



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

감귤 콤부차 발효액의
인체 방광암세포에 대한 성장억제와
Apoptosis에 미치는 영향

濟州大學校 大學院

食品營養學科

金 淸 이

2015 年 8月

감귤 콤부차 발효액의
인체 방광암세포에 대한
성장억제와 Apoptosis에 미치는
영향

指導教授 朴 晟 秀

金 淸 伊

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2015 年 6 月

金淸伊 의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ (印)

委 員 _____ (印)

委 員 _____ (印)

濟州大學校 大學院

2015 年 6月

Impact of citrus fermented broth with
Kombucha on growth inhibition and Apoptosis
in human bladder cancer cells

Chung-I Kim

(Supervised by professor Sung-Soo Park)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE

2015. 8.

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE&NUTRITION
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

Abstract	III
List of Abbreviations	V
List of Table	VI
List of Figures	VII
I. 서 론	1
II. 이론적 배경	3
1. 콤부차	3
2. 방광암	4
3. Apoptosis	5
III. 재료 및 방법	7
1. 콤부차 배양 및 시료처리	7
2. 실험방법	10
1) 세포 배양	10
2) 항산화 실험 및 총 페놀함량 측정	10
3) 세포 생존력 측정(MTT assay)	11
4) 세포 이동성에 미치는 영향(Scratch-wound assay)	11
5) Annexin V 측정(FACS analysis)	12
6) Apoptosis 관련 단백질 발현(Western blot assay)	12
3. 통계 분석	13
IV. 결과	14

1. 항산화 실험 및 총 페놀함량 측정	14
1) K, CK DPPH, ABTS radical 소거능력	15
2) K, CK 총페놀함량 측정	16
2. 세포 생존력 측정(MTT assay)	17
1) Raw 264.7세포 성장억제 효과	18
2) T24세포 성장억제 효과	20
3) 5637세포 성장억제 효과	21
3. 세포 형태 변화	22
1) T24세포 형태 변화	23
2) 5637세포 형태 변화	24
4. 세포 이동성에 미치는 영향(Scratch-wound assay)	25
1) T24세포 이동성에 미치는 영향	26
2) 5637세포 이동성에 미치는 영향	27
5. Annexin V 측정(FACS analysis)	28
1) T24세포 Annexin V측정	29
2) 5637세포 Annexin V측정	30
6. Apoptosis 관련 단백질 발현(western blot assay)	31
1) T24세포 Apoptosis 관련 단백질 발현	32
2) 5637세포 Apoptosis 관련 단백질 발현	33
V. 고찰	34
VI. 요약 및 결론	37
VII. 참고문헌	39
국문초록	44

<Abstract>

**Impact of citrus fermented broth with Kombucha on growth inhibition
and Apoptosis in human bladder cancer cells**

Chung-I Kim

Department of Food Science&Nutrition Graduate School

Jeju National University

Supervised by Professor Sung-Soo Park

In this study, we produced cultured Citrus Kombucha (CK) by adding citrus rich in various flavonoids and other functional substances expecting these substances enhance bioactivity of Kombucha (K) known as Teekwass. The purpose of this study is to assess the anticancer activity and anti-oxidant effect of CK compared to K and to screen natural substances showing anti-proliferation activity of cancers utilizing two different bladder cancer cell lines (T24 and 5637).

In order to evaluate these effects, we measured anticancer activities including anti-oxidant effect, cell cytotoxicity, cellular morphology changes, suppression of migration, Annexin V measurements, and apoptosis. Anti-oxidant effect and poly-phenol contents was higher in CK compared to K. Measurement of anti-proliferation effect of CK compared to K in T24 and 5637 cells using MTT after 24h showed that CK treated cells were suppressed more than K in a concentration dependent manner. Especially, T24 cells treated with 6 and 8 mg/ml of CK resulted in lower viability of 19.49% and 13.44, respectively. Anti-proliferation effect of CK or K was higher in T24 than 5637 cells. Cellular morphology change was identified in T24 cells treated with CK of 6

and 8mg/ml. Cell migration was suppressed in T24 by treatments of CK and K dose dependently. However, the suppression activity was higher in CK-treated cells than K. In addition, migration of 5637 cells was only inhibited at 8mg/ml of K compared to CK being inhibited dose dependently. However, inhibitory activity of migration was lower than T24 cells. Annexin V was measured to determine the rate of apoptosis at the initial stage. The rate was evaluated to be 97% in T24 treated with 8 mg/ml of CK. Meanwhile, it was low in 5637 treated with either K or CK. In order to measure apoptosis-related protein, Western blots were performed for T24 and 5637 cells treated with K and CK under various concentrations. Neither T24 nor 5637 treated with K showed significant differences in anti-apoptotic or pro-apoptotic proteins or in caspases. Interestingly, T24 treated with 6 mg/ml and 8 mg/ml CK resulted in decreased bcl-2 (anti-apoptosis), decreased caspases including pro caspase-9, pro caspase-8, and pro caspase-3, and increased cleaved caspase-9, cleaved caspase-8, and cleaved caspase-3. also cleaved PARP band was increased which is indicating proteolytic cleavage of PARP.

Taken together, Citrus Kombucha(CK) containing citrus juice was more effective in generating caspase-induced apoptosis of the human bladder cancer cell T24, than Kombucha(K). CK had greater antioxidant capacity and a higher phenol content than K. Treatment with K or CK had no anti-cancer effect in the bladder cancer cell, 5637, which is more malignant than T24, but inhibited growth of Non-Muscle Invasive Bladder Cancer (T24) and generated expression of proteins related to the induction of apoptosis; therefore, CK is expected to be a good natural substance effective in inhibiting growth of bladder cancer at its initial stage and in preventing bladder cancer. Further research should be conducted to determine anti-cancer effects of CK in other human cancer cells treated with CK.

List of Abbreviations

Abbreviation	Full name
K	Kombucha
CK	Citrus Kombucha
PBS	Phosphate buffer saline
PARP	Poly ADP-ribose polymerase
DMSO	Dimethyl sulfoxide
FBS	Fetal Bovine Serum
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
ABTS	2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonicacid
FACS	Fluorescence activated cell sorter
BCA	Bicinchoninic acid
ECL	enhanced chemiluminescent
TBS-T	Tris Buffered Saline-Tween 20
SD	Standard deviation

List of Table

Table 1. Antibodies used in Western blot analysis	13
Table 2. Antioxidative activity of Kombucha and Citrus Kombucha. ...	15
Table 3. Total phenolics contents of Kombucha and Citrus Kombucha.	16

List of Figures

Figure 1. flow diagram of the main molecular pathways leading to Apoptosis.....	6
Figure 2. A flow diagram for Kombucha.....	7
Figure 3. A flow diagram for Citrus Kombucha.....	8
Figure 4. Samples of Kombucha and Citrus Kombucha beverage.....	8
Figure 5. Effect of Kombucha and Citrus Kombucha on Raw 264.7 cell viability.....	17
Figure 6. Effect of Kombucha and Citrus Kombucha of the bladder cancer cell(T24) viability.....	19
Figure 7. Effect of Kombucha and Citrus Kombucha of the bladder cancer cell(5637) viability.....	20
Figure 8. Effect of Kombucha on morphological change of bladder cancer cell(T24).....	21
Figure 9. Effect of Citrus Kombucha on morphological change of bladder cancer cell(T24).....	21
Figure 10. Effect of Kombucha on morphological change of bladder cancer cell(5637).....	22
Figure 11. Effect of Citrus Kombucha on morphological change of bladder cancer cell(5637).....	22
Figure 12. This show that scratch wound assay on the bladder cancer cell(T24) treated Kombucha after 24hr.....	26
Figure 13. This show that scratch wound assay on the bladder cancer cell(T24) treated Citrus Kombucha after 24hr.....	26
Figure 14. This show that scratch wound assay on the bladder cancer cell(5637) treated Kombucha after 24hr.....	27

Figure 15. This show that scratch wound assay on the bladder cancer cell(5637) treated Citrus Kombucha after 24hr.....	27
Figure 16. Effect of Kombucha and Citrus Kombucha on T24 cell apoptosis %.....	27
Figure 17. Effect of Kombucha and Citrus Kombucha on 5637 cell apoptotsis %.....	28
Figure 18. Effect of Kombucha and Citrus Kombucha on T24 cell Apoptosis related protein Expression.....	30
Figure 19. Effect of Kombucha and Citrus Kombucha on 5637 cell Apoptosis related protein Expression.....	31

I. 서론

전 세계적으로 암 발병률이 꾸준히 증가하고 있으며 2013년 통계청의 한국인 주요 사망원인 보고에 따르면 한국 3대 사망원인이 암, 뇌혈관 질환, 심장질환으로 보고되고 있다. 또한 세계 보건기구 산하 국제암연구소의 보고에 따르면 암 사망의 30%는 흡연에 의해, 30%는 식이요인에 의해, 18%는 만성감염에 기인한다고 하며, 그밖에 직업, 유전, 음주, 생식요인 및 호르몬, 방사선, 환경오염 등의 요인도 각각 1-5%정도 기여하고 있는 것으로 알려져 있다(1).

그 중 방광암은 우리나라에서 2012년 남성기준 10대 암 중 아홉 번째로 높은 암으로 꼽혔으며 방광암 치료를 위한 수술, 약물요법, 항암치료의 부작용으로 소화기계, 비뇨기계 감염 및 혈액계, 감각계 합병증 및 골수억제, 백혈구 감소, 전신적인 부작용이 있다고 보고되고 있다.

최근에는 항암, 항산화 등의 생리활성을 갖는 천연물에 대한 연구가 많이 진행되고 있으며 천연물에서 발견한 화합물들이 암세포의 Apoptosis를 유도하여 항암효과를 나타낸다는 연구결과와(2), flavonoids와 polyphenol과 같은 phytochemical이 암세포 증식 억제 및 암세포 전이의 억제에 관련된 연구가 진행되고 있고(3)(4), Phytochemical에 의한 암 치료와 더불어 주변에서 흔히 접할 수 있는 천연물 소재를 찾아 원료로 사용하여 새로운 용도 및 부가가치 향상을 위한 연구 개발이 요구되고 있다(5).

감귤은 정균 및 항균작용을 나타내는 플라보노이드화합물(6), 알칼로이드 및 비타민 계열의 성분이 항산화 작용, 암 예방 효과와 지질과산화물 형성을 억제하며 노화지연 등의 역할 및 항염증 효과, 모세혈관 보호, 콜레스테롤을 낮춰주는 헤스페리딘(hesperidin)같은 다양한 활성이 있는 것으로 알려져 있고(7)(8)(9)(10) 이러한 감귤류에 naringin, hesperidin, neohesperidin, rutin, nobiletin, tangeretin 등이 함유되어 있는 감귤류에 플라보노이드는 암세포 증식억제에 의한 항암작용, 노화 및 질병의 원인이 되는 생체 내 지질 과산화를 억제하는 항산화 작용 등 다양한 생리활성이 확인되었다(11).

콤부차는 국내에서 홍차버섯이라고 알려진 발효음료로 해독작용과 항균활성 및 항산화 활성이 높다고 알려져 있다.

콤부차를 배양 할 때에 홍차, 녹차, 우롱차 등을 사용 하고 있는데 그 중 녹차는 홍차나 우롱차와 같은 발효차에 비해 차 카테킨 함량이 높다고 보고되고 되며

(12) 차 카테킨은(Tea Catechin) 식품이 변질되는 것을 방지하기 위해 산화 방지제로 사용되며 체중, 허리둘레, 신체질량지수 등 혈중지질 성분이 저하된다고 보고되고 있다(13). 이에 콤부차 배양 시 녹차 추출물을 이용하고, 감귤액을 콤부차 배양 시에 첨가해 감귤의 생리활성 물질이 콤부차로의 이행효과를 기대하여 콤부차와 감귤액을 첨가한 콤부차의 항산화능력과 페놀함량을 확인하고, 천연물 소재로부터 방광암 세포 증식을 억제하며 Apoptosis에 어떠한 영향을 미치는지 조사 하고 더 나아가 건강기능성 소재로서의 가치를 확인 해보기 위해 연구를 진행하고자 하였다.

II. 이론적 배경

1. 콤부차(Kombucha)

콤부차는 홍차 추출액에 균총을 넣어 발효시킨 러시아의 전통 발효음료로 알려진 음료 중 하나로(14) 독일, 프랑스 및 북아프리카 지역에서 세계 2차 대전 이후 널리 대중화 되었고 미국에서는 콤부차가 갖고 있는 상쾌한 맛과 해독작용, 만성피로, 변비 등 건강증진 및 의학적 치료효과와(15) 관절염의 통증 완화, 혈압을 낮추고 T세포의 증가, 변비 완화, 소화기나 대사성 질환에 효과가 있다고 보고되며(15)(16)(17)(18), glucuronic acid, vitamin B1, B2, B6와 항균활성이 있는 usnic acid 등의 성분과 항산화활성에 효능이 있다고 알려져 있다(19).

콤부차 에서 관찰되는 *Acetobacter sp*로는 *Acetobacter Xylinum*이 대표적이며, 그 외에는 *Saccharomyces sp.*, *Zygosaccharomyces sp.*, *Torulopsis sp.*, *Pichia sp.*, *Brettanomyces sp.* 와 같은 yeast 들이 존재 한다(20),(21).

콤부차 발효에서 *Acetobacter sp.* 와 yeast는 서로 공생관계에 있으며, 이들 균주가 동시에 상호작용하며 발효가 진행되어 acetic acid, glucuronic acid, amino acids, cellulose pellicle 등을 생산하는 것으로 보고되었으며(22) 최근 콤부차 관련 연구에서는 전립선암 신생혈관 하향조절의 효과(23)와 간세포에서의 독성물질 예방(24) 등의 효과가 있다고 알려져 있다.

또한 현재 전 세계적으로 콤부차가 시판되어 음용하고 있으며, 국내 언론에서 도 콤부차 및 배양 방법 소개 등 집에서 많이 배양해서 음용되고 있는 것으로 알려져 있다.

2. 방광암

방광암은 우리나라 2012년도 기준 남성의 주요 암 발생 현황에서 아홉 번째로 높은 암이며 2013년에는 사망자 975명으로 10대 암에서 2.1%에 사망분율로 보고되며 여성보다 남성의 방광암 발병률이 높아 여성의 2.5배로 보고되고 있다 (1). 방광암의 요인으로는 정확한 원인에 대해서는 알려져 있지 않지만 연령, 흡연, 화학 약품의 노출 감염 및 방광결석 등 방광암의 위험 인자로 알려져 있으며 수술 후에도 재발 확률이 높은 것으로 알려져 있다(25).

방광암의 진행단계는 방광 근육의 침범 범위에 따라 비근침윤성(표재성)방광암과 근침윤성 방광암 그리고 전이방광암으로 구분되며, 비근침윤성 방광암의 형태는 방광 안쪽으로 튀어나온 형태로 방광암 중에서 가장 많이 진단받는 형태이다. 또한 전이가 쉽지만 수술 시 60~80%의 재발률을 보이며 근침윤성 방광암으로 진행되기 때문에 비근침윤성(표재성) 방광암은 조기 진단과 적절한 치료 후에 추적 관찰과 치료가 중요하다고 보고되고 있다(26).

암세포가 방광의 근육층 이상을 침범한 근침윤성 방광암은 근육층을 뚫고 자라 주위 조직으로 침윤하여 전이되는 암으로 알려져 있으며, 마지막 단계인 전이암은 방광암 진단 시 이미 다른 장기로 퍼진 상태를 의미하는 암으로 이렇게 세 단계로 방광암은 구분되어 진다(1).

3. Apoptosis

세포가 죽는 과정은 크게 두 가지 경로로 세포괴사(necrosis)와 세포 사멸(apoptosis)이 있다. 세포 괴사는 세포에 자극을 주면 세포 밖에 수분이 유입되어 부풀어 오르다가 파괴되는 것으로 염증반응이 동반되며, 세포사멸은 내부적 요인 또는 외부 자극에 의해 세포가 스스로 사멸함으로써 핵이 조각나고 세포가 조각나 식세포가 그 조각을 삼킴으로 염증 반응 없이 세포사가 진행 된다(27).

즉 세포가 신체에서 필요가 없거나 그 세포의 존재가 유기체 전체의 건강을 위협하는 등 여러 가지 경우에 시작 된다(28),(29).

세포사멸 과정 중 Caspase(Cysteine aspartate-specific protease)는 세포자살로 죽어가는 세포에서 많은 생화학 및 구조적인 변화에 영향을 미치며 여러 유전자와 발현 단백질들에 의해 조절되어 일어나는 능동적인 사멸로 알려져 있다.

또한 위험요인을 가지고 있는 세포를 정상적인 세포들로부터 제거하여 조직의 항상성을 유지하게 하여 중요한 역할을 한다(30).

Apoptosis 기전에서 세포의 사멸을 억제하는 기능 anti-apoptotic와 세포 사멸을 유도하는 기능인 pro-apoptotic으로 구성되어 있으며 이 두 비율에 의해 apoptotic cell death를 조절한다.

또한 세포의 수용체와 관련된 extrinsic pathway와 미토콘드리아와 관련된 intrinsic pathway으로 나뉘며(31), death receptors, Bcl-2 family, caspase 등이 상호작용에 의해서 조절된다.

Anti-apoptotic 단백질인 BCL-2는 apoptosis inhibition factors(32)로 Bax와 결합하여 heterodimer를 형성하여 Bax의 활성을 억제하여 apoptosis를 방해하거나 caspase에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다.

Pro-apoptotic 단백질인 Bax는 apoptosis induction factors로(33),(34) 미토콘드리아 막의 투과성(MOMP)을 증가시키고 cytochrome c의 방출을 증가시켜 Apaf-1과 결합하여 apoptosome을 형성하여 caspase-9에 활성화가 되어 apoptosis를 유도 한다(35).

Caspase는 apoptosis에서 중요한 조절인자로 작용하며 initiator로 작용되는 종류

는 caspase-2, caspase-8, caspase-9, caspase-10이며 effector로 작용되는 종류는 caspase-3, caspase-6, caspase-7이 있다(36).

또한 대표적인 caspase-3의 기질 단백질에 해당되는 PARP는 정상세포의 DNA 수복이나 유전자 안정성 유지에 중요한 역할을 하며 apoptosis 유발 시 caspase-3에 의해 분해가 일어나면서 이러한 회복기능이 상실 된다(37).

Apoptosis 기전은 아래 그림으로 표시하였다(Figure. 1)(38).

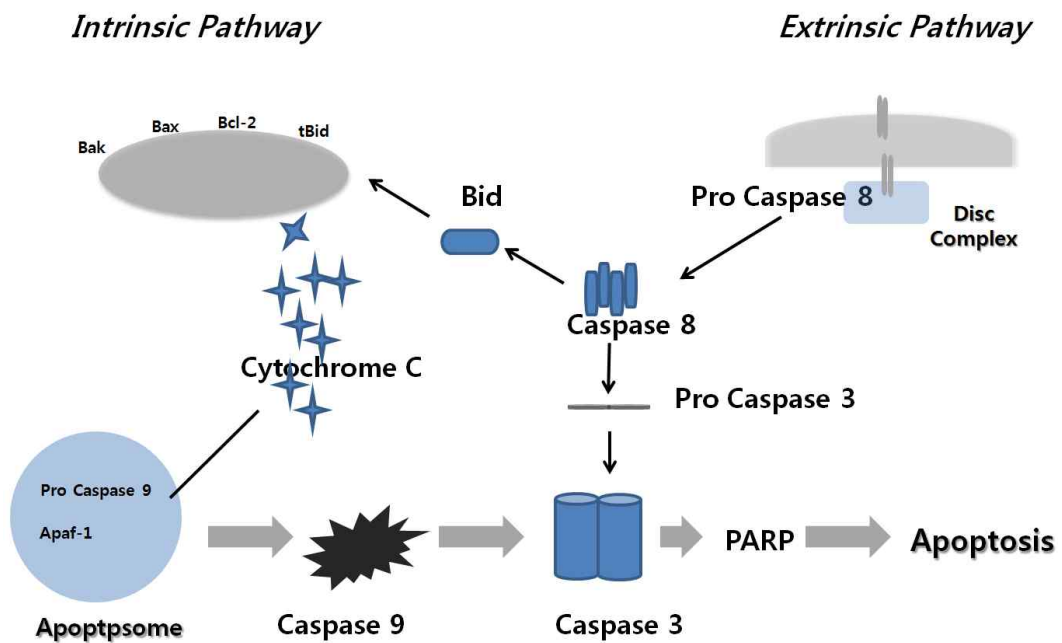


Figure 1. flow diagram of the main molecular pathways leading to Apoptosis

Ⅲ. 재료 및 방법

1. 콤부차 배양 및 시료 처리 방법.

1) 콤부차 배양

본 실험에서 사용한 콤부차는 local domestic Kombucha이며, 민간에서 분양하여 판매하는 것을 인터넷으로 구매하여 사용하였다(www.auction.co.kr).

콤부차는 Figure. 2에 따라 녹차 추출액 900ml와 설탕 90g을 교반한 후 전배양을 통해 얻은 배양액 100ml에 pellicle 1/4를 넣어 30°C 조건으로 10일간 배양하였고, 감귤 콤부차는 콤부차 배양과 동일한 과정에 전배양을 통해 얻은 배양액 100ml에 녹차 추출액 700ml, pellicle 1/4, 감귤액 200ml에 acetate 500 μ l를 첨가하여 콤부차와 동일한 조건에서 배양하였다(Figure. 3).

본 실험에 사용된 감귤액은 (주)일해에서 생산된 것을 받아서 사용하였다.

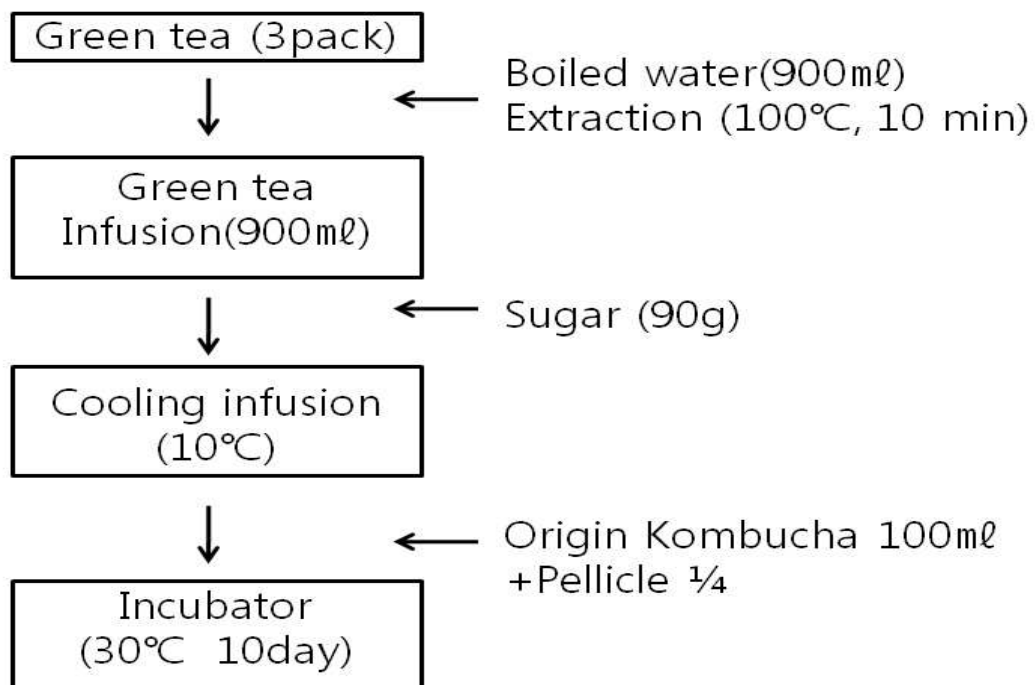


Figure 2. A flow diagram for Kombucha

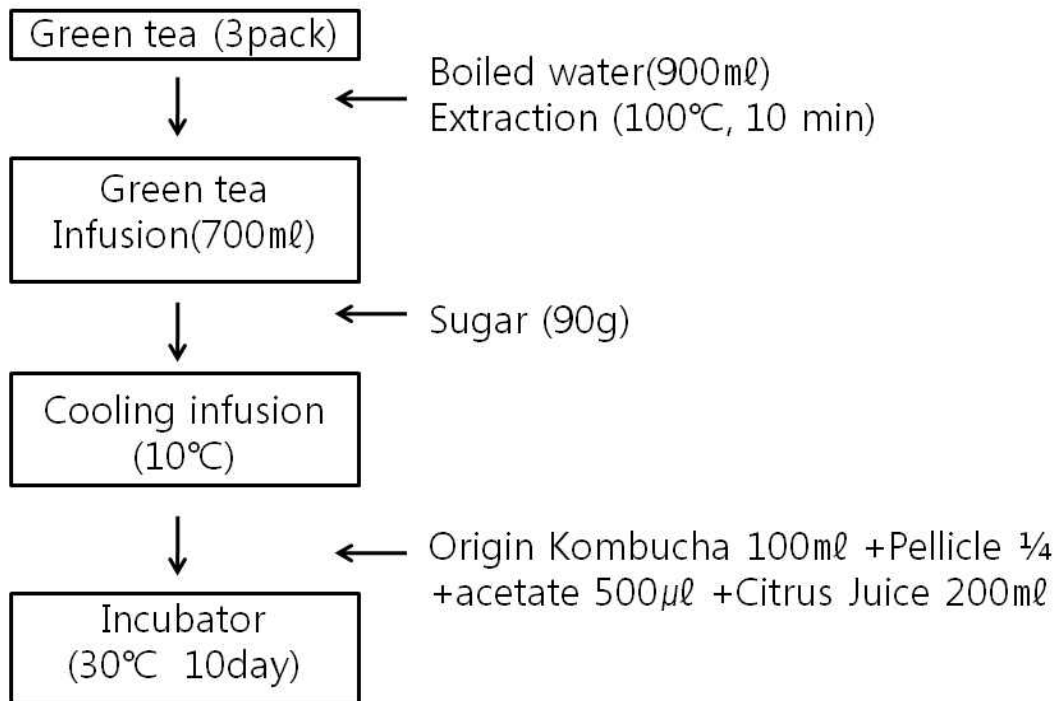
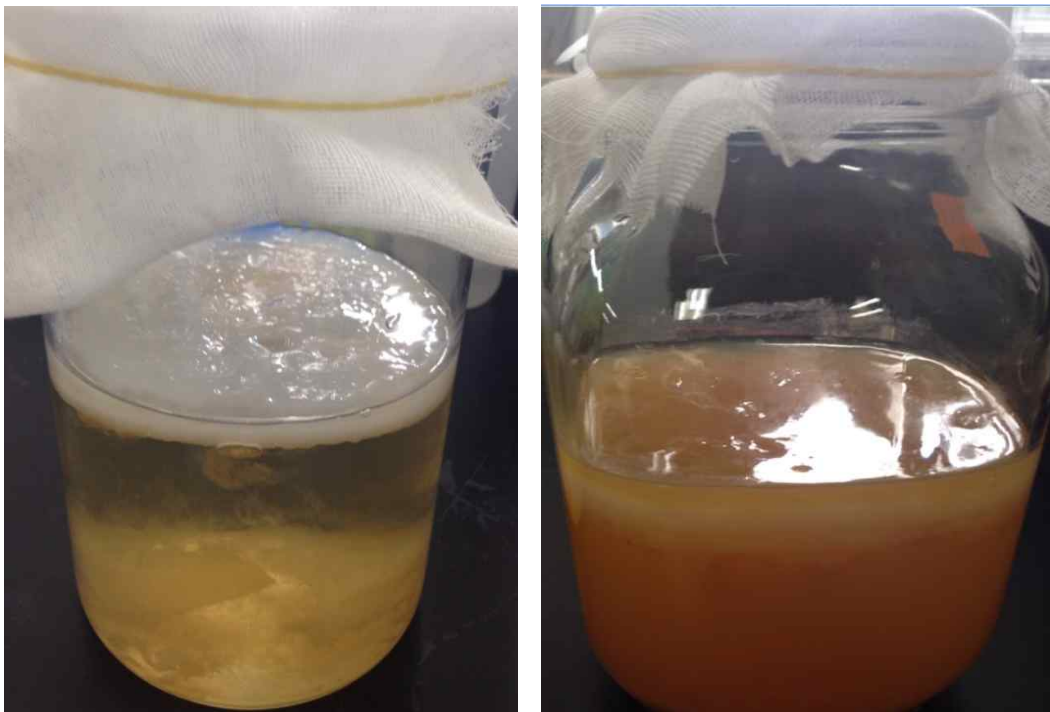


Figure 3. A flow diagram for Citrus Kombucha



Kombucha

Citrus Kombucha

Figure 4. Samples of Kombucha and Citrus Kombucha beverage.

2) 시료처리

가. 항산화 및 총 페놀함량 측정

콤부차(Kombicha) 감귤 콤부차(Citrus Kombucha)를 12000 rpm에서 20분간 원심분리 후 상등액을 사용하였다.

나. 세포실험

콤부차(Kombicha) 감귤 콤부차(Citrus Kombucha)를 12000 rpm에 20분간 원심분리 후 상등액을 주사기용 필터유닛(Pore size 45 μ m)을 이용하여 Filter 한 후 배지(RPMI-1640)에 희석하여 사용하였다.

2. 실험방법

1) 세포배양

실험에서 사용한 T24세포, 5637세포는 한국세포주 은행에서 구입하여 RPMI-1640(Sigma-Aldrich) 배지에 10%FBS(GIBCO Inc.)와 1%의 Penicillin(GIBCO Inc.)을 넣어 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

2) 항산화 실험 및 페놀함량 측정

가. DPPH radical 소거능 측정

시료 1ml에 ethanol로 용해한 0.2mM DPPH 용액 4ml를 첨가하여 혼합한 후 상온에서 20분간 반응하였다. 그리고 ELISA Microplate Readerreader(Versa Max, USA)를 사용하여 517nm에서 흡광도 값을 측정한 후 다음 식을 이용하여 결과 값을 나타내었다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = [1 - (\text{experiment}/\text{control})] \times 100$$

나. ABTS radical 소거능 측정

7.4mM ABTS와 potassium persulphate 2.6mM을 하루 동안 암소에 방치하여 ABTS 양이온을 형성 시킨 후 이 용액을 735mM에서 흡광도 값이 1.4-1.5가 되도록 증류수로 희석하였다.

시료 100 μ l와 ABTS 용액 900 μ l를 첨가한 후 30분방치 후 ELISA reader를 사용하여 750nm에서 측정 한 후 다음 식을 이용하여 결과 값을 나타내었다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = [1 - (\text{experiment}/\text{control})] \times 100$$

다. 총 페놀함량 측정

시료 1ml와 10% Folin-ciocalteu's reagent 1ml 및 2% sodium carbonate 용액 1ml을 각각 혼합 하여 1시간동안 암소에서 방치 후 ELISA reader를 이용하여 750nm를 이용하여 흡광도를 측정 하였다.

총 페놀 함량 분석은 tannic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로 함량을 계산한 후 총 폴리페놀 함량은 시료 중량 당 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타내었다.

3) 세포 독성 실험(MTT assay)

콤부차(Kombucha)와 감귤 콤부차(Citrus Kombucha) 처리에 따른 세포증식 억제 정도를 측정하기 위해 6-well plate에 방광암세포를 분주하여 배양한 후 농도를 달리하여 24시간 배양하였다.

그 후 5mg/ml MTT시약(Thiazyl blue)을 $10\mu\text{l}$ 씩 처리하여 1시간 배양하고, 배지를 제거한 후 DMSO $100\mu\text{l}$ 씩 분주하여 well에 생성된 formazan을 모두 녹인 후 ELISA reader로 560nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포의 증식률은 시료의 흡광도를 대조군(무 처리군)의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

4) 세포의 형태 및 이동성에 미치는 영향(Scratch-wound assay)

방광암 세포를 6-well plate에 분주하여 배양한 후 K, CK를 24시간 농도별로 처리 한 후 도립 현미경(CK \times 40-CPG30, Olympus, Japan)으로 확인하였으며, 세포이동성은 세포가 Subconfluence에 도달 한 배지에 $200\mu\text{l}$ 피펫 끝으로 긁어 스크래치를 내어 세포를 제거한 시점을 0시간으로 하고, 상층의 배지를 제거하고, K, CK를 배지에 희석한 후 방광암세포에 처리 하여 24시간 후 세포이동성의 변화를 도립 현미경으로 세포가 스크래치 모서리 부분으로 자라 들어오는 정도를 관찰하였다.

5) Annexin V 측정(FACS analysis)

방광암세포를 6-well plat에 배양하여 용기에 부착된 방광암세포에 K와 CK를 24시간 동안 처리하였다.

이 후 배지와 세포를 tube에 옮겨 1000 rpm에서 2분간 원심분리 하였다.

분리된 세포를 cold PBS로 세척하여 다시 원심분리 한 후 상등액을 제거하였다.

1x cold binding buffer로 1×10^5 을 맞게 희석해, 여기에 $5 \mu\text{l}$ PE annexin V를 넣은 후 약하게 vortex 한 후 25°C 에서 15분 방치한 후 1x binding buffer $400 \mu\text{l}$ 를 넣은 후 FACS(Moxi flow cytometry, ORFLO, Cambridge, USA)로 측정 하였다.

6) Apoptosis 관련 단백질 발현(western blot assay)

방광암세포 T24, 5637을 Petri dish에 분주 하여 배양한 후 K, CK를 첨가하여 24시간 동안 배양하여 scraper로 세포를 모았다.

세포를 모을 때는 PBS로 세척한 후 protein lysis buffer를 넣어 세포를 파괴한 후 1000rpm에서 2분간 원심분리 하여 얻은 상등액을 BCA를 이용하여 단백질 정량을 하고 sample로 사용하였다.

12% gradient sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에서 동량의 단백질을 loading하여 3시간동안 단백질을 분리 하고 polyvinyliden fluoride (PVDF) 0.45um size membrane에 옮겨 2시간 transfer 후 5% skim-milk로 blocking한다.

blocking이 다 끝나면 TBS-T로 세척 후 1차 antibody를 4°C 에서 overnight로 반응시켰다.

그리고 10분간 3회씩 TBS-T로 세척하고 2차 antibody를 1시간 동안 반응시킨 후 ECL-solution과 반응시켜 단백질 ECL 화상분석 시스템을 이용하여(Fusion-FX7 Advance, VILBER, Europe)으로 측정하였다.

사용된 Antibody 종류는 Table 1.과 같다.

Table. 1. Antibodies used in Western blot analysis

Antibody	Origin	Company
Bax	Rabbit	Cell Signaling Technology
Bcl-2	Rabbit	Cell Signaling Technology
Cleaved Caspase-8	Rabbit	Cell Signaling Technology
Cleaved Caspase-3	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology
Cleaved Caspase-9	Goat	Santa Cruz Biotechnology
Cleaved PARP	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology
β -Actin	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology

3. 통계처리

본 실험은 독립적으로 3번 이상 반복 실험하였다.

실험 결과는 통계분석용 프로그램 SPSS Version 18.0 package program을 이용하여 각 실험 군의 평균과 표준편차를 계산 하고 *t*-test 분석, ANOVA 분석 후 $P=0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 처리군 간의 유의성을 검증 하였다.

IV. 결과

1. 항산화 실험 및 페놀함량 측정

1) 항산화 실험

DPPH, ABTS radical 소거활성

DPPH assay는 빠르고 간단하게 유리 라디칼 소거능력 측정법으로 항산화능을 측정하기 위해 널리 사용되는 방법이다.

DPPH는 짙은 보라색을 나타내는 organic nitrogen radical로 에탄올 용액 상태에서 흡광도를 보이며(39) 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 빠른 속도로 hydrogen radical의 전자를 받아들이면서 환원되어 안정한 화합물이 비가역적으로 전환되며 짙은 보라색이 없어지는 특징을 가진다(40).

또한 ABTS assay는 양이온 ($ABTS^{\cdot+}$)에 대한 항산화제의 소거능을 측정하는 방법으로 potassium persulfate 와 반응하여 녹색의 ABTS radical을 형성하고, 생성된 ABTS radical은 항산화력을 가진 물질로부터 전자를 받아 무색의 물질로 환원 된다(41)

이런 천연물의 항산화활성은 활성 radical 소거능은 식품중의 지방질 산화를 억제할거나, 인체 내에서는 활성 라디칼에 의한 노화를 억제시킬 수 있는 능력을 의미 한다(42).

콤부차 배양액과 감귤액을 첨가한 감귤콤부차의 DPPH radical 소거능 활성 과 ABTS radical 소거능 활성은 Table 2.에 나타내었다.

콤부차와 감귤 콤부차 1mg/ml에 DPPH radical 소거 활성은 87.9%, 91.2%이며 ABTS radical 소거 활성은 78.78%, 94.59%로 DPPH, ABTS scavenging activity에서 모두 감귤액을 첨가한 감귤 콤부차가 유리 radical 소거활성이 높은 결과가 나타났다.

Table 2. Antioxidative activity of Kombucha and Citrus Kombucha.

sample (mg/ml)	DPPH scavenging activity (%)	ABTS scavenging activity (%)
Ascorbic acid	93±0.04 ^a	96.9±0.2 ^a
K	87.9±0.42 ^c	78.78±1.57 ^b
CK	91.2±0.25 ^b	94.59±1.81 ^a

The results are expressed mean±SD. values with different superscripts within the same row are significant at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

2) 총 폴리페놀함량 측정 (Total polyphenol content)

페놀함량 측정법은 시료의 항산화능을 측정하는 방법은 아니지만, 시료에 함유되어 있는 항산화능을 예측할 수 있으므로 항산화 연구에 폭넓게 이용되는 방법이다(43).

폴리페놀 화합물의 벤젠 고리에 치환되어 있는 여러 개의 수산기가 free radical 과의 환원 반응에 참여함으로써 항산화 활성이 나타나므로, 일반적으로 시료에 포함되어 있는 총 폴리페놀 함량이 증가할수록 항산화 활성이 증가한다고 볼 수 있으며(44), 과일 및 음료를 대상으로 실시한 선행연구에서 총 폴리페놀 화합물과 항산화 활성의 양의 상관관계가 있다고 보고되었다(45),(46).

총 페놀함량 측정 결과는 Table 3.에서 나타내었다.

일반 콤부차와 감귤액을 첨가한 감귤 콤부차의 총 페놀함량이 μg 당 tannic acid 의 등량값으로 나타낼 때 일반 콤부차는 $17.82\mu\text{g}/\text{ml}$, 감귤 콤부차는 $28.62\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 감귤 콤부차가 일반 콤부차 보다 높은 페놀함량을 보였다.

Table 3. Total phenolics contents of Kombucha and Citrus Kombucha.

sample	TPC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
K	17.82 ± 0.08
CK	28.62 ± 0.55

The results are expressed mean \pm SD

2. 세포 독성 실험(MTT assay)

1) 콤부차 및 감귤 콤부차가 정상세포 (RAW 264.7)에 대한 세포 독성

콤부차(Kombucha) 및 감귤 콤부차(Citrus Kombucha)가 정상세포 RAW 264.7 세포에 영향을 미치는지 MTT assay를 통해 확인하였다.

K 및 CK자체의 독성을 확인한 결과 K, CK처리 0, 1, 2, 4, 6mg/ml에서 생존율 100%이상을 보였고 K, CK처리 8mg/ml에서 생존율 80% 이상으로 나타나 RAW 264.7 세포 사멸에 큰 영향을 주지 않는 것으로 판단하여 (Figure. 5) 본 실험에서는 0-8mg/ml의 농도로 설정하여 본 실험을 수행하였다.

이에 콤부차 및 감귤 콤부차가 다양한 생리활성 기능을 활용한 기능성 식품 과 식품 첨가물로 이용함에 있어 안전성 있는 물질로 판단된다.

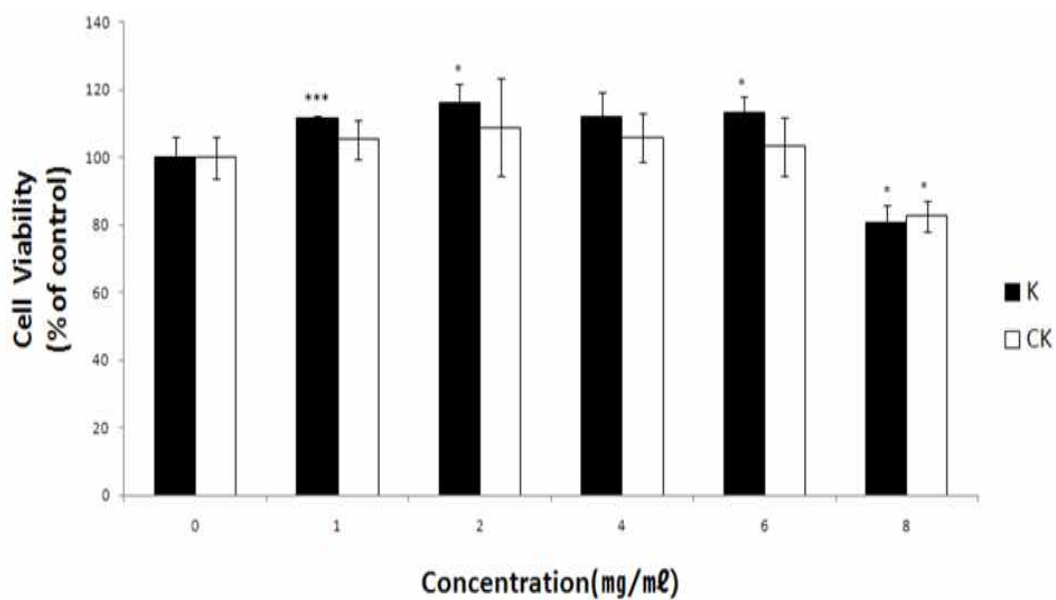


Figure 5. Effect of Kombucha and Citrus Kombucha on Raw 264.7 cell viability. Raw264.7 cell were plated in 96 well plates at a 1×10^4 cell/well with RPMI1640 supplemented with 10% FBS. the cell viability of Raw264.7 cell was measured by MTT assay for 24hr. the results are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. significance was determined using a Student's t-test ($*p < 0.05$)

2) 방광암 세포 증식 억제 효과(T24, 5637)

방광암 세포(T24, 5637)에 Kombucha, Citrus Kombucha를 0-8mg/ml의 농도별로 처리하고 각각 24시간 동안 배양하여 세포증식을 얼마나 억제하는지 알아보기 위하여 MTT assay를 통해 확인하였다.

24시간이 지난 후 MTT 시약(Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)을 첨가하여 formazan을 형성시킨 후 DMSO로 용해시켜 흡광도로 측정하여 대조군 세포 생존율을 100% 기준으로 정하고 농도별 세포 증식을 비교하였다.

방광암 세포 T24에 K를 처리한 결과 1, 2, 4, 6, 8mg/ml 농도에서 생존율 82.57%, 69.01%, 50.12%, 33.47%, 26.09%였고, CK를 처리한 결과 81.96%, 72.77%, 50.36%, 19.49%, 13.44%의 생존율이 나타났다($p < 0.05$).

K, CK에 농도가 높아짐에 따라 방광암 세포 T24세포의 억제율의 증가를 알 수 있었으며 K처리보다 CK처리가 방광암 세포의 억제의 높음을 알 수 있었다 (Figure. 6).

또한 방광암 세포 5637에 K를 처리한 결과 1, 2, 4, 6, 8mg/ml 농도에서 생존율 84.22%, 84.71%, 85.63%, 80.63%, 68.22%였고, CK처리한 결과 82.5%, 74.24%, 76.03%, 65.71%, 35.87%의 생존율로 방광암 세포(T24)와 마찬가지로 농도 의존적으로 방광암 세포(5637)의 억제율의 증가를 보였고 K처리보다 CK처리가 방광암 세포의 생존율을 억제함에 있어 세포독성이 높음을 확인 하였다(Figure. 7).

반면에 방광암 세포 5637보다 T24에 K, CK 처리가 암세포의 성장 억제가 높았으며, K보다 CK처리가 높음을 확인하였다.

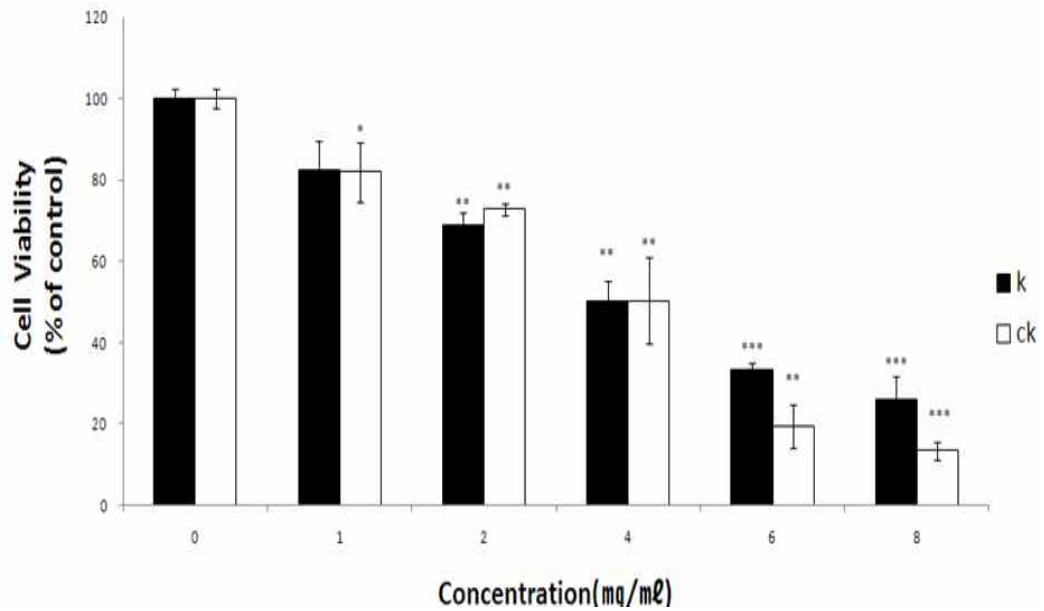


Figure 6. Effect of Kombucha and Citrus Kombucha of the bladder cancer cell (T24) viability. T24 cell were plated in 96 well plates at a 1×10^4 cell/well with RPMI 1640 supplemented with 10% FBS. The cells were treated with Kombucha, citrus Kombucha concentration dependent manner. the cell viability of T24 cells was measured by MTT assay for 24hr. the results are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. significance was determined using a Student's t-test ($*p < 0.05$)

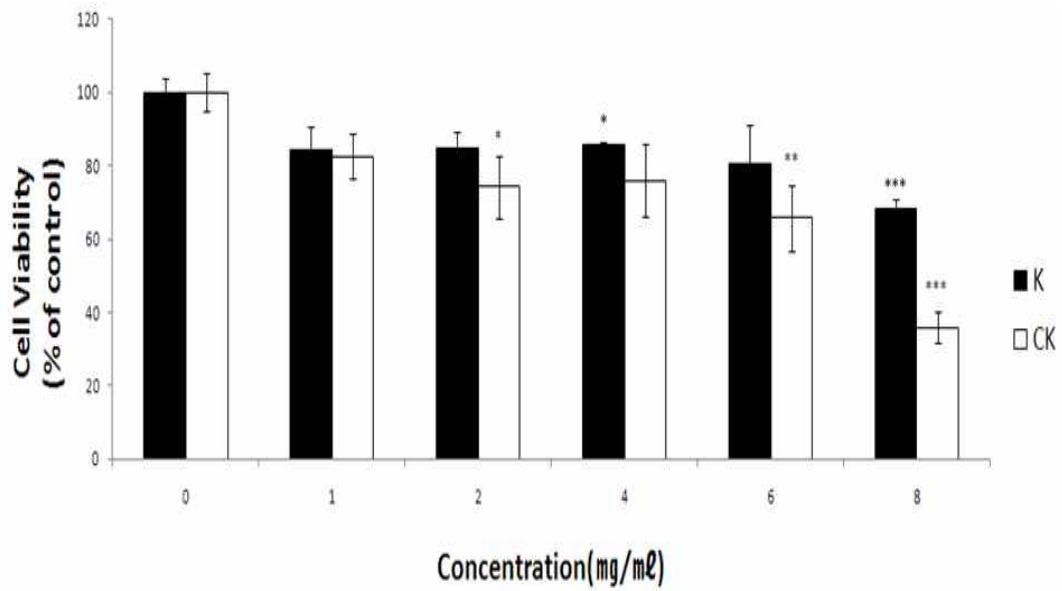


Figure 7. Effect of Kombucha and Citrus Kombucha of the bladder cancer cell (5637) viability. 5637 cell were plated in 96 well plates at a 1×10^4 cell/well with RPMI1640 supplemented with 10% FBS. The cells were treated with Kombucha, citrus Kombucha concentration dependent manner. the cell viability of 5637 cells was measured by MTT assay for 24hr. the results are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. significance was determined using a Student's t-test ($*p < 0.05$)

3. 방광암 세포 형태 변화

콤부차(Kombucha)와 감귤 콤부차(Citrus Kombucha)를 방광암 세포(T24, 5637)에 24시간 처리 하였을 때 세포의 형태학적인 변화를 도립 현미경을 사용하여 100×(0.25)PhP 배율로 관찰 하였다.

방광암 세포 T24에 K처리 시 농도 8mg/ml에서 세포가 줄어들었음을 알 수 있었지만 형태적인 변화는 관찰하지 못했다(Figure. 8).

T24세포에 CK처리 시 농도 6, 8mg/ml에서 형태가 변화를 관찰 할 수 있었으며 CK처리 6mg/ml 보다는 8mg/ml에서 방광암세포 T24에 심한 형태적 변형이 관찰되었고 부착능력이 상실되면서 배지 위로 부유한 형태를 확인 할 수 있었다(Figure. 9).

또한 방광암 세포 5637에 K처리 농도가 높아짐에 따라 세포수가 줄어들었음을 알 수 있지만, 형태 변화의 큰 차이는 없었다(Figure. 10).

반면 5637세포에 CK처리 시 8mg/ml에서 약간의 세포의 형태변화를 확인할 수 있었지만, T24에 CK 처리보다 세포의 형태변화 수준이 미비했다(Figure. 11).

1) 방광암 세포(T24)

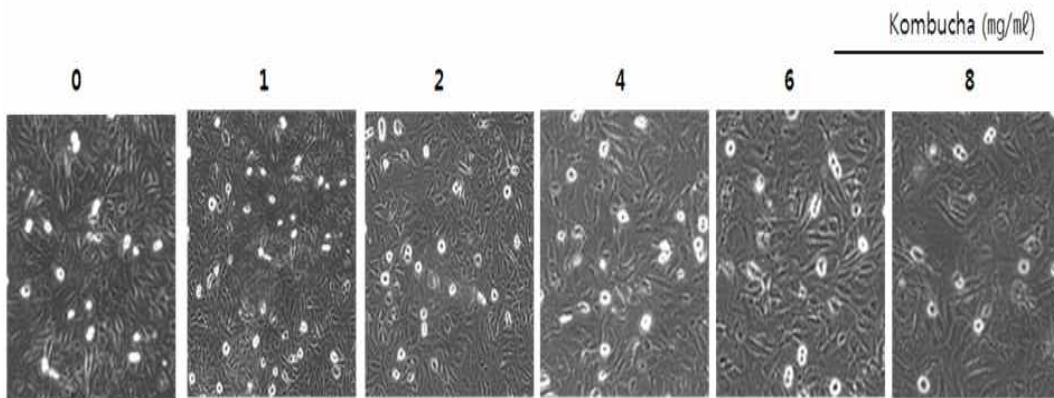


Figure 8. Effect of Kombucha on morphological change of bladder cancer cell(T24). T24 cell treated with or without Kombucha after 24 hours and examined by microscopy 100×(0.25php)

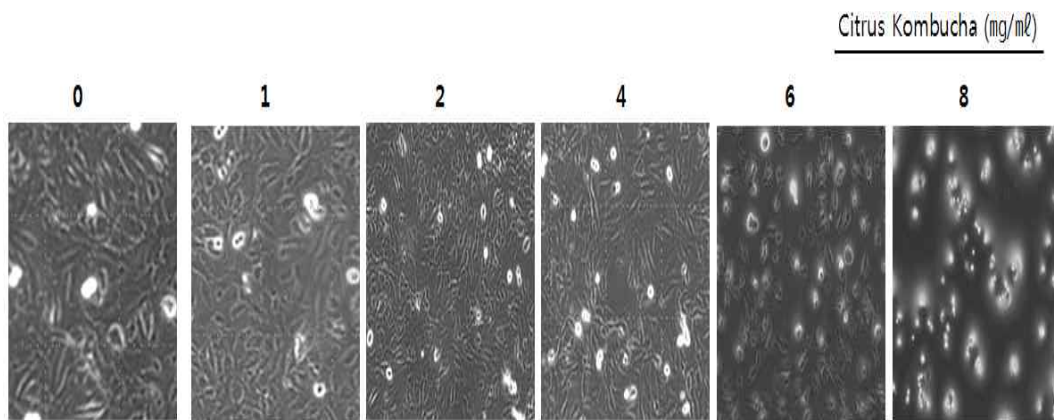


Figure 9. Effect of Citrus Kombucha on morphological change of bladder cancer cell(T24). T24 cell treated with or without Citrus Kombucha after 24 hours and examined by microscopy 100×(0.25php)

2) 방광암 세포(5637)

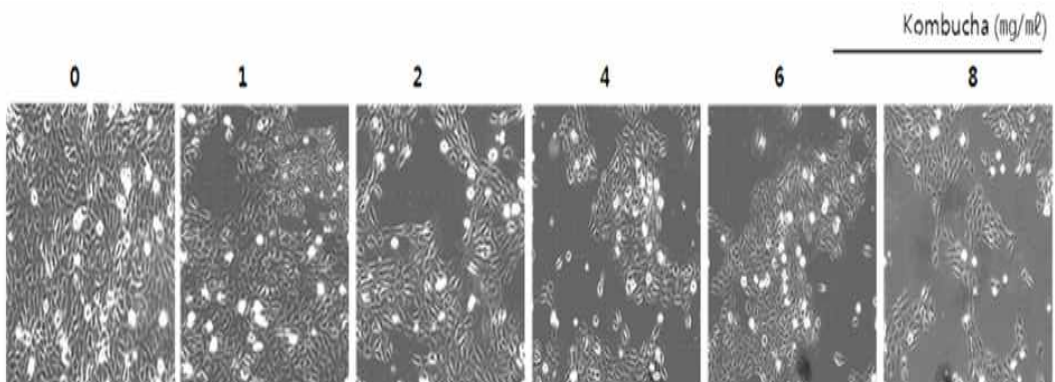


Figure 10. Effect of Kombucha on morphological change of bladder cancer cell(5637). 5637 cell treated with or without Kombucha after 24 hours and examined by microscopy 100×(0.25php)

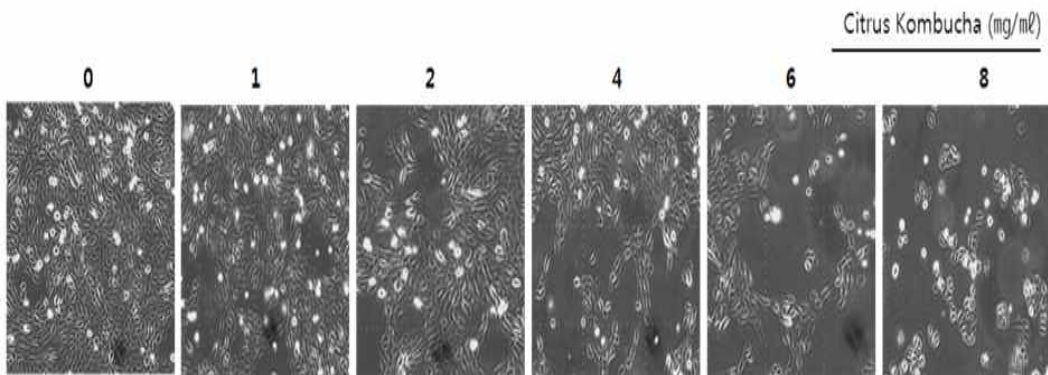


Figure 11. Effect of Citrus Kombucha on morphological change of bladder cancer cell(5637). 5637 cell treated with or without Citrus Kombucha after 24 hours and examined by microscopy 100×(0.25php)

4. 방광암 세포 이동성에 미치는 영향(Scratch-Wound assay)

세포이동은 (Cell migration)동물의 성장 과 생리활동을 위해 중요한 과정이며 (47) 최근에 연구 발표에서는 세포의 집단 이동이 다종의 종양전이에 기여 한다는 보고되고 있다(48).

이에 단순하고 쉽게 세포들이 얼마나 이동하였는지 확인하기 위해 방광암 세포 (T24, 5637)의 콤부차(Kombucha)와 감귤 콤부차(Citrus Kombucha)를 24시간 동안 노출시킨 후 scratch-wound assay를 이용해 24시간 동안 이동 정도를 관찰 하였다.

현미경 사진에서 점선 외부의 세포들은 24시간 동안 피펫 팁으로 scratch를 가해 세포를 제거한 내부로 점차적인 이동현상을 보인다.

그 결과 방광암 세포 T24에서 배지만 처리한 실험군 에서는 24시간 후에 세포의 이주가 현저하게 증가 하였으나, K의 농도가 높아짐에 따라 세포의 이주가 억제 됨을 확인 할 수 있었다(Figure. 12).

그러나 K보다 CK처리에서의 세포 이주가 4, 6, 8mg/ml에서 세포의 이동성이 더욱 억제됨을 확인 하였다(Figure. 13).

한편 방광암 세포 5637에서는 K처리 시 배지만 처리한 실험군과 비교했을 때 세포의 이동성이 8mg/ml에서 억제됨을 확인 할 수 있었으며(Figure. 14), CK 처리 에는 T24에 CK처리 보다는 세포이동 억제가 낮았지만 농도가 높아짐에 따라 세포에 이동억제가 느리게 진행되었다(Figure. 15).

1) 방광암 세포(T24)

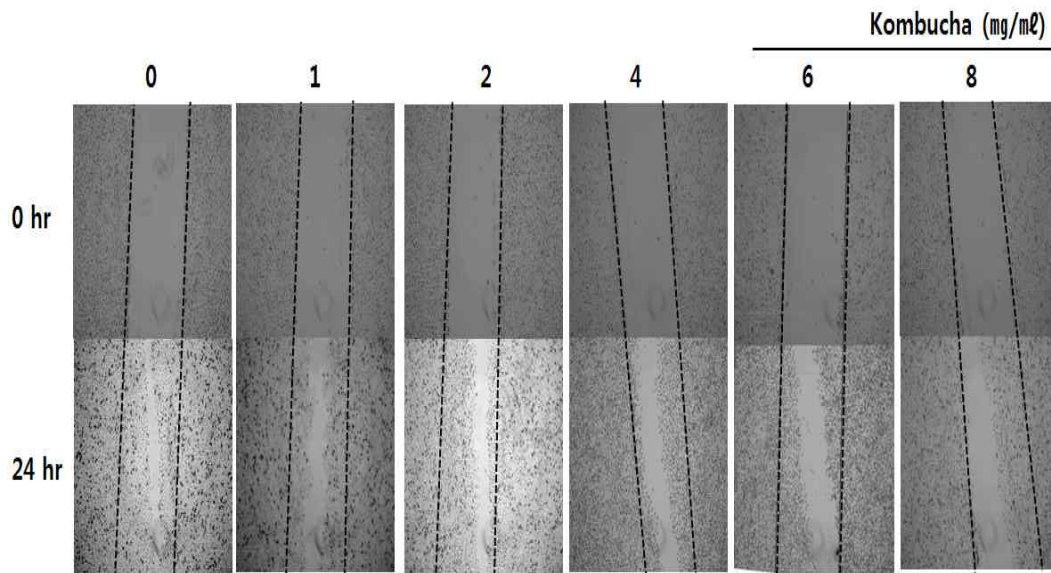


Figure 12. This show that scratch wound assay on the bladder cancer cell(T24). scratch wound assay T24 cell treated with or without Kombucha after 24 hours and examined by microscopy 40×(0.13php)

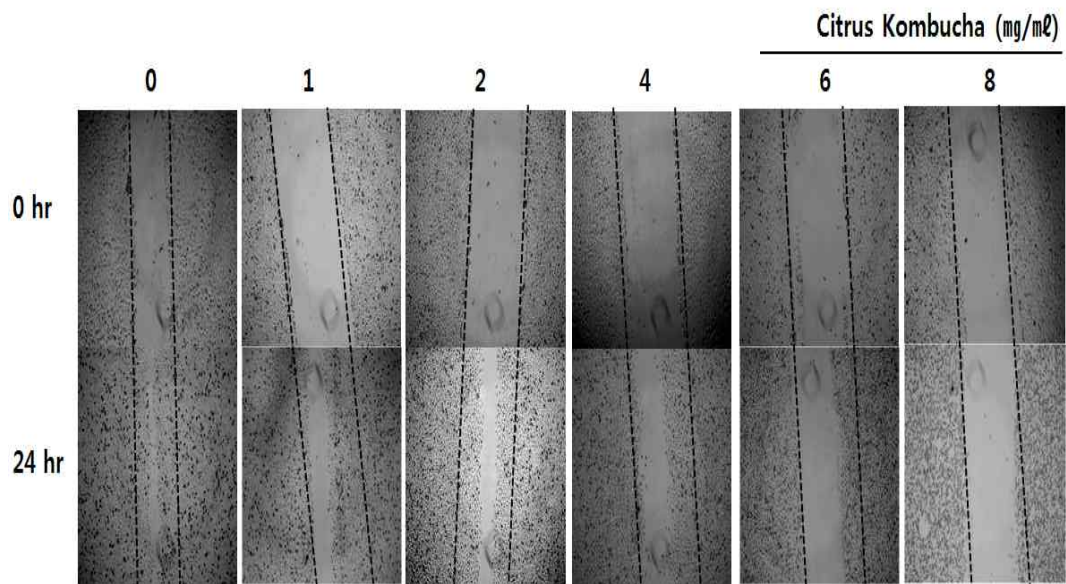


Figure 13. This show that scratch wound assay on the bladder cancer cell(T24). scratch wound assay T24 cell treated with or without Citrus Kombucha after 24 hours and examined by microscopy 40×(0.13php)

2) 방광암 세포(5637)

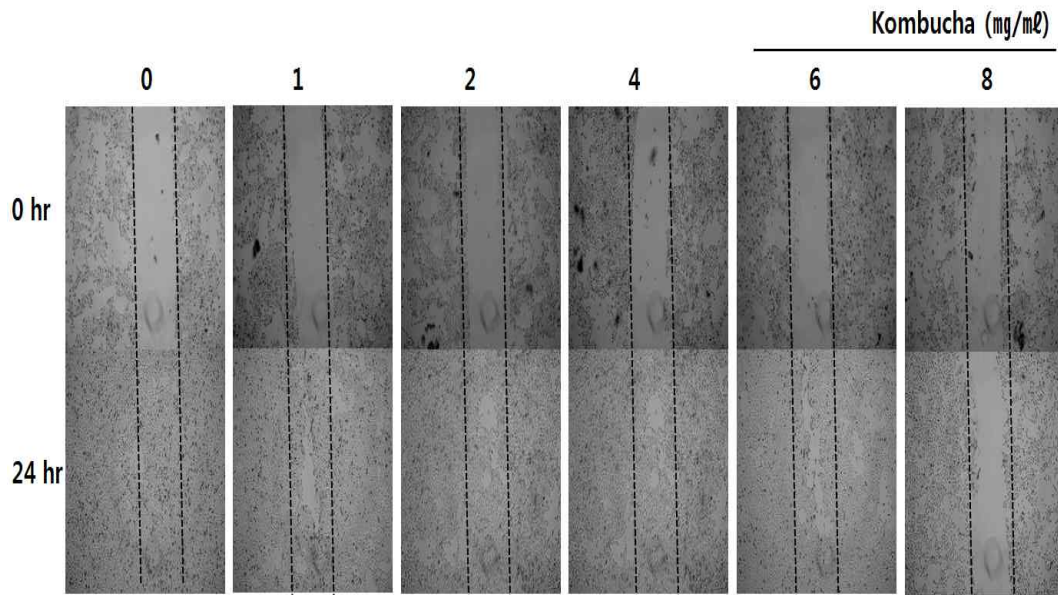


Figure 14. This show that scratch wound assay on the bladder cancer cell(5637). scratch wound assay 5637 cell treated with or without Kombucha after 24 hours and examined by microscopy 40×(0.13php)

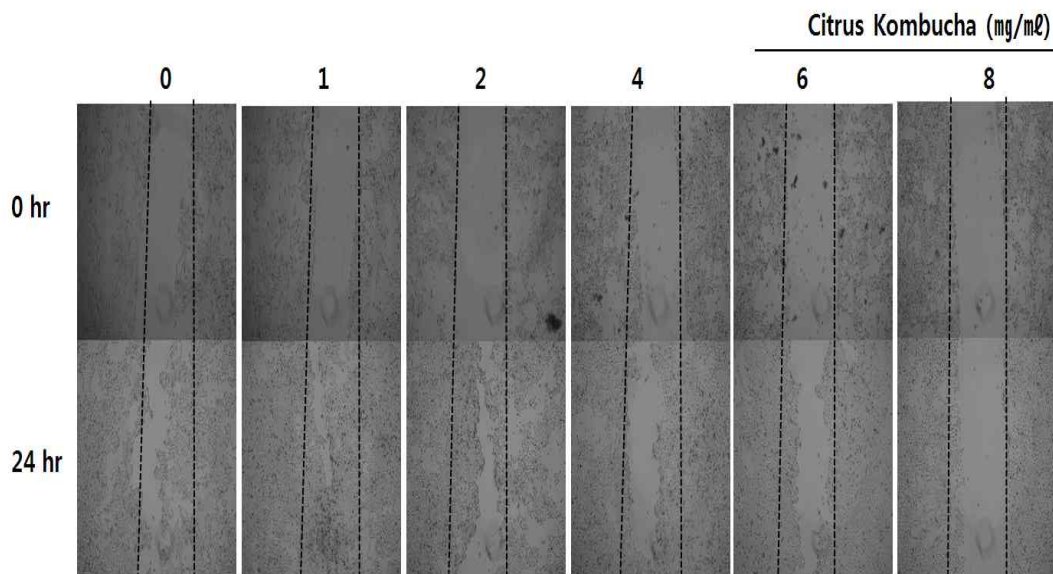


Figure 15. This show that scratch wound assay on the bladder cancer cell(5637). scratch wound assay 5637 cell treated with or without Citrus Kombucha after 24 hours and examined by microscopy 40×(0.13php)

5. FACS analysis 분석(Annexin V 측정)

콤부차(Kombucha)와 감귤 콤부차(Citrus Kombucha)의 방광암 세포 처리에 따른 성장억제 및 세포 형태 변화가 apoptosis에 의한 것인지 확인하기 위해서 방광암세포 T24, 5637세포에 K, CK를 0, 4, 6, 8mg/ml의 농도로 24시간 동안 처리한 후 PE annexin V Kit을 이용하여 apoptosis에 의한 세포사멸의 유발정도를 정량적으로 확인하였다.

Annexin V 는 apoptosis가 발생하면 초기단계에 membrane 구조가 망가지게 되어 세포 내부에만 있던 Posphatidyl Serine(PS)와 같은 인지질이 세포 밖으로 노출되는데 Annexin V가 이것들과 결합하여 세포가 현재 apoptosis 초기단계임을 확인해주는 원리로 Moxi flow cytometry로 측정하였다.

방광암 세포 T24에 K처리 시 apoptosis의 유발 정도가 0, 4, 6, 8mg/ml 농도에서 각 4.47%, 4.07%, 6.4%, 11.1%로 측정이 되었고, CK처리 시 3.5%, 6.87%, 30.97%, 97.4%로 CK처리 8mg/ml에서만 apoptosis에 의한 세포사멸을 확인 할 수 있었다(Figure. 16).

또한 방광암세포 5637에 K처리 시 apoptosis에 의한 세포사멸의 비율이 각 3.87%, 5.57%, 6.73%, 7.83%로 확인되었고, CK처리 3.87%, 6.27%, 7.3%, 15.73%로 확인되었다(Figure. 17).

1) 방광암 세포(T24)

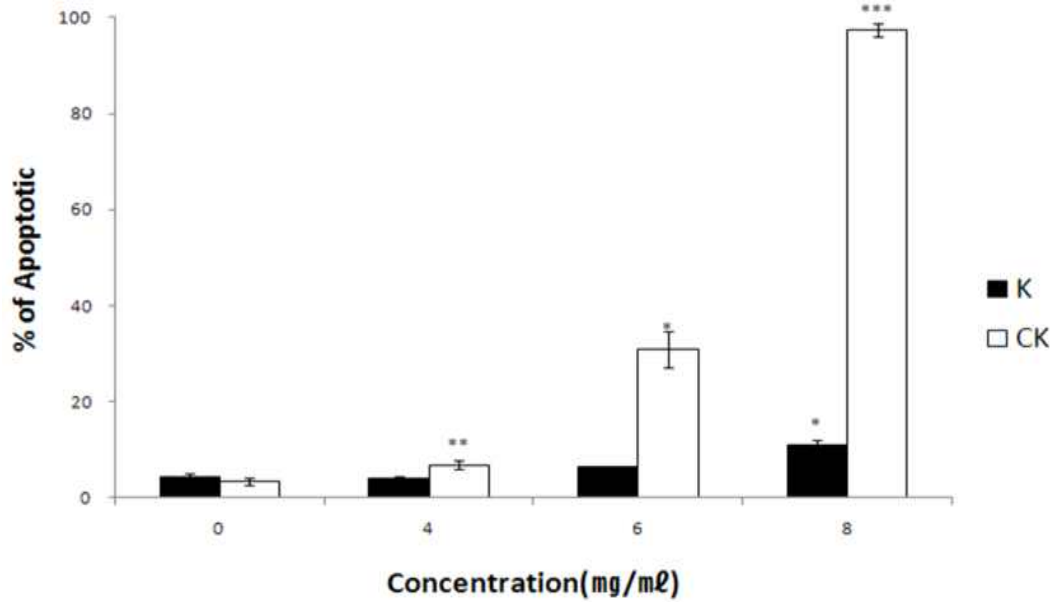


Figure 16. Effect of Kombucha and Citrus Kombucha on T24 cell apoptosis %. Flow Cytometric quantitation of apoptosis cells carried out using PE Annexin V Kit, which uses Annexin V conjugate for detection of cell changes that occur early in the apoptotic process. the results are expressed as the mean±SD of three independent experiments. significance was determined using a Student's t-test (* $p < 0.05$)

2) 방광암 세포(5637)

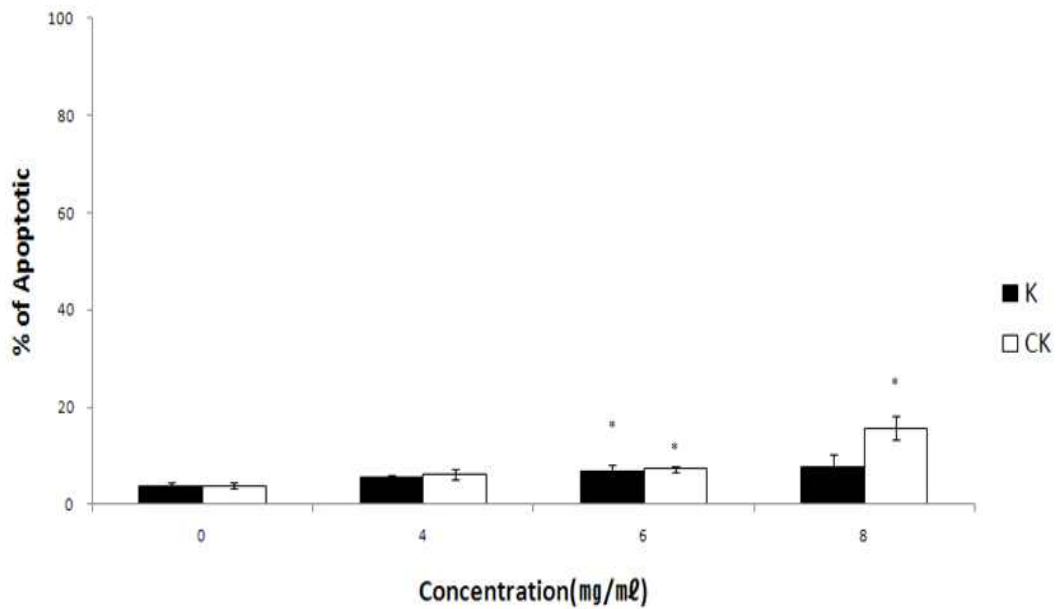


Figure 17. Effect of Kombucha and Citrus Kombucha on 5637 cell apoptosis %. Flow Cytometric quantitation of apoptosis cells carried out using PE Annexin V Kit, which uses Annexin V conjugate for detection of cell changes that occur early in the apoptotic process. the results are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. significance was determined using a Student's t-test (* $p < 0.05$)

6. 방광암 세포에서의 Apoptosis 유도(Western blot assay)

콤부차(Kombucha)와 감귤 콤부차(Citrus Kombucha)에 의한 T24 방광암세포의 apoptosis 관련 단백질 및 유전자를 살펴보기 위하여 단백질을 크기 별로 분리한 후 항원-항체 반응을 이용하여 전체 단백질에서 특정 단백질만을 detection 하는 원리로 western blot assay을 실시하였다.

미토콘드리아 외막에 존재하는 Bcl-2 family 단백질들은 미토콘드리아 막의 투과성과 cytochrome c의 방출을 조절함으로써 apoptosis를 조절하고, apoptosis가 일어나기 위해서는 활성화된 Caspase에 의해 PARP가 분절 되므로 apoptosis가 유도된다.

따라서 방광암 세포 T24, 5637에 K와 CK를 농도별로 처리한 뒤 control로 사용된 β -Actin과 비교 하였다.

방광암 세포 T24에 K와 CK처리를 비교하였을 때 CK처리 시 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2의 발현이 6, 8mg/ml 농도에서 감소하였고, pro-apoptotic 단백질인 Bax의 발현은 유의적인 차이가 없었다.

또한 Cleaved caspase-9, Cleaved caspase-8, Cleaved caspase-3은 농도가 증가 할수록 발현이 되었고 Pro caspase-9, Pro caspase-8, Pro caspase-3은 농도가 증가할수록 발현이 감소되었으며, caspase-3에 의해 분해가 일어나 PARP의 분절이 증가됨을 관찰 되었다(Figure. 18).

반면 방광암 세포 T24에 K처리 시 농도별 발현의 차이를 보이지 않았으며, 방광암 세포 5637에 K와 CK를 비교했을 때 농도별 발현의 차이를 보이지 않았다(Figure. 19).

1) 방광암 세포(T24)

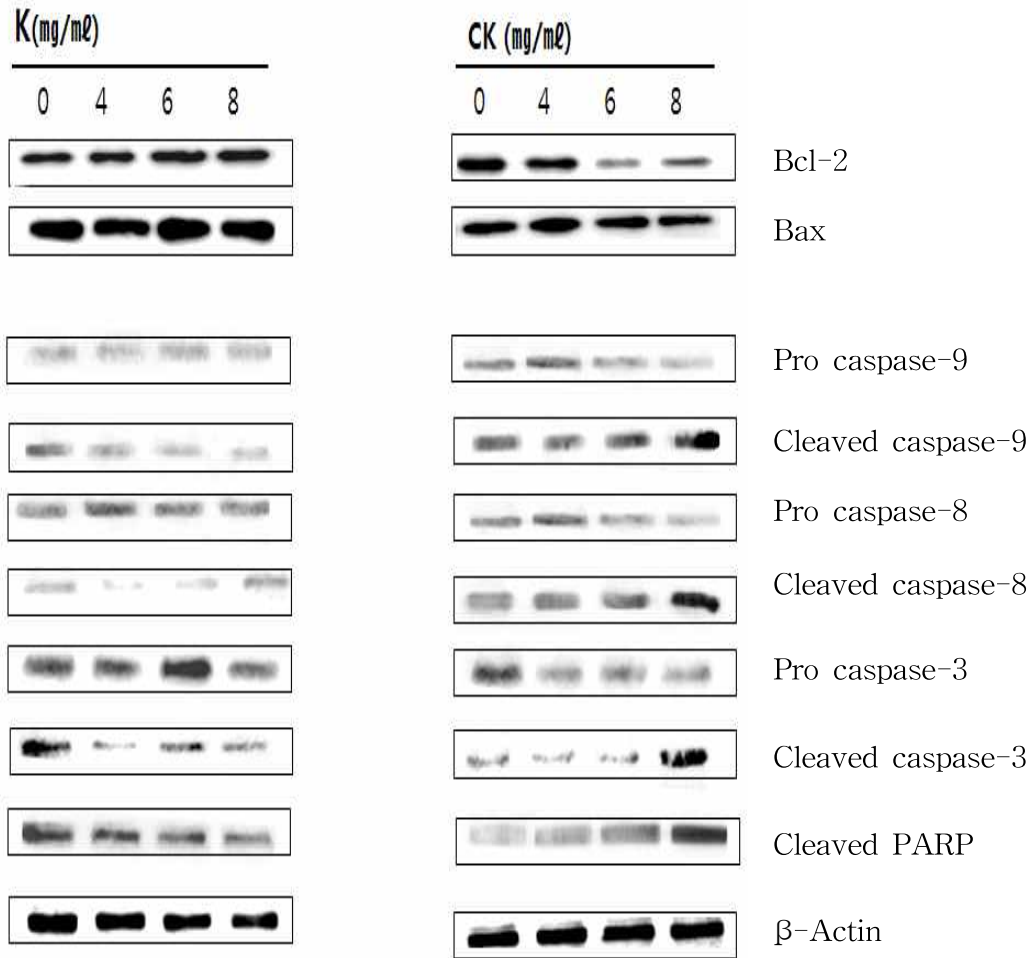


Figure 18. Effect of Kombucha and Citrus Kombucha on T24 cell Apoptosis related protein Expression. Expression of Bcl-2, Bax and intrinsic caspase-3, caspase-8, caspase-9 and PARP in T24 cell. T24 cells(1×10^6 cells/ml) were cultured in the absence or presence of after K, CK for incubation time is 24hr, cell were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels. separated proteins in gels transferred to PVDF membrane and immunoblotted with specific antibodies. β -Actin was used as an internal control.

2) 방광암 세포(5637)

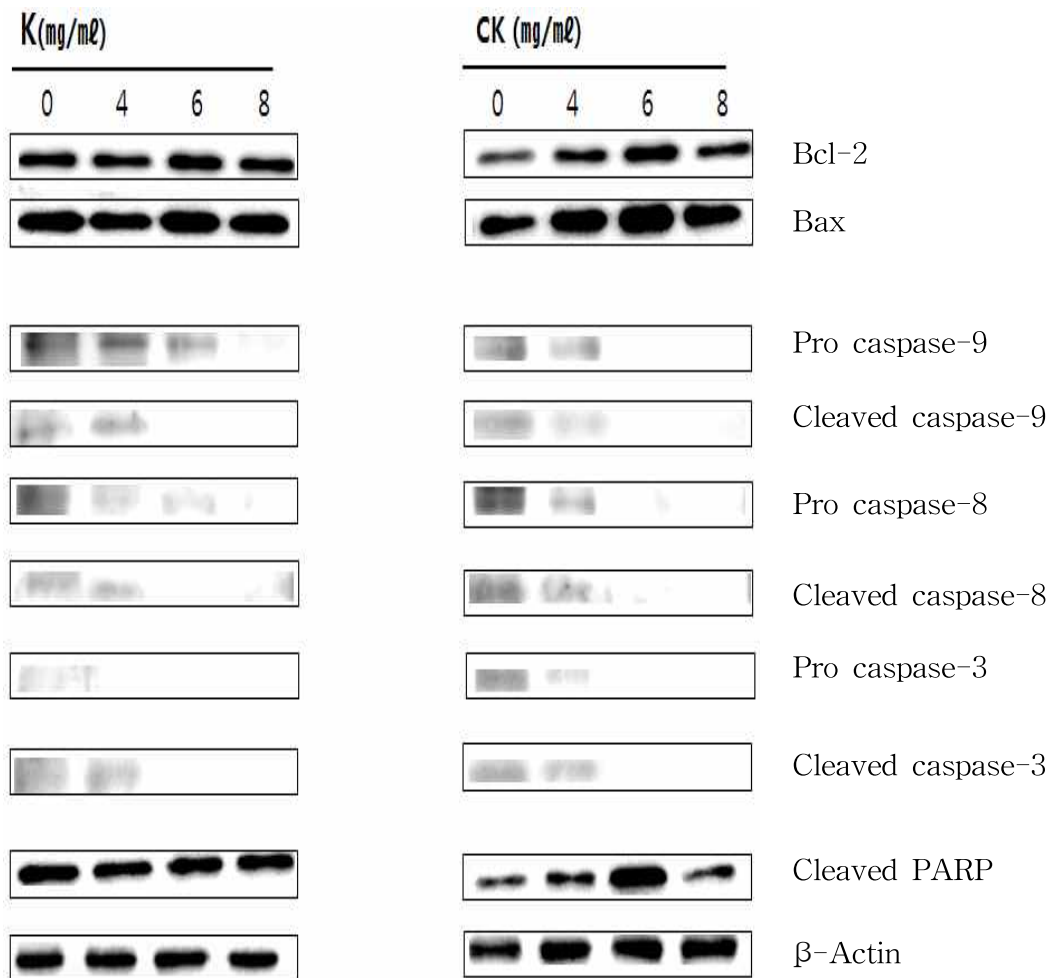


Figure 19. Effect of Kombucha and Citrus Kombucha on 5637 cell Apoptosis related protein Expression. Expression of Bcl-2, Bax and intrinsic caspase-3, caspase-8, caspase-9 and PARP in 5637 cell. 5637 cells(1×10^6 cells/ml) were cultured in the absence or presence of after K, CK for incubation time is 24hr, cell were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels. separated proteins in gels transferred to PVDF membrane and immunoblotted with specific antibodies. β -Actin was used as an internal control.

V 고찰

콤부차(K=Kombucha)와 감귤 콤부차(CK=Citrus Kombucha)의 항산화능력 및 페놀함량과 방광암세포 T24, 5637세포의 성장억제 및 Apoptosis유도에 관련 단백질의 발현을 western blot assay를 통해 다음과 같은 결론을 얻었다.

DPPH, ABTS radical 소거능력 에서 CK가 91.22%, 94.59%로 K보다 높았으며 총 페놀함량에서도 콤부차는 17.82 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 감귤 콤부차는 28.62 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 감귤 콤부차가 일반 콤부차 보다 높은 페놀함량을 보였다.

K및 CK가 인체 방광암 세포 사멸에 미치는 영향을 확인하기 이전에 정상세포인 RAW264.7을 이용하여 K와 CK의 자체 독성을 확인한 결과 0, 1, 2, 4, 6 mg/ml 처리 모두 100%이상의 생존율을 확인하였으며 K, CK 8mg/ml 처리 시 80%이상에 생존율 확인하여 방광암 세포에 K, CK 처리 수준을 0-8mg/ml로 설정하였다.

본 실험에서 K와 CK가 인체 방광암 세포 증식 억제효과를 확인하기 위하여 T24, 5637 방광암 세포를 사용하여 MTT assay를 하였다.

T24방광암 세포와 5637방광암 세포의 차이점은 방광암의 진행 상태로 분리되는데 T24는 비근침윤성(표재성)방광암으로 방광암의 약 70%정도 진단되며 중앙절제술로 절제가 가능하다.

5637세포는 T24보다 악성도가 높은 방광암으로 알려져 있으며(49), 방광암 중 점막에 국한되어 있으나 보통의 비근침윤성 방광암과는 다르게 방광표면에 튀어나온 혹이 없으며 방광 점막을 따라 존재하는 암으로 근침윤성 암으로 진행되기가 쉽다고 알려져 있다(1).

T24세포에 K, CK처리 시 농도 의존적으로 생존율이 감소하였고, 그 중 6, 8 mg/ml농도에서 K처리 시 33.47%, 26.09%, CK처리 시 19.49%, 13.44%로 측정되어 CK처리 시 생존율이 더 낮음을 확인되었으며($p>0.05$), 5637세포 독성에서는 K처리 시 6, 8mg/ml에서 80.63%, 68.22%였고, CK처리한 결과 65.71%, 35.87%로($p>0.05$) T24세포에 K, CK처리 보다 생존율이 높아 5637세포에 K, CK처리가 세포 독성이 약한 것으로 판단된다.

방광암 세포 T24에 CK 6, 8mg/ml 처리에 따른 증식억제는 세포의 응축과 부착력이 상실하면서 배양액에 부유한 모습이 관찰 되었고, 세포의 형태적 변화를 동반하였다.

방광암 세포의 증식억제와 형태변화가 apoptosis에 기인하는지 확인하기 위해서 flow cytometry를 이용하여 Annexin V를 측정하였다.

그 결과 T24세포에 K 0-8mg/ml처리 apoptosis로 인한 세포사멸의 비율이 모두 11%이하로 확인되었고, CK처리 6, 8mg/ml에서 Apoptosis에 의한 세포사멸 유발정도 38%, 97%을 확인 하였고, 5637세포 에서는 K, CK 0-8mg/ml 처리 시 apoptosis로 인한 세포사멸의 비율이 모두 15%이하로 확인되었다.

또한 K, CK의 apoptosis관련 단백질에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 western blot assay를 수행하였다.

pro-apoptotic단백질은 미토콘드리아의 막 투과성을 증가시키고 anti-apoptotic 단백질은 pro-apoptotic 단백질의 활성을 억제하고 apoptosis를 억제 한다(50). 활성화된 caspase-8는 세포막에 존재하는 cell death receptor가 cell death ligands와 결합하면서 활성화가 되며 caspase-9는 미토콘드리아 막의 투과성이 증가되어 세포질로 방출된 cytochrome c에 의해 활성화가 된다.

이에 활성화된 caspase-8, caspase-9는 effector caspase인 caspase-3을 활성화 시키고 PARP 단백질을 분해하여 apoptosis를 유도 한다(51).

따라서 본 연구에서는 pro-apoptotic인 bax와 anti-apoptotic인 bcl-2와, 비활성 형태인 Pro caspase와 활성형태인 Cleaved caspase의 단백질의 발현을 조사하였다.

이에 방광암 세포 T24, 5637에 K와 CK를 농도별로 처리 하였을 때 5637세포와 T24세포에 K처리 시 anti-apoptotic, po-apoptotic 단백질 모두 유의적인 차이가 없었으며, T24에 CK 처리 시 anti-apoptotic 단백질인 bcl-2는 6, 8mg/ml에서 감소하였으며 pro caspase-9, pro caspase-8, pro caspase-3은 농도가 높아질수록 감소하였고, cleaved caspase-9, cleaved caspase-8, cleaved caspase-3은 증가하는 경향과 PARP의 분절도 농도가 높아짐에 따라 PARP 분절시 관찰되는 Cleaved PARP 밴드가 증가됨을 확인 할 수 있었다.

이상의 결과에서 콤포차 보다 감귤액을 첨가한 감귤 콤포차가 인체 방광암 세

포 T24에 caspase에 의한 apoptosis가 유도되었음을 확인 할 수 있었다. 콤부차에 감귤액을 첨가함으로써 항산화능력 및 인체 방광암세포 T24세포에 성장억제, Annexin V를 통한 apoptosis 유발정도, Western blot을 통한 apoptosis 관련 단백질들의 발현 정도가 콤부차 처리보다 효과가 좋은 결과를 확인 할 수 있었다.

그러나 T24보다 악성도가 높다고 알려진 5637에서 K와 CK처리가 apoptosis 유발에 관여하는 단백질 발현은 확인 되지 못하였다.

이에 감귤액을 첨가한 콤부차에 항산화능 활성화와 콤부차 보다 높은 페놀 함량을 확인할 수 있었으며, 비근침윤성(표재성) 방광암(T24)에 성장억제 및 apoptosis유발 관련 단백질 발현이 나타남으로 감귤 콤부차는 방광암 초기단계에 성장억제 효과와 방광암 예방에 좋은 천연물질로 예상된다.

추후 감귤 콤부차에 대한 항암효과를 다른 인체 암세포에 처리하여 암세포 성장 억제 및 apoptosis 유발에 어떠한 영향을 미치는지 연구가 필요할 것으로 사료된다.

VI. 요약 및 결론

콤부차(K=Kombucha) 와 감귤 콤부차(CK=Citrus Kombucha)의 항산화 능력 및 방광암세포 T24, 5637 세포의 미치는 영향과 Apoptosis 유도 효과를 실험하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 본 실험에 사용된 시료는 K, CK를 배양 하여 12000 rpm에서 20분간 원심 분리 한 후 상등액을 실험에 사용하였으며 세포실험 에는 주사기용 필터유닛 (Pore size 45 μ m)을 이용하여 Filter 한 후 배지(RPMI-1640)에 희석하여 사용 하였다.

2. K와 CK의 항산화 활성능력 및 페놀함량 측정에서 DPPH radical 소거능력 에서 K는 87.9%, CK는 91.2%로 측정 되었고, ABTS radical 소거능력은 K는 78.78%, CK가 94.59%로 K보다 CK가 radical 소거능력이 좋았다.

또한 총 페놀함량에서 CK에서 28.62 μ g/ml로 K보다 함량이 높게 확인되었다.

3. 정상세포 RAW264.7 세포를 이용하여 K, CK의 자체의 독성을 확인하였다. K와 CK를 각각 0, 1, 2, 4, 6mg/ml 수준에서 처리했을 때 생존율 100%이상으 로 확인되었고, K, CK 8mg/ml처리에서는 80%이상의 생존율을 확인하여 방광 암 세포(T24, 5637)에 콤부차와 감귤콤부차 처리 수준을 0-8mg/ml로 설정하였 다.

4. K, CK처리가 방광암 세포독성 정도를 확인하기 위해 방광암 세포 T24에 K와 CK를 0, 1, 2, 4, 6, 8mg/ml 수준에서 처리했을 때 농도가 높아짐에 따라 생존율은 줄어들었고 그 중 CK 처리 6, 8mg/ml 농도에서 낮은 생존율을 보였 으나 세포 5637에서는 T24세포에 K, CK처리 보다 낮은 독성을 확인하였다.

5. K와 CK처리에 따른 방광암 세포의 형태학적 변화는 T24세포는 CK 처리 6, 8mg/ml에서 세포의 응축과 부착력이 상실하면서 배양액에 부유한 모습이 관찰 되었고 세포의 형태적 변화를 동반하였다.

또한 K처리보다 CK 처리가 낮은 세포이동성을 보였으며, 5637세포 보다 T24 세포에서 세포의 이동현상이 뚜렷하고, 많이 억제되었다.

6. apoptosis 초기단계의 apoptosis로 인한 세포사멸의 유발 정도를 확인하기 위한 Annexin V측정에서는 T24세포에 K, CK처리가 농도 의존적으로 증가 하였지만 그 비율이 낮았으며 CK처리 8mg/ml에서만 97%의 비율을 확인하였다. 5637세포 에서는 K, CK 처리 시 apoptosis로 인한 세포사멸의 비율이 모두 15%이하로 확인되었다.

7. Apoptosis 관련 유전자 발현 확인에서 T24세포에 CK처리가 농도가 높아짐에 따라 Bcl-2의 발현이 감소하였고, pro-apoptotic 단백질인 Bax의 발현은 유의적인 차이가 없었으며, 활성형인 Cleaved caspase-9, Cleaved caspase-8, Cleaved caspase-3은 농도가 증가할수록 발현이 되었고, 비활성형인 Pro caspase-9, Pro caspase-8, Pro caspase-3는 농도가 증가할수록 발현이 감소 되었으며 PARP 분절이 증가됨을 관찰 되었다.

5637세포에 K, CK처리에 농도별, 단백질별 유의적인 차이가 없었고. T24세포의 K처리에서도 apoptosis관련 유전자 발현을 확인하지 못하였다.

결론적으로 본 실험을 통해 감귤액을 첨가하여 배양한 감귤 콤부차가 일반 콤부차 보다 높은 항산화 능력 및 페놀함량을 확인하였고, 비근침윤성(표제성)방광암 세포 T24에 성장억제 및 세포사멸을 유도하는 것으로 확인되었지만 악성도가 높은 방광암세포 5637에서는 성장억제 와 세포사멸유도의 결과는 확인 하지 못하였다.

이에 감귤 콤부차는 초기방광암의 진행을 억제할 수 있고, 예방에 효과가 있다고 예상되어지며 다른 암 종의 항암 효능을 입증하기 위해 추후 감귤 콤부차에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

VII. 참고문헌

1. 국가암정보센터. 2015.06. [Http://www.Cancer.Go.kr/mbs/cancer/](http://www.Cancer.Go.kr/mbs/cancer/).
2. Frankfurt, OS, Krishan, A. 2003. Apoptosis-Based Drug Screening and Detection of Selective Toxicity to Cancer Cells. *Anticancer Drugs* 14: 555-561.
3. Banerjee, M, Singh, P, Panda, D. 2010. Curcumin Suppresses the Dynamic Instability of Microtubules, Activates the Mitotic Checkpoint and Induces Apoptosis in MCF 7 Cells. *Febs Journal* 277: 3437-3448.
4. Dupuy, J, Larrieu, G, Sutra, J, Lespine, A, Alvinerie, M. 2003. Enhancement of Moxidectin Bioavailability in Lamb by a Natural Flavonoid: Quercetin. *Vet Parasitol* 112: 337-347.
5. 황용주, 남혜경, 장문정, 노건웅, 김선희. 2003. 표고와 새송이버섯이 대장암 세포 증식 및 세포사멸에 미치는 영향. *한국식품영양과학회지* 32: 217-222.
6. Cvetnic, Z, Vladimir-Knezevic, S. 2004. Antimicrobial Activity of Grapefruit Seed and Pulp Ethanolic Extract. *Acta Pharm* 54: 243-250.
7. Lee, B, Park, K, Ahn, P, Choi, C, Kim, C, Lee, M. 1992. Anticancer Activities of the Extract from the Mycelia of *Coriolus Versicolor*. *Korean Journal of Applied Microbiology and Biotechnology (Korea Republic)* .
8. Carrol, K, Kurowska, E, Guthrie, N. 1999. Use of Citrus Limonoids and Flavonoids as Well as Tocotrienols for the Treatment of Cancer. *International patent WO* 9916167: .
9. Reiss, J. 1994. Influence of Different Sugars on the Metabolism of the Tea Fungus. *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 198: 258-261.
10. Monforte, MT, Trovato, A, Kirjavainen, S, Forestieri, AM, Galati, EM, Lo Curto, RB. 1995. Biological Effects of Hesperidin, a Citrus Flavonoid. (Note II): Hypolipidemic Activity on Experimental Hypercholesterolemia in Rat.

Farmaco 50: 595-599.

11. 김은식, 진영욱, 윤재호, 郭帥, 주덕용, 송원섭. 2011. 천연화장품 신소재 개발을 위한 감귤류 (Citrus) 의 생리 및 면역활성. *한국자원식물학회 2011 년 정기총회 및 춘계학술발표회* 182-182.
12. Koo, MW, Cho, CH. 2004. Pharmacological Effects of Green Tea on the Gastrointestinal System. *Eur J Pharmacol* 500: 177-185.
13. Hase, T, Komine, Y, Meguro, S, TAKEDA, Y, TAKAHASHI, H, MATSUI, Y, INAOKA, S, KATSURAGI, Y, TOKIMITSU, I, SHIMASAKI, H. 2001. Anti-Obesity Effects of Tea Catechins in Humans [和文]. *Journal of oleo science* 50: 599-605.
14. Hesseltine, C. 1983. The Future of Fermented Foods. *Nutr Rev* 41: 293-301.
15. Steinkraus, K, Shapiro, K, Hotchkiss, J, Mortlock, R. 1996. Investigations into the Antibiotic Activity of Tea fungus/kombucha Beverage. *Acta Biotechnol* 16: 199-205.
16. Srinivasan, R, Smolinske, S, Greenbaum, D. 1997. Probable Gastrointestinal Toxicity of Kombucha Tea. *Journal of general internal medicine* 12: 643-645.
17. Frank, GW, Tyndale, A. 1995. *Kombucha: Healthy Beverage and Natural Remedy from the Far East, its Correct Preparation and use*. Publishing House W. Ennsthaler, .
18. Steinkraus, K, Shapiro, K, Hotchkiss, J, Mortlock, R. 1996. Investigations into the Antibiotic Activity of Tea fungus/kombucha Beverage. *Acta Biotechnol* 16: 199-205.
19. Hesseltine, C. 1983. The Future of Fermented Foods. *Nutr Rev* 41: 293-301.
20. Liu, C, Hsu, W, Lee, F, Liao, C. 1996. The Isolation and Identification of Microbes from a Fermented Tea Beverage, Haipao, and their Interactions during Haipao Fermentation. *Food Microbiol* 13: 407-415.
21. Markov, SL, Malbasa, R, Hauk, MJ, Cvetkovic, D. 2001. Investigation of

Tea Fungus Microbe Associations, 1: The Yeasts. *Acta Periodica Technologica (Yugoslavia)* .

22. Chu, S, Chen, C. 2006. Effects of Origins and Fermentation Time on the Antioxidant Activities of Kombucha. *Food Chem* 98: 502-507.

23. Srihari, T, Arunkumar, R, Arunakaran, J, Satyanarayana, U. 2013. Downregulation of Signalling Molecules Involved in Angiogenesis of Prostate Cancer Cell Line (PC-3) by Kombucha (Lyophilized). *Biomedicine & Preventive Nutrition* 3: 53-58.

24. Bhattacharya, S, Manna, P, Gachhui, R, Sil, PC. July 2011. Protective Effect of Kombucha Tea Against Tertiary Butyl Hydroperoxide Induced Cytotoxicity and Cell Death in Murine Hepatocytes. *Indian Journal of Experimental Biology* 511-524.

25. Nargund, VH, Tanabalan, C, Kabir, M. 2012. Management of Non - Muscle-invasive (superficial) bladder cancer. In Seminars in oncology. ELSEVIER 559-572.

26. 변상권. 2006. 방광암 재발 예측에 대한 NMP22의 유용성 평가 및 걱정치 설정. *연세대학교 대학원* .

27. Steller, H. 1995. Mechanisms and Genes of Cellular Suicide. *Science* 267: 1445-1449.

28. Reed, JC. 2001. Apoptosis-Regulating Proteins as Targets for Drug Discovery. *Trends Mol Med* 7: 314-319.

29. Cory, S, Huang, DC, Adams, JM. 2003. The Bcl-2 Family: Roles in Cell Survival and Oncogenesis. *Oncogene* 22: 8590-8607.

30. Simonet, W, Lacey, D, Dunstan, C, Kelley, M, Chang, M, Lüthy, R, Nguyen, H, Wooden, S, Bennett, L, Boone, T. 1997. Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell* 89: 309-319.

31. Jin, Z, El-Deiry, WS. 2005. Overview of Cell Death Signaling Pathways. *Cancer biology & therapy* 4: 147-171.

32. Gross, A, McDonnell, JM, Korsmeyer, SJ. 1999. BCL-2 Family Members

- and the Mitochondria in Apoptosis. *Genes Dev* 13: 1899–1911.
33. Park, BC, Bosire, KO, Lee, E, Lee, YS, Kim, J. 2005. Asiatic Acid Induces Apoptosis in SK-MEL-2 Human Melanoma Cells. *Cancer Lett* 218: 81–90.
34. Degli Esposti, M, Dive, C. 2003. Mitochondrial Membrane Permeabilisation by Bax/Bak. *Biochem Biophys Res Commun* 304: 455–461.
35. Farrow, SN, Brown, R. 1996. New Members of the Bcl-2 Family and their Protein Partners. *Curr Opin Genet Dev* 6: 45–49.
36. Villa, P, Kaufmann, SH, Earnshaw, WC. 1997. Caspases and Caspase Inhibitors. *Trends Biochem Sci* 22: 388–393.
37. Schreiber, V, Dantzer, F, Ame, J, De Murcia, G. 2006. Poly (ADP-Ribose): Novel Functions for an Old Molecule. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7: 517–528.
38. Favalaro, B, Allocati, N, Graziano, V, Di Ilio, C, De Laurenzi, V. 2012. Role of Apoptosis in Disease. *Aging (Albany NY)* 4: 330–349.
39. Blois, MS. 1958. Antioxidant Determinations by the use of a Stable Free Radical.
40. Thongchai, W, Liawruangrath, B, Liawruangrath, S. 2009. Flow Injection Analysis of Total Curcuminoids in Turmeric and Total Antioxidant Capacity using 2, 2'-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl Assay. *Food Chem* 112: 494–499.
41. Lemańska, K, Szymusiak, H, Tyrakowska, B, Zieliński, R, Soffers, AE, Rietjens, IM. 2001. The Influence of pH on Antioxidant Properties and the Mechanism of Antioxidant Action of Hydroxyflavones. *Free Radical Biology and Medicine* 31: 869–881.
42. Lee, G, Chang, H, Kim, H. 1997. Antioxidative and Nitrite-Scavenging Activities of Edible Mushrooms. *Korean J Food Sci Technol* 29: 432–436.
43. Folin, O, Denis, W. 1912. On Phosphotungstic-Phosphomolybdic Compounds as Color Reagents. *J Biol Chem* 12: 239–243.
44. Park, Y, Kim, S, Choi, S, Han, J, Chung, H. 2008. Changes of Antioxidant Capacity, Total Phenolics, and Vitamin C Contents during *Rubus Coreanus*

- Fruit Ripening. *Food Science and Biotechnology* 17: 251-256.
45. Gorinstein, S, Cvikrova, M, Machackova, I, Haruenkit, R, Park, Y, Jung, S, Yamamoto, K, Ayala, ALM, Katrich, E, Trakhtenberg, S. 2004. Characterization of Antioxidant Compounds in Jaffa Sweeties and White Grapefruits. *Food Chem* 84: 503-510.
46. Proteggente, AR, Pannala, AS, Paganga, G, Buren, Lv, Wagner, E, Wiseman, S, Put, Fvd, Dacombe, C, Rice-Evans, CA. 2002. The Antioxidant Activity of Regularly Consumed Fruit and Vegetables Reflects their Phenolic and Vitamin C Composition. *Free Radic Res* 36: 217-233.
47. Halin, C, Rodrigo Mora, J, Sumen, C, von Andrian, UH. 2005. In Vivo Imaging of Lymphocyte Trafficking. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 581-603.
48. Rørth, P. 2009. Collective Cell Migration. *Annual Review of Cell and Developmental* 25: 407-429.
49. 전상현. 2000. 정상 방광 및 방광암에서 Bone Morphogenetic Protein(BMP) 및 BMP 수용체 발현의 의미. *연세대학교 대학원 의학과 석사학위논문*.
50. Cory, S, Huang, DC, Adams, JM. 2003. The Bcl-2 Family: Roles in Cell Survival and Oncogenesis. *Oncogene* 22: 8590-8607.
51. Budihardjo, I, Oliver, H, Lutter, M, Luo, X, Wang, X. 1999. Biochemical Pathways of Caspase Activation during Apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 269-290.

<국문초록>

감귤 콤부차 발효액의
인체 방광암세포에 대한 성장억제와 Apoptosis에 미치는 영향

金 淸 이

濟州大學校 大學院 食品營養學科

指導教授 朴 晟 秀

본 연구에서는 홍차버섯이라고 알려진 콤부차에 플라보노이드 성분 및 각종 기능성 물질들이 풍부한 감귤액을 첨가하여 감귤에 생리활성 물질들이 콤부차로 이행효과를 기대해 감귤 콤부차를 배양하였으며, 감귤액이 첨가된 감귤 콤부차(CK=Citrus Kombucha)와 일반 콤부차(K=Kombucha)를 비교하여 항산화능력과 인체 방광암 세포(T24, 5637)를 이용한 항암효과를 확인하고 더 나아가 암의 증식을 억제시킬 수 있는 천연 소재 탐색을 목적으로 연구를 진행하였다.

이에 항산화, 세포독성, 세포의 형태변화 및 이동성 변화, Annexin v 측정, Apoptosis 관련 단백질을 확인해 보았다.

항산화 및 총 페놀함량 결과는 K보다 CK가 항산화 능력과 페놀함량이 높게 확인되었으며 방광암 세포 T24, 5637에 K와 CK를 24시간 처리 후 MTT assay를 통해 세포독성을 확인 한 결과 농도 의존적으로 생존율이 감소하였지만 K보다 CK처리가 방광암 세포 T24, 5637에 독성이 높았으며, 그 중 T24에 CK처리 6과 8mg/ml처리에서 19.49%, 13.44%로 낮은 생존율을 확인하였고, 5637세포 보다 T24세포에서 K, CK 처리가 세포독성이 더 높게 확인되었다.

세포 형태 변화에서는 T24세포에 CK처리 6과 8mg/ml에서 세포의 형태변화를 확인 하였고 세포의 이동성 측정에서는 T24에 K처리, CK처리 모두 농도 의존적으로 세포 이동이 억제되었지만 CK처리가 K처리 보다 세포이동이 현저하게 낮아 세포에 이동성이 많이 억제가 되었다.

또한 5637세포에 K처리 시 8mg/ml에서만, CK처리 시 농도 의존적으로 세포에

이동이 억제되지만 T24세포에 K, CK처리보다는 세포이동에 억제가 느리게 진행되었다.

초기 Apoptosis에 의한 세포사멸의 비율을 확인하기 위해 Annexin v를 측정 한 결과 T24세포에 CK처리 8mg/ml에서 97%로 확인되었고, 5637세포에서는 K, CK 처리 모두 낮은 비율을 확인하였다.

Western blot을 통해 Apoptosis 관련 단백질 발현을 확인하기 위해 T24, 5637에 K와 CK를 농도별로 처리 하였을 때 5637세포와 T24세포에 K처리 시 anti-apoptotic, pro-apoptotic 단백질 및 caspase 모두 유의적인 차이가 없었으며, T24에 CK처리 시 anti-apoptosis인 bcl-2는 6, 8mg/ml에서 감소하는 것으로 나타났으며 caspase 중 pro caspase-9, pro caspase-8, pro caspase-3은 농도가 높아질수록 감소하였으며 cleaved caspase-9, cleaved caspase-8, cleaved caspase-3은 농도가 높아질수록 증가하는 경향을 보였다. 또한 농도가 높아짐에 따라 PARP분절 시 관찰되는 Cleaved PARP 밴드가 증가됨을 확인 할 수 있었다.

이상의 결과에서 일반 콤포차 보다 감귤액을 첨가한 감귤 콤포차가 인체 방광암 세포 T24에 caspase에 의한 Apoptosis가 유도 됨을 확인 할 수 있었다.

본 실험 결과에서는 감귤액을 첨가한 감귤 콤포차에 일반 콤포차 보다 높은 항산화능력과 페놀 함량을 확인할 수 있었으며, 방광암 세포 T24보다 악성도가 높은 방광암세포 5637에서는 K, CK처리에서 항암의 효과를 확인하지 못하였지만, 비근침윤성(표재성) 방광암(T24)에 성장억제 및 Apoptosis유발 관련 단백질 발현이 나타남으로 감귤 콤포차는 방광암 초기단계에 성장억제 효과와 방광암 예방에 좋은 천연물질로 예상된다.

추후 감귤 콤포차에 대한 항암효과를 다른 인체 암세포에 처리하여 암세포 성장억제 및 Apoptosis유발에 어떠한 영향을 미치는지 연구가 필요할 것으로 사료된다.