

Delphinidin이 인체 유방암세포 MDA-MB-231의 세포증식 억제와 세포사멸 유도에 미치는 영향*

서은영[§]

장안대학교 식품영양과

Delphinidin inhibits cell proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cell lines*

Seo, Eun Young[§]

Department of Food and Nutrition, Jangan University, Gyeonggi-do 445-756, Korea

ABSTRACT

Breast cancer is the most common malignancy in women, both in the developed and developing countries. Anthocyanins are natural coloring of a multitude of foods, such as berries, grapes or cherries. Glycosides of the aglycons delphinidin represent the most abundant anthocyanins in fruits. Delphinidin has recently been reported to inhibit the growth of human tumor cell line. Also, delphinidin is a powerful antioxidant that reportedly exerts beneficial effects in patients with advanced cancer by reducing the level of reactive oxygen species and increasing glutathione peroxidase activity. This study investigates the effects of delphinidin on protein ErbB2, ErbB3 and Akt expressions associated with cell proliferation and Bcl-2, Bax protein associated with cell apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cell line. MDA-MB-231 cells were cultured with various concentrations (0, 5, 10, and 20 $\mu\text{mol/L}$) of delphinidin. Delphinidin inhibited breast cancer cell growth in a dose dependent manner ($p < 0.05$). ErbB2 and ErbB3 expressions were markedly lower 5 $\mu\text{mol/L}$ delphinidin ($p < 0.05$). In addition, total Akt and phosphorylated Akt levels were decreased dose-dependently in cells treated with delphinidin ($p < 0.05$). Futher, Bcl-2 levels were dose-dependently decreased and Bax expression was significantly increased in cells treated with delphinidin ($p < 0.05$). In conclusion, I have shown that delphinidin inhibits cell growth, proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cell lines. (J Nutr Health 2013; 46(6): 503 ~ 510)

KEY WORDS: delphinidin, breast cancer, inhibit proliferation, induce apoptosis.

서 론

우리나라에서 가장 문제가 되고 있는 질병 중 하나인 암은 2010년 원인별 사망자수 결과 1위를 차지하였다.¹⁾ 그 중 유방암은 2008년 발병율이 여성의 경우 갑상선암에 이어 2위를 차지할 정도로 우리 사회 심각한 건강 문제 중 하나이다.²⁾ 1999년부터 2008년까지 10만 명 당 유방암 발병율은 연간 6.5%씩 증가되고 있으며, 이후에도 꾸준히 증가되고 있다.³⁾ 수많은 의학 연구에서 유방암은 다른 종류의 암과 비교하여 식사성 원인과 매우 밀접한 관련성을 보고하고 있다.⁴⁾ 여러 역학조사 및 case control study에 따르면 식품 성분들이 암의 발생 및 예방

에 중요하게 작용하고 있으며 특히, 고지방과 고단백질 식사는 유방암의 발병을 증가시키고 채소와 과일의 섭취 증가는 유방암 발병을 예방한다고 하였다.⁵⁾ 식품 성분 중 유방암 예방에 효과가 있는 것은 콩의 제니스테인,⁶⁾ EPA (eicosapentaenoic acid), DHA (docosahexaenoic acid)⁷⁾ 등이 보고되고 있다. 암의 치료 방법 중 화학요법은 종양세포 이외에 정상세포까지 손상시키며 오심, 구토 등의 여러 부작용이 보고되고 있어 최근에는 부작용이 없는 천연물의 항암 효과에 대해 많은 연구가 활발히 진행되고 있다.^{8,9)}

색이 진한 과일이나 채소 등에 함유되어 있는 색소 성분들이 여러 질병 예방과 치료에 효과가 있다고 보고되면서 색소 성분이 포함된 과일이나 채소의 소비가 증가되고 있다.^{10,11)} 그

Received: Nov 14, 2013 / Revised: Nov 23, 2013 / Accepted: Dec 3, 2013

*This work was supported by grant from Jangan University in 2013.

[§]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: e.young719@jangan.ac.kr

© 2013 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

중 anthocyanin은 flavonoid 중 하나로 색이 진한 청색, 보라색, 적색을 띠는 색소 성분이며 식품에는 베리류, 적포도, 체리, 적색 감자와 적색 양배추 등에 많이 함유되어 있다.¹⁰⁾ Anthocyanin은 탁월한 항산화력이 보고되고 있으며, 지질과산화물을 억제하고 활성산소종 (SOD) 생성을 감소시키는 효과가 있다.¹²⁾ 또한 anthocyanin은 암의 진행 단계에서도 생리적인 억제 효과가 있으며, 다양한 선종 세포 (carcinoma cell)의 기능을 둔화시킨다.^{13,14)} 고 하였다. Anthocyanin을 가수분해하면 당 부분 (단당류, 소당류)과 비당 부분인 anthocyanidin으로 분해된다.¹⁵⁾ 당 부분인 anthocyanidin은 약 20종으로 구분되는데 그 중에서도 delphinidin과 cyanidin은 우수한 항산화력을 보고하고 있다.¹⁶⁾ 이전 연구에서 anthocyanin 중 cyanidin이 인체 유방암 세포 MDA-MB-231 세포의 암 전이 과정 중 이동성과 침윤성의 효과가 관찰되었다.¹⁷⁾ 대부분의 연구에서는 적색 과일이나 채소에서 색소를 추출하여 사용하였으며,^{18,19)} 유방암에서의 암세포 증식과 성장, 세포 사멸에 미치는 영향에 대한 연구는 매우 제한적으로 보고되고 있다. 그러므로, 본 연구에서는 anthocyanin 중에서 항산화력이 뛰어난 delphinidin을 처리하였을 때 전이성인 강한 유방암 세포인 MDA-MB-231 cell의 암세포 성장과 세포사멸에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

연구방법

세포 배양

실험에 사용된 인체 유방암 세포 MDA-MB-231 cell은 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 세포는 습윤한 5% CO₂, 37°C incubator에서 Dulbecco's modified Eagle's medium/Nutrient Mixture Ham's F12 (DMEM/F12, Gibco/BRL, Gaithersburg, MD, USA), 10% FBS, 100 units/ml penicillin, 100 µg/mL streptomycin (Gibco/BRL)이 포함되도록 medium을 만들어 배양하였다.¹⁷⁾ 세포가 80~90% 정도 dish를 덮으면 phosphate buffered saline solution (PBS)으로 2번 씻어내고 trypsin-EDTA (Gibco/BRL)를 처리하여 세포를 모은 후 계대 배양하고 medium은 2~3일마다 교환하였다.²⁰⁾ Delphinidin (Roth, Karlsruhe, Germany)은 dimethyl sulphoxide (DMSO, Fisher scientific)에 100 mM로 stock을 만들어 냉동 보관하여 사용하였고, 대조군을 포함하여 모든 well에는 DMSO의 농도가 동일하게 포함되도록 하였다.

세포 증식

Delphinidin의 첨가 농도 증가에 따른 세포의 성장을 알아

보기 위해 24 well plate에 2.5×10^4 cells/mL의 농도로 plating 하고, 48시간 후에 fetal bovine serum (FBS)을 첨가하지 않은 serum free medium (SFM, 0.1% BSA, 5 µg/mL transferrin, 5 ng/mL selenium, 1,000 units/mL penicillin, 1,000 µg/mL streptomycin, Gibco)으로 medium을 교환하였다. 24시간 serum starvation 시킨 후, SFM에 delphinidin을 0, 5, 10, 20 µmol/L로 처리하여 medium을 교환하였다. Treatment 후 0, 24, 96시간이 경과한 후 MTT assay 방법으로 세포 증식 정도를 측정하였다. MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma]를 1 mg/mL의 농도로 well 당 1 mL씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 3시간 incubation시킨 후 iso-propanol 0.5 mL에 용해시킨 다음 490 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.^{21,22)}

단백질 발현

세포 성장, 세포 사멸과 관련된 단백질 발현을 알아보기 위해 western blot을 실시하였다. MDA-MB-231 cell을 5×10^5 cells/mL의 농도로 100 mm dish에 분주하고 48시간 후에 SFM으로 교환하여 세포를 starvation하였다. 24시간 후 SFM에 delphinidin을 0, 5, 10, 20 µmol/L로 농도로 첨가하여 treatment하였다. 48시간 후에 새로운 treatment 용액으로 교환하고, 24시간 후에 차가운 rinse buffer (PBS, 1 mM PMSF, 1 mM sodium orthovanadate)를 이용하여 세척하고 cell을 모아 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 차가운 lysis buffer (137 mM NaCl, 20 mM Tris-Cl, 1% triton X-100, 10% glycerol, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM PMSF, 20 µg/mL aprotinin, 10 µg/mL antipain, 10 µg/mL leupeptin, 80 µg/mL benzamidine HCl)를 넣어 세포를 파괴한 후, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여, 상층액을 모아 시료로 사용하였다. 단백질을 정량하고 4~20% gradient sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에서 단백질을 분리한 후, immobilon™-P membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)에 4°C, overnight으로 transfer하였다. Membrane은 5% milk/TBST (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.4)로 실온에서 1시간 incubation 한 후 알아보고자하는 단백질의 antibody (EerB2, EerB3, Akt, pAkt, Bcl-2, Bax; Santacruz, USA)를 사용하여 incubation시켰다. TBST로 씻어낸 후 다시 anti-mouse 1 g horseradish peroxidase/TBST 또는 anti-rabbit 1 g horseradish peroxidase/TBST (Amersham Buckinghamshire, England)으로 incubation시켰고, Supersignal^R West Dura extended Duration Substrate (Pierce, IL, USA) 사용하여 발색시킨 후 X-Omat film (Ko-

dak)으로 현상하여 high molecular weight marker (Amersham, England)로 분자량을 비교하여 분석하였다. 각 밴드는 imaging program인 Image J Launcher (Provided by NCBI)를 이용하여 밀도를 측정하였으며, control군의 발현 정도를 100%로 나타낸 후 delphinidin을 처리한 농도별로 control군에 대비하여 결과를 정리하였다. 실험은 독립적으로 3번 반복하여 통계처리하였다.²¹⁾

통계 처리

본 연구의 실험으로 얻어진 결과는 SAS 프로그램을 이용하여 각 실험군의 평균과표준 편차로 계산되었고, 각 군 간의 차이는 ANOVA 분석 후 $\alpha = 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하여 유의성을 검증하였다.¹⁷⁾

결 과

세포 성장 억제 효과 (MTT assay)

인체 유방암 세포인 MDA-MB-231에 delphinidin을 0, 5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$ 로 처리하고 0, 24, 96시간 후에 살아있는 세포를 염색하여 흡광도를 측정하였다. 그 결과 delphinidin을 처리한 후 24시간에는 세포 증식에 delphinidin이 영향을 주지 않았으나, 96시간 후에는 처리 농도가 증가할수록 세포 증식이 억제되었다. Delphinidin을 처리한 96시간 후에는 처리 농도 5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$ 농도에서 control에 비해 8.4%, 20%, 28%로 세포 증식이 유의적으로 억제되었다($p < 0.05$)(Fig. 1).

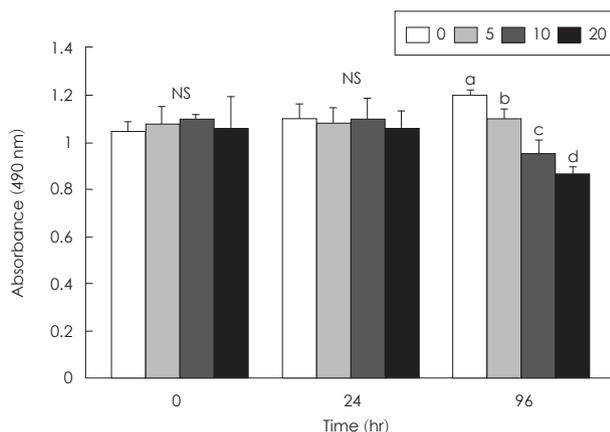


Fig. 1. Effect of delphinidin on cell proliferation in MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells were plated at a density of 2.5×10^4 cells/ml in 24 well plate with DMEM/F12 supplemented with 10% FBS for 48 hour, the monolayers were serum-starved with DMEM/F12 supplemented with 5 $\mu\text{g/mL}$ transferrin, 5 $\mu\text{g/mL}$ selenium, and 1 mg/mL bovine serum albumin for 24 hour. After serum starvation, the monolayer were incubated in serum free medium with 0, 5, 10, 20 μM delphinidin. Viable cell numbers were estimated by the MTT assay. Each bar represents the mean \pm SE from three independent experiments. Comparison among different concentrations of delphinidin that yielded significant differences ($p < 0.05$) are indicated by different letters above each bar.

세포 증식과 관련된 단백질 발현 (Western blot)

세포 증식 신호를 전달하는 EGFR (Epidermal growth factor receptor) heterodimer를 이루어 신호를 받아 전달하는 ErbB2와 ErbB3의 발현으로 delphinidin이 세포 증식에 영향을 미치는지 알아보려고 하였다. ErbB2 단백질의 발현에 delphinidin의 처리 농도가 20 $\mu\text{mol/L}$ 에서 유의적인 감소를 보였다.

Delphinidin을 20 $\mu\text{mol/L}$ 로 처리하였을 때 control에 비해 약 30% 정도 발현이 감소되었다 ($p < 0.05$)(Fig. 2).

ErbB3 발현의 경우 delphinidin의 처리 농도가 5 $\mu\text{mol/L}$ 에서부터 유의적인 감소가 관찰되었다 ($p < 0.05$)(Fig. 3).

EGFR의 신호를 전달받아 세포 증식에 관여하는 Akt 단백질의 발현의 경우 delphinidin의 농도가 5 $\mu\text{mol/L}$ 에서부터 유의적으로 발현이 억제되었다. Akt 단백질 발현의 경우 control에 비해 5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$ 농도에서 81%, 63%, 34%로 발현이 억제되었다($p < 0.05$)(Fig. 4). Akt의 활성형인 p-Akt 역시 delphinidin의 처리 농도가 증가할수록 발현이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다. p-Akt 단백질의 경우 delphinidin을 20 $\mu\text{mol/L}$ 로 처리한 군에서 control에 비해 약 35% 정도 발현이 억제되었다 ($p < 0.05$)(Fig. 5).

세포 사멸 관련 단백질 발현 (Western blot)

세포사멸을 억제하는 단백질인 Bcl-2의 발현은 delphinidin의 처리 농도가 10 $\mu\text{mol/L}$ 에서부터 유의적인 감소를 보였다

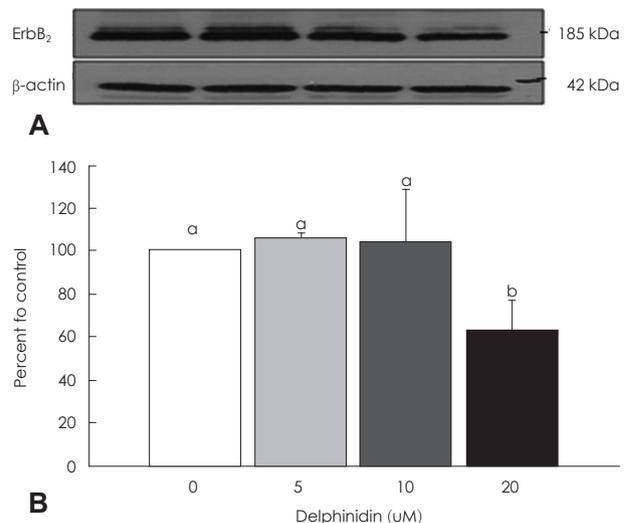


Fig. 2. Effects of delphinidin on ErbB2 expression in MDA-MB-231 cells. Cell lysates were subjected to immunoblotting with an antibody against ErbB2 and β -actin. A: The photographs of chemiluminescent detection of the blots, which were representative of three independent experiments are shown. B: Quantitative analysis of immunoblots. The relative abundance of each band was estimated by densitometric scanning of the exposed films. Each bar represents the mean \pm SE ($n = 3$). Comparisons between groups that yielded significant differences ($p < 0.05$) are indicated by different letters above each bar.

나($p < 0.05$)(Fig. 6), 세포사멸을 유도하는 단백질인 Bax는 delphinidin의 처리에 유의적인 차이가 관찰되지 않았다 ($p < 0.05$)(Fig. 7). 그러나, 세포사멸의 지표로 많이 이용되고 있는

Bcl-2/Bax ratio로 살펴보면 20 $\mu\text{mol/L}$ 에서부터 유의적으로 감소되었으며, control에 비해 50% 이하로 감소되었다 ($p < 0.05$)(Fig. 8).

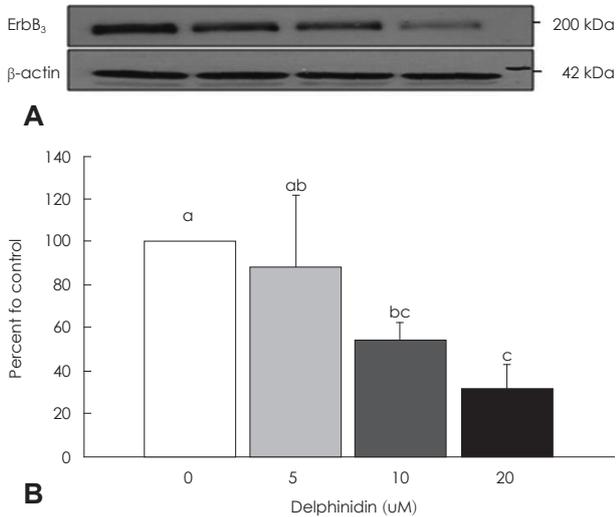


Fig. 3. Effects of delphinidin on ErbB3 expression in MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells were treated with delphinidin for 48 hr as described in Fig. 1. Cell lysates were subjected to immunoblotting with an antibody against ErbB3 and β -actin. A: The photographs of chemiluminescent detection of the blots, which were representative of three independent experiments are shown. B: Quantitative analysis of immunoblots. The relative abundance of each band was estimated by densitometric scanning of the exposed films. Each bar represents the mean \pm SE ($n = 3$). Comparisons between groups that yielded significant differences ($p < 0.05$) are indicated by different letters above each bar.

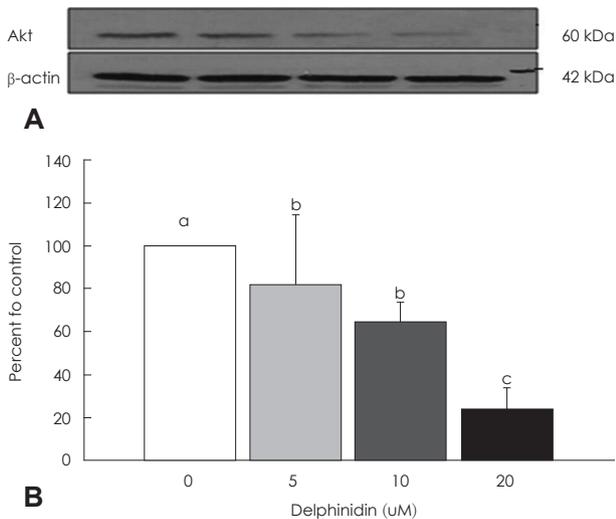


Fig. 4. Effects of delphinidin on Akt expression in MDA-MB-231 cells. Cells were treated as described in Fig. 1 and protein samples were analyzed by immunoblotting with anti-Akt protein antibody or β -actin. A: The photographs of chemiluminescent detection of the blots, which are representative of three independent experiments, are shown. B: Quantitative analysis of immunoblots. The relative change in Akt band on Western blots was quantitated by densitometric analysis. Each bar represents the mean \pm SE ($n = 3$). Comparisons between groups that yielded significant differences ($p < 0.05$) are indicated by different letters above each bar.

고찰

최근 여러 연구에서 천연 식품 성분을 이용하여 선종 단계에서 암 진행 억제 효과 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 연구에서도 과일과 채소에 함유된 천연 색소 성분인 anthocyanin계 delphinidin을 이용하여 전이성이 강한 유방암 세포 MDA-MB-231의 세포 증식과 세포사멸 효과를 관찰해보고자 하였다.

인체 유방암 세포인 MDA-MB-231에 delphinidin을 0, 5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$ 로 처리한 후 96시간 이후에 세포의 성장이 유의적으로 억제되었다(Fig. 1). Katsube 등¹⁴에 따르면 bilberry를 추출하여 인체 promyelocytic leukemia HL-6 세포와 대장암 세포인 HCT-116세포에 bilberry 추출물을 처리한 결과 강력한 성장 억제 효과가 관찰되었으며, Meiers 등²³도 in vitro 실험으로 인체 종양세포에 anthocyanin과 anthocyanidin을 처리하였을 때 종양 세포의 성장이 둔화되었다고 하였다. Zhang 등²⁴은 인체 유방암 세포인 MCF-7에 delphinidin을 처리한 후 MTT assay를 실시한 결과 48시간 후에 50 μM 농도에서 세포의 성장이 억제된 것을 관찰하였고, delphinidin은 MCF-7 인체 유방암 세포의 성장에 강력한 효과가 있다고 보고하였다.

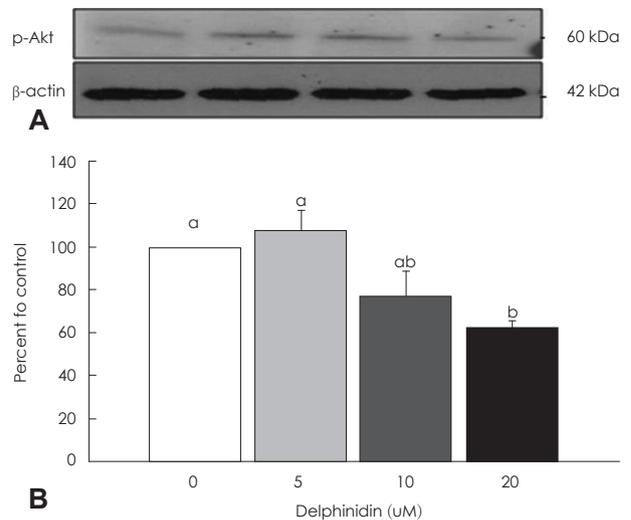


Fig. 5. Effects of delphinidin on p-Akt expression in MDA-MB-231 cells. Cells were treated as described in Fig. 1 and protein samples were analyzed by immunoblotting with antiphospho-Akt protein or β -actin antibody. A: The photographs of chemiluminescent detection of the blots, which were representative of three independent experiments, are shown. B: Quantitative analysis of immunoblots. The relative change in p-Akt band on western blots was quantitated by densitometric analysis. Each bar represents the mean \pm SE ($n = 3$). Comparisons between groups that yielded significant differences ($p < 0.05$) are indicated by different letters above each bar.

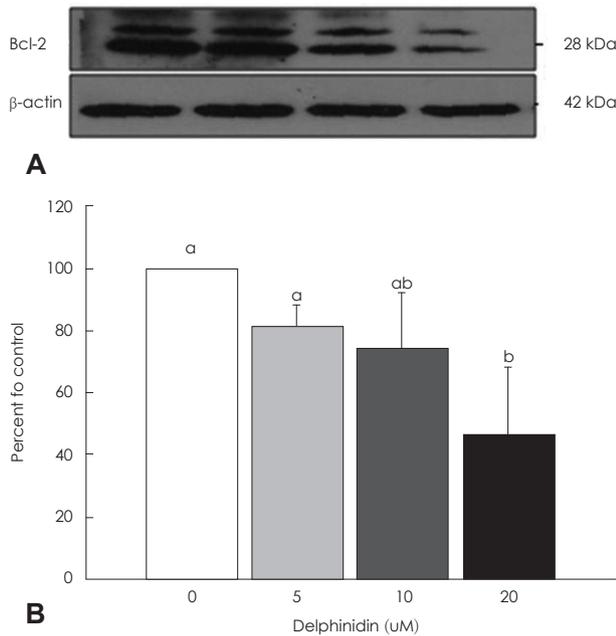


Fig. 6. Effects of delphinidin on Bcl-2 expression in MDA-MB-231 cells. Cells were treated as described in Fig. 1 and protein samples were analyzed by immunoblotting with an Bcl-2 or β -actin antibody. A: photographs of chemiluminescent detection of the blots, which were representative of three independent experiments, are shown. B: quantitative analysis of immunoblots. The relative abundance of each bar was estimated by densitometric scanning of the exposed films. Each bar represents the mean \pm SE (n = 3). Comparisons between groups that yielded significant differences ($p < 0.05$) are indicated by different letters above each bar.

또한, Martin 등²⁵⁾과 Koide 등²⁶⁾의 연구에서도 delphinidin은 암세포의 성장을 억제하였으며 세포 주기의 진행이 delphinidin의 처리 농도에 따라 억제되었다고 하였다. 인체 embryonic fibroblast cell을 기질로 하여 세포 주기 중 S 단계에서 delphinidin을 처리하였을 때 다음 단계인 G2 단계로의 진행이 완전히 차단되었다고 하였다. Marko 등²⁷⁾은 anthocyanidin 중 delphinidin, malvidin, cyanidin, peonidin을 처리하여 IC₅₀을 측정하고 결과 각 처리 물질의 농도가 35~90 μ M에서 종양세포의 성장이 억제되었다고 보고하였다. 이러한 많은 연구 결과들과 본 연구 결과로 볼 때 delphinidin은 암세포의 세포 성장 억제에 강력한 효과가 있는 것으로 보여진다.

Epidermal growth factor receptor (EGFR) 과발현은 암의 증후가 악화되었을 때 표현되는 지표로 암 예방과 치료에 중요한 목표 중 하나이다.^{28,29)} EGFR family에는 ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4가 있으며, 인산화되면서 성장신호를 전달하여 tyrosine kinase가 활성화된다. 인체 유방암 환자의 약 67%에서 EGFR family 중 하나 또는 그 이상의 유전자 부호의 과발현이나 변형이 관찰되었으며,³⁰⁾ 인체 유방암의 20~30%에서 EGFR1과 EGFR2의 과발현이 관찰되었고, EGFR1의 과발현은

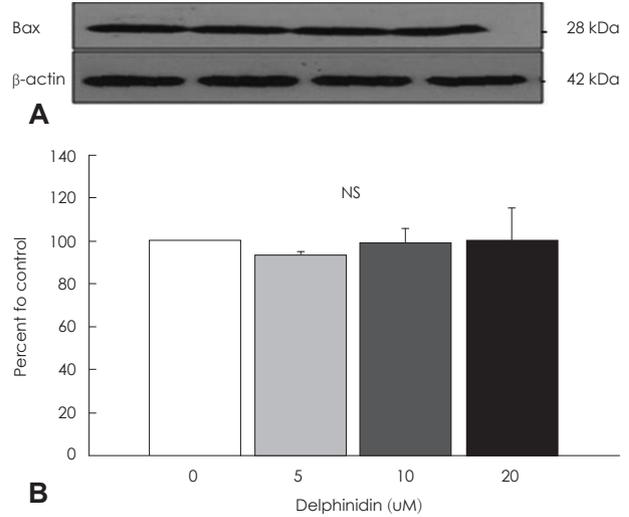


Fig. 7. Effects of delphinidin on Bax expression in MDA-MB-231 cells. Cells were treated as described in Fig. 1 and protein samples were analyzed by immunoblotting with an Bax or β -actin antibody. A: photographs of chemiluminescent detection of the blots, which were representative of three independent experiments, are shown. B: quantitative analysis of immunoblots. The relative abundance of each bar was estimated by densitometric scanning of the exposed films. Each bar represents the mean \pm SE (n = 3). Comparisons between groups that yielded significant differences ($p < 0.05$) are indicated by different letters above each bar.

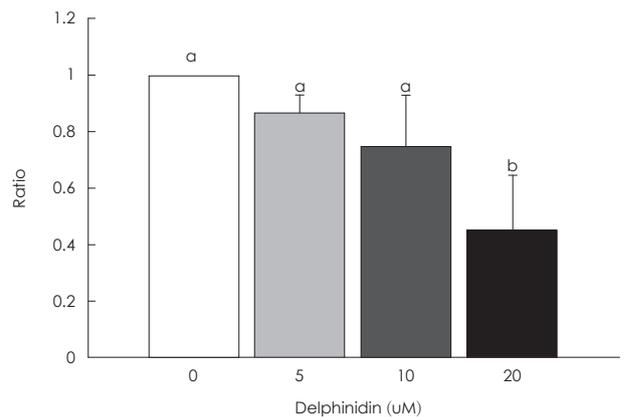


Fig. 8. Effects of delphinidin on Bcl-2/Bax ratio in MDA-MB-231 cells. Each bar represents the mean \pm SE (n = 3). Comparisons between groups that yielded significant differences ($p < 0.05$) are indicated by different letters above each bar.

estrogen 작용이 낮아지는 것과 높은 관련성이 있다고 하였다.³¹⁻³³⁾ De Potter 등³⁴⁾과 Gusterson 등³⁵⁾에 따르면 암 발전에 종양을 더 악화시키는 데에는 epidermal growth factor (EGF)가 관여한다고 하였다. 세포 외 성장 관련 리간드 (ligand)와 결합하는 EGFR family는 세포 내 신호전달 경로와 연결되어 증식, 분화, 세포의 이동성, 생존 등 여러 생물학적 작용을 조절한다. 그 중 ErbB2는 ErbB3와 heterodimer를 이루어 인산화되어 세포 내로 신호를 전달하게 된다.³⁶⁻³⁸⁾ EGFR family의 과발현이나 변형도 다양한 인체 종양의 발암 과정에 중요하게

작용하며, 암환자의 악화된 증상과 관련이 있다고 하였다.³⁶⁾

Graus-Porta 등³⁹⁾의 연구에서는 ErbB2와 결합하는 ErbB3가 결합된 경우 이중 이성화 (heterodimerization)나 인산화 전이과정의 활성화되지 못해 세포 내로의 신호전달이 원활하지 못하였다고 보고하였다. Meiers 등²³⁾에 따르면 anthocyanidin인 cyanidin과 delphinidin은 EGFR의 tyrosine kinase 활성화에 강력한 억제자로 EGFR 감소는 연속적으로 신호전달을 받는 MAPK (Mitogen-activated protein kinases)의 활성을 효과적으로 둔화시킨다고 하였다. 그 외 다른 연구⁴⁰⁾에서도 delphinidin을 뛰어난 EGFR의 억제제로 연속적 신호전달을 억제하는 효과가 있다 하였고, 전사인자 Elk1의 인산화로 측정된 MAPK 활성도 억제되었다고 하였다. 본 연구에서도 delphinidin의 처리 농도가 증가될수록 ErbB2, ErbB3의 발현이 대조군에 비해 유의적으로 감소되었다. 또한, 세포성장 신호 경로 중 EGFR 신호를 전달받는 Akt의 발현에서도 본 연구의 delphinidin 처리 농도 중 가장 저농도인 5 μ M에서 유의적으로 발현이 억제된 것으로 볼 때, delphinidin은 유방암 세포성장 중 EGFR의 발현을 억제하여 연속적인 신호 전달을 받는 Akt의 발현과 신호 전달에 매우 강력한 억제제로 작용한다고 할 수 있다.

세포사멸 또는 계획된 세포 죽음은 중앙 억제 및 치료에 중요 기전이며, 일반적으로 세포성장과 세포사멸의 장애나 이상으로 정상세포가 빠르게 preplastic 또는 neoplastic 세포로 성장하여 암으로 발전하게 된다. 세포사멸 또는 세포 주기의 제어는 인체를 선종으로 진행하거나 발전시키고 신생물 또는 신생물로의 진행 전이나 손상으로부터 보호하는데 뛰어난 방법이라 하였다.⁴¹⁻⁴³⁾ Bax와 Bcl-2유전자는 세포사멸 경로에서 중요한 작용자로 고려되어지고 있다.^{44,45)} Bcl-2는 Bcl-x family 중 하나로 세포사멸로부터 세포를 억제하는 역할을 하며, 여러 연구에서 세포사멸에서의 Bcl-2는 Bax에 의해 영향을 받는 것으로 나타났다. Bcl-2는 homodimer로 세포사멸을 억제하는 유전자이며, Bax는 세포사멸을 유도하는 유전자로 알려져 있다. 이러한 두 유전자의 발현이 세포죽음이나 생존을 결정하는데 중요하게 작용한다.⁴⁶⁾ Afaq 등⁴⁶⁾은 HaCat 세포에 delphinidin을 처리하였을 때 세포사멸을 유도하는 Bax는 유의적으로 감소하고, 세포사멸을 억제하는 Bcl-2는 증가하였으며, Bax/Bcl-2 비율은 세포사멸을 유도하지 않는 방향으로 변화되었다고도 하였다. 그러나 대부분의 연구에서 anthocyanidin의 처리는 세포사멸을 효과적으로 유도하는 것으로 나타났다. Lazzè 등⁴⁷⁾은 자궁암 세포인 HeLa에 delphinidin을 100, 150, 200 μ M 농도로 처리하여 A.I. (apoptotic index)를 통해 세포사멸을 측정된 결과, delphinidin의 농도가 증가함에 따라 각각 25.4, 35.5, 40.6% 세포사멸이 유도되었다고 하였다. Katsu-

be 등²³⁾도 인체 leukemia 세포 HL-60에 베리에서 추출한 anthocyanidin계 delphinidin을 처리한지 6시간 후, 세포사멸이 유도되었고 하였고, Shih 등⁴⁸⁾은 인체 adenocarcinoma 세포인 AGS에 anthocyanidin 중 malvidin을 처리한 결과, 처리 농도에 따라 Bax/Bcl-2 비율이 상승되었다고 하였다. 본 연구결과에서도 delphinidin은 세포사멸을 억제하는 Bcl-2를 유의적으로 억제하였고, Bcl-2/Bax 비율에서는 delphinidin을 20 μ mol/L로 처리하였을 때부터 유의적으로 감소된 것으로 볼 때, anthocyanin계 delphinidin은 인체 유방암 세포인 MDA-MB-231 세포의 세포사멸을 유도하는 것으로 사료된다.

이상의 결과들을 종합해보면, 인체 유방암 세포인 MDA-MB-231에서 delphinidin은 암세포의 증식을 억제하고, 세포사멸을 유도하는 것으로 사료되며, 이는 delphinidin 등의 색소 성분을 이용한 기능성식품 개발 가능성을 제시하는 것으로 앞으로 동물과 인체를 대상으로 하는 더 많은 연구 진행이 요구되어진다.

요약 및 결론

본 연구는 식물의 대표적인 색소 성분인 anthocyanin계 색소 중 delphinidin이 인체 유방암 세포 MDA-MB-231에서 암세포의 성장과 증식, 세포사멸에 미치는 영향을 알아보고자 실시되었다. 실험 결과 delphinidin의 첨가량이 증가할수록 세포성장이 억제되었다. Delphinidin은 세포 증식 경로에 관여하는 ErbB2와 ErbB3의 발현을 억제하였고, 연속적인 신호 전달을 받는 Akt의 발현이나 이들 유전자의 mRNA 수준에서도 발현이 억제되었다. 또한 세포사멸에도 delphinidin은 유의적으로 뚜렷하게 세포사멸을 유도하는 것이 관찰되었다. 결론적으로, delphinidin은 인체 유방암 세포인 MDA-MB-231에서 암세포의 증식을 억제하고 세포사멸을 유도하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

Literature cited

- 1) National Health Insurance Service (KR). Analysis of cancer patients in 2008 [Internet]. Seoul: National Health Insurance Service; 2010 [cited 2010 Jun 5]. Available from: <http://www.nhis.or.kr/cms/board/board/Board.jsp?act=VIEW&communityKey=B0070&boardId=20108>
- 2) National Cancer Information Center (KR). Types of breast cancer [Internet]. Goyang: National Cancer Information Center; 2013 [cited 2013 February 1]. Available from: http://www.cancer.go.kr/mbs/cancer/jsp/cancer/cancer.jsp?cancerSeq=4757&menuSeq=4761&viewType=all&id=cancer_020112000000
- 3) Korean Breast Cancer Society. Breast cancer facts & figures 2006-2008. Seoul: Korean Breast Cancer Society; 2008
- 4) Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoid-

- dable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 1981; 66(6): 1191-1308
- 5) Wu C, Ray RM, Lin MG, Gao DL, Horner NK, Nelson ZC, Lampe JW, Hu YW, Shannon J, Stalsberg H, Li W, Fitzgibbons D, Porter P, Patterson RE, Satia JA, Thomas DB. A case-control study of risk factors for fibrocystic breast conditions: Shanghai Nutrition and Breast Disease Study, China, 1995-2000. *Am J Epidemiol* 2004; 160(10): 945-960
 - 6) Magee PJ, McGlynn H, Rowland IR. Differential effects of isoflavones and lignans on invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro. *Cancer Lett* 2004; 208(1): 35-41
 - 7) Schley PD, Jijon HB, Robinson LE, Field CJ. Mechanisms of omega-3 fatty acid-induced growth inhibition in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 92(2): 187-195
 - 8) Klass CM, Shin DM. Current status and future perspectives of chemoprevention in head and neck cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2007; 7(7): 623-632
 - 9) Lila MA. From beans to berries and beyond: teamwork between plant chemicals for protection of optimal human health. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1114: 372-380
 - 10) Harborne JB. Comparative biochemistry of the flavonoids. New York (NY): Academic Press; 1967
 - 11) Bae EA, Moon GS. A study on the antioxidative activities of Korean soybeans. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 1997; 26(2): 203-208
 - 12) Ding M, Feng R, Wang SY, Bowman L, Lu Y, Qian Y, Castranova V, Jiang BH, Shi X. Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. *J Biol Chem* 2006; 281(25): 17359-17368
 - 13) Hou DX. Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins. *Curr Mol Med* 2003; 3(2): 149-159
 - 14) Katsube N, Iwashita K, Tshushida T, Yamaki K, Kobori M. Induction of apoptosis in cancer cells by Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *J Agric Food Chem* 2003; 51(1): 68-75
 - 15) Yoon TH, Lee SW. Stability of anthocyanins in foods. *Korean J Food Sci Technol* 1979; 11(1): 63-73
 - 16) Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 2003; 64(5): 923-933
 - 17) Chu SK, Seo EY, Kim WK, Kang NE. Effect of cyanidin on cell motility and invasion in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Korean J Nutr* 2008; 41(8): 711-717
 - 18) Li L, Adams LS, Chen S, Killian C, Ahmed A, Seeram NP. Eugenia jambolana Lam. Berry extract inhibits growth and induces apoptosis of human breast cancer but not non-tumorigenic breast cells. *J Agric Food Chem* 2009; 57(3): 826-831
 - 19) Hui C, Bin Y, Xiaoping Y, Long Y, Chunye C, Mantian M, Wenhua L. Anticancer activities of an anthocyanin-rich extract from black rice against breast cancer cells in vitro and in vivo. *Nutr Cancer* 2010; 62(8): 1128-1136
 - 20) Weng MS, Ho CT, Ho YS, Lin JK. Theanaphthoquinone inhibits fatty acid synthase expression in EGF-stimulated human breast cancer cells via the regulation of EGFR/ErbB-2 signaling. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 218(2): 107-118
 - 21) Seo EY, Lee HS, Kim WK. Effect of [6]-gingerol on inhibition of cell proliferation in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Korean J Nutr* 2005; 38(8): 656-662
 - 22) Landesberg R, Cozin M, Cremers S, Woo V, Kousteni S, Sinha S, Garrett-Sinha L, Raghavan S. Inhibition of oral mucosal cell wound healing by bisphosphonates. *J Oral Maxillofac Surg* 2008; 66(5): 839-847
 - 23) Meiers S, Kemény M, Weyand U, Gastpar R, von Angerer E, Marko D. The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth-factor receptor. *J Agric Food Chem* 2001; 49(2): 958-962
 - 24) Zhang Y, Vareed SK, Nair MG. Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. *Life Sci* 2005; 76(13): 1465-1472
 - 25) Martin S, Andriambelosen E, Takeda K, Andriantsitohaina R. Red wine polyphenols increase calcium in bovine aortic endothelial cells: a basis to elucidate signalling pathways leading to nitric oxide production. *Br J Pharmacol* 2002; 135(6): 1579-1587
 - 26) Koide T, Hashimoto Y, Kamei H, Kojima T, Hasegawa M, Terabe K. Antitumor effect of anthocyanin fractions extracted from red soybeans and red beans in vitro and in vivo. *Cancer Biother Radiopharm* 1997; 12(4): 277-280
 - 27) Marko D, Puppel N, Tjaden Z, Jakobs S, Pahlke G. The substitution pattern of anthocyanidins affects different cellular signaling cascades regulating cell proliferation. *Mol Nutr Food Res* 2004; 48(4): 318-325
 - 28) Sainsbury JR, Malcolm AJ, Appleton DR, Farndon JR, Harris AL. Presence of epidermal growth factor receptor as an indicator of poor prognosis in patients with breast cancer. *J Clin Pathol* 1985; 38(11): 1225-1228
 - 29) Sainsbury JR, Farndon JR, Needham GK, Malcolm AJ, Harris AL. Epidermal-growth-factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer. *Lancet* 1987; 1(8547): 1398-1402
 - 30) Koenders PG, Beex LV, Geurts-Moespot A, Heuvel JJ, Kienhuis CB, Benraad TJ. Epidermal growth factor receptor-negative tumors are predominantly confined to the subgroup of estradiol receptor-positive human primary breast cancers. *Cancer Res* 1991; 51(17): 4544-4548
 - 31) Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235(4785): 177-182
 - 32) Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, Press MF. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244(4905): 707-712
 - 33) Toi M, Osaki A, Yamada H, Toge T. Epidermal growth factor receptor expression as a prognostic indicator in breast cancer. *Eur J Cancer* 1991; 27(8): 977-980
 - 34) De Potter CR, Beghin C, Makar AP, Vandekerckhove D, Roels HJ. The neu-oncogene protein as a predictive factor for haematogenous metastases in breast cancer patients. *Int J Cancer* 1990; 45(1): 55-58
 - 35) Gusterson BA, Machin LG, Gullick WJ, Gibbs NM, Powles TJ, Elliott C, Ashley S, Monaghan P, Harrison S. c-erbB-2 expression in benign and malignant breast disease. *Br J Cancer* 1988; 58(4): 453-457
 - 36) Sweeney C, Fambrough D, Huard C, Diamonti AJ, Lander ES, Cantley LC, Carraway KL 3rd. Growth factor-specific signaling pathway stimulation and gene expression mediated by ErbB receptors. *J Biol Chem* 2001; 276(25): 22685-22698
 - 37) Crovello CS, Lai C, Cantley LC, Carraway KL 3rd. Differential signaling by the epidermal growth factor-like growth factors neuregulin-1 and neuregulin-2. *J Biol Chem* 1998; 273(41): 26954-26961
 - 38) Tzahar E, Pinkas-Kramarski R, Moyer JD, Klapper LN, Alroy I, Levkowitz G, Shelly M, Henis S, Eisenstein M, Ratzkin BJ, Sela M, Andrews GC, Yarden Y. Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network. *EMBO J* 1997; 16(16): 4938-4950
 - 39) Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* 1997; 16(7): 1647-1655
 - 40) Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion

- blocks apoptosis. *Cell* 1997; 88(4): 435-437
- 41) Meyskens FL Jr, Szabo E. Diet and cancer: the disconnect between epidemiology and randomized clinical trials. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(6): 1366-1369
- 42) Ramos S, Alía M, Bravo L, Goya L. Comparative effects of food-derived polyphenols on the viability and apoptosis of a human hepatoma cell line (HepG2). *J Agric Food Chem* 2005; 53(4): 1271-1280
- 43) Heo HJ, Lee CY. Strawberry and its anthocyanins reduce oxidative stress-induced apoptosis in PC12 cells. *J Agric Food Chem* 2005; 53(6): 1984-1989
- 44) Tessitore L, Davit A, Sarotto I, Caderni G. Resveratrol depresses the growth of colorectal aberrant crypt foci by affecting bax and p21(CIP) expression. *Carcinogenesis* 2000; 21(8): 1619-1622
- 45) Bunz F, Hwang PM, Torrance C, Waldman T, Zhang Y, Dillehay L, Williams J, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J Clin Invest* 1999; 104(3): 263-269
- 46) Afaq F, Syed DN, Malik A, Hadi N, Sarfaraz S, Kweon MH, Khan N, Zaid MA, Mukhtar H. Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, protects human HaCaT keratinocytes and mouse skin against UVB-mediated oxidative stress and apoptosis. *J Invest Dermatol* 2007; 127(1): 222-232
- 47) Lazzè MC, Savio M, Pizzala R, Cazzalini O, Perucca P, Scovassi AI, Stivala LA, Bianchi L. Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines. *Carcinogenesis* 2004; 25(8): 1427-1433
- 48) Shih PH, Yeh CT, Yen GC. Effects of anthocyanidin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells. *Food Chem Toxicol* 2005; 43(10): 1557-1566