J East Asian Soc Dietary Life
20(1): 30~36 (2010)

블루베리가 인체 유방암세포 MCF7에서 세포 사멸 관련 유전자 발현에 미치는 영향

이 세 나·강 금 지†

덕성여자대학교 자연과학대학 식품영양학과

The Effect of Blueberry Extract on Gene Expressions Related to Apoptosis in Human Breast Cancer MCF7 Cells

Se-Na Lee and Keum-Jee Kang†

Dept. of Food & Nutrition, DukSung Women's University, Seoul 132-714, Korea

Abstract

This study was conducted to investigate the effects of blueberry extract on cell death, ROS and gene expression patterns associated with the anti-cancer activity in human breast cancer MCF7 cells. To accomplish this, 20 mg/mL concentration of blueberry extract was added to the cell culture for 0, 6, 12, 24 or 48 h, after which the effects were evaluated by various analyses. MTT assay showed that the cellular activities decreased rapidly during the first 12 h of treatment. During this period, dual staining with Hoechst33322 and propidium iodide also produced a similar trend in which the dead or dying cells increased sharply. Furthermore, evaluation of BrdU incorporation as an index for cell proliferation revealed a marked decrease during the first 12 h of treatment, suggesting that anticancer activity involves the inhibition of cell proliferation and induces cell death. ROS also increased according to the duration of the treatment, indicating intracellular accumulation is associated with the cell death. RT-PCR analysis revealed significant decreases in anti-apoptotic (Bax) and increases in pro-apoptotic gene expressions (Bcl-2, caspase- 3, and 9) ($p<0.05$). Taken these together, blueberry extract induces ROS accumulation in MCF7 cells, causing inhibition of cell proliferation and eventually leading to cell death. This cell death was associated with apoptotic gene expression in blueberry-treated cells for up to 24 h.

Key words : Blueberry, Bax, Bcl-2, caspase 3, 9, MCF7 cell.

서 론

2005년 통계청 자료에 의하면 암은 우리나라 사망 원인 중 1위를 차지하고 있으며, 암의 종류별로는 위암, 간암, 자궁암은 감소하는 반면, 폐암과 소위 서구형 암인 대장암, 유방암, 전립선 암 등이 급속히 증가하고 있다(Korea National Statistics Office 2005). 우리나라의 여성암 발생률 중, 가장 괄목할 만한 증가세를 보이고 있는 암은 유방암으로서, 7년 전에 비해 4.7% 증가하는 추세이며, 2004년 10만 명당 40.5명으로 급격히 증가하여 현재 여성암의 16.8%를 차지함으로써 국내 여성암 1위를 차지하고 있다(Ministry of Health and Welfare 2005).

유방암의 원인은 아직 밝혀져 있지 않지만, 대체로 유전적인 요인과 환경적인 요인에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다(Kelsey JL 2005). 환경적인 요인으로는 잘못된 식생활 중 과도한 영양 및 지방 섭취가 증가되면서 발생되어지는 것으로 추정하며, 이를 치료 및 예방하기 위해 암을 예방하는데 효과가 있는 과일과 채소를 충분히 섭취하도록 권장하고 있다(Jhons & Romeo 1999, Nkondjock & Ghadirian 2005, Giovannucci *et al* 2005).

블루베리는 쌍떡잎식물 진달래목 진달래과에 속하는 관목이다. 블루베리의 열매는 수분 84.61%, 탄수화물 14.13%, 단백질 0.67%, 그 밖의 다량의 식이섬유소와 칼륨, 망간, 철분으로 이루어져 있고 달고 신맛이 강하며, 둥글고 짙은 하늘색, 붉은 빛을 나타낸다. 블루베리에 가장 많이 함유되어 있는 폴리페놀류의 flavonoid 계에 속하는 안토시아닌 색소는 강력한 항암과 항산화 작용을 한다고 보고되어 있다(Wedge *et al* 2001, Bagchi *et al* 2004, Borek *et al* 2004, Smith *et al* 2004, Smith *et al* 2000, Akoh *et al* 2005, Shih & Gow-Chin 2005). Akoh *et al*(2005)은 블루베리의 구성 성분인 페놀 화합물은 결장암의 세포 증식과 세포 사멸을 일으켜 암세포를 억제시킨다고 보고하였다. Seeram *et al*(2006)은 25~200 ug/mL의 베리 상징액을 농도별로 구강(KB, CAL-27), 결장(HT-29, HCT116),

† **Corresponding author** : Keum-Jee Kang, Tel : +82-2-901-8363, Fax : +82-2-901-8372, E-mail : kjkang@duksung.ac.kr

유방(MCF-7), 전립선(LNCaP) 암세포에 떨어뜨려 DAPI 핵염색과 PCR을 한 결과, 농도에 따라 영향을 미치는 정도는 각각 다르지만 모든 농도에서 암세포의 성장과 증식을 억제한다고 보고하였다.

세포의 죽음은 세포 사멸(apotosis)과 세포 괴사(nerosis)로 나뉠 수 있는데, 세포 사멸은 계획된 죽음과 같은 의미로 사용된다(Danial & Korsmeyer 2004).

세포 사멸은 세포의 본질적인 기전으로서 수용체와 연관된 외부적인 경로와 세포 사멸을 조절하는 역할을 수반하는 막, 세포 내 소체막 등과 같은 미토콘드리아와 연관된 내부적인 경로, 두 가지에 의해 이루어지며, 두 경로 모두 cysteine protease의 일종인 caspase 효소의 연속적인 활성이 수반된다(Budihardjo I 1999). 미토콘드리아를 경유하는 세포 사멸은 크게 세 단계로 나눌 수 있는데, 첫 단계에서 세포 사멸을 결정하는데 가장 중요한 역할을 하는 Bcl-2 family(Adams & Cory 1998, Osford *et al* 2004)는 세포 사멸을 억제하는 Bcl-2와 세포 사멸을 유도하는 Bax로 나누어진다(Reed JC 1994).

Active site에 존재하는 세포 내 단백질과 핵단백질을 분해하는 단백질 분해 효소인 caspase(cystein-aspartyl-specific-protease)의 활성은 신호 전달의 마지막 단계로서 세포 사멸을 일으키는 주체가 되며, 기질이 되는 단백질 내 특정한 aspartic acid를 인지하여 아미노산 결합을 절단하는 역할을 하며, 이들은 또 다시 upstream caspase인 caspase-2, 8, 10과 downstream caspase인 caspase-1, 3, 6, 7, 9 등으로 나뉘어진다(Reed JC 1997, Budihardjo I 1999, Budihardjo *et al* 2004).

블루베리에 함유된 주요 색소 성분인 anthocyanin 등과 같은 단일 화합물의 항암 작용에 의한 선행 연구는 잘 알려져 있지만 순수한 블루베리 원액이 유방암에 미치는 영향에 대한 연구는 미비하므로, 블루베리 첨가 후 지속 시간에 따라 인체 유방암 MCF7 세포의 증식과 사멸을 다양한 세포염색법에 의하여 관찰하였고, 또한 세포 사멸에 영향을 미치는 유전자인 Bcl-2, Bax, caspase-3 및 caspase-9의 mRNA 발현을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 시료 준비

블루베리는 냉동, 동결 건조시킨 미국산용을 방산시장(Seoul, Korea)으로부터 구입하였다. 대부분의 시약은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 기타의 시약은 그 구입처를 별도로 표시하였다. 블루베리 400 g을 4℃에서 믹서로 20분간 점성이 강한 액체 상태로 만든 후, SW41 rotor용 초원심분리기 튜브를 이용하여 20,000 rpm에서 1시간 초원심분리하여, 24 mL의 순수한 블루베리 원액을 추출하여 1 mL씩 분주한 후 −70℃ 냉동고에 보관하였다.

2. 세포배양

인체 유방암 MCF7세포(한국 세포주 은행)는 10% fetal bovin serum(FBS; PAA, Exton PA, USA), penicillin-streptomycin(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 넣은 Dulbecco's Modified Eagle's medium(DMEM, GibcoBRL, Grand Island, NY, USA)에서 세포 농도는 2×10^5 cells/mL로 10 mL의 배양액에 계대하여 세포가 confluent한 경우 계대 배양하여 유지하였다. 세포 분석을 위하여 gelatin-coated coverslip 위에 drop 형태로 부착한 후 이용하였으며, 2일 후 선행 연구(Lee *et al* 2009)에서 결과가 가장 좋았던 블루베리 20 μg/mL를 첨가 후 0, 6, 12, 24 및 48시간 동안 지속하게 한 후 세포 증식과 세포 사멸을 3 반복하여 관찰하였다. 블루베리 처리군에 대한 대조군으로는 vehicle인 DMEM 20 μL/mL를 사용하였다.

3. 세포 생존율 분석(MTT Assay)

MCF7세포의 생존률은 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 분석법으로 측정하였다. MCF7 세포를 24-well plate에 2×10^5의 세포 농도로 1 mL씩 분주한 후 37℃ 배양기에서 24시간 증식시킨 후 블루베리 20 μg/mL를 첨가한 후 0, 6, 12, 24 및 48시간 동안 지속시켰다. 각각의 시간이 지난 후, 각각의 well에 100 μL의 MTT 용액(5 mg/mL, phosphate buffered saline: PBS, pH 7.4)을 가한 후, 4시간 동안 37℃ 배양기에서 반응시켰으며, 4시간 후 배양액을 제거하고, 1 mL의 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 첨가하여 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 formazan을 용해시켰다. 그 후 96-well용 분광광도계(THERMO max, USA)를 이용하여 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 세포 생존율은 정상 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

4. 이중염색에 의한 세포 사멸분석

세포 사멸을 분석하기 위하여 세포를 trypsin으로 분산시켜 Eppendorf tube에 부유세포 및 부착세포를 수집하여 세포 소실을 방지하였다. 이들 각 세포 부유액을 각각 10 mg/mL의 Hoechst 33342와 1 mg/mL의 propidium iodide(PI) 혼합 염색액으로 20분 배양하여 염색하였다. 원심분리로 세포 부유액 내의 과다량의 염색액을 수세한 후 세포 관찰 표본을 만들어 형광현미경으로 분석하였다. 형광 현미경에서 무작위로 선정된 현미경 시야의 세포를 촬영 기록한 후, 세포 수를 측정하였다.

5. BrdU(Bromodideoxyuridine) 염색법을 통한 세포 증식 분석

MCF7세포의 증식을 시각화하기 위해 블루베리를 첨가한 후 각각의 지속시킨 시간 완료 6시간 전에 10 mM/mM 농도

의 BrdU 용액이 되도록 BrdU를 첨가하여 증식 중인 세포로 incorporation시킨 후, 세포 증식을 분석하였다. 염색이 보이게 하기 위하여 anti-BrdU antibody(1:200 희석, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였다. 핵의 배경 염색은 100 μg/mL의 propidium iodide로 10분간 염색한 후, 세포를 mounting, sealing하여 형광현미경(Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 관찰하였다.

6. Spectrofluorimeter에 의한 Radical Oxygen Species (ROS) 분석

ROS를 측정하기 위하여 800 nM의 DCFDA 용액을 PBS가 담긴 세포에 각 처리시간 별로 첨가하여 20분간 반응시킨 후, 즉시 차가운 PBS로 5회 철저히 수세하여 잔여량의 DCFDA를 제거하고 96-well dish(Corning Incorporated Corning, NY, USA)를 Zenyth 3100 multiwell plate reader에서 485 nm(excitation) and 535 nm(emission)에서 각각 측정하여 ROS 값을 구하였다.

7. RT-PCR(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)에 의한 사멸 관련 유전자 분석

세포 사멸에 관여하는 유전자 발현을 관찰하기 위하여 블루베리를 첨가한 후 시간별로 지속시킨 MCF7세포로부터 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA로부터 표적 유전자의 mRNA를 역전사시켜 cDNA를 합성하고, Bcl-2, Bax, caspase-3, caspase-9 primer 쌍을 첨가하여 PCR을 수행하였다. PCR의 총 부피는 25 μL이고, 1 μL의 RT산물, 2.5 μL의 10× buffer, 2 μL의 2.5 mM dNTP, 1.5 μL의 25 mM $MgCl_2$, 20 μM의 forward와 reverse primer 쌍(Bio-Rad, Hercules, Ca, USA)을 각각 1 μL씩 넣어주고 0.1 μL의 Taq DNA polymerase (Promega)를 넣어준 후, total volume 25 μL에 맞추기 위해서 증류수를 첨가하였다. Denaturation 반응은 95℃에서 15분 그리고, 94℃에서 30초, 65 또는 62℃ 유전자에 따라 30초, 72℃에서 1분 동안 35, 37, 39 cycles을 반응시킨 후, 72℃에서 10분 동안 post extension시켰다.

8. DNA Agarose Gel 전기 영동

RT-PCR 산물을 1.0% agarose(BMA, USA cat No. 50004) gel(1X Tris-acetate-EDTA butter, 1.0% agar, 1 mg/mL ethidium bromide)에서 30분 동안 70 voltage에서 전기영동을 한 후 image analyzer로 관찰하였다.

9. 통계 분석

각각의 실험은 독립적으로 3번 이상 실시하였으며, 얻어진 결과는 평균과 표준편차 또는 %로 표시하였다. PCR 산물의 발현 정도를 수치화하기 위하여 Quantity One program을 이용하여 그 비율을 결정하였다. 실험군 간의 유의성 차이는 SPSS program을 이용하여 Duncan's multiple range test로 $p<0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

1. MTT 분석

블루베리 20 μg/mL를 인체 유방암세포 MCF7에 첨가하고 각각 0, 6, 12, 24및 48시간이 지난 후 MTT assay를 한 결과, 블루베리를 첨가하고 12시간이 되었을 때 세포 생존성이 급격히 감소되었으며, 24시간 지속시켰을 시에는 12시간 지속시켰을 시보다는 유의성이 높게 나타났지만 6 및 12시간 지속 시에 보이는 세포 생존성의 대조군 대비 감소 비율(각각 약 25 및 50% 감소)에 비하면 미미한 차이로 보인다. 따라서 전체적으로 볼 때, 블루베리 추출물은 유방암 세포의 생존성을 12시간 지속시켰을 때에 급격히 감소시키며, 그 이후 감소 상태가 지속되는 것으로 나타났다(Fig. 1).

2. 세포 생존, 사멸 구별법

MCF7세포의 세포 사멸 진행이 세포 활성의 감소와 관련되어 있는지를 규명하기 위하여 세포 변화와 형태를 Hoechst 33322와 propidium(PI)으로 이중 염색한 결과, Fig. 2A에서 보듯이 PI(red)(+) 세포수가 블루베리 첨가 후 6시간을 개시로 급격하게 증가되는 것을 보여주고 있어, MTT assay에 의한 세포 활성의 감소는 유방암 세포가 사멸을 진행시키고 있으며, 이는 그 이후로도 지속적으로 유사한 세포 사멸을 보이는 것과 밀접하게 연관되어 있음을 알 수 있다. 또한 핵의

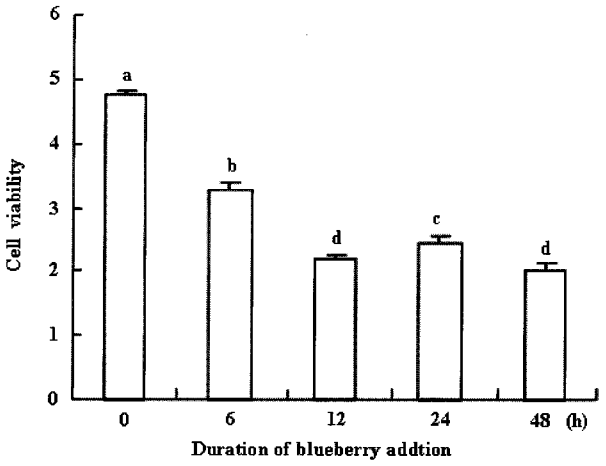


Fig. 1. The time course effects of blueberry extract for 0, 6, 12, 24 and 48h on the viability in MCF7 breast cancer cells. Cell viability was measured by MTT assay, and presented as arbitrary numbers. The absorbance was measured and presented in each replicate as cell viability in three replicate experiments.

형태도 대조군에 비하여 둥근모습보다는 농축되고 때로는 파편화된 염색체 형태를 보여, 세포가 사멸했거나 사멸 중인 세포임을 관찰할 수 있었다(Fig. 2A). 이같이, MTT와 이중 염색 분석으로 블루베리 추출물이 인체 유방암 MCF7 세포 생존성을 저해하며, 이는 세포 사멸과 관련이 있다는 것을 보여 주었다.

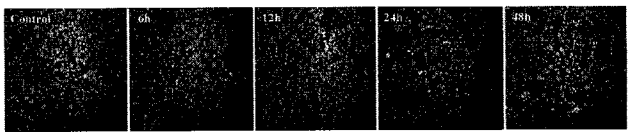
암세포에 anthocyanin을 첨가할 경우, 세포 사멸을 일으키는 기전은 anthocyanin이 암세포의 세포 주기에 영향을 미쳐 G0, G1 phase에 arrest를 일으켜 S phase로 진행되어지지 않게 한다. 이로 인해, DNA 합성이 저해되어 세포의 수축, 변형이 일어나며, apoptosis가 일어나게 된다(Sun & Liu 2006). Olsson *et al*(2004)의 연구에 의하면, 블루베리 등을 포함한 다양한 베리류에 들어있는 anthocyanins 0.01~350 μg/mL와 malvidin-3-glucoside 20~200 μg/mL, ascorbic acid 5~200 μg/mL가 유방암 및 결장암 세포의 사멸을 농도 의존적으로 증가시킨다고 보고하였다. 본 연구에서는 단일 화합물을 사용한 Olsson *et al*(2004)의 실험과는 달리 블루베리 원액을 이용하여 유방암세포의 증식과 사멸에 미치는 영향에 대해 관찰하였으나, 결과는 Olsson *et al*(2004)의 연구 결과와 비슷하게 관찰되었다.

3. BrdU 염색법을 통한 세포 증식 관찰

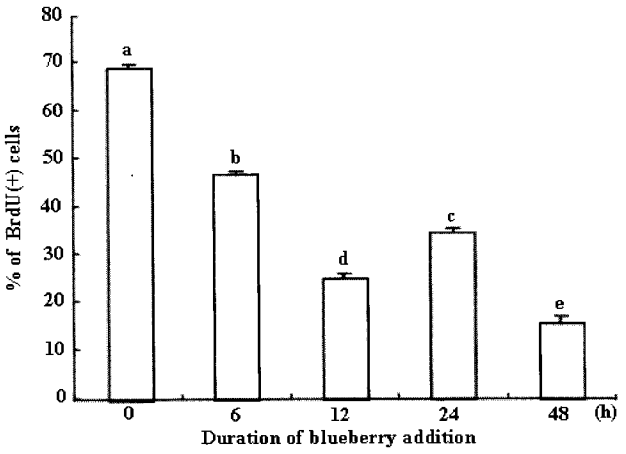
세포 사멸 이외에 MCF7세포가 DNA 합성으로 세포 증식 활동을 보이는지를 알기 위하여 증식된 세포만을 염색해 주는 BrdU핵 염색법을 이용하여 유방암 세포 증식에 미치는 결과를 분석한 결과, 세포 증식 비율은 블루베리 첨가 후 지속 시간에 따라 점차로 감소됨을 보여 주었으며, 특히 블루베리 첨가 후 12시간이 되었을 때는 0, 6시간 동안 지속시킨 때에 비해 유의적으로 낮아짐을 알 수 있었다. 24시간 지속시켰을 때에는 12시간 지속시켰을 때에 비해 유의적으로 높아졌다가 48시간째에는 12시간 지속시보다 더 낮아졌다(Fig. 2B). Malik *et al*(2005)의 연구에서는 석류 추출물 10~100 g/mL를 48시간 PC3 전립선암세포에 첨가시켜 배양한 경우 석류 추출물이 G0/G1 phase 지수를 증가시켜 DNA 합성을 저해하여 전립선암세포의 사멸을 유도하였다고 보고하였다. 본 연구에서도 블루베리 첨가 후 48시간이 되었을 때 대부분의 세포가 G0/G1 phase 수치가 증가하여 S/M기로 넘어가지 못하였으며, 이러한 결과로 인해 세포 증식이 억제됨을 알 수 있었다.

4. ROS 분석

상기의 결과에서 세포활성 감소는 세포 사멸과 관련이 있으며, 블루베리 첨가 후 24시간까지는 시간 의존적으로 세포 사멸을 유도한 것으로 나타났다. 이러한 결과가 과연 세포 내에 축적되는 ROS의 양과 연계되어 있는지를 알기 위하여 ROS를 측정하였다. ROS는 생체 세포를 공격하여 지질과 단백질 핵산을 파괴하고, 여러가지 효소 기능을 저해하여 암과 같은 질병을 발생시키고 노화를 촉진한다(Sahinoglu *et al* 1996, Nakamura *et al* 2003). Wang *et al*(2006)의 연구에 의하면 유방암 발생은 과도한 활성 산소종을 억제할 수 있는 항산화 체계의 불균형에서 야기된 DNA와 세포 조직의 손상 때문이라고 보고하였다. 본 실험 결과에서 블루베리를 첨가한 즉시에는(0시간) baseline의 배경 형광만을 보여주지만 블루베리 추출물을 첨가하여 6시간 지남에 따라 ROS가 급격히 증가되며, 이후에는 그 증가 폭이 완만히 되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 3). 따라서 블루베리를 첨가하여 6시간이 되었을 때부터 급격히 ROS를 축적시킴으로써 세포 내의 ROS 농도를 증가시켜 세포에 손상을 주기 시작하며, 결국 12시간 정도의 작용시간을 가지고 세포활성 저하 및 세포 증식 저하 활동을 보이는 것으로 추정할 수 있을 것이다.



(A)



(B)

Fig. 2. The time-course effects of blueberry extract for 0, 6, 12, 24 and 48h on cell death by dual staining with Hoechst33342 and propidium iodide(PI), and the cell proliferation by BrdU incorporation in MCF7 breast cancer cells, respectively. Cell were treated as indicated blueberry at 20 μg/ mL for the indicated durations. While Hoechst(blue) stains all the nuclei, PI(red) stains only the dead cells. The proportions of cell death showing PI(+) cells are markedly increasing against all Hoechst-stained cell nuclei from 12 h onwards(A). BrdU incorporation was measured by fluorescence using an anti-BrdU antibody after 18 h BrdU exposure at each time point(B). Over 1,300 cells were scored and presented in each replicate as a proportion of BrdU(+) cells in three replicate experiments.

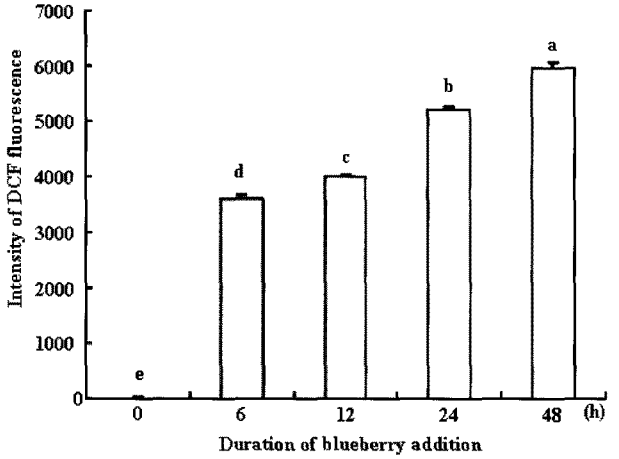


Fig. 3. The time-course effects of blueberry extract for 0, 6, 12, 24 and 48h on the ROS accumulation in MCF7 breast cancer cells. Accumulated ROS was measured by fluorescence using a spectrofluorimeter after staining with DC-F. The intensity of three representative DCF fluorescenc was measured and shown as mean±S.D.

5. 세포 사멸 관련 유전자 발현 분석

세포 사멸을 억제하는 기능을 갖는 Bcl-2, 세포 사멸을 유도하는 Bax, 사멸 신호 전달의 마지막 경로인 caspase-3 및 caspase-9 발현을 분석한 결과, Bcl-2의 발현은 블루베리 첨가 시간이 증가함에 따라 Bcl-2의 발현이 저하됨으로써 세포 사멸이 일어남이 관찰되었다(Fig. 4). 그와 반대로 Bax의 발현은 블루베리를 첨가하고 6, 12 및 24시간까지는 급격히 증가하다가 (p<0.05), 48시간째에는 유의적으로 낮아졌다. 세포 사멸의 지표로 사용되는 Bcl-2와 Bax의 비율(Fig. 5)은 블루베리를 첨가하고 24시간이 되었을 때 유의적으로 높았고, 48시간에는 감소함을 보였다. Oltvai *et al*(1993)은 세포 사멸 과정에서 Bcl-2 family 단백질의 세포내 균형은 미토콘드리아 막의 유지 여부에 중요한 지표가 된다고 보고하였으며, Antonsson *et al*(2001)은 세포 사멸 시에는 Bcl-2 단백질은 4배 정도 감소하였고, Bax는 7배 정도 증가되었다고 보고하였다.

신호 전달의 마지막 경로인 caspase-3 및 caspase-9은 핵 안의 DNA를 분절하여 세포를 사멸시키는 특징을 나타내고 있다. Yang *et al*(2001)은 caspase-3은 세포 사멸을 일으키는데 중요한 역할을 하며, 유방암이나 다른 종류의 암에서 caspase-3이 결핍되거나 감소되었음을 보고하였다. 본 연구에서 caspase-3의 발현은 블루베리를 첨가하고 24시간이 되었을 때 가장 높았으며, 48시간이 되었을 때는 발현이 유의적으로 감소됨을 보였다. Caspase-9의 발현도 caspase-3의 발현과 유사하게 나타나고 있다. 블루베리 첨가 후 48시간이 되었을 때 Bax, caspase-3과 caspase-9의 발현이 감소되는것은 블루베리는 당 함량이 높고, 온도에 매우 민감하여 산화를 잘 일으킴

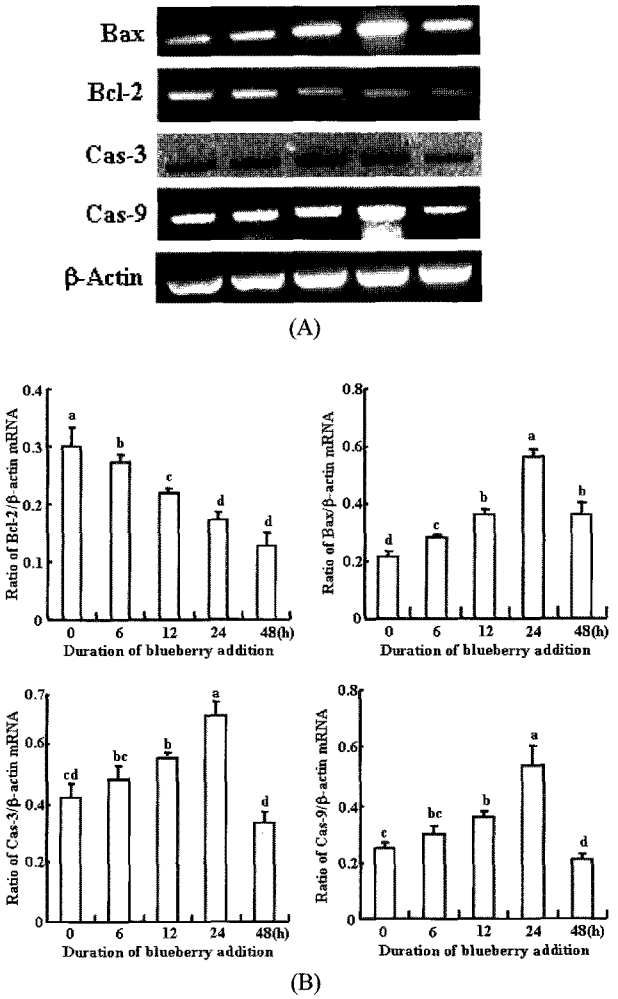


Fig. 4. The time course effects of blueberry extract for 0, 6, 12, 24 and 48h on apoptosis-related gene expression in MCF7 breast cancer cells. RT-PCR was carried out from the total RNAs isolated form the cells treated for corresponding duration. To demonstrate semi-quantitaion analysis, the intensity of three representative RT-PCR products were analyzed and shown as mean±S.D. β-Actin was served as an internal control for RNA isolation, RT-PCR and loading controls.

으로써 48시간 동안 지속시켰을 경우, 첨가 시간이 길어짐에 의해 블루베리가 산화하여 그 활성이 떨어졌음을 추정할 수 있다. 또한, Vokkala *et al*(1999)은 caspase는 유방암 종의 진행에 관여함으로써 유방암 세포에 항암제 투여 시 초반에는 caspase의 활성이 증가됨에 따라 DNA를 분절시켜 세포 사멸을 일으키지만, 유방암의 경우 시간의 증가에 따른 사멸효과에 영향을 받지 않는 암세포의 경우 악성 종양으로 형질을 변환시킴으로써 형질 변환 후에는 생존력을 증가시키기 위해 세포 사멸을 선택적으로 차단한다고 보고하였다.

본 실험의 결과, 블루베리를 유방암세포 MCF7에 첨가 한 후 0, 6, 12, 24, 48시간 지속시켰을 때 블루베리는 MCF7의

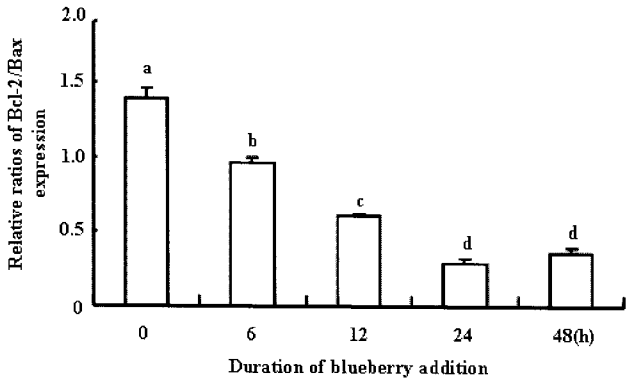


Fig. 5. Relative ratios of Bcl-2/Bax to demonstrate expression patterns of pro-survival and pro-apoptotic genes. β-Actin was served as an internal control for RNA isolation, RT-PCR and loading controls. The intensities of three representative RT-PCR products were analyzed and shown as mean±S.D.

증식을 억제하고, ROS 축적과 세포 사멸을 증가시키며, Bcl-2, Bax, caspase-3 및 caspase-9의 발현을 통하여 세포 사멸을 유도하는 효과가 있는 것으로 나타났다. 앞으로 *in vitro*와 *in vivo* 실험에서 더욱 더 다양한 연구의 필요성이 요구되어진다.

결론 및 요약

본 연구는 블루베리 추출물이 인체유방암세포 MCF7에서 세포의 생존, 증식, ROS 축적과 세포 사멸 관련 유전자 발현에 미치는 영향을 살펴보았다. 블루베리 추출물 20 ug/mL를 MCF7세포에 첨가 후 0, 6, 12, 24 및 48시간 동안 지속시켰다. MTT 분석에 의한 세포 활성은 처리 시간이 증가됨에 따라 점차로 활성이 감소됨을 보여주었다. 세포 생존율도 Hoechst 33342와 propidium iodide로 이중생사염색으로 분석한 결과, 유사한 경향을 나타내었다. 이와 더불어, 세포 증식에 영향을 주는지를 규명하기 위하여 BrdU incorporation을 이용한 결과, 블루베리 추출물은 세포 사멸을 유도할 뿐 아니라, 세포 증식도 경시적으로 억제함을 보였다. 이 같은 경향은 세포 내에 축적되는 ROS에 의하여 12시간 정도의 ROS 작용 시간을 거쳐 급격한 세포 사멸을 블루베리 첨가 후 24시간 동안 지속시켰을 때 유도함을 알 수 있었다. 지속 시간에 따라 Bcl-2의 발현은 유의적으로 감소하였고($p<0.05$), Bax의 발현은 24시간 지속시켰을 때 유의적으로 높았다($p<0.05$). 한편, caspase-3와 caspase-9도 모두 24시간 지속시켰을 때 유의적으로 높았다($p<0.05$). 세포 사멸의 지표로 사용되는 Bcl-2와 Bax의 비율은 첨가시간이 증가할수록 감소하였다.

결론적으로, 블루베리는 인체유방암세포 MCF7의 증식을 억제하고, ROS 축적과 세포 사멸을 증가시키며, Bcl-2, Bax, caspase-3 및 caspase-9의 발현을 통하여 세포 사멸을 유도하는 효과가 있는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 2008년도 덕성여자대학교 자연과학연구소의 지원에 의해 수행되었기에 감사드립니다.

문 헌

Adams JM, Cory S (1998) The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science* 281: 1322-1326.

Akoh CC, Yi W, Fischer J, Krewer G (2005) Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. *J Agric Food Chem* 53: 7320-7329.

Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, Martinou JC (2001) Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Bio Chem* 276: 11615-11623.

Bagchi D, Sen CK, Bagchi M, Atalay M (2004) Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. *Biochem* 69: 75-80.

Borek C, Labriola D, Livingston R (2004) Dietary antioxidants and human cancer. *Inter Cancer Ther* 3: 333-341.

Budihardjo I (1999) Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Bio* 115: 269-290.

Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X (2004) Chemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Bio* 115: 269-290.

Danial NN, Korsmeyer SJ (2004) Cell death: critical control points. *Cell* 23: 205-219.

Giovannucci E, Stampfer MJ, Colditz G, Rimm EB, Willett WC (2005) Diet and cancer an evolving picture. *JAMA* 293: 233-234.

Jhons T, Romeo JT (1999) Functionality of food phytochemicals. *Recent Adv Phytochem* 33: 133-159.

Kelsey JL (1998) Breast cancer epidemiology. *Cancer Res* 48: 5615-5623.

Korea National Statistic Office (2005) The Korean cause of death.

Lee SN, Kim KH, Kang KJ (2009) The effect of blueberry on the ROS and apotosis in human breast cancer MCF7 cells. *Plant Resou Res Institute Duksung Women's University* 8: 51-67.

Malik AS, Afaq F, Sarfaraz S, Adhami VM, Syed DN, Mukhtar H (2005) Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *PNAS* 102: 14813-14818.

Ministry of Health and Welfare (2005) 한국인 암 등록 조사 자료 분석보고서. 5-7.

Nakamura J, Purvis ER, Swenberg JA (2003) Micromolar concentrations of hydrogen peroxide induce oxidative DNA lesions more efficiently than millimolar concentrations in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 31: 1790-1795.

Nkondjock A, Ghadirian P (2005) Risk factors and risk reduction of breast cancer. *Med Sci* 21: 175-180.

Olsson ME, Gustavsson KE, Andersson SF, Nilsson A, Duan RD (2004) Inhibition of cancer cell proliferation *in vitro* by fruit and berry extracts and correlations with antioxidant levels. *J Agri Food Chem* 52: 7264-7271.

Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 80: 609-619.

Osford SM, Dallman CL, Jhonson PW, Ganesan A, Packham G (2004) Current strateigs to target the anti-apoptosis Bcl-2 protein I n cancer cells. *Cuee Med Chem* 11: 1031-1039.

Reed JC (1997) Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387: 773-776.

Reed JC, Korsmeyer SJ, Xiao-Ming Y, Yang E, Zha J, Sedlak T, Oltvai Z (1994) Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *Cell* 74: 609-619.

Sahinoglu T, Stevens CR, Bhatt B, Sahinoglu T (1996) The role of reactive oxygen species in inflammatory disease: Evaluation of methodology. *Enzymology* 9: 628-634.

Seeram NP, Adams LS, Zhang YJ, Lee RP, Sand DN. Scheuller HS, Heber DV (2006) Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells *in vitro*. *J Agri Food Chem* 54: 9329-9339.

Shih PH, Gow-Chin Y (2005) Effects of anthocyanidin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells. *Food Chem Toxicol* 43: 1557-1566.

Smith MAL, Marley KA, Seigler DA, Singletary KW, Meline B (2000) Bioactive properties of wild blueberry fruits. *J Food Sci* 65: 352-356.

Smith SH, Tate PL, Huang G, Magee JB, Meepagala KM, Wedge DE, Larcom LL (2004) Antimutagenic activity of berry extracts. *J Med Food* 7: 450-455.

Sun J, Liu RH (2006) Cranberry phytochemical extracts induce cell cycle arrest and apotosis in human MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Letters* 241: 124-134.

Vokkala M, Paakko P, Soini Y (1999) Expression of caspase 3, 6, and 8 is increased in parallel with apoptosis and histological aggresiveness of the breast lesion. *Br J Cancer* 81: 592-599.

Wang X, Yuan S, Wang J, Lin P, Liu G, Lu Y, Zhang J, Wang W, Wei Y (2006) Anticancer activity of litchi fruit pericarp extract against human breast cancer *in vitro* and *in vivo*. *Toxicol Appl Pharm* 215: 168-178.

Wedge DE, Meepagala KM, Magee JB, Smith SH, Huang G, Larcom LL (2001) Anticarcinogenic activity of strawberry, blueberry, and raspberry extracts to breast and cervical cancer cells. *J Med Food* 4: 49-52.

Yang XH, Edgerton S, Thor AD (2001) Reconstitution of caspase-3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to radiation therapy. *J Oncol* 26: 62-73.

(2009년 11월 11일 접수, 2009년 12월 29일 채택)