



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](#)

박사학위논문

감귤폐기물에 의한 인체 흑색종
세포사멸 및 알킬아닐린 유발독성
억제효과

제주대학교대학원

생명공학부

김 지 혜

2020년 01월

감귤폐기물에 의한 인체 흑색종 세포사멸 및 알킬아닐린 유발독성 억제효과

지도교수 김 민 영

김 지 혜

이 논문을 이학 박사학위 논문으로 제출함

2020년 01월 01일

김지혜의 이학 박사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____ 김 정 현

위 원 _____ 김 민 영

위 원 _____ 문 서 현

위 원 _____ 신 효 숙

위 원 _____ 김 애 란



제주대학교 대학원

2020년 01월 01일

CONTENTS

LIST OF TABLE	i
LIST OF FIGURE	ii
I. ABSTRACT	1
II. 서론	4
III. 재료 및 방법	
1. 감귤폐기물 소재 확보	10
2. 감귤폐기물 활성성분 도출을 위한 용매 추출	12
3. 총 폴리페놀 함량 분석	12
4. 총 플라보노이드 함량 분석	13
5. DPPH를 이용한 라디칼 소거능 측정	13
6. Superoxide 라디칼 소거능 측정	13
7. Hydrogen peroxide 소거능 측정	14
8. Nitric oxide 소거능 측정	15
9. 세포배양	15
10. 세포 독성 측정	16
11. 돌연변이 빈도 측정	17
12. 총 산화질소 생성량 측정	17

13. 유세포 분석기를 이용한 세포주기 및 세포사멸 세포수 측정	18
14. DNA 단편화 현상 측정	19
15. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)에 의한 mRNA 발현 분석.....	19
16. Western blot analysis에 의한 단백질 발현 분석	21
17. Caspase-3 activity 측정	21
18. 멜라닌 합성량 측정	22
19. 통계처리	22

IV. 결과

1. 감귤폐기물을 이용한 흑생종에서의 산화질소 역할 규명 및 암 제어 연구	24
2. 알킬아닐린의 독성유발기전과 감귤폐기물을 이용한 독성저감효과 연구	75

V. 고찰	87
-------------	----

VI. 참고문헌	93
----------------	----

LIST OF TABLE

Table 1. Citrus samples used in this study	11
Table 2. Primers used for RT-PCR	20
Table 3. Induction of cell cycle arrest by 1400W and/or carboxy-PTIO in A375 and SK mel-28 cells	34
Table 4. Apoptosis was calculated by Annexin V /propidium iodide staining in A375 and SK mel-28 cells	35
Table 5. Cell cycle analysis of A375 and SK mel-28 cells by flow cytometry	53
Table 6. Apoptosis was calculated by flow cytometry analysis in A375 and SK mel-28 cells	55
Table 7. Cell cycle analysis of A375 and SK mel-100 cells by flow cytometry	57
Table 8. Apoptosis was calculated by flow cytometry analysis in A375 and SK mel-100 cells	59
Table 9. Activation of caspase-3 by citrus juice processing waste or SNP in human malignant melanoma cells	71
Table 10. Activation of caspase-3 by citrus juice processing waste or SNP in human malignant melanoma cells	72
Table 11. Mutation frequency of AS52 cells by after treatment with <i>o</i> -toluidine, <i>m</i> -toluidine, 2-ethylaniline and 3-ethylaniline in the presence of human S9	78
Table 12. Mutation frequency of AS52 cells by after treatment with immature citrus extracts and/or <i>m</i> -toluidine and 3-ethylaniline in the presence of human S9	84

LIST OF FIGURE

Figure 1. The percentage of viable human malignant melanoma cells following treatment with NOS inhibitors and NO [•] scavenger	26
Figure 2. The percentage of viable A375 cells following treatment with sodium SNP	28
Figure 3. The percentage of viable human malignant melanoma cells following co-treatment of doxorubicin with 1400W and/or SNP	30
Figure 4. The percentage of viable human malignant melanoma cells following co-treatment of cisplatin with 1400W and/or SNP	32
Figure 5. DNA fragmentation by 1400W and/or carboxy-PTIO in A375 and SK mel-28 cells	36
Figure 6. Cellular nitrite level and iNOS mRNA expression by 4 mM of 1400W or 400 μM of carboxy-PTIO alone, or combination (4 mM of 1400W pre-incubated with 200 μM of carboxy-PTIO for 24 h) treated for 72 h in A375 and SK mel-28 cells	38
Figure 7. Expression of survivin, XIAP and cIAP-1 mRNA in A375 and SK mel-28 cells after treatment with 4 mM of 1400W or 400 μM of carboxy-PTIO alone, or combination (4 mM of 1400W pre-incubated with 200 μM of carboxy-PTIO for 24 h) treated for 72 h	40
Figure 8. Total phenol and flavonoid contents of citrus wastes	42
Figure 9. DPPH, superoxide, hydrogen peroxide and nitric oxide scavenging activities of citrus wastes	44
Figure 10. Cell viability in A375 and SK mel-28 cells 24 h after citrus wastes treatment, as determined by trypan blue exclusion assay	46
Figure 11. Cell viability in A375 and SK mel-100 cells 24 h after citrus wastes treatment, as determined by trypan blue exclusion assay	47

Figure 12. Growth inhibition after treatment with citrus wastes in A375 and SK mel-28 cells	49
Figure 13. Growth inhibition after treatment with citrus waste in A375 and SK mel-100 cells	50
Figure 14. Induction of DNA fragmentation by citrus wastes in A375 and SK mel-28 cells	54
Figure 15. Induction of DNA fragmentation by citrus wastes in A375 and SK mel-100 cells	58
Figure 16. Cellular nitrite level by citrus wastes treated for 48 h in A375 and SK mel-28 cells. NOS mRNA expressions by citrus wastes treated for 48 h in A375 and SK mel-28 cells	61
Figure 17. Cellular nitrite level by citrus wastes treated for 48 h in A375 and SK mel-100 cells. NOS mRNA expressions by citrus wastes treated for 48 h in A375 and SK mel-100 cells	62
Figure 18. Effect of citrus waste or SNP in human malignant melanoma cells	64
Figure 19. Effect of citrus waste or SNP in human malignant melanoma cells	65
Figure 20. Expression of DR4 in human malignant melanoma cells after treated with citrus juice processing waste or SNP. Citrus juice processing waste or SNP-induced intrinsic pathway-dependent apoptotic cell death. Effect of citrus juice processing waste or SNP on degradation of apoptotic molecules (PARP and procaspase-9)	67
Figure 21. Effect of citrus juice processing waste or SNP treatment on the levels of p53 and PARP in human malignant melanoma cells. Expression levels of IAP family by citrus juice processing waste or SNP treatment in human malignant melanoma cells	69
Figure 22. Effect of citrus juice processing waste and SNP on melanin content in human malignant melanoma cells	74

Figure 23. Cell viability was determined by trypan blue exclusion assay after 6 h treatment with *o*-toluidine, *m*-toluidine, 2-ethylaniline and 3-ethylaniline in chinese hamster ovary AS52 cells in the absence and presence of human S976

Figure 24. Nitrite production of AS52 cells after treatment with with *o*-toluidine, *m*-toluidine, 2-ethylaniline and 3-ethylaniline in the presence of human S980

Figure 25. Cells were treated with either immature citrus extracts alone or in combination with 1,000 μ M of *m*-toluidine and 3-ethylaniline82

Figure 26. Nitrite production of AS52 cells after treatment immature citrus extracts and/or *m*-toluidine and 3-ethylaniline in the presence of human S986

I . ABSTRACT

Inducible nitric oxide synthase (iNOS) is associated with disease progression in human malignant melanoma. We therefore tested the hypothesis that targeted iNOS inhibition would interfere with cell growth and thereby induce apoptosis in human malignant melanoma cells. Release of nitric oxide (NO[•]) induced by iNOS expression was inhibited by a specific iNOS inhibitor, N-[(3-aminomethyl) benzyl]acetamide (1400W), and/or an NO[•] scavenger carboxy-PTIO in A375 (p53 wildtype) and SK mel-28 (p53 mutant) cell lines, and subsequently led to p53-dependent apoptosis via sub-G1 cell cycle arrest, as indicated by Annexin V/propidium iodide and DNA fragmentation assays. Human malignant melanoma cell apoptosis induced by iNOS inhibition was blocked by an exogenous NO[•] donor, sodium nitroprusside. Comparison of control and 1400W and/or carboxy-PTIO-treated human malignant melanoma cells by quantitative RT-PCR analysis revealed that inhibition of NO[•] synthesis modulated levels of inhibitors of apoptosis family (XIAP, cIAP-1 and -2, and survivin). Collectively, these data show that endogenous NO[•] accelerates cancer cell proliferation activity, and iNOS expression may have predictive value for tumor progression in human malignant melanoma cells.

Citrus wastes such as premature fruit drop and citrus juice processing waste material cause many economic and environmental problems. Citrus wastes were evaluated for their bioactive compounds and antioxidant capacity. The contents of total phenolic and flavonoid pigments were measured using colorimetric method. In addition, free radicals (DPPH, O₂⁻, H₂O₂ and NO[•]) scavenging assays were used to determine the antioxidant capacity. The highest contents of total phenolic and flavonoid pigments were found in citrus wastes. These contents were more prevalent in premature fruit drops than the level found in mature fruits.

All citrus wastes possess an evident antioxidant capacity. The results showed that citrus wastes could be economic and readily accessible source of natural antioxidants and as a possible pharmaceutical supplement.

We investigated the role of nitric oxide (NO[•]) and influence of p53 status during apoptosis induced by these agents in A375 (p53 wildtype) and SK mel-28 (p53 mutant) cells. Citrus wastes inhibited cell growth and promoted apoptosis by the elevation of NO[•]; treatment with citrus juice processing waste in p53 wildtype cell was most effective. Increased NO[•] production after treatment with citrus juice processing waste modulated levels of gene products involved in the apoptosis pathway such as Bax, DR4, Bcl-2, PARP, caspase-3, and inhibitors of apoptosis family (XIAP, cIAP-1 and -2, and survivin), dependently of p53 status. These findings support the hypothesis that citrus wastes are effective apoptosis-promoting agent in human malignant melanoma cells and indicate that NO[•] could be considered a potential target for improvement of the effectiveness of human malignant melanoma treatment.

In this work the influence of citrus wastes on nitric oxide (NO[•]) level and on the apoptotic processes in human malignant melanoma melanin-free A375 and melanin-producing SK mel-100 cells were investigated. Citrus wastes inhibited cell growth and promoted apoptosis by the elevation of NO[•]; treatment with citrus juice processing waste in melanin-free cell was most effective. Gene product levels of inhibitors of apoptosis family were depressed, but increases in p53, PTEN, caspase-3 and PARP occurred, dependently of melanin status. The data suggests that citrus wastes may be beneficial in combating human malignant melanoma and nitric oxide and melanin can be considered as a target for human malignant melanoma chemotherapy.

Exposure to monocyclic aromatic alkyilanilines namely *o*-toluidine, *m*-toluidine, 2-ethylaniline and 3-ethylaniline, was significantly and independently associated with bladder cancer incidence. Chinese hamster ovary AS52 cells were exposed to *o*-toluidine, *m*-toluidine,

2-ethylaniline and 3-ethylaniline for 6 h in the presence and absence of a metabolic activator (human S9 mix). Cell survival was determined by trypan blue exclusion 24 h after treatment, and 6-thioguanine-resistant mutants at the xanthine-guanine phosphoribosyltransferase (*gpt*) gene locus were assessed. Chinese hamster ovary AS52 cells exhibited a dose-dependent increase in cytotoxicity, mutant fraction and nitrite production on treatment of *o*-toluidine, *m*-toluidine, 2-ethylaniline and 3-ethylaniline. Supplementation with immature citrus extract reduced toxicity induced by *o*-toluidine, *m*-toluidine, 2-ethylaniline and 3-ethylaniline. Immature citrus extract also provided protection in oxidant status of *o*-toluidine, *m*-toluidine, 2-ethylaniline and 3-ethylaniline-treated cells. Our results indicate the importance of immature citrus extract as a public health concern and its importance with respect to the high probability of alkyraniline exposures and their toxic effects.

II. 서론

악성 흑색종(human malignant melanoma)은 멜라닌 세포의 악성화로 생긴 종양으로서 전체 피부암의 4%를 차지하지만 그 사망률은 80%에 이르는 치명적인 피부암이다[1, 2, 3]. 여타 암종과 비교하여 볼 때 흑색종은 악성도가 매우 높고 내부 장기로 빠르게 전이되며 화학요법 및 방사선요법에 높은 저항성을 가지기 때문에 조기 발견 후 외과적 수술을 통한 절제만이 현재까지 유일한 치료법으로 인정받고 있다[4, 5]. 역학조사에 의하면 흑색종의 발생빈도는 다른 어떤 종양보다 전세계적으로 빠르게 증가하고 있다고 보고되고 있으며, 서양에서는 흑색종으로 인한 사망률이 높고 매년 발병률이 지속적으로 증가하고 있어 관련연구가 활발히 진행되고 있다[6, 7]. 동양인에서는 발바닥, 손바닥, 손톱 밑과 같은 신체의 말단부에 호발하는 선단형 흑색종이 주를 이루며, 국내에서도 자외선에 대한 노출과 노령인구의 증가로 흑색종 환자가 급증세에 있으나, 드문 발병률 등의 이유로 그 연구가 미비한 수준으로 이를 활성화하기 위한 다양한 방안이 마련되어야 할 것으로 보인다.

암(cancer)은 다단계로 진행되며 크게 개시(initiation), 촉진(promotion) 그리고 진행(progression)의 세 과정으로 구분된다. 이 중 촉진 단계를 표적으로 많은 화학적 암 예방제(chemopreventive agents) 개발이 시도되고 있으며, 산화질소가 관여하는 염증(inflammation) 및 산화적 손상(oxidative stress)이 암 촉진 단계와 밀접한 연관성을 가지고 있다는 결과들이 보고되고 있지만 암세포의 성장과 자연사멸에 있어 산화질소가 어떠한 작용을 하는지에 대한 선행연구는 미비한 실정이다.

산화질소 (nitric oxide, NO)는 3 가지 nitric oxide synthase (NOS): neuronal NOS (nNOS, NOS1), inducible NOS (iNOS, NOS2), endothelial NOS (eNOS, NOS3)로부터 합성되는 물질로 생체 내에서 항상성을 조절하고 신경계와 면역계의 주요매개인자로 작용한다. 뿐만 아니라 산화질소는 그 발생량에 따라 apoptosis를 항진시키거나 저해하는데, 과량 생성된 산화질소가 superoxide anion (O_2^-)과 반응하여 peroxynitrite (ONOO) 등 반응성이 큰 free radical 생성 시 superoxide dismutase (SOD), catalase (CTA), glutathione peroxidase (GPx) 등과 같은 체내 항산화계에 의해 reactive nitrogen species (RNS)가 소거되지 않을 때 산화질소의 과다 축적으로 야기되는 nitrosative stress는 mitochondria의 기능 상실, 핵의 응축, DNA 단편화 등을 초래하며, 암을 비롯한 많은 질병 과정에 작용하는 것으로 알려졌는데 폐혈증, 천식, 당뇨병 섬유증, 파킨슨 질환, 심장마비, 악성 이상고열증 등의 모든 질환이 비정상적인 산화질소 발생을 기본으로 한 신호전달 경로와 관련되어 있다고 보고되었다[8, 9, 10].

실례로 2008년 미국 듀크 대학 연구자들에 의해 산화질소가 시스테인 잔기의 S-nitrosylation을 통해 세포 내 신호 전달에서 작용하며 단백질의 denitrosylation을 통해 caspase-3 활성을 증가시키고 세포사멸을 촉진시키는 것으로 보고되었으며, 2009년 미국 MIT 공대 연구진이 *H. hepaticus*라는 헬리코박터균 감염에 대한 염증세포의 반응으로 생성된 산화질소가 대장 세포를 암으로 변이 시킬 수 있으며, 산화질소 생산에 필요한 효소를 차단함으로써 대장암 발병을 막을 수 있다고 보고하였다[11, 12]. 최근 연구결과에 의하면 낮은 농도의 아스피린 복용이 혈액 중 산화질소 생성에 관여하여 대장암으로 인한 사망률을 획기적으로 줄일 수 있다고 밝혔고, 미국 텍사스대학 엠디앤더슨 암 센터의 Grimm 박사팀은 악성 흑색종 환자들에서 나타나는 높은 산화질소 합성효소 iNOS의 활성은 그들의 희박한 생존률과 밀접한

관련이 있으며, iNOS 활성 저해가 흑색종 증식을 억제하고 화학치료 효과를 증진시킨다는 연구결과를 발표하였다[13, 14, 15, 16]. 이와 더불어 2010년 뉴질랜드 오클랜드 대학 연구진에 의해 산화질소를 포함한 혈관활성화 분자들의 국소적 유리 조절이 암의 혈액 유입을 감소시켜 괴사를 유도한다는 연구결과가 보고되었고, 최근에는 산화질소가 산화적 손상과 미토콘드리아 기능 저해에 의해 진행되는 치매 등 퇴행성 뇌질환 치료를 위한 새 약물표적이 될 수 있다는 결과가 발표되었다 [17, 18]. 이처럼 산화질소는 생체 내에서 암을 포함한 질병발생에 양면적인 역할을 하고 있으며, 따라서 암 제어, 항암치료, 항암신약의 개발은 산화질소의 조절기전에 대한 정확한 이해가 선행되어야 할 것으로 사료된다.

제주지역을 주력시장으로 생산되고 있는 감귤은 재배면적의 확대와 생산량 급증으로 인한 가격경쟁력 확보와 한중 FTA 등 시장개방확대 대응 방책의 일환으로 감귤 원료의 가공품 생산과 새로운 고부가가치 품종 개발이 이루어지고 있다. 하지만 제주감귤산업은 고품질의 감귤을 생산하기 위한 열매 숙기 작업으로 매년 약 5-10만 톤에 이르는 미성숙과 처리에 애로를 겪어왔으며, 해거리 등에 의해 과잉생산 시 산지와 해양에 폐기되어 농가소득에 막대한 손실을 끼쳤다. 게다가 2012년부터 런던협약에 따라 공해상에 부산물 투기가 불가능해짐에 따라 이에 대한 대책이 매우 시급한 실정이므로 적절한 처리법이 요구되고 있다. 비상품 감귤이나 감귤 가공 시 발생하는 감귤박 등의 감귤폐기물을 이용할 경우 농가의 소득증대와 부산물 처리비용의 절감효과 등 긍정적인 효과를 가져올 수 있을 것으로 기대되며, 감귤폐기물을 인위적으로 제거하는 것은 현실적인 어려움이 있어, 이를 효과적으로 자원화하고 높은 부가가치를 창출하기 위해 식품, 의약품, 향장품 등으로의 산업화가 대안으로 제시되고 있다.

현재까지 감귤류에는 polyphenol, flavonoid, carotenoid, limonoid 등 약 60여 종의 기능성 성분이 함유되어 있는 것으로 밝혀졌으며, naringin이나 hesperidin과 같은 주요 flavonoid 외에 polymethoxyflavone이나 coumarin 등 새로운 생리활성 성분의 발견과 아울러 항괴양, c-AMP phosphodiesterase 저해, 항알레르기, 항염증, 항진통 등의 생리작용을 하는 것으로 보고되고 있다[19, 20, 21, 22]. 감귤류의 특징적 성분인 polymethoxyflavone은 혈소판 응집억제, 임파구 증식억제, 항괴양 등의 생물활성을, nobiletin은 항산화 작용을 비롯하여 마우스 피부암 억제작용을 나타내며, hesperidin이나 diosmin은 대장암, 전립선암을 억제하는 것으로 보고되고 있다[23, 24]. 이외에도 quercetin이나 luteolin도 발암 억제 효과를 가지고, 미국 오리건 주립대학의 최근 연구발표에 따르면 감귤류에 포함된 flavonoid가 노화 방지는 물론 암을 비롯한 여러 가지 성인병 예방에 효과를 나타내며, 암과 심질환에 대한 효과를 포함한 모든 메카니즘이 상대적으로 적은 양의 flavonoid에 의해 유도되는데 이는 백신의 효과에 비유될 수 있다고 보고하였다[25]. 2008년 미국 버지니아 주립대학 메시 암 센터/분자의학연구소 연구진들이 췌장암을 예방 및 치료하는 유전자요법 시험결과, 사람의 췌장암이 이식된 마우스에 감귤에 포함되어 있는 식이성분과 cytokine의 유전자를 조합하여 투여 시 암세포가 감수성을 보이며 자연사멸이 촉진되었다는 결과를 발표하였다 [26]. 또한 이와 같이 항산화, 항알레르기, 항염증, 암 증식 억제 작용 등에 유효한 효과를 보이는 다양한 생리활성 성분 함량이 감귤 성숙과에 비해 감귤 미성숙과에서 월등히 높은 것으로 나타나, 감귤 미성숙과의 활용방안에 대한 연구가 지역 감귤 산업 활성화 및 농가 소득 증진에 기여할 수 있을 것으로 전망된다 [27].

선진 각국에서는 이처럼 자연계에 널리 존재하는 천연물질로부터 효능이 우수한 반면 독성이 없는 향암 및 암 예방제를 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 독성이 없는 천연활성물질을 이용하여 암화 과정을 제어하려는 치료법이 실질적으로 암 발생률 및 사망률을 낮출 수 있는 새로운 전략으로 주목 받고 있다. 따라서 본 연구에서는 감귤폐기물을 이용하여 *in vitro*에서 다양한 암세포에 대한 암 생존과 사멸기전의 산화질소 역할 규명 연구를 통해 암 제어기술 확립 및 향암제 개발을 위한 기초지식과 폐기물 자원화 방안을 마련하고자 한다.

현재 전 세계적으로 유통되고 있는 화학물질의 수는 10만여 종에 이르며 매년 2천여 종의 새로운 화학물질이 개발되어 상품화되는 것으로 알려져 있어 이들에 의한 인체 및 환경 위해성이 날로 증가하고 있는 추세이다. 또한 2004년 통계보고에 의하면 우리나라에서 인구 3.8명중 1명(26.3%)이 암으로 사망하고, 해마다 암환자 수가 현저히 증가하는 추세로 이 같은 현상은 비단 우리나라뿐 아니라, 미국, 일본 등 거의 대부분의 나라에서 공통적이지만, 현재 시행되는 발암독성 평가의 장기간 시험과 다수의 동물 사용에 따른 고비용 문제 때문에 매년 완료되는 화학물질의 발암성 평가는 극히 제한되어 있어 적절한 발암성 관련 독성 데이터가 없는 실정이다.

알킬아닐린(alkylaniline)은 공기, 물, 음식 및 담배연기 등 환경도처에서 발견되는 단환방향족고리를 가진 아민으로 염료, 농업, 고무화학, 제약산업에서 원료 또는 용매로 광범위하게 사용되고 있으나, 그 발암 연구자료는 미흡한 실정이다. 단환방향족아민 중 *o*-toluidine만 유일하게 IARC group 1(인체발암물질)이자 EU REACH 사용허가가 필요한 화학물질로 지정되었고, 비흡연과 연관된 방광암 발생위험성으로 인해 2009년부터 미국 NTP를 통해 총괄적인 위해성 평가가

시작되었으나 이와 유사한 화학적 구조를 가진 *m*-toluidine, 2-ethylaniline, 3-ethylaniline은 미규제 대상 물질로 이들의 발암 위해성에 대한 연구가 절실하게 요구되고 있다 [28, 29]. 최근 연구결과에 따르면, 알킬아닐린은 생체 내에서 (i) cytochrome P450과 같은 Phase I 효소작용(N-hydroxylation)에 의해 N-hydroylamine으로 대사된 후 (ii) Phase II 효소의 작용(sulfation 또는 acetylation)으로 quinone imine으로 전환되어 DNA와 반응(DNA adduct 형성)하게 되는데, 이 N-hydroylamine 또는 quinone imine이 일으키는 직접적인 유전독성이 알킬아닐린의 발암성을 촉진시키는 것으로 예측된다 [30, 31].

유전독성시험은 시험물질의 발암성을 예측하기 위한 단기 검색법으로서 포유동물세포를 이용한 염색체이상시험법과 마우스 lymphoma 시험법, 복귀돌연변이 시험법 등이 수십 년 동안 널리 사용되고 있다. 하지만 이 시험법들은 직접적인 DNA 손상을 유발하는 물질만을 대상으로 하고 유전독성 기작에 대한 정보는 거의 알 수 없다는 단점이 있어 본 연국 논문에서는 알킬아닐린의 발암성을 예측하기 위해 표적 유전자 *gpt* (xanthine-guanine phosphoribosyltransferase, 자연돌연변이 발생빈도가 낮고 정확한 결실과 점 돌연변이 검출이 가능하며, intron 부위가 없어 돌연변이 분석에 용이함)를 유전자 돌연변이를 지표(유전적 생체 표지자)로 하여 알킬아닐린의 유전독성을 평가하고자 한다 [32, 33].

Ⅲ. 재료 및 방법

1. 감귤폐기물 소재 확보

실험에 사용된 감귤폐기물 소재는 2011년 7월(1차)과 8월(2차) 유과기에 제주특별자치도 농업기술원으로부터 해거리현상으로 감귤 생산의 격차를 막기 위해 숙아내어 폐기되는 온주밀감 품종 중 흥진조생과 농업기술원 보급품종인 궁천조생, 한라봉 미숙과를 시기별로 제공받아 사용하였다(Group 3-8).

또한 제주특별시 개발공사 감귤복합가공공장에서 발생하는 가공부산물인 감귤 착즙박(Group 9)과 바이오에탄올 생산 시 발생하는 감귤 과피 잔여물(Group 10)을 제주대학교 연구팀으로부터 제공받아 사용하였으며, 제주도에서 가장 많이 생산되는 온주밀감 성숙과의 과피와 과육을 시험군에 포함시켜(Group 1-2) 그 결과를 비교하였다. 전체 시험군은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Citrus samples used in this study

Group	Name	Harvest time
1	Peel of Miyagawa-wase	November 2011
2	Pulp of Miyagawa-wase	November 2011
3	Premature Okisu-wase fruits	July 2011
4	Premature Okisu-wasw fruits	August 2011
5	Premature Sandojosaeng fruits	July 2011
6	Premature Sandojosaeng fruits	August 2011
7	Premature Hallabong fruits	July 2011
8	Premature Hallabong fruits	August 2011
9	Citrus juice processing wastes	December 2011
10	Hydrolysis citrus residues from bioethanol production	ND ^{a)}

^{a)}No Data

2. 감귤폐기물 활성성분 도출을 위한 용매 추출

확보된 감귤폐기물은 농약 및 불순물의 제거를 위해 물로 2회 세척하여 과육과 과피를 분리하고 두께 0.3 cm로 slice하여 -80°C 초저온냉장고에서 1차로 동결한 후, 동결건조기로 3일동안 완전히 건조시켰다. 동결건조된 감귤폐기물은 분쇄하여 0.5 mm mesh의 체에 거른 후, 5 g/100 mL의 농도가 되도록 100% methanol을 첨가하여 25°C , 150 rpm으로 72시간 동안 교반하여 유효성분을 추출하였다. 추출액은 1500 rpm에서 15분 간 원심분리한 뒤 0.45 μm syringe filter로 부유성분을 제거하였으며, 회전증발농축기를 통하여 얻어낸 고형성분을 다시 동결 건조시켜 보관하였다.

실험 시에는 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 이용하여 200 mg/mL의 농도로 stock solution을 만든 다음 적정 농도로 배지에 희석하여 사용하였다.

3. 총 폴리페놀 함량 분석

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis의 방법을 변형하여 측정하였다. 준비된 감귤폐기물을 0.45 μm 실린지 필터로 여과한 뒤 Folin-Ciocalteu 시약(50%), 95% ethanol, DW를 가한다. 5분 후 5% Na_2CO_3 용액을 첨가하고 1시간 동안 발색시킨 다음 microplate reader를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정한다. 표준용액으로 사용된 gallic acid로 산출한 검량선에 의해 총 폴리페놀 함량을 정량하였다.

4. 총 플라보노이드 함량 분석

감귤폐기물을 0.45 μm 실린지 필터로 여과한 후 추출물에 NaNO_2 용액(5%), DW를 가하고, 6분 후 10% AlCl_3 용액을 첨가한 후 다시 6분 간 실온에서 반응시켰다. 4% NaOH 용액을 첨가한 후 DW로 총 용량을 맞추고 잘 혼합한 후 15분 간 실온에서 반응시키고 microplate reader를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. Rutin 표준용액을 사용하여 산출한 검량선에 의해 총 플라보노이드 함량을 정량하였다.

5. DPPH를 이용한 라디칼 소거능 측정

100% methanol로 추출한 여러 농도의 시료용액 100 μL 에 실험직전에 제조한 동량의 4 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 용액을 첨가 혼합하고 빛이 들어가지 않도록 하여 10분 간 실온에서 incubation 하였다. 517 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하여 소거능을 다음공식에 의해 산출하였다.

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\{(C^a) - (CB^b)\} - \{(S^c) - (SB^d)\}}{(C - CB)} \times 100;$$

C^a): control, CB^b): blank control, S^c): absorbances of the sample, SB^d): blank sample,

6. Superoxide 라디칼 소거능 측정

시험관에 50 mM Na₂CO₃ 완충용액(pH 10.5) 1200 μL, 3 mM xanthine 100 μL, 3 mM ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA) 100 μL, 0.15% bovine serum albumin 용액 100 μL, 0.75 mM nitro blue tetrazolium 100 μL의 혼합용액과 감귤폐기물 100 μL를 넣어 25°C의 incubator에서 10분 간 반응시키고, 6 mU/mL xanthine oxidase 100 μL를 가하여 25°C의 incubator에서 20분 반응한 후, 6 mM의 CuCl₂ 20 mL를 첨가하여 560 nm에서 흡광도를 측정하여 소거능을 다음공식에 의해 산출하였다.

$$\% \text{ inhibition} = \frac{[(C^a) - (CB^b)] - [(S^c) - (SB^d)]}{(C - CB)} \times 100;$$

C^a): control, CB^b): blank control, S^c): absorbances of the sample, SB^d): blank sample,

7. Hydrogen peroxide 소거능 측정

96 well plate에 시료와 blank, control을 구분하여, 각 효소별 시료 80 μL에 인산완충용액(0.1 M, pH 5.0) 100 μL와 10 mM의 H₂O₂ 20 μL를 혼합하여 37°C의 incubator에서 5분 간 반응시켰으며, 감귤폐기물에는 실험직전 제조한 1.25 mM 2,2-azinobis(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonicacid 30 μL, blank에는 증류수 30 μL를 첨가한 후 peroxidase (1 U/mL) 30 μL를 시료와 blank에 첨가하여 37°C의 incubator에서 10분 반응시킨 다음 microplate reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하여 소거능을 다음공식에 의해 산출하였다.

$$\% \text{ inhibition} = \frac{[(C^a) - (CB^b)] - [(S^c) - (SB^d)]}{(C - CB)} \times 100;$$

C^{a)}: control, CB^{b)}: blank control, S^{c)}: absorbances of the sample, SB^{d)}: blank sample,

8. Nitric oxide 소거능 측정

감귤폐기물 50 μ L에 인산완충용액(pH 7.0)으로 제조한 10 mM sodium nitroprusside 50 μ L를 첨가하여 25°C의 incubator에서 3시간 동안 반응시킨 후, 100 μ L의 griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% N-1-naphthylethylenediaminedihydrochloridein and 2.5% polyphosphoricacid)와 혼합한 뒤 5분간 반응시켜 540nm에서 흡광도를 측정하여 소거능을 다음공식에 의해 산출하였다.

$$\% \text{ inhibition} = [\{ (C^a) - (CB^b) \} - (S^c) - (SB^d) \} / (C - CB)] \times 100;$$

C^{a)}: control, CB^{b)}: blank control, S^{c)}: absorbances of the sample, SB^{d)}: blank sample,

9. 세포배양

본 실험에 사용된 인간 흑색종 세포 A375 (p53 wild type, melanin-free), SK mel-100 (p53 wild type, melanin-producing), SK-mel 28 (p53 mutant, melanin-producing)을 각각 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100 units/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin과 L-glutamine을 첨가한 dulbecco's modified eagle medium 배지를 이용하여 37°C 습윤한

CO₂ incubator (5% CO₂/95% air)에서 배양하였다. 세포가 배양용기의 80% 정도 증식 시 phosphate buffered saline (PBS)으로 세포를 세척한 후 0.25% trypsin-EDTA로 처리하여 계대 배양하였고 배양액은 3-4일마다 교환하였다.

모든 실험 시 세포를 분주한 후 혈청을 첨가하지 않은 배양액으로 24시간 배양하여 G0기에 동기화를 시행하였다.

10. 세포 독성 측정

Trypan blue exclusion assay를 이용한 세포 생존율 측정은 Kim 등[34]의 방법을 변형하여 다음과 같은 방법으로 측정되었다. 6 well plate에 세포를 2×10^6 cells/well 또는 1×10^6 cells/well 이 되도록 분주하고 시험물질을 농도별, 시간별로 처리한 후 세포배양액과 0.4% trypan blue를 동량으로 넣어 hemacytometer를 이용하여 세포의 증식 정도를 광학현미경으로 관찰하였다. 세포가 염색되지 않으면 살아 있는 세포, 염색되면 죽은 세포로 간주하여 측정하였다. 측정은 모두 세 번 이루어졌으며, 시험물질을 첨가하지 않은 대조군 세포수를 100%로 하여 각 시험물질의 상대적인 생존율을 구하였다.

MTT assay를 이용한 세포독성은 다음과 같은 방법으로 측정되었다. 세포를 5×10^4 cells/mL이 되도록 배양액으로 희석하여 100 μ L의 세포 현탁액을 96 well 배양용기의 각 well에 24시간 동안 배양하여 부착시켰다. 시험물질을 농도별, 시간별로 처리한 후 각 well에 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT, 5 mg/mL)

용액을 첨가하여 4시간 처리한 후 100 μ L의 formazan을 녹여 microplate reader를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포독성은 실험적 특성에 따라 MTT assay와 trypan blue exclusion assay를 적합하게 선택하여 측정되었으며, 모든 실험은 시험물질을 첨가하지 않은 대조군의 세포수를 100%로 각 시험물질의 상대적인 세포생존율을 구하였고, 유전독성 실험은 대사활성을 위해 배지 배지 1 mL 당 16 μ L S9(440 μ g S9 protein)과 65 μ L sterile-filtered core mixture (25 mg/mL NADP, 45 mg/mL DL-isocitric acid)를 첨가하여 진행하였다.

11. 돌연변이 빈도 측정

gpt 유전자 돌연변이 빈도는 Li 등의 방법을 변형하여 세포를 1×10^6 cells/well의 비율로 분주하고 시험물질을 처리한 후 처리시간이 지난 세포를 계대배양하며 7-10일 동안 성장 시켰다. *gpt* 유전자 돌연변이와 클로닝 효율을 결정하기 위해 세포를 선택물질(2 μ M 6-thioguanine)이 첨가되거나 또는 첨가되지 않은 배지에서 배양하였으며, 10-14일 동안 성장시켜 발생한 콜로니를 계수하여 돌연변이 빈도를 측정하였다.

12. 총 산화질소 생성량 측정

Nitrite 생성량은 Kim 등[34]의 방법에 기반하여 측정하였다. 시험물질을 시간별, 농도별로 처리한 배양용기에서 100 μ L씩의 배양액을 취하여 동량의 griess reagent를 첨가하고 이를 10분 간 반응시켜 oxidation product인 NO_2^- 생성 정도를 540 nm 파장에서 측정하였으며, 이때 NO_2^- 농도에 대한 표준곡선은 NaNO_2 를 사용하여 작성하였다.

13. 유세포 분석기를 이용한 세포주기 및 세포사멸 세포수 측정

Cell cycle은 Kim 등[34]의 방법에 따라 분석하였다. 시험 세포주 (2×10^6 cells/well)에 시험물질을 시간별, 농도별로 처리하고 세포를 회수하여 PBS로 세척한 후 70% 에탄올로 4°C에서 30분 동안 고정하였다. 고정된 세포는 1200 rpm으로 12분 동안 원심분리한 다음 상층액을 제거하고 1% FBS가 포함된 PBS로 2-3회 세척하였다. 준비된 세포를 500 μ g/mL의 propidium iodide로 염색한 후 10 μ g/ μ L의 RNase가 포함된 PBS (1% FBS)에 넣어 37°C에서 30분 간 반응시키고 flow cytometer를 이용하여 세포주기를 분석하였다.

세포사멸 세포 수 측정을 위해 세포를 60 mm 배양접시에 2×10^6 cells/well의 밀도로 분주한 후 위와 동일한 방법으로 시험물질을 처리하여 배양하였다. 세포를 PBS로 세척하고 trypsin-EDTA를 처리 수집해 Annexin V와 propidium iodide (500 μ g/mL)로 염색한 후 flow cytometry 방법에 의해 측정하였다.

14. DNA 단편화 현상 측정

세포(2×10^6 cells/well)에 시험물질을 처리하여 배양하고, 세포를 수집하여 GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit를 이용하여 DNA를 분리하였다. 분리한 DNA를 1.8% agarose gel에서 60-90분(50 V) 동안 전기영동을 한 다음 ethidium bromide로 염색하고 UV transilluminator 하에서 DNA 단편화 현상을 관찰하였다.

15. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)에 의한 mRNA 발현 분석

TRI reagent를 이용하여 total RNA를 분리하고 UV spectrophotometer로 정량한 후, top script one-step RT-PCR kit와 각각의 primer (Table 2), DEPC water를 넣고 유전자증폭기로 증폭하였다. mRNA 발현 수준을 비교하기 위하여 각 PCR 산물을 ethidium bromide 용액이 첨가된 1.5% agarose gel에서 60-90분(50 V) 동안 전기영동하여 UV transilluminator를 이용하여 확인하였다.

각 sample의 RT-PCR 산물은 동일한 시료가 나타내는 β -actin 유전자의 RT-PCR 산물을 internal control로 보정한 후 비교 분석하였다.

Table 2. Primers used for RT-PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer
nNOS	5' TTGGGGGCCTGGGATTTCTG G-3'	5' GTTGGCATGGGGGAGTGAGC -3'
iNOS	5' CCAGTGACACAGGATGACCT TCAG-3'	5' -TGCCATTGTTGGTGG AGTAACG-3'
eNOS	5' CCAGCTAGCCAAAGTCACCA T-3'	5' GTCTCGGAGCCATACAGGAT T-3'
Survivin	5' GCATGGGTGCCCCGACGTTG- 3'	5' GCTCCGGCCAGAGGCCTCAA- 3'
XIAP	5' ACACCATATACCCGAGGAAC- 3'	5' CTTGCATACTGTCTTTCTGAG C-3'
cIAP-1	5' AAGTTCCTACCCCTGTCCAAT G-3'	5' CAAGTAGATGAGGGTAACTG GC-3'
cIAP-2	5' CCTGTGGTTAAATCTGCCTTG -3'	5' CAATTCGGCACCATAACTCT G-3'
β -actin	5' GGTCATCTTCTCGCGGTTGGC CTTGGGGT-3'	5' CCCAGGCACCAGGGCGTGA T-3'

16. Western blot analysis에 의한 단백질 발현 분석

상기의 조건에서 배양된 세포에 적정량의 RIPA lysis solution을 첨가하여 4℃에서 1시간 동안 반응시킨 후, 총 단백질을 분리하였다. 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약 사용방법에 준하여 정량한 다음 동량의 5%의 mercaptoethanol이 첨가된 laemmli sample buffer를 섞어서 sample을 제조하였다. 보정된 sample을 sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 전이시킨 후, 비특이적인 단백질과의 결합을 막기 위해 5%의 skim milk를 함유한 T-TBS (10% Tween 20)를 2시간 동안 처리하였다. 처리된 membrane에 1차 항체와 그에 상응하는 2차 항체를 처리하여 반응시킨 후 enhanced chemiluminescence 용액을 적용시킨 다음 ChemiDoc XRS를 이용하여 특정단백질의 발현을 확인하였다.

본 실험에 사용된 1차 antibody로는 anti-NOS1 (diluted 1:500), anti-NOS2 (1:500), anti-NOS3 (1:1000), anti-p53 (1:1000), anti-p21 (1:1000), anti-Bax (1:1000), anti-Bcl-2 (1:1000), anti-DR4 (1:1000), anti-caspase 8 (1:1000), anti-caspase-3 (1:1000), anti-caspase-9 (1:1000), anti-PARP (1:1000), anti-β-actin (1:8000)이 사용되었고, 2차 antibody로는 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody, horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibody를 사용하였다.

17. Caspase-3 activity 측정

시험물질 처리에 따른 caspase-3 activity 변화를 알아보기 위하여 ApoAlert Caspase-3 Colorimetric Assay kit를 이용하였으며, 실험 방법은 다음과 같다. 위와 동일한 실험 조건으로 배양된 세포에 chilled cell lysis buffer 50 μ L를 첨가하여 얼음에서 10분 동안 두고 4 $^{\circ}$ C, 16000 \times g에서 10분 간 원심분리하여 부유액을 수집한 뒤 50 μ L의 부유액에 2 \times reaction buffer/DTT를 50 μ L 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 30분 간 반응시킨다. 반응이 끝나면 caspase-3 substrate (DEVD-pNA) 혹은 caspase-3 inhibitor (DEVD-fmk) 5 μ L를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시킨 뒤 microplate reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다..

18. 멜라닌 합성량 측정

세포를 60 mm plate에 2 \times 10⁶ cells/well이 되도록 분주하여 24시간 동안 부착시키고 시험물질을 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후 수집된 세포에 1N NaOH 용액 1 mL을 첨가하여 100 $^{\circ}$ C에서 30분 간 용해시키고, 12000 \times g에서 20분 간 원심분리하여 얻어진 상층액의 흡광도를 400 nm에서 측정하였다.

시험물질을 첨가하지 않은 대조군 세포의 멜라닌 합성량을 100%로 하여 각 시험물질의 상대적인 합성량을 계산하였다.

19. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 평균 \pm 표준편차로 표시하였으며, 통계적 유의성에 대한 검증은 SPSS program(12.0)의 Duncan' s multiple range test와 student's *t*-test를 이용하여 $p < 0.05$ 일 때만 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

IV. 결과

1. 감귤폐기물을 이용한 흑색종에서의 산화질소 역할 규명 및 암 제어 연구

본 연구에서는 내인성 산화질소가 흑색종 세포 증식에 어떠한 역할을 하고 있는지를 규명하기 위하여 이 세가지 NOS들의 작용을 억제할 수 있는 inhibitor로 내인성 산화질소의 생성을 막거나 세포 내 이미 생성된 내인성 산화질소를 고갈시킬 수 있는 NO[•] scavenger를 이용하였다.

효과적인 NOS inhibitor와 NO[•] scavenger 및 이들의 유효농도를 찾기 위하여 48시간 동안 종양억제유전자 정상 p53을 가진 인간 흑색종 A375 (p53 wildtype) 세포에 아래 NOS inhibitor와 NO[•] scavenger를 농도별로 처리하여 그 세포사멸 정도를 MTT 방법을 이용하여 측정하였다.

사용된 inhibitor로는 NOS 종류에 관계없이 억제효과를 보이는 것으로 알려진 non-specific NOS inhibitor인 N-omega-nitro-L-arginine methylester (NMA), iNOS specific inhibitor인 N-[(3-aminomethyl) benzyl]acetamide (1400W), nNOS specific inhibitor인 Vinyl-L-NIO, eNOS specific inhibitor인 gallotannin 그리고 NO[•] scavenger인 carboxy-PTIO를 사용하였다. iNOS specific inhibitor인 aminoguanidine (AMG)과 gallotannin은 예비실험결과에서 사멸 효과를 보이지 못하여 본 실험에서 제외시켰다.

A375 세포에서 NMA와 Vinyl-L-NIO는 뚜렷한 세포사멸효과를 보이지 못하였으나 (4 mM에서 각각 89와 88%의 생존율), 1400W과 carboxy-PTIO의 경우 저농도에서

고농도로 갈수록 세포사멸효과가 증가하는 현상을 보였다 (Figure 1A). 1400W의 경우 4 mM에서 43%의 생존율을, c-PTIO의 경우 400 μ M에서 36%의 생존율을 보여 흑색종 세포에서 iNOS와 세포내 생성된 내인성 산화질소가 암세포 증식과 관련된 주요역할을 하고 있을 것으로 사료된다.

다음 단계로 20~30%의 생존율을 보이는 각 inhibitor와 scavenger의 한가지 농도를 택하여 24-72시간 동안 세포사멸 양상을 관찰하였으며, p53 유전자에 따라 어떠한 영향을 받는 지 알아보기 위하여 정상적인 p53 유전자(p53 wildtype)를 가지고 있는 A375와 p53 유전자가 변이된 SK mel-28 (p53 mutant) 세포주를 사용하였다 (Figure 1B). 모든 시험군에서 처리시간이 증가함에 따라 생존율이 감소함을 보였고, A375에서는 72시간 동안 1400W, carboxy-PTIO, NMA (200 μ M carboxy-PTIO 전처리) 처리 시 25-32%의 생존율을 보였으며 (Figure 1B), SK mel-28 (p53 mutant)의 생존율이 A375보다 높은 것으로 미루어 p53 유전자가 각 inhibitor와 scavenger 작용에 관여할 것으로 예상된다 (Figure 1C).

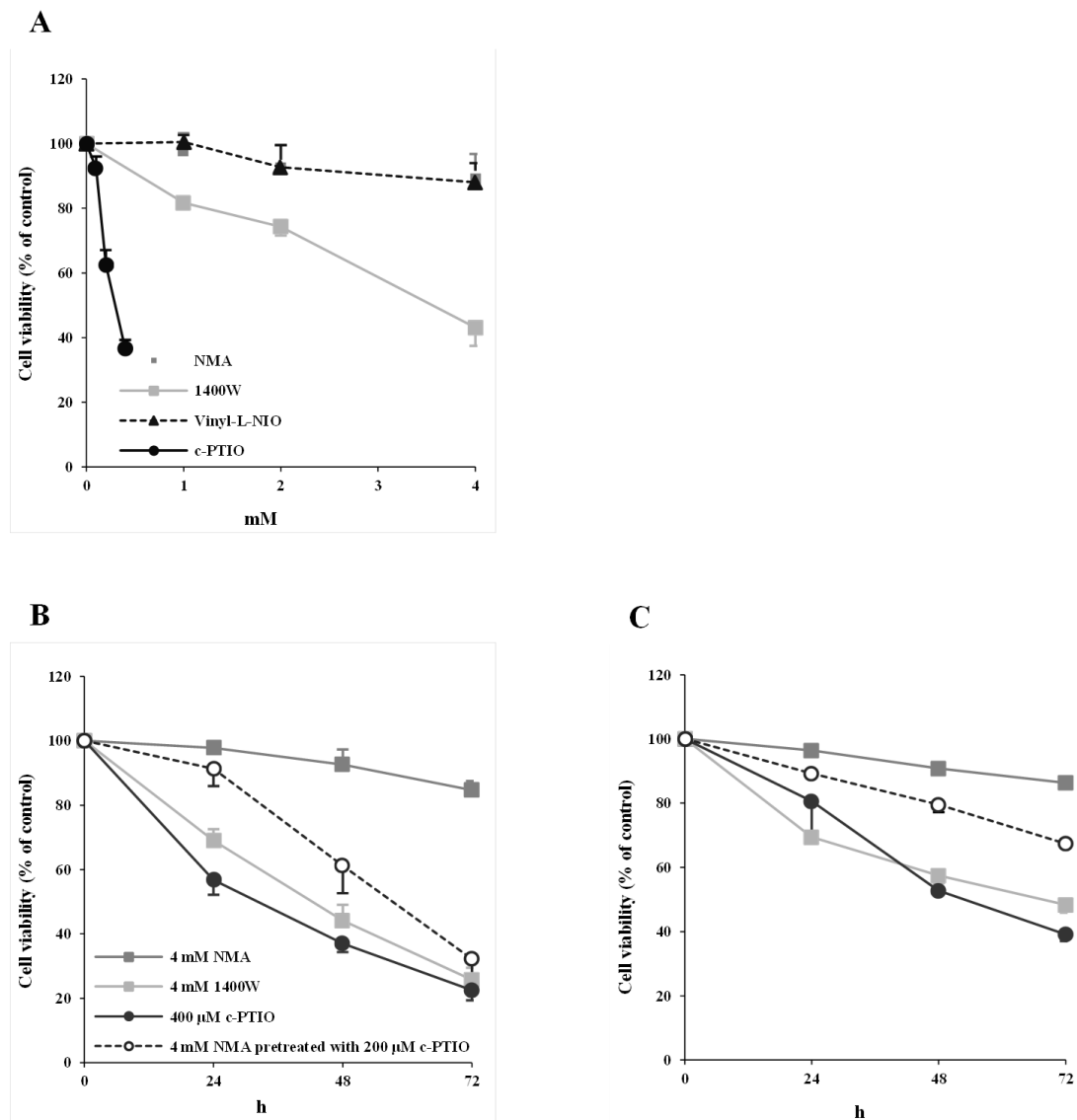


Figure 1. The percentage of viable human malignant melanoma cells following treatment with NOS inhibitors and NO[•] scavenger. The human malignant melanoma A375 cells were treated with the indicated concentration for 48 h (A). A375 (p53 wildtype) (B) and SK mel-28 (p53 mutant) (C) cells were treated with the indicated concentration for 24-72 h. Each point is the mean \pm SD of three experiments.

흑색종의 세포 증식에 영향을 미치는 산화질소의 역치농도를 설정하기 위하여 A375 세포주를 대상으로 산화질소 공여제인 sodium nitroprusside (SNP)를 이용하여 0부터 50 μM 까지 농도별로 처리한 결과 A375에서 48시간 경과 시 100 μM 의 농도까지 증식한 후 그 이상의 농도에서 사멸하는 양상을 나타냈다 (Figure 2).

이 결과를 바탕으로 0.1 μM 의 SNPfmf 이용하여 흑색종 세포내의 산화질소량을 inhibitor와 scavenger를 이용하여 조절함으로써 doxorubicin과 cisplatin의 세포사멸 효과 실험에 적용하였다.

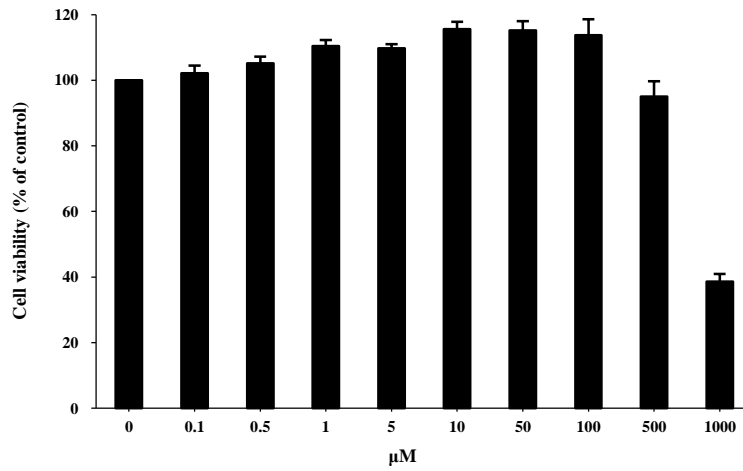


Figure 2. The percentage of viable A375 cells following treatment with sodium nitroprusside (SNP). Cells were treated with the indicated concentration for 48 h. Each point is the mean \pm SD of three experiments.

Doxorubicin은 안트라사이클린계 항생물질의 일종으로 악성림프종, 폐암, 유방암에 뛰어난 항암효과를 나타내며 DNA 염기쌍간에 삽입하여 topoisomerase II, DNA/RNA 중합효소반응을 저해하는 것이 작용기전으로 알려져 있다. 하지만 doxorubicin은 활성산소를 생성함으로써 심독성을 일으킬 수 있으며, 최근 논문에서 doxorubicin의 항암작용을 위해서는 iNOS 활성이 반드시 필요하다는 결과가 발표되었다 [35, 36, 37, 38, 39, 40]. 따라서 NO[•] inhibitor 및 NO[•] scavenger를 doxorubicin과 병용 처리함으로써 세포 내 산화질소 발생량 조절이 항암제의 작용을 증강시킬 수 있는지 확인하였으나, 1400W, carboxy-PTIO 또는 SNP를 병용하여 내인성 산화질소를 조절하였음에도 불구하고 doxorubicin의 세포사멸능에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다 (Figure 3).

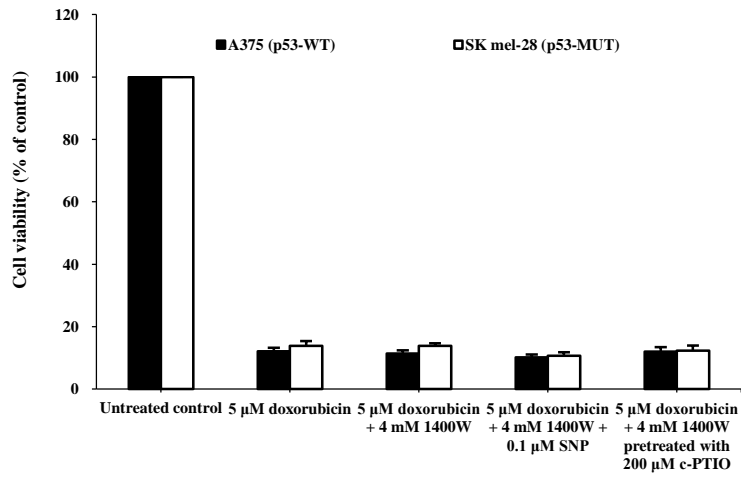


Figure 3. The percentage of viable human malignant melanoma cells following co-treatment of doxorubicin with 1400W and/or SNP. A375 and SK mel-28 cells were treated with the indicated concentration for 24 h. Each point is the mean \pm SD of three experiments.

Cisplatin은 백금화합물 중금속계 항암제로 작용기전은 암세포의 DNA 연결고리와 결합해 DNA 합성을 저해하는 것으로 알려져 있다. Cisplatin은 여러 종양에 유효효과를 가지고 있는 것으로 보고되어, cisplatin과 NO[•] inhibitor 및 NO[•] scavenger의 병용이 산화질소 조절을 통한 암세포 사멸능을 강화시킬 수 있는지 알아보았다.

Cisplatin과 각각의 inhibitor, scavenger의 병용 처리가 산화질소 조절에 따른 암세포 사멸능을 강화시킬 수 있는지 알아보기 위해 실험을 진행하였을 때 병용 처리 시 세포사멸 효과가 증대됨을 알 수 있어 흑색종 세포내의 산화질소의 억제가 기존 항암제의 상승효과를 가져올 수 있으며, 이러한 작용은 정상적인 p53을 가지고 있는 세포주에서 상대적으로 뚜렷한 효과를 보였다(Figure 4).

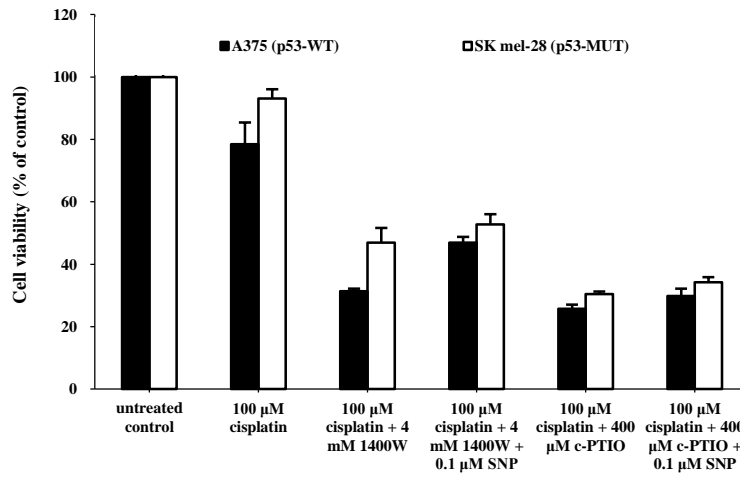


Figure 4. The percentage of viable human malignant melanoma cells following co-treatment of cisplatin with 1400W and/or SNP. A375 and SK mel-28 cells were treated with the indicated concentration for 24 h. Each point is the mean \pm SD of three experiments.

다음으로 NO^{*} inhibitor와 NO^{*} scavenger의 처리가 흑색종 세포의 apoptosis를 유발하는지 확인하였다. Apoptosis 유발 정도를 정량적으로 분석하기 위하여 DNA flow cytometry를 이용하여 세포주기 중 apoptosis가 일어난 세포군에 해당하는 sub-G₁기의 빈도를 조사한 결과, 정상 p53을 지니고 있는 흑색종 세포에 1400W와 carboxy-PTIO 처리 시 각각 43.6%와 31.8%가 sub-G₁기에 속하는 것으로 나타났으나 병용 시 큰 차이를 보이지 않았다 (Table 3). p53 유전자가 돌연변이화된 세포주에서는 1400W와 c-PTIO 처리 후 각각 25.7%와 34.6%가 sub-G₁기에 arrest 되었으며, 모든 세포주에서 SNP를 병용시 sub-G₁기가 감소하는 것으로 나타났다 (Table 3). Annexin V/propidium iodide 염색 결과 또한 cell cycle 결과와 유사하게 apoptosis를 유도함을 확인할 수 있었다 (Table 4). Apoptosis의 결과로서 세포 내 DNA가 180-200 bp의 길이로 잘려지는 특징을 이용한 DNA Fragmentation 실험을 행한 결과 상기의 flow cytometry 결과와 같이 NOS inhibitor와 NO^{*} scavenger 처리시 DNA 단편화 현상 역시 증가함을 관찰할 수 있었다 (Figures 5).

이상의 결과로 보아 내인성 산화질소가 흑색종 세포의 apoptosis 억제에 관여하는 것을 추측할 수 있다.

Table 3. Induction of cell cycle arrest by 1400W and/or carboxy-PTIO in A375 and SK mel-28 cells

	A375	SK mel-28
Vehicle	12.5 ± 0.11%	14.0 ± 1.79%
1400W	43.6 ± 1.71%	25.7 ± 1.07%
1400W + SNP	29.3 ± 1.08%	26.2 ± 1.05%
carboxy-PTIO	31.8 ± 2.14%	34.6 ± 1.82%
carboxy-PTIO + SNP	32.9 ± 0.98%	30.5 ± 1.53%
1400W pretreated with carboxy-PTIO	42.7 ± 1.30%	30.2 ± 0.39%
1400W pretreated with carboxy-PTIO + SNP	31.8 ± 2.52%	26.0 ± 1.34%

Results are presented as a percentage of control cell (mean ± SD).

Table 4. Apoptosis was calculated by Annexin V /propidium iodide staining in A375 and SK mel-28 cells

	A375	SK mel-28
Vehicle	4.7 ± 1.00%	8.8 ± 0.98%
etoposide	40.2 ± 2.45%	30.3 ± 1.41%
1400W	74.2 ± 1.63%	48.3 ± 2.17%
1400W + SNP	54.7 ± 0.80%	42.2 ± 2.91%
carboxy-PTIO	72.1 ± 4.44%	39.5 ± 7.47%
carboxy-PTIO + SNP	70.0 ± 2.20%	26.2 ± 1.53%
1400W pretreated with carboxy-PTIO	71.3 ± 3.93%	70.0 ± 1.32%
1400W pretreated with carboxy-PTIO + SNP	45.6 ± 0.55%	63.7 ± 4.06%

Results are presented as a percentage of control cell (mean ± SD).

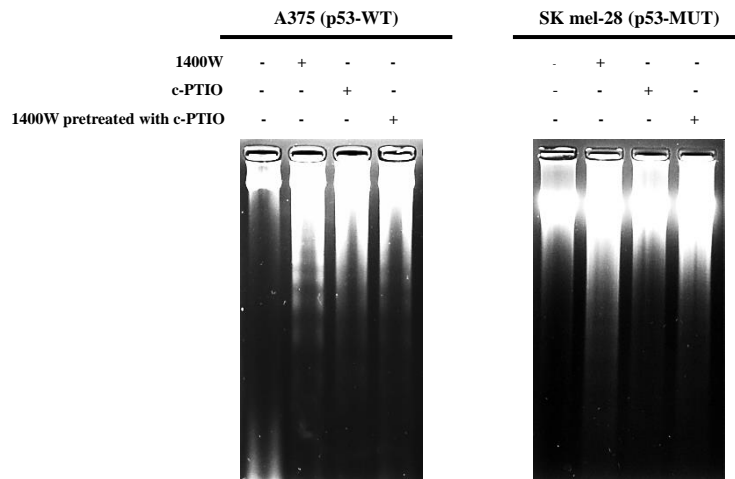


Figure 5. DNA fragmentation by 1400W and/or carboxy-PTIO in A375 and SK mel-28 cells. The cells were treated with 4 mM 1400W and/or 400 μ M carboxy-PTIO for 72 h, DNA extracted and separated by agarose gel electrophoresis. Lane 1, Untreated control; lanes 2 and 3, cells treated with 4 mM 1400W and 400 μ M c-PTIO, respectively; lane 4, cells treated with 4 mM 1400W pretreated with 200 μ M carboxy-PTIO for 24 h.

이상의 연구 결과에서 iNOS specific inhibitor인 1400W와 NO[•] scavenger인 carboxy-PTIO를 단독 또는 병용 시 흑색종 세포의 증식을 억제하고 apoptosis 유발한다는 결과를 확인할 수 있어, 이에 대한 자연사멸 기전 규명을 위해 1400W와 carboxy-PTIO를 단독 또는 병용 시의 iNOS mRNA의 발현변화를 조사하였다.

NO[•] inhibitor와 NO[•] scavenger의 처리가 내인성 산화질소 발생량에 영향을 미치는지 확인하기 위하여 NO[•] 생성량을 측정한 결과, 4 mM 1400W, 400 μM carboxy-PTIO와 두 물질의 병용 시 산화질소 생성량이 현저히 감소함을 확인할 수 있었다 (Figure 6). 또한 4 mM 1400W, 400 μM carboxy-PTIO 단독 처리 시와 두 물질의 병용 시 산화질소 생성량과 iNOS mRNA 발현량이 감소하는 결과를 보였는데, 이를 통하여 내인성 산화질소가 흑색종 세포의 자연사를 억제한다는 사실을 간접적으로 알 수 있다 (Figure 6).

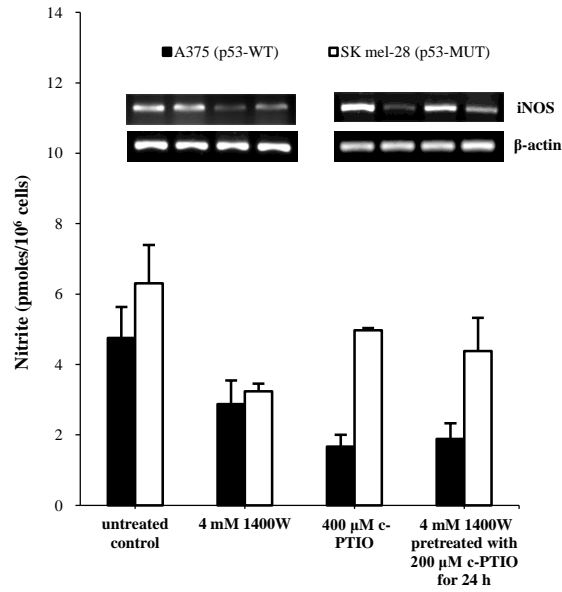


Figure 6. Cellular nitrite level and iNOS mRNA expression by 4 mM of 1400W or 400 μ M of carboxy-PTIO alone, or combination (4 mM of 1400W pre-incubated with 200 μ M of carboxy-PTIO for 24 h) treated for 72 h in A375 and SK mel-28 cells. Results are presented as a percentage of control cells (mean \pm SD, n=3). Lane 1, Untreated control; lanes 2 and 3, cells treated with 4 mM 1400W and 400 μ M c-PTIO, respectively; lane 4, cells treated with 4 mM 1400W pretreated with 200 μ M carboxy-PTIO for 24 h.

세포자연사는 결함이 있는 세포나 인체에 해가 되는 세포를 제거하고 암 발생과 자기면역에 대한 방어역할을 한다 [41]. 세포자연사를 조절하는 중요한 인자들 중 inhibitor of apoptosis family (IAP) 유전자의 발현 및 기능 증가는 세포의 생존능력을 증가시키고, 항암제에 대한 저항을 증가시킨다 [42]. 반면에 IAP 유전자의 발현감소는 여러 자극에 대한 세포자연사의 증가를 유도한다.

정상 p53 유전자를 가지고 있는 흑색종 세포(A375)에서 1400W와 carboxy-PTIO 단독 또는 병용 시 세포자연사를 억제하는 survivin과 cIAP-1의 발현량이 감소하였으며, XIAP의 경우 1400W 단독처리 시 그 발현량이 감소하였으나 c-PTIO 단독 또는 병용 시 발현량 변화를 보이지 않았다. 정상 p53 유전자를 가지고 있지 않는 흑색종 세포(SK mel-28) 역시 유사한 결과를 보여, 내인성 산화질소가 흑색종 세포의 apoptosis 유발에 영향을 미치는 것으로 나타났다(Figure 7).

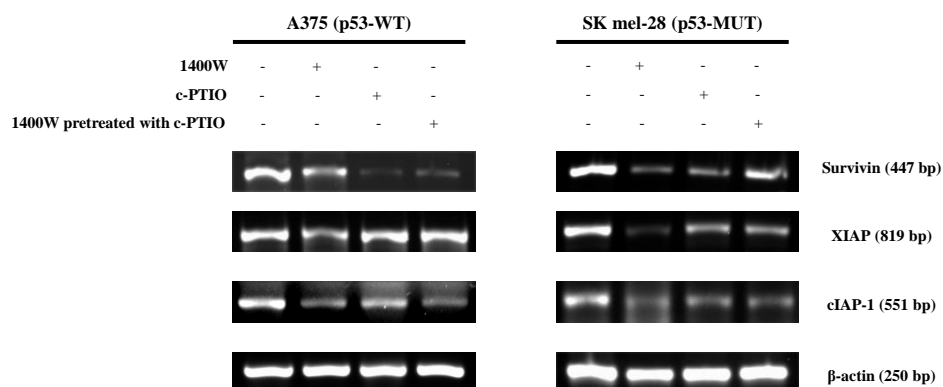


Figure 7. Expression of survivin, XIAP and cIAP-1 mRNA in A375 and SK mel-28 cells after treatment with 4 mM of 1400W or 400 μ M of carboxy-PTIO alone, or combination (4 mM of 1400W pre-incubated with 200 μ M of carboxy-PTIO for 24 h) treated for 72 h. Semi-quantitative PCR was performed using primer specific to survivin, XIAP and cIAP-1 or β -actin control on 1 μ g total RNA prepared from treated cells.

감귤폐기물의 활성성분 분석을 위해 총 폴리페놀 화합물의 함량을 측정한결과, Group 9(착즙박)과 Group 3(흥진조생, 7월 수확)의 총 폴리페놀 함량이 각각 41,554 mg/100 g과 28,272 mg/100 g으로 가장 높았으며, 미숙과 감귤시료(Groups 3-8)의 총 폴리페놀 함량이 22,792-28,272 mg/100 g의 범위로 성숙과(Group 1과 Group 2)와 비교하여 약 2-3.5배 높았다(Figure 8A). 이상의 결과로부터 감귤 주스 가공부산물인 착즙박과 감귤 미숙과에는 성숙과에 비해 항산화 작용을 하는 폴리페놀 화합물이 더 많이 함유되어 있음을 알 수 있다.

총 폴리페놀 결과와 유사하게 Group 10(착즙박)의 총 플라보노이드 함량이 가장 높았으며(13,247 mg/100 g), Group 3(흥진조생, 7월), Group 5(상도조생, 7월), Group 7(한라봉, 7월) 미숙과와 성숙과 과피(Group 1)의 순으로 함량이 높은 것으로 나타났다(Figure 8B). 시기적으로 보아 1차(7월) 유과기에 숙아내 폐기된 감귤 미숙과가 2차(8월) 유과기에 수집된 감귤 미숙과 보다 높은 플라보노이드 함량을 가지고 있는 것으로 나타났다(Figure 8B).

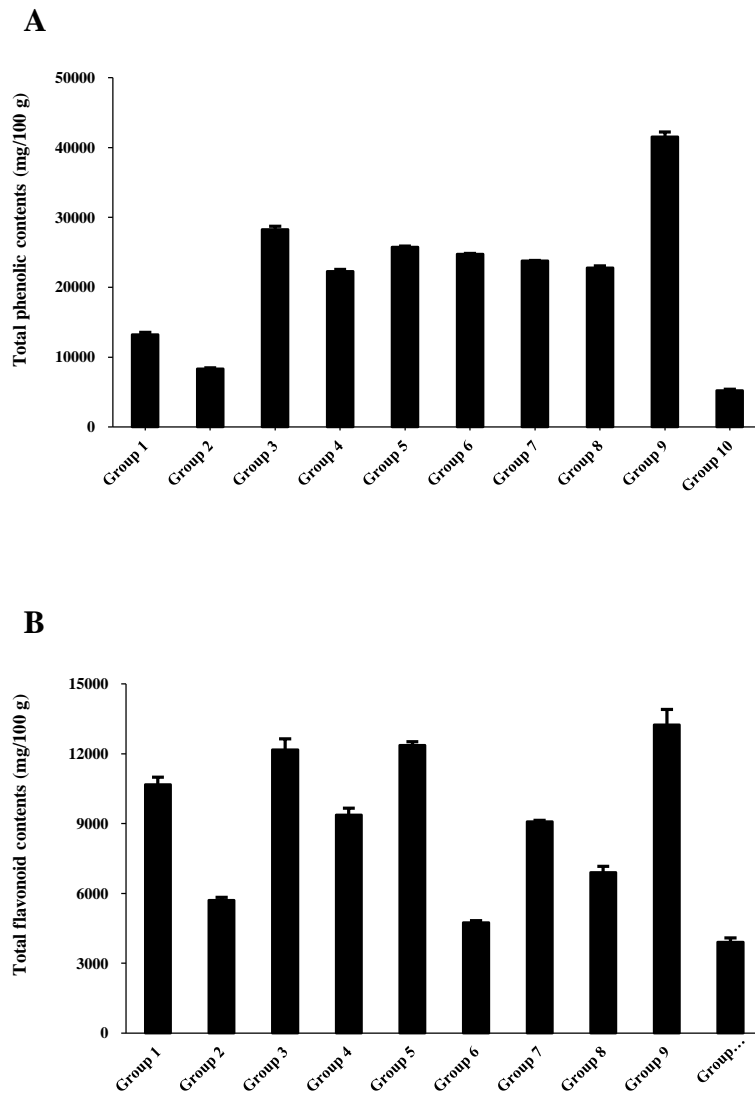


Figure 8. Total phenol (A) and flavonoid (B) contents of citrus wastes. Values are means \pm SD of three separated experiments.

감귤폐기물의 DPPH 유리기 소거활성은 Group 3(상도조생 미숙과, 7월 수집)이 가장 높았으며, Group 10(바이오에탄올 생산 잔여물)이 가장 낮은 활성을 보였다(Figure 9A). 또한 성숙과의 과피(Group 1)와 과육(Group 2)보다 미숙과(Groups 3-8)가 DPPH 소거능이 뛰어난 것으로 나타났다(Figure 9A).

Superoxide 라디칼 소거활성은 DPPH 소거활성 결과와 비슷한 양상을 보였으나 전반적으로 미숙과 시험군들의 superoxide 유리기 소거활성이 성숙과 과육(Group 2)이나 Group 10(바이오에탄올 생산 잔여물)보다 높은 활성을 보였다(Figure 9B).

Hydrogen peroxide (H_2O_2) 소거활성은 Group 9(착즙박)과 Group 8(상도조생, 8월)이 가장 높았으며, Group 10(바이오에탄올 생산 잔여물)이 가장 낮은 활성을 보였다(Figure 9C). 또한 성숙과의 과피(Group 1)와 과육(Group 2)보다 미숙과들(Groups 3-8)의 H_2O_2 소거능이 뛰어난 것으로 나타났다(Figure 9C).

다른 radical들의 소거활성 결과와 달리 nitric oxide 소거활성은 성숙과의 과피(Group 1)와 과육(Group 2)이 가장 높은 효과를 나타냈으며, Group 6 (흥진조생, 8월)의 활성이 가장 낮은 것으로 나타났다(Figure 9D).

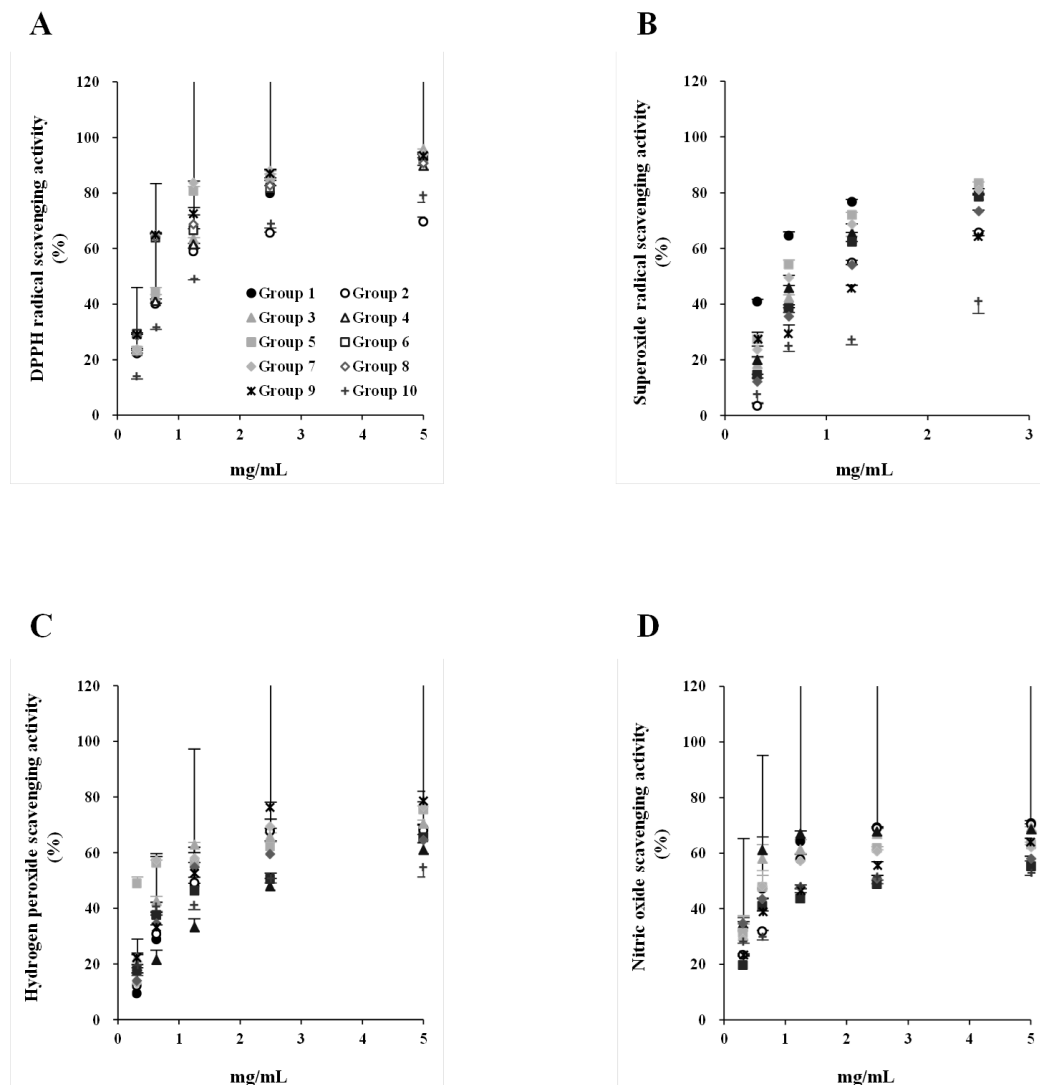


Figure 9. DPPH (A), superoxide (B), hydrogen peroxide (C) and nitric oxide (D) scavenging activities of citrus wastes. All values are the means \pm SD of triplicate determinations.

효과적인 감귤의 생리활성물질 및 이들의 유효농도를 찾기 위하여 24시간동안 중앙억제유전자 정상 p53을 가진 인간 흑색종 세포 A375와 돌연변이 p53을 가진 SK mel-28 세포의 사멸정도를 측정하였다. 저농도에서 감귤폐기물은 흑색종 세포의 증식을 촉진시킨 반면, 고농도에서는 세포증식을 억제하는 결과를 보였다. 두 흑색종 세포에 10개 감귤폐기물을 농도별로 처리하여 상대적으로 세포사멸효과가 높은 5개 group을 선별하였으며 [(i) group 1의 온주밀감 성숙과 과피; (ii) group 3의 7월 수확 홍진조생; (iii) group 5의 7월 수확 상도조생; (iv) group 7의 7월 수확 한라봉; (v) group 9의 착즙박], 모든 시험군의 역치용량은 250 µg/mL으로 나타났다(Figure 10).

또한, 감귤폐기물에 의해 유발된 항암능에 melanin 생성이 어떠한 영향을 미치는지 탐색하기 위하여 melanin을 생성하지 않는 A375와 melanin을 생성하는 SK mel-100을 사용하였다. 감귤폐기물 메탄올 추출물을 처리 농도가 증가함에 따라 SK mel-100의 세포생존율은 감소하였고 A375보다 증식 억제 효과가 적게 나타나는 것으로 보아 melanin이 감귤폐기물의 증식 억제 작용에 관여하는 것으로 사료된다(Figure 11).

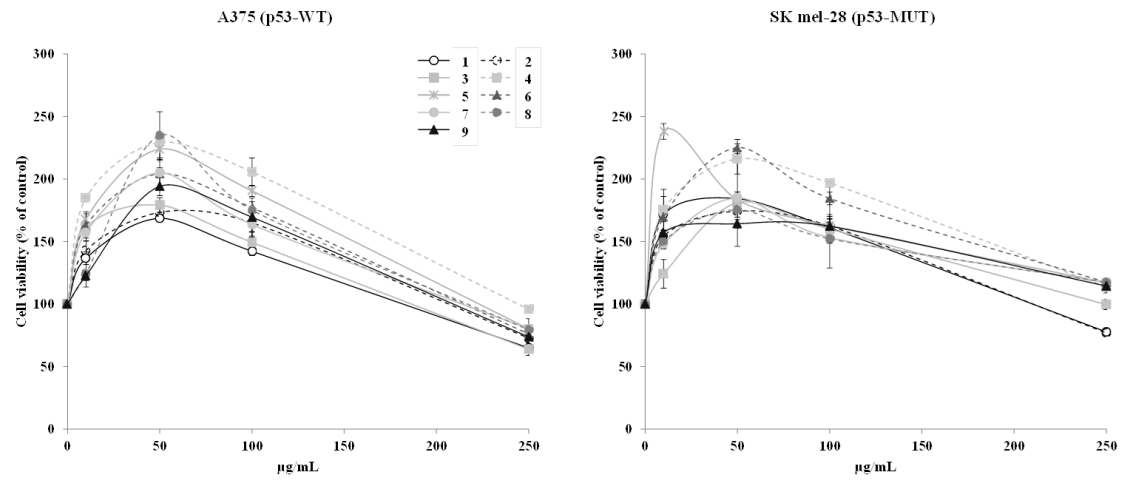


Figure 10. Cell viability in A375 and SK mel-28 cells 24 h after citrus wastes treatment, as determined by trypan blue exclusion assay. Data represent the mean of triplicate experiments. Standard deviation were less than 15%.

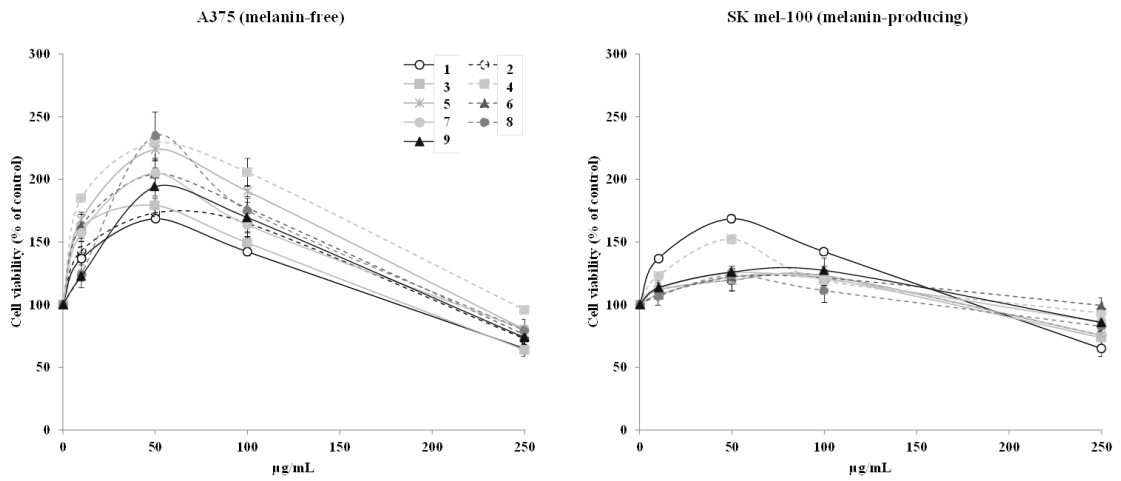


Figure 11. Cell viability in A375 and SK mel-100 cells 24 h after citrus wastes treatment, as determined by trypan blue exclusion assay. Data represent the mean of triplicate experiments. Standard deviation were less than 15%.

상기 용량-독성 결과와, 2차(8월) 유과기에 슈아넨 감귤 미숙과보다 1차(7월) 유과기에 수집된 감귤 미숙과에 더 높은 함량으로 생리활성물질이 포함되어 있다는 연구결과를 바탕으로 본 연구에서는 Group 1(성숙과 과피), Group 3(홍진조생, 7월), Group 5(상도조생, 7월), Group 7(한라봉, 7월), Group 9(착즙박)를 선별하여 실험을 진행하였다.

p53 유전자가 암세포의 자연사멸과 연관성이 있는지 그 역할 규명을 위해 정상 p53 유전자를 지니고 있는 A375와 돌연변이화된 p53 유전자를 지니고 있는 SK mel-28을 사용하였으며, 각 감귤폐기물 추출물을 농도별(200 µg/mL)로 처리하여 24 시간 동안 배양한 후 trypan blue exclusion 방법을 이용하여 측정하였다(Figure 12).

Figure 12에 나타났듯이 감귤폐기물 처리 후 용량 및 시간 의존적 반응을 보이며 72시간 처리 후 생존율이 급격히 감소하는 것을 확인하였다. 감귤폐기물에 의한 세포 사멸은 p53 암억제유전자가 관여하는 것으로 나타났는데 p53 wildtype 세포는 14-21%, p53 mutant 세포의 경우에는 35-44%의 생존율을 보였다.

SK mel-100의 경우 감귤폐기물 추출물 처리 후 48시간이 경과하였을 때, Group 1 53.1%, Group 3 47%, Group 5 55.5%, Group 7 41.2%, Group 9 46.0%로 40-50%의 세포생존율을 보였으며(Figure 13) 같은 조건에서 A375보다 높은 생존율을 보였다. 이로 미루어 보아 melanin 생성 유무가 흑색종 세포의 증식 억제에 영향을 미치는 것을 알 수 있다.

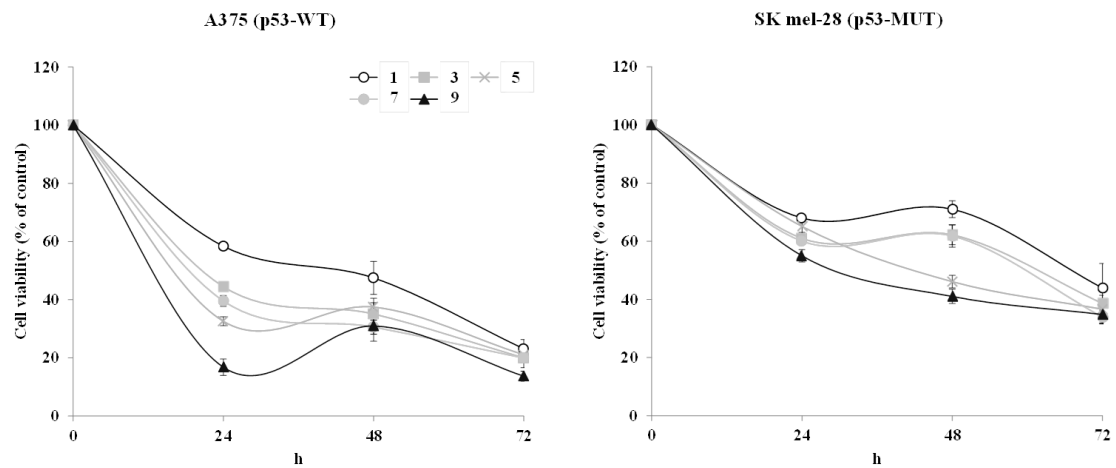


Figure 12. Growth inhibition after treatment with citrus wastes in A375 and SK mel-28 cells. Cells were treated with 200 $\mu\text{g/mL}$ of citrus wastes for 24-72 h. The growth inhibition was measured by trypan blue exclusion assay. Data represent the mean of triplicate experiments. Standard deviation were less than 15%.

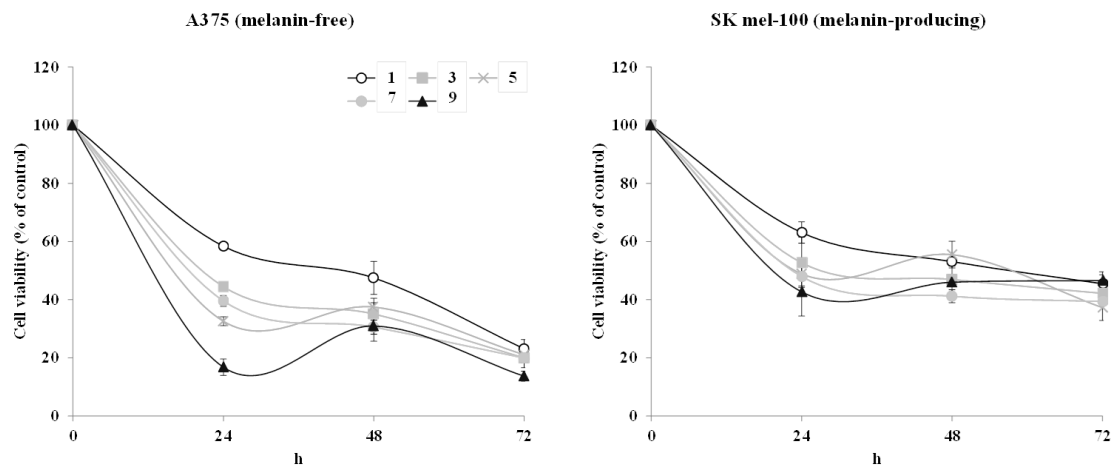


Figure 13. Growth inhibition after treatment with citrus waste in A375 and SK mel-100 cells. Cells were treated with 200 $\mu\text{g/mL}$ of citrus wastes for 24-72 h. The growth inhibition was measured by trypan blue assay. Data represent the mean of triplicate experiments. Standard deviation were less than 15%.

생존율 변화 결과를 바탕으로 감귤폐기물 처리에 의한 흑색종 세포의 증식 억제 현상이 apoptosis를 유발함에 있어 세포주기의 어떤 단계에 관련하는지 알아보기 위해 200 µg/mL로 48 시간 동안 배양된 각 처리군을 propidium iodide 염색액을 통해 염색한 후 DNA flow cytometry를 이용하여 세포주기의 sub-G1에 해당하는 세포들의 빈도를 정량적으로 분석하였다.

A375에 감귤폐기물 추출물을 처리한 결과 sub-G1는 Group 1, Group 3, Group 5, Group 7에서 5-7%, 가장 높은 사멸율을 보인 Group 9에서는 10.7%로 sub-G1기 증가에 따른 세포사멸을 보고하고 있다(Table 5). SK mel-28의 sub-G1비율은 Group 1, Group 3, Group 5, Group 7에서 5-6%, Group 9에서 7.6%로 A375와 유사하였지만 Group 9의 경우 A375보다 sub-G1 빈도가 낮게 나타났다.

감귤폐기물 추출물의 처리가 세포사멸을 유도함에 있어 DNA fragmentation을 형성하는지 관찰하기 위하여 감귤폐기물을 처리한 A375로부터 DNA를 분리하여 DNA fragmentation 형성을 살펴보았다. Group 1의 경우 뚜렷한 DNA fragmentation을 확인할 수 없었으나 Group 3, Group 5, Group 7, Group 9에서는 DNA laddering이 관찰되어(Figure 14) DNA flow cytometry 결과와의 유사성을 나타냈다. 반면 SK mel-28의 경우 DNA laddering이 형성되지만 A375에 비해 명확히 관찰되지 않았다.

감귤폐기물 메탄올 추출물 처리에 의한 흑색종 세포의 증식 저해가 apoptosis 유도에 의한 것임을 Annexin V/propidium iodide 염색을 통해 정량화 하였다. 염색체 응축현상인 apoptotic body가 형성됨에 따라 Annexin V 염색에 의한 초기 apoptosis와 Annexin V/propidium iodide 염색에 의한 후기 apoptosis 세포가 A375의 경우 30-40% 빈도로 나타났으며 Group 5가 49.25%로 DMSO control에 비해 4배가량 높게 나타났다(Table 6). p53이 돌연변이화된 SK mel-28 역시 유사한 경향을 보였으나

Group 5의 경우 22.64%로 A375에 비하여 낮게 나타났다.

Table 5. Cell cycle analysis of A375 and SK mel-28 cells by flow cytometry

	A375	SK mel-28
Vehicle	4.1 ± 0.23%	3.9 ± 0.23%
Group 1	5.4 ± 0.67%	5.7 ± 0.06%
Group 2	5.8 ± 0.70%	5.7 ± 0.05%
Group 3	6.3 ± 0.33%	5.8 ± 0.28%
Group 4	6.1 ± 0.05%	5.7 ± 0.14%
Group 5	10.7 ± 0.24%	7.6 ± 0.48%

Results are presented as a percentage of control cell (mean ± SD).

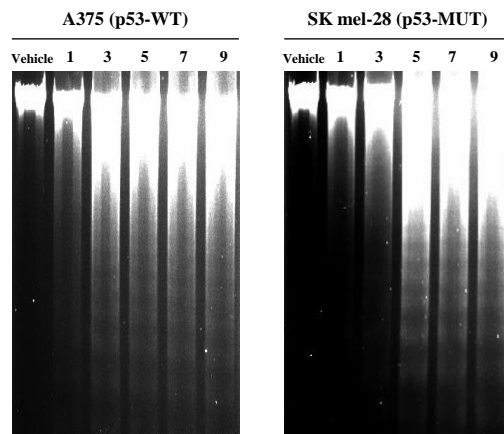


Figure 14. Induction of DNA fragmentation by citrus wastes in A375 and SK mel-28 cells. DNA extracted and separated by agarose gel electrophoresis.

Table 6. Apoptosis was calculated by flow cytometry analysis in A375 and SK mel-28 cells

	A375	SK mel-28
Vehicle	11.6 ± 0.77%	18.4 ± 2.54%
Group 1	24.9 ± 20.28%	18.2 ± 1.56%
Group 2	32.6 ± 0.84%	16.5 ± 0.93%
Group 3	32.7 ± 3.27%	15.8 ± 0.81%
Group 4	35.9 ± 6.21%	12.5 ± 0.44%
Group 5	49.3 ± 3.36%	22.6 ± 1.34%

Results are presented as a percentage of control cell (mean ± SD).

세포주기 중 apoptosis가 진행 중인 세포주기인 sub-G₁기의 빈도를 조사한 결과, SK mel-100의 sub-G₁은 Group 1 3.9%, Group 3 6.1%, Group 5 6.00%, Group 7 6.8%, Group 9 6.5%로 apoptosis 빈도가 증가하였으며(Table 7) melanin을 형성하지 않는 A375와 유사한 경향을 보이는 것으로 미루어 보아 감귤폐기물 메탄올 추출물이 흑색종 세포의 세포주기 지연을 일으켜 sub-G₁ 기를 증가시킴으로써 사멸을 유도하는 것으로 여겨진다.

Melanin 형성 여하에 따른 세포사멸 유도를 확인하기 위해 A375와 SK mel-100을 비교한 결과 상기와 유사하게 DNA fragmentation이 증가하는 경향을 나타냈다(Figure 15).

Annexin V-FITC apoptosis assay 결과, 감귤폐기물 메탄올 추출물을 200 µg/mL의 농도로 48시간 동안 처리 하였을 때 SK mel-100에서도 20-30%로 A375에 비하여 apoptosis가 적게 일어났음을 확인하였다(Table 8). 이상의 결과는 melanin 형성 여부가 흑색종 세포의 apoptosis 유도에 기인함을 알 수 있다.

Table 7. Cell cycle analysis of A375 and SK mel-100 cells by flow cytometry

	A375	SK mel-100
Vehicle	4.1 ± 0.23%	1.8 ± 0.41%
Group 1	5.4 ± 0.67%	3.9 ± 0.12%
Group 2	5.8 ± 0.70%	6.1 ± 0.81%
Group 3	6.3 ± 0.33%	6.0 ± 0.09%
Group 4	6.1 ± 0.05%	6.8 ± 0.30%
Group 5	10.7 ± 0.24%	6.5 ± 0.16%

Results are presented as a percentage of control cell (mean ± SD).

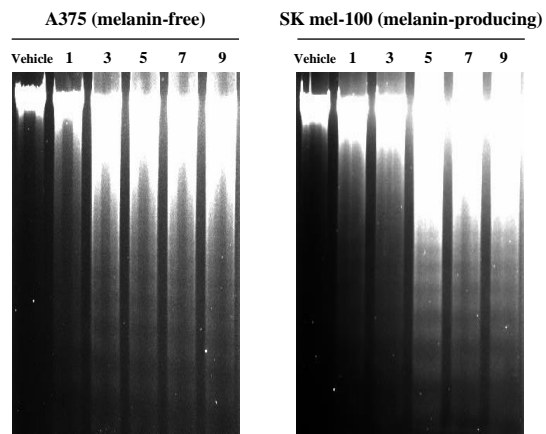


Figure 15. Induction of DNA fragmentation by citrus wastes in A375 and SK mel-100 cells. DNA extracted and separated by agarose gel electrophoresis.

Table 8. Apoptosis was calculated by flow cytometry analysis in A375 and SK mel-100 cells

	A375	SK mel-100
Vehicle	11.6 ± 0.77%	11.8 ± 1.34%
Group 1	24.9 ± 20.28%	20.4 ± 0.66%
Group 2	32.6 ± 0.84%	24.9 ± 4.25%
Group 3	32.7 ± 3.27%	22.4 ± 3.19%
Group 4	35.9 ± 6.21%	31.3 ± 1.39%
Group 5	49.3 ± 3.36%	31.5 ± 2.72%

Results are presented as a percentage of control cell (mean ± SD).

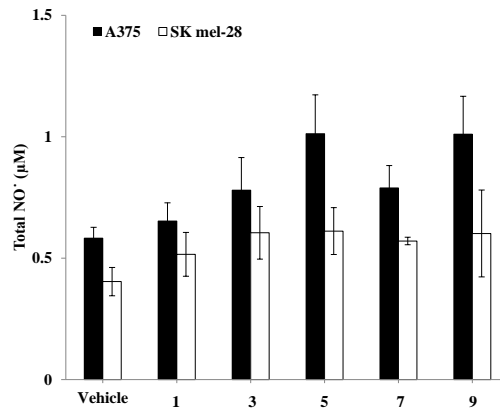
감귤폐기물 처리 시 배지 내 산화질소 발생량이 증가하였는데, A375 세포에서 Group 3A와 Group 5가 다른 처리군에 비해 산화질소 생성량이 많았다(Figure 16A). SK mel-28 세포에서도 감귤폐기물 처리 시 산화질소 발생량은 증가하였으나 A375 보다 적게 생성되었으며 처리 물질 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

산화질소 생성 증가가 산화질소 합성 효소의 발현 증가에 따른 것인지 알아보기 위해, RT-PCR을 통해 산화질소 합성 효소의 전사수준에서의 발현을 확인하였다. A375에서 nNOS, eNOS의 발현량은 DMSO 단독 처리군에 비해 증가하였으나 iNOS의 발현은 감소하였고, SK mel-28에서는 모든 산화질소 합성 효소의 발현이 대체적으로 증가하였다(Figure 16B).

SK mel-100 세포도 감귤폐기물 처리 시 산화질소 발생량이 증가하였지만 A375 보다 낮게 나타났다 (Figure 17A). 상기의 결과로 감귤폐기물 메탄올 추출물에 의한 흑색종 세포에 대한 세포독성에 산화질소와 멜라닌이 관여함을 간접적으로 알 수 있다.

세 가지 NOS에 대한 RT-PCR 결과, SK mel-100에서는 전반적으로 세 가지 산화질소 합성 효소 모두 과발현되었고 이는 산화질소의 생성이 산화질소 합성효소의 전사 수준에서의 발현 증가에 의한 것임을 시사한다(Figure 17B). 따라서 감귤폐기물 메탄올 추출물 처리에 의한 흑색종 세포의 증식 억제 현상과 apoptosis 유발에 산화질소의 생성, 산화질소 생성효소의 발현 변화 및 멜라닌이 동반되고 있음을 알 수 있다.

A



B

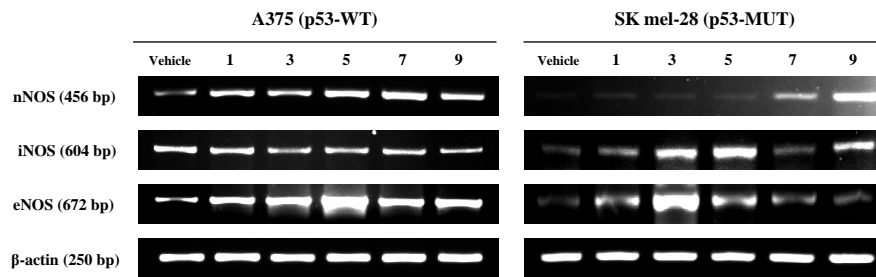


Figure 16. Cellular nitrite level by citrus wastes treated for 48 h in A375 and SK mel-28 cells

(A). NOS mRNA expressions by citrus wastes treated for 48 h in A375 and SK mel-28 cells

(B). Results are presented as a percentage of control cells (mean \pm SD, n=3).

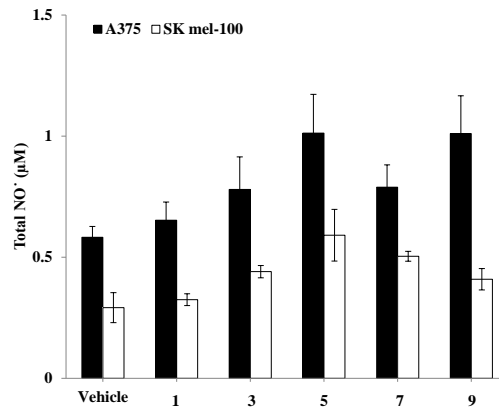
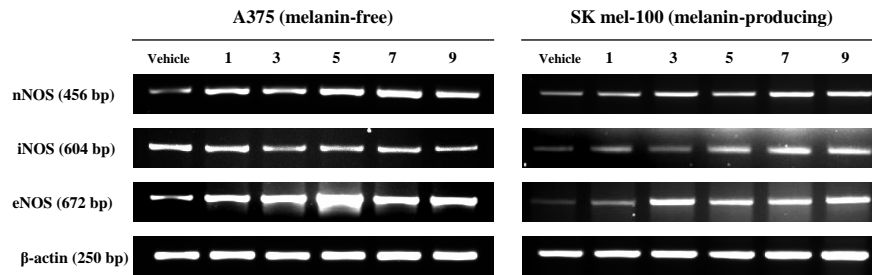
A**B**

Figure 17. Cellular nitrite level by citrus wastes treated for 48 h in A375 and SK mel-100 cells (A). NOS mRNA expressions by citrus wastes treated for 48 h in A375 and SK mel-100 cells (B). Results are presented as a percentage of control cells (mean \pm SD, n=3).

본 연구에서는 산화질소 공여제에 의해 유입된 외인성 산화질소가 암세포 종에 대한 항암능을 지니고 있는지 탐색하고, 감귤폐기물과 비교 분석을 통해 그 이용가능성을 평가하기 위하여 외인성 산화질소 공여제 SNP를 이용하여 암세포의 생존율 변화를 조사하였다. SNP 처리 농도가 증가함에 따라 흑색종 세포의 생존율이 현격히 감소되었으며, 정상 p53 유전자를 가지고 있는 A375의 생존율이 p53이 돌연변이화된 SK mel-28 보다 낮은 것으로 미루어보아 p53 유전자가 외인성 산화질소에 의한 증식 억제 작용에 영향을 끼치는 것으로 사료된다 (Figure 18).

외인성 산화질소가 흑색종 세포의 증식억제에 영향을 미치는지 알아보고, 흑색종 세포내의 melanin 형성 유무가 어떠한 역할을 하는지 알아보기 위하여 melanin을 생성하지 않는 A375와 melanin을 생성하는 SK mel-100을 이용하여 외인성 산화질소 공여제 SNP에 의한 생존율 변화를 탐색하였다. SNP를 농도별 (0-1 mM)로 48시간 동안 처리하였을 때 A375 세포의 증식이 점차적으로 저해되어 1 mM에서 약 28%의 생존율을 나타내었고, SK mel-100은 이보다 높은 약 46%로 melanin이 SNP에 의한 증식 억제에 관여하는 것으로 여겨진다 (Figure 19).

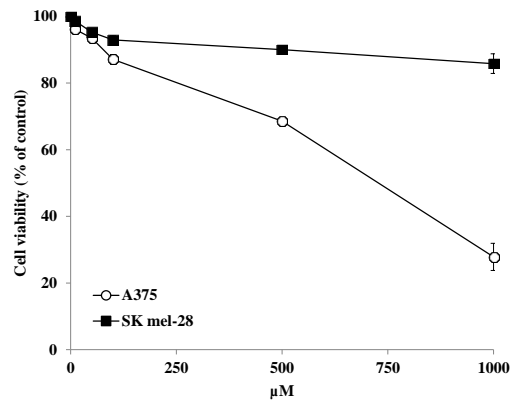


Figure 18. Effect of citrus waste or SNP in human malignant melanoma cells. The data are presented as mean \pm SD of three separated experiments.

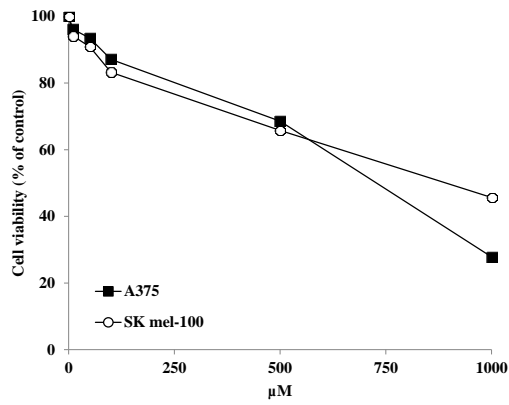


Figure 19. Effect of citrus waste or SNP in human malignant melanoma cells. The data are presented as mean \pm SD of three separated experiments.

감귤 착즙박 및 SNP에 의해 발생하는 흑색종 세포의 자연사멸이 apoptosis의 어떤 경로에 의한 것인지 확인하기 위하여 death receptor 중 DR4의 발현을 조사한 결과 A375 및 SK mel-28에서 다소 감소하거나 큰 변화를 보이지 않았다(Figure 20A).

A375와 SK mel-28에 대한 감귤 착즙박 및 SNP의 apoptosis 유도 경로를 탐색하기 위하여 대표적인 intrinsic pathway 조절인자인 Bcl-2 family: Bax, Bcl-2와 apoptosis 기전에 있어서 중요한 역할을 하는 procaspase-9, PARP의 발현 양상을 western blot analysis을 통해 조사하였을 때, 농도-의존적으로 Bax와 Bcl-2의 비율이 증가되었고 procaspase-9 및 PARP의 단편화 현상 또한 증가함을 확인할 수 있었다(Figure 20B and 20C). 이상의 결과를 살펴볼 때 감귤 착즙박 및 SNP에 의해 유발된 apoptosis는 intrinsic pathway에 의한 것으로 예상된다.

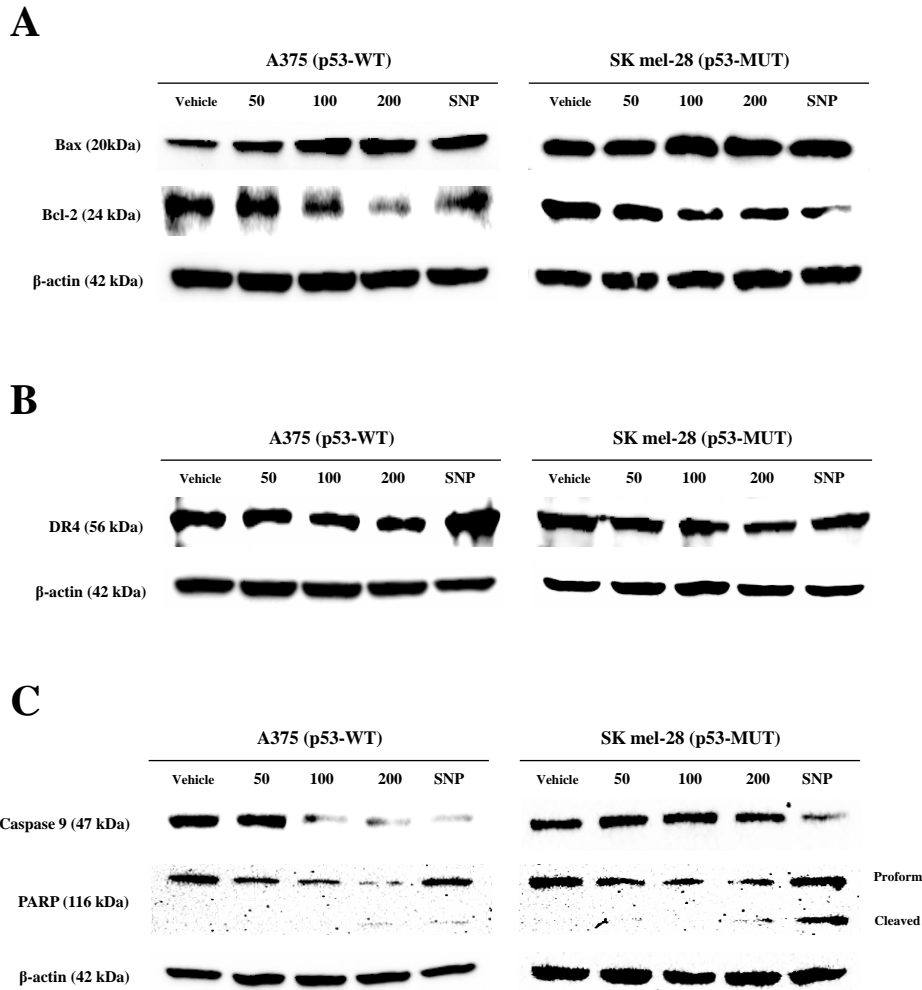


Figure 20. Expression of DR4 in human malignant melanoma cells after treated with citrus juice processing waste or SNP (A). Citrus juice processing waste or SNP-induced intrinsic pathway-dependent apoptotic cell death (B). Effect of citrus juice processing waste or SNP on degradation of apoptotic molecules (PARP and procaspase-9) (C). β -actin was used as an internal control.

Melanin 생성 여하에 따른 암세포 사멸기전 해석을 위하여 apoptosis 유발에 핵심적인 역할을 하는 주요 종양억제유전자 p53 및 DNA 안정화와 수선에 관여하는 PARP 유전자의 발현 변화를 조사하였다. Figure 21A에서 볼 수 있듯이 감귤 착즙박 처리 농도에 비례하여 p53 발현과 PARP 분절화가 증가되었으며 SNP 처리 시 가장 뚜렷하게 나타났지만, A375 및 SK mel-100 세포 간의 큰 차이는 관찰되지 않았다.

다음으로 caspase와 결합하여 활성을 차단함으로써 apoptosis 조절에 관여하는 대표적인 유전자 IAP와 Akt/PKB 신호경로를 차단하여 자연사멸을 유도하는 PTEN 유전자의 발현 변화를 조사하였을 때, A375의 경우 survivin, XIAP, cIAP-1의 발현이 감소하였으며 cIAP-2와 PTEN의 발현이 소폭 상승하였다. 이러한 IAP의 발현 변화는 SK mel-100에서도 유사한 양상을 띠었지만, A375의 결과와는 판이하게 SK mel-100에서는 survivin 유전자의 발현 변화가 나타나지 않아 melanin이 survivin 유전자에 의해 조절되어지는 세포사멸 기전을 억제하는 것이라 유추된다 (Figure 21B).

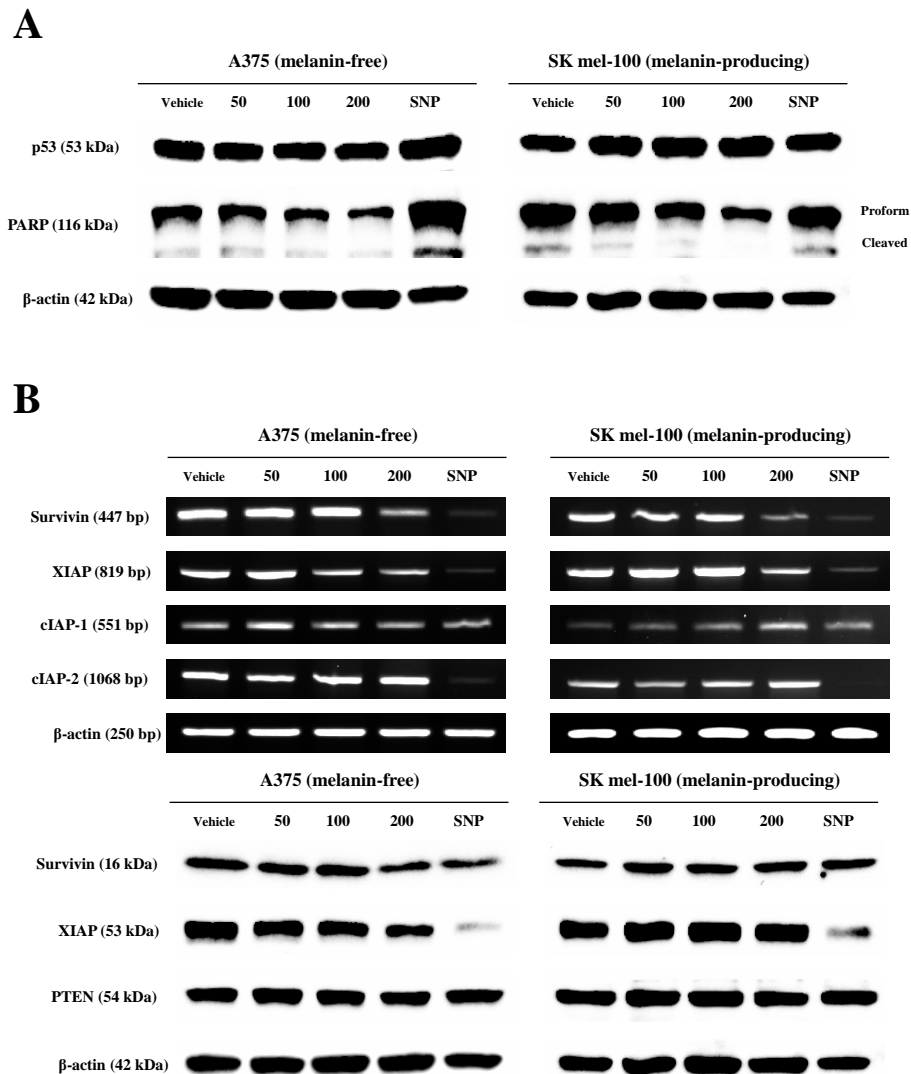


Figure 21. Effect of citrus juice processing waste or SNP treatment on the levels of p53 and PARP in human malignant melanoma cells (A). Expression levels of IAP family by citrus juice processing waste or SNP treatment in human malignant melanoma cells (B). β -actin was used as an internal control.

상기의 결과를 재확인하기 위하여 apoptosis 유발 과정에 핵심적인 작용을 하는 caspase의 활성화에 감귤 착즙박이 영향을 미치는지 알아보기 위하여 effector caspase로 알려진 caspase-3의 활성을 caspase-3 특이적 저해제 z-DEVD-fmk를 처리하여 억제된 뒤 caspase-3 활성 정도를 분석하였다. A375의 경우 caspase-3의 활성이 감귤 착즙박을 처리하였을 때 대조군에 비하여 약 2.5배가량 증가하였고, SNP를 처리하였을 때 약 5.6배 증가하여 가장 높은 활성을 나타내었다. 하지만 SK mel-28은 감귤 착즙박 및 SNP를 처리하였을 때 약 1.5배 증가하며 A375와 확연한 차이를 나타내어 흑색종 세포의 자연사멸 기전에 p53 유전자가 주요한 역할을 하는 것으로 생각된다 (Table 9).

SK mel-100 역시 caspase-3 활성이 증대되었지만 A375 보다 낮은 활성을 나타내어 감귤 착즙박의 흑색종 세포에 대한 세포독성에 melanin이 관여함을 알 수 있다 (Table 10).

Table 9. Activation of caspase-3 by citrus juice processing waste or SNP in human malignant melanoma cells

	A375	SK mel-28
Vehicle	100	100
50 μ g/mL	131.02 \pm 8.239	100.7 \pm 0.97
100 μ g/mL	154.05 \pm 22.456	105.1 \pm 6.32
200 μ g/mL	264.4 \pm 0.69	147.3 \pm 6.77
500 μ M SNP	559.9 \pm 3.86	146.5 \pm 19.51

Results are presented as a percentage of control cell (mean \pm SD).

Table 10. Activation of caspase-3 by citrus juice processing waste or SNP in human malignant melanoma cells

	A375	SK mel-100
Vehicle	100	100
50 μ g/mL	131.02 \pm 8.239	131.2 \pm 3.00
100 μ g/mL	154.05 \pm 22.456	141.7 \pm 17.89
200 μ g/mL	264.4 \pm 0.69	228.5 \pm 4.33
500 μ M SNP	559.9 \pm 3.86	386.6 \pm 1.601

Results are presented as a percentage of control cell (mean \pm SD).

Melanin은 tyrosinase에 의해 합성되는 색소로 외부 자극에 대해 피부세포를 보호하는 역할을 하지만 melanin의 과잉 생산은 피부암을 유발하거나 흑색종의 악성도를 증강시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 감귤 착즙박 및 SNP의 처리가 인간 흑색종 A375 세포와 SK mel-100 세포의 melanin 생합성능에 영향을 주는지 알아보기 위하여 melanin 합성량을 조사하였다. 그 결과 Figure 22에 나타난 바와 같이 A375에선 melanin 합성량 변화가 관찰되지 않았지만, SK mel-100에서 감귤 착즙박과 SNP에 의해 melanin 합성량이 유의적으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 현상은 감귤 착즙박 및 SNP에 의해 발생된 nitrite가 SK mel-100의 tyrosinase를 활성화하여 melanin 합성에 기인한 것이라 예상된다.

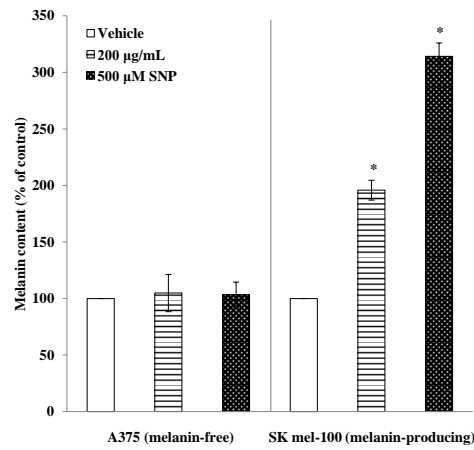


Figure 22. Effect of citrus juice processing waste and SNP on melanin content in human malignant melanoma cells. Each point is the mean \pm SD of three experiments ; * $p < 0.05$, as compared with vehicle.

2. 알킬아닐린의 독성유발기전과 감귤폐기물을 이용한 독성저감효과 연구

알킬아닐린이 chinese hamster ovary AS52 세포에 미치는 독성을 평가하고 그 유효농도를 설정하기 위하여 trypan blue exclusion assay를 이용하여 세포 생존율 변화를 측정하였다. 4종의 알킬아닐린 이형성체를 농도별(0-1,000 μM)로 6시간 동안 처리한 결과 Figure 23A와 같이 농도 의존적으로 AS52의 생존율이 감소하였으며, 1,000 μM 처리 시 80-83%의 생존율을 나타내었다.

알킬아닐린은 그 자체가 발암성을 지니지 않고 생체 내에서 P450 대사효소계에 의해 대사되어 발암성과 같은 유해성을 갖는 대사활성물질로 전환되는 것으로 알려져 있기 때문에, 본 연구에 사용된 *o*-toluidine, *m*-toluidine, 2-ethylaniline, 3-ethylaniline을 인간 S9의 촉매작용을 이용하여 알킬아닐린 대사활성체가 AS52세포에 미치는 독성을 평가하였다. Figure 1B에 나타난 바와 같이 알킬아닐린은 인간 S9 존재 시 AS52 세포에 강력한 독성을 나타내어 1,000 μM 에서 *o*-toluidine과 2-ethylaniline이 각각 17%, *m*-toluidine과 3-ethylaniline이 각각 47%, 37%로 뚜렷한 세포독성을 확인할 수 있었다.

상기 연구결과에 의하면 chinese hamster ovary AS52 세포에 알킬아닐린 처리 시 농도 의존적 세포독성을 나타냈으며, 대사활성에 의해 높은 세포 사멸율을 나타냄을 확인할 수 있었다.

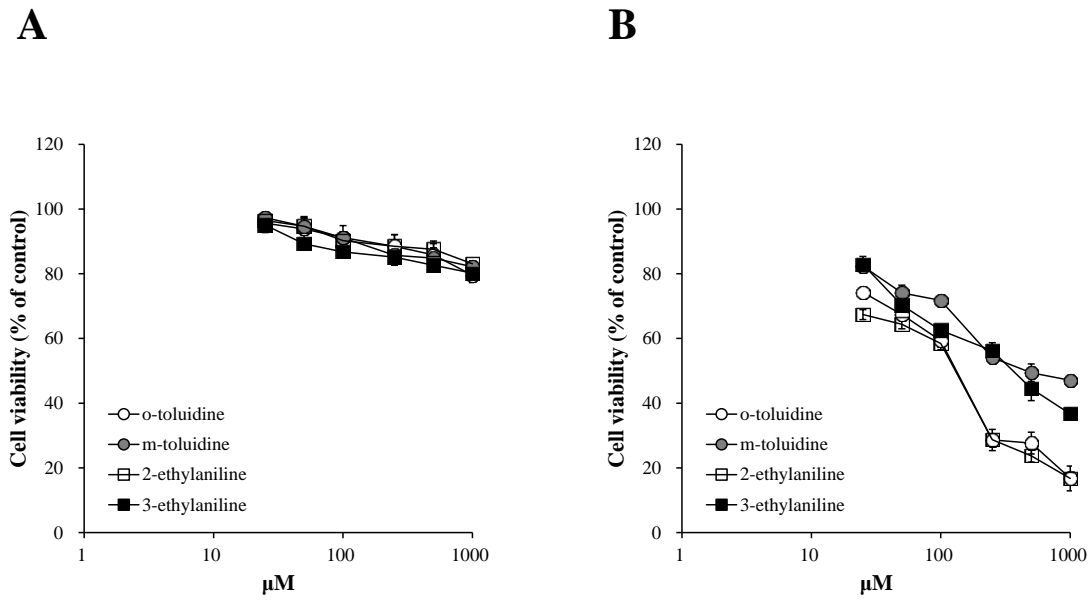


Figure 23. Cell viability was determined by trypan blue exclusion assay after 6 h treatment with *o*-toluidine, *m*-toluidine, 2-ethylaniline and 3-ethylaniline in chinese hamster ovary AS52 cells in the absence (A) and presence (B) of human S9. Values are given as means \pm SD of three independent experiments

Chinese hamster ovary AS52 세포에 대한 알킬아닐린 대사활성체의 증식 억제 작용에 유전자 변형에 의한 유전독성이 수반되는지 파악하기 위하여 4가지 알킬아닐린(*o*-toluidine, *m*-toluidine, 2-ethylaniline, 3-ethylaniline)을 대상으로 guanine-hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*gpt*) 유전자 돌연변이 빈도를 측정하였다. 알킬아닐린 대사활성체가 나타내는 *gpt* 유전자 변이원성을 0-1,000 μM 의 농도까지 검색하였을 때, 돌연변이 발생빈도가 농도의존적으로 증가하였고, 최고농도(1000 μM)에서 *o*-toluidine (27.3×10^{-5})과 2-ethylaniline (29.3×10^{-5})이 *m*-toluidine (21.4×10^{-5})과 3-ethylaniline (21.9×10^{-5})에 비해 높게 나타났다(Table 11).

Table 11. Mutation frequency of AS52 cells by after treatment with *o*-toluidine, *m*-toluidine, 2-ethylaniline and 3-ethylaniline in the presence of human S9.

μM	<i>o</i> -toluidine ($\times 10^{-5}$)	<i>m</i> -toluidine ($\times 10^{-5}$)	2-ethylaniline ($\times 10^{-5}$)	3-ethylaniline ($\times 10^{-5}$)
0	6.2 \pm 0.45	6.2 \pm 0.32	6.2 \pm 0.45	6.2 \pm 0.32
25	6.6 \pm 0.86	6.2 \pm 1.03	10.0 \pm 0.45	6.5 \pm 0.69
50	9.3 \pm 1.20	8.4 \pm 0.58	14.3 \pm 0.42	8.5 \pm 0.65
100	12.0 \pm 1.30	9.0 \pm 0.82	16.9 \pm 0.04	9.2 \pm 0.78
250	16.1 \pm 1.79	12.1 \pm 0.70	18.8 \pm 1.42	13.5 \pm 0.35
500	19.8 \pm 1.34	14.6 \pm 0.33	24.2 \pm 0.57	14.7 \pm 0.65
1,000	27.3 \pm 1.66	21.4 \pm 0.94	29.3 \pm 0.20	21.9 \pm 0.37

Values are given as means \pm SD of three independent experiments.

NO^{*}는 3가지 NOS: nNOS, iNOS, eNOS에 의해 L-arginine으로부터 생성되는 물질로 발생량에 따라 세포독성을 향진시키거나 억제하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이에 알킬아닐린 대사체에 의해 유도된 유전독성과 NO^{*}와의 관련성을 파악하기 위하여 nitrite 발생량을 확인한 결과, nitrite 발생량이 알킬아닐린의 처리 농도가 증가함에 따라 비례적으로 증가하였다. 특히 *o*-toluidine과 2-ethylaniline의 경우에는 nitrite 발생량이 *m*-toluidine과 3-ethylaniline에 비해 1.5배 증가하는 것을 확인할 수 있어(Figure 24), 알킬아닐린에 의해 유발된 AS52 세포의 유전독성이 nitrosative stress와 밀접한 연관성이 있음을 확인할 수 있었다.

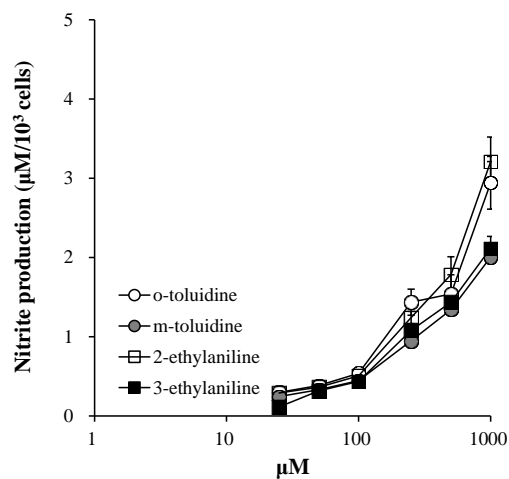


Figure 24. Nitrite production of AS52 cells after treatment with with *o*-toluidine, *m*-toluidine, 2-ethylaniline and 3-ethylaniline in the presence of human S9. Nitrite in the medium was determined by the griess assay. Values are given as means \pm SD of three independent experiments.

감귤폐기물(홍진조생 7월)의 chinese hamster ovary AS52 세포에 대한 역치 농도를 설정하기 위한 예비실험의 일환으로 감귤폐기물을 AS52 세포에 0-400 mg/mL의 농도로 6시간 동안 처리한 결과 최고농도에서 약 90-95%의 미비한 독성을 나타내어, 해당 농도 범위를 적용하여 감귤폐기물의 병용 처리가 알킬아닐린에 의해 유발된 유전독성을 저감시킬 수 있는지 평가하였다.

1,000 μ M의 알킬아닐린에 감귤폐기물을 농도별(0-400 mg/mL)로 처리하였을 때 농도가 증가됨에 따라 AS52 세포의 생존율이 유의적으로 증가함을 보였으며, 400 mg/mL의 농도로 배양한 결과 *m*-toluidine 과 3-ethylaniline의 독성이 각각 22%, 36% 회복됨을 확인할 수 있었다(Figure 25).

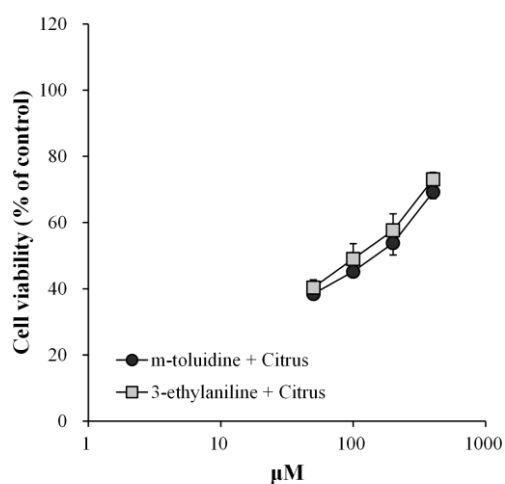


Figure 25. Cells were treated with either immature citrus extracts alone or in combination with 1,000 μM of *m*-toluidine and 3-ethylaniline. Cell viability was determined by trypan blue exclusion assay after 6 h in the presence of human S9. Values are given as means \pm SD of three independent experiments.

Table 12에 나타난 바와 같이 감귤폐기물 처리 시 알킬아닐린에 의해 유발된 *gpt* 유전자 돌연변이 빈도가 농도 의존적으로 감소하여 400 mg/mL에서 *m-toluidine*이 12.4×10^{-5} , *3-ethylaniline*이 14.0×10^{-5} 로 나타났다.

Table 12. Mutation frequency of AS52 cells by after treatment with immature citrus extracts and/or *m*-toluidine and 3-ethylaniline in the presence of human S9.

mg/mL	<i>m</i> -toluidine($\times 10^{-5}$)	3-ethylaniline($\times 10^{-5}$)
0	6.3 \pm 0.54	6.3 \pm 0.56
50	20.3 \pm 0.56	21.1 \pm 0.89
100	17.4 \pm 0.19	19.0 \pm 0.26
200	15.9 \pm 0.47	16.9 \pm 0.87
400	12.4 \pm 0.78	14.0 \pm 1.40

Values are given as means \pm SD of three independent experiments.

NO[•]는 세포사멸 유발 과정에 핵심적인 역할을 하며, 과도한 NO의 축적은 세포 내 산화적 스트레스 증가에 따른 DNA 손상을 야기하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 Figure 26에 나타난 바와 같이 AS52 세포에 알킬아닐린과 감귤폐기물의 병용 처리 시 nitrite 생성량이 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났는데 (400 mg/mL에서 *m*-toluidine이 2.5배, 3-ethylaniline이 2.6배 감소), 이는 감귤폐기물에 존재하는 기능성 성분이 NO[•]를 감소시켜 AS52 세포의 유전독성을 저감시키는 것으로 사료된다.

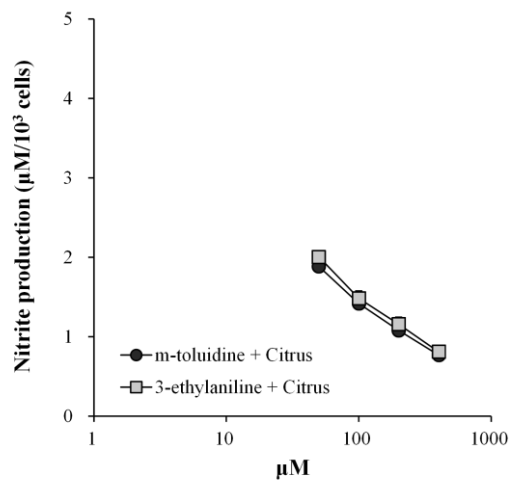


Figure 26. Nitrite production of AS52 cells after treatment immature citrus extracts and/or *m*-toluidine and 3-ethylaniline in the presence of human S9. Nitrite in the medium was determined by the Griess assay. Values are given as means \pm SD of three independent experiments.

V. 고찰

Jayaprakasha 등[43]에 따르면 감귤류의 limonexic acid 및 β -sitosterol glucoside 성분이 대장암 HT-29 세포의 증식 억제 작용을 하고, Yoo 등[44]은 감귤류에 함유된 생리활성 물질이 전립선 암 DU145와 LN-Cap에 대해 암세포의 성장을 저해한다고 보고하고 있다. 또한, 감귤의 flavonoid 유도체인 noblietin, hesperetin, naringin 등이 여러 암종을 억제하는 것으로 밝혀지고 있어[45, 46, 47], 본 연구에서도 감귤폐기물에 포함된 다양한 생리활성 물질 및 항산화 활성이 흑색종 세포의 증식 억제 작용에 영향을 미친 것으로 생각된다.

효과적인 암의 치료와 예방에 있어서 비정상적인 세포나 암세포의 apoptosis 유발은 많은 치료제의 표적이 되고 있다. Apoptosis는 programmed cell death라는 별칭처럼 세포가 정상적인 상태 또는 병리학적 요인에 노출된 후 체계적인 신호전달을 통해 죽음에 이르게 되는 정교한 세포의 방어기전이다. 즉, apoptosis의 실패는 암화 과정 및 종양 진행의 원인이 될 수 있기 때문에 apoptosis 조절은 암 치료의 주요한 표적으로 주목 받고 있다. 일반적으로 apoptosis는 extrinsic과 intrinsic pathway로 구별되며, extrinsic pathway는 세포막의 death receptor에 특정 ligand가 결합함으로써 개시되어 caspase cascade에 의해 DNA 단편화 및 apoptosis를 야기하고, intrinsic pathway는 Bcl-2 family, inhibitor of apoptosis protein (IAP) family의 비활성화가 mitochondrial dysfunction 을 중심으로 한 apoptosis를 초래하게 된다. 암세포의 apoptosis 유발은 복합적인 과정이기 때문에, 세포주기의 교란과 저해를 통한 암화 과정 및 종양진행의 억제는 새로운 항암제 발굴에 있어 매우 중요한 의의를

갖는다[48, 49, 50].

세포주기의 전환은 cyclin과 cyclin dependent kinase (CDK)의 상호작용에 의해 조절되고, 일반적으로 암세포는 정상세포보다 활발하게 세포주기가 진행되며, 세포분열이 이행되기에 앞서 세포주기의 정체로 발생하는 mitotic arrest는 새로운 세포주기의 진입을 저지하여 암세포의 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 있다[51, 52, 53].

이와 같이 apoptosis 유발에 따른 감귤류의 항암효능은 폐암 세포 A549와 CL1-5에서 JNK 활성화에 의해 apoptosis를 유발하거나 A549, ECV304 세포에서 p53 활성화 및 Bax/Bcl-2 ratio 증가에 따른 사멸효과를 나타내고 Korean Citrus aurantium L.에서 분리동정된 flavonoid 성분이 intrinsic pathway 진행에 따른 apoptosis를 초래하여 A549 세포를 저해하는 등 다수 보고되어있다[54, 55, 56]. 이 뿐 아니라 Charoensinphon 등[57]이 tangeretin 및 5-methyltangeretin을 폐암 3종(A549, H460, H1299)에 투여하여 세포주기를 분석한 결과 세포주기 중 sub-G1 fraction의 분포가 농도 의존적으로 증가하였으며, Hung 등[58]이 합성 didymin을 A549와 H460에 처리하여 세포사멸 변화를 측정하였을 때 Fas 활성화에 따른 apoptosis를 유도한다고 발표하였다. 이와 더불어 본 연구결과는 간암 세포주에서 hesperidin과 naringenin의 투여가 각각 MAPK 및 mitochondria-mediated pathway를 통한 항암 효능을 강화한다는 기존 연구결과와 유사한 경향성을 갖는다[59, 60]. 결과적으로 감귤폐기물에 의해 유도된 증식 억제 작용이 apoptosis 유발에 기반하며 여러 인간 암종에 대해 선택적인 독성을 나타냄을 알 수 있었다.

IAP family는 caspase-3와 caspase-9와 결합하여 그 활성을 무력화함으로써 apoptosis 발생을 억제하는 것으로 알려져 있으며, 현재까지 사람에서는 8개의 IAP family

(NAIP, XIAP, cIAP-1, cIAP-2, survivin, apollen, livin, ILP-2)가 존재하는 것으로 알려져 있다. 이 중 survivin 유전자는 세포사멸뿐만 아니라 세포주기 중 G2/M기의 진행을 저해하여 IAP 중 유일하게 세포분열에 관여하고 방광암, 위암, 직장암 등에서의 발현 감소는 세포사멸과 항암제에 대한 감수성을 증가시키는 것으로 조사되어 있다. 또한 XIAP는 일반적으로 암세포에서 높게 발현되고 여러 유발인자에 의한 발현의 감소는 전립선암, 흑색종의 증식 억제 및 apoptosis를 향진시키는 작용을 하는 것으로 보고되었다. 자연사멸에 관여하는 여러 생화학적 표지인자 중 antagonist로 작용하는 IAP 단백질은 전사조절인자인 nuclear factor kappa B의 조절을 받아 최종적으로 caspase와 직간접적으로 결합함으로써 그들의 apoptotic 활성을 억제하는 것으로 보고되어 있다[61, 62, 63].

본 연구 결과에 의하면 감귤껍질에 의해 유발된 apoptosis가 IAP family의 발현을 저해함으로써 인간 악성 흑색종 세포의 세포사멸을 증강시키는 것으로 확인되었는데, 기존 보고에 의하면 naringin은 survivin을 불활성화시킴으로써 유방암 MDA-MB-231, -468, BT-549 의 성장을 저해하고, bergamottin은 IAP family에 의해 연계되는 mitochondria-mediated apoptosis 경로를 차단하여 4종의 인간 암종(U266: 다발성골수종, DU145: 전립선암세포, MDA-MB-231: 유방암세포, Hep3B: 간암세포)의 세포사멸을 유도하는 것으로 보고된 바 있다[64, 65]. 이 외에도 본 연구 결과는 bitter orange의 과피 추출물이 XIAP와 Akt의 활성을 현저히 감소시켜 백혈병세포 U937의 악성화를 억제한다는 연구결과와 감귤류에 함유되어 있는 apigenin이 NF- κ B 활성과 XIAP 불활성화를 통해 GSK-3 β /NF- κ B 경로를 거치며 2 종의 위암세포(BxPC-3, PANC-1)의 증식을 억제한다는 연구결과와도 부합된다[66, 67]. IAP family의 발현에 영향을 미치는 NF- κ B 활성은 lemon 등에 다량 함유되어 있는 citrus

limonoid obacunone에서 가장 많이 보고되어 있으며 전립선암 세포주에서 Akt 불활성화에 따른 증식 저해를, 유방암 세포주에서 p38 MAPK 이행에 따른 세포사멸을, 위암 세포주에서 cox-2 억제에 따른 anti-inflammatory 작용을 일으키는 것으로 발표되어 있다 [68, 69, 70].

Chakraborty 등의 연구에서 piper의 hydroxychavicol에 의해 발생된 NO[•]는 만성 골수성 백혈병 세포 K562의 eNOS 발현을 증강시킴으로써 apoptosis를 유도하고 aloe에 포함된 emodin은 NO[•] 조절에 의한 apoptosis 및 cell cycle arrest를 유발하였다[71, 72]. 여타 연구결과에서도 이와 흡사한 현상이 발표되었는데, 감귤류에 포함된 isoorientin은 HepG2에서 NO[•] 생성 및 PI3K/Akt 조절에 의한 mitochondria 기능상실을 일으키고, goldenseal에서 추출한 berberine 성분은 nitrite 생성에 의한 apoptosis를 증강시킴과 동시에 방사선조사에 따른 HepG2의 방사선 저항성을 해소시켰다[73, 74]. 아울러 여러 식물 소재에 함유된 capsaicin과 resveratrol 등의 유효 성분이 흑색종, 대장암, 방광암에서 NO[•] pathway를 거치며 종양을 억제하는 것으로 알려져 있다[75, 76, 77]. 본 연구진의 선행 연구에서도 상사한 양상을 띠어 감귤폐기물 처리에 따른 apoptosis 촉진에 NOS 증가에 의한 nitrite 생성이 관여하는 것이라 유추된다[78, 79].

다환방향족 아민은 임상결과를 바탕으로 일찍이 인체발암물질로 규정된 반면 염료, 농업, 고무화학, 제약산업에서 원료 또는 용매로 광범위하게 사용되고 있는 단환방향족 아민의 독성 및 발암 연구자료는 상대적으로 매우 미흡한 실정이다. 본 연구 논문에서는 IARC group 1(인체발암물질)인 o-toluidine과 유사한 구조를 가지고 있는 미규제 대상 물질 m-toluidine, 2-ethylanilin, 3-ethylaniline을 대상으로 대사활성에 따른 chinese hamster ovary AS52 세포독성과 xanthine-guanine phosphoribosyltransferase

(gpt) 표적유전자 변이성을 조사한 결과 세포생존율이 현격히 감소하고, gpt 유전자 돌연발생률이 급격히 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 알킬아닐린의 세포독성 유발 nitrite 증가에 따른 nitrosative stress가 수반되어, 항산화 활성을 지닌 감귤폐기물을 병용처리한 결과, 알킬아닐린의 세포독성을 효과적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

이러한 현상은 hepatocyte에 aniline을 처리하였을 때 reactive oxygen species (ROS) 증가에 따른 apoptosis가 유발된다는 결과와 chinese hamster ovary AS52 세포에 dimethylaminophenol을 처리하였을 때 처리농도에 비례하여 세포독성을 야기한다는 결과들과 유사한 것으로 보인다[80, 81]. Chao 등에 따르면 ascorbic acid, N-acetyl cysteine (NAC) 등의 항산화 활성이 mammalian 세포에 유발된 알킬아닐린의 세포독성을 효과적으로 저감시키고 것으로 밝혀지고 있어, 본 연구에서도 감귤폐기물이 함유하고 있는 다양한 phytochemical 및 항산화 활성이 영향을 미친 것으로 추측된다[82, 83].

본 연구에서는 선발된 감귤폐기물의 항암능, 산화질소 발생과의 연관성, 암 자연사멸과 생존기전 규명 연구를 실시하고 외인성 산화질소 공여제에 의한 암 자연사멸기전과 유전독성 저감 능력을 규명하여 항암제제로써의 개발 가능성을 타진하였다. 결론적으로 상기의 연구결과를 종합하여 볼 때 본 연구에서 평가된 감귤폐기물은 NO[•] pathway를 거쳐 인간 악성 흑색종 세포의 세포사멸을 유발하는 것으로 확인되었으며, 특히 감귤폐기물의 처리가 암세포 중에 유발된 apoptosis의 extrinsic pathway와 intrinsic pathway의 분자적 기전을 조절하며 세포사멸을 유도하는 것으로 검증되었다. 또한, 감귤폐기물에 의한 산화질소의 발생 변화가 알킬아닐린에 의해 유발된 AS52세포의 gpt 유전자 돌연변이를 저감시키는 것으로 암시되어,

추가적인 기전 분석을 통해 더욱 효과적인 암세포 자연사멸 유도 전략 및 유해화합물 독성 평가방법을 수립하는데 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

VI. 참고문헌

1. Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Wu, J., Smigal, C. and Thun, M. J. 2006. Cancer statistics. *CA Cancer H Clin* 56, 106-130.
2. Megahed, M., Schon, M., Selimovic, D. and Schon, M. P. 2002. Peliability of diagnosis of melanoma in situ. *Lancet* 359, 1921-1922.
3. Rezaul, K., Wilson, L. L. and Han, D. K. 2008. Direct tissue proteomics in human diseases: potential applications to melanoma research. *Expert Rev Proteomics* 5, 405-412.
4. Garbe, C., Hauschild, A., Volkenandt, M., Schadendorf, D., Stolz, W., Reinhold, U., Kortmann, R. D., Kettelhack, C., Frerich, B., Keilholz, U., Dummer, R., Sebastian, G., Tilgen, W., Schuler, G., Mackensen, A. and Kaufmann, R. 2007. Evidence and interdisciplinary consense-based german guidelines:diagnosis and surveillance of melanoma. *Melanoma Res* 17, 393-399.
5. Satyanoorthy, K., Bogenrieder, T. and Herlyn, M. 2001. No longer a molecular black box-new clues to apoptosis and drug resistance in melanoma. *Trends Mol Med* 7, 191-194.
6. Meier, F., Satyamoorthy, K., Nesbit, M., Hsu, M. Y., Schitteck, B., Garbe, C. and Herlyn, M. 1998. Molecular events in melanoma development and progression. *Front Biosci* 3, 1005-1010.
7. Saida, T. 2001. Recent advance in melanoma research. *J Dermatol Sci* 26, 1-13.
8. Hirst, D. G. and Robson, T. 2007. Nitrosative stress in cancer therapy. *Front Biosci* 12, 3406-3418.

9. Hirst, D. G. and Robson, T. 2010. Nitrosative stress as a mediator of apoptosis : Implications for cancer therapy. *Curr Pharm Des* 16, 45-55.
10. Xu, W., Liu, L. Z., Loizidou, M., Ahmed, M. and Charles, I. G. 2002. The role of nitric oxide in cancer. *Cell Res* 12, 311-320.
11. Benhar, M., Forrester, M. T., Hess, D. T and Stamler, J. S. 2008. Regulated protein denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins. *Science* 320, 1050-1054.
12. Erdman, S. E., Rao, V. P., Routahidis, T., Rogers, A. B., Taylor, C. L., Jackson, E. A., Ge, Z., Lee, C. W., Schauer, D. B., Wogan, G. N., Tannenbaum, S. R. and Fox, J. G. 2009. Nitric oxide and TNF-alpha trigger colonic inflammation and carcinogenesis in *Helicobacter hepaticus*-infected, Rag2-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 1027-1032.
13. Ouyang, N., Williams, J. L. and Rigas, B. 2008. NO-donating aspirin inhibition angiogenesis by suppressing VEGF expression in HT-29 human colon cancer mouse xenografts. *Carcinogenesis* 29, 1794-1798.
14. Grimm, E. A., Ellerhorst, J., Tang, C. H. and Ekmekcioglu, S. 2008. Constitutive intracellular production of iNOS and NO in human melanoma: possible role in regulation of growth and resistance to apoptosis. *Nitric Oxide* 19, 133-137.
15. Uffort, D. G., Grimm, E. A. and Ellerhorst, J. A. 2009. NF-kappaB mediates mitogen-activated protein kinase pathway-dependent iNOS expression in human melanoma. *J Invest Dermatol* 129, 148-154.
16. Ekmekcioglu, S., Mumm, J. B., Udtha, M., Chada, S. and Grimm, E. A. 2008. Killing of human melanoma cells induced by activation of class I interferon-regulated signaling pathways via MDA-7/IL-24. *Cytokine* 43, 34-44.
17. Denny, W. A. 2010. Hypoxia-activated prodrugs in cancer therapy: progress to the clinic. *Future Oncol* 6, 419-428.

18. Westermann, B. 2009. Nitric oxide links mitochondrial fission to Alzheimer's disease. *Sci Signal* 2, 29.
19. Meiyanto, E., Hermawan, A. and Anindyajati. 2012. Natural products for cancer-targeted therapy: citrus flavonoids as potent chemopreventive agents. *Asian Pac J Cancer Prev* 13, 427-436.
20. Roohbakhsh, A., Parhiz, H., Soltani, F., Rezaee, R. and Iranshahi, M. 2015. Molecular mechanisms behind the biological effects of hesperidin and hesperetin for the prevention of cancer and cardiovascular diseases. *Life Sci* 124, 64-74.
21. Vanamala, J., Leonardi, T., Patil, B. S., Taddeo, S. S., Murphy, M. E., Pike, L. M., Chapkin, R. S., Lupton, J. R. and Turner, N. D. 2006. Suppression of colon carcinogenesis by bioactive compounds in grapefruit. *Carcinogenesis* 27, 1257-1265.
22. Dallas, C., Gerbi, A., Tenca, G., Juchaux, F. and Bernard, F. X. 2008. Lipolytic effect of a polyphenolic citrus dry extract of red orange, grapefruit, orange (SINETROL) in human body fat adipocytes. Mechanism of action by inhibition of cAMP-phosphodiesterase (PDE). *Phytomedicine* 15, 783-792.
23. Murakami, A., Nakamura, Y., Torikai, K., Tanaka, T., Koshihara, T., Koshimizu, K., Kuwahara, S., Takahashi, Y., Ogawa, K., Yano, M., Tokuda, H., Nishino, H., Mimaki, Y., Sashida, Y., Kitanaka, S. and Ohigashi, H. 2000. Inhibitory effect of citrus nobiletin on phorbol ester-induced skin inflammation, oxidative stress, and tumor promotion in mice. *Cancer Res* 60, 5059-5066.
24. Murakami, A., Nakamura, Y., Ohto, Y., Yano, M., Koshihara, T., Koshimizu, K., Tokuda, H., Nishino, H. and Ohigashi, H. 2000. Suppressive effects of citrus fruits on free radical generation and nobiletin, an anti-inflammatory polymethoxyflavonoid. *Biofactors* 12, 187-192.

25. Kesinger, N. G. and Stevens, J. F. 2009. Covalent interaction of ascorbic acid with natural products. *phytochemistry* 70, 1930-1939.
26. Sarkar, D., Dent, P., Curiel, D. T. and Fisher, P. B. 2008. Acquired and innate resistance to the cancer-specific apoptosis-inducing cytokine, mda-7/IL-24: not insurmountable therapeutic problems. *Cancer Biol Ther* 7, 109-112.
27. Choi, S. Y., Ko, H. C., Ko, S. Y., Hwang, J. H., Park, J. G., Kang, S. H., Han, S. H., Yun, S. H. and Kim, S. J. 2007. Correlation between flavonoid content and the no production inhibitory activity of peel extracts from various citrus fruits. *Biol Pharm Bull* 30, 772-778.
28. Gan, J., Skipper, P. L., Gago-Dominguez, M., Arakawa, K., Ross, R. K., Yu, M. C. and Tannenbaum, S. R. 2004. Alkylaniline-hemoglobin adducts and risk of non-smoking-related bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 96, 1425-1431.
29. Johansson, G. M., Jönsson, B. A., Axmon, A., Lindh, C. H., Lind, M. L., Gustavsson, M., Broberg, K., Boman, A., Meding, B., Liden, C. and Albin, M. 2015. Exposure of hairdressers to ortho- and meta-toluidine in hair dyes. *Occup Environ Med* 72, 57-63.
30. Skipper, P. L., Kim, M. Y., Sun, H. L., Wogan, G. N. and Tannenbaum, S. R. 2010. Monocyclic aromatic amines as potential human carcinogens: old is new again. *Carcinogenesis* 31, 50-58.
31. Chao, M. W., Erkekoglu, P., Tseng, C. Y., Ye, W., Trudel, L. J., Skipper, P. L., Tannenbaum, S. R. and Wogan, G. N. 2014. Intracellular generation of ROS by 3,5-dimethylaminophenol: persistence, cellular response, and impact of molecular toxicity. *Toxicol Sci* 141, 300-313.
32. Wagner, E. D., Rayburn, A. L., Anderson, D. and Plewa, M. J. 1998. Calibration of the single cell gel electrophoresis assay, flow cytometry analysis and forward mutation in Chinese hamster ovary cells. *Mutagenesis* 13, 81-84.

33. Ferguson, L. R., Turner, P. M. and Denny, W. A. 2000. The mutagenic spectrum of acridine-linked aniline nitrogen mustards in AS52 cells: implications of DNA targeting with high selectivity for adenine or guanine bases. *Mutat Res* 469, 115-126.
34. Kim, J. H. and Kim, M. Y. 2014. Immature citrus fruits extracts enhance the apoptosis inducing potential of cisplatin in human malignant melanoma A375 cells via regulation of nitric oxide and inhibitor of apoptosis family (IAP). *J Life Sci* 24, 454-460.
35. Khan, F., Sherwani, A. F. and Afzal, M. 2009. Chromosomal aberration and micronucleus studies of two topoisomerase (II) targeting anthracyclines. *J Environ Biol* 2009 30, 409-412.
36. Morgensztern, D., Baggstrom, M. Q., Pilot, G., Tan, B., Fracasso, P., Suresh, R., Wildi, J. and Govindan, R. 2009. A phase I study of pegylated liposomal doxorubicin and irinotecan in patients with solid tumors. *Chemotherapy* 55, 441-445.
37. Olukman, M., Can, C., Erol, A., Oktem, G., Oral, O. and Cinar, M. G. 2009. Reversal of doxorubicin-induced vascular dysfunction by resveratrol in rat thoracic aorta: Is there a possible role of nitric oxide synthase inhibition. *Anadolu Kardiyol Derg* 9, 260-266.
38. De-Boo, S., Kopecka, J., Brusa, D., Gazzano, E., Matera, L., Ghigo, D., Bosia, A. and Riganti, C. 2009. iNOS activity is necessary for the cytotoxic and immunogenic effects of doxorubicin in human colon cancer cells. *Mol Cancer* 19, 108.
39. Sparano, J. A., Goldstein, L. J., Childs, B. H., Shak, S., Brassard, D., Badve, S., Baehner, F. L., Bugarini, R., Rowley, S., Perez, E., Shulman, L. N., Martino, S., Davidson, N. E., Sledge, G. W. Jr. and Gray, R. 2009. Relationship between Topoisomerase 2A RNA expression and recurrence after adjuvant chemotherapy for breast cancer. *Clin Cancer Res* 15, 7693-7700.

40. Li, Q. Y., Wang, Y., Yin, Z. F. and Wu, F. C. 2009. Role of DNA topoisomerase II alpha in intrinsic and acquired drug resistance of liver cancer. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 17, 620-621.
41. Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495-516.
42. Chawla-Sarkar, M., Bae, S. I., Reu, F. J., Jacobs, B. S., Lindner, D. J. and Borden, E. C. 2004. Downregulation of Bcl-2, FLIP or IAPs (XIAP and survivin) by siRNAs sensitizes resistant melanoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 11, 915-923.
43. Jayaoraksha, G. K., Jadegoud, G. A., Gowda, N. and Patil, B. S. 2010. Bioactive compounds from sour orange inhibit colon cancer cell proliferation and induce cell cycle arrest. *J Agric Food Chem* 58, 180-186.
44. Yoo, K. M. and Hwang, I. K. 2004. In vitro effect of yuza (citrus junos SIEB ex TANAKA) extracts on proliferation of human prostate cancer cells and antioxidant activity. *Korean J Food Sci* 36, 339-344.
45. Arul, D. and Subramanian, P. 2013. Naringenin (citrus flavonone) induces growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Pathol Oncol Res* 19, 763-770.
46. Lee, C. J., Wilson, L., Jordan, M. A., Nguyen, V., Tang, J. and Smiyun, G. 2010. Hesperidin suppressed proliferations of both human breast cancer and androgen-dependent prostate cancer cells. *Phytother Res* 24, 15-19.
47. Luo, G., Guan, X. and Zhou, L. 2008. Apoptosis effect of citrus fruit extract nobiletin on lung cancer cell line A549 in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* 7, 966-973.
48. Ardecky, R. J., Welsh, K., Finlay, D., Lee, P. S., Lopez, M. G., Ganji, S. R., Ravanan, P., Mace, P. D., Riedl, S. J., Vuori, K., Reed, J. C. and Cosford, N. D. P. 2013. Design,

- synthesis and evaluation of inhibitor of apoptosis protein (IAP) antagonists that are highly selective for the BIR2 domain of XIAP. *Bioorg Med Chem Lett* 23, 4253-4257.
49. Passante, E., Wurstle, M. L., Hellwig, C. T., Leverkus, M. and Rehm, M. 2013. Systems analysis of apoptosis protein expression allows the case-specific prediction of cell death responsiveness of melanoma cells. *Cell Death Differ* 20, 1521-1531.
 50. Saleem, M., Qadir, M. I., Perveen, N., Ahmad, B., Saleem, U., Irshad, T. and Ahmad, B. 2013. Inhibitors of apoptotic proteins: new targets for anticancer therapy. *Chem Biol Drug* 82, 243-251.
 51. Champeme, M. H., Bieche, L., Lizard, S. and Lidereau, R. 1995. 11q13 amplification in local recurrence of human primary breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 12, 128-133.
 52. Kawamoto, H., Koizumi, H. and Uchikoshi, T. 1997. Expression of the G2-M checkpoint regulators cyclin B1 and cdc2 in nonmalignant and malignant human breast lesions: immunocytochemical and quantitative image analyses. *Am J Pathol* 150, 15-23.
 53. Sherr, C. J. and Roberts, J. M. 1996. Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672-1677.
 54. Chen, Y. K., Wang, H. C., Ho, C. T., Chen, H. Y., Li S., Chan, H. L., Chung, T. W., Tan, K. T., Li, Y. R. and Lin, C. C. 2015. 5-Demethylnobiletin promotes the formation of polymerized tubulin, leads to G2/M phase arrest and induces autophagy via JNK activation in human lung cancer cells. *J Nutr Biochem* 26, 484-504.
 55. Luo, G., Guan, X. and Zhou, L. 2008. Apoptotic effect of citrus fruit extract nobiletin on lung cancer cell line A549 in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* 7, 966-973.
 56. Park, K. I., Park, H. S., Nagappan, A., Hong, G. E., Lee do, H., Kang, S. R., Kim, J. A., Zhang, J., Kim, E. H., Lee, W. S., Shin, S. C., Hah, Y. S. and Kim, G. S. 2012. Induction of the cell cycle arrest and apoptosis by flavonoids isolated from Korean Citrus aurantium L. in non-small-cell lung cancer cells. *Food Chem* 135, 2728-2735.

57. Charoensinphon, N., Qiu, P., Dong, P., Zheng, J., Ngauv, P., Cao, Y., Li, S., Ho, C. T. and Xiao, H. 2013. 5-demethyltangeretin inhibits human nonsmall cell lung cancer cell growth by inducing G2/M cell cycle arrest and apoptosis. *Mol Nutr Food Res* 57, 2103-2111.
58. Hung, J. Y., Hsu, Y. L., Ko, Y. C., Tsai, Y. M., Yang, C. J., Huang, M. S. and Kuo, P. L. 2010. Didymin, a dietary flavonoid glycoside from citrus fruits, induces Fas-mediated apoptotic pathway in human non-small-cell lung cancer cells in vitro and in vivo. *Lung Cancer* 68, 366-374.
59. Arul, D. and Subramanian, P. 2013. Naringenin (citrus flavonone) induces growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Pathol. Oncol Res* 19, 763-770.
60. Yumnam, S., Park, H. S., Kim, M. K., Nagappan, A., Hong, G. E., Lee, H. J., Lee, W. S., Kim, E. H., Cho, J. H., Shin, S. C. and Kim, G. S. 2014. Hesperidin induces paraptosis like cell death in hepatoblastoma, HepG2 cells: involvement of ERK1/2 MAPK. *PLoS One* 9, e101321.
61. Ardecky, R. J., Welsh, K., Finlay, D., Lee, P. S., Lopez, M. G., Ganji, S. R., Ramanan, P., Mace, P. D., Riedl, S. J., Vuori, K., Reed, J. C. and cosford, N. D. P. 2013. Design, synthesis and evaluation of inhibitor of apoptosis protein (IAP) antagonists that are highly selective for the BIR2 domain of XIAP. *Bioorg Med Chem Lett* 23, 4253-4257.
62. Passante, E., Wurstle, M. L., Hellwig, C. T., Leverkus, M. and Rehm, M. 2013. Systems analysis of apoptosis protein expression allows the case-specific prediction of cell death responsiveness of melanoma cells. *Cell Death Differ* 20, 1521-1531.
63. Saleem, M., Qadir, M. I., Perveen, N., Ahmad, B., Saleem, U., Irshad, T. and Ahmad, B. 2013. Inhibitors of apoptotic proteins: new targets for anticancer therapy. *Chem Biol Drug* 82, 243-251.

64. Li, H., Yang, B., Huang, J., Xiang, T., Yin, X., Wan, J., Luo, F., Zhang, L., Li, H. and Ren, G. 2013. Naringin inhibits growth potential of human triple-negative breast cancer cells by targeting β -catenin signaling pathway. *Toxicol Lett* 220, 219-228.
65. Kim, S. M., Lee, J. H., Sethi, G., Kim, C., Baek, S. H., Nam, D., Chung, W. S., Kim, S. H., Shim, B. S. and Ahn, K. S. 2014. Bergamottin, a natural furanocoumarin obtained from grapefruit juice induces chemosensitization and apoptosis through the inhibition of STAT3 signaling pathway in tumor cells. *Cancer Lett* 354, 153-163.
66. Han, M. H., Lee, W. S., Lu, J. N., Kim, G., Jung, J. M., Ryu, C. H., Kim, G. Y., Hwang, H. J., Kwon, T. K. and Choi, Y. H. 2012. *Citrus aurantium* L. exhibits apoptotic effects on U937 human leukemia cells partly through inhibition of Akt. *Int J Oncol* 40, 2090-2096.
67. Johnson, J. L. and de Mejia, E. G. 2013. Flavonoid apigenin modified gene expression associated with inflammation and cancer and induced apoptosis in human pancreatic cancer cells through inhibition of GSK-3 β /NF- κ B signaling cascade. *Mol Nutr Food Res* 57, 2112-2127.
68. Murthy, K. N., Jayaprakasha, G. K. and Patil, B. S. 2015. Cytotoxicity of obacunone and obacunone glucoside in human prostate cancer cells involves Akt-mediated programmed cell death. *Toxicology* 329, 88-97.
69. Kim, J., Jayaprakasha, G. K. and Patil, B. S. 2014. Obacunone exhibits anti-proliferative and anti-aromatase activity in vitro by inhibiting the p38 MAPK signaling pathway in MCF-7 human breast adenocarcinoma cells. *Biochimie* 105, 36-44.
70. Chidambara Murthy, K. N., Jayaprakasha, G. K. and Patil, B. S. 2011. Apoptosis mediated cytotoxicity of citrus obacunone in human pancreatic cancer cells. *Toxicol In Vitro* 25, 859-867.
71. Chakraborty, J. B., Mahato, S. K., Joshi, K., Shinde, V., Rakshit, S., Biswas, N., Choudhury Mukherjee, I., Mandal, L., Ganguly, D., Chowdhury, A. A., Chaudhuri, J.,

- Paul, K., Pal, B. C., Vinayagam, J., Pal, C., Manna, A., Jaisankar, P., Chaudhuri, U., Konar, A., Roy, S. and Bandyopadhyay, S. 2012. Hydroxychavicol, a Piper betle leaf component, induces apoptosis of CML cells through mitochondrial reactive oxygen species-dependent JNK and endothelial nitric oxide synthase activation and overrides imatinib resistance . *Cancer Sci* 103, 88-99.
72. Tabolacci, C., Oliverio, S., Lentini, A., Rossi, S., Galbiati, A., Montesano, C., Mattioli, P., Provenzano, B., Facchiano, F. and Beninati, S. 2011. Aloe-emodin as antiproliferative and differentiating agent on human U937 monoblastic leukemia cells. *Life Sci* 89, 812-820.
73. Yuan, L., Wang, J., Xiao, H., Xiao, C., Wang, Y. and Liu, X. 2012. Isoorientin induces apoptosis through mitochondrial dysfunction and inhibition of PI3K/Akt signaling pathway in HepG2 cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 265, 83-92.
74. Hur, J. M., Hyun, M. S., Lim, S. Y., Lee, W. Y. and Kim, D. 2009. The combination of berberine and irradiation enhances anti-cancer effects via activation of p38 MAPK pathway and ROS generation in human hepatoma cells. *J Cell Biochem* 107, 955-964.
75. Kim, M. Y. 2012. Nitric oxide triggers apoptosis in A375 human melanoma cells treated with capsaicin and resveratrol. *Mol Med Rep* 5, 585-591.
76. Kim, M. Y., Trudel, L. J. and Wogan, G. N. 2009. Apoptosis induced by capsaicin and resveratrol in colon carcinoma cells requires nitric oxide production and caspase activation. *Anticancer Res* 29, 3733-3740.
77. Stocco, B., Toledo, K., Salvado,r M., Paulo, M., Koyama, N. and Torqueti Toloi, M. R. 2012. Dose-dependent effect of resveratrol on bladder cancer cells: chemoprevention and oxidative stress. *Maturitas* 72, 72-78.
78. Kim, J. H. and Kim, M. Y. 2014. Antiproliferation effects of *Sasa quepaertensis* Nakai in human cancer cells. *J Life Sci* 24, 903-909.

79. Kim, J. H. and Kim, M. Y. 2014. Immature citrus fruits extracts enhance the apoptosis inducing potential of cisplatin in human malignant melanoma A375 cells via regulation of nitric oxide and inhibitor of apoptosis family (IAP). *J Life Sci* 24, 454-460.
80. Wang, Y., Gao, H., Na, X. L., Dong, S. Y., Dong, H. W., Yu, J., Jia, L. and Wu, YH8. 2016. Aniline induces oxidative stress and apoptosis of primary cultured hepatocytes. *Int J Environ Res Public Health* 13, E1188.
81. Erkekoglu, P., Chao, M. W., Ye, W., Ge, J., Trudel, L. J., Skipper, P. L., Kocer-Gumusel, B., Engelward, B. P., Wogan, G. N. and Tannenbaum, S.R. 2014. Cytoplasmic and nuclear toxicity of 3,5-dimethylaminophenol and potential protection by selenocompounds. *Food Chem Toxicol* 72, 98-110.
82. Chao, M. W., Erkekoglu, P., Tseng, C. Y., Ye, W., Trudel, L. J., Skipper, P. L., Tannenbaum, S. R. and Wogan, G. N. 2015. Protective effects of ascorbic acid against the genetic and epigenetic alterations induced by 3,5-dimethylaminophenol in AA8 cells. *J Appl Toxicol* 35, 466-477.
83. Chao, M. W., Kim, M. Y., Ye, W., Ge, J., Trudel, L. J., Belanger, C. L., Skipper, P. L., Engelward, B. P., Tannenbaum, S. R. and Wogan, G. N. 2012. Genotoxicity of 2,6- and 3,5-dimethylaniline in cultured mammalian cells: the role of reactive oxygen species. *Toxicol Sci* 130, 48-59.