



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

윤현근 교수 지도
석사학위 청구 논문

십자화과 채소류 추출물이
Proteasome 활성화에 미치는 영향

2023

성신여자대학교 일반대학원
미래응용과학학과
전은영

십자화과 채소류 추출물이
Proteasome 활성화에 미치는 영향

윤현근 교수 지도

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2022년 11월

성신여자대학교 일반대학원

미래응용과학학과

전은영

인 준 서

전은영의 석사학위 논문으로 인준함

2022년 11월

심사위원장

현정은 (서명 ~~또는 인~~)

심사위원

이승민 (서명 ~~또는 인~~)

심사위원

윤현근 (서명 ~~또는 인~~)

성신여자대학교 일반대학원

논문개요

26S proteasome은 진핵세포의 주요 protease로, 다양한 세포 경로를 조절하고 잘못 접히거나 응집되기 쉬운 손상된 단백질을 제거하여 세포 내의 단백질을 유지한다. NF- κ B는 세포사멸을 억제하고 혈관신생, 세포 증식 및 이동을 유도하여 종양 형성에 결정적인 역할을 하는데, 26S proteasome은 세포질에서 비활성화 상태로 존재하는 NF- κ B가 핵 안으로 이동하여 활성화 상태가 되도록 유도한다. 따라서 26S proteasome의 억제는 NF- κ B의 기능을 조절하여 암 발생을 예방하는데 있어 중추적인 역할을 할 수 있다. 본 연구에서는 전 세계적으로 많이 소비되고 식물생리활성물질이 풍부한 십자화과 채소 중 양배추, 적양배추, 콜라비, 브로콜리, 케일을 선정하여 항암 및 항산화 효과를 확인하기 위해 간암 세포에서 채소류 추출물의 세포 증식, 항산화능 및 항산화 성분 함량, proteasome 억제 효과, NF- κ B 활성 억제 효과를 평가하였으며, proteasome 억제 효과가 높았던 케일과 적양배추를 LC-MS를 통해 분석하였다. MTT assay를 이용한 세포 증식 실험에서 5가지의 채소류 추출물 모두 유의적으로 세포 증식률을 감소시켰다($p < 0.05$). DPPH, ABTS, CAA assay를 이용한 항산화능 측정 실험에서는 적양배추와 케일 추출물이 유의적으로 높은 항산화능을 보였다($p < 0.05$). 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 측정을 이용한 항산화 성분 함량 측정 실험에서는 항산화능 측정 실험 결과와 동일하게 적양배추와 케일 추출물이 유의적으로 높은 항산화 성분 함량을 나타냈다($p < 0.05$). Proteasome 역가 저해율 측정 실험 결과, 세포 추출물을 이용한 CE assay에서는 5가지의 채소류 추출물이 모두 유의적으로 proteasome 억제 효과를 보이지 않았지만, 세포 내 proteasome 역가 저해율을 측정하는 CPIA assay에서는 5가지의 채소류 추출물 모두 유의적으로 proteasome 억제 효과를 보였으며, 특히 케일 추출물

이 농도 의존적으로 유의하게 가장 높은 proteasome 역가 저해율을 나타냈다($p < 0.05$). 또한, proteasome 억제 효과가 있다고 알려진 genistein과 배당체인 genistin, 6"-O-Malonylgenistin, 6"-O-Acetylgenistin의 proteasome 역가 저해율 측정에서는 CE assay에서 효과가 없었던 6"-O-Acetylgenistin이 CPIA assay에서 유의적으로 가장 높은 proteasome 역가 저해율을 보였다($p < 0.05$). 케일 추출물이 NF- κ B 활성화에 미치는 영향을 western blot 실험을 통해 확인한 결과, 100 μ g/mL 농도에서 NF- κ B 활성이 유의적으로 억제되었다($p < 0.05$). Proteasome 역가 저해율이 가장 높았던 케일 추출물을 용매별로 분획하여 proteasome 역가 저해율 측정 실험을 진행한 결과, hexane, chloroform, ethyl acetate 분획물에서 유의적으로 proteasome 억제 효과를 나타내었다($p < 0.05$). 케일 추출물과 분획물들을 LC-MS로 분석한 결과에서는 검출기 파장 320nm의 경우 ethyl acetate 분획물, 검출기 파장 450nm의 경우 hexane 및 ethyl acetate 분획물에서 다른 분획물들에 비해 면적 값이 큰 peak가 분석되었다. 특히, hexane 분획물에서는 carotenoid 계열의 lutein이 분석되었고, ethyl acetate 분획물에서는 hydroxycinnamic acid 계열의 trisinapoyl-diglucoside를 포함하여 다양한 polyphenols가 분석되었다. 적양배추 추출물은 LC-MS 분석을 통해 16가지의 cyanidin 배당체를 확인하였다. 따라서 본 연구에서는 양배추, 적양배추, 콜라비, 브로콜리, 케일은 천연 항산화제 및 proteasome 억제제로 활용될 수 있으며, 특히 케일은 다양한 식물생리활성물질들이 proteasome 억제제로 작용할 수 있고, 적양배추는 cyanidin 계열의 물질들이 proteasome 억제제로 작용할 수 있다는 점을 확인하였다.

목 차

논문개요

I. 서론	1
II. 재료 및 방법	11
1. 실험 재료	11
1) 시료 및 세포	11
2) 시약 및 기기	11
2. 실험 방법	14
1) 십자화과 채소류 추출물 제조	14
2) 케일 추출물 및 분획물 제조	14
3) HepG2 세포 배양	15
4) 세포 독성 측정 (Cell cytotoxicity)	17
5) 세포 증식 측정 (Cell proliferation)	18
6) 항산화능 측정	19
① DPPH assay	19
② ABTS assay	19
③ Cellular Antioxidant Activity (CAA) assay	20
7) 항산화 성분 함량 측정	21
① 총 폴리페놀 함량 측정	21
② 총 플라보노이드 함량 측정	21
8) Proteasome 역가 저해율 측정	22

① Cell Extract Proteasome Inhibitory Activity (CE) assay	22
② Cellular Proteasome Inhibitory Activity (CPIA) assay	23
9) Western blot	24
10) LC-MS를 이용한 proteasome 억제 물질 분석	26
11) 통계처리	31
III. 결과 및 고찰	32
1. 십자화과 채소의 세포 독성 (Cell cytotoxicity)	32
2. 십자화과 채소의 세포 증식 (Cell proliferation)	32
3. 십자화과 채소의 항산화능	37
1) DPPH 라디칼 소거능	37
2) ABTS 라디칼 소거능	37
3) 세포 내 항산화능 (CAA)	37
4. 십자화과 채소의 항산화 성분 함량	41
1) 총 폴리페놀 함량	41
2) 총 플라보노이드 함량	41
5. 십자화과 채소의 proteasome 역가 저해율	44
1) 십자화과 채소의 proteasome 역가 저해율 스크리닝	44
2) 케일의 농도별 proteasome 역가 저해율	47
6. Genistein 및 배당체의 proteasome 역가 저해율	49
7. 케일에 의한 NF- κ B 활성 변화	51
8. Proteasome 억제 물질 분석	53
1) 케일 추출물 및 분획물의 proteasome 역가 저해율 비교	53
2) 케일 추출물 및 분획물의 LC-MS 분석	55
3) 적양배추 추출물의 LC-MS 분석	61

IV. 결론 63

참고문헌

ABSTRACT

List of Figures

Fig. 1. Composition of 26S proteasome.	2
Fig. 2. Overview of the ubiquitin proteasome system.	4
Fig. 3. The schematic diagram showing the regulation NF- κ B functions by the 26S proteasome.	6
Fig. 4. Extraction and fraction procedure of kale.	16
Fig. 5. Effects of cabbage extracts (A), red cabbage extracts (B), kohlrabi extracts (C), broccoli extracts (D), kale extracts (E) on cytotoxicity and proliferation in HepG2 cells.	34
Fig. 6. DPPH (A), ABTS (B) scavenging activity and cellular antioxidant activity value (C) of cabbage, red cabbage, kohlrabi, broccoli, kale extracts.	39
Fig. 7. Total phenolics (A) and flavonoid (B) contents of cabbage, red cabbage, kohlrabi, broccoli, kale extracts.	43
Fig. 8. Proteasome inhibitory activities of cabbage, red cabbage, kohlrabi, broccoli, kale extracts. (A): cell extract proteasome inhibitory activity (CE assay), (B): cellular proteasome inhibitory activity (CPIA assay).	46
Fig. 9. Cellular proteasome inhibitory activity of kale extract.	48
Fig. 10. Proteasome inhibitory activities of Genistein and its glycosides. (A): cell extract proteasome inhibitory activity (CE assay), (B): cellular proteasome inhibitory activity (CPIA assay).	50
Fig. 11. Effect of kale extract on TNF- α -induced NF- κ B activation. ..	52
Fig. 12. Proteasome inhibitory activities of kale extract and solvent fractions.	54
Fig. 13. Chromatograms of kale extract and fractions at detector wavelength 320nm.	57
Fig. 14. Chromatograms of kale extract and fractions at detector wavelength 450nm.	58
Fig. 15. Chromatograms of lutein standard and kale hexane fraction.	59

Fig. 16. Chromatograms of kale ethyl acetate fraction. 60
Fig. 17. Chromatograms of anthocyanins in red cabbage extract..... 62

List of Tables

Table 1. LC-MS analysis conditions of kale extract and fractions.	27
Table 2. LC-MS analysis conditions of lutein in kale.	28
Table 3. LC-MS analysis conditions of phenolic compounds in kale. ..	29
Table 4. LC-MS analysis conditions of anthocyanins in red cabbage extract.	30
Table 5. Retention time and MS data of anthocyanins in red cabbage extract.	62

I. 서론

Proteasome은 세포 내 단백질을 분해하는 거대한 단백질 복합체로, 진핵세포에서 적절한 시기에 주요 단백질을 제거하여 다양한 세포 경로를 조절하고 잘못 접히거나 응집되기 쉬운 손상된 단백질을 제거함으로써 세포 내의 단백질을 유지한다[1]. 26S proteasome은 진핵세포의 주요 protease로, 세포질과 핵에서 단백질 분해를 담당한다[2]. 26S proteasome은 proteasome의 단백질 분해 활성을 부여하는 20S core particle (CP)과 유비퀴틴 단백질 접합체에 대한 ATP 의존성과 특이성을 나타내는 19S regulatory particle (RP)로 구성된다[3]. 20S CP는 주변에 위치한 α -ring 2개와 중앙에 위치한 β -ring 2개로 이루어진 원통형 구조이다. α -ring과 β -ring은 각각 7개의 subunit (α 1- α 7, β 1- β 7)으로 구성되어 있는데, β -subunit 7개 중 3개의 subunit (β 1, β 2, β 5)만이 진핵생물에서 단백질 분해 활성을 보유한다. 이들은 기질 특이성에 따라 caspase-like (β 1), trypsin-like (β 2), chymotrypsin-like (β 5)로 불린다. caspase-like (β 1)는 산성 잔기를 우선적으로 절단하고 trypsin-like (β 2)는 염기성 잔기를 우선적으로 절단하며 chymotrypsin-like (β 5)는 소수성 잔기를 우선적으로 절단한다[1, 3]. 19S RP는 기질 인식, 탈유비퀴틴화, 단백질 풀림, 20S CP로의 기질 전위 등 다양한 기능을 담당하며, lid와 base로 구성되어 있다. Base는 6개의 ATPase subunit (Rpt1-6)과 4개의 non-ATPase subunit (Rpn1, 2, 10, 13)으로 구성되어 있고, Lid는 9개의 subunit (Rpn3, 5-9, 11, 12, Rpn15/Sem1)으로 구성되어 있다. 유비퀴틴화된 기질과 proteasome의 결합은 base의 유비퀴틴 수용체인 Rpn1, Rpn10, Rpn13에 의해 촉진되는 반면, 결합된 기질의 탈유비퀴틴화는 탈유비퀴틴화 효소인 Rpn11에 의해 발생한다. 기질의 풀림과 전위는 ATP를 기반으로 하며, 20S CP와 상호작용하고 gate 개방을 조절하는 6개의 ATPase에 의해 실행된다[4].

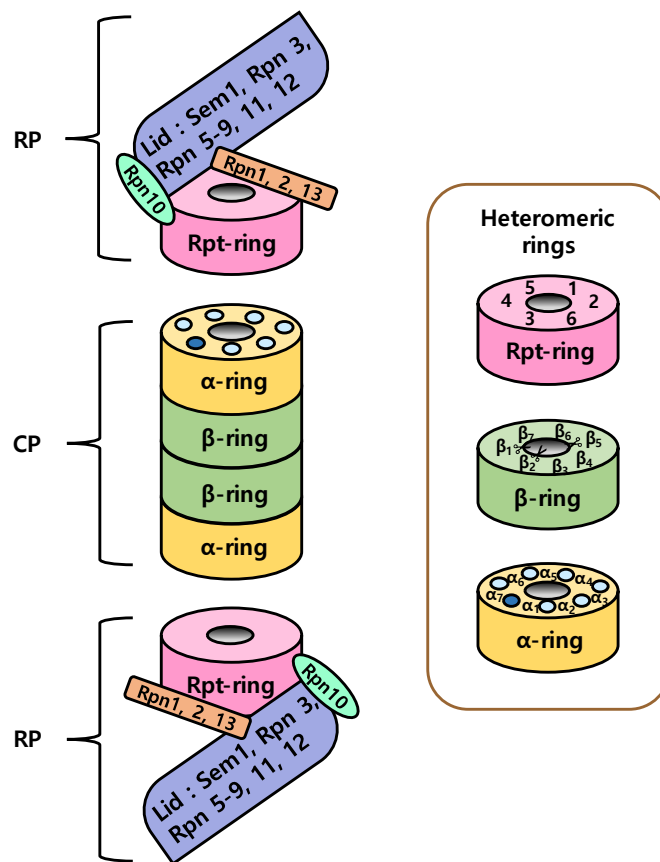


Fig. 1. Composition of 26S proteasome. The 26S proteasome consists of a 20S core particle composed of two α -rings and two β -rings, and a 19S regulatory particle composed of lid and base subcomplexes. In particular, the β_1 , β_2 , and β_5 subunits of the β -ring have proteolytic activity in eukaryotes[5].

세포 내 단백질은 ATP-의존성 26S proteasome에 의해 분해되며, 76개의 아미노산으로 구성된 ubiquitin에 의해 표지된다[6]. Ubiquitin Proteasome System (UPS)은 단백질의 80-90%를 분해하는 시스템으로, 잘못 접히거나 산화 또는 손상된 단백질을 분해시켜 세포 기능을 조절하고 단백질 항상성을 유지한다[7, 8]. UPS는 세포 주기와 종양 형성에 관여하는 핵심 단백질의 대사 회전을 조절하기 때문에 잠재적인 항암 표적이 될 수 있다[7]. 또한 UPS는 염증 반응, 면역 반응, 신호 전달, 전사 조절, DNA 복구, 세포 소기관의 생합성 등과 관련된 단백질의 분해를 선택적으로 중재하여 세포의 생리적 기능을 조절한다[6, 9]. 따라서 UPS는 암을 비롯하여 알츠하이머병, 파킨슨병과 같은 신경 무력증과 헌팅톤병, 척수소뇌성 운동실조증과 같은 유전성 신경 질환에도 관련되는 것으로 보고되면서 ubiquitin을 매개로 하는 단백질 분해 경로에 대한 관심도 확대되고 있다[9]. UPS는 proteasome, ubiquitin (Ub), Ub-activating enzyme (E1), Ub-conjugating enzyme (E2), Ub ligating enzyme (E3), deubiquitin enzyme (DUB)으로 구성된다[7]. Ubiquitin은 ATP 의존적인 방식으로 E1에 의해 활성화되어 E2에 전달되고 E3에 의해 기질 단백질로 이동한다[10]. 그 후, UPS의 substrate-recruiting components는 ubiquitin의 C-말단 glycine 잔기와 기질 단백질 lysine 잔기의 ϵ -amino기 사이의 isopeptide 결합 형성을 촉매한다[11]. 이러한 과정이 반복되면 기질 단백질에 polyubiquitination된 사슬이 연결되어 UPS에서 단백질의 분해를 담당하는 26S proteasome에 의해 기질이 분해된다[11, 12]. Deubiquitinating enzymes (DUBs)는 mono-ubiquitinations를 제거하거나, ubiquitin 사슬을 자르거나 제거하여 기질 단백질로부터 ubiquitin을 제거한다[10].

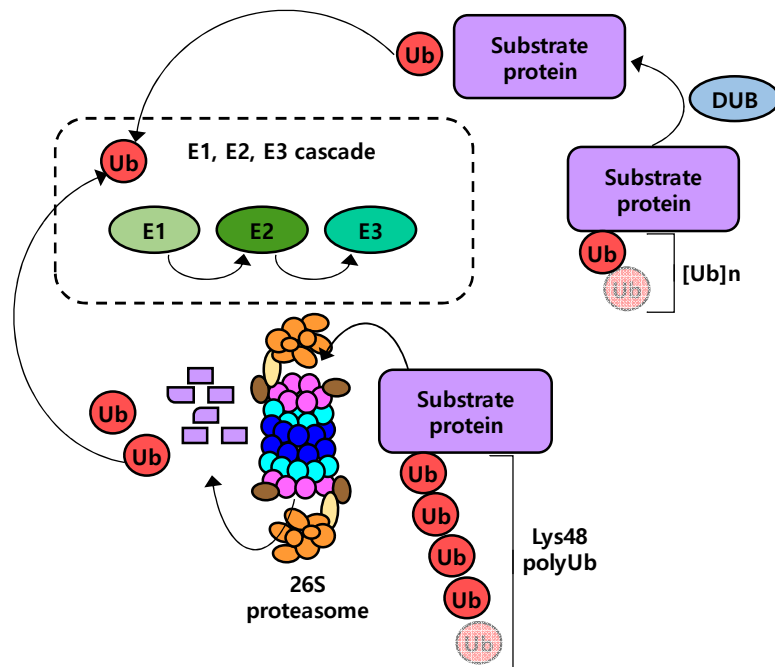


Fig. 2. Overview of the ubiquitin proteasome system. Ubiquitin is polyubiquitinated through repeated ubiquitination cycles by E1, E2, and E3, which constitute the UPS. Then, substrate proteins are degraded by the 26S proteasome. DUBs remove ubiquitin from substrate proteins[10].

Proteasome에 의해 영향을 받는 대표적인 경로에는 NF- κ B 신호 경로의 활성화가 있다[13]. NF- κ B는 염증, 면역, 세포 증식 및 사멸과 관련된 유전자의 발현을 조절하며[14], 5개의 유전자로 구성되어 NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), RelA (p65), c-Rel, RelB로 구분된다[15]. NF- κ B는 여러 세포에 공통적으로 존재하는 전사인자인데, 염증 매개 물질인 tumor necrosis factor (TNF- α), IL-2, IL-6, IL-8, lymphotoxin, GM-CSF, interferon- β 등의 5' 단 말부에 κ B 결합부가 존재하고 있어 이들의 전사가 NF- κ B에 의해 조절된다. 따라서 NF- κ B는 염증성 물질들의 전사를 촉진하기 때문에 염증 반응에서 중심 역할을 한다[16]. 암과 관련이 있는 NF- κ B의 기능은 세포 증식 및 세포 사멸에 관여하는 것으로, 세포 증식의 경우 NF- κ B는 cyclin A, cyclin D1 또는 cyclin-dependent kinase 6 (CDK6)와 같은 세포주기 조절인자의 발현을 조절하며, NF- κ B의 활성화를 통해 TNF- α 에 의해 유도된 세포 사멸로부터 세포를 보호한다[14]. NF- κ B는 세포질에서 I κ B와 결합하여 비활성화 상태로 존재하다가 박테리아, 곰팡이, 바이러스, 염증성 사이토카인, 스트레스, 자외선, 발암물질 같은 외부 자극에 의해 인산화 및 폴리우비퀴틴화된 I κ B가 26S proteasome에 의해 분해되면 I κ B와 분리되어 활성화된다. 이를 통해 NF- κ B는 핵으로 이동하여 표적 유전자의 전사를 활성화시킨다[17, 18]. 암에서 종양 촉진 역할을 하는 NF- κ B는 선택적 억제제를 통해 임상 치료에 적용될 수 있다. 항염증제인 aspirin과 sodium salicylate는 I κ B α 의 분해를 차단하여 NF- κ B를 억제하는 것으로 나타났으며, anti-TNF- α 항체는 임상에 적용되어 부분적인 질병 안정 효과가 있는 것으로 평가되었다[19]. 따라서 NF- κ B의 기능이 잘못 조절되면 암의 발생에 영향을 미치는데, proteasome이 억제되면 NF- κ B가 억제되어 apoptosis 증가와 세포 부착 감소 등으로 이어지기 때문에 26S proteasome은 NF- κ B의 기능을 조절하는데 중추적인 역할을 한다고 볼 수 있다[3].

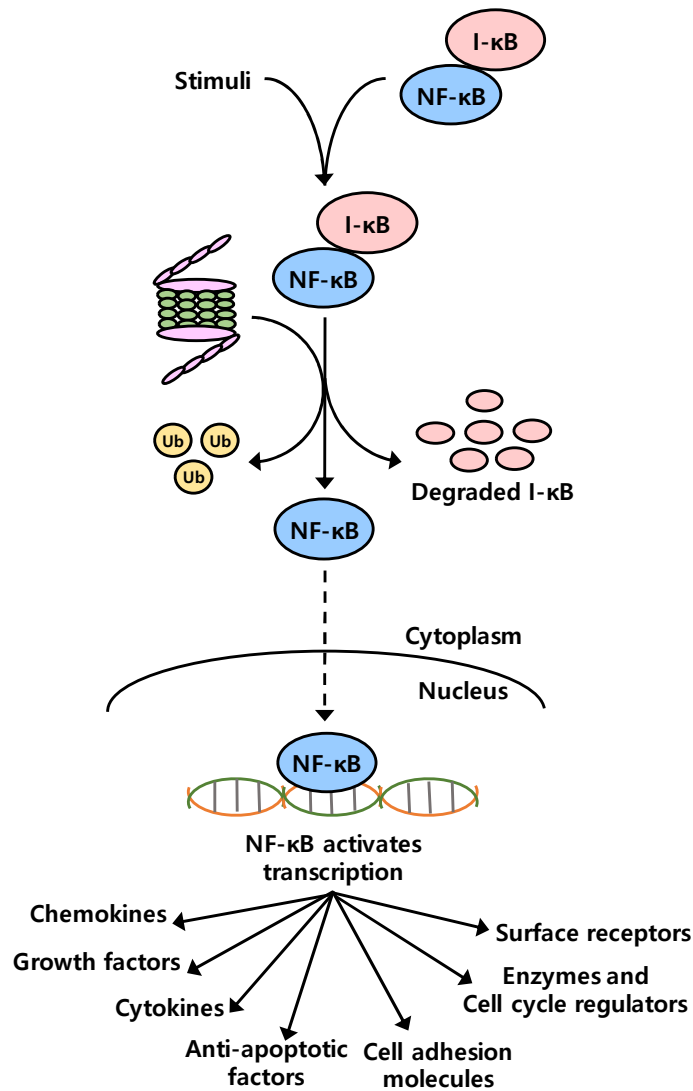


Fig. 3. The schematic diagram showing the regulation NF-κB functions by the 26S proteasome. NFκB is separated from IκB by external stimuli such as ionizing and ultraviolet irradiation, pathogens, stress, free radicals, and cytokines. As a result, NFκB translocates to the nucleus, which is associated with the occurrence of cancer[3].

Proteasome inhibitor는 화학적으로 합성된 펩타이드 유도체와 자연에서 유래한 화합물로 분류되어 진다. 합성된 peptidyl inhibitor는 화학적 구조에 따라 peptide aldehyde, peptide boronate, peptide sulfone으로 분류된다. MG132는 1세대 합성 tripeptide aldehyde이며, proteasome의 $\beta 5$ subunit을 억제한다. CEP1612는 proteasome의 chymotrypsin 유사 단백질 분해 활성화에 선택적인 dipeptide aldehyde proteasome inhibitor이다. ZLVS와 NLVS는 chymotrypsin 유사 proteasome 활성을 억제하는 vinyl sulfone이다. MG262는 MG132의 boronate 유사체이며, anti-proteasome 활성이 100배 증가한 proteasome inhibitor이다[20]. Bortezomib은 FDA의 승인을 받은 다발성 골수종 및 외투세포림프종 치료를 위한 boronate 형태의 항암제로, proteasome의 chymotrypsin 유사 활성 억제제이다[21, 22]. 천연물 유래 proteasome inhibitor에는 *Kitasatospora* 종에서 분리한 tripeptide aldehyde인 Tyropeptin A가 있으며, proteasome의 chymotrypsin 유사 활성을 억제한다. Carfilzomib은 FDA 승인을 받은 2세대 proteasome inhibitor로[23], epoxomicin의 세포 투과성 tetrapeptide epoxyketone 유사체이다. Carfilzomib은 주로 proteasome의 chymotrypsin 유사 부위를 억제하며, 고용량에서는 trypsin 및 caspase 유사 부위에 억제 효과를 보인다[24]. Non-peptide proteasome inhibitor에는 전통 약초인 뇌공등에서 분리된 quinone-methide triterpene 형태의 Celastrol, Ashwagandha에서 분리된 steroidal lactones 형태의 Withaferin A, 곰팡이의 대사산물인 Gliotoxin, 녹차의 카테킨 성분인 EGCG가 있다[20, 25, 26]. Celastrol은 인간 다발성 골수종 세포의 $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ proteasome 활성을 억제하고[25], Withaferin A는 인간 전립선암 세포와 악성 흉막 중피종 세포에서 proteasome의 chymotrypsin 유사 활성을 억제하였다[27]. Gliotoxin은 인간 20S proteasome의 chymotrypsin 유사 활성을 억제하며[28], EGCG는 유방암 및 전립선암 세포에서 chymotrypsin 유사 활성을 억제한다고 보고되었다[29].

십자화과 채소는 꽃잎이 십자형인 쌍떡잎식물로 양배추, 브로콜리, 콜리플라워, 무, 순무, 청경채 등이 포함되며, 338속 3709종으로 구성되어 있다[30, 31]. 십자화과 채소의 주요 영양 성분은 탄수화물, 단백질, 비타민, 미네랄이며, 지방 함량이 거의 없어 저지방 및 심장 건강을 위한 식단의 중요한 성분이다. 십자화과 채소는 다량 및 미량 영양소 외에도 여러 만성 질환 발생의 위험을 감소시킬 수 있는 식물생리활성물질이 풍부하다[32]. 십자화과 채소의 주요 식물생리활성물질은 glucosinolates와 그 분해 생성물 (isothiocyanates, indoles), phenolic compounds (flavonoids, hydroxycinnamic acids, anthocyanins, lignans), tocopherol (α -, γ -, δ -tocopherols), carotenoids (α -, β -carotene, lutein), fatty acids (palmitic, stearic, oleic, linoleic, linolenic, eicosenoic, erucic acids)이다[33]. 십자화과 (*Brassicaceae*) 식물 중 가장 중요하게 분류되는 *Brassica* 속은 오랜 농업의 역사를 가지고 있으며, 콜, 겨자, 유채 그룹으로 분류된다. 이 중 콜 작물 (*B. oleracea*)은 전 세계적으로 가장 많이 소비되는 잎이 많은 줄기 채소로, 양배추, 브로콜리, 콜리플라워, 방울다다기양배추, 케일 등이 포함되며, 비타민 C와 엽산의 훌륭한 공급원이다[31]. 특히 *B. oleracea* 품종인 양배추, 적양배추, 콜라비, 브로콜리, 케일은 항암 및 항산화 성분 등의 기능성을 갖는 채소로, 건강에 도움을 주는 기능성 성분에 대한 관심이 증가함에 따라 소비량이 증가하는 추세이다[34, 35, 36].

양배추는 지중해 연안이 원산지로서, 우리나라에서 가장 많이 소비되는 십자화과 채소 중의 하나이다[37]. 양배추는 필수아미노산인 lysine, 필수지방산인 linolenic acid, carotene, 비타민 C, 섬유질 등의 영양성분과 sinigrin, glucoraphanin, glucobrassicin 등의 glucosinolates가 풍부하다. 또한, 위액 분비를 억제하고 궤양 조직의 세포 재생을 촉진하는 물질로 알려진 S-methylmethionine (SMM)이 다른 십자화과 채소에 비해 다량 함유되어 있어 항염증, 통증 억제, 지방 축적 억제 등의 효과를 나타낸다[38]. 적양배추는

흰 양배추에 비해 과당, 포도당, lysine, 비타민 C 등의 영양 성분이 더 많고 selenium이 풍부하다. 적양배추는 indole-3-carbinol (I3C)를 함유하고 있어 암이 진행되는 과정에 관여하는 효소의 작용을 차단한다[39]. 특히 적양배추에 다량으로 함유된 성분인 anthocyanin은 항산화 효능이 뛰어나서 암세포 증식을 억제하고 세포의 염증 반응을 줄이며, free radical에 의한 세포 손상을 막아 심장질환과 암을 예방한다[39, 40]. 또한 적양배추는 항노화, 항균, 콜레스테롤 저하, 심장 및 간 보호 등에도 효과가 있는 것으로 알려졌다. 이외에도 적양배추는 β -carotene과 lutein 등에 의해 눈의 황변성을 감소시켜 눈 건강에 효과를 나타낸다[39, 41]. 콜라비는 북유럽이 원산지인 두해살이 식물로[42], anthocyanin, carotenoid, 비타민 C, glucosinolate 등을 풍부하게 함유하고 있다. 콜라비는 열량이 낮으며 식이섬유소가 풍부해 다이어트에 유효하다고 알려져 있으며, 항암·항산화·항증식·항균 효과가 보고되었다[43, 44]. 브로콜리는 β -carotene, rutin, ascorbic acid, selenium, quercetin, glutathione, indole, sulforaphane, glucosinolate 등이 함유되어 있어 세계 10대 건강식품 중의 하나로 알려져 있다[45, 46]. 브로콜리에 포함된 sulforaphane은 혈당과 콜레스테롤 수치를 감소시키고 항산화 활성을 발휘하여 암과 같은 만성 질환 예방에 효과를 보이며, 브로콜리 유래의 indole-3-carbinol과 3,3'-diindolylmethane은 전립선 암세포에서 농도 의존적인 항암 활성을 나타내었다고 보고되었다[46]. 케일은 비타민, 미네랄, carotenoids, glucosinolates, polyphenols 등을 함유하며, 특히 비타민 A, 비타민 K, 비타민 C 및 엽산과 칼륨, 칼슘 및 마그네슘, 식이 섬유가 풍부하다[47]. 케일은 flavonoids와 같은 식물생리활성물질이 풍부한데, 케일의 flavonoids에는 주로 hydroxycinnamic acids로 아실화되는 isorhamnetin, quercetin, kaempferol의 배당체로 구성된 flavonol 유도체가 존재한다[48]. 이와 같이 다양한 성분이 함유되어 있는 케일은 장 질환, 비만, 영양 실조, 심혈관 질환과 암 같은 만성 질환을 치료하는 약용 식품으로 널리

알려져 있다[47].

지금까지 진행된 십자화과 채소의 proteasome 활성 억제와 관련된 연구에서는 십자화과 채소에서 유래한 isothiocyanates의 일종인 benzyl isothiocyanate와 phenethyl isothiocyanate가 인간 다발성 골수종 세포에서 proteasome의 chymotrypsin, trypsin, caspase 유사 활성을 억제했으며[49], benzyl isothiocyanate는 인간 췌장암 세포에서 NF- κ B 활성을 억제했고[50], phenethyl isothiocyanate는 인간 전립선암 세포에서 NF- κ B 활성을 억제함으로써 세포 사멸을 유도하였다[51]. 또한 십자화과 채소 중 적양배추에 풍부하다고 보고된 anthocyanin과 anthocyanidin이 인간 백혈병 세포에서 proteasome의 chymotrypsin 유사 활성을 억제했으며[52], 케일에 다량 함유되어 있다고 알려진 quercetin과 kaempferol은[53] 인간 백혈병 세포에서 proteasome의 chymotrypsin 유사 활성을 억제했다고 보고 되었다[54].

현재까지 보고된 연구를 통해 인간 간암 세포에서 다양한 십자화과 채소의 proteasome 역가 저해율을 비교한 실험은 진행되지 않았으며, 특정 채소의 성분을 분석하여 proteasome 억제제로 작용하는 물질을 밝힌 실험도 많이 진행되지 않았음을 알 수 있다. 따라서 본 연구에서는 소비량이 많고 식물생리활성물질이 풍부한 십자화과 채소류 5종을 선정하여 세포 독성과 증식, 항산화능, proteasome 역가 저해율, NF- κ B 활성 억제를 평가하고, proteasome 역가 저해율이 높은 채소류의 성분을 분석하여 인체에 부작용을 나타내지 않는 천연 proteasome 억제 물질을 찾고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 시료 및 세포

추출물 제조에 사용된 5가지의 십자화과 채소 (*Brassica oleracea*)는 2021년 8월 25일에 구입하였다. 양배추 (*Brassica oleracea L. var. capitata*), 적양배추 (*Brassica oleracea L. var. capitata f. rubra*), 케일 (*Brassica oleracea L. var. acephala DC*)은 롯데슈퍼 수유점에서 구입하였고, 브로콜리 (*Brassica oleracea L. var. Italica Plenck*)는 수유시장에서 구입하였으며, 콜라비 (*Brassica oleracea L. var. gongylodes*)는 프레시잉에서 구입하였다. Proteasome 억제 물질 분석을 위해 추출물 및 분획물 제조에 사용된 케일 (*Brassica oleracea L. var. acephala DC*)은 2022년 11월 16일 엠마트 수유점에서 구입하였다.

실험에 사용된 인간 간암 세포주인 HepG2 세포 (human hepatocarcinoma cell line)는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 분양받았다.

2) 시약 및 기기

추출에 사용된 용매인 ethyl alcohol은 DAEJUNG (Daejung Chemicals & Metals Co. Ltd, Korea)에서 구입하였다. 분획에 사용된 용매인 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, n-butanol은 DAEJUNG (Daejung Chemicals & Metals Co. Ltd, Korea)에서 구입하였다. 세포 배양에 사용된 minimum essential media (MEM)는 Hyclone (Logan, Utah, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS)은 Welgene (Gyeongsan, Korea)에서 구입하였다.

No-phenol red MEM은 Gibco (Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. Penicillin-streptomycin, trypsin-EDTA solution, phosphate-buffered saline (PBS), dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 세포 독성 및 증식 실험에 사용된 thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 항산화능 측정 실험에 사용된 L-ascorbic acid (Vitamin C)는 DAEJUNG (Daejung Chemicals & Metals Co. Ltd, Korea)에서 구입하였고, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)은 Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA)에서 구입하였다. 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), 2,2'-Azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH), quercetin, 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 항산화 성분 함량 측정 실험에 사용된 gallic acid, catechin, Folin & Ciocalteu's phenol reagent는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Sodium carbonate (Na_2CO_3)는 TEDIA (Fairfield, OH, USA)에서 구입하였고, sodium nitrite (NaNO_2)는 Junsei Chemical Co. Ltd. (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. Aluminium chloride (AlCl_3) 및 sodium hydroxide (NaOH)는 DAEJUNG (Daejung Chemicals & Metals Co. Ltd, Korea)에서 구입하였다. Proteasome 역가 측정 실험에 사용된 proteasome substrate III (Suc-LLVY-AMC)는 Calbiochem (San Diego, CA, USA)에서 구입하였고, MG-132 (Z-Leu-Leu-Leu-al), genistein, genistin은 Sigma-aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 6"-O-Malonyl genistin은 Carbosynth (Compton, Berkshire, UK), 6"-O-Acetyl genistin은 Nagara Science Co., Ltd. (Gifu, Japan)에서 구입하였다. 단백질 정량에 사용된 DC Protein

assay kit I 은 Bio-Rad (Hercules, CA, USA)에서 구입하였다. Western blot 실험에 사용된 tumor necrosis factor- α (TNF- α)는 Sigma-aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, Nuclear Extract Kit는 Active Motif (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다. Immobilon-P transfer membrane은 Millipore (Billerica, MA, USA)에서 구입하였다. primary antibody인 NF- κ B p65는 Santa cruz biotechnology (Dallas, TX, USA)에서 구입하였고, anti-nucleolin은 Millipore (Billerica, MA, USA)에서 구입하였다. secondary antibody인 anti-mouse IgG (HRP-linked antibody)와 anti-biotin (HRP-linked antibody)은 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. Western blot detection kit인 ECL solution은 ELPIS-Biotech (Daejeon, Korea)에서 구입하였다. 분석에 사용된 용매인 formic acid와 methyl alcohol은 DAEJUNG (Daejung Chemicals & Metals Co. Ltd, Korea)에서 구입하였고, acetonitrile은 Honeywell Burdick & Jackson (Muskegon, MI, USA)에서 구입하였다.

실험에 사용한 기기는 homogenizer (Tops, Daeillab service, Seoul, Korea), aspirator (A-3S, Eyela, Japan), 회전 증발 농축기 (Hei-VAP ML Adv/Pre, Heidolph, Germany 및 N-N series, Eyela, Tokyo, Japan), 동결 건조기 (FD8508, IShinBioBase Co., Ltd., Dongducheon, Korea), microplate reader (Spectramax plus 384, Molecular devices, San Jose, CA, USA), fluorescence microplate reader (SpectraMax M5, Molecular Devices), chemidoc (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA), LC-MS (HP1100 / Agilent6130, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)이다.

2. 실험 방법

1) 십자화과 채소류 추출물 제조

십자화과 채소류 추출물 제조는 선행 연구를 참고하여 수행하였다[55]. 채소 50g당 차가운 70% ethanol (v/v) 400g과 함께 blender로 갈아준 다음 ice box에서 homogenizer로 균질화시켰다. 균질화한 용액을 aspirator를 사용하여 filter paper (Whatman No. 2)로 여과한 다음 여과액을 회전 증발 농축기를 사용하여 45°C에서 90% 이상 증발시켜 농축하였다. 농축액에 증류수를 첨가하여 부피를 20mL로 맞추고 -80°C deep freezer에서 완전히 얼린 후 동결 건조기를 사용하여 분말화하였다. 분말화하여 얻은 양은 양배추 2.56g, 적채 2.47g, 콜라비 1.72g, 브로콜리 1.80g, 케일 1.51g이었고, 실험에 사용할 때까지 -20°C 냉동고에서 보관하였다.

2) 케일 추출물 및 분획물 제조

케일 추출물 제조는 선행 연구를 참고하여 수행하였다[55]. 케일 100g을 차가운 70% ethanol (v/v) 800g과 함께 blender로 갈아준 다음 ice box에서 homogenizer로 균질화시켰다. 균질화한 용액을 aspirator를 사용하여 filter paper (Whatman No. 2)로 여과한 다음 여과액을 회전 증발 농축기를 사용하여 35°C에서 90% 이상 증발시켜 농축하였다. 농축액에 증류수를 첨가하여 부피를 20mL로 맞추고 -80°C deep freezer에서 완전히 얼린 후 동결 건조하여 5.07g의 분말을 얻었다.

용매별 분획은 선행 연구를 참고하여 수행하였다[56]. 케일 추출물 4g을 3차 증류수에 1:10 (w/v)으로 희석한 후, n-hexane, chloroform, ethyl acetate, n-butanol, 3차 증류수의 순서로 가하여 분획물을 얻었다(Fig. 7). 용매별 분획물은 감압 농축 및 동결 건조하여 n-hexane 분획물 0.0337g,

chloroform 분획물 0.0033g, ethyl acetate 분획물 0.0053g, n-butanol 분획물 0.4247g, 3차 증류수 분획물 2.9509g을 얻었다.

3) HepG2 세포 배양

HepG2 세포는 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 MEM 배지를 이용하여 37℃, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 배양하였고, 배지는 3-4일에 한 번씩 교체하였다.

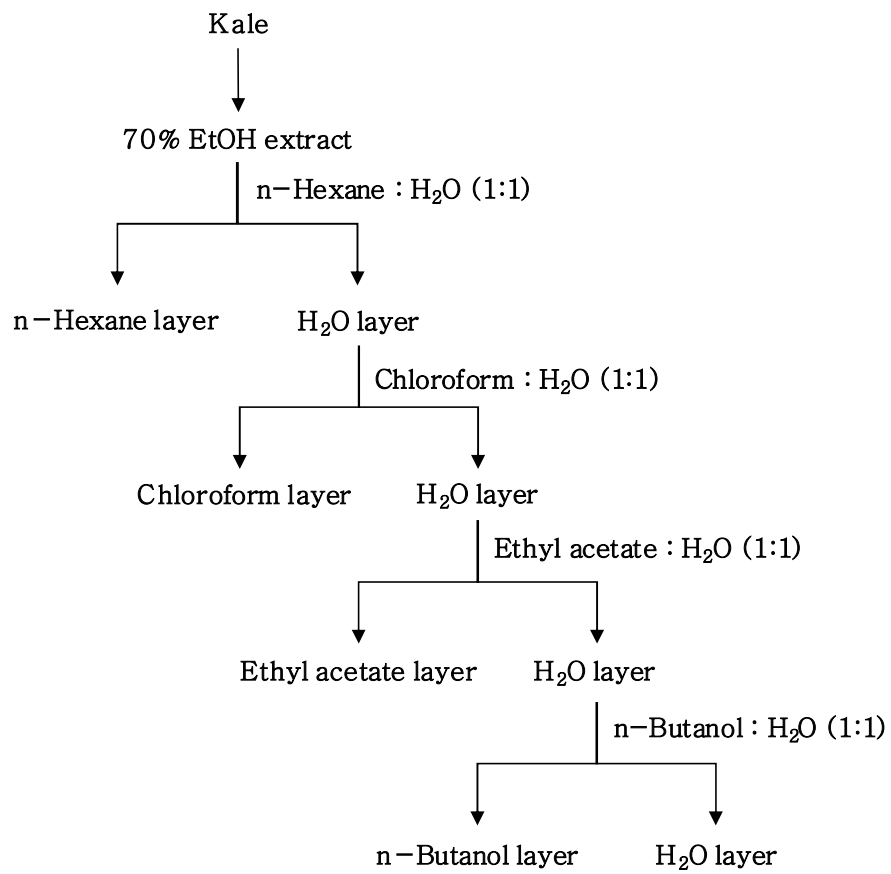


Fig. 4. Extraction and fraction procedure of kale.

4) 세포 독성 측정 (Cell cytotoxicity)

시료에 따른 세포 독성은 선행 연구를 참고하여 측정하였다[57]. HepG2 세포를 96-well plate에 6×10^4 cell/well의 농도로 $100 \mu\text{L}$ 씩 분주하고 37°C , 5% CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 배지를 제거하고, serum-free MEM 배지를 사용하여 0, 10, 30, 50, 70, $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 희석한 시료를 well당 $100 \mu\text{L}$ 씩 처리하고 37°C , 5% CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 배지를 제거하고, 각 well에 $0.5 \text{mg}/\text{mL}$ 농도의 MTT 용액 $100 \mu\text{L}$ 를 처리하여 37°C , 5% CO_2 incubator에서 4시간 동안 배양하였다. MTT 용액을 제거한 후, formazan 결정을 녹이기 위해 각 well에 DMSO $100 \mu\text{L}$ 씩 넣어 30분 동안 교반하였다. 그 후 microplate reader를 사용하여 590nm 에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값은 다음 식에 대입하여 세포 독성률을 구하였다.

$$\text{cell cytotoxicity (\%)} = \frac{\text{control absorbance} - \text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}} \times 100$$

5) 세포 증식 측정 (Cell proliferation)

시료에 따른 세포 증식은 선행 연구를 참고하여 측정하였다[57]. HepG2 세포를 96-well plate에 4×10^4 cell/well의 농도로 $100 \mu\text{L}$ 씩 분주하고 37°C , 5% CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 배지를 제거하고, serum-free MEM 배지를 사용하여 0, 10, 30, 50, 70, $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 희석한 시료를 well당 $100 \mu\text{L}$ 씩 처리하고 37°C , 5% CO_2 incubator에서 96시간 동안 배양하였다. 그 후 배지를 제거하고, 각 well에 $0.5 \text{mg}/\text{mL}$ 농도의 MTT 용액 $100 \mu\text{L}$ 를 처리하여 37°C , 5% CO_2 incubator에서 4시간 동안 배양하였다. MTT 용액을 제거한 후, formazan 결정을 녹이기 위해 각 well에 DMSO $100 \mu\text{L}$ 씩 넣어 30분 동안 교반하였다. 그 후 microplate reader를 사용하여 590nm 에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값은 다음 식에 대입하여 세포 증식률을 구하였다.

$$\text{cell proliferation (\%)} = \frac{\text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}} \times 100$$

6) 항산화능 측정

① DPPH assay

DPPH radical을 이용한 vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC)는 선행연구를 참고하여 측정하였다[58]. 각각의 시료 및 표준용액으로 사용하는 L-ascorbic acid (vitamin C)는 50% methanol (v/v)을 용매로 하여 제조하였고, 100 μ M DPPH radical solution은 80% methanol (v/v)을 용매로 하여 제조하였다. 측정 시료 15 μ L와 DPPH radical solution 885 μ L를 혼합하여 실온의 암실에서 30분간 반응시킨 후, 96-well plate에 200 μ L씩 옮기고 microplate reader를 사용하여 520nm에서 흡광도를 측정하였다. L-ascorbic acid를 통해 얻은 표준곡선을 이용하여 시료 g당 mg vitamin C equivalent (VCE)를 산출하였다.

② ABTS assay

ABTS radical을 이용한 vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC)는 선행연구를 참고하여 측정하였다[58, 59]. 각각의 시료 및 표준용액으로 사용하는 L-ascorbic acid (vitamin C)는 50% methanol (v/v)을 용매로 하여 제조하였고, ABTS radical solution은 PBS를 용매로 하여 1mM AAPH와 2.5mM ABTS를 혼합하고 68 $^{\circ}$ C water bath에서 투명한 청록색이 될 때까지 가열하여 제조하였다. 측정 시료 20 μ L와 ABTS radical solution 980 μ L를 혼합하여 실온의 암실에서 10분간 반응시킨 후, 96-well plate에 250 μ L씩 옮기고 microplate reader를 사용하여 750nm에서 흡광도를 측정하였다. L-ascorbic acid를 통해 얻은 표준곡선을 이용하여 시료 g당 mg vitamin C equivalent (VCE)를 산출하였다.

③ Cellular Antioxidant Activity (CAA) assay

세포 내 항산화 활성은 선행 연구를 참고하여 측정하였다[60, 61]. HepG2 세포를 96-well black plate에 8×10^4 cell/well의 농도로 $100 \mu\text{L}$ 씩 분주하고 37°C , 5% CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 배지를 제거하고, serum-free MEM 배지로 희석한 농도별 시료를 well당 $100 \mu\text{L}$ 씩 처리한 다음 $25 \mu\text{M}$ DCFH-DA를 첨가하여 37°C , 5% CO_2 incubator에서 1시간 동안 반응시켰다. 1시간 후 4°C , 130rcf에서 3분간 원심분리하고 PBS로 세척한 다음 동일 조건에서 원심분리하여 PBS를 제거하였다. HBSS로 희석한 $600 \mu\text{M}$ ABAP를 well당 $100 \mu\text{L}$ 씩 첨가하고, 37°C 로 설정한 microplate reader를 사용하여 485nm excitation, 538nm emission에서 60분간 2분 간격으로 형광을 측정하여 다음과 같이 CAA unit을 계산하였다.

$$\text{CAA unit} = 100 - (\int \text{SA} / \int \text{CA}) \times 100$$

($\int \text{SA}$ = sample area, $\int \text{CA}$ = control area)

CAA unit을 이용하여 EC 50 값을 구한 다음 (CompuSyn program, version 1.0), EC 50 값을 통해 채소 100g 당 μmol quercetin equivalent (QE)를 산출하였다.

7) 항산화 성분 함량 측정

① 총 폴리페놀 함량 측정

Gallic acid를 표준 물질로 이용한 폴리페놀 함량은 선행연구를 참고하여 측정하였다[62]. 증류수 500 μ L에 측정 시료 125 μ L와 Folin-Ciocalteu reagent 125 μ L를 첨가하여 6분간 반응시킨 후, 7% Na₂CO₃용액 (w/v) 1.25mL를 첨가한 즉시 증류수 1mL를 첨가하여 실온의 암실에서 90분 동안 반응시켰다. 96-well plate에 시료 반응액을 200 μ L씩 옮기고 microplate reader를 사용하여 750nm에서 흡광도를 측정하고, gallic acid를 통해 얻은 표준곡선을 이용하여 각각의 시료 g당 mg gallic acid equivalent (GAE)를 산출하였다.

② 총 플라보노이드 함량 측정

Catechin을 표준 물질로 이용한 플라보노이드 함량은 선행연구를 참고하여 측정하였다[63]. 증류수 300 μ L에 측정 시료 50 μ L와 5% NaNO₂ 용액 (w/v) 15 μ L를 첨가하여 5분간 반응시킨 후, 10% AlCl₃ 용액 (w/v) 30 μ L를 첨가하고 6분간 반응시켰다. 1M NaOH 용액 100 μ L를 혼합한 후, 96-well plate에 시료 반응액을 100 μ L씩 옮기고 microplate reader를 사용하여 520nm에서 흡광도를 측정하였다. Catechin을 통해 얻은 표준곡선을 이용하여 각각의 시료 g당 mg catechin equivalent (CE)를 산출하였다.

8) Proteasome 역가 저해율 측정

① Cell Extract Proteasome Inhibitory Activity (CE) assay

Whole cell lysate를 이용한 proteasome 역가 저해율은 선행 연구를 참고하여 측정하였다[64]. HepG2 세포를 6-well plate에 5×10^5 cell/well의 농도로 1mL씩 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 배지를 제거하고 ice-cold PBS로 2회 세척한 다음, 얼음 위에서 cell scraper를 사용하여 세포를 떼어내고 4°C, 130rcf에서 5분간 원심분리하였다. cell pellet에 RIPA buffer (50mM tris (pH 7.4), 1% IGEPAL, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1mM Na₃VO₄, 1mM NaF) 150μL를 첨가하고, 20분 동안 얼음 위에 두면서 5분마다 vortexing하였다. 4°C, 12,000rcf에서 15분간 원심분리 후, 상층액인 세포 추출물을 모아서 -80°C deep freezer에서 보관하였다.

세포 추출물은 단백질 정량 후 96-well black plate에 단백질 50μg에 해당하는 양을 분주하였다. Reaction buffer (20mM tris-HCl (pH 7.8), 0.5mM EDTA, 0.035% SDS)를 사용하여 희석한 시료와 proteasome-specific inhibitor인 MG-132 10μM (positive control) 및 DMSO 0.1% (negative control)를 well당 50μL씩 첨가하였다. Reaction buffer로 희석한 100μM proteasome substrate III를 well당 150μL씩 첨가하고, 37°C로 설정한 microplate reader를 사용하여 380nm excitation, 460nm emission에서 60분간 2분 간격으로 형광을 측정하여 시간에 따른 fluorescence 곡선 이하 면적을 구했다. proteasome 역가 저해율은 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{PIA (\%)} = \frac{\text{negative control 곡선 이하 면적} - \text{시료 곡선 이하 면적}}{\text{negative control 곡선 이하 면적} - \text{positive control 곡선 이하 면적}} \times 100$$

② Cellular Proteasome Inhibitory Activity (CPIA) assay

세포 내 proteasome 역가 저해율은 선행 연구를 참고하여 측정하였다[65]. HepG2 세포를 96-well black plate에 8×10^4 cell/well의 농도로 $100 \mu\text{L}$ 씩 분주하고 37°C , 5% CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 배지를 제거하고, serum-free MEM 배지로 희석한 시료와 proteasome-specific inhibitor인 MG-132 $10 \mu\text{M}$ (positive control) 및 DMSO 0.1% (negative control)를 well당 $50 \mu\text{L}$ 씩 첨가하여 37°C , 5% CO_2 incubator에서 1시간 동안 반응시켰다. 1시간 후 4°C , 130rcf에서 3분간 원심분리하고 PBS로 세척한 다음 동일 조건에서 원심분리하였다. PBS를 제거한 후 no-phenol red MEM 배지를 사용하여 $100 \mu\text{M}$ 로 희석한 proteasome substrate III를 well당 $50 \mu\text{L}$ 씩 첨가하고, 37°C 로 설정한 microplate reader를 사용하여 380nm excitation, 460nm emission에서 60분간 2분 간격으로 형광을 측정하여 시간에 따른 fluorescence 곡선 이하 면적을 구했다. proteasome 역가 저해율은 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{PIA (\%)} = \frac{\text{negative control 곡선 이하 면적} - \text{시료 곡선 이하 면적}}{\text{negative control 곡선 이하 면적} - \text{positive control 곡선 이하 면적}} \times 100$$

9) Western blot

케일의 NF- κ B 활성 억제 효과는 선행 연구를 참고하여 측정하였다[66]. HepG2 세포를 6-well plate에 1×10^6 cell/well의 농도로 2mL씩 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 배지를 제거한 다음 PBS로 1회 세척하고, serum-free MEM 배지를 사용하여 0, 1, 10, 100 μ g/mL 농도로 희석한 시료를 well당 1mL씩 처리한 후, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 배지를 제거하고 PBS로 1회 세척한 후, 10ng/mL의 농도로 희석한 TNF- α 를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 30분 동안 반응시켰다.

30분 후 배지를 제거하고 ice-cold PBS로 2회 세척한 다음, 얼음 위에서 cell scraper를 사용하여 세포를 떼어내고 4°C, 12,000rcf에서 5분간 원심분리하였다. 세포질과 핵 추출은 Active Motif Nuclear Extract Kit를 이용하여 다음과 같이 수행하였다. 먼저, 원심분리하여 모은 cell pellet에 1X Hypotonic buffer 250 μ L를 넣고 15분간 얼음에 두었다. Detergent 12.5 μ L를 넣고 10초간 세계 vortexing하고 4°C, 14,000rcf, 2분간 원심분리한 후, 상층액인 세포질 추출물을 -80°C deep freezer에서 보관하였다. 상층액을 제거하고 남은 pellet은 Complete lysis buffer 25 μ L를 넣고 4°C에서 30분간 rocking shaker로 교반한 후, 30초간 세계 vortexing하고 4°C, 14,000rcf에서 13분간 원심분리하였다. 원심분리하여 얻은 상층액인 핵 추출물은 -80°C deep freezer에서 보관하였다.

핵 추출물은 단백질을 정량하고 2X sample buffer와 1:1로 섞어 95°C에서 가열하였다. 단백질 샘플은 10% (w/v) SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 후 PVDF (polyvinylidene fluoride) membrane으로 단백질을 이동시켰다. Transfer가 끝난 membrane은 5% skim milk in 0.1% PBST로 실온에서 1시간 동안 교반하여

blocking한 후, primary antibody인 NF- κ B p65 (1:250), anti-nucleolin (1:10000)을 4°C에서 overnight 동안 붙여주었다. 0.1% PBST로 5분씩 3회 세척한 후, secondary antibody인 anti-mouse IgG (1:2000), anti-biotin (1:2000)을 상온에서 2시간 동안 붙여주었다. 0.1% PBST로 5분씩 3회 세척하고 0.1% TBST로 10분씩 1회 세척한 후, ECL solution을 처리하여 nucleolin band를 기준으로 NF- κ B band를 정량하였다.

10) LC-MS를 이용한 proteasome 억제 물질 분석

Proteasome 저해 물질 분석을 위해 샘플을 1mg/mL 농도가 되도록 0.1% formic acid로 희석한 후, 0.2 μ m syringe filter로 여과하고 Table 1, 2, 3, 4와 같은 조건을 적용하여 분석을 수행하였다. 케일 추출물 및 분획물 분석은 proteasome 억제 효과가 있다고 알려진 phenolic compounds와 terpenoids 분석을 위해 [67], [68], [69]을 참고하여 측정하였고, 적양배추 추출물은 proteasome 억제 효과가 있다고 알려진 anthocyanin 분석을 위해 [70]을 참고하여 측정하였다.

Table 1. LC-MS analysis conditions of kale extract and fractions.

Parameters	Conditions																					
Instrument	HP1100, Agilent6130																					
Column	NUCLEODUR C18 Pyramid (2.0 x 150 mm, 3.0 μ m)																					
Ionization	ESI negative																					
Detector	UV 320nm, 450nm																					
Mobile phase	A : 0.1% Formic acid/ ACN B : 0.1% Formic acid/ Water																					
Gradient	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time</th> <th>A (%)</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>5.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>35.0</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>60.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>70.0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>80.0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Time	A (%)	B (%)	0.0	5	95	5.0	10	90	35.0	40	60	60.0	90	10	70.0	100	0	80.0	100	0
	Time	A (%)	B (%)																			
	0.0	5	95																			
	5.0	10	90																			
	35.0	40	60																			
	60.0	90	10																			
70.0	100	0																				
80.0	100	0																				
Flow rate	0.3mL / min																					
Injection volume	10 μ L																					

Table 2. LC-MS analysis conditions of lutein in kale.

Parameters	Conditions												
Instrument	HP1100, Agilent6130												
Column	NUCLEODUR C18 Pyramid (2.0 x 150 mm, 3.0 μ m)												
Ionization	ESI positive												
Detector	UV 450nm												
Mobile phase	A : 0.1% Formic acid/MeOH B : 0.1% Formic acid/Water												
Gradient	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time</th> <th>A (%)</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Time	A (%)	B (%)	0.0	80	20	10.0	100	0	20.0	100	0
Time	A (%)	B (%)											
0.0	80	20											
10.0	100	0											
20.0	100	0											
Flow rate	0.3mL / min												
Injection volume	50 μ L												

Table 3. LC-MS analysis conditions of phenolic compounds in kale.

Parameters	Conditions															
Instrument	HP1100, Agilent6130															
Column	NUCLEODUR C18 Pyramid (2.0 x 150 mm, 3.0 μ m)															
Ionization	ESI negative															
Detector	UV 320nm															
Mobile phase	A : 0.1% Formic acid/ ACN B : 0.1% Formic acid/ Water															
Gradient	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time</th> <th>A (%)</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>50.0</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>55.0</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>60.0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Time	A (%)	B (%)	0.0	5	95	50.0	30	70	55.0	70	30	60.0	100	0
	Time	A (%)	B (%)													
	0.0	5	95													
	50.0	30	70													
	55.0	70	30													
60.0	100	0														
Flow rate	0.3mL / min															
Injection volume	10 μ L															

Table 4. LC-MS analysis conditions of anthocyanins in red cabbage extract.

Parameters	Conditions																								
Instrument	HP1100, Agilent6130																								
Column	NUCLEODUR C18 Pyramid (2.0 x 150 mm, 3.0 μ m)																								
Ionization	ESI positive																								
Detector	UV 520nm																								
Mobile phase	A : 6% Formic acid / ACN B : 6% Formic acid / Water																								
Gradient	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time</th> <th>A (%)</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>3</td> <td>97</td> </tr> <tr> <td>11.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>22.0</td> <td>9</td> <td>91</td> </tr> <tr> <td>44.0</td> <td>13</td> <td>87</td> </tr> <tr> <td>66.0</td> <td>15</td> <td>85</td> </tr> <tr> <td>77.0</td> <td>17</td> <td>83</td> </tr> <tr> <td>80.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>	Time	A (%)	B (%)	0.0	3	97	11.0	5	95	22.0	9	91	44.0	13	87	66.0	15	85	77.0	17	83	80.0	90	10
	Time	A (%)	B (%)																						
	0.0	3	97																						
	11.0	5	95																						
	22.0	9	91																						
	44.0	13	87																						
	66.0	15	85																						
77.0	17	83																							
80.0	90	10																							
Flow rate	0.3mL / min																								
Injection volume	5 μ L																								

11) 통계처리

본 실험의 결과는 3회 반복하여 평균±표준편차로 나타내었고, IBM SPSS Statistics 25 프로그램을 이용하여 일원배치 분산분석 (one-way ANOVA) 을 실시함으로써 실험군과 대조군의 차이에 대한 통계적 유의성을 확인한 후, $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 사후분석을 수행하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

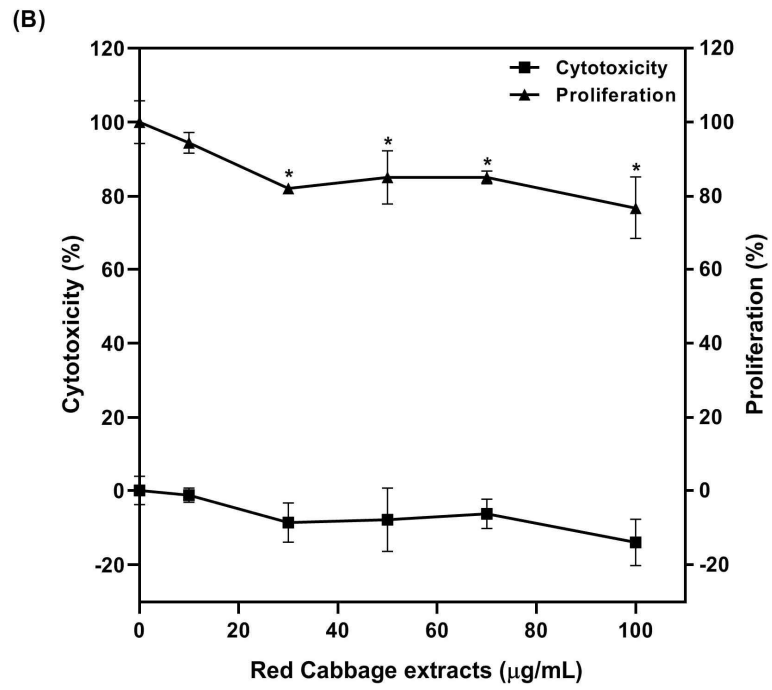
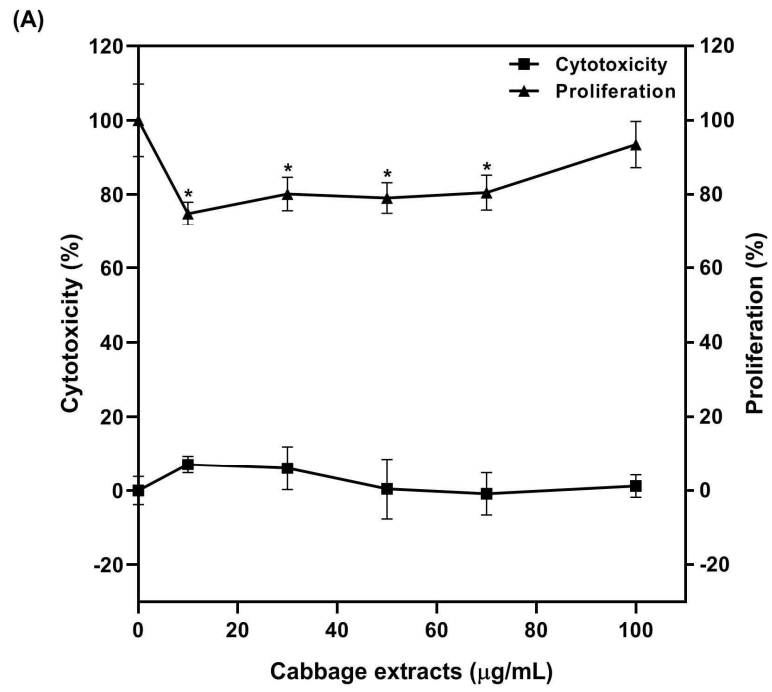
1. 십자화과 채소의 세포 독성 (Cell cytotoxicity)

추출물을 농도별로 세포에 24시간 처리하였을 때의 세포 독성이 10% 이상이면 급성 독성을 나타낸다고 보았다. 따라서 추출물이 세포 독성을 나타내지 않는 농도 범위를 확인한 후, 세포에 대한 처리 농도를 결정하기 위해 실험을 수행하였다. 양배추, 적양배추, 콜라비, 브로콜리, 케일 추출물을 0-100 μ g/mL의 농도로 HepG2 세포에 24시간 처리하였을 때, 모든 농도에서 세포 독성률이 10% 미만으로 나타났다(Fig. 5). 따라서 양배추, 적양배추, 콜라비, 브로콜리, 케일은 세포에 급성 독성을 미치지 않는다고 볼 수 있으며, 세포 독성률이 10% 미만으로 확인된 0-100 μ g/mL의 농도 범위에서 실험을 진행하였다.

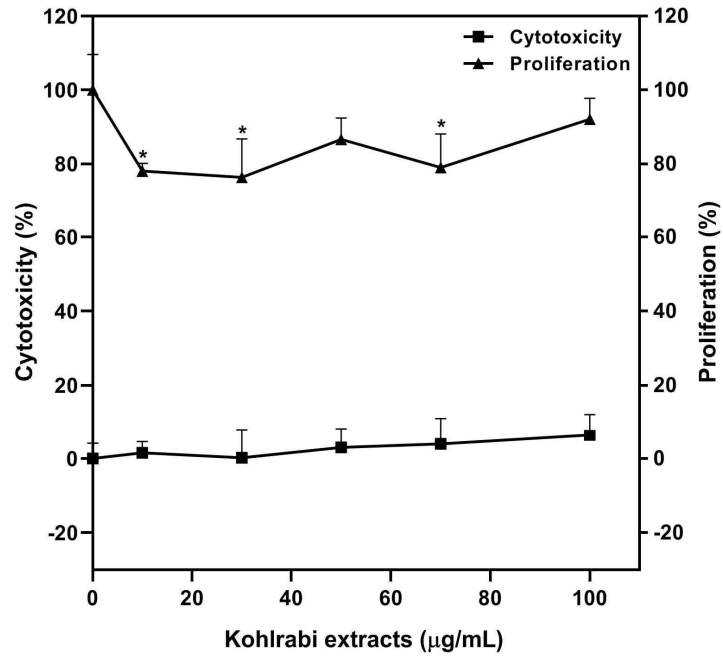
2. 십자화과 채소의 세포 증식 (Cell proliferation)

추출물을 농도별로 세포에 96시간 처리하였을 때, 세포의 증식 억제 현상이 나타나면 추출물의 항암 가능성을 확인할 수 있다. 따라서 세포 독성을 나타내지 않는 추출물의 농도 범위 내에서 세포의 증식률 변화를 확인하기 위해 실험을 수행하였다. 양배추, 적양배추, 콜라비, 브로콜리, 케일 추출물을 0-100 μ g/mL의 농도로 HepG2 세포에 96시간 처리하였을 때, Fig. 5와 같은 증식률의 변화가 나타났다. 양배추는 10, 30, 50, 70 μ g/mL의 농도에서 control (0 μ g/mL)과 비교하여 유의적으로 세포 증식률이 감소하였고 ($p < 0.05$), 적양배추는 30, 50, 70, 100 μ g/mL의 농도에서 control과 비교하여 유의적으로 세포 증식률이 감소하였다($p < 0.05$). 콜라비는 10, 30, 70 μ g/mL의

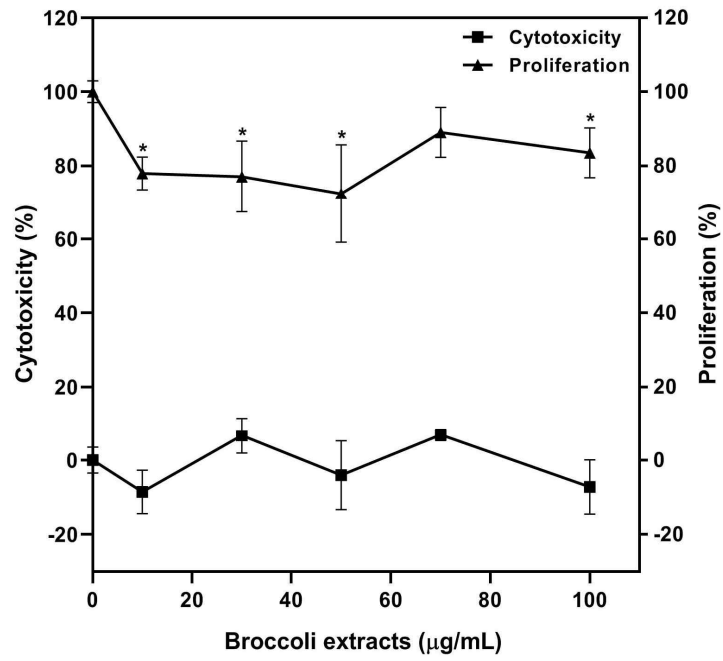
농도에서 control과 비교하여 유의적으로 세포 증식을 저해하였고($p<0.05$), 브로콜리는 10, 30, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 control과 비교하여 유의적으로 세포 증식을 저해하였다($p<0.05$). 케일은 70, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 control과 비교하여 유의적으로 세포 증식률이 감소하였으며($p<0.05$), 농도 의존적으로 세포 증식을 저해하는 경향을 보였다. 따라서 양배추, 적양배추, 콜라비, 브로콜리, 케일은 세포 증식률 감소에 영향을 미치며, 이를 통해 십자화과 채소 추출물의 항암 효과를 확인하였다.



(C)



(D)



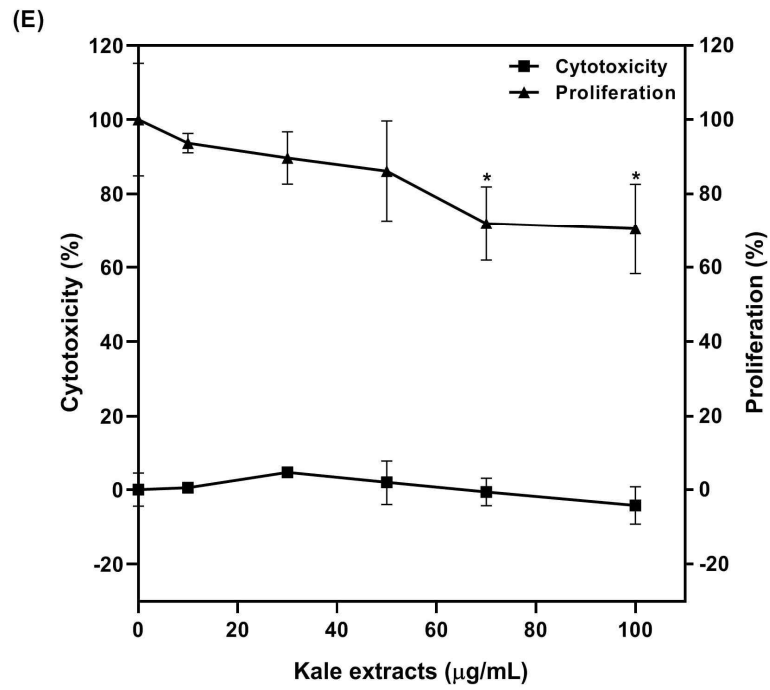


Fig. 5. Effects of cabbage extracts (A), red cabbage extracts (B), kohlrabi extracts (C), broccoli extracts (D), kale extracts (E) on cytotoxicity and proliferation in HepG2 cells. An asterisk (*) indicates significant difference in cell proliferation compared to the control ($p < 0.05$).

3. 십자화과 채소의 항산화능

1) DPPH 라디칼 소거능

DPPH는 화학적으로 안정된 free radical을 가지고 있는 수용성 물질로, 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 전자를 내주면서 라디칼이 소멸되고 짙은 보라색이 옅어지는 특징을 가진다[71, 72]. 양배추, 적양배추, 콜라비, 브로콜리, 케일 추출물의 DPPH 라디칼 소거능의 결과는 Fig. 6A와 같다. 적양배추는 64.04 ± 0.97 mg VCE/g extract로 가장 높은 라디칼 소거 활성을 보였고, 케일 50.14 ± 0.93 mg VCE/g extract, 콜라비 13.72 ± 0.51 mg VCE/g extract, 브로콜리 11.27 ± 4.33 mg VCE/g extract, 양배추 3.61 ± 1.02 mg VCE/g extract 순으로 라디칼 소거 활성을 보였다($p < 0.05$).

2) ABTS 라디칼 소거능

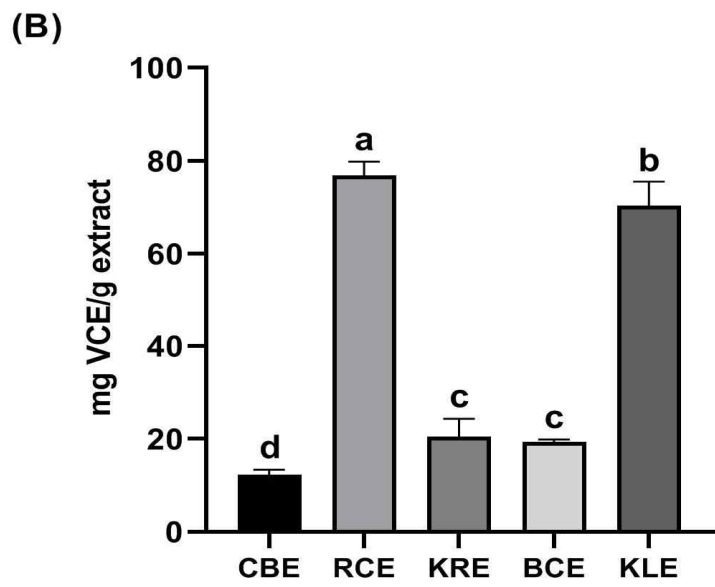
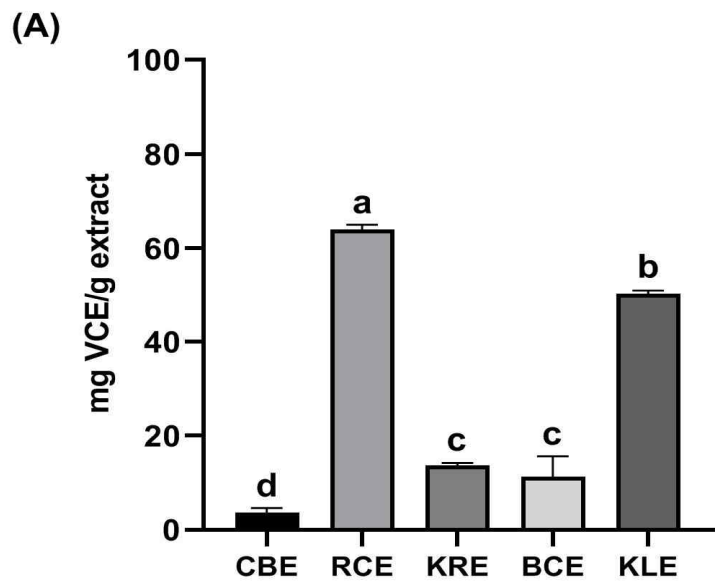
ABTS는 potassium persulfate와 반응하여 ABTS 라디칼이 생성되는데, 항산화 물질과 반응하면 양이온이 소거되어 청록색이 탈색된다[72, 73]. 양배추, 적양배추, 콜라비, 브로콜리, 케일 추출물의 ABTS 라디칼 소거능의 결과는 Fig. 6B와 같다. DPPH assay와 동일하게 ABTS assay에서도 적양배추가 76.87 ± 3.01 mg VCE/g extract로 가장 높은 라디칼 소거 활성을 보였고, 케일 70.36 ± 5.21 mg VCE/g extract, 콜라비 20.42 ± 3.89 mg VCE/g extract, 브로콜리 19.40 ± 0.50 mg VCE/g extract, 양배추 12.26 ± 1.11 mg VCE/g extract 순으로 라디칼 소거 활성을 보였다($p < 0.05$).

3) 세포 내 항산화능 (CAA)

CAA는 비극성, 비이온성 구조를 가짐으로써 세포막을 통과하여 확산할 수 있는 DCFH-DA probe를 이용하여 세포 내 활성 산소종의 양에 따른 형광 발생 정도를 측정하는 방법이다. 세포막을 통과한 DCFH-DA는 세포질

에서 세포 내 esterase에 의해 비형광물질인 DCFH로 가수분해된다. 활성 산소종 존재 시에 DCFH는 산화되어 형광을 띠는 DCF로 전환된다[72]. 양배추, 적양배추, 콜라비, 브로콜리, 케일 추출물의 세포 내 항산화능에 관한 결과는 Fig. 6C와 같다. DPPH assay, ABTS assay와 동일하게 CAA assay에서도 적양배추가 $77.07 \pm 14.28 \mu\text{mole quercetin}/100\text{g vegetable}$ 로 가장 높은 ROS 소거 활성을 보였고, 케일 $58.88 \pm 8.12 \mu\text{mole quercetin}/100\text{g vegetable}$, 콜라비 $18.14 \pm 4.72 \mu\text{mole quercetin}/100\text{g vegetable}$, 브로콜리 $11.12 \pm 3.01 \mu\text{mole quercetin}/100\text{g vegetable}$, 양배추 $10.19 \pm 5.23 \mu\text{mole quercetin}/100\text{g vegetable}$ 순으로 ROS 소거 활성을 보였다($p < 0.05$).

위 실험 결과에서 적양배추와 케일은 다른 채소류에 비해 높은 항산화능을 보였다. 콜리플라워, 브로콜리, 적양배추, 양배추 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼을 이용한 항산화능 비교 연구에서 라디칼 소거능은 본 연구와 동일하게 적양배추가 가장 높았고 양배추가 가장 낮았다[74]. 케일, 브로콜리, 콜리플라워, 방울다다기양배추 메탄올 추출물의 ABTS 라디칼을 이용한 항산화능 비교 연구에서는 케일이 가장 높은 항산화능을 보였다[75]. 양배추, 적양배추, 콜리플라워 물 추출물의 CAA assay를 이용한 세포 내 항산화능 비교 연구에서는 적양배추가 가장 높은 항산화능을 나타냈고 양배추의 항산화능이 가장 낮았다[76]. 적양배추는 강력한 항산화 능력을 가진 안토시아닌이 풍부한데[77], 15가지 이상의 안토시아닌을 함유하고 있으며, cyanidin-3, γ -5-diglucoside와 cyanidin-3-sophoroside-5-glucoside가 적양배추의 주요 시아닌 유도체이다[78]. 케일은 항산화 활성을 나타내는 카로티노이드 함량이 높으며[78, 79], 주요 카로티노이드는 lutein, β -carotene, violaxanthin, neoxanthin으로 알려져 있다[79]. 따라서 적양배추와 케일이 양배추, 콜라비, 브로콜리보다 높은 항산화능을 보이는 것으로 생각된다.



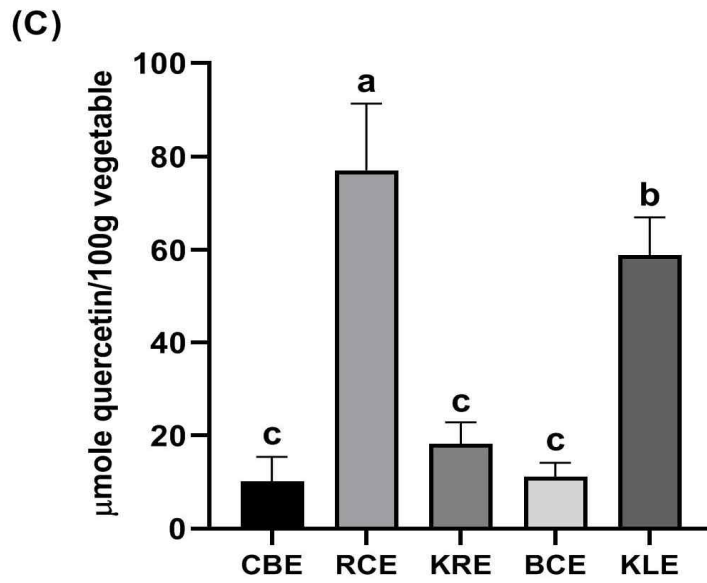


Fig. 6. DPPH (A), ABTS (B) scavenging activity and cellular antioxidant activity value (C) of cabbage, red cabbage, kohlrabi, broccoli, kale extracts. CBE; cabbage extract, RCE; red cabbage extract, KRE; kohlrabi extract, BCE; broccoli extract, KLE; kale extract. Bars with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

4. 십자화과 채소의 항산화 성분 함량

1) 총 폴리페놀 함량

폴리페놀 화합물은 과일 및 엽채류에 다량 함유되어 있는 식물계의 2차 대사산물로, 여러 화합물과 쉽게 결합하는 phenolic hydroxyl (OH)기를 가지고 있어 항산화, 항암, 항염 효과가 뛰어나다[80, 81]. 총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 시약이 추출물의 폴리페놀 화합물에 의해 환원되어 몰리브덴 청색으로 발색하는 원리로 측정하였다[82]. 양배추, 적양배추, 콜라비, 브로콜리, 케일 추출물의 총 폴리페놀 함량 측정 결과는 Fig. 7A와 같다. 케일은 62.51 ± 0.30 mg GAE/g extract로 가장 높은 함량을 보였고, 적양배추 61.99 ± 0.42 mg GAE/g extract, 브로콜리 26.30 ± 0.05 mg GAE/g extract, 콜라비 13.83 ± 0.05 mg GAE/g extract, 양배추 4.89 ± 0.05 mg GAE/g extract 순으로 총 폴리페놀 함량을 보였다($p < 0.05$).

2) 총 플라보노이드 함량

플라보노이드는 폴리페놀에 속하는 성분으로, 2개의 방향족 고리를 포함한 3개의 링이 결합한 구조 (C6-C3-C6)를 기본 골격으로 하여 각 링 내부의 작용기에 의해 항산화 활성을 가진다. 플라보노이드는 채소류, 과실류, 곡류, 두류 등에 풍부하게 함유되어 있으며, 항산화제로의 역할 외에도 항암, 항염, 항균, 항알레르기, 항혈전 등의 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다[80, 81]. 총 플라보노이드 함량은 플라보노이드가 알칼리성 pH 조건에서 알루미늄과 반응하여 flavonoid-aluminium 결합체를 형성하는 원리를 이용하여 측정하였다[83]. 양배추, 적양배추, 콜라비, 브로콜리, 케일 추출물의 총 플라보노이드 함량 측정 결과는 Fig. 7B와 같다. 적양배추는 21.05 ± 0.25 mg CE/g extract로 가장 높은 함량을 보였고, 케일 14.00 ± 0.25 mg CE/g extract, 브로콜리 9.60 ± 0.57 mg CE/g extract, 콜라비 3.04 ± 0.10

mg CE/g extract, 양배추 0.18 ± 0.17 mg CE/g extract 순으로 총 플라보노이드 함량을 보였다($p < 0.05$).

총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량 측정 결과는 항산화능 측정 결과와 동일하게 적양배추와 케일에서 높은 수치를 보였고 양배추에서 가장 낮은 수치를 나타냈다. 여러 연구에서는 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량이 항산화 활성과 양의 상관관계가 있다고 보고되었는데[84], 본 연구에서도 십자화과 채소의 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량이 높을수록 항산화 활성이 뛰어나다는 것을 확인하였다.

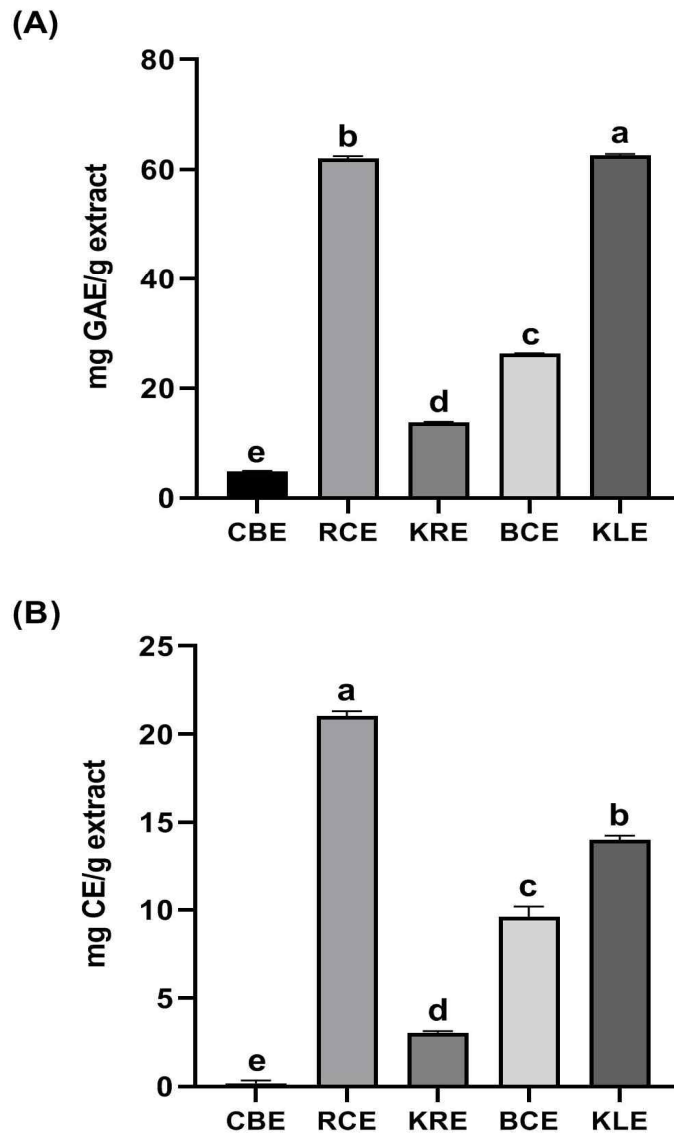


Fig. 7. Total phenolics (A) and flavonoid (B) contents of cabbage, red cabbage, kohlrabi, broccoli, kale extracts. CBE; cabbage extract, RCE; red cabbage extract, KRE; kohlrabi extract, BCE; broccoli extract, KLE; kale extract. Bars with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

5. 십자화과 채소의 proteasome 역가 저해율

1) 십자화과 채소의 proteasome 역가 저해율 스크리닝

세포 추출물을 이용한 CE assay (*in vitro*)와 배양 세포를 대상으로 한 CPIA assay (*in vivo*)를 적용하여 양배추, 적양배추, 콜라비, 브로콜리, 케일 추출물의 proteasome 역가 저해율을 비교하였다(Fig. 8). CE assay 결과, 5가지의 십자화과 채소 모두에서 proteasome 억제 효과를 보이지 않았다. 반면, CPIA assay 결과에서는 5가지의 십자화과 채소에서 모두 proteasome 억제 효과를 보였다. 특히, 케일은 $90.64 \pm 6.09 \%$, 적양배추는 $87.71 \pm 4.05 \%$ 로 다른 채소류에 비해 높은 저해율을 보였고, 콜라비 $69.34 \pm 11.76 \%$, 양배추 $61.82 \pm 2.23 \%$, 브로콜리 $59.89 \pm 3.84 \%$ 의 저해율이 나타났다($p < 0.05$).

이처럼 CE assay (*in vitro*)에서는 proteasome 억제 효과를 보이지 않았지만, CPIA assay (*in vivo*)에서는 proteasome 억제 효과를 보이는 이유는 십자화과 채소류 추출물이 세포막을 통과할 때 각 추출물에 함유된 물질이 proteasome 억제 효과를 나타내는 물질로 구조가 변형되어 세포 내에 작용했기 때문이라고 생각할 수 있다.

케일과 적양배추가 다른 채소에 비해 높은 proteasome 저해율을 보인 이유는 다음과 같이 추측할 수 있다. 먼저 케일에 풍부한 polyphenols와 glucosinolates를 분석한 연구에 따르면 케일에서는 flavonol 유도체 21종, hydroxycinnamic acid 유도체 14종, glucosinolates 7종이 분석되었으며, 특히 flavonol 유도체에는 다양한 종류의 quercetin과 kaempferol 배당체가 풍부했다[67]. 그리고 quercetin과 kaempferol은 여러 연구에서 proteasome의 chymotrypsin 유사 활성을 억제한다고 보고되었다[54, 85]. 또한, 십자화과 채소에 존재하는 benzyl isothiocyanate와 phenethyl isothiocyanate는 proteasome의 chymotrypsin, trypsin, caspase 유사 활성을 억제한다고 알려져 있는데[49], 케일은 이러한 성분들을 함유하고 있다[86, 87]. 적양배추는 암의

발생을 예방하는 것으로 알려진 anthocyanin의 함유량이 높다[88]. 적양배추의 anthocyanin을 분석한 연구에 따르면 적양배추에는 20가지의 cyanidin 배당체가 풍부한데[70], anthocyanin과 anthocyanidin이 인간 백혈병 세포에서 proteasome의 chymotrypsin 유사 활성을 억제한 연구에 따르면 cyanidin과 cyanidin 배당체인 Cyanidin-3,5-diglucoside (cyanin), Cyanidin-3-glucoside (kuromanin), Cyanidin-3-galactoside (ideain), Cyanidin-3-rutinoside (keracyanin)이 효과를 나타낸 것으로 보고되었다[52]. 따라서 케일은 flavonol과 glucosinolate의 가수분해 생성물인 isothiocyanate가 proteasome 억제에 영향을 미쳤으며, 적양배추는 anthocyanin과 anthocyanidin이 proteasome 억제에 영향을 미친 것으로 볼 수 있다.

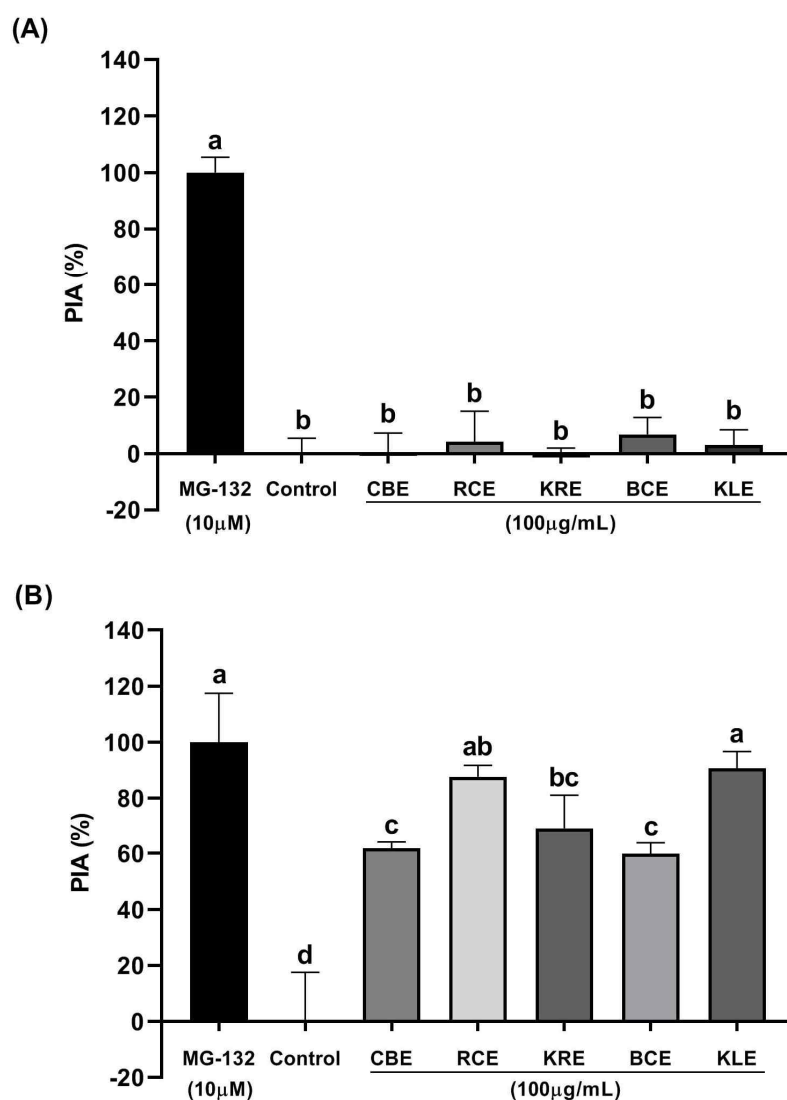


Fig. 8. Proteasome inhibitory activities of cabbage, red cabbage, kohlrabi, broccoli, kale extracts. (A): cell extract proteasome inhibitory activity (CE assay), (B): cellular proteasome inhibitory activity (CPIA assay). CBE; cabbage extract, RCE; red cabbage extract, KRE; kohlrabi extract, BCE; broccoli extract, KLE; kale extract. Bars with different letters indicate significant differences ($p<0.05$).

2) 케일의 농도별 proteasome 역가 저해율

CPIA assay에서 proteasome 역가 저해율이 가장 높은 십자화과 채소 1가지를 선정하고 CPIA assay (*in vivo*)를 적용하여 농도 변화에 따른 proteasome 역가 저해율을 확인하였다(Fig. 9). 케일 추출물을 1, 10, 100 μ g/mL의 농도로 처리하였을 때, 1 μ g/mL에서 30.00 \pm 16.32 %, 10 μ g/mL에서 61.01 \pm 1.12%, 100 μ g/mL에서 96.10 \pm 24.21 %의 proteasome 역가 저해율을 보였으므로, 케일 추출물은 농도 의존적으로 proteasome 억제 효과를 나타냄을 알 수 있다($p < 0.05$). 따라서 케일 추출물을 용매별로 분획하여 CPIA assay를 통해 proteasome 역가 저해율을 확인한 후, LC-MS 분석을 진행하여 케일 속 proteasome 저해 물질을 찾고자 한다.

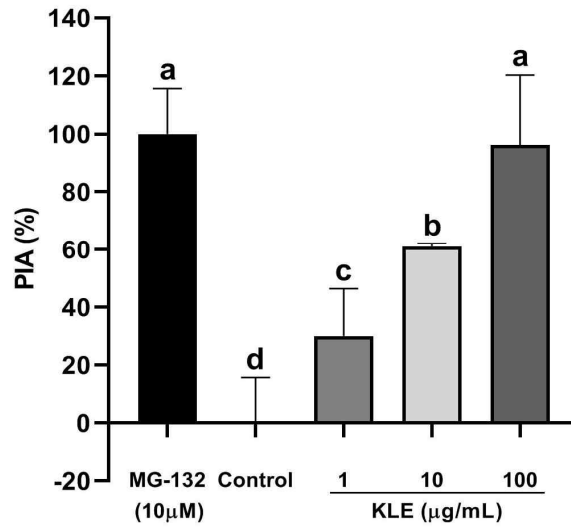


Fig. 9. Cellular proteasome inhibitory activity of kale extract. HepG2 cells were treated with kale extract (0, 1, 10, 100 µg/mL) for 1h. KLE; kale extract. Bars with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

6. Genistein 및 배당체의 proteasome 역가 저해율

Proteasome의 $\beta 1$, $\beta 5$ subunit을 억제한다고 알려진 flavonoid 계열 물질인 genistein[89]과 genistein 배당체인 genistin, 6"-O-Malonyl genistin, 6"-O-Acetyl genistin의 proteasome 역가 저해율을 측정하였다(Fig. 10.). CE assay (*in vitro*)에서는 genistein $35.14 \pm 0.73 \%$, genistin $28.20 \pm 3.19 \%$, 6"-O-Malonylgenistin $16.88 \pm 20.93 \%$, 6"-O-Acetylgenistin $0.11 \pm 6.15 \%$ 의 저해율을 보였으며($p < 0.05$), CPIA assay (*in vivo*)에서는 genistein $21.13 \pm 4.20 \%$, genistin $-1.95 \pm 4.44 \%$, 6"-O-Malonylgenistin $-2.94 \pm 7.84 \%$, 6"-O-Acetylgenistin $54.99 \pm 7.34 \%$ 의 저해율을 보였다($p < 0.05$).

즉, CE assay에서는 genistein과 genistin이 proteasome 억제 효과를 나타내고 CPIA assay에서는 genistein과 6"-O-Acetylgenistin이 proteasome 억제 효과를 나타낸다는 것을 알 수 있다. 이와 같은 결과를 통해 genistein의 proteasome 억제 활성을 확인할 수 있었으며, CE assay에서 proteasome 억제 효과를 보이지 못한 6"-O-Acetylgenistin이 CPIA assay에서는 세포막을 통과할 때 Acetyl 기가 제거되고 genistein 형태로 세포에 작용하여 proteasome 활성을 억제한 것으로 볼 수 있다.

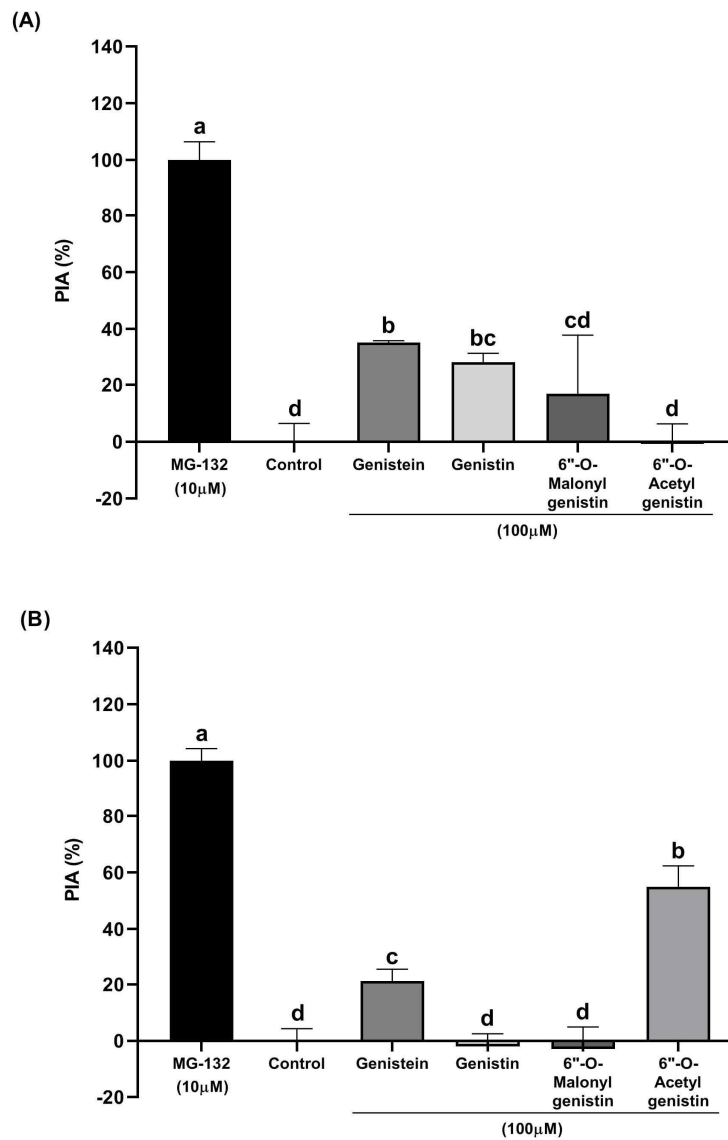


Fig. 10. Proteasome inhibitory activities of Genistein and its glycosides. (A): cell extract proteasome inhibitory activity (CE assay), (B): cellular proteasome inhibitory activity (CPIA assay). Bars with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

7. 케일에 의한 NF- κ B 활성 변화

HepG2 세포에 케일 추출물을 24시간 처리하고 TNF- α 로 세포질에 존재하는 NF- κ B를 활성화시켜 핵 안으로 유도한 후, Western blot을 통해 케일 추출물이 NF- κ B 활성화에 미치는 영향을 측정하였다(Fig. 11). 케일은 1, 10 μ g/mL의 농도에서 positive control (TNF- α +, KLE -)과 비교했을 때 유의적인 차이를 보이지 않았지만, 100 μ g/mL의 농도에서는 positive control과 유의적인 차이를 보이므로 NF- κ B 활성을 억제하였다($p < 0.05$).

이와 같은 결과가 나타난 이유는 케일에는 NF- κ B 활성을 억제한다고 보고된 flavonol 계열의 quercetin과 kaempferol 및 carotenoid 계열의 β -carotene이 풍부하기 때문이라고 생각할 수 있다[53, 90, 91, 92]. 또한, proteasome 역가 저해율 측정 실험에서 케일은 proteasome 억제 효과를 나타냈기 때문에 NF- κ B 활성화에도 억제 효과를 보인 것을 알 수 있다.

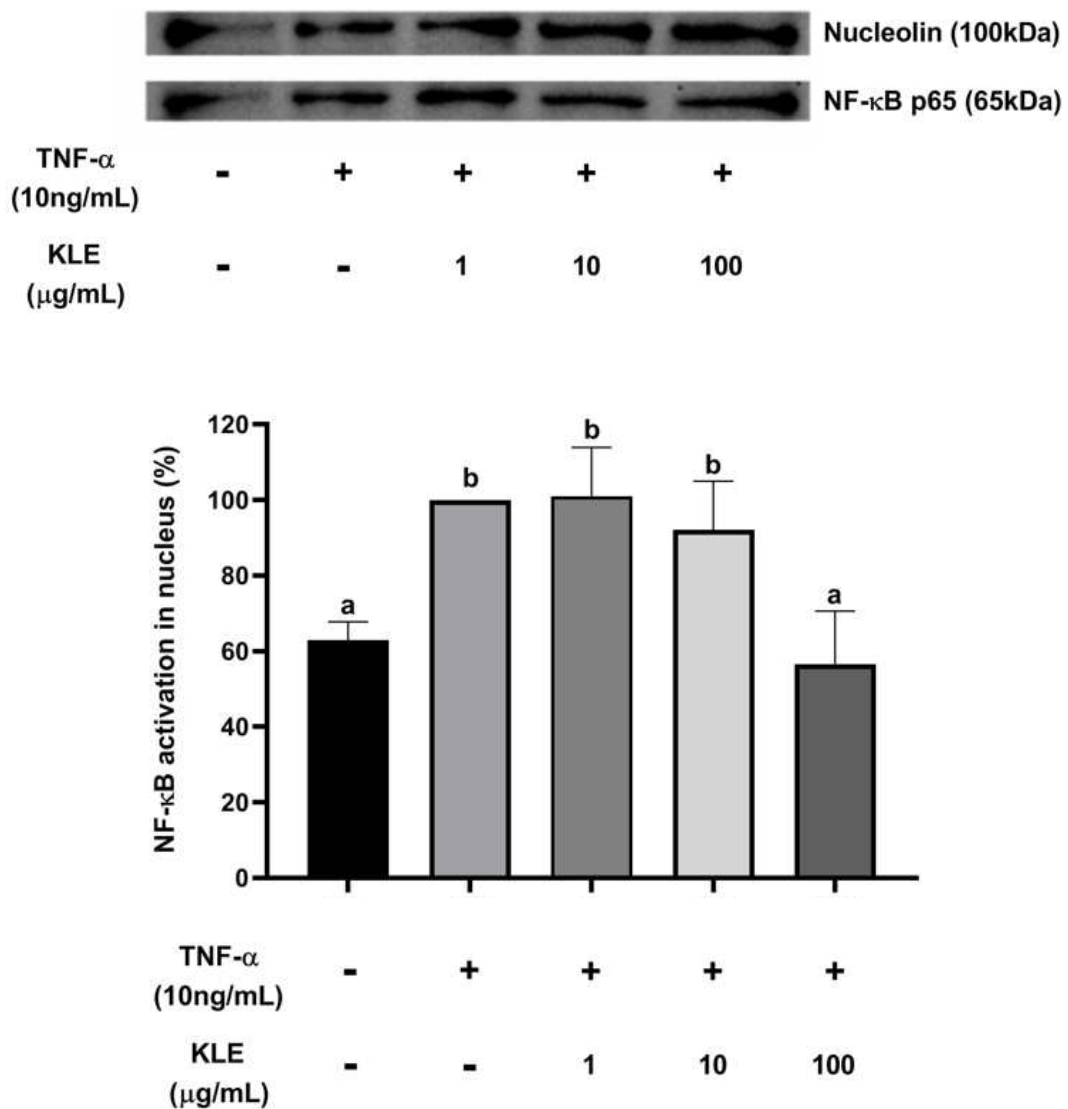


Fig. 11. Effect of kale extract on TNF- α -induced NF- κ B activation. HepG2 cells were treated with kale extract (0, 1, 10, 100 μ g/mL) for 24h and NF- κ B activation was induced by 10ng/mL TNF- α for 30min. Nucleolin was used as loading control. KLE; kale extract. Bars with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

8. Proteasome 억제 물질 분석

1) 케일 추출물 및 분획물의 proteasome 역가 저해율 비교

CPIA assay (*in vivo*)를 적용하여 케일 70% ethanol 추출물과 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol, water 분획물의 proteasome 역가 저해율을 비교하였다(Fig. 12). 각각의 저해율은 70% ethanol 추출물 43.02 ± 7.44 %, hexane 분획물 37.03 ± 4.01 %, chloroform 분획물 47.99 ± 4.82 %, ethyl acetate 분획물 44.88 ± 3.27 %, butanol 분획물 6.48 ± 8.88 %, water 분획물 8.46 ± 3.74 %로 나타났다($p < 0.05$). 따라서 hexane, chloroform, ethyl acetate 분획물이 butanol과 water 분획물보다 높은 proteasome 억제 활성을 보인다는 것을 알 수 있다.

분획물에 따라 proteasome 역가 저해율에 차이가 나는 이유는 각 분획물 별로 분리되는 성분들이 다르기 때문이다. 특히, hexane 분획물에는 carotenoids와 chlorophylls 같은 지용성 성분이 분리되어 나오며[93, 94], ethyl acetate 분획물에는 polyphenols가 풍부하게 분리된다[95, 96]. 따라서 케일에는 proteasome 억제 효과를 보이는 물질이 한 종류가 아닌 여러 종류가 존재한다고 볼 수 있다.

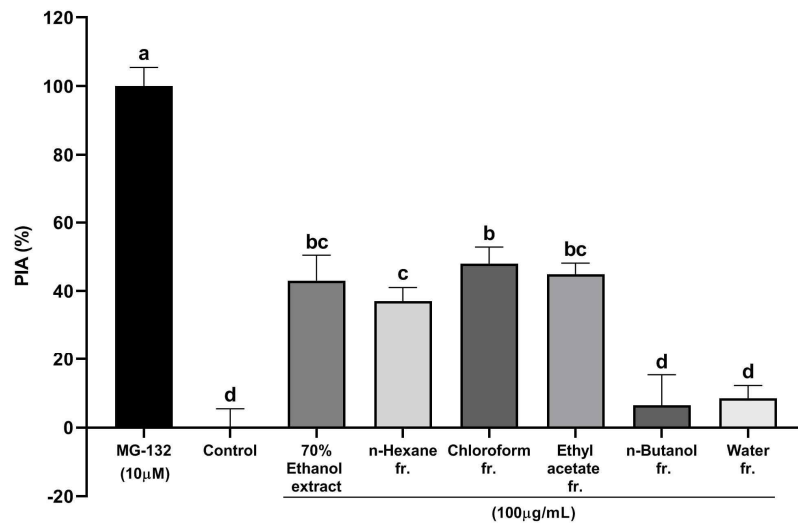


Fig. 12. Proteasome inhibitory activities of kale extract and solvent fractions. Bars with different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

2) 케일 추출물 및 분획물의 LC-MS 분석

케일 추출물 및 분획물에 존재하는 식물생리활성물질과 CPIA assay 결과를 바탕으로 분획물별 proteasome을 억제할 것으로 보이는 물질을 알아보기 위해 LC-MS 분석을 수행하였다(Fig. 13, 14, 15, 16).

검출기 파장 320nm에서 분석한 크로마토그램에서는 다른 용매 분획물들에 비해 ethyl acetate 분획물의 peak 면적이 가장 크게 나타났다. 검출기 파장 450nm에서 분석한 크로마토그램에서는 hexane과 ethyl acetate 분획물의 peak 면적이 크게 나타났고, chloroform 분획물은 hexane과 ethyl acetate 분획물에서 나타나는 peak가 작지만 동시에 나타났다. 즉, ethyl acetate 분획물은 다른 분획물보다 320nm에서의 peak 면적이 크며 다양한 peak들이 보이는데, 이러한 peak들은 polyphenols이고 proteasome 억제에 기여할 것으로 생각된다[68]. 또한, hexane 분획물은 다른 분획물보다 450nm에서의 peak 면적이 크고 다양하게 나타나는데, 이러한 peak들은 hexane에 잘 녹는 지용성 물질인 carotenoids와 chlorophylls에 속하며 proteasome 억제 효과를 보일 것으로 생각된다[92, 93, 94].

Hexane 분획물을 450nm 파장으로 분석한 결과(Fig. 14-B)에서 가장 큰 peak가 나타내는 분자량은 568로, hexane에 추출되는 지용성 성분인 carotenoids와 chlorophylls에 속하는 물질과 비교하였을 때 lutein으로 예상되었다. 따라서 lutein 분석 조건으로 분석을 진행한 결과, 15분에서 lutein standard와 hexane 분획물에서 동일한 분자량을 보이는 peak가 검출되었고 lutein은 NF- κ B를 억제한다고 보고되었으므로[92], hexane 분획물의 proteasome 억제 효과를 나타낸 물질은 lutein으로 볼 수 있다.

Ethyl acetate 분획물을 320nm 파장으로 분석한 결과(Fig. 13-D)와 케일에 함유된 polyphenols를 분석한 연구[67]를 비교하였을 때 분자량 959인 물질이 발견되었다. 따라서 polyphenols만을 분석하는 조건으로 분석을 진행한

결과, polyphenols로 보이는 다양한 peak들이 검출되었으며, 42분에서 959의 분자량을 가지는 hydroxycinnamic acids 계열의 trisinapoyl-diglucoside가 분석되었다[67]. Ethyl acetate 분획물은 trisinapoyl-diglucoside 외에도 다양한 peak들이 분석되었으므로, proteasome 억제 효과를 나타내는 물질이 하나 이상 존재할 것으로 생각된다.

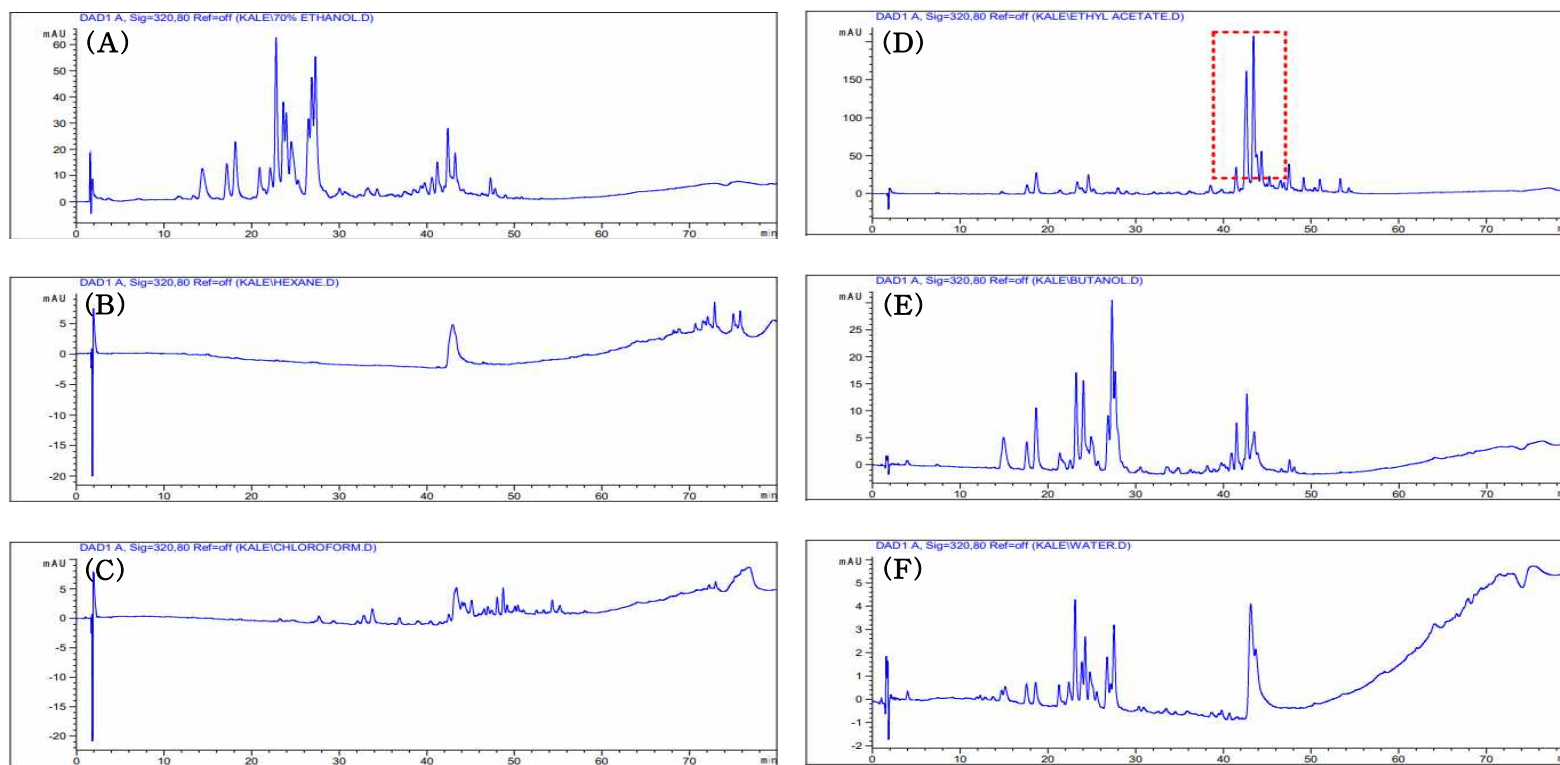


Fig. 13. Chromatograms of kale extract and fractions at detector wavelength 320nm. (A): 70% Ethanol extract, (B): Hexane fraction, (C): Chloroform fraction, (D): Ethyl acetate fraction, (E): Butanol fraction, (F): Water fraction.

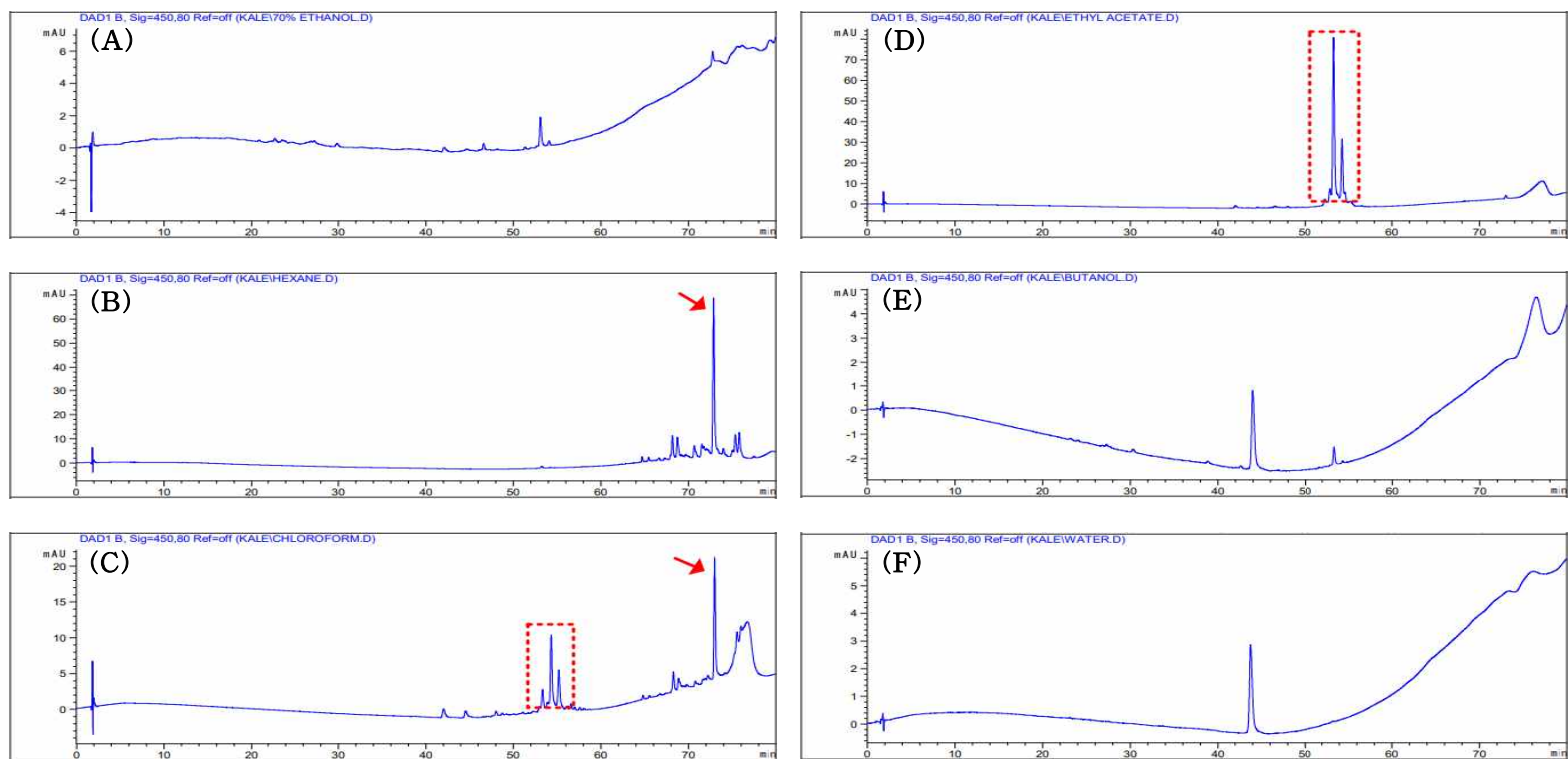


Fig. 14. Chromatograms of kale extract and fractions at detector wavelength 450nm. (A): 70% Ethanol extract, (B): Hexane fraction, (C): Chloroform fraction, (D): Ethyl acetate fraction, (E): Butanol fraction, (F): Water fraction.

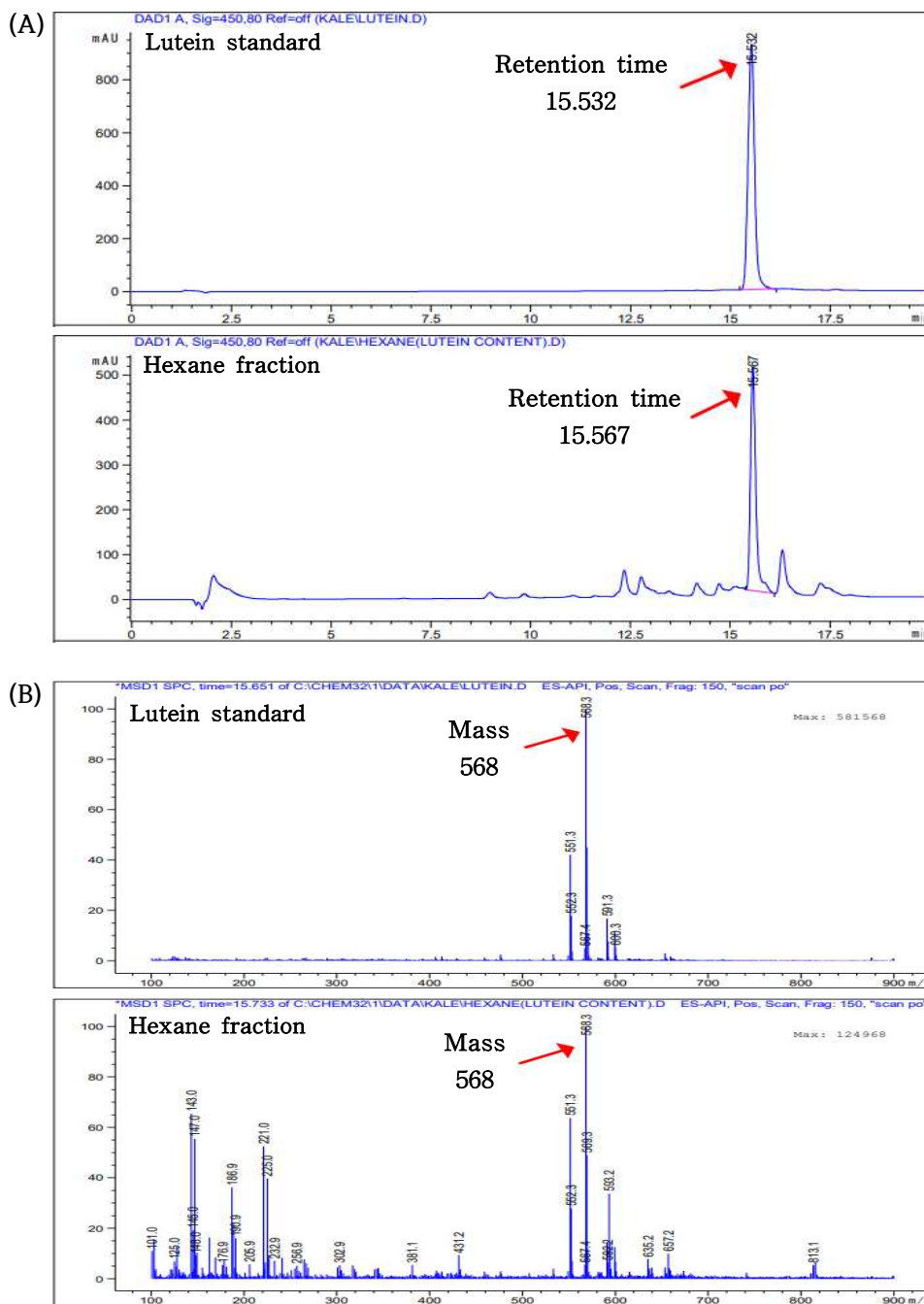


Fig. 15. Chromatograms of lutein standard and kale hexane fraction.
(A): DAD chromatograms, (B): MS chromatograms

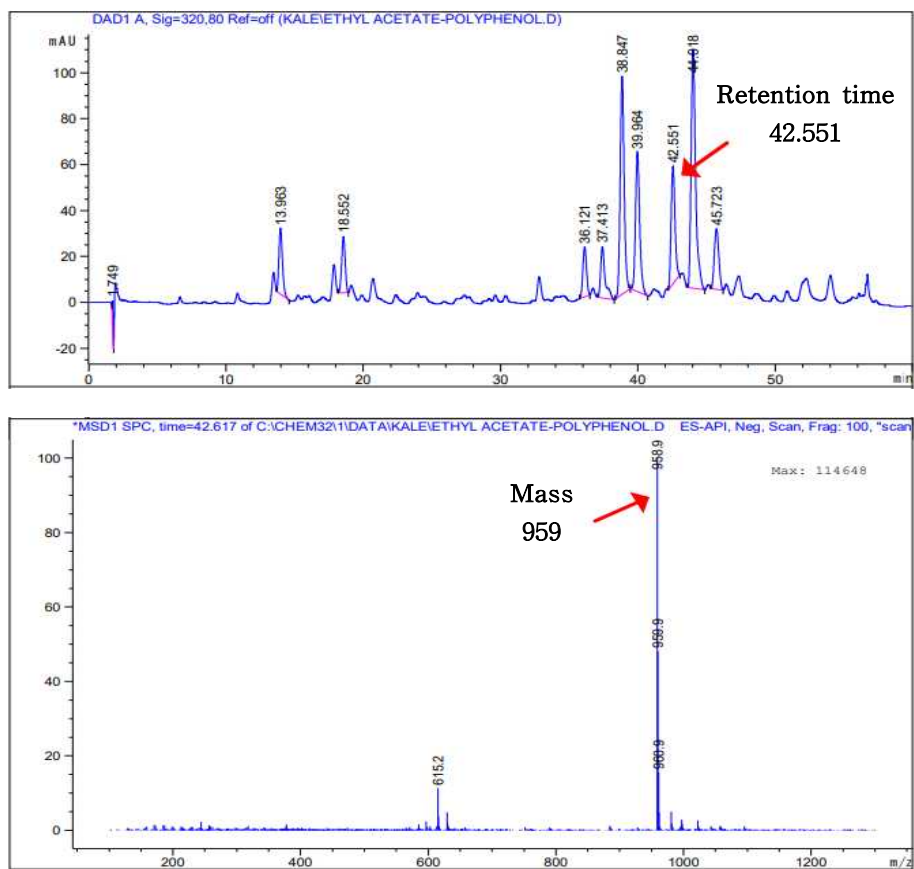


Fig. 16. Chromatograms of kale ethyl acetate fraction. The molecular weight of 959 represents trisinapoyl-diglucoside, a component of kale.

3) 적양배추 추출물의 LC-MS 분석

적양배추 추출물에 존재하는 식물생리활성물질과 proteasome 저해 물질이 존재할 것으로 예상되는 물질을 알아보기 위해 LC-MS 분석을 수행하였다 (Fig. 17).

적양배추의 anthocyanins 분석 연구[70]를 참고하여 적양배추 추출물을 LC-MS로 분석한 결과, proteasome의 chymotrypsin 유사 활성을 억제한다고 보고된 cyanidin-3-glucoside-5-glucoside[52]를 포함하여 총 16가지의 cyanidin 배당체가 발견되었다(Table 5). 따라서 proteasome 역가 저해를 측정 실험(*in vivo*)에서 적양배추가 효과를 나타낸 이유는 다양한 종류의 cyanidin 배당체가 영향을 미쳤기 때문이라고 생각할 수 있다.

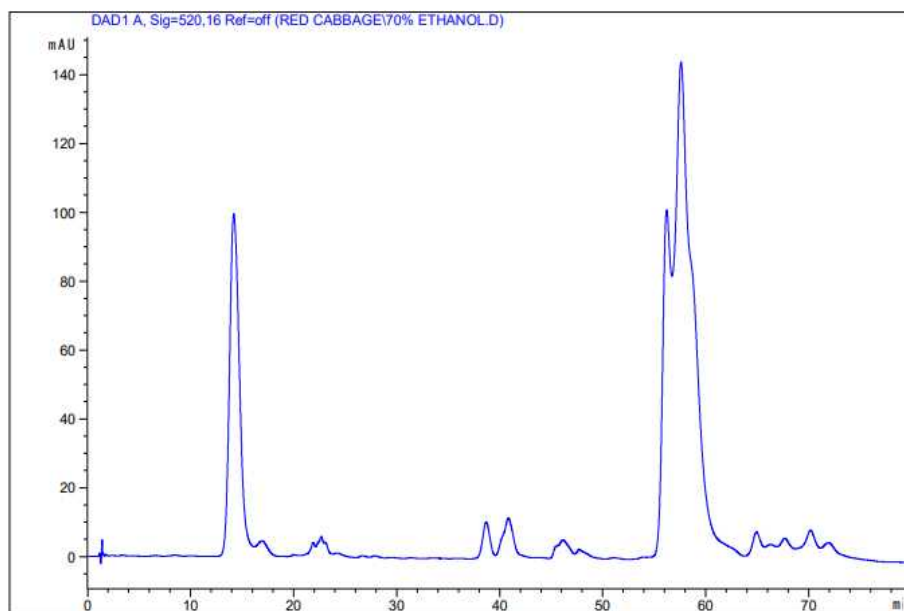


Fig. 17. Chromatograms of anthocyanins in red cabbage extract.

Table 5. Retention time and MS data of anthocyanins in red cabbage extract.

Time	Compounds	[M] ⁺ (m/z)
14.45	Cyanidin-3-diglucoside-5-glucoside	773
17.29	Cyanidin-3-glucoside-5-glucoside	611
32.88	Cyanidin-3-(sinapoyl)-diglucoside-5-glucoside	979
38.83	Cyanidin-3-(caffeoyl)(p-coumaroyl)-diglucosides-5-glucoside	1081
40.20	Cyanidin-3-(feruloyl)-triglucosides-5-glucoside	1111
41.02	Cyanidin-3-(sinapoyl)-triglucoside-5-glucoside	1141
45.80	Cyanidin-3-(feruloyl)(feruloyl)-triglucoside-5-glucoside	1287
46.08	Cyanidin-3-(caffeoyl)-diglucoside-5-glucoside	935
47.90	Cyanidin-3-(feruloyl)(sinapoyl)-triglucoside-5-glucoside	1317
56.35	Cyanidin-3-(p-coumaroyl)-diglucoside-5-glucoside	919
57.81	Cyanidin-3-(feruloyl)-diglucoside-5-glucoside	949
57.81	Cyanidin-3-(sinapoyl)-diglucoside-5-glucoside	979
63.04	Cyanidin-3-(sinapoyl)-glucoside-5-glucoside	817
65.14	Cyanidin-3-(feruloyl)(feruloyl)-diglucoside-5-glucoside	1125
67.90	Cyanidin-3-(feruloyl)(sinapoyl)-diglucoside-5-glucoside	1155
70.37	Cyanidin-3-(sinapoyl)(sinapoyl)-diglucoside-5-glucoside	1185

IV. 결론

1. 십자화과 채소류 추출물 5종은 HepG2 cell에 급성 독성을 미치지 않았다.

양배추, 적양배추, 콜라비, 브로콜리, 케일 추출물을 HepG2 cell에 100 μ g/mL 이하의 농도로 처리하였을 때, 모든 추출물에서 세포 독성률이 10% 미만으로 나타났다. 따라서 0-100 μ g/mL의 농도 내에서 실험을 진행하였다.

2. 십자화과 채소류 추출물 5종은 HepG2 cell의 증식을 저해하였다.

양배추, 적양배추, 콜라비, 브로콜리, 케일 추출물을 HepG2 cell에 100 μ g/mL 이하의 농도로 처리하였을 때, 모든 추출물은 세포 증식률을 감소시켰다($p < 0.05$). 이러한 결과는 각 추출물의 항산화능 및 proteasome 억제 효과가 영향을 미쳤을 것이라고 추측할 수 있다.

3. 십자화과 채소류 추출물 5종은 항산화 효과를 나타냈으며, 특히 적양배추와 케일 추출물이 높은 항산화 효과를 보였다.

양배추, 적양배추, 콜라비, 브로콜리, 케일 추출물을 DPPH, ABTS, CAA assay를 통해 항산화능을 평가한 결과, 적양배추 > 케일 > 콜라비 > 브로콜리 > 양배추 추출물 순으로 항산화능을 보였다($p < 0.05$). 특히 적양배추와 케일 추출물은 다른 추출물에 비해 높은 항산화능을 보였는데, 이는 적양배추에 풍부한 안토시아닌과 케일에 풍부한 카로티노이드의 항산화 활성 때문이라고 생각된다.

4. 십자화과 채소류 추출물 5종의 항산화 성분 함량을 측정한 결과, 항산화능이 우수한 적양배추와 케일 추출물에서 높은 항산화 성분 함량이

측정되었다.

양배추, 적양배추, 콜라비, 브로콜리, 케일 추출물의 항산화 성분 함량 측정을 위해 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과, 총 폴리페놀 함량은 케일 > 적양배추 > 브로콜리 > 콜라비 > 양배추 추출물 순으로 높았으며, 총 플라보노이드 함량은 적양배추 > 케일 > 브로콜리 > 콜라비 > 양배추 추출물 순으로 높았다($p < 0.05$). 이는 적양배추와 케일 추출물이 다른 추출물에 비해 항산화능이 우수했던 결과와 관련이 있음을 알 수 있다.

5. 십자화과 채소류 추출물 5종은 CE assay에서 proteasome 활성 억제 효과를 보이지 못했지만, CPIA assay에서는 proteasome 활성 억제 효과를 보였다.

양배추, 적양배추, 콜라비, 브로콜리, 케일 추출물의 proteasome 활성 억제 효과를 평가하기 위해 CE assay와 CPIA assay를 적용한 결과, 모든 추출물은 CE assay에서는 효과를 나타내지 않았고 CPIA assay에서 효과를 나타냈다($p < 0.05$). 이는 십자화과 채소류 추출물에 함유된 식물생리활성물질이 세포막을 통과할 때 그 구조가 변형되어 나타난 결과라고 추정되며, 각 추출물 별로 함유된 식물생리활성물질의 종류와 양이 다르기 때문에 proteasome 역가 저해율에 차이가 있는 것으로 생각된다.

6. CPIA assay에서 가장 높은 효과를 보였던 케일 추출물은 농도 의존적으로 proteasome 역가 저해율을 보였다.

십자화과 채소류 5종으로 proteasome 역가 저해율을 평가하여 CPIA assay에서 가장 높은 저해율을 보였던 케일 추출물을 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 HepG2 cell에 처리하였을 때 농도 의존적으로 proteasome 활성을 억

제하였다($p < 0.05$). 이러한 결과는 케일에 함유되어 있고 proteasome 억제 효과가 있다고 알려진 quercetin, kaempferol, benzyl isothiocyanate, phenethyl isothiocyanate에 의한 것으로 생각할 수 있다.

7. 6"-O-Acetyl genistin은 CE assay에서는 proteasome 억제 효과를 나타내지 않았지만, CPIA assay에서는 proteasome 억제 효과를 나타냈다.

Genistein 및 유도체의 proteasome 역가 저해율을 평가한 결과, genistein은 CE assay와 CPIA assay에서 proteasome 활성 억제 효과를 보였고, 6"-O-Acetyl genistin은 CPIA assay에서 proteasome 활성 억제 효과를 보였다($p < 0.05$). 이러한 결과는 6"-O-Acetyl genistin이 세포막을 통과할 때 acetyl 기가 제거되고 genistein의 구조로 세포에 작용하여 proteasome 활성을 억제한 것으로 추측할 수 있다.

8. 케일 추출물은 NF- κ B 활성 억제 효과를 보였다.

케일 추출물을 1, 10, 100 μ g/mL 농도로 HepG2 cell에 처리하였을 때, 100 μ g/mL에서 NF- κ B 활성이 억제되었다($p < 0.05$). 이는 케일에는 NF- κ B 활성을 억제하는 quercetin, kaempferol, β -carotene이 풍부하며, proteasome 역가 저해율 측정 실험에서의 효과로 인한 것으로 생각된다.

9. 케일의 용매별 분획물은 CPIA assay 결과에서 hexane, chloroform, ethyl acetate 분획물에서 proteasome 억제 효과를 보였다.

케일 추출물을 용매별로 분획한 후 CPIA assay를 적용하여 proteasome 역가 저해율을 평가한 결과, hexane, chloroform, ethyl acetate 분획물에서 proteasome 억제 효과를 나타냈다($p < 0.05$). 따라서 케일 추출물의

proteasome 억제 효과를 나타내는 물질은 hexane, chloroform, ethyl acetate 분획물에 함유되어 있음을 알 수 있다.

10. 케일 분획물을 LC-MS로 분석한 결과에서 hexane 분획물은 450nm, ethyl acetate 분획물은 320nm 파장에서 면적이 큰 peak가 검출되었다. 특히, hexane 분획물에서는 lutein이 분석되었고, ethyl acetate 분획물에서는 trisinapoyl-diglucoside를 포함하여 다양한 polyphenols가 분석되었다.

검출기 파장 450nm에서는 hexane 분획물, 320nm에서는 ethyl acetate 분획물의 peak 면적이 크게 나타났다. 이는 각 용매별로 추출되는 성분이 다르기 때문인데, 분획물에는 지용성 물질인 carotenoids와 chlorophylls가 추출되고 ethyl acetate 분획물에는 polyphenols가 추출되기 때문이다. 따라서 hexane 분획물에서는 lutein, ethyl acetate 분획물에서는 trisinapoyl-diglucoside를 포함한 다양한 polyphenols가 분석되었다고 생각된다.

11. 적양배추 추출물을 LC-MS로 분석한 결과에서 anthocyanins 중 cyanidin 배당체들이 발견되었다.

적양배추 추출물에는 Proteasome 억제 효과가 있다고 알려진 cyanidin-3-glucoside-5-glucoside를 포함하여 총 16가지의 cyanidin 배당체가 분석되었다. 즉, proteasome 역가 저해율 측정 실험에서 적양배추 추출물의 효과는 다양한 종류의 cyanidin 배당체로 인한 것으로 생각된다.

따라서 양배추, 적양배추, 콜라비, 브로콜리, 케일의 세포증식 억제, 항산화 및 항산화 성분 함량, proteasome 및 NF- κ B 활성 억제, LC-MS 분석 결과를 통해 천연 proteasome 억제제로의 가능성을 확인할 수 있었다.

참고문헌

- [1] Sahu, I., & Glickman, M. H. (2021). Proteasome in action: substrate degradation by the 26S proteasome. *Biochemical Society Transactions*, 49(2), 629-644.
- [2] Bard, J. A., Goodall, E. A., Greene, E. R., Jonsson, E., Dong, K. C., & Martin, A. (2018). Structure and function of the 26S proteasome. *Annual review of biochemistry*, 87, 697-724.
- [3] Frankland-Searby, S., & Bhaumik, S. R. (2012). The 26S proteasome complex: an attractive target for cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1825(1), 64-76.
- [4] Wang, X., Cimermancic, P., Yu, C., Schweitzer, A., Chopra, N., Engel, J. L., Greenberg, C., Huszagh, A. S., Beck, F., Sakata, E., Yang, Y., Novitsky, E. J., Leitner, A., Nanni, P., Kahraman, A., Guo, X., Dixon, J. E., Rychnovsky, S. D., Aebersold, R., ... & Huang, L. (2017). Molecular details underlying dynamic structures and regulation of the human 26S proteasome. *Molecular & Cellular Proteomics*, 16(5), 840-854.
- [5] Bedford, L., Paine, S., Sheppard, P. W., Mayer, R. J., & Roelofs, J. (2010). Assembly, structure, and function of the 26S proteasome. *Trends in cell biology*, 20(7), 391-401.
- [6] Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, A., & Chandu, D. (2006). The ubiquitin-proteasome system. *Journal of biosciences*, 31(1), 137-155.
- [7] Chen, Y. J., Wu, H., & Shen, X. Z. (2016). The ubiquitin - proteasome system and its potential application in hepatocellular carcinoma therapy.

Cancer letters, 379(2), 245-252.

[8] Pagan, J., Seto, T., Pagano, M., & Cittadini, A. (2013). Role of the ubiquitin proteasome system in the heart. *Circulation research*, 112(7), 1046-1058.

[9] Bang, O. S. (2004). Ubiquitin-mediated proteolysis. *Molecular and Cellular Biology News*, 16(4), 12-21.

[10] Leestemaker, Y., & Ovaa, H. (2017). Tools to investigate the ubiquitin proteasome system. *Drug Discovery Today: Technologies*, 26, 25-31.

[11] Rahimi, N. (2012). The ubiquitin-proteasome system meets angiogenesis. *Molecular cancer therapeutics*, 11(3), 538-548.

[12] von Mikecz, A. (2006). The nuclear ubiquitin-proteasome system. *Journal of cell science*, 119(10), 1977-1984.

[13] El Yaagoubi, O. M., Oularbi, L., Bouyahya, A., Samaki, H., El Antri, S., & Aboudkhil, S. (2021). The role of the ubiquitin-proteasome pathway in skin cancer development: 26S proteasome-activated NF- κ B signal transduction. *Cancer Biology & Therapy*, 22(10-12), 479-492.

[14] Zinatizadeh, M. R., Schock, B., Chalbatani, G. M., Zarandi, P. K., Jalali, S. A., & Miri, S. R. (2021). The Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) signaling in cancer development and immune diseases. *Genes & diseases*, 8(3), 287-297.

[15] Seo, G. S. (2011). The role of NF-kappaB in colon cancer. *Korean J Gastroenterol*, 57(1), 3-7.

[16] Kwon, S. Y., Lee, C. T., Kim, Y. W., Han, S. K., Shim, Y. S., & Yoo,

C. G. (2003). Decreased Neutrophil Apoptosis in Patients with Sepsis is Related to the Activation of NF- κ B. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 54(5), 495-509.

[17] Serasanambati, M., & Chilakapati, S. R. (2016). Function of nuclear factor kappa B (NF- κ B) in human diseases—a review. *South Indian Journal of Biological Sciences*, 2(4), 368-87.

[18] Chae, S. W. (2005). Function and Activation of NF-kappa B in Immune System. *Korean Journal of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery*, 48(3), 284-288.

[19] Yu, H., Lin, L., Zhang, Z., Zhang, H., & Hu, H. (2020). Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 1-23.

[20] Huang, L., & Chen, C. H. (2009). Proteasome regulators: activators and inhibitors. *Current medicinal chemistry*, 16(8), 931-939.

[21] Mujtaba, T., & Dou, Q. P. (2011). Advances in the understanding of mechanisms and therapeutic use of bortezomib. *Discovery medicine*, 12(67), 471.

[22] Sherman, D. J., & Li, J. (2020). Proteasome inhibitors: Harnessing proteostasis to combat disease. *Molecules*, 25(3), 671.

[23] Georgoulis, V., Haidich, A. B., Bougioukas, K. I., & Hatzimichael, E. (2022). Efficacy and safety of carfilzomib for the treatment of multiple myeloma: an overview of systematic reviews. *Critical Reviews in Oncology / Hematology*, 103842.

[24] Kortuem, K. M., & Stewart, A. K. (2013). Carfilzomib. *Blood, The*

Journal of the American Society of Hematology, 121(6), 893–897.

[25] Zhong, Y. L., Xu, G. J., Huang, S., Zhao, L., Zeng, Y., Xiao, X. F., An, J. L., Liu, J., & Yang, T. (2019). Celastrol induce apoptosis of human multiple myeloma cells involving inhibition of proteasome activity. *European journal of pharmacology*, 853, 184–192.

[26] Sultana, T., Okla, M. K., Ahmed, M., Akhtar, N., Al-Hashimi, A., Abdelgawad, H., & Haq, I. U. (2021). Withaferin A: From Ancient Remedy to Potential Drug Candidate. *Molecules*, 26(24), 7696.

[27] Hassannia, B., Logie, E., Vandenabeele, P., Berghe, T. V., & Berghe, W. V. (2020). Withaferin A: From ayurvedic folk medicine to preclinical anti-cancer drug. *Biochemical Pharmacology*, 173, 113602.

[28] Staszczak, M. (2021). Fungal Secondary Metabolites as Inhibitors of the Ubiquitin - Proteasome System. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13309.

[29] Hubbell, G. E., & Tepe, J. J. (2020). Natural product scaffolds as inspiration for the design and synthesis of 20S human proteasome inhibitors. *RSC chemical biology*, 1(5), 305–332.

[30] Zhang, Z., Bergan, R., Shannon, J., Slatore, C. G., Bobe, G., & Takata, Y. (2018). The role of cruciferous vegetables and isothiocyanates for lung cancer prevention: current status, challenges, and future research directions. *Molecular nutrition & food research*, 62(18), 1700936.

[31] Favela González, K. M., Hernández Almanza, A. Y., & De la Fuente-Salcido, N. M. (2020). The value of bioactive compounds of cruciferous vegetables (Brassica) as antimicrobials and antioxidants: A review. *Journal of Food Biochemistry*, 44(10), e13414.

- [32] Li, Z., Lee, H. W., Liang, X., Liang, D., Wang, Q., Huang, D., & Ong, C. N. (2018). Profiling of phenolic compounds and antioxidant activity of 12 cruciferous vegetables. *Molecules*, 23(5), 1139.
- [33] Agagunduz, D., Sahin, T. O., Yilmaz, B., Ekenci, K. D., Duyar Ozer, S., & Capasso, R. (2022). Cruciferous Vegetables and Their Bioactive Metabolites: from Prevention to Novel Therapies of Colorectal Cancer. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022.
- [34] 농사로, 국립농업과학원 식생활영양과, (2022년 12월 19일), URL: <https://www.nongsaro.go.kr/portal/ps/psr/psrb/monthFdmtDtl.ps?menuId=PS03924&cntntsNo=208288&code=251004&thisYear=2018&thisMonth=03>.
- [35] Heo, S. H., Boo, K. H., Han, S. H., Park, S. S., & Kim, C. S. (2021). Changes in Physicochemical Properties and Biological Activities of Kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*) according to Storage Conditions. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 50(7), 699-706.
- [36] Lee, G. J., Heo, J. W., Jung, C. R., Kim, H. H., Jo, J. S., Lee, J. G., Lee, G. J., Nam, S. Y., & Hong, E. Y. (2016). Effects of artificial light sources on growth and glucosinolate contents of hydroponically grown kale in plant factory. *Journal of Bio-Environment Control*, 25(2), 77-82.
- [37] Joo, S. Y., & Choi, H. Y. (2016). Quality characteristics of cabbage rice nutritional bars made with varying ratios of cabbage powder. *Korean journal of food and cookery science*, 32(4), 441-448.
- [38] Hwang, E. S., & Thi, N. D. (2015). Impact of cooking method on bioactive compound content and antioxidant capacity of cabbage. *Korean journal of food science and technology*, 47(2), 184-190.

- [39] Nam, M. K., & Kang, K. J. (2013). The effect of red cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra*) extract on the apoptosis in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 42(1), 8-16.
- [40] Baek, K. H., Jo, D. J., Yoon, S. R., Kim, G. R., Park, J. H., Lee, G. D., Kim, J. S., Kim, Y. R., Han, B. S., & Kwon, J. H. (2013). Optimization of cultivation and storage conditions on red cabbage seed sprouts. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 45(1), 13-19.
- [41] Ha, H. J., & Lee, C. B. (2014). Antioxidant and anti-inflammation activity of red cabbage extract. *Culinary science and hospitality research*, 20(2), 16-26.
- [42] Zhang, Y., Hu, Z., Zhu, M., Zhu, Z., Wang, Z., Tian, S., & Chen, G. (2015). Anthocyanin accumulation and molecular analysis of correlated genes in purple kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(16), 4160-4169.
- [43] Pak, W. M., Kim, K. B. W. R., Kim, M. J., Kang, B. K., Bark, S. W., Kim, B. R., Ahn, N. K., Choi, Y. U., Yoon, S. R., & Ahn, D. H. (2014). Antioxidative effect of extracts from different parts of Kohlrabi. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 57(4), 353-358.
- [44] Kim, D. B., Oh, J. W., Lee, J. S., Kim, Y. H., Park, I. J., Cho, J. H., & Lee, O. H. (2014). Antioxidant activities of green and purple kohlrabi juices. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 46(5), 601-608.
- [45] Lee, H. S., & Park, Y. W. (2005). Antioxidant activity and antibacterial activities from different parts of broccoli extracts under high temperature. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 34(6), 759-764.

- [46] Park, S. J., An, I., Noh, G. P., Yoo, B. H., & Lee, J. R. (2019). Inhibitory effect of broccoli leaf extract on PGE 2 production by NF- κ B inhibition. *The Korea Journal of Herbology*, 34(6), 117-124.
- [47] Alfawaz, H. A., Wani, K., Alrakayan, H., Alnaami, A. M., & Al-Daghri, N. M. (2022). Awareness, Knowledge and Attitude towards 'Superfood' Kale and Its Health Benefits among Arab Adults. *Nutrients*, 14(2), 245.
- [48] Zietz, M., Weckmüller, A., Schmidt, S., Rohn, S., Schreiner, M., Krumbein, A., & Kroh, L. W. (2010). Genotypic and climatic influence on the antioxidant activity of flavonoids in kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(4), 2123-2130.
- [49] Mi, L., Gan, N., & Chung, F. L. (2011). Isothiocyanates inhibit proteasome activity and proliferation of multiple myeloma cells. *Carcinogenesis*, 32(2), 216-223.
- [50] Srivastava, S. K., & Singh, S. V. (2004). Cell cycle arrest, apoptosis induction and inhibition of nuclear factor kappa B activation in anti-proliferative activity of benzyl isothiocyanate against human pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis*, 25(9), 1701-1709.
- [51] Qin, C. Z., Zhang, X., Wu, L. X., Wen, C. J., Hu, L., Lv, Q. L., Shen, D. Y., & Zhou, H. H. (2015). Advances in molecular signaling mechanisms of β -phenethyl isothiocyanate antitumor effects. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(13), 3311-3322.
- [52] Dreiseitel, A., Schreier, P., Oehme, A., Locher, S., Rogler, G., Piberger, H., Hajak, G., & Sand, P. G. (2008). Inhibition of proteasome activity by anthocyanins and anthocyanidins. *Biochemical and biophysical research communications*, 372(1), 57-61.

- [53] Hong, Y. J., Kim, S. Y., Han, J. G., Lim, Y. I., & Park, K. Y. (2013). Inhibitory effects of cabbage juice and cabbage-mixed juice on the growth of AGS human gastric cancer cells and on HCl-ethanol induced gastritis in rats. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 42(5), 682-689.
- [54] Chen, D., Daniel, K. G., Chen, M. S., Kuhn, D. J., Landis-Piwowar, K. R., & Dou, Q. P. (2005). Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells. *Biochemical pharmacology*, 69(10), 1421-1432.
- [55] Yoon, H. G., & Liu, R. H. (2007). Effect of selected phytochemicals and apple extracts on NF- κ B activation in human breast cancer MCF-7 cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(8), 3167-3173.
- [56] Kim, G. S., Chang, J. P., Doh, E. S., Kil, K. J., & Yoo, J. H. (2016). Stem bark of *Maackia amurensis* extract according to extraction solvent. *The Korea Journal of Herbology*, 31(3), 43-48.
- [57] Latif, M. A., Ibrahim, F. W., Arshad, S. A., Hui, C. K., Jufri, N. F., & Hamid, A. (2019). Cytotoxicity, proliferation and migration rate assessments of human dermal fibroblast adult cells using *Zingiber zerumbet* extract. *Sains Malaysiana*, 48(1), 121-127.
- [58] Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of food composition and analysis*, 24(7), 1043-1048.
- [59] Chun, O. K., Kim, D. O., Moon, H. Y., Kang, H. G., & Lee, C. Y. (2003). Contribution of individual polyphenolics to total antioxidant capacity of plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(25), 7240-7245.

- [60] Wolfe, K. L., & Liu, R. H. (2007). Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(22), 8896–8907.
- [61] Song, W., Derito, C. M., Liu, M. K., He, X., Dong, M., & Liu, R. H. (2010). Cellular antioxidant activity of common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(11), 6621–6629.
- [62] Wolfe, K., Wu, X., & Liu, R. H. (2003). Antioxidant activity of apple peels. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(3), 609–614.
- [63] Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chemistry*, 64(4), 555–559.
- [64] Min, S. Y., & Yoon, H. G. (2019). Effects of Lentils (*Lens culinaris*) Extract on Proteasome Activity and Nuclear Factor κ B Activation in HepG2 Human Liver Cancer Cells. *The Korean Journal of Food And Nutrition*, 32(5), 565–570.
- [65] Kim, S. Y., & Yoon, H. G. (2019). Effects of persimmon leaf extracts on proteasome activity in HepG2 human liver cancer cells. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 51(4), 393–397.
- [66] Yoon, H. G., & Liu, R. H. (2008). Effect of 2 α -hydroxyursolic acid on NF- κ B activation induced by TNF- α in human breast cancer MCF-7 cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(18), 8412–8417.
- [67] Liu, Z., Shi, J., Wan, J., Pham, Q., Zhang, Z., Sun, J., Yu, L., Luo, Y., Wang, T. T. Y., & Chen, P. (2021). Profiling of Polyphenols and Glucosinolates in Kale and Broccoli Microgreens Grown under Chamber and Windowsill Conditions by Ultrahigh-Performance Liquid

Chromatography High-Resolution Mass Spectrometry. ACS Food Science & Technology, 2(1), 101-113.

[68] Shao, Y., Jiang, J., Ran, L., Lu, C., Wei, C., & Wang, Y. (2014). Analysis of flavonoids and hydroxycinnamic acid derivatives in rapeseeds (*Brassica napus* L. var. *napus*) by HPLC-PDA - ESI (-)-MS n/HRMS. Journal of agricultural and food chemistry, 62(13), 2935-2945.

[69] Ligor, M., & Buszewski, B. (2012). Effect of kale cultivation conditions on biosynthesis of xanthophylls. Journal of Food Research, 1(4), 74.

[70] Wiczowski, W., Szawara-Nowak, D., & Topolska, J. (2013). Red cabbage anthocyanins: Profile, isolation, identification, and antioxidant activity. Food research international, 51(1), 303-309.

[71] Cho, M., Lee, H. J., Kang, M. H., & Min, H. (2017). Comparison of antioxidant activity and prevention of lymphocyte DNA damage by fruit and vegetable juices marketed in Korea. Journal of Nutrition and Health, 50(1), 1-9.

[72] Kim, M. J., & Park, E. J. (2011). Feature analysis of different in vitro antioxidant capacity assays and their application to fruit and vegetable samples. Journal of the Korean society of food science and nutrition, 40(7), 1053-1062.

[73] Yang, S. Y., Kim, H. G., Lee, S. J., Cha, W. M., Ahn, C. H., & Boo, H. O. (2013). Comparison of the antioxidative abilities of greenhouse-grown cucumber according to cultivars and growth stages. Korean Journal of Plant Resources, 26(5), 548-556.

[74] Zafar, I., Hussain, A. I., Fatima, T., Abdullah Alnasser, S. M., & Ahmad, A. (2022). Inter-Varietal Variation in Phenolic Profile, Sugar

Contents, Antioxidant, Anti-Proliferative and Antibacterial Activities of Selected Brassica Species. *Applied Sciences*, 12(12), 5811.

[75] Sikora, E., Cieřlik, E., Leszczyńska, T., Filipiak-Florkiewicz, A., & Pisulewski, P. M. (2008). The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. *Food Chemistry*, 107(1), 55–59.

[76] Koss-Mikolajczyk, I., Kuszniereicz, B., Wiczowski, W., Płatosz, N., & Bartoszek, A. (2019). Phytochemical composition and biological activities of differently pigmented cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) and cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(12), 5499–5507.

[77] Zanoni, F., Primiterra, M., Angeli, N., & Zoccatelli, G. (2020). Microencapsulation by spray-drying of polyphenols extracted from red chicory and red cabbage: Effects on stability and color properties. *Food chemistry*, 307, 125535.

[78] Soengas Fernández, M. D. P., Sotelo Pérez, T., Velasco Pazos, P., & Cartea González, M. E. (2011). Antioxidant properties of Brassica vegetables.

[79] Samec, D., Urlic, B., & Salopek-Sondi, B. (2018). Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) as a superfood: Review of the scientific evidence behind the statement. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(15), 2411–2422.

[80] Kim, E. J., Choi, J. Y., Yu, M. R., Kim, M. Y., Lee, S. H., & Lee, B. H. (2012). Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 44(3), 337–342.

- [81] Lee, S. H., & Lee, S. O. (2016). Polyphenol contents and antioxidant activities of lentil extracts from different cultivars. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 45(7), 973–979.
- [82] Lee, I. A., Kim, H. J., & Kim, H. J. K. J. S. (2009). Effect of antioxidant activity of cheonggukjang.
- [83] Nam, D., Jang, E., Jang, K. H., & Lee, J. C. (2018). Radical scavenging activity of domestic fruit wine. *Korean Journal of Food Preservation*, 25(3), 351–358.
- [84] Kim, K. C., Eom, T. K., & Kim, J. S. (2019). Polyphenol contents and antioxidant activity of fruit extracts from *Daphniphyllum macropodum*. *J Adv Eng Technol*. 2019a, 12, 149–155.
- [85] Noolu, B., Gogulothu, R., Bhat, M., SYH Qadri, S., Sudhakar Reddy, V., Bhanuprakash Reddy, G., & Ismail, A. (2016). In vivo inhibition of proteasome activity and tumour growth by *Murraya koenigii* leaf extract in breast cancer xenografts and by its active flavonoids in breast cancer cells. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry–Anti-Cancer Agents)*, 16(12), 1605–1614.
- [86] Lee, S. M., & Park, K. Y. (1997). Inhibitory Effect of Kale Juice on the Growth and DNA Incorporation of Human Cancer Cells. *Preventive Nutrition and Food Science*, 2(2), 167–173.
- [87] Gwon, M. H., & Yun, J. M. (2021). Phenethyl isothiocyanate improves lipid metabolism and inflammation via mTOR/PPAR γ /AMPK signaling in the adipose tissue of obese mice. *Journal of Medicinal Food*, 24(6), 666–669.
- [88] Xu, F., Zheng, Y., Yang, Z., Cao, S., Shao, X., & Wang, H. (2014). Domestic cooking methods affect the nutritional quality of red cabbage.

Food Chemistry, 161, 162–167.

[89] Shen, M., Hang Chan, T., & Ping Dou, Q. (2012). Targeting tumor ubiquitin–proteasome pathway with polyphenols for chemosensitization. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry–Anti-Cancer Agents)*, 12(8), 891–901.

[90] Chekalina, N., Burmak, Y., Petrov, Y., Borisova, Z., Manusha, Y., Kazakov, Y., & Kaidashev, I. (2018). Quercetin reduces the transcriptional activity of NF- κ B in stable coronary artery disease. *Indian Heart Journal*, 70(5), 593–597.

[91] Rajendran, P., Rengarajan, T., Nandakumar, N., Palaniswami, R., Nishigaki, Y., & Nishigaki, I. (2014). Kaempferol, a potential cytostatic and cure for inflammatory disorders. *European journal of medicinal chemistry*, 86, 103–112.

[92] Salminen, A., Lehtonen, M., Suuronen, T., Kaarniranta, K., & Huuskonen, J. (2008). Terpenoids: natural inhibitors of NF- κ B signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(19), 2979–2999.

[93] Ryu, B. M., Ryu, S. H., Jeon, Y. S., Lee, Y. S., & Moon, G. S. (2004). Inhibitory effect of solvent fraction of various kinds of kimchi on ultraviolet B induced oxidation and erythema formation of hairless mice skin. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 33(5), 785–790.

[94] Kim, S. J. (2007). Domestic technology trends in the field of natural pigments. *Bulletin of Food Technology*, 20(1), 38–68.

[95] Olatunji, O. J., Chen, H., & Zhou, Y. (2017). Effect of the Polyphenol

Rich Ethyl Acetate Fraction from the Leaves of *Lycium chinense* Mill. on Oxidative Stress, Dyslipidemia, and Diabetes Mellitus in Streptozotocin Nicotinamide Induced Diabetic Rats. *Chemistry & biodiversity*, 14(10), e1700277.

[96] Ooi, D. J., Azmi, N. H., Imam, M. U., Alitheen, N. B., & Ismail, M. (2018). Curculigoside and polyphenol-rich ethyl acetate fraction of *Molineria latifolia* rhizome improved glucose uptake via potential mTOR/AKT activated GLUT4 translocation. *Journal of food and drug analysis*, 26(4), 1253-1264.

ABSTRACT

Effects of Cruciferous Vegetables Extracts on Proteasome Activities

Jeon Eun Young

Department of Next Generation Applied Sciences

Graduate School of

Sungshin University

The 26S proteasome is a major protease in eukaryotic cells. It maintains intracellular proteins by regulating various cellular pathways and removing damaged proteins that are prone to misfolding or aggregation. NF- κ B plays a crucial role in tumorigenesis by inhibiting apoptosis and inducing angiogenesis, cell proliferation, and migration. The 26S proteasome induces NF- κ B, which is in an inactive state in the cytoplasm, to move into the nucleus and become an activated state. Therefore, inhibition of the 26S proteasome can play a pivotal role in preventing cancer by regulating the function of NF- κ B. In this study, cabbage, red cabbage, kohlrabi, broccoli, and kale were selected among cruciferous vegetables consumed worldwide and rich in phytochemicals. In order to confirm anticancer and antioxidant effects, cell proliferation, antioxidant capacity and antioxidant component

content, proteasome inhibitory effect, and NF- κ B activation inhibitory effect of vegetable extracts were evaluated in liver cancer cells. In addition, kale and red cabbage, which had high proteasome inhibitory effects, were analyzed by LC-MS. In the cell proliferation experiment using the MTT assay, all five vegetable extracts significantly reduced the cell proliferation rates ($p < 0.05$). In the antioxidant activity measurement experiments using DPPH, ABTS, and CAA assays, red cabbage and kale extracts showed significantly high antioxidant activities ($p < 0.05$). In the antioxidant component content measurement experiments using the total polyphenol and total flavonoid content measurement, the red cabbage and kale extracts showed significantly high antioxidant component contents ($p < 0.05$), same as the results of the antioxidant activity measurement experiments. As a result of the proteasome titer inhibition rate measurement experiment, all five vegetable extracts did not show significant proteasome inhibitory effects in the CE assay using cell extracts, but in the CPIA assay that measures the intracellular proteasome titer inhibition rate, all five vegetable extracts showed significant proteasome inhibitory effects. In particular, kale extract showed the highest proteasome titer inhibition rate in a dose-dependent manner ($p < 0.05$). In addition, in the measurement of the proteasome titer inhibition rate of genistein, which is known to have proteasome inhibitory effect, and the glycosides genistin, 6"-O-Malonylgenistin, and 6"-O-Acetylgenistin, 6"-O-Acetylgenistin, which had no effect in the CE assay, showed the highest proteasome titer inhibition rate in the CPIA assay ($p < 0.05$). As a result of confirming the effect of kale extract on NF- κ B activity through western

blot experiment, NF- κ B activity was significantly inhibited at a concentration of 100 μ g/mL ($p < 0.05$). The kale extract, which had the highest proteasome titer inhibition rate, was fractionated for each solvent, and the proteasome titer inhibition rate measurement experiment was conducted. As a result, the hexane, chloroform, and ethyl acetate fractions showed significant proteasome inhibitory effects ($p < 0.05$). As a result of analyzing kale extracts and fractions by LC-MS, peaks with larger area values than other fractions were analyzed in the ethyl acetate fraction at a detector wavelength of 320nm and in the hexane and ethyl acetate fractions at a detector wavelength of 450nm. In particular, lutein of the carotenoid series was analyzed in the hexane fraction, and various polyphenols including trisinapoyl-diglucoside of the hydroxycinnamic acid series were analyzed in the ethyl acetate fraction. In the red cabbage extract, 16 types of cyanidin glycosides were identified through LC-MS analysis. Therefore, in this study, it was confirmed that cabbage, red cabbage, kohlrabi, broccoli, and kale can be used as natural antioxidants and proteasome inhibitors. In particular, it was confirmed that various phytochemicals contained in kale can act as proteasome inhibitors, and various cyanidin substances contained in red cabbage can act as proteasome inhibitors.