

# *Machaerium cuspidatum* 메탄올 추출물의 항산화 및 항암활성에 관한 연구

진수정<sup>1,2</sup>, 오유나<sup>1</sup>, 박현진<sup>1</sup>, 권현주<sup>1,2</sup>, 김병우<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>동의대학교 블루바이오 소재개발 센터

<sup>2</sup>동의대학교 자연생활과학대학 생명응용학과

Received: August 4, 2016 / Revised: August 25, 2016 / Accepted: August 29, 2016

## Anti-oxidative and Anti-cancer Activities of Methanol Extract of *Machaerium cuspidatum*

Soojung Jin<sup>1,2</sup>, You Na Oh<sup>1</sup>, Hyun-jin Park<sup>1</sup>, Hyun Ju Kwon<sup>1,2</sup>, and Byung Woo Kim<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Blue-Bio Industry Regional Innovation Center, <sup>2</sup>Department of Life Science and Biotechnology, College of Natural Sciences and Human Ecology, Dong-Eui University, Busan 47340, Republic of Korea

*Machaerium cuspidatum*, a canopy liana, is a species of genus legume in the Fabaceae family and contributes to the total species richness in the tropical rain forests. In the present study, we investigated the anti-oxidative and anti-cancer effects of *M. cuspidatum* and its mode of action. The methanol extract of *M. cuspidatum* (MEMC) exhibited anti-oxidative activity with an IC<sub>50</sub> value of 1.66 µg/ml, and this was attributable to its 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity. MEMC also exhibited a cytotoxic effect and induced morphological changes in a dose-dependent manner in several cancer cell lines including human lung adenocarcinoma A549 cells, human hepatocellular carcinoma HepG2 cells, and human colon carcinoma HT29 cells. Moreover, MEMC treatment induced the accumulation of subG1 population, which is indicative of apoptosis in A549 and HepG2 cells. MEMC-induced apoptosis was confirmed by the increase in Annexin V-positive apoptotic cells and apoptotic bodies using Annexin-V staining and DAPI staining, respectively. Further investigation showed that MEMC-induced apoptosis was associated with the increase in p53 and Bax expression, and the decrease in Bcl-2 expression. In addition, MEMC treatment led to proteolytic activation of caspase-3, 8, and 9 and degradation of poly-ADP ribose polymerase (PARP). Taken together, these results suggest that MEMC may exert a beneficial anti-cancer effect by inducing apoptosis via both the extrinsic and intrinsic pathways in A549 and HepG2 cells.

**Keywords:** Anti-cancer, anti-oxidative, apoptosis, A549, HepG2, *Machaerium cuspidatum*

## 서론

암은 전세계적으로 사망의 주요 원인 중 하나이며, 현대 의학의 발달에도 불구하고 암발생률은 점점 증가하여 2012년 한해 동안 전세계에서 천4백만명이 새롭게 암이 발병하였으며 8백만명이 암으로 사망하였다[41]. 국내의 경우, 통계청 자료에 따르면 2014년 국내 3대 사망원인은 암, 심장질환, 뇌혈관질환으로 전체 사망자의 47.7%를 차지하며 그 중 암

에 의한 사망률은 28.6%로 가장 높았다. 또한 국가암등록사업 연례보고서에 따르면, 2013년 새로 발생한 암환자 수는 약 23만명으로 암발생률은 10년전보다 약 79.3%가 증가하였다[35]. 반면 최근 암 질환에 관한 많은 연구와 치료성과가 나오면서 '09-'13년 암환자의 5년 상대생존율은 69.4%로 '01-'05년 생존율 53.8% 대비 15.6% 향상되었다[35]. 이러한 긍정적인 성과 속에서도 기존의 항암제의 정상세포에 대한 부작용과 내성에 관한 문제들이 지속적으로 대두되고 있어, 부작용이 적으며 뛰어난 항암활성을 보유하는 천연물 유래 소재의 중요성이 대두되고 있으며, 암세포의 증식억제, 자가사멸 유도 등의 분자적 기전을 밝히는 연구가 활발히 진행되고 있다[26, 33].

### \*Corresponding author

Tel: +82-51-890-2900, Fax: +82-505-182-6951

E-mail: bwkim@deu.ac.kr

© 2016, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

생체 대사 과정 중에서는 superoxide ( $^{\cdot}O_2^-$ ), hydroxy radical ( $\cdot OH$ ), 과산화수소수( $H_2O_2$ ) 등과 같은 활성산소종(Reactive oxygen species)이 끊임없이 발생하며, 이러한 활성산소는 화학적으로 높은 반응성을 지녀 강력한 산화적 스트레스를 유발한다[8]. 대부분의 활성산소는 생체 내 항산화 체계에 의해 제거되나, 방어체계의 균형이 깨어지는 경우 세포 구성 성분인 DNA, 단백질 등을 파괴하여 암, 노화, 심장 질환 등 다양한 질병을 일으킨다[10, 16]. 따라서 활성산소를 제거할 수 있는 항산화능을 보유하는 소재의 개발 및 후보 소재의 항산화능 보유 유무 확인은 다양한 생리활성 소재 개발에 매우 중요하다[7].

Apoptosis는 programmed cell death라고도 불리며, 살아 있는 세포의 survive/death balance를 조절하여 세포의 항상성을 유지할 수 있도록 한다[17, 21]. Apoptosis 과정에 이상이 생겨 제대로 작동하지 못하게 되면 암, 자가면역질환 등이 유발되고, apoptosis가 촉진될 경우 퇴행성질환을 야기한다[5]. 따라서 암세포에 apoptosis를 유도하여 암세포를 제거하는 방법이 암치료를 위한 중요한 전략 중 하나이며, apoptosis 유도에 의한 항암활성을 보유한 물질을 발굴하고 그 기전을 밝히는 연구가 활발히 진행되고 있다[13, 23, 28, 40]. Apoptosis는 세포의 수축, DNA의 분절 및 염색질 응축에 따른 apoptotic body를 형성하는 생화학적 특징을 보이며, 사멸수용체를 통한 외인성 경로(extrinsic pathway)와 미토콘드리아를 통한 내인성 경로(intrinsic pathway)의 두 가지 경로를 통하여 유도된다[14, 42]. 외인성 경로를 통한 apoptosis는 세포외부의 다양한 신호들이 Fas, 종양괴사인자 수용체 1 (TNF-R1) 등과 같은 세포 표면의 사멸수용체(death receptor)에 결합하여 death inducing signaling complex (DISC)를 형성하며 유발된다. 이 DISC가 다양한 신호전달 시스템을 통하여 caspase-8을 활성화시킴으로써 caspase cascade가 시작되고 이후 단계적으로 caspase-3, -6, -7이 활성화된다[3, 11]. 또한 내인성 경로를 통한 apoptosis의 경우, 세포의 생화학적 변화에 따른 미토콘드리아의 막전위 변화로 인해 cytochrome c가 세포질로 방출되고 caspase-9, apoptotic protease activating factor (Apaf-1)와 결합하여 apoptosome을 형성하게 된다. 이후 개시 caspase인 caspase-9가 활성화되고 실행 caspase인 caspase-3, -6, -7이 활성화되어 apoptosis가 일어난다[3]. 이 때 cytochrome c 방출에는 B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) family 단백질 중 pro-apoptotic 분자(Bax, Bak 등)와 anti-apoptotic 분자(Bcl-2, Bcl-xL 등)의 발현변화가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[1]. 이러한 외인성 경로 또는 내인성 경로를 통해 활성화된 실행 caspase는 poly ADP-ribose polymerase (PARP)와 같은 기질 단백질을 분해한다. PARP는 DNA 수

복에 관여하는 효소로 caspase에 의해 절단되면서 정상적인 기능을 하지 못하게 되고 apoptosis를 유도하게 된다[25].

*Machaerium cuspidatum*은 Fabaceae 과에 속하는 캐노피 덩굴식물(canopy liana)로, 열대 우림 지역에 분포하며 동물과 사람들에게 식량을 제공해주는 생태학적으로 매우 중요한 식물이다[4, 32]. *Machaerium* 속 식물들은 예로부터 설사, 감기, 아파타성 구내염 등의 치료에 사용되었으며, 다양한 *Machaerium* 속 식물들의 생리활성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다[20, 24]. 특히 최근까지 *M. villosum*과 *M. floribundum*의 에탄올 추출물의 항산화활성, *M. aristulatum*과 *M. multiflorum*의 에탄올 추출물의 항균활성 및 *M. aristulatum* 유래 화합물의 세포사멸효과 등에 관한 연구결과가 보고되었다[2, 9, 31, 38]. 그러나 *M. cuspidatum*의 생리활성에 대해서는 아직까지 밝혀진 바가 없으며, 따라서 본 연구에서는 *M. cuspidatum*의 메탄올 추출물(Methanol extract of *M. cuspidatum*; MEMC)을 사용하여 항산화능 및 항암활성에 관하여 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 시료준비

본 실험에 사용된 *M. cuspidatum* 메탄올 추출물(MEMC)은 해외생물소재허브센터(한국생명공학연구원)에서 구입(분양번호 FBM117-037) 하여 사용하였으며, 95.0% GR급 메탄올을 사용하여 15분간 sonication을 10회 반복하며 45°C에서 3일간 추출하고 여과 후 농축하여 동결 건조하였다. 추출한 시료는 100 mg/ml 농도로 dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma, USA)에 용해시켜 4°C에서 보관하고 세포에 처리하기 전에 배지에 희석하여 사용하였다.

### DPPH radical 소거 활성 측정

MEMC의 항산화능 보유 유무를 확인하기 위하여 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거법을 이용한 전자공여능을 측정하였다. MEMC를 농도별(0.51–12.8 µg/ml)로 메탄올에 녹여 96-well plate에 160 µl를 분주한 다음 메탄올에 용해된  $1.5 \times 10^{-4}$  M DPPH 40 µl를 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후, microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 음성 대조군과 비교하여 free radical 소거활성을 백분율로 나타내고, 50% 저해 농도(IC<sub>50</sub>)를 계산하였다. 양성 대조군으로는 대표적인 항산화제인 ascorbic acid를 사용하였으며, 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다. Free radical 소거능의 백분율 공식은 다음과 같다.

DPPH radical scavenging activity (%)  
 $= \{1 - (A - B)/C\} \times 100$

A: sample absorbance 520 nm  
 B: color control absorbance 520 nm  
 C: control absorbance 520 nm

### 세포배양

본 실험에 사용된 인체 폐암 세포 A549, 인체 간암 세포 HepG2 및 인체 대장암 세포 HT29는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)으로부터 구입하여 사용하였으며, 10% fetal bovine serum (FBS) 및 penicillin/streptomycin이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였다.

### WST assay에 의한 세포 성장억제 조사

MEMC가 암세포의 성장억제에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 WST (water soluble tetrazolium salt) assay를 수행하였다. 먼저 24-well plate에 1-2 × 10<sup>4</sup> cell의 암세포를 분주하여 MEMC를 농도별로 처리하고 48시간 동안 배양한 후 WST 시약(Daeillab, Korea)이 포함된 배지로 교체하였다. 30분간 반응시킨 후 microplate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정값은 3회 반복 실험을 하여 그에 대한 평균값으로 나타내었으며, 본 실험결과를 바탕으로 이후 적정 처리 농도를 결정하였다.

### 도립현미경을 이용한 세포의 형태 변화 관찰

MEMC 처리에 따른 암세포의 성장억제 및 형태 변화 관찰을 위하여 A549, HepG2 및 HT29를 6-well plate에 1-2 × 10<sup>5</sup> cells/well로 분주한 다음 적정 농도의 MEMC를 처리하였다. 48시간 배양 후 MEMC 처리에 따른 암세포의 성장 정도와 형태 변화를 도립현미경을 이용하여 관찰한 다음 Axio Vision program을 사용하여 사진 촬영을 하였다.

### 세포주기 분석

MEMC가 A549와 HepG2의 세포주기에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 암세포에 적정 농도의 MEMC를 처리한 다음, CycleTEST™ PLUS DNA Reagent Kit (Becton Dickinson, USA)를 사용하여 세포주기변화를 분석하였다. 각 세포는 6-well plate에 1-2 × 10<sup>5</sup> cells/well의 농도로 분주하여 부착시킨 다음, MEMC를 농도별로 48시간 처리 후 회수하였다. 회수한 세포는 PBS로 세척한 다음, ribonuclease A를 실온에서 10분간 처리하고 propidium iodide (PI) 용액을 첨가하여 4°C에서 10분간 염색하였다. 염색된 세포는 Flow cytometry (Cell Lab Quanta SC; Beckman Coulter, USA)를

이용하여 분석하였다.

### 세포의 apoptosis 분석

A549 및 HepG2 세포에서 MEMC에 의해 유도되는 apoptosis의 정량적 분석을 위하여 Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit (Merck Millipore, Germany)를 사용하여 염색하였다. 먼저, 암세포를 6-well plate에 1-2 × 10<sup>5</sup> cells/well의 농도로 분주하여 부착시킨 후, MEMC를 다양한 농도로 처리하였다. 48시간 배양 후 1% FBS가 첨가된 PBS로 세포를 회수하고 Muse™ Annexin V & Dead Cell Reagent를 1:1로 첨가하여 차광하여 실온에서 20분간 반응하였다. 이 후 Muse™ Cell Analyzer (Merck Millipore, Germany)를 사용하여 apoptosis가 유발된 세포의 비율을 분석하였다.

### DAPI 염색에 의한 세포핵의 형태 관찰

A549 및 HepG2 세포를 8-well cell culture chamber slide (SPL Life Sciences, Korea)에 2 × 10<sup>4</sup> cells/well의 농도로 분주하여 24시간 동안 부착시키고 적절한 농도의 MEMC를 처리 후 48시간 동안 배양하였다. MEMC를 처리한 세포는 4% formaldehyde 용액으로 상온에서 10분간 고정시킨 다음, PBS로 세척 후 0.5% Triton X-100으로 상온에서 10분간 permeabilization 시켰다. PBS로 세척한 다음 1 µg/ml의 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma, USA) 용액을 가하여 차광한 상태로 상온에서 10분간 염색한 다음, slide holder를 제거하고 Fluoro-Gel with Anti-Fading Agent (Electron Microscopy Sciences, USA)를 사용하여 mounting 하였다. 염색된 세포핵의 형태는 형광현미경(Axio Scope. A1; Carl Zeiss, Germany)으로 관찰하였으며, Axio Vision Program을 이용하여 촬영하였다.

### Western blot analysis에 의한 단백질 발현 분석

MEMC를 처리한 A549 및 HepG2를 모아 PBS로 세척한 후 lysis buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100, 1 µg/ml leupeptin, 1 mM PMSF]를 첨가하여 4°C에서 30분간 반응시킨 후, 16,000 × g으로 30분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 추출한 단백질의 농도는 Bradford 법을 이용하여 정량한 다음 30 µg의 단백질을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하고 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. 5% skim milk가 함유된 PBS-T를 사용하여 상온에서 1시간 동안 blocking을 하고, 각각의 일차항체를 4°C에서 overnight 처리한 다음, horse radish peroxidase (HRP)가 부착된 이차항체를 상온에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 Western

blotting luminol reagent (Santa Cruz Biotechnology, USA)를 적용시킨 다음 chemiluminescence detection system (FluoChem® FC2; AlphaInnotech, USA)을 사용하여 분석하였다. 일차항체인 p53, Bax, caspase 9, PARP, actin과 이차항체 HRP-conjugated anti-rabbit, anti-goat, anti-mouse는 Santa Cruz Biotechnology (Dalla, USA)에서 구입하였으며, 일차항체 p21, Bcl-2, caspase 3, 8은 Cell Signaling Technology (Danvers, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 통계분석

모든 결과는 mean  $\pm$  SD (Standard deviation)로 나타내었으며, 분석된 실험 데이터의 통계적 유의성은 대조군과 각 시료 처리군의 실험데이터로부터 SPSS 20.0 program을 이용한 Student's *t* test를 통하여 검증하였으며 *p* 값이 0.05 미만( $p < 0.05$ )인 경우 유의성이 있는 것으로 평가하였다.

## 결과 및 고찰

### MEMC의 항산화능 분석

항암활성을 가지는 후보소재의 항산화능 보유 유무의 확인은 매우 중요하므로 먼저 MEMC의 항산화능을 확인하였다. 체내에 존재하는 활성 라디칼에 전자나 수소원자를 공여하여 안정한 형태로 전환시켜 산화를 막는 것을 항산화 작용이라고 하며, 항산화 활성을 측정하기 위하여 라디칼 소거능 분석이 널리 사용된다. 특히 DPPH는 비교적 안정한 free radical로써 ascorbic acid, tocopherol, polyhydroxy 방향족 화합물, 방향족 아민류 등에 의해 환원되어 짙은 자색이 탈색되며, 이러한 원리를 이용하여 식물이나 식품 추출물 또는 단일 화합물의 항산화능 측정법으로 이용된다[37]. 이에 MEMC의 항산화능을 DPPH radical scavenging activity 측정을 통해 확인한 결과, Table 1에 제시한 바와 같이 MEMC를 농도별로 DPPH와 반응시켰을 때, 농도의존적으로 DPPH radical 소거능이 증가하였다. 즉, MEMC 농도 0.51, 2.56, 12.8  $\mu\text{g/ml}$ 에서 DPPH 소거능이 각각 26.01, 68.59, 97.17%였으며, 소거능 50%일 때의 MEMC 농도

**Table 1. DPPH radical scavenging activity by methanol extract of *Machaerium cuspidatum*.**

	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Inhibition rate (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )
MEMC	0.51	26.01 $\pm$ 1.45	1.66
	2.56	68.59 $\pm$ 0.58	
	12.8	97.17 $\pm$ 0.07	
Ascorbic acid	0.51	24.60 $\pm$ 0.24	1.23
	2.56	97.31 $\pm$ 0.08	
	12.8	97.77 $\pm$ 0.06	

(IC<sub>50</sub>)는 1.66  $\mu\text{g/ml}$ 로 추출물인 것을 감안하면 양성 대조군인 ascorbic acid의 IC<sub>50</sub>인 1.23  $\mu\text{g/ml}$ 과 거의 유사한 효과적인 항산화 활성을 보유하고 있음을 확인하였다.

### MEMC에 의한 암세포 사멸효과

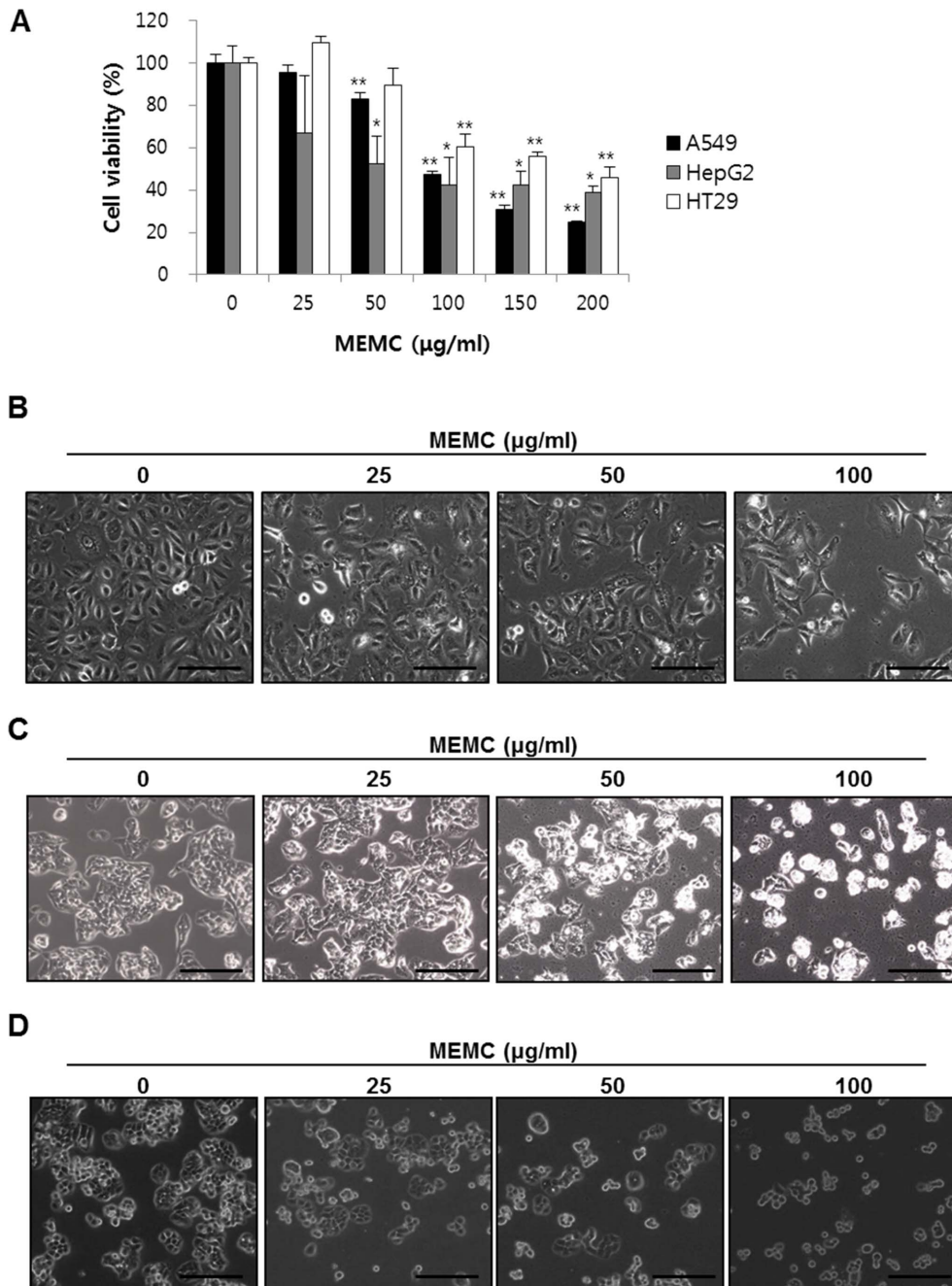
MEMC가 다양한 암세포의 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위하여 A549, HepG2, HT29를 이용하여 적정농도의 MEMC를 48시간 동안 처리한 다음 WST assay를 수행하였다. 그 결과, Fig. 1A에 제시한 바와 같이 모든 암세포에서 MEMC 농도의존적으로 생존율이 감소하였다. 특히 인체 폐암세포인 A549와 간암세포인 HepG2에서 높은 암세포 사멸효과를 나타내었다. 또한 MEMC 처리에 따른 암세포의 형태변화를 관찰한 결과, 모든 종류의 암세포에서 MEMC의 농도가 높아질수록 세포의 형태가 불규칙하게 변화하고 세포 밀도가 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 1B-D). 이상의 결과를 바탕으로 이후 실험은 A549와 HepG2를 사용하여 진행하였다.

### MEMC에 의한 세포주기 변화 분석

현재까지 다양한 암세포에서 정상세포와는 다르게 세포주기 중 G1기 및 G2기의 checkpoint 자체의 변이 또는 이를 조절하는 상류 시그널의 조절 등에 의하여 비정상적인 무한 세포 증식이 일어난다는 것이 보고되어 있다[18, 29]. 또한 이러한 암세포의 특징을 이용하여 암세포의 비정상적인 세포주기 진행을 저해하는 항암 소재의 개발이 활발하게 진행되고 있다[34, 44]. 따라서 본 연구에서는 MEMC의 암세포 사멸효과가 세포주기에 영향을 주는지 확인하기 위하여 A549와 HepG2를 이용하여 적정농도의 MEMC를 48시간 처리한 다음 세포주기변화를 관찰하였다. 그 결과, A549와 HepG2 공히 세포주기 조절에 의한 항암활성에서 주로 보이는 G1기 또는 G2/M기 세포의 증가는 관찰되지 않았으며, MEMC 처리농도 증가에 따라 G1기, S기, G2/M기의 세포비율이 감소하였다. 반면 MEMC 처리 농도가 증가할수록 apoptosis가 유발되었을 것이라 예상되는 subG1기의 세포분포는 증가하였다(Fig. 2). Table 2에 나타난 바와 같이, A549의 경우 대조군에서 9.92%였던 subG1기 세포가 최고농도인 100  $\mu\text{g/ml}$  처리군에서 44.07%로 증가하였으며, HepG2의 경우 대조군에서 4.33% subG1 세포가 100  $\mu\text{g/ml}$  처리군에서는 59.35%로 증가하였다. 이와 같은 결과들은 MEMC가 A549와 HepG2의 apoptosis를 유도하여 세포증식을 억제시키는 가능성을 제시한다.

### MEMC에 의한 Apoptosis 유도

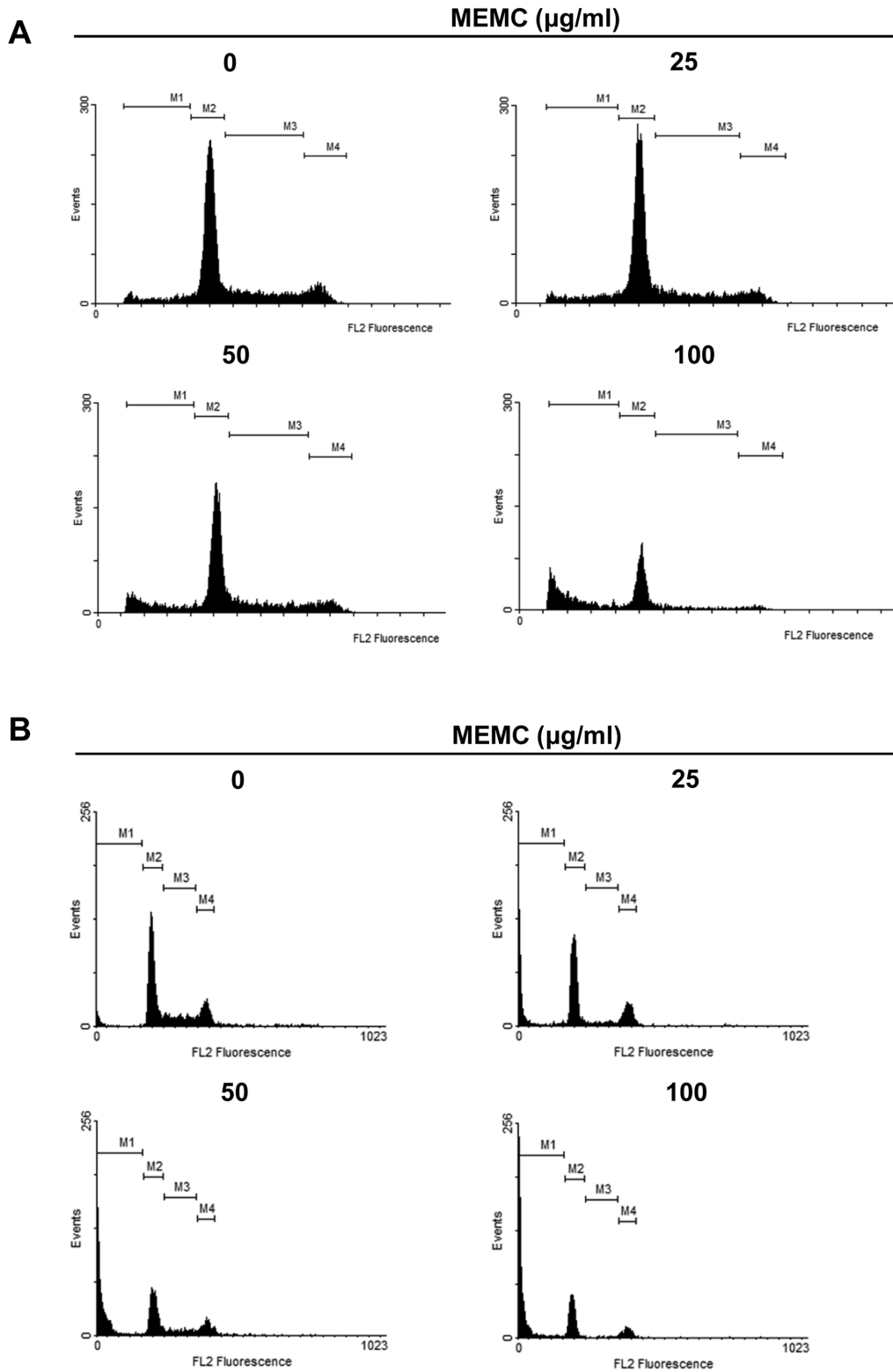
세포에 apoptosis가 유발되면 세포막의 유동성이 증가되며, 막 인지질의 비대칭성이 소실되어 지질이중막의 내부에



**Fig. 1. Effect of MEMC on cell growth and morphological changes in various cancer cell lines.** (A) Human lung carcinoma A549 cells, human hepatocellular carcinoma HepG2 cells and human colon carcinoma HT29 cells were treated with indicated concentration of MEMC for 48 h. Cytotoxic effect of MEMC was determined by WST assay. Results are expressed as percentage of the control  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.005$  compared with the control. (B-D) Morphological changes by MEMC in A549 (B), HepG2 (C) and HT29 (D) cells. Cell morphology was visualized by light microscopy. Scale bars, 200  $\mu$ m.

존재하는 포스파티딜세린(phosphatidyl serine)이 세포표면으로 노출된다[12, 30]. 따라서 apoptosis가 일어난 세포의 분석을 위해서 포스파티딜세린과 특이적으로 결합하는 Annexin

V를 표식자로 널리 사용하고 있다. 세포주기분석 결과로부터 MEMC 처리에 의해 subG1기 세포가 증가하였으므로, Annexin V/7-Aminoactinoycin D (7-AAD) 염색방법을 사용



**Fig. 2. Accumulation of subG1-phase cells by MEMC treatment.** A549 and HepG2 cells were treated with indicated concentrations of MEMC for 48 h, stained with propidium iodide for 10 min and analyzed by flow cytometry. DNA-fluorescence histograms of A549 (A) and HepG2 (B) are shown. M1, subG1 phase; M2, G1 phase; M3, S phase; M4, G2/M phase.

**Table 2. Cell cycle distribution of methanol extract of *Mach-  
aerium cuspidatum*.**

Cell line	MEMC (μg/ml)	% of cells			
		SubG1 (M1)	G1 (M2)	S (M3)	G2/M (M4)
A549	0	9.92	57.79	21.97	10.31
	25	12.15	59.46	20.28	7.94
	50	17.65	50.42	21.70	9.80
	100	44.07	40.18	10.44	3.94
HepG2	0	4.33	52.04	18.76	17.80
	25	24.12	46.45	7.16	18.82
	50	42.78	30.49	10.32	11.64
	100	59.35	27.08	2.04	8.99

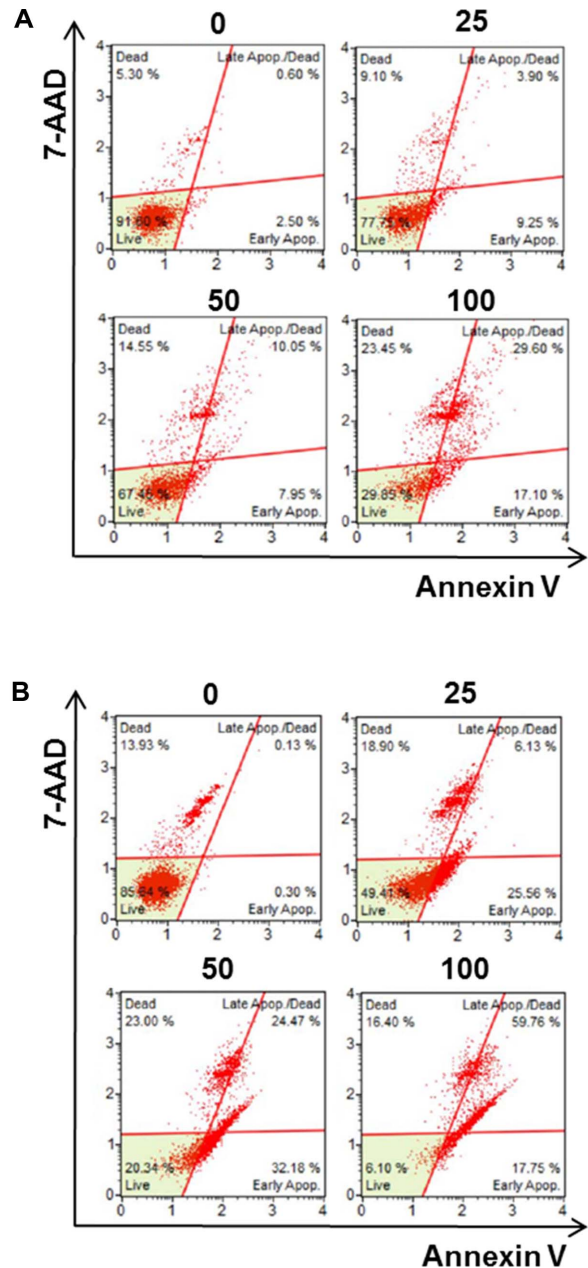
하여 MEMC에 의한 A549와 HepG2의 apoptosis 유도를 정량적으로 분석하였다. 그 결과, Fig. 3에서 보여지듯이 A549와 HepG2 모두 MEMC 농도가 증가할수록 살아있는 세포 비율은 감소하는 반면, Annexin V 양성 세포비율이 증가하였다. 또한 저농도의 MEMC 처리시 early apoptotic 세포 (Annexin V<sup>+</sup>/7-AAD<sup>-</sup>)가 증가되었으며, 농도가 증가할수록 점차 late apoptotic 세포(Annexin V<sup>+</sup>/7-AAD<sup>+</sup>)가 증가되어, 최고 농도 100 μg/ml에서 Annexin V 양성 세포는 A549의 경우 46.7%, HepG2의 경우는 77.5%까지 증가하였다. 이러한 결과로부터 MEMC에 의해 A549와 HepG2의 apoptosis 유도되며 이들 세포의 증식이 억제되는 것을 알 수 있었다.

**MEMC에 의한 세포핵의 형태변화 분석**

세포에 apoptosis가 유도되면 세포의 수축, linker DNA 절단에 의한 chromosome의 단편화, 염색질의 응축 등에 의한 apoptotic body와 같은 전형적인 형태변화가 나타나며, apoptosis 유도를 확인하기 위하여 이러한 특징을 관찰하는 것은 매우 중요하다[11, 45]. 특히 apoptosis 유도에 의해 형성되는 apoptotic body는 염색시약에 의해 관찰이 가능하므로, A549와 HepG2 세포에 MEMC를 처리한 다음, DAPI 염색을 통하여 MEMC에 의한 apoptosis 유도를 확인하였다. 그 결과, Fig. 4에서 보여지듯이 0.1% DMSO를 처리한 대조군의 경우, 완전한 핵의 형태가 관찰되는 반면, A549와 HepG2에서 공히 MEMC를 처리한 경우 핵이 응축된 apoptotic body가 관찰되었다. 또한 MEMC 처리 농도가 증가할수록 apoptotic body의 형성도 증가하여 apoptosis가 일어난 세포의 전형적인 특징을 관찰할 수 있었다.

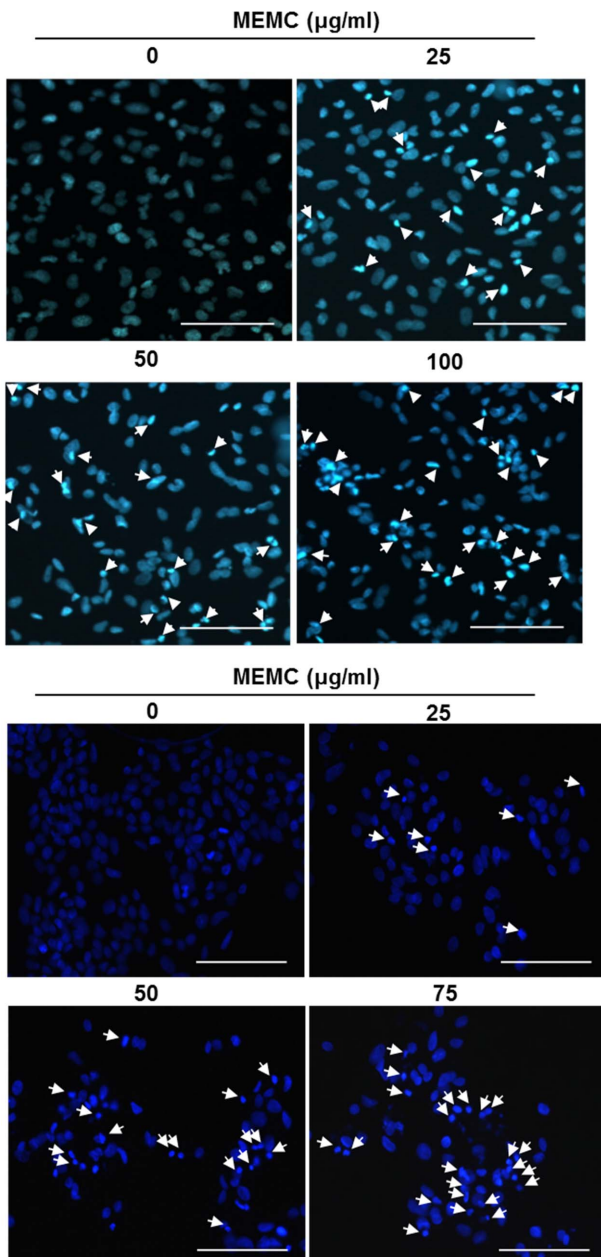
**MEMC에 의한 apoptosis 유도의 분자 메커니즘**

다음으로 MEMC에 의한 A549 및 HepG2의 apoptosis 유도 기전 분석을 위하여 apoptosis 관련 단백질의 발현변화를 Western blot analysis로 확인하였다. p53은 death receptor



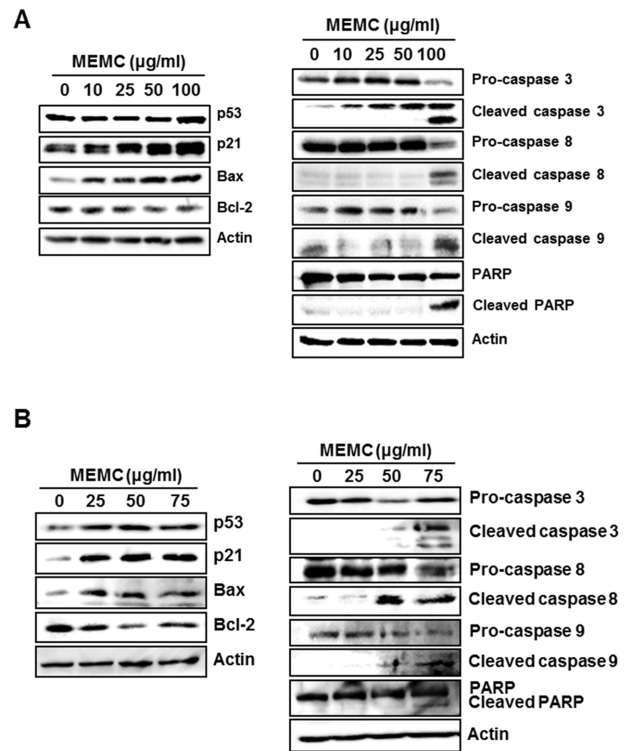
**Fig. 3. Apoptosis induction by MEMC in A549 and HepG2 cells.** A549 (A) and HepG2 (B) cells were treated with indicated concentrations of MEMC for 48 h, stained with Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit for 20 min and analyzed by Muse™ Cell Analyzer. Dot plots represented four independent sections. Live cells (lower left): Annexin V<sup>-</sup>/7-AAD<sup>-</sup>, dead cells (upper left): Annexin V<sup>-</sup>/7-AAD<sup>+</sup>, early apoptotic cells (lower right): Annexin V<sup>+</sup>/7-AAD<sup>-</sup>, late apoptotic cells (upper right): Annexin V<sup>+</sup>/7-AAD<sup>+</sup>.

(Fas, DR5)의 발현을 유도하여 개시 caspase인 caspase-8과 실행 caspase인 caspase-3의 활성화화를 통한 apoptosis의 외인성 경로에 관여할 뿐 아니라, Bcl-2 family 단백질의 발현



**Fig. 4. Apoptotic morphological changes of A549 and HepG2 cells by MEMC.** A549 (A) and HepG2 (B) cells were exposed to various concentrations of MEMC for 48 h. The cells were fixed and stained with DAPI for 20 min. Stained cells were observed by fluorescence microscopic analysis and imaged using Axio Vision Program. Arrows indicate the apoptotic bodies. Scale bars, 100  $\mu$ m.

을 조절하여 내인성 경로에 의한 apoptosis에도 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다[15, 19]. 특히 Bcl-2 family 단백질의 경우, 정상세포에서는 pro-apoptotic 단백질(Bax, Bak, Bid 등)과 anti-apoptotic 단백질(Bcl-2, Bcl-xL 등)이



**Fig. 5. Effect of MEMC on the expression of apoptotic proteins in A549 and HepG2 cells.** MEMC-treated A549 (A) and HepG2 (B) cells were harvested and then proteins were isolated. The expression of apoptotic proteins was estimated by Western blot analysis. Actin was used as an internal control.

균형을 이루고 있으나, 외부 자극으로 증가된 p53에 의해 pro-apoptotic 분자의 발현이 증가되고 반면 anti-apoptotic 분자의 발현이 저해되어 이러한 세포 내 균형이 깨어지게 된다. 증가된 pro-apoptotic 분자는 homodimer를 형성하여 cytochrome c를 방출시키고, cytochrome c/Apaf-1/caspase-9를 포함하는 apoptosome 복합체를 형성하여 caspase-3 활성화에 따른 apoptosis가 유도된다[3, 14]. 또한 최근에는 p21의 upregulation이 apoptosis의 내인성 경로를 촉진시킨다는 연구 결과가 보고되어 있다[22, 36]. 이러한 외인성 및 내인성 경로를 통하여 활성화된 caspase는 PARP와 같은 여러 가지 기질을 분해하여 apoptosis를 유도한다[27, 43].

A549와 HepG2에 MEMC를 농도별로 처리한 다음 Western blot analysis를 수행한 결과, Fig. 5에서 나타난 바와 같이 MEMC의 농도가 증가할수록 A549와 HepG2에서 종양억제유전자 p53, p21 및 pro-apoptotic 분자인 Bax의 발현이 증가하였으며, anti-apoptotic 분자인 Bcl-2의 발현이 감소하였다. 또한 MEMC 처리에 의해 pro-caspase들이 활성화되어 cleaved caspase-3, -8, -9가 증가하였으며, PARP의 분해가 관찰되었다. 이러한 결과로부터 MEMC 처리에 의해



p53의 발현이 증가되고, 외인성 경로를 자극하여 caspase-8을 활성화시킬 뿐 아니라, 내인성 경로를 자극하여 Bcl-2 family 단백질의 발현변화 및 caspase-9 활성화에 의한 실행 caspase인 caspase-3을 활성화시키는 것으로 판단된다. 아울러 최근 보고된 연구결과로 미루어 볼 때 MEMC에 의한 p21의 upregulation은 내인성 경로에 따른 apoptosis 유도에 관여할 것이라 사료된다.

우리나라를 포함하여 전세계적으로 암 발병률 및 사망률은 해마다 증가하고 있으며, 기존의 수술 및 화학요법에 따른 부작용 때문에 대체의학 및 천연물의약에 관한 관심이 높아지고 있다. 또한 암 치료제 뿐 아니라 암 치료 보조제, 암 예방 등에도 관심이 많아지며 합성물질이 아니라 항암 활성을 보유하는 천연물 소재의 개발이 꾸준히 연구되고 있다 [6, 39]. 이러한 천연물 의약 소재는 대부분이 식물 유래이며, 식물에는 알칼로이드, 플라보노이드류 및 테펜류의 다양한 성분들이 존재하며 이들의 높은 암세포독성과 낮은 부작용을 이용하여 다양한 항암제 개발이 이루어지고 있다. 본 연구의 결과에서, MEMC는 높은 항산화능을 보유하고 있고 A549와 HepG2의 증식을 강력하게 억제하며, 이러한 증식 억제 기전은 p53의 발현증가와 Bcl-2 family의 발현변화에 따른 외인성과 내인성 경로를 통한 apoptosis 유도에 의한 것으로 사료된다. 따라서 본 연구는 *Machaerium cuspidatum* 메탄올 추출물의 항산화 및 항암 활성을 확인하였으며 그 기전을 해석하였을 뿐 아니라, 본 연구자료는 항암 활성 보유 소재 개발을 위한 중요한 기초 자료가 될 것이라 사료된다. 또한 실질적인 항암 치료제로서의 개발을 위하여서는 추후 활성성분 분석 및 in vivo에서의 추가 실험 등이 다양하게 수행되어야 할 것이다.

## 요 약

*Machaerium cuspidatum*은 Fabaceae과 legume속에 속하는 캐노피 덩굴식물(canopy liana)로, 열대 우림 지역에 분포하는 식물이다. 본 연구에서는 *Machaerium cuspidatum* 메탄올 추출물(MEMC)의 항산화능을 확인하고, 항암 활성 및 그 기전을 인체 폐암세포 A549, 인체간암세포 HepG2를 사용하여 분석하였다. 먼저 DPPH를 이용하여 MEMC의 radical 소거능을 분석한 결과, 소거능 50%의 MEMC 농도(IC<sub>50</sub>)는 1.66 µg/ml이었으며, MEMC가 추출물인 것을 감안할 때 효과적인 항산화능을 보유하고 있음을 알 수 있었다. 또한 MEMC는 A549, HepG2 및 HT29에 대해 농도의존적으로 세포 사멸 효과를 보였으며, 세포 형태 변화를 유도하였다. A549와 HepG2를 사용하여 세포주기를 분석한 결과, MEMC 처리 농도가 증가할수록 apoptotic 세포를 의미하는 subG1기의 세포가 증가하였다. 따라서 MEMC에 의한 A549

및 HepG2의 apoptosis 유도를 Annexin V/7AAD 염색으로 확인한 결과, A549 및 HepG2에서 MEMC 농도의존적으로 Annexin V 양성 세포의 비율이 증가하였으며, DAPI 염색 결과 MEMC 농도의존적으로 A549와 HepG2의 apoptotic body가 증가하였다. 특히 MEMC에 의한 apoptosis는 p53과 Bax의 발현증가 및 Bcl-2의 발현감소와 연관되어 있으며, caspase-3, -8, -9의 활성화와 poly ADP ribose polymerase (PARP)의 단편화를 일으키는 것을 확인하였다. 이러한 결과들로부터 MEMC는 외인성 및 내인성 경로를 통한 apoptosis 유도에 의해 A549와 HepG2의 증식을 억제시키는 것으로 사료된다.

## Acknowledgments

This work was supported by Blue-Bio Industry Regional Innovation Center (RIC08-06-07) at Dong-Eui University as a RIC program under Ministry of Trade, Industry & Energy (MOTIE) and Busan city.

## References

1. Adam JM, Cory S. 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **26**: 1324-1337.
2. Amen YM, Marzouk AM, Zaghloul MG, Afifi MS. 2015. The genus *Machaerium* (Fabaceae): taxonomy, phytochemistry, traditional uses and biological activities. *Nat. Prod. Res.* **29**: 1388-1405.
3. Andreas G. 2003. Introduction to apoptosis. *ApoReview*. 2-26.
4. Appanah S, Gentry AH, Lafrankie JV. 1993. Liana diversity and species richness of Malaysian rain forests. *J. Trop. For. Sci.* **6**: 116-123.
5. Carson DA, Ribeiro JM. 1993. Apoptosis and disease. *Lancet* **341**: 1251-1254.
6. Choi HJ, Yee ST, Kwon GS, Joo WH. 2015. Anti-inflammatory and anti-tumor effects of *Tetragonia tetragonoides* extracts. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **43**: 391-395.
7. Choi IP. 2013. Reactive oxygen species and cancer. *Hanyang Med. Rev.* **33**: 118-122.
8. Devasagayam TP, Tilak JC, Bloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. 2004. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J. Assoc. Physicians India* **52**: 794-804.
9. Diaz L, Montijo S, Medina AL, Melendez P, Laurence V, Marti-Mestres G. 2011. Activity of ethanolic extracts leaves of *Machaerium floribundum* against acne-inducing bacteria, and their cytoprotective and antioxidant effects on fibroblast. *Rev. Peru. Biol.* **18**: 153-158.
10. Dickinson BC, Chang CJ. 2011. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat. Chem. Biol.* **7**: 504-511.
11. Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death.

- Toxicol. Pathol.* **35**: 495-516.
12. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Hensen PM. 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* **148**: 2207-2216.
  13. Fluda S. 2015. Targeting apoptosis for anticancer therapy. *Semin. Cancer Biol.* **31**: 84-88.
  14. Fluda S, Debatin KM. 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **25**: 4798-4811.
  15. Green DR, Reed JC. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**: 1308-1312.
  16. Halliwell BH, Gutteridge JMC. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* **186**: 1-85.
  17. Han SI, Kim YS, Kim TH. 2008. Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions. *BMB Rep.* **41**: 1-10.
  18. Hartwell LH, Kastan MB. 1994. Cell cycle control and cancer. *Science* **266**: 1821-1828.
  19. Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. 2003. Apoptosis – the p53 network. *J. Cell Sci.* **116**: 4077-4085.
  20. Heinrich M, Rimpler H, Barrera NA. 1992. Indigenous phytotherapy of gastrointestinal disorders in a lowland Mixe community (Oaxaca, Mexico): ethnopharmacologic evaluation. *J. Ethnopharmacol.* **36**: 63-80.
  21. Hengartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**: 770-776.
  22. Hernandez AM, Colvin ES, Chen YC, Geiss SL, Eller LE, Fueger PT. 2013. Upregulation of p21 activates the intrinsic apoptotic pathway in beta-cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **304**: 1281-1290.
  23. Jin S, Park HJ, Oh YN, Kwon HJ, Kim JH, Choi YH, et al. 2015. Anti-cancer activity of *Osmanthus matsumuranus* extract by inducing G2/M arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *J. Cancer Prev.* **20**: 241-249.
  24. Joly LG, Guerra S, Septimo R, Solis PN, Correa M, Gupta M, et al. 1987. Ethnobotanical inventory of medicinal plants used by the Guaymi Indians in western Panama: part I. *J. Ethnopharmacol.* **20**: 145-171.
  25. Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. 1993. Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* **53**: 3976-3985.
  26. Landis-Piwowar KR, Iyer NR. 2014. Cancer chemoprevention: current state of the art. *Cancer Growth Metastasis* **7**: 19-25.
  27. Lawen A. 2003. Apoptosis – an introduction. *BioEssays* **25**: 888-896.
  28. Lowe SW, Lin AW. 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* **21**: 485-495.
  29. Malumbres M, Barbacid M. 2001. To cycle or not to cycle: A critical decision in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **1**: 222-231.
  30. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, et al. 1995. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of bcl-2 and abl. *J. Exp. Med.* **182**: 1545-1556.
  31. Muhammad I, Li XC, Jacob MR, Tekwani BL, Dunbar DC, Ferreira D. 2003. Antimicrobial and antiparasitic (+)-trans-hexahydrodibenzopyrans and analogues from *Machaerium multiflorum*. *J. Nat. Prod.* **66**: 804-809.
  32. Nabe-Nielsen J. 2002. Growth and mortality rates of the Liana *Machaerium cuspidatum* in relation to light and topographic position. *Biotropica* **34**: 319-322.
  33. Neergheen VS, Bahorun T, Taylor EW, Jen LS, Aruoma OI. 2010. Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention. *Toxicology* **278**: 229-241.
  34. Newman DJ, Cragg GM. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* **70**: 461-477.
  35. Oh CM, Won YJ, Jung KW, Kong HJ, Cho H, Lee JK, et al. 2016. Cancer statistics in Korea: Incidence, mortality, survival, and prevalence in 2013. *Cancer Res. Treat.* **48**: 436-450.
  36. Park HJ, Jin S, Oh YN, Kim BW, Kwon HJ. 2015. Induction of apoptosis by methanol extract of *Endlicheria anomala* in human lung and liver cancer cells. *Korean J. Life Sci.* **25**: 441-449.
  37. Sak K. 2014. Dependence of DPPH radical scavenging activity of dietary flavonoid quercetin on reaction environment. *Mini Rev. Med. Chem.* **14**: 494-504.
  38. Seo EK, Kim NC, Mi Q, Chai H, Wall ME, Wani MC, et al. 2001. Macharistol, a new cytotoxic cinnamylphenol from the stems of *Machaerium aristulatum*. *J. Nat. Prod.* **64**: 1483-1485.
  39. Shim JH, Gim H, Lee S, Kim BJ. 2016. Inductions of caspase-, MAPK-, and ROS-dependent apoptosis and chemotherapeutic effects caused by an ethanol extract of *Scutellaria barbata* D. Don in human gastric adenocarcinoma cells. *J. Pharmacopuncture* **19**: 129-136.
  40. Singh S, Singh PP, Roberts LR, Sanchez W. 2014. Chemopreventive strategies in hepatocellular carcinoma. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **11**: 45-54.
  41. Stewart BW, Wild CP. 2014. World cancer report 2014. International Agency for Research on Cancer (IARC), Geneva, World Health Organization.
  42. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 231-241.
  43. Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, et al. 1995. Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly (ADP-ribose) polymerase. *Cell* **81**: 801-809.
  44. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. 2003. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* **36**: 131-149.
  45. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. 1980. Cell death: the significance of cell death. *Int. Rev. Cytol.* **68**: 251-306.