

## 씀바귀 추출물이 인체유방암세포의 활성 산소 및 Bcl-2 Family에 미치는 영향

김희정·강금지<sup>†</sup>

덕성여자대학교 자연과학대학 식품영양학과

### Effects of *Ixeris dentata* Extract on Radical Oxygen Species and Bcl-2 Family in Human Breast Cancer Cells

Hee-Jung Kim and Keum-Jee Kang<sup>†</sup>

Dept. of Food and Nutrition, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

#### ABSTRACT

The aim of the study was to determine the effects of *Ixeris dentata* extract (IDE) on anticancer activity in human breast cancer MDA-MB-231 cells at both cellular and molecular levels. The cells were cultured in the presence of 0, 20, 30 and 40 µg/mL *Ixeris dentata* extract for 24 hours, respectively. At the end of culture, cytochemical analyses for MTT activity, trypan blue dye exclusion, Annexin V-FITC Apoptosis, and radical oxygen species (ROS) were conducted. RT-PCR was also performed to determine whether or not alterations in cell viability affect the Bax/Bcl-2 ratio. MTT assay showed that relative cell viability decreased in a dose-dependent manner ( $p<0.05$ ). Reduction of cell viability matched well with increased cell membrane permeability as determined by trypan blue dye exclusion test ( $p<0.05$ ). The rates of intracellular ROS also increased in a similar manner to those of TB-stained cells. There was an associated shift of apoptotic cells from early to late apoptosis between the 30 and 40 µg/mL. Bax/Bcl-2 ratio significantly increased along with significant decreases in Bcl-2 expression between 30 and 40 µg/mL groups ( $p<0.05$ ). In conclusion, anticancer activity of *Ixeris dentata* extract is modulated by a reduction in cell viability along with increased membrane permeability, leading to ROS accumulation within cells, and subsequently cell death through an apoptotic pathway that involves Bax and Bcl-2 in human breast cancer MDA-MB-231 cells.

**Key words:** *Ixeris dentata*, anticancer activity, breast cancer cells, ROS, Bax/Bcl-2 ratio

#### 서론

유방암은 2012년 국가암등록통계(Ministry of Health and Welfare 2012)에 따르면 한국 여성의 암 발생자 중 갑상선암에 이어 높은 발생률을 보이고 있으며, 유방암의 연평균 증가율도 6.0%로 높은 증가율을 보이고 있다. 아직 유방암의 원인은 밝혀지지 않지만, 유전적과 환경적 요인이 있는데, 환경적 요인 중에서 식이로 섭취되는 영양소와 관련하여 서구화된 식생활과 환경의 변화가 큰 연관성이 있는 것으로 추정되며(Kelsey JL 2005), 아직 뚜렷한 화학적 치료요법이 없는 상태에서, 식품과 영양을 통한 예방과 치료에 관심 및 연구가 계속적으로 증가하고 있다. 최근 미국암연구협회(American Institute of Cancer Research 2007)에서는 암 발생의 30~40%가 적절한 식품과 영양을 통하여 예방할 수 있다고 발표하였으며, 암 예방에 효과가 있는 과일과 채소를 충분히 섭취하도록 권장하고 있다.

세포사멸(apoptosis) 및 세포괴사(necrosis)는 각기 다른 특성을 가지며, 세포활성 및 유전자 분석을 통해 세포예정사(programmed cell death)에 의한 세포사멸 여부를 인지할 수 있다(Vaux DL 1993). 세포사멸은 물리적, 화학적 인자 및 감염 등으로 인한 세포 손상이나 심한 스트레스로 인해 나타나는 반응으로 알려져 있다(Alnemri ES 1997). 세포사멸에 있어서 천연물의 항암작용은 그 종류에 따라 다르지만, 천연물로 야기된 세포막의 투과성, 세포 내의 활성산소(radical oxygen species, ROS) 증가(Cabiscol *et al* 2000; Kma L 2013) 및 사멸억제 유전자인 Bcl-2와 이를 유도하는 유전자인 Bax가 서로 길항적으로 조절된다고 알려져 있으며, 또한 Bax/Bcl-2 ratio는 세포사멸의 주요 임상지표로 이용되고 있다(Reed JC 1994; Zhap *et al* 2001).

씀바귀(*Ixeris dentata*, ID)는 비타민 A, C와 E, 카로티노이드 및 flavonoids 등을 포함한 생리활성 물질이 풍부하며, 항산화 및 면역기능을 증진시킨다고 알려진 sesquiterpene lactones 등 다양한 성분들을 함유하고 있다(Ahn *et al* 2006, Cha *et al* 2011; Chung *et al* 1994; Zhang *et al* 2002). 쯔바귀 추출물이 항돌연변이, 유전적 독성 완화(Kim 1995; Kim *et al*

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

2002a; Kim *et al* 2002b; Kim *et al* 2004), 항고지혈(Lim & Lee 1997), 항염증(Lee E 2011) 및 항산화 작용(Kim *et al* 2002a; Lee *et al* 2009; Hong *et al* 2011) 등 다양한 생리적 활성을 보인다고 보고되었다. 또한 MG-63, A549, Hep3B, MCF-7 세포 등의 인체 암세포 주에서 높은 증식 억제 및 유전독성 완화작용을 보여주고 있으며(Kim SH 1995; Kim *et al* 2002a; Kim *et al* 2002b; Heo *et al* 2009), 이러한 항암효과는 썬바귀의 핵산, 부탄올 및 메탄올 등의 추출 분획으로 암세포 증식저해작용이 보고되어 있다. 그러나 보다 간편하고 식이에 친화적인 썬바귀 추출물을 이용하여 악성 유방암세포 중의 하나인 MDA-MB-231 세포에 대하여 어떻게 세포학적으로 암세포 증식저해작용을 일으키는지에 대한 상세한 연구보고는 없으며, 세포막과 활성산소의 변화에 의한 항암작용의 진행과정이 세포에서 사멸 관련 유전자들과 어떠한 관계가 있는지를 밝힌 연구보고는 찾아보기 어렵다.

따라서 본 연구는 썬바귀에 포함된 다양한 생리활성 물질들이 식이용으로 이용되었을 경우, 저독성 용매 및 수용성 성분들이 극대화된 에탄올 추출물이 인체 유방암세포인 MDA-MB-231의 세포 증식 억제, 막 투과성, 세포 사멸 및 ROS 축적에 미치는 영향과 apoptosis에 관여하는 Bax와 Bcl-2 유전자 발현 변화를 분석하여 썬바귀의 항암 물질로서의 가능성을 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료

2011년도에 강원도 횡성에서 수확한 썬바귀를 직접 구매하여 열풍 건조 및 파쇄를 통하여 분말화한 후,  $-70^{\circ}\text{C}$  냉동고에 이용 시까지 보관하였다. 건조 분말 썬바귀 80 g을 200 mL의 70% ethyl alcohol(EtOH)에 첨가하여  $4^{\circ}\text{C}$  rocker에서 18시간 진탕시킨 후, 썬바귀 입자 및 불용성 물질을 제거하기 위하여  $4^{\circ}\text{C}$  2,500×g에서 각각 30분간 3회 원심분리(LE-80, Beckman, Chicago, IL, USA)하여 침전물을 제거하고 상정액을 얻었다. 그 후 Speed Vac(AES1010, Savant, New York, USA)을 이용하여 점성이 강한 액체로 농축시켜 2.4 g의 농축물을 얻었다. 이를 8 mL의 70% EtOH로 충분히 녹여내었으며, 다시  $4^{\circ}\text{C}$  10,000 × g에서 원심분리로 상층액만을 취하여 최종 건조분말기준 10 mg/mL의 에탄올 추출물을 얻었다. 추출물은 분주하여 실험할 때까지  $-70^{\circ}\text{C}$  냉동고에 저장하였으며, 실험 시 분주액을 용해시켜, 다시  $4^{\circ}\text{C}$  10,000 × g에서 원심분리 후, 배양액에 필요한 농도로 희석하여 배양액의 세포에 입자의 유입이 일어나지 않도록 유의하여 사용하였다.

### 2. 세포배양

인체 유방암 MDA-MB-231 세포는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 구입하였으며, 세포배양은 이미 보고된 방법에 따라 수행하였다. 즉, 10% fetal bovine serum(FBS; PAA, Exton PA, USA), 1% penicillin-streptomycin (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)을 넣은 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, high glucose, Welgene, Daegu, Korea)을 혼합하여 만든 배양액에  $2 \times 10^5$  cell/mL의 세포 농도로 계대하였고, 5%  $\text{CO}_2$ ,  $37^{\circ}\text{C}$  배양기에서 배양하였다. 세포가 배양접시에 70% 정도 밀집성을 보일 경우, phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2) 용액으로 세척한 후, trypsin-ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)(T/E, Welgene, Korea)를 처리하여 세포를 분리하여, 다시 계대 배양하여 세포를 유지하였다.

### 3. 시료첨가 및 농도결정

세포 분석을 위한 시료 첨가 농도를 결정하기 위하여, MDA-MB-231 세포를 96-well plate에  $1 \times 10^4$  농도로 seeding 하였으며, 6시간 후 썬바귀 추출물(*Ixeris dentata* extract: IDE)을 0~150  $\mu\text{g/mL}$ 까지 다양한 농도로 처리하였다. 24시간 처리 후 세포 형태학적 모양변화 관찰 및 각 처리군 별 세포를 계수하여 half maximal inhibitory concentration(IC50)을 예비 실험을 통하여 결정하였다. 이를 통하여 세포 수 감소와 형태학적 모양이 대조군과 비교하여 현저하게 변화되는 농도를 기준으로 그 이상과 이하의 농도인 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 및 80  $\mu\text{g/mL}$ 로 좁혀 정하였고, 이 농도에서 2차로 trypan blue 염색에 의하여 세포생존성을 측정하였다. 그 결과, 최종적인 IDE 처리농도는 세포 수의 감소, 세포의 형태학적 모양을 고려하여 0, 20, 30, 40  $\mu\text{g/mL}$ 로 결정하였다. IDE 처리군에 대한 대조군(Control)으로는 MDA-MB-231 세포의 배양액인 DMEM을 사용하였으며, 추출물 첨가에 따른 효과가 추출물의 용매인 70% EtOH처리와 독립적인지 확인하기 위하여 예비실험을 한 결과, 대조군에 비교하여 큰 차이를 나타내지 않았다.

### 4. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide(MTT) 분석

Gelatin-coated된 원형 coverslip에  $2 \times 10^5$  cells/well 농도로 seeding된 coverslip을 24-well dish에 옮긴 후, 5%  $\text{CO}_2$ ,  $37^{\circ}\text{C}$  배양기에서 3시간 안정화시킨 후, IDE를 농도 별로 첨가하였다. 24시간 처리 후, PBS로 세척하고 새 배양액 100  $\mu\text{L}$ 에 5 mg/mL의 MTT용액(Sigma Chem Co) 10  $\mu\text{L}$ 를 혼합하여 첨가하고,  $37^{\circ}\text{C}$  배양기에서 2시간 반응시킨 후에는 50  $\mu\text{L}$ 의 dimethyl sulfoxide(DMSO, Welgene)를 첨가, 구입회사의 추천된 방법에 의해 보라색 formazan을 용해시켜 ELISA reader

(SpectraMax, Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 결과는 대조군(0 µg/mL)을 100%로 하여 세포활성을 백분율(%)로 상대적으로 나타내었으며, 세포활성의 흡광도를 50%로 감소시킬 수 있는 시료의 농도(IC50)로 다시 한 번 확인하였다.

### 5. Trypan Blue Dye Exclusion Assay에 의한 세포막 투과성 측정

세포막의 투과성에 의한 암세포의 생존 상태를 결정하기 위하여 IDE를 24 시간 처리한 후, PBS로 수세한 세포에 200 µL PBS를 넣고 동량의 200 µL의 0.4%(w/v) trypan blue액을 첨가하여 3~5분간 37°C에서 반응시킨 후(Strober W 2001), 각 처리군 별 임의로 세지역의 영상을 기록하고, 이를 토대로 총 400여개 이상의 세포를 계상하여 trypan blue 염색에 대한 세포투과성으로 세포생존성을 결정하였다.

### 6. 세포내 ROS의 DCF-DA에 의한 Spectrofluorimetry 분석

세포 독성으로 작용하는 ROS의 축적에 의한 세포 손상을 가져오는 과산화물을 측정하기 위하여 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA, Sigma) 형광염료를 이용하였다(Cabiscol *et al* 2000). 근접 빛이 차단된 96-well dish에  $1 \times 10^4$  cells을 각각 seeding한 후, 각 IDE 처리군 별로 24시간 후, Hank's balanced salt solution(HBSS)로 세포를 세척한 후, deaeration 시킨 800 nM의 DCF-DA를 첨가하여 잘 혼합한 후, 20분간 37°C의 배양기에서 정치하여 반응시켰다. 반응 종료 직후, HBSS와 PBS로 수세하고, Zenyth3100 multiwell plate reader (Anthos Labtec Instruments, Wals, Austria)를 이용하여 485 nm와 535 nm에서 spectrofluorimetry 분석으로 측정된 ROS에 결합된 형광 DCF-DA를 측정하여 대조군에 대한 상대적인 수치로 나타내었다.

### 7. 세포사멸 단계의 Fluorescence-activated Cell Sorting(FACS) 분석

IDE 처리 농도로 야기된 세포사멸의 진행단계를 구체적으로 분석하여 농도별로 일어나는 세포사멸의 특성을 결정하기 위하여 세포막의 막투과성을 탐지함으로써 세포의 사멸진행 과정을 차별화할 수 있는 Cell Lab ApoScreen Annexin V-FITC(fluorescein isothiocyanate) Apoptosis Kit(Beckman Coulter, Inc, South Kraemer Boulevard Brea, CA, USA)를 이용하여 세포사멸 단계를 분석하였다. 이를 위해, 세포를 6-well plate에  $3 \times 10^5$  /well의 농도로 분주하여 24시간 동안 안정시킨 후, IDE를 농도별로 처리, 24시간 배양 후 T/E를 처리, 원

심분리하여 세포들을 회수하였다. 그 후 각각의 농도별 세포의 수를 정량하여  $1 \times$  binding buffer를 첨가하여 총 세포수를 일정하게 맞추고, 각 농도별 세포에 annexin V-FITC 용액 5 µL와 propidium iodide(PI) 용액 5 µL를 첨가하여 어두운 곳에서 15분 동안 반응시킨 뒤, FACS analysis 기기(Cell Lab Quanta SC, Beckman Coulter, Inc)를 이용하여 각 세포사멸 유형 및 단계별 사멸세포를 분석하였다.

### 8. 역전사-중합연쇄반응(Reverse Transcription-polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

사멸유도에 관여하는 유전자의 발현 분석을 위하여 농도별 IDE를 처리한 세포로부터 total RNA를 분리하였다. 그 total RNA로부터 mRNA를 역전사시켜 cDNA를 합성하고, 표적유전자인 Bcl-2과 Bax 유전자 mRNA에 대한 PCR을 수행하였다. PCR 시료는 총 50 µL로 cDNA 2 µL,  $10 \times$  buffer 5 µL, dNTP 5 µL, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 3 µL, 10 pmol/µL의 양 primer 쌍 1 µL(Table 1), Taq DNA polymerase(Promega) 0.2 µL를 넣은 후, 전체 부피는 증류수로 50µL로 조정하였다. Denaturation 반응은 95°C 3분, 94°C 30초, 55 또는 58°C(primer에 따라 annealing 온도가 다름) 30초, 72°C 1분을 각 cycle로 하여 30 cycles 반응시킨 후, post extension을 72°C 10분간(Table 1) 시킨 후에 1.0% agarose(cat No. 50004, BMA, Washington, DC, USA) gel( $1 \times$  Tris-acetate-EDTA buffer, 1.0% agar, 1 mg/mL ethidium bromide)에서 20분 동안 100 voltage에서 전기영동을 한 후, image analyzer(Gel Doc XR+, Bio-Rad, Washington, DC, USA)로 관찰하였다. 세포관련 유전자의 발현 정도를 수치화하기 위하여 Image J 프로그램(NIH, Bethesda, MD, U.S.A.; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>)을 이용하였으며, 세포사멸 유전자의 대조군으로 β-Actin 수치에 대한 각각의 유전자의 상대적인 비율(%)을 결정하였다. 각 cDNA를 주형으로 하여 PCR을 3회 수행 후, 나타난 산물의 밴드를 3회 분석하여, 그 평균치를 그래프로 나타내었다.

### 9. 통계분석

각 실험은 독립적으로 3회 이상 실시하였으며, 얻어진 결과는 평균과 표준편차 또는 %로 표시하였다. 실험군 간의 차이는 SPSS® 12.0(SPSS Inc. Chicago, IL, USA) software를 이용하여 ANOVA 분석 후, Duncan's multiple range test로 유의성을  $p < 0.05$  수준에서 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. IDE에 의한 세포 증식 억제 효과

IDE가 유방암세포 MDA-MB-23 세포의 증식에 미치는 영

Table 1. Gene primer pairs used for RT-PCR

Genes	Primer pairs	Sequences	Conditions/cycles
Bcl-2	Forward	5'-AGCTGCACCTGACGCCCTTCA-3'	94°C 30 sec
	Reverse	5'-AGCCAGGAGAAATCACAGAGG-3'	55°C 30 sec 30 72°C 1 min
Bax	Forward	5'-ATGGACGGGTCCGGGGAGCAG-3'	94°C 30 sec
	Reverse	5'-CAGTTGAAGTTGCCGTCAGA-3'	58°C 30 sec 30 72°C 1 min
β-Actin	Forward	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	94°C 30 sec
	Reverse	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	60°C 30 sec 25 72°C 1 min

향을 알아보기 위해 MTT assay를 통해 세포 증식 억제율을 측정하였다.

MTT는 살아있는 세포의 미토콘드리아에 있는 reductase에 의해 환원되어 formazan을 형성하지만, 사멸된 세포에서는 미토콘드리아가 깨져 formazan을 형성하지 못하기 때문에(Liu *et al* 1997) IDE 처리로 인하여 MDA-MB-231 세포의 증식이 저하되는 것을 추정할 수 있다. 예비실험에서 결정된 다양한 농도에 의하여 최종 선정된 0, 20, 30 및 40 µg/mL IDE 처리 후, MTT 반응액을 첨가하고, formazan을 용해시켜 흡광도를 측정하여 대조군에 대한 상대적 값으로 환산하였다.

실험 결과, IDE 처리 농도에 따라 유방암 세포의 생존율이 유의적으로 감소하여 20, 30, 및 40 µg/mL의 농도로 24시간 동안 처리하였을 때 각 76, 43 및 25%의 생존율을 보였다(Fig. 1). 이전의 연구 보고에 따르면 IDE의 부탄올 분획물이 폐암 세포주인 A549에서 93.75%, IDE의 핵산 분획물은 간암 세포주인 Hep3B에서 84.91%, 유방암 세포주인 MCF-7에서 68.56%의 높은 억제 효과를 보여주었다(Kim SH 1995). 따라서 본 연구에서도 IDE를 처리함으로써 유방암 세포주인 MDA-MB-231 세포 증식을 억제하였고, 특히 이전의 연구들보다 낮은 농도에서 효과가 있음을 확인하였다.

## 2. IDE의 Trypan Blue 염색에 대한 세포막의 투과성 유도

MTT assay 통해 보여준 세포증식 억제 효과가 trypan blue 염색에 대한 세포막의 투과성과 관련성이 있는지를 조사하기 위하여 IDE를 24 시간 처리한 후, trypan blue 염색을 하여 확인하였다. 각 처리군간 총세포수에 대한 염색된 세포수의 비율을 각 실험 당 400여 개의 세포를 계상한 결과를 정량적으로 나타내었다. 실험결과, 대조군이 6.9%였으나, 20, 30 및 40 µg/mL IDE 처리 후, 각 19.6, 59.7 및 82.0%로 세포가 trypan blue dye에 대한 투과성이 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2B). 이러한 결과는 세포질이 아

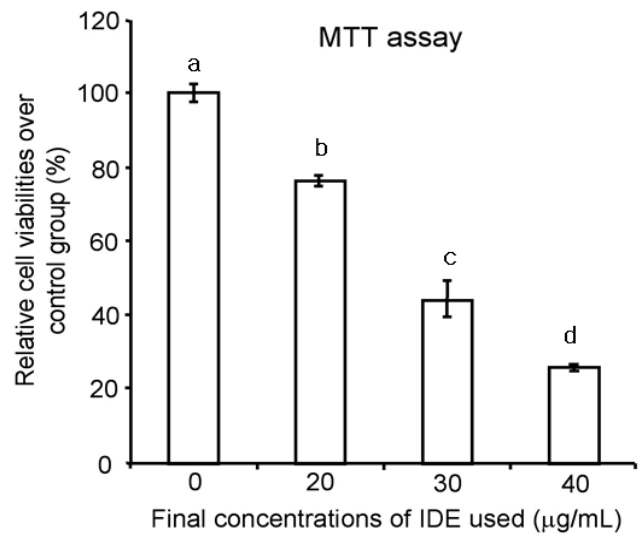
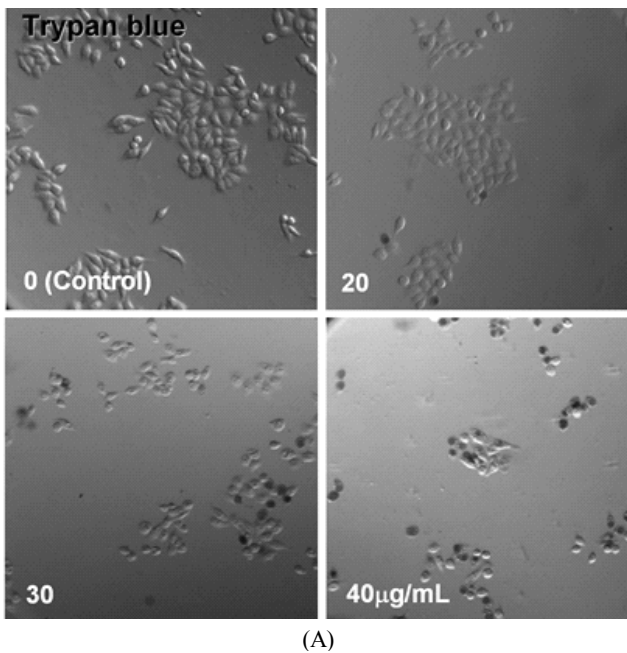


Fig. 1. Effects of *Ixeris dentata* extract (IDE) on cell viability obtained from MMT assay in MDA-MB-231 cells.

Three replicate experiments were performed for the MTT assay. Relative cell viability over the control group is shown. The values (mean±S.D.) with different alphabetical letters are significantly different at  $p < 0.05$  in varying treatment groups, respectively.

니라 세포막의 형질 변화인 trypan blue dye에 대한 암세포의 막 투과성이 IDE 농도에 따라 증가하는 것으로, 세포막이 온전하고 건강한 세포는 염색이 되지 않는 반면, 세포막의 손상으로 구멍이 형성되면 세포질이 dye에 의하여 푸르게 염색된다(Fig. 2A). 또한, differential interference contrast(DIC) 현미경법에 의하여 영상 기록된 대조군 세포의 경우, 커다란 세포들의 조각으로 활발한 세포증식의 모습을 볼 수 있었으나, IDE를 처리한 군에서는 세포의 증식활동도 적을 뿐만 아니라, 배양접시에서 세포가 뺏어나가는 형태가 매우 제한되어 농도가 높을수록 점진적으로 둥그런 세포 형태를 띠고 있었다.



**Fig. 2. Effects of *Ixeris dentata* extract (IDE) on trypan blue permeability to the cell membrane in MDA-MB-231 cells.**

Three replicate experiments were performed for the trypan blue dye exclusion test. Random and representative images of the cells stained with trypan blue were shown (A). At least 400 cells were scored in randomly chosen fields for the quantitative graph (B). The values(mean±S.D.) with different alphabetical letters are significantly different at  $p < 0.05$  in different treatment groups, respectively.

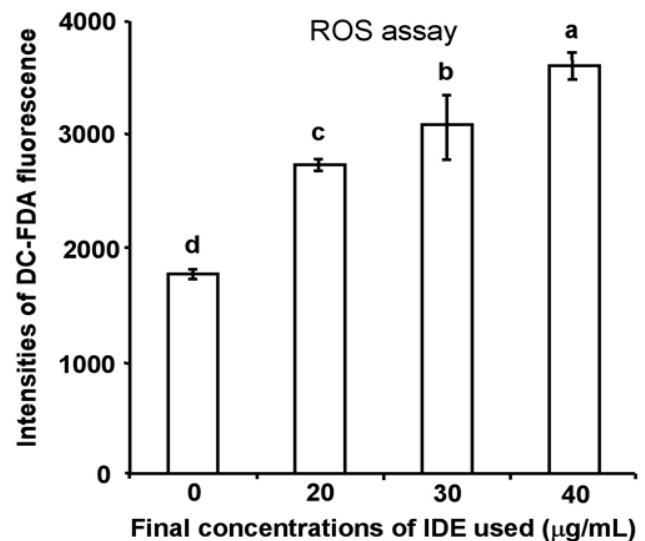
Trypan blue 염색법은 암세포를 포함한 다양한 세포의 세포활성 측정법 또는 세포막 투과성 측정법(Strober W 2001)

으로 자궁경부암 HeLa와 유방암 MCF-7 세포계통(Abhyankar *et al* 2010) 및 혈액암 CEM과 유방암 T47D 세포계통(Somasagara *et al* 2011)에서 이용되는 간단하고 신속한 세포활성의 측정기법이다. 비록 IDE를 이용한 다른 연구보고의 세포 투과성과 직접 비교할 자료는 없지만, 위에 인용된 보고의 세포막 투과성 저하는 세포의 내재적인 세포사멸 과정과 관련이 있는 것으로 보여진다.

본 실험에서 앞서 보여준 IDE 농도 증가에 따른 trypan blue 염색 비율의 증가는 세포질의 MTT의 결과와 반비례적으로 나타나고 있어, 이와 같은 세포질 및 세포막의 투과성 저하의 이유로 첫째, IDE 처리에 따라 세포증식 활동의 저하로 인한 세포수의 증가 정도가 낮아지고, 둘째, 세포막의 손상으로 인하여 사멸하는 세포수가 증가하여 세포 내의 투과성이 저하되는 것으로 추정할 수 있다.

### 3. IDE에 의한 세포내 ROS 축적 유도

IDE 처리에 의한 세포 증식 억제와 관련이 있는지를 조사하기 위해 ROS와 특이적으로 결합하는 형광염료인 DCF-DA를 이용하여 확인하였다. 실험결과, 세포 내총 ROS의 지표인 형광 강도가 대조군의 경우 1,800인 반면, 20, 30 및 40 µg/mL 농도에서는 각 2,760, 3,100 및 3,600을 보여 주어, IDE 처리 농도 의존적으로 암세포 내에 ROS 축적이 증가하는 것을 간접적으로 알 수 있었다(Fig. 3). 이와 같은 형



**Fig. 3. Effects of *Ixeris dentata* extract (IDE) on intracellular accumulation of radical oxygen species (ROS) in MDA-MB-231 cells.**

Three replicate experiments were performed for the ROS assay using spectrofluorimetry by DCF-DA. The values(mean±S.D.) with different alphabetical letters are significantly different at  $p < 0.05$  in different treatment groups, respectively.

광의 강도 즉, ROS의 축적 증가는 대조군에 비해 20  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서부터 나타났고, 30 및 40  $\mu\text{g/mL}$  농도에서는 증가 폭이 크지는 않았지만, 모두 유의성 있게 증가하였다. 따라서, IDE 처리에 따른 세포증식 억제 및 세포막의 투과성 증가는 세포내에 축적되는 ROS의 양과 긴밀한 연관이 있음이 확인되었다.

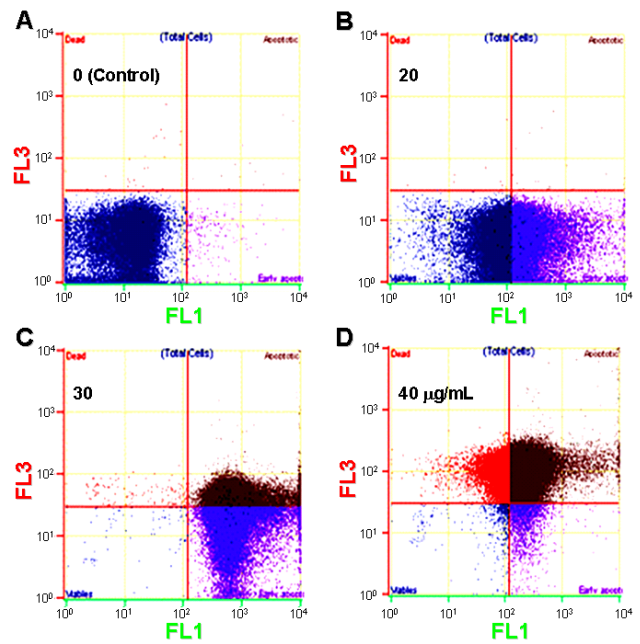
기존의 여러 연구 결과에서 암세포에 대한 씬바귀의 세포사멸은 항산화작용(Kim *et al* 2002a; Lee *et al* 2009; Hong *et al* 2011)보다 ROS를 축적하여 세포사멸을 초래한다고 보고되었다. 또한, 한 연구에서는 유방암세포 MCF-7과 정상세포 MCF-10A를 블루베리로 처리했을 때, ROS 축적이 MCF-7 세포에서만 일어난다는 것을 보여주었다(Lee & Kang 2008).

산화-환원의 조절에 의해 생체내 세포들의 생존을 조절하게 되는데(Trachootham *et al* 2008), 만일 세포 내의 활성산소를 방어하는 체계인 항산화물질의 불균형이 일어나면 환경으로부터 세포내로 활성산소를 흡수하거나, 과도 생산하게 되어 세포에 심각한 손상을 가져온다고 알려져 있다(Uttara *et al* 2006). 더 나아가, 최근에는 산화-환원 조절은 생체 내의 대상이 암세포이거나 또는 *in vitro*에서라도 암세포와 정상세포 사이의 선택은 이들 세포들의 산화-환원 환경 차이에 의존할 수도 있으며, 이외에도 세포신호, 항산화효소 발현량 등이 종합적 작용으로 일어나며(Wang & Yi 2008), 산화-환원 상태는 정상세포와 암세포에 대하여 마치 양날의 칼과 같은 역할을 한다. 즉, 정상세포에서는 활성산소 축적을 방지하여 산화적 스트레스를 제거하지만, 암세포에서는 활성산소를 축적시켜서 세포활성 감소, 막투과성의 증가를 초래하여, 결국 전형적인 산화적 스트레스 유도에 의한 세포사멸이 일어나는데(Nogueira & Hay 2013), 본 실험에서도 ROS의 증가와 세포사멸이 긴밀한 관련이 있는 것으로 사료된다.

#### 4. IDE 처리 농도별 세포사멸의 특성

IDE에 의해 사멸이 유도된 세포들을 flow cytometry를 이용하여 Annexin V-FITC와 PI로 이중 염색하고 정량적으로 분석하였다(Fig. 4). 실험결과, 대조군에서는 일부 괴사된 세포를 제외하고, 초기사멸 및 후기사멸 세포는 매우 낮았다. 하지만 IDE 처리 농도에 따른 초기세포 사멸은 20, 30 및 40  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 각 50.30, 52.35 및 2.7%로 나타났다. 후기사멸 또한 20, 30, 및 40  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 각 0.03, 47.39 및 82%로 증가하였다. 특히, 40  $\mu\text{g/mL}$ 에서는 전체 세포사멸이 84.7%로 유방암 세포사멸의 효과가 높은 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 20  $\mu\text{g/mL}$  농도에서는 초기사멸이 일어나는 것을 알 수 있었고, 30과 40  $\mu\text{g/mL}$  농도에서는 후기사멸을 통해 세포사멸이 이루어짐을 알 수 있었다.

추출용매와 제형의 특성은 상이하지만, 씬바귀 메탄올 추



Different apoptotic stages	Cell proportions(%) at the following IDE concentrations( $\mu\text{g/mL}$ )			
	0 (Control)	20	30	40
Live	99.13	49.65	0.11	0.63
Early apoptosis	0.75	50.30	52.35	2.70
Late apoptosis	0.04	0.03	47.39	82.00
Dead	0.08	0.01	0.15	14.47

**Fig. 4. Effects of *Ixeris dentata* extract (IDE) on different stages of apoptotic cells in MDA-MB-231 cells.**

Three replicate experiments were performed using the Apoptosis kit. Representative images of FACS results of detailed progressive cell death were shown. After 24h incubation with IDE, and early apoptosis and apoptotic cells were detected by FACS using the kit.

출물은 골육암세포 MG-63에 대한 항암 효과를 100  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 76% 성장억제를 가져왔으며(Kim 1995), 씬바귀의 분획물은 375~500  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 68.56~93.75%의 높은 억제 효과를 보여 주었다(Kim *et al* 2002b). 본 실험에서 나타난 결과는 이전의 항암효과를 발견한 씬바귀 추출물 보고(Chung *et al* 1994; Kim 1995; Chung *et al* 2002; Kim *et al* 2002a; Kim *et al* 2002b; Zhang *et al* 2002)를 뒷받침하며, 특히 IDE에 의해 발생된 높은 세포사멸 효과는 세포내 ROS 축적 증가로 암세포의 스트레스 증가와 손상 유도와 관련이 있음을 알 수 있었다.

#### 5. IDE가 Bcl-2 Family mRNA 발현에 미치는 영향 앞선 결과를 통해 세포사멸에 이르는 효과가 세포가 내재

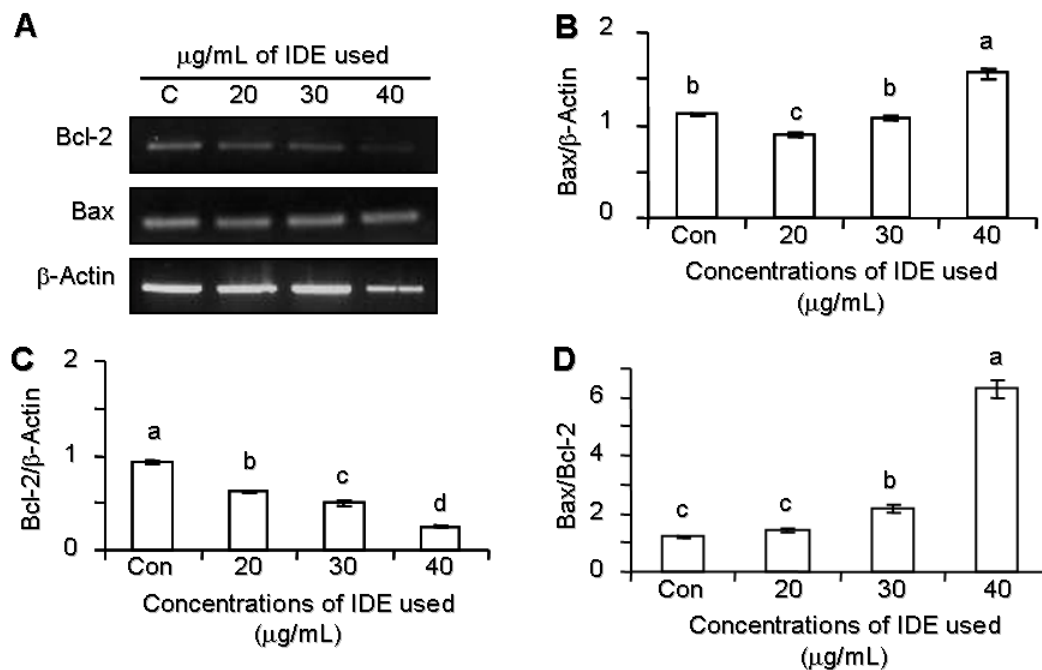
적으로 갖고 있는 유전자 발현을 따라 조절되는지를 관찰하기 위해, Bcl-2 family인 Bcl-2와 Bax의 mRNA 발현을 확인하였다. 실험 결과, 세포사멸을 억제, 지연시켜 세포의 생존을 연장시키는 유전자인 Bcl-2의 발현은 IDE 농도에 따라 감소하는 경향을 보였으며, Bax의 발현량은 현저하게 증가하였다(Fig. 5A~C). 이는 IDE가 함유하는 다양한 화합물들이 협동적 또는 길항적으로 작용하여 세포사멸을 유도하는 것으로 추정된다. 특히, Bax/Bcl-2 ratio는 암 환자에서 유용한 임상적인 지표로 이용되는 바, 본 연구에서 보여준  $\beta$ -Actin에 대한 상대적인 Bax/Bcl-2 ratio는 첨가된 IDE의 농도에 의존적인 증가를 보여주는 것으로 나타났다(Fig. 5D). 따라서 Bcl-2 family 발현이 전사 수준에서 IDE 농도 의존적으로 변화되고, 특히 Bax/Bcl-2 비율의 증가됨을 통해 IDE에 의한 세포사멸을 조절함을 알 수 있었다.

Bcl-2 family는 미토콘드리아의 안정성을 조절하는 단백질로 알려져 있으며, 이 중 Bax는 세포질에서 미토콘드리아로 이동하여, cytochrome C의 분비 활성을 높여, 세포사멸을 촉진하고, 반면, Bcl-2는 미토콘드리아로의 Bax 이동을 억제함으로써 세포사멸을 억제시키는 작용을 한다(Oltvai *et al* 1993). Bcl-2의 세포사멸을 억제하는 기능이 Bcl-2 family간 균형에 의존하며, 개별 유전자의 수준보다 Bax에 대한 Bcl-2의 비율이 세포의 생존과 사멸을 결정하는데 더 중요하다고 볼 수

있다(Reed JC 1994; Yang *et al* 1997; Zhap *et al* 2001).

## 요 약

본 연구는 인체유방암세포인 MDA-MB-231세포를 이용하여 IDE를 처리하였을 때 세포사멸에 미치는 영향을 세포화학적 방법으로 확인하였다. IDE를 각각 0, 20, 30 및 40  $\mu$ g/mL 첨가하여 24시간 배양한 후, 세포증식 억제, 막투과성, 세포내 ROS 분석 및 세포사멸 단계의 특성을 FACS 분석하고, RT-PCR에 의한 사멸관련 유전자 중 Bax/Bcl-2 ratio 분석을 통하여 IDE의 항암작용의 조절작용을 밝히고자 하였다. MTT의 세포 증식 억제는 첨가된 IDE의 농도에 따라 유의적으로 감소하였다( $p < 0.05$ ). 이와 동시에, trypan blue에 대한 염색성과 DCF-DA 형광 분석의 결과는 각각, 막투과성과 세포내 ROS 농도가 모두 농도 의존적으로 증가됨을 보였다( $p < 0.05$ ). 이와 같은 IDE 농도에 따른 세포화학적 변화 중에서 세포의 초기사멸에서 후기사멸 과정으로 급격한 사멸단계의 변화가 특히, IDE 농도 30과 40  $\mu$ g/mL에서 일어났다. RT-PCR 분석에 의한 Bax/Bcl-2 ratio도 IDE 농도 30과 40  $\mu$ g/mL에서 급격히 증가하였다( $p < 0.05$ ). 이와 같은 세포화학적 결과와 RT-PCR 결과를 종합해 볼 때, IDE의 유방암세포(MDA-MB-231)에 대한 세포사멸작용은 막 투과성의 증가와 ROS 증가를 통



**Fig. 5. Effects of *Ixeris dentata* extract (IDE) on Bax, Bcl-2, Bax/Bcl-2 ratio in MDA-MB-231 cells.**

Three replicate experiments were performed for PCR experiment from synthesized cDNA from each group. A representative image of RT-PCR product bands is shown (A). The semi-quantitative graphic data depict a gradual decrease of Bcl-2 over  $\beta$ -Actin gene expression. The Bax/Bcl-2 ratio (D) was calculated from the Bax (B) and Bcl-2 over  $\beta$ -Actin (C) ratios. The values (mean $\pm$ S.D.) with different alphabetical letters are significantly different at  $p < 0.05$  in different treatment groups, respectively.

하여 세포에 점진적인 손상을 일으키며, 이는 세포의 생화학적 변화도 초래하여 세포 증식 억제를 감소시켜, 결국 세포 내의 사멸관련 유전자 지표인 Bax/Bcl-2 ratio를 크게 변화시키는 일련의 세포사멸을 점진적으로 유도시켜 항유방암의 효과의 가능성을 제시하였다.

### 감사의 글

본 연구는 덕성여자대학교 2013년 교내 연구비 지원에 의해 수행되었기에 감사드립니다.

### REFERENCES

- Abhyankar G, Suprasanna P, Pandey BN, Mishra KP, Rao KV, Reddy VD (2010) Hairy root extract of *Phyllanthus amarus* induces apoptotic cell death in human breast cancer cells. *Innov Food Sci Emerging Technol* 11: 526-532.
- Ahn EM, Bang MH, Song MC, Park MH, Kim HY, Kwon BM, Baek NI (2006) Cytotoxic and ACAT-inhibitory sesquiterpene lactones from the root of *Ixeris dentata* forma *albiflora*. *Arch Pharm Res* 29: 937-941.
- Alnemri ES (1997) Mammalian cell death proteases: A family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem* 64: 32-42.
- American Institute of Cancer Research/World Cancer Research Fund (2007) Food, nutrition, physical activity, and prevention of cancer: A global perspective. American Institute of Cancer Research, Washington, DC, USA. pp 41-45.
- Cabiscol EI, Piulats E, Echave P, Herrero E, Ros J (2000) Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275: 27393-27398.
- Cha MR, Choi YH, Choi CW, Yoo DS, Kim YS, Choi SU, Kim YH, Ryu SY (2011) New guaiane sesquiterpene lactones from *Ixeris dentata*. *Planta Med* 77: 380-382.
- Chung HS, Jeong HJ, Han MJ, Park ST, Seong KK, Baek SH, Jeong DM, Kim MJ, Kim HM (2002) Nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production by *Ixeris dentata* in mouse peritoneal macrophages. *J Ethnopharmacol* 82: 217-222.
- Chung HS, Woo WS, Lim SJ (1994) Dentatins: Sesquiterpene glucosides from *Ixeris dentata*. *Arch Pharm Res* 17: 323-326.
- Heo BK, Chon SU, Park YJ, Bae JH, Park SM, Park YS, Jang HG, Gorinstein S (2009) Antiproliferative activity of Korean wild vegetables on different human tumor cell lines. *Plant Foods Hum Nutr* 64: 257-263.
- Hong S, Jeong D, Kim K, Hwang E (2011) The composition of the root of *Ixeris dentata* var. *albiflora* Nakai. and cell viability and DPPH radical scavenging activities of its extract. *Korean J Nutr* 43: 105-113.
- Kelsey JL (2005) Breast cancer epidemiology. *Cancer Res* 48: 5615-5623.
- Kim JK, Woo HJ, Kim JH, Yoon YD (2004) Effects of *Ixeris dentata* extracts on the genotoxicity induced by gamma irradiation in rats. *Korean J Environ Biol* 22: 543-549.
- Kim MJ, Kim JS, Jeong DM, Ham SS, Yu CY (2002a) Effect of antioxidant, antimutagenicity and anticancer of root extract from *Ixeris dentata* Nakai. *Korean J Medicinal Crop Sci* 10: 222-229.
- Kim MJ, Kim JS, Kang WH, Jeong DM (2002b) Effect on antimutagenic and cancer cell growth inhibition of *Ixeris dentata* Nakai. *Korean J Medicinal Crop Sci* 10: 139-143.
- Kim SH (1995) Inhibitory effects of *Ixeris dentata* on mutagenicity of aflatoxin B1, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and the growth of MG-63 human osteosarcoma cells. *J Korean Soc Food Nutr* 24: 305-312.
- Kma L (2013) Roles of plant extracts and constituents in cervical cancer therapy. *Asian Pacific J Cancer Prev* 14: 3429-3436.
- Lee E (2011) Effects of *Ixeris dentata* extract on the production of pro-inflammatory cytokines in the LPS stimulated rat and Raw 264.7 cells. *Korean J Plan Res* 24: 604-612.
- Lee KS, Kim GH, Kim HH, Kim ES, Park HM, Oh MJ (2009) Physiological functionalities of tea thermally processed from *Ixeris dentata* root. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 496-501.
- Lee SN, Kang KJ (2008) The effect of blueberry on ROS accumulation and cell death in human normal breast epithelial (MCF10A) and breast cancer (MCF7) cells. *Korean J Food Nutr* 21: 416-424.
- Lim SS, Lee JH (1997) Effects of *Aster scaber* and *Ixeris dentata* on contractility and vasodilation of cardiovascular and endothelial cell in hyperlipidemic rat. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 300-307.
- Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D (1997) Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem* 69: 581-593.



- Ministry of Health and Welfare (2012) National survey of cancer patients: Analysis of national cancer survey. Ministry of Health and Welfare, Seoul, Republic of Korea. pp 8-15.
- Nogueira V1, Hay N (2013) Molecular pathways: reactive oxygen species homeostasis in cancer cells and implications for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 19: 4309-4314.
- Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609-619.
- Reed JC (1994) Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 124: 1-6.
- Somasagara RR, Hegde M, Chiruvella KK, Musini A, Choudhary B, Raghavan SC (2012) Extracts of strawberry fruits induce intrinsic pathway of apoptosis in breast cancer cells and inhibits tumor progression in mice. *PLoS ONE* 7: e47021.
- Strober W (2001) Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol* A.3B.1-A.3B.2.
- Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Valle NRD, Huang P (2008) Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal* 10: 1343-1374.
- Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT (2006) Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol* 7: 65-74.
- Vaux DL (1993) Toward an understanding of the molecular mechanism of physiological cell death. *Proc Natl Acad Sci* 90: 786-789.
- Wang J, Yi J (2008) Cancer cell killing via ROS: To increase or decrease, that is the question. *Cancer Biol Thera* 7: 1875-1884.
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J (1997) Prevention of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275: 1129-1132.
- Zhang YC, He CN, Chew EH (2002) Studies on the chemical constituents and biological activities of *Ixeris*. *Chem Biodivers* 10: 1373-1391.
- Zhap ZQ, Budde JM, Morris C, Wang NP, Velez DA, Murak S, Guyton RA, Vinten JJ (2001) Adenosine attenuated reperfusion induced apoptotic cell death by modulation expression of Bcl-2 and Bax proteins. *J Mol Cell Cardiol* 33: 57-68.

---

Date Received	Sep. 11, 2014
Date Revised	Dec. 6, 2014
Date Accepted	Dec. 17, 2014