

시금치, 양배추, 양파 추출물의 암세포 증식 억제 효과

이해님 · 신성아 · 추강식 · 김형진 · 박영석 · 김상기 · 정지윤

공주대학교 특수동물학과

Inhibitory Effects of Spinach, Cabbage, and Onion Extracts on Growth of Cancer Cells

Hae-Nim Lee, Seong-Ah Shin, Gang-Sik Choo, Hyeong-Jin Kim,
Young-Seok Park, Sang-Ki Kim, and Ji-Youn Jung

Department of Companion and Laboratory Animal Science, Kongju National University

ABSTRACT Extracts from spinach, cabbage, and onion are known to possess various instructive characteristics, including antioxidant and anti-inflammation activities. Spinach, cabbage, and onion are consumed worldwide and represent important sources of dietary phytochemicals with proven antioxidant properties, such as flavonoids and phenolic acids. Food-derived flavonoids and phenolic compounds are expected to be promising drugs for cancer. In the present study, we investigated the effects of methanol extracts of spinach, cabbage, and onion on cell proliferation and apoptosis in human gastric and breast cancer cells. Proliferation rates of AGS, MDA-MB-231, and SK-BR-3 cells were determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The methanol extracts of spinach, cabbage, and onion inhibited proliferation of cancer cells in a dose-dependent manner. 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining revealed that chromatin condensation significantly increased compared with the control. In the results of MTT assay and DAPI staining, onion extract was the most effective in inhibiting cancer cell proliferation and apoptosis. To assess changes in protein expression level by onion extract, we identified Bax (pro-apoptotic), Bcl-2 (anti-apoptotic), and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) protein by western blot analysis. The expression of Bax and cleaved-PARP increased, whereas expression of Bcl-2 was decreased compared with the control. These results suggest that spinach, cabbage, and onion extracts suppressed growth of human gastric cancer AGS, human breast cancer MDA-MB-231, and SK-BR-3 cells through induction of apoptosis. Among the extracts, onion extract had stronger anti-cancer and apoptosis induction effects than spinach and cabbage extracts. Further, onion extract more effectively induced apoptosis of human gastric cancer cells than human breast cancer cells. Therefore, further studies are needed to determine the anti-cancer effects of onion extracts *in vivo*. Onion extract can be developed as a chemopreventive or therapeutic agent for gastric cancer.

Key words: spinach, cabbage, onion, anticancer, apoptosis

서 론

암은 전 세계적으로 인간의 생명을 위협하는 질병 중 하나로, 국내에서도 서구화된 식생활 및 환경 등 후천적 요인으로 인하여 암의 발생빈도 및 사망률은 꾸준히 증가하고 있다(1). 위암은 동아시아 국가에서 모든 종류의 암 중 사망률이 가장 높게 평가되며, 점점 더 빠르게 증가하고 있다. 현재 위암 치료법으로는 수술, 방사선, 화학요법 등이 있지만 치료 후에도 재발 가능성이 매우 크고 생존율이 낮아 좋은 예후를 기대하기는 어렵다(2-4). 유방암은 여성에서 가장 흔

하게 발생하는 암으로 한국 중앙 암 등록 보고서에 의하면 2012년에 여성 암 중 16,521건이 발생하여 14.8% 비율로 2위를 차지하였다(5). 유방암의 치료제로 Tamoxifen 같은 비스테로이드성 항에스트로겐제가 사용되지만 암세포뿐만 아니라 정상세포에도 영향을 미치고 내성이 생기는 등 예후가 좋지 않은 경향이 있다(6,7).

암 발생 원인 중 35% 정도가 잘못된 식습관에 의한 발병으로(8), 특히 고지방, 고열량 음식과 같은 서구화된 식습관이나 채소, 과일의 불충분한 섭취가 문제가 되고 있다(9). 충분한 채소 섭취는 대장암, 직장암 등 각종 암의 위험률을 감소시키는 것으로 보고되어 있다(10). 이러한 이유로 암을 치료하는 데 있어 안전성이 입증된 천연물을 이용하여 독성과 부작용이 없으면서 암세포에 특이적으로 작용하는 천연물 유래 항암제 개발에 대한 연구가 필요한 실정이다.

과일과 채소 등에 풍부하게 포함된 비타민 C, β-카로틴

및 폴리페놀 등과 같은 항산화 물질들은 순환계 질병과 암 발생률을 감소시킨다고 보고되어 있다(11). 이 중 플라보노이드는 diphenylpropane의 골격을 가진 페놀계 화합물의 총칭으로 과일, 채소, 견과류를 비롯한 식물의 줄기, 뿌리, 껍질에 널리 분포되어 있으며 지금까지 알려진 플라보노이드는 약 4,000여 종류가 있다(12). 플라보노이드는 식물화학물질 중에서 가장 주목받고 있는 생리활성물질의 하나로 항산화(13), 항암(14), 항바이러스(15), 항염증(16)과 같은 다양한 약리학적 활성을 갖는 것으로 보고되어 있다. 우리나라에서 식재료로 많이 이용되고 있는 채소 중 시금치, 양배추, 양파 등은 quercetin, quercitrin, rutin, kaempferol 등과 같은 플라보노이드가 풍부한 식품으로 알려졌다(17-20).

시금치(*Spinacia oleracea* L.)는 명아주과의 일년생 작물로 우리나라에는 1500년대에 전래되어 상용되고 있는 채소이다(21). 시금치는 비타민 A의 전구체인 카로틴과 비타민 C, 칼슘, 철분 등의 무기질을 다량 함유하고 있으며, 클로로필을 포함하고 있는 녹색색 엽채류이다(22). 이러한 엽채류에는 glycoside form으로 flavones이나 flavonols 등이 함유되어 있으며(23), 시금치는 생리학적으로 항산화(23), 항암(24), 항종양(25) 등의 효과가 있는 것으로 알려졌다.

양배추(*Brassica oleracea* var. *capitata*)는 십자화과 채소의 일종으로 glucosinolates라는 독특한 생리활성물질이 함유되어 있으며(26,27), phenolic acids, flavonols, anthocyanidins 등과 같은 천연 페놀 화합물을 함유하고 있다(28,29). 여러 연구에 의하면 양배추 추출물 처리로 위암, 간암, 전립선암 등의 암세포 증식이 억제되었으며(30), 이런 십자화과 채소의 항암 효과는 glucosinolates의 분해산물인 isothiocyanates에 의한 것으로 알려졌다(31,32).

양파(*Allium cepa* L.)는 백합목 백합과에 속하는 이년생 초본으로서 독특한 향미특성으로 우리 식생활에 중요한 조미채소로 사용되고 있다(33). 양파에는 quercetin, kaempferol, gallic acid, ferulic acid, protocatechuic acid와 같은 다양한 페놀계 화합물이 함유되어 있으며(34,35), 특히 양파의 표피 바로 아래에 quercetin이 가장 풍부한 것으로 알려져 있다(36), 양파의 생리활성으로는 항산화(37,38), 항염증(39), 항균(40), 항암(41), 신경세포 보호 효과(42) 등이 보고되어 있다.

대부분 항암 및 암 예방 효과가 있는 약물 또는 물질들이 암세포의 apoptosis 유도에 효과적이라는 연구 결과들이 보고되기 시작하면서 암세포의 apoptosis 유도가 암 치료 및 예방법 중 하나로 강조되고 있다. 따라서 본 연구에서는 시금치, 양배추, 양파 추출물이 위암세포인 AGS, 유방암세포인 MDA-MB-231과 SK-BR-3의 증식에 미치는 영향을 조사하고 이러한 영향이 apoptosis에 의한 것인지를 확인하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 연구에 사용한 위암세포 AGS와 유방암세포 MDA-MB-231, SK-BR-3는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 세포배양에 사용한 RPMI-1640, fetal bovine serum(FBS)은 Welgene(Gyeongsan, Korea)에서 구입하였으며, streptomycin/penicillin은 Gibco(BRL, Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. 본 연구에 사용한 일반적인 시약들은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, anti-rabbit IgG와 anti-Bcl-2, anti-Bax, anti-PARP, anti- β -actin은 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다.

시료 추출

본 실험에 사용한 시금치, 양배추, 양파 추출물은 식물재료를 methyl alcohol로 45°C에서 15분간 sonication 후 2시간 정치를 1일 10회 반복하여 3일 동안 추출한 다음 무형광 솜을 사용하여 filtering 하였다. 그 후 Rotary Evaporator를 사용하여 45°C에서 감압 농축시킨 후 동결 건조하여 -4°C의 저온에서 보관한 시료를 한국식물추출물은행(Cheongju, Korea)에서 분양받아 실험에 사용하였다. 시금치 추출물의 추출수율은 14.22%로 원시료 140 mg당 20 mg이 추출되었으며, 양배추 추출물의 추출수율은 18.77%로 원시료 106 mg당 20 mg, 양파 추출물의 추출수율은 20.66%로 원시료 96 mg당 20 mg이 추출되었다.

세포 배양

위암세포 AGS, 유방암세포 MDA-MB-231과 SK-BR-3는 10% FBS, 1% streptomycin/penicillin이 포함된 RPMI-1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂가 유지되는 incubator에서 배양하였다. 175-cm² flask에 세포가 80~90% 정도 되었을 때 phosphate buffered saline solution (PBS)으로 세포의 단층을 세척한 후 trypsin-EDTA를 사용하여 계대배양 하였고 배지는 2~3일마다 교환하였다.

MTT assay

AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포의 증식에 미치는 시금치, 양배추, 양파 추출물의 영향을 조사하기 위해 MTT assay를 수행하였다. 세포 배양용 96 well plate에 세포를 2×10^4 cells/mL로 분주하고 24시간 동안 안정화시켰다. 그 후 각 세포에 시금치, 양배추, 양파 추출물을 0, 50, 100, 200 μ g/mL로 각각 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 배지를 제거하고 PBS에 녹인 MTT solution을 각 well당 40 μ L씩 처리하여 2시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. MTT solution을 제거한 후 DMSO를 100 μ L씩 처리하여 well에 형성된 formazan을 모두 녹인 다음 ELISA reader(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 595 nm에서 흡광도

를 측정하였다.

DAPI staining

Apoptosis가 유발되었을 때 특이적으로 나타나는 핵의 형태학적인 변화를 관찰하기 위해 DAPI staining을 수행하였다. AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포를 60 dish에 1×10^5 cells/mL로 분주하고 24시간 동안 안정화시켰다. 그 후 각 세포에 시금치, 양배추, 양파 추출물을 0, 200 $\mu\text{g/mL}$ 를 처리하여 24시간 동안 incubator에서 배양하였다. 24시간 후 배지를 제거하고 PBS로 두 번 세척한 다음 4% para-formaldehyde solution으로 15분간 고정시켰다. 15분 후 paraformaldehyde를 제거하기 위해 PBS로 두 번 세척하고 DAPI solution을 2 mL씩 처리하여 형광현미경(Zeiss fluorescence microscope, Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA)으로 200배 시야에서 관찰하였다.

Western blot analysis

추출물 처리에 의한 단백질들의 변화를 확인하기 위해 western blotting을 수행하였다. 175- cm^2 flask에 37°C, 5% CO_2 가 유지되는 incubator에서 배양시킨 AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포에 양파 추출물을 0, 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하고 24시간 동안 배양시켰다. 24시간 후 세포에 trypsin-EDTA를 첨가하여 세포를 부유시킨 후 원심분리(1,200 rpm, 5 min, 4°C) 하였다. 원심분리 하여 얻은 cell pellet에 cell lysis buffer(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 첨가하여 4°C에서 20분간 반응시켰다. 그 후 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리 하여 얻은 상등액을 cell lysate로 사용하였다. 추출한 단백질의 농도는 Bradford protein assay를 이용하여 정량하였고 단백질을 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 크기별로 분리한 후 nitrocellulose membrane(Bio-Rad)에 이동시켰다. Membrane은 5% skim milk로 2시간 동안 blocking 한 후 anti-Bcl-2, anti-Bax, anti-PARP, anti- β -actin의 1차 항체를 각각 첨가하여 4°C에서 overnight 하였다. 그 후 anti-rabbit IgG를 첨가하여 2시간 동안 반응시켰다. 각 protein band는 ECL detection reagents(Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 실험 결과를 보았다. 각 밴드는 imaging program인 Image J Launcher(provided by NCBI)를 이용하여 밀도를 측정하였다.

통계처리

모든 실험 결과는 평균치와 표준편차를 사용하여 나타내고 각 군 간 비교는 one-way ANOVA에 이은 *t*-test 분석을 실시하였다. 대조군과 비교하여 *P* 값이 0.05 미만일 때를 통계학적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

시금치, 양배추 양파 추출물이 암세포의 성장에 미치는 영향

우리나라의 일일 평균 채소류의 섭취 권장량은 300~500 g으로, Lee 등(43)의 연구에서 양파 추출물 150 mL(양파 약 300 g)를 고콜레스테롤혈증 환자가 10주간 섭취하였을 때 항고지혈증 효과를 확인하였다. 또 Wang 등(44)의 연구에서 ethyl acetate로 추출한 양파 추출물을 MDA-MB-231 유방암세포에 0~250 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때 농도 의존적으로 세포의 생존율이 감소한 것을 확인하였고, Hwang 등(30)의 연구에서 양배추 에탄올 추출물을 AGS 위암세포, HepG2 간암세포, LNCaP 전립선암세포에 0~250 ppm의 농도로 24시간, 48시간 동안 처리하였을 때 농도 의존적으로 세포의 생존율이 감소한 것을 확인하였다. 이러한 결과들을 근거로 하여 본 실험에서는 시금치, 양배추, 양파 추출물의 최대 농도를 200 $\mu\text{g/mL}$ 로 설정하여 실험을 진행하였다.

시금치, 양배추, 양파 추출물이 위암세포인 AGS와 유방암세포인 MDA-MB-231과 SK-BR-3의 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 각 추출물을 0, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 24시간 처리한 후 MTT assay를 통해 세포 생존율을 측정하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 추출물을 처리하지 않은 군과 비교하였을 때 시금치, 양배추, 양파 추출물을 처리하였을 때 암세포의 생존율이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다.

시금치 추출물을 AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포에 24시간 동안 처리한 결과 각 세포의 생존율이 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 96.52%, 88.87%, 95.16%, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 91.18%, 80.73%, 93.91%, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 67.52%, 73.01%, 78.97%로 AGS 세포에서는 100 $\mu\text{g/mL}$, MDA-MB-231 세포에서는 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서부터 유의적인 암세포 성장 억제 효과를 보였으며, SK-BR-3 세포에서는 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서만 유의적인 암세포 성장 억제 효과를 보였다. 또 고농도의 시금치 추출물 200 $\mu\text{g/mL}$ 를 AGS와 MDA-MB-231, SK-BR-3 세포에 처리했을 때 각각 32.48%, 27%, 21.03%의 성장 억제율을 보였고 위암세포인 AGS에서 유방암세포인 MDA-MB-231과 SK-BR-3에 비해 상대적으로 높은 암세포 증식 억제 효과를 보였다.

양배추 추출물을 AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포에 24시간 동안 처리한 결과 각 세포의 생존율이 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 87.5%, 78.35%, 79.58%, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 75.96%, 69.11%, 75.89%, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 63.35%, 60.94%, 62.20%로 세 종류의 세포주 모두 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서부터 유의적인 암세포 성장 억제 효과를 나타냈으며, 고농도의 양배추 추출물 200 $\mu\text{g/mL}$ 를 AGS와 MDA-MB-231, SK-BR-3 세포에 처리했을 때 각각 36.64%, 39.05%, 37.8%의 억제율로 세 종류의 암세포에서

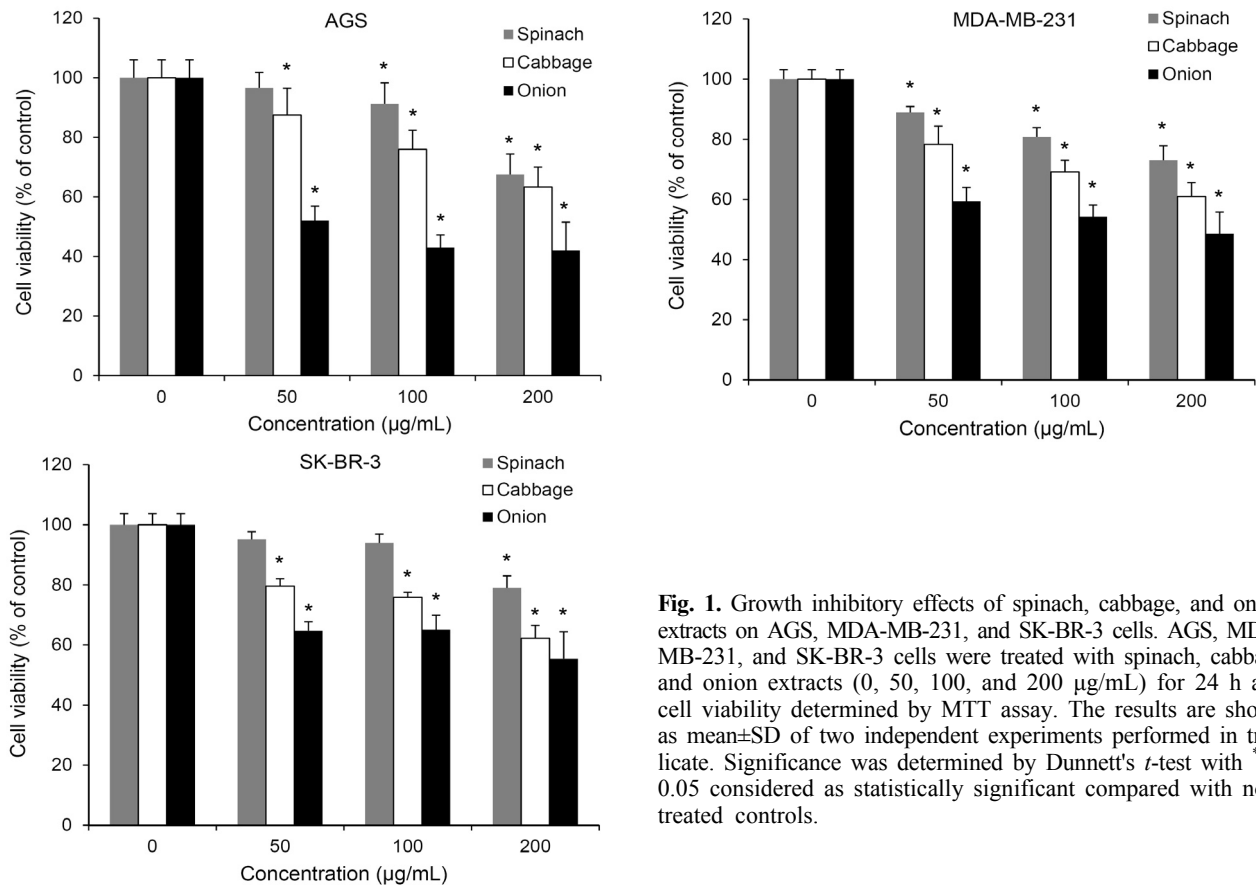


Fig. 1. Growth inhibitory effects of spinach, cabbage, and onion extracts on AGS, MDA-MB-231, and SK-BR-3 cells. AGS, MDA-MB-231, and SK-BR-3 cells were treated with spinach, cabbage and onion extracts (0, 50, 100, and 200 µg/mL) for 24 h and cell viability determined by MTT assay. The results are shown as mean±SD of two independent experiments performed in triplicate. Significance was determined by Dunnett's *t*-test with **P*<0.05 considered as statistically significant compared with non-treated controls.

비슷한 성장 억제 효과를 보였다.

양파 추출물을 AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포에 24시간 동안 처리한 결과 각 세포의 생존율은 50 µg/mL의 농도에서 52.03%, 59.40%, 64.70%, 100 µg/mL의 농도에서 43%, 54.26%, 65.07%, 200 µg/mL의 농도에서 41.99%, 48.53%, 55.37%로 세 종류의 세포주 모두 50 µg/mL의 농도에서부터 높은 성장 억제 효과를 보였고, 고농도의 양파 추출물 200 µg/mL를 AGS와 MDA-MB-231, SK-BR-3 세포에 처리했을 때 각각 58.01%, 51.46%, 44.62%의 억제율로 세 종류의 세포주에서 시금치 및 양배추 추출물보다 양파 추출물에 의한 암세포 증식 억제 효과가 상대적으로 높은 것을 확인하였다.

추출용매와 제형의 특성은 상이하지만 Maeda 등(25)의 연구에 의하면 Colon-26 대장암세포에 시금치로부터 분리된 glycolipid 분획을 0~100 µg/mL의 농도로 24시간 동안 처리하였을 때 농도 의존적으로 세포의 생존율이 감소한 것을 확인하였으며 100 µg/mL의 농도에서 대조군보다 75.7%의 억제율을 나타내었고, Hong 등(45)의 연구에서 AGS 위암세포에 양배추즙을 2 mg/mL의 농도로 48시간 동안 처리하였을 때 대조군보다 위암세포의 성장을 42% 억제한 것을 확인하였다. 또 Wang 등(44)의 연구에서 MDA-MB-231 유방암세포에 ethyl acetate로 추출한 양파 추출물을 0~250 µg/mL의 농도로 24시간 동안 처리하였을 때 농도

의존적으로 세포의 생존율이 감소한 것을 확인하였으며, MDA-MB-231 세포의 102 µg/mL의 농도에서 대조군보다 84%의 억제율을 보였다.

이러한 연구 결과들은 본 실험 결과에 나타난 시금치, 양배추, 양파 추출물의 위암 및 유방암 세포 증식 억제 효과와 같은 결과로 이전에 보고된 시금치, 양배추, 양파 추출물의 항암효능(24,30,41)을 뒷받침하는 결과이며, 세 종류의 추출물 중 양파 추출물의 효과가 다소 뛰어난 것을 확인하였다.

시금치, 양배추 양파 추출물이 암세포의 형태학적인 변화에 미치는 영향

Apoptosis는 세포가 정상적인 상태 또는 병리학적인 요인에 노출된 후 죽음에 이르게 되는 생리학적 과정 중 하나이다(46). Apoptosis가 유도되면 세포질 및 염색질 응축, 세포막 수포화 현상, DNA 단편화 등이 수반되는데 이러한 현상은 세포 내부의 복잡한 신호전달에 의해 조절되어 조직의 항상성을 유지하며 감염이나 손상된 세포에 대한 방어를 통해 암을 억제할 수 있다(47).

시금치, 양배추, 양파 추출물 처리에 의한 암세포의 생존율 감소가 apoptosis 유도에 의한 것인지 확인하기 위하여 DAPI staining을 통해 핵의 형태학적인 변화 및 염색질 응축 현상을 관찰하였다. AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포에 시금치, 양배추, 양파 추출물을 0, 200 µg/mL의 농도

로 24시간 동안 처리한 후 DAPI 염색을 수행하여 형광 현미경으로 관찰하였다(Fig. 2A). 그 결과 시금치, 양배추, 양파 추출물을 처리한 군에서는 MTT assay 결과에서 세포의 증식이 억제된 것과 동일하게 세포의 수가 감소하였으며 apoptotic body와 염색질 응축 등을 포함하는 apoptosis의 특징적인 형태가 관찰되었다. 이는 nucleosome의 linker DNA 부분의 절단에 의한 DNA 단편화의 결과이므로 시금치, 양배추, 양파 추출물 처리에 의한 AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포의 성장 억제 효과는 apoptosis와 연관이 있음을 시사한다.

Apoptosis가 유도된 정도를 정량적으로 분석하기 위해 DAPI-positive 한 세포를 counting 한 결과(Fig. 2B), 시금

치 추출물 200 $\mu\text{g/mL}$ 를 AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포에 처리하였을 때 각각 18%, 11.6%, 11.6%, 양배추 추출물 200 $\mu\text{g/mL}$ 를 AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포에 처리하였을 때 각각 15%, 12.6%, 12.8%, 양파 추출물 200 $\mu\text{g/mL}$ 를 AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포에 처리하였을 때 각각 27.8%, 19.4%, 20.8%로 세 종류의 세포주에서 시금치와 양배추 추출물을 처리한 세포보다 양파 추출물을 처리하였을 때 apoptosis가 유도된 형태의 세포가 많이 발견되었다. 이는 이전의 MTT assay 수행 결과에서 양파 추출물이 가장 높은 세포 증식 억제 효과를 보인 것과 일치하는 결과로 위암세포 AGS와 유방암세포 MDA-MB-231, SK-BR-3에서의 apoptosis 유도 효과는 양파 추출

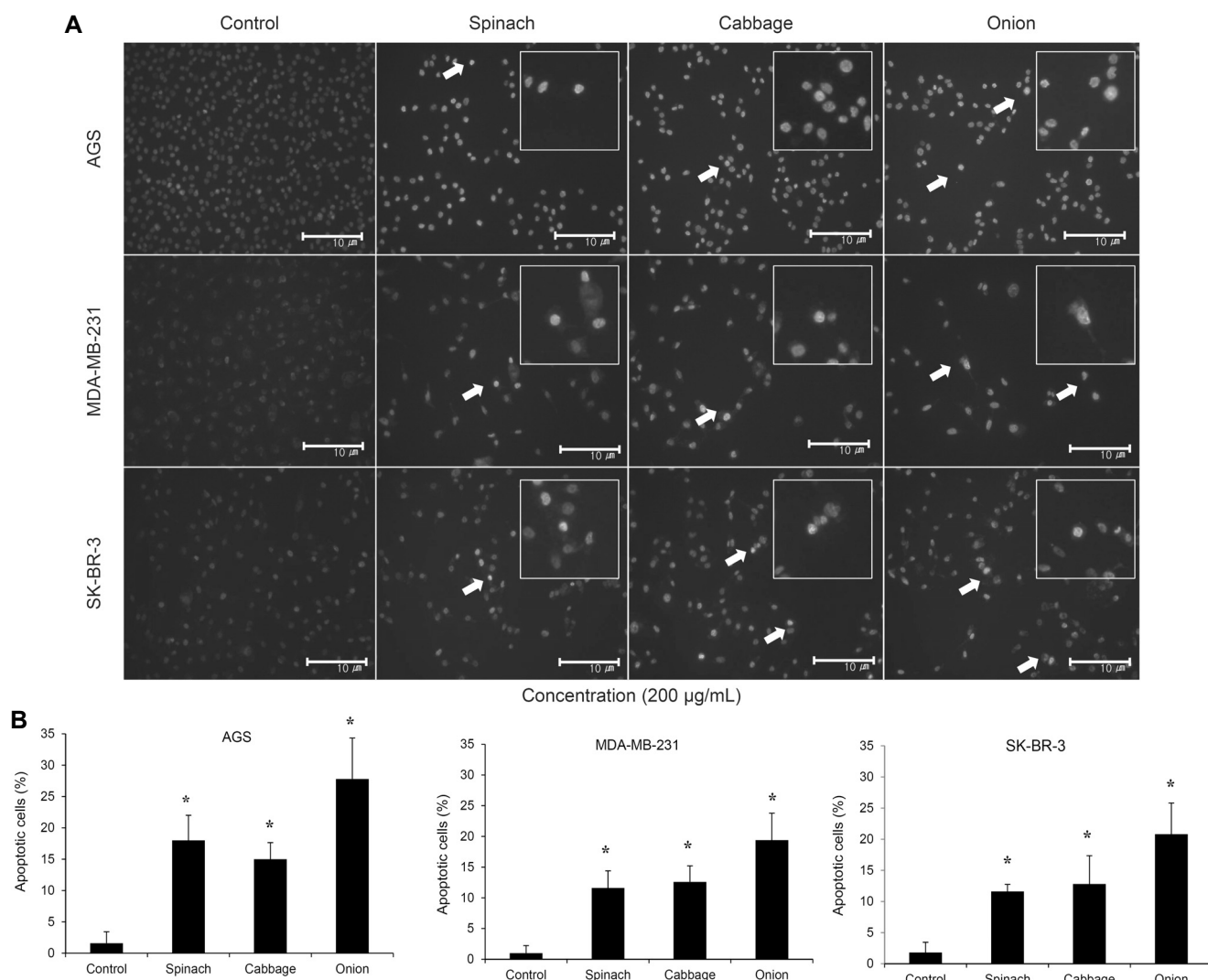


Fig. 2. The effects of spinach, cabbage, and onion extracts on apoptosis in AGS, MDA-MB-231, and SK-BR-3 cells. (A) AGS, MDA-MB-231, and SK-BR-3 cells were treated with spinach, cabbage, and onion extracts (0 and 200 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h and apoptotic bodies stained with DAPI. The arrows indicate chromatin condensation in the cancer cells. Cleaved nuclear were examined using a fluorescence microscope ($\times 200$). (B) AGS, MDA-MB-231, and SK-BR-3 cells were treated with spinach, cabbage, and onion extracts (0 and 200 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h and nuclear condensation determined by DAPI. Graphs shows quantification of DNA fragmentation and nuclear condensation. Each bar represents the mean \pm SD calculated from five independent experiments. Significance was determined by Dunnett's *t*-test with $*P < 0.05$ considered as statistically significant compared with non-treated controls.

물이 더 우수한 효과가 있는 것으로 생각한다.

양파 추출물이 Bcl-2 family 단백질의 발현에 미치는 영향

Apoptosis는 다양한 단백질들의 상호 작용으로 일어나며 이 중 Bcl-2 family 단백질들은 미토콘드리아 막에 존재하거나 세포사멸 유도 신호에 의해 미토콘드리아 막으로 이동하여 세포사멸을 조절하는 중요한 역할을 담당한다(48). 그 중 Bax는 pro-apoptotic protein으로 세포질에서 미토콘드리아로 이동한 후 cytochrome C의 분비 활성을 높여 apoptosis를 유도시키는 반면, Bcl-2 단백질은 anti-apoptotic protein으로 미토콘드리아로의 Bax의 이동을 억제함으로써 apoptosis의 유도를 억제하는 역할을 한다(49,50).

MTT assay와 DAPI staining 결과 AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포에서 세포 생존율 및 apoptosis 유도 효과에 가장 큰 효과를 보였던 양파 추출물에 의한 apoptosis 관련 단백질의 발현 양상을 확인하기 위해 western blotting을 수행하였다. 그 결과 AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포에 양파 추출물 200 µg/mL로 24시간 동안 처리한 군에서 pro-apoptotic 인자인 Bax 단백질의 발현이 증가하였으며(Fig. 3A), anti-apoptotic 인자인 Bcl-2 단백질은 감소하는 경향을 보였다(Fig. 3B).

Bax/Bcl-2 ratio는 암 환자에서 유용한 임상적인 지표로 이용되는바 본 연구에서 나타난 β-actin에 대한 상대적인 Bax/Bcl-2 ratio는 양파 추출물 처리에 의해 통계적으로 유의하게 증가하였으며 유방암세포인 MDA-MB-231, SK-BR-3 세포보다 위암세포 AGS 세포에서의 증가율이 높게 나타났다(Fig. 3C).

이러한 결과를 통해 양파 추출물의 AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 암세포 성장 억제 효과는 apoptosis에 의한 것임을 Bcl-2 family 단백질의 발현 변화를 통해 확인하였으며, 양파 추출물의 apoptosis 유도 효과는 유방암세포보다는 위암세포에서 더 효과가 있는 것으로 생각한다.

양파 추출물이 PARP 단백질 발현에 미치는 영향

Poly(ADP ribose) polymerase(PARP)는 손상된 DNA를 복구하는 단백질로 apoptosis 유도 과정 중 활성화된 caspase에 의하여 단백질의 분해가 일어나면서 정상적인 DNA 수리 과정이 억제된다(51,52). 정상세포의 경우 PARP 단백질은 116 kDa의 분자량을 가지지만 apoptosis가 유도된 경우 85 kDa 크기의 분절이 관찰되므로 PARP의 분절은 apoptosis의 대표적인 특징 중 하나이다(53,54).

AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포에 양파 추출물을 0, 200 µg/mL로 24시간 동안 처리한 후 western blotting을 통해 PARP 단백질의 발현 양상을 확인한 결과 양파 추출물을 200 µg/mL 처리한 군에서 PARP의 분절이 증가하였다(Fig. 4). 이러한 결과를 종합하였을 때 양파 추출물에 의해 AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포의 Bax 및 Bcl-2 단백질의 발현 수준이 변화되고 PARP를 분절시켜 apoptosis가 유도되는 것으로 생각한다.

따라서 시금치, 양배추, 양파 추출물은 인간 위암세포인 AGS, 인간 유방암세포인 MDA-MB-231, SK-BR-3 세포에서 세포의 증식을 억제하고 apoptosis를 유도시키는 것으로 확인하였으며, 또 이 중 가장 효과가 우수했던 양파 추출물에 의한 각 세포에서의 단백질의 변화를 확인한 결과 Bax, Bcl-2, PARP 단백질의 수준이 변화되는 것을 확인하였다. 이는 양파 추출물이 위암세포와 유방암세포에서 apoptosis를 유도시키며 단백질의 발현량을 정량화시킨 결과 유방암세포보다는 위암세포에서 그 효과가 더 뛰어난 것으로 나타났다. 더불어 유방암은 호르몬 수용체인 estrogen receptor (ER), progesterone receptor(PR), HER2(ERBB2)가 양성인지 음성인지에 따라 분자적 서브타입인 basal-like(ER-negative, PR-negative, HER2-negative), Luminal A(ER-positive and/or PR-positive and HER2-negative), Luminal B(ER-positive and/or PR-positive and HER2 positive), HER-2(ER-negative, PR-negative, HER2-pos-

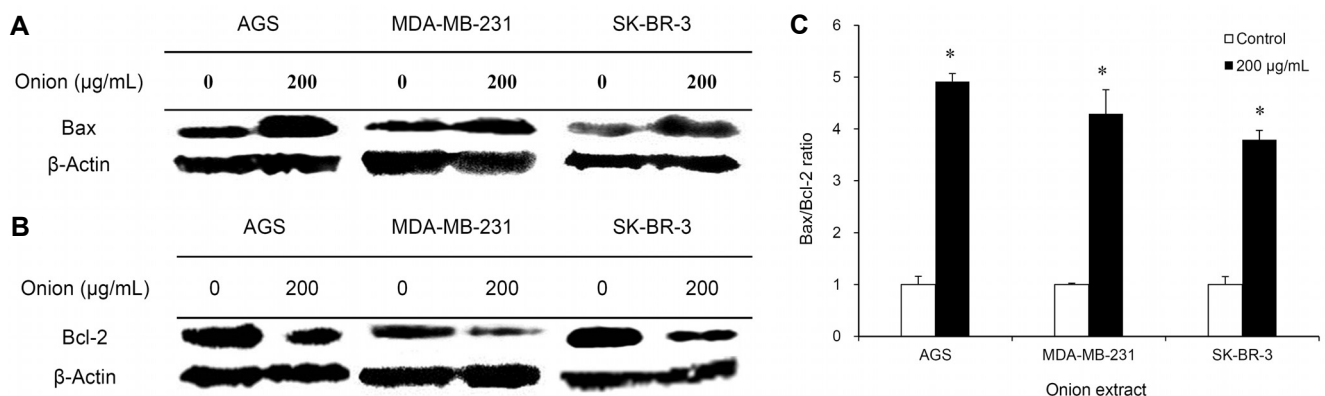


Fig. 3. The effects of onion extract on Bcl-2 family protein in AGS, MDA-MB-231 and SK-BR-3 cells. Cells were treated with onion extracts (0 and 200 µg/mL) for 24 h and cell harvested to measure protein levels of (A) Bax and (B) Bcl-2 by western blotting. The blots were also probed with anti-β-actin antibodies to confirm equal sample loading. (C) The Bax/Bcl-2 ratio was calculated from the Bax and Bcl-2 over β-actin ratios. Each bar represents the mean±SD calculated from two independent experiments. Significance was determined by Dunnett's *t*-test with **P*<0.05 considered as statistically significant compared with non-treated controls.

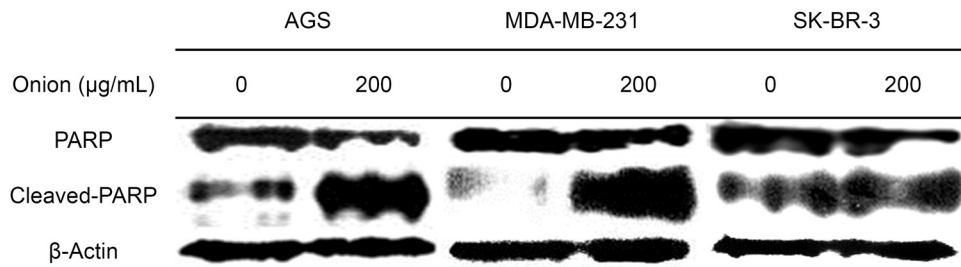


Fig. 4. The effect of onion extract on PARP protein in AGS, MDA-MB-231, and SK-BR-3 cells. Cells were treated with onion extract (0 and 200 μg/mL) for 24 h and cell harvested to measure protein levels of PARP by western blotting. The blots were also probed with anti-β-actin antibodies to confirm equal sample loading.

itive)로 구분되는데(55), 본 실험에 사용한 MDA-MB-231 세포는 basal-like, SK-BR-3 세포는 HER2 positive type 으로 양파 추출물 처리에 의해 유도된 암세포 증식 억제 효과 및 apoptosis 유도 효과는 두 유방암세포에서 큰 차이가 없는 것으로 나타나 호르몬 의존도와는 관계없이 유방암세포의 증식을 억제하는 것으로 생각한다.

종합적으로 양파 추출물이 시금치, 양배추 추출물보다 암세포 증식 억제 효과 및 apoptosis 유도 효과가 우수한 것으로 나타났는데 이는 양파 추출물의 플라보노이드 성분에 기인한 것으로 추정된다. Sultana와 Anwar(19)의 연구에서 채소류에 있는 flavonol의 함량을 분석한 결과 total flavonol은 시금치에서 1,720.5±37.6 mg/kg, 양배추에서 23.9±2.1 mg/kg, 양파에서 104.8±0.6 mg/kg으로 시금치가 가장 많았지만 그중 quercetin은 양파에서만 104.5±4.2가 검출되었다. 또 Shin 등(56)의 연구에서 42종의 채소류에 함유된 플라보노이드의 성분을 조사한 결과 양파가 916.5 mg/100 g으로 가장 많았으며 그중 quercetin이 822.6 mg/100 g을 차지하였다. 하지만 본 연구에 사용한 채소류 추출물의 유용성분에 대한 연구는 이루어지지 않았으며, 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량의 차이는 각 추출물의 재배 조건, 수확 시기, 추출 조건 등에 따라 상이하기 때문에 quercetin 이외에도 다른 활성성분이 관여했을 가능성을 배제할 수는 없다.

따라서 본 연구 결과는 시금치, 양배추, 양파와 같은 채소류 추출물이 항암 효능을 가지며 이 중 양파 추출물의 효과가 유방암보다는 위암에서 더 뛰어났음을 확인하였으며 그 생리적 유용성을 규명하였다는 것에 의의를 지닌다. 더불어 양파 추출물 및 양파의 섭취는 암세포의 apoptosis 유도를 통해 위암의 예방과 치료에 기여할 것으로 기대되며 어떤 기전으로 암세포의 apoptosis를 유도하고 생체 내에서도 항암 효과를 보이는지에 대한 세부적인 후속 연구가 필요할 것으로 생각한다.

요 약

본 연구에서는 메탄올로 추출한 시금치, 양배추, 양파 추출

물의 인간 위암세포 AGS와 인간 유방암세포 MDA-MB-231, SK-BR-3 암세포에서의 세포 증식 억제 효과와 apoptosis 유도 효과에 대하여 비교 조사하였다. AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 암세포에 시금치, 양배추, 양파 추출물을 0, 50, 100, 200 μg/mL로 24시간 동안 처리한 뒤 MTT assay를 통하여 세포 생존율을 측정한 결과 암세포 생존율이 농도 의존적으로 감소하였다. 이러한 시금치, 양배추, 양파 추출물의 암세포 증식 억제 효과가 apoptosis에 의해 유도되는지 확인하기 위해 AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 암세포에 각 추출물을 0, 200 μg/mL로 24시간 동안 처리한 후 DAPI staining을 수행한 결과 apoptotic body와 염색질 응축이 추출물 처리군에서 증가하였다. MTT assay와 DAPI staining 결과 암세포 증식 억제 효과 및 apoptosis 유도 효과가 가장 우수했던 양파 추출물에 의한 apoptosis 관련 단백질들의 변화 양상을 확인하기 위해 western blotting을 수행하였다. AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 암세포에 양파 추출물을 0, 200 μg/mL로 24시간 동안 처리한 뒤 western blotting을 수행한 결과 pro-apoptotic 인자인 Bax 발현은 증가하였으며 PARP 단백질의 분절 또한 증가한 것을 확인하였다. 반면 anti-apoptotic 인자인 Bcl-2의 발현은 감소하였다. 이러한 결과들을 종합하였을 때 시금치, 양배추, 양파 추출물은 인간 위암세포인 AGS, 인간 유방암세포인 MDA-MB-231, SK-BR-3에서 apoptosis 유도를 통해 암세포 성장을 억제하는 것으로 생각한다. 그중 양파 추출물의 효과가 가장 우수했으며 유방암세포보다 위암세포에서의 apoptosis 유도 효과가 뛰어났다. 따라서 양파의 섭취는 위암의 예방 및 치료를 위한 치료제로의 개발 가능성이 우수함을 제시하며 추후 지속적인 연구를 통하여 *in vivo*에서의 양파 추출물의 항암 효과에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 생각한다.

감사의 글

이 논문은 2013년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(NRF-2013R1A1A4A01012315)

REFERENCES

- Kang HI, Kim JY, Cho HD, Park KW, Kang JS, Seo KI. 2010. Resveratrol induces apoptosis in primary human prostate cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1119-1125.
- Lee MS, Cha EY, Thuong PT, Kim JY, Ahn MS, Sul JY. 2010. Down-regulation of human epidermal growth factor receptor 2/neu oncogene by corosolic acid induces cell cycle arrest and apoptosis in NCI-N87 human gastric cancer cells. *Biol Pharm Bull* 33: 931-937.
- Li N, Fan LL, Sun GP, Wan XA, Wang ZG, Wu Q, Wang H. 2010. Paeonol inhibits tumor growth in gastric cancer *in vitro* and *in vivo*. *World J Gastroenterol* 16: 4483-4490.
- Zhang L, Hou YH, Wu K, Zhai JS, Lin N. 2010. Proteomic analysis reveals molecular biological details in varioliform gastritis without *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 16: 3364-3673.
- NCC. Annual report of cancer statistics in Korea in 2012. <http://www.cancer.go.kr/ebook/104/PC/104.html> (accessed Dec 2014).
- Dorssers LCJ, van der Flier S, Brinkman A, van Agthoven T, Veldscholte J, Berns EMJJ, Klijn JGM, Beex L, Foekens JA. 2001. Tamoxifen resistance in breast cancer. *Drugs* 61: 1721-1733.
- Seeram NP. 2008. Berry fruits for cancer prevention: current status and future prospects. *J Agric Food Chem* 56: 630-635.
- Dorai T, Aggarwal BB. 2004. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Lett* 215: 129-140.
- Nkondjock A, Ghadirian P. 2005. Risk factors and risk reduction of breast cancer. *Med Sci (Paris)* 21: 175-180.
- Ogimoto I, Shibata A, Fukuda K. 2000. World Cancer Research Fund/American Institute of Cancer Research 1997 Recommendations: applicability to digestive tract cancer in Japan. *Cancer Causes Control* 11: 9-23.
- Block G, Patterson B, Subar A. 1992. Fruits, vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer* 18: 1-29.
- Bravo L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 56: 317-333.
- Naderi GA, Asgary S, Sarraf-Zadegan N, Shirvany H. 2003. Anti-oxidant effect of flavonoids on the susceptibility of LDL oxidation. *Mol Cell Biochem* 246: 193-196.
- Cragg GM, Newman DJ. 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol* 100: 72-79.
- Kaul TN, Middleton E Jr, Ogra PL. 1985. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *J Med Virol* 15: 71-79.
- Hämäläinen M, Nieminen R, Vuorela P, Heinonen M, Moilanen E. 2007. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF- κ B activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- κ B activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators Inflammation* 2007: 45673.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79: 727-747.
- Ko EY, Nile SH, Sharma K, Li GH, Park SW. 2015. Effect of different exposed lights on quercetin and quercetin glucoside content in onion (*Allium cepa* L.). *Saudi J Biol Sci* 22: 398-403.
- Sultana B, Anwar F. 2008. Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. *Food Chem* 108: 879-884.
- Nile SH, Park SW. 2013. Total phenolics, antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activity of three colored onions (*Allium cepa* L.). *Front Life Sci* 7: 224-228.
- Lee MH, Han JS, Kozukue N, Minamide T. 2005. Physico-chemical characteristics of commercial spinach produced in autumn. *J East Asian Soc Dietary Life* 15: 306-314.
- Kim NY, Yoon SK, Jang MS. 1993. Effect of blanching on the chemical properties of different kind of spinach. *Korean J Soc Food Sci* 9: 204-209.
- Lee YA, Kim HY, Cho EJ. 2005. Comparison of methanol extracts from vegetables on antioxidative effect under *in vitro* and cell system. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 1151-1156.
- Matsubara K, Matsumoto H, Mizushima Y, Mori M, Nakajima N, Fuchigami M, Yoshida H, Hada T. 2005. Inhibitory effect of glycolipids from spinach on *in vitro* and *ex vivo* angiogenesis. *Oncol Rep* 14: 157-160.
- Maeda N, Kokai Y, Ohtani S, Sahara H, Kumamoto-Yonezawa Y, Kuriyama I, Hada T, Sato N, Yoshida H, Mizushima Y. 2008. Anti-tumor effect of orally administered spinach glycolipid fraction on implanted cancer cells, colon-26, in mice. *Lipids* 43: 741-748.
- Jahangir M, Kim HK, Choi YH, Verpoorte R. 2009. Health-affecting compounds in Brassicaceae. *Comp Rev Food Sci Food Saf* 8: 31-43.
- Sang JP, Minchinton IR, Johnstone PK, Truscott RJW. 1984. Glucosinolate profiles in the seed, root and leaf tissue of cabbage, mustard, rapeseed, radish and swede. *Can J Plant Sci* 64: 77-93.
- Singh J, Upadhyay AK, Bahadur A, Singh B, Singh KP, Rai M. 2006. Antioxidant phytochemicals in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata). *Sci Hortic* 108: 233-237.
- Mattila P, Hellstrom J. 2007. Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *J Food Compos Anal* 20: 152-160.
- Hwang ES, Hong E, Kim GH. 2012. Determination of bio-active compounds and anti-cancer effect from extracts of Korean cabbage and cabbage. *Korean J Food & Nutr* 25: 259-265.
- Hwang ES, Lee HJ. 2010. Effects of phenylethyl isothiocyanate and its metabolite on cell-cycle arrest and apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells. *Int J Food Sci Nutr* 61: 324-336.
- Smith TK, Mithen R, Johnson IT. 2003. Effects of Brassica vegetable juice on the induction of apoptosis and aberrant crypt foci in rat colonic mucosal crypts *in vivo*. *Carcinogenesis* 24: 491-495.
- Cho J, Bae RN, Lee SK. 2010. Current research status of postharvest technology of onion (*Allium cepa* L.). *Kor J Hort Sci Technol* 28: 522-527.
- Bilyk A, Cooper PL, Sapers GM. 1984. Varietal differences in distribution of quercetin and kaempferol in onion (*Allium cepa* L.) tissue. *J Agric Food Chem* 32: 274-276.
- Crozier A, Lean MEJ, McDonald MS, Black C. 1997. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. *J Agric Food Chem* 45: 590-595.
- Patil BS, Pike LM. 1995. Distribution of quercetin content in different rings of various coloured onion (*Allium cepa* L.) cultivars. *J Hortic Sci* 70: 643-650.
- Alpsoy S, Kanter M, Aktas C, Erboğa M, Akyuz A, Akkoyun DC, Oran M. 2014. Protective effects of onion extract on cadmium-induced oxidative stress, histological damage, and

- apoptosis in rat heart. *Biol Trace Elem Res* 159: 297-303.
38. Ola-Mudathir KF, Maduagwu EN. 2014. Antioxidant effects of methanol extract of *Allium cepa* linn on cyanide-induced renal toxicity in male Wistar rats. *Niger J Physiol Sci* 29: 147-151.
39. Kim J, Kim JS, Park E. 2013. Cytotoxic and anti-inflammatory effects of onion peel extract on lipopolysaccharide stimulated human colon carcinoma cells. *Food Chem Toxicol* 62: 199-204.
40. Elnima EI, Ahmed SA, Mekkawi AG, Mossa JS. 1983. The antimicrobial activity of garlic and onion extracts. *Pharmazie* 38: 747-748.
41. Rho SN, Han JH. 2000. Cytotoxicity of garlic and onion methanol extract on human lung cancer cell lines. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 870-874.
42. Yang EJ, Kim GS, Kim JA, Song KS. 2013. Protective effects of onion-derived quercetin on glutamate-mediated hippocampal neuronal cell death. *Pharmacogn Mag* 9: 302-308.
43. Lee HJ, Lee KH, Park E, Chung HK. 2010. Effect of onion extracts on serum cholesterol in borderline hypercholesterolemic participants. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1783-1789.
44. Wang Y, Tian WX, Ma XF. 2012. Inhibitory effects of onion (*Allium cepa* L.) extract on proliferation of cancer cells and adipocytes via inhibiting fatty acid synthase. *Asian Pac J Cancer Prev* 13: 5573-5579.
45. Hong YJ, Kim SY, Han J, Lim YI, Park KY. 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. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 682-689.
46. Hengartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776.
47. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68: 251-306.
48. Kim EJ, Park SY, Hong J, Shin M, Lim SS, Shin HK, Yoon JH. 2007. Inhibitory effect of the methanolic extract of *Symphycaradia latiuscula* on the growth of HT-29 human colon cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 431-438.
49. Donovan M, Cotter TG. 2004. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim Biophys Acta* 1644: 133-147.
50. Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609-619.
51. Galluzzi L, Kepp O, Trojel-Hansen C, Kroemer G. 2012. Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. *Circ Res* 111: 1198-1207.
52. Boulares AH, Yakovlev AG, Ivanova V, Stoica BA, Wang G, Iyer S, Smulson M. 1999. Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *J Biol Chem* 274: 22932-22940.
53. Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM. 1995. Yama/CPP32 β , a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81: 801-809.
54. Los M, Mozoluk M, Ferrari D, Stepczynska A, Stroh C, Renz A, Herceg Z, Wang ZQ, Schulze-Osthoff K. 2002. Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. *Mol Biol Cell* 13: 978-988.
55. Wiechmann L, Sampson M, Stempel M, Jacks LM, Patil SM, King T, Morrow M. 2009. Presenting features of breast cancer differ by molecular subtype. *Ann Surg Oncol* 16: 2705-2710.
56. Shin JH, Kim HW, Lee MK, Lee SH, Lee YM, Jang HH, Hwang KA, Cho YS, Kim JB. 2014. Content and distribution of flavanols, flavonols and flavanones on the common vegetables in Korea. *Korean J Environ Agric* 33: 205-212.