



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](#)

2019年 2月

석사학위논문

금전초 추출물의 항산화 활성 및 유방암  
세포주에서 apoptosis 유도 효과

조선대학교 대학원

식품영양학과

홍 성 우

금전초 추출물의 항산화 활성 및 유방암  
세포주에서 apoptosis 유도 효과

Effect of Antioxidant Activities and Apoptosis  
Induction of *Lysimachia christinae* Hance  
in Human Breast Cancer Cells

2019年 2月 24日

조선대학교 대학원

식품영양학과

홍성우

# 금전초 추출물의 항산화 활성 및 유방암 세포주에서 apoptosis 유도 효과

지도교수 이 주 민

이 논문을 이학 석사학위신청 논문으로 제출함

2018年 10月

조선대학교 대학원

식품영양학과

홍 성 우

# 홍성우의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 이재준 (印)

위원 조선대학교 교수 이주민 (印)

위원 조선대학교 교수 황승림 (印)

2018年 11月

조선대학교 대학원

# 목 차

LIST OF TABLES .....	iii
LIST OF FIGURES .....	iv
ABSTRACT .....	v
제1장 서 론 .....	1
제2장 연구방법 .....	4
1. 실험재료 .....	4
2. 시료추출 .....	4
3. 일반성분 분석 .....	5
4. 지방산 분석 .....	6
5. 유기산 분석 .....	7
6. 비타민 분석 .....	8
7. 구성 아미노산 분석 .....	10
8. 무기질 분석 .....	11
9. 총 polyphenol 함량 측정 .....	12
10. 총 flavonoid 함량 측정 .....	12
11. DPPH radical 소거능 .....	13
12. ABTS <sup>+</sup> radical 소거능 .....	13
13. 세포배양 .....	14
14. MTS assay .....	14
15. 인체 유방암 세포 형태 관찰 .....	15
16. DAPI staining .....	15
17. Western blotting .....	16

18. 통계처리 .....	16
<b>제3장 실험결과 및 고찰 .....</b>	<b>17</b>
1. 일반성분 분석 .....	17
2. 지방산 분석 .....	19
3. 유기산 분석 .....	21
4. 비타민 분석 .....	23
5. 구성 아미노산 분석 .....	25
6. 무기질 분석 .....	27
7. 총 polyphenol 함량 측정 .....	29
8. 총 flavonoid 함량 측정 .....	31
9. DPPH radical 소거능 .....	33
10. ABTS <sup>+</sup> radical 소거능 .....	35
11. 금전초 추출물이 유방암세포의 성장에 미치는 영향 .....	37
12. DAPI 형광염색을 이용한 apoptosis 확인 .....	40
13. 금전초 추출물이 유방암세포의 apoptosis 관련 단백질 발현에 미치는 영향 .....	42
14. PI3K/Akt 경로의 발현에 미치는 금전초 추출물의 영향 .....	47
<b>제4장 요약 .....</b>	<b>50</b>
<b>참 고 문 헌 .....</b>	<b>51</b>

## LIST OF TABLES

Table 1. Operating conditions of gas chromatography for fatty acids .....	6
Table 2. Operating conditions of Prominence HPLC for organic acids .....	7
Table 3. Operating conditions of HPLC for vitamin A and E .....	9
Table 4. Operation conditions of HPLC for vitamin C .....	9
Table 5. Operating conditions of amino acid auto - analyzer .....	10
Table 6. Operating conditions of Inductively Coupled Plasma Spectrometer for minerals .....	11
Table 7. Proximate compositions of <i>Lysimachia christinae</i> Hance .....	18
Table 8. Compositions of fatty acids in <i>Lysimachia christinae</i> Hance .....	20
Table 9. Contents of organic acids in <i>Lysimachia christinae</i> Hance .....	22
Table 10. Contents of vitamin A, C and E in <i>Lysimachia christinae</i> Hance ..	24
Table 11. Contents of total amino acids in <i>Lysimachia christinae</i> Hance .....	26
Table 12. Contents of minerals in <i>Lysimachia christinae</i> Hance .....	28
Table 13. Total polyphenol .....	30
Table 14. Total flavonoid .....	32
Table 15. DPPH radical-scavenging activity of <i>Lysimachia christinae</i> Hance .....	34
Table 16. ABTS <sup>+</sup> radical-scavenging activity of <i>Lysimachia christinae</i> Hance .....	36



## LIST OF FIGURES

Fig. 1. Viability of MCF-7 and HCC 38 breast cancer cells after treatment with the indicated concentrations of <i>Lysimachia christinae</i> Hance extract for 24 and 48 h by a MTS assay .....	38
Fig. 2. The cell morphology was visualized by optical microscopy after the <i>Lysimachia christinae</i> Hance extract treatment for 48 h .....	39
Fig. 3. Induction of apoptosis by <i>Lysimachia christinae</i> Hance extract in MCF-7 and HCC 38 breast cancer cells. The nuclear morphology was analyzed by DAPI staining for 48 h .....	41
Fig. 4. The changes of PARP expressions in MCF-7 and HCC 38 cells ·	43
Fig. 5. The changes of Cleaved PARP expressions in MCF-7 and HCC 38 cells .....	44
Fig. 6. The changes of Bcl-2 expressions in MCF-7 and HCC 38 cells ·	45
Fig. 7. The changes of P53 expressions in MCF-7 and HCC 38 cells ···	46
Fig. 8. The changes of Phospho Akt expressions in MCF-7 and HCC 38 cells .....	48
Fig. 9. The changes of Akt expressions in MCF-7 and HCC 38 cells ····	49

## ABSTRACT

### Effect of Antioxidant Activities and Apoptosis Induction of *Lysimachia christinae* Hance in Human Breast Cancer Cells

by. Hong, Seong-woo

Advisor : Prof. Lee, Joomin, Ph.D.

Dept. of Food and Nutrition,

Graduate School of Chosun University,

Gwangju, Korea

This research investigated the nutritional components and antioxidant activities of *Lysimachia christinae* Hance (LH) as well as apoptotic effect of LH in MCF-7 (estrogen receptor positive) and HCC 38(estrogen receptor negative) breast cancer cells. The proximate compositions of LH were 8.17% of moisture content, 7.09% of crude ash, 0.72% of crude fat, 5.83% of crude protein and 78.19% of carbohydrate, respectively. The content of fatty acids in LH was 29.84% palmitic acid of saturated fatty acids, and 46.18% of polyunsaturated fatty acids. The malic acid(2411.30 ppm) is the most abundant organic acids in LH extract. The LH extract showed the highest ascorbic acid content(4695.53 ppm). The contents of total amino acid and essential amino acids were 3,593.99 mg/100g and 1,555.56 mg/100g, respectively. The component ratio of essential amino acids to amino acids was 43.28%. Mineral contents of LH were in the order K>Ca>Na>Mg. Total polyphenols and total flavonoids of LH were 311.31 mg TAE/g and 184.68 mg RE/g, respectively. The IC<sub>50</sub> values of LH extracts based

on DPPH and ABTS<sup>+</sup> hydroxyl scavenging were 0.62 mg/mL and 0.15 mg/mL, respectively. Next, we examined the potential anti-cancer effects of LH extracts against MCF-7 and HCC 38 human breast cancer cells. The LH extract significantly inhibited the proliferation of MCF-7 and HCC 38 cells. Treatment with LH for 24 h resulted in the condensation of MCF-7 and HCC38 nuclei, as determined by 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI) staining. To confirm the apoptotic activity, the anti-apoptotic and pro-apoptotic proteins were measured by western blot analysis. The protein expressions of cleaved poly(ADP-ribose) polymerase(PARP) and p53 were increased, however the protein expression of Bcl-2 was decreased after LH extract treatment compared to the control. And LH extract increased the protein expression of the phospho-Akt in MCF-7 and HCC 38 cells. Taken together, these findings showed that LH might have the therapeutic value against human breast cancers.

## 제1장 서론

현대사회는 의학의 발전으로 점차 고령화 사회로 진입하고 있으며, 이에 따라 노화의 지연과 질병의 예방을 원하는 개개인의 식품 및 의약품 섭취에 대한 요구가 높아지고 있다(1). 또한 현대인들의 서구화된 식생활로 인해 고혈압, 비만, 당뇨 등과 같은 만성질환이 점차 증가하고 있으며, 이러한 질병들은 정상적인 대사과정에서 생기는 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 및 유리라디칼(free radical)이 체내에 증가하게 되면서 생기는 것으로 알려져 있다(2). 산소는 생명을 유지하기 위한 필수적인 요소이나, 그 부산물인 활성산소는 반응력이 매우 커 세포를 손상시킴으로서 지질산화, 단백질 분해, 세포막 손상 등의 여러 가지 생리적 기능장애 및 질환을 초래한다. 초과산화 음이온(superoxide anion), 초과산화물(superoxide), 수산화라디칼(hydroxyl radical), 과산화수소(hydrogen peroxide) 등과 같은 활성산소는 개시, 증식, 종결의 과정을 거치며 세포를 손상, 노화에 이르게 하는 것으로 보고되었다. 사람은 들이마시는 산소의 약 1~3%를 초과산화물로 만들며, 이를 사람의 산소 사용량으로 계산하면 연간 2 kg의 초과산화물을 체내에서 만드는 것과 같다(3). 이러한 활성산소로부터 자신을 보호하기 위해 인체는 glutathione peroxidase(Gpx), catalase(CAT), superoxide dismutase(SOD) 등의 방어 시스템을 이용해 활성산소를 소거한다. 이러한 항산화 효소들은  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , 유기 과산화수소, 그리고 OH 라디칼 등을 약화 또는 해소시킴으로써 항산화 기능을 나타낸다. 하지만 체내에서 빠르게 생성되는 활성산소종(ROS) 전부를 소거 할 수는 없으며, 체내 존재하는 항산화 효소는 성인의 시점에서 점차 감소하기 때문에 외부에서 항산화물질들을 충분히 공급해 주어야 한다(4). 항산화제의 종류로는 합성 항산화제와 천연 항산화제가 있으며, 널리 쓰이는 합성 항산화제에는 butylated hydroxyanisole(BHA), butylated hydroxytoluene(BHT), propyl gallate(PG) 등이 있으며, 천연 항산화제로는 polyphenol, flavonoid, carotinoid, ascorbic acid, tocopherol 등이 있다(5). 하지만 합성 항산화제인 PG, BHA, BHT, PG 등은 위장관 및 심혈관에 독성 및 발암을 일으킨다고 보고되었고, 천연 항산화제인 tocopherol은 가격이 비교적 높다는 문제점이 있다. 따라서 좀 더 안정적이고 효과적으로 대체할 수 있는 항산화제에 대한 개발이 요구되고 있다. 식품산업 분야 역시 활성산소의 생성을 억제하고 노화를 지연시키는 항산화제에 대한 관심이 높아

지고 있다(6). 또한 생성된 활성산소와 이를 소거하려는 방어체계의 불균형은 산화적 질병을 발생시킴으로서, 체내 항산화 작용과 질병에 대한 연구가 활발히 진행 중이다.

한편 현대에 이르러 생활환경 및 서구화된 식생활의 증가 등으로 인해 암 발생은 증가하고 있으나, 여전히 발생과정과 치료에 대해 명확한 해답을 찾지 못한 상황이다(7). 이중 유방암은 우리나라 여성에게 두 번째로 발병률이 높은 암으로 주목받고 있다(8). 유방암은 세계적으로 연간 100만 명 이상의 여성에게 발병하고 약 400,000명 이상의 사망자가 발생하는 선진국형 질환이다(9). 유방암의 원인으로서는 성별, 가족력, 호르몬, 나이, 생활습관에 의해 영향을 받으며 특히 운동부족, 고칼로리 식습관 등에 의해 발병률이 높다고 보고되었다. 유방암 치료에는 국소적 요법인 외과적 수술, 방사선 치료와 전신요법인 화학요법, 호르몬치료 등이 있으며, 병기에 따라 수술, 항암요법, 약물치료 등이 있다. 그러나 화학요법으로 사용되는 항암제 등은 환자 개인마다 다른 약리작용이 나타내어 정상적인 세포를 공격 하는 등 부작용 및 독성 후유증을 배제할 수 없다. 따라서 최근에는 항암 및 질병예방에 우수하며 안전성이 확인된 천연물을 이용한 약물개발이 요구되고 있는 현실이다(7). 유방암에 관한 연구로는 암세포의 사멸을 유도하는 여러 기전에 대한 연구가 활발히 진행 중이며 이에 대한 치료법에 대해서도 주목받고 있다(10). 암세포가 사멸에 이르는 과정은 크게 세포괴사(necrosis)와 자가세포사멸(apoptosis)로 분류할 수 있으며, 이는 세포의 생화학적 특성 및 형태적 특성에 의하여 구분한다. Necrosis는 조직손상이나 감염에 의해 발생하는 비정상적 과정이며 세포를 둘러싼 환경이 급격히 변할 때 세포가 더 이상 적응할 수 없어 이온농도의 변화, 세포의 팽창 등이 조절되지 않는 상태로 유발되는 세포의 사멸이다. 이는 에너지에 대해 비의존적이며 necrosis가 유발된 세포의 내용물이 유출 되어 근처에 위치한 세포에 영향을 미치게 되며 면역 반응의 손상을 유발하기도 한다(11, 12, 13). 반면 자가세포사멸인 apoptosis는 programmed cell death라고도 불리며 핵축, 세포수축, 세포막 기포형성 등의 특징을 가지는 세포내의 자발적인 파괴과정이다. Apoptosis는 생리학적으로 난자배란, 신경 시냅스 형성, 태아의 형태형성 등과 같은 발달·분화 과정중의 비정상세포 사멸에 관여하며 이러한 체내 비정상 세포의 제거는 개체 생존을 위한 정교한 방어 수단이다(14). Apoptosis는 주로 Bcl-2 family 단백질, Bax, p53 등과 연관되어 세포 내·외부로 부터 오는 신호를 통해 일련의 과정을 거친다(15). 그 경로는 세포막 수용체에 의한 외인성 경로(extrinsic way)와 미토콘드리아에 의한

내인성 경로(intrinsic way)로 구분되며, 특히 내인성 경로는 미토콘드리아의 Bcl-2 family가 cytochrome c를 세포질로 방출하게 되며 그에 따라 apoptosis 정도를 파악할 수 있다(16). 이러한 apoptosis 체계에 이상이 생기면 암 발병의 중요한 원인이 됨으로 apoptosis는 암 치료를 위한 중요한 표적중 하나로 여겨지고 있다(12, 17).

금전초(*Lysimachia christinae* Hance)는 꿀풀과(Labiatae)에 속한 전초로 여러해살이풀이며 온대기후에 분포하고 여름과 가을에 채취하여 햇볕에 말려 이용한다. 주로 털이 없거나 엉켜서 뭉쳐져 있고, 또는 부드러운 털이 성글게 났으며 줄기는 뒤틀려 있다. 잎은 마주나고 대부분 오그라져 있는데 펼치면 넓은 난형 또는 심장형으로 너비 1~5 cm, 길이 1~4 cm 이다(19). 금전초는 phenol성 성분인 sterol, flavone, amino acid, tannin, choline 등을 함유하고 있으며 myricetin, kaempferol 및 quercetin의 배당체들이 풍부하다고 보고되어 있다(18,19,20). 본 실험에 사용된 금전초는 한의학에서 성질은 미한(微寒)하고, 맛은 감함(甘鹹)하며 요로결석, 황달, 담석증, 담낭염 등의 치료제로 사용되어 왔다(21,22). 최근 이루어진 연구로는 항염증 효과(23), 산화방지효과(24), 이노제(25), 메탄올 추출물과 분획물의 담석증 감소 효과(22) 등 다양한 생리활성에 관한 연구들이 있다. 한의학 역시 오랜 기간 동안 不老(노화를 막는법)와 암의 치료를 위해 다양한 약물들을 사용해왔다. 따라서 천연 항산화제, 천연 항암제 개발을 위해 한의학 문헌에 근거한 한약재 발굴은 좋은 방법이라 할 수 있다. 하지만 약물 사용의 과학적 근거는 부족한 것이 현실이다.

현재까지 금전초의 항산화 성분에 대한 다수의 논문이 보고되고 있으나, 항산화 효과, 항암효과에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다. 체내에서 만들어진 활성산소에 의한 산화를 조절 하는 것은 apoptosis를 통한 암세포의 증식과 사멸에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(26). 따라서 본 연구에서는 금전초 추출물의 식품으로의 이용가능성에 대한 연구의 일환으로 일반성분과 영양성분을 분석하였다. 또한 금전초가 항산화활성 및 apoptosis에 미치는 영향에 대해 알아보고자 하였다.

## 제2장 연구방법

### 1. 실험재료

본 연구에 사용된 백합과 식물인 맥문동(충남 청양)은 늘푸른농장에서, 총백(전북 고창)은 갑당약초에서 구입하였다. 꿀풀과 식물인 익모초(강원 홍천), 박하(경남 산청), 금전초(충북 충주)는 각각 자연가루 가루랑, 지리산한방식품 영농조합법인, 농업회사 푸른들판에서 구입하여 사용하였다. 모든 시료는 2017년 12월에 구입하였으며,  $-70^{\circ}\text{C}$  deep freezer(MDFU52V, Sanyo Electric Co., Ltd., Osaka, Japan)에 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 2. 시료추출

건조된 5개의 시료 분말 100 g에 80% ethanol 1.5 L을 첨가하였다. 그 다음  $65^{\circ}\text{C}$ 의 heating mantle(Mtops ms-265, Seoul, Korea)에 환류냉각관을 부착하고 3시간씩 3회 반복하여 추출하였다. 이 추출액을 Whatman filter paper(Whatman No.2)를 이용하여 여과하고 그 여액을 rotary vacuum evaporator(EYELA VACUUM NVC-1100, Tokyo, Japan)를 이용하여  $40^{\circ}\text{C}$  수욕 상에서 감압·농축한 다음 동결 건조하였으며, 산화방지를 위해 시료는  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 냉동 보관하여 이용하였다.

### 3. 일반성분 분석

금전초 분말의 일반성분은 Association of Official Analytical Chemists법(27)을 이용하여 3회 분석 후 평균값으로 하였다. 수분 함량은 105℃ 건조법, 조지방은 Soxhlet법, 조회분은 550℃ 회화법으로 분석하였고 조단백질은 원소분석기vario MACRO cube, DKSH, Zurich, Switzerland)를 이용하여 전질소량을 정량하고 6.25(질소계수)를 곱하여 조단백질로 하였으며 탄수화물은 100에서 수분, 조단백질, 조지방, 조회분의 값을 제한 값으로 표시하였다.



## 4. 지방산 분석

금전초의 지방산 조성 분석은 Wungaarden의 방법(28)에 따라 분석하였다. 시료 2 g을 원통여지에 넣고 chloroform-methanol로 추출·여과하여 감압농축시켜 증량법으로 함량을 측정했다. 추출한 시료 약 100 mg을 가지형 플라스크에 취하고 1N-KOH·ethanol 용액 4 mL를 섞어 유지방울이 없어질 때까지 교반하였다. 그 후 14% BF<sub>3</sub>-Methanol 5 mL를 가한 뒤 환류냉각기를 부착하여 5분간 80℃에서 가열하여 methylester화 하였고, 이 용액에 NaCl 포화용액 3 mL를 가하고, 다시 hexane 1 mL를 가하여 흔들어 섞은 후 시험관에 옮겨 방치하였고 상층을 분리, 채취하여 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 넣어 탈수한 후 0.5 mL를 vial에 채취해서 시험용액으로 하였고, Gas chromatography(GC-17A, Shimadzu, Kyoto, Japan)로 분석하였다. 분석조건은 Table 1과 같다.

**Table 1. Operating conditions of gas chromatography for fatty acids**

Instrument model	Shimadzu GC-17A(Shimadzu Co.,Kyoto, Japan)
Column	SP <sup>TM</sup> -2560 capillary column (100m length x 0.25mm I.d. x 0.25μm film thickness)
Oven temperature	140℃(10 min) → 4℃/min → 240℃(30min)
Injection temp.	260℃
Detector temp.	260℃
Split ratio	1 : 80
Detector	Flame ionization detector
Injection volume	2 μl

## 5. 유기산 분석

유기산 시료 0.5 g을 취하여 cap이 달린 삼각플라스크에 넣고 증류수 20 mL을 가한 후, 80°C 이상의 항온 수욕 상에서 4시간 동안 가열시키고 Whatman membrane filter paper(1 μm)를 이용해 여과하여 30 mL로 정용하였다. 이를 Whatman membrane filter(0.45 μm)로 여과한 후에 Prominence HPLC(Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용해 분석하였다. 분석조건은 Table 2와 같다.

**Table 2. Operating conditions of Prominence HPLC for organic acids**

Organic acid	
Model	Prominence HPLC(Shimadzu Co., Kyoto, Japan)
Column	Two Shim-pack SCR-102H(300×8.0 mm)
Guard column	Shim-pack Guard Column SCR-102H(50×6.0 mm)
Mobile phase	4 mM <i>p</i> -toluenesulfonic acid
Oven temp.	40°C
Flow rate	0.8 mL/min
Reaction reagent	16 mM Bis-Tris aqueous solution containing 4 mM <i>p</i> -toluenesulfonic acid and 100 μM EDTA
Detection	Electroconductivity
Inj. Volume	20 μl

## 6. 비타민 분석

비타민 A, C 및 E의 분석은 식품공전법(29)의 시험방법을 기준으로 하여 분석하였다.

비타민 A와 E의 함량 측정을 위한 시료 전처리는 다음과 같다. 시료 4 g에 아스코르브산 0.1 g과 ethanol 30 mL를 첨가하여 균질화하고 80°C에서 20분간 추출하였다. 추출액에 50% KOH용액 0.25 mL를 가한 후에 증류수 3 mL와 hexane 5 mL를 첨가하여 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 시켰다. 상등액을 분리한 후 잔사에 hexane 5 mL를 가하여 균질화 시킨 뒤 80°C에서 20분 동안 추출하고 3,000 rpm에서 20분간 추출 후 원심분리 시켰다. 상등액에 무수황산나트륨을 가해 탈수 시킨 뒤 50°C에서 감압 농축하고 methanol로 용해시키고 membrane filter(0.45  $\mu$ m)로 여과하여 비타민 A와 E를 HPLC(LC-10AVP, Shimadzu, Kyoto, Japan)로 분석하였다. 분석조건은 Table 3와 같다.

비타민 C의 함량 측정을 위한 시료 전처리는 다음과 같다. 5 g의 시료를 균질화하고 10% metaphosphoric acid( $\text{HPO}_3$ ) 용액 10 mL를 가하여 원심분리(3000 rpm, 20분) 하였다. 이 후, 다시 10%  $\text{HPO}_3$  용액 5 mL를 가해서 추출하여 다시 원심분리 하였다. 이의 상등액을 취해 membrane filter (0.20  $\mu$ m)로 여과하여 시험용액으로 사용하였다. 이를 HPLC(LC-10AVP, Shimadzu, Kyoto, Japan)로 분석하였다. 분석조건은 Table 4과 같다.

Table 3. Operating conditions of HPLC for vitamin A and E

Retinol(Vit.A) and (±)α-tocopherol(Vit.E)	
Model	LC-10Avp (Shimadzu Co., Kyoto, Japan)
Column	Phenomenex Luna 5 um C18(250×4.6 mm)
Mobile phase	Acetonitrile : 2-Propanol (95 : 5)
Flow rate	1.0 mL/min
Inj.Volume	20μℓ
Detection	UV-VIS Detector(254 nm) Spectrofluorometric Detector(EX:290 nm, EM:330 nm)

Table 4. Operation conditions of HPLC for vitamin C

Ascorbicacid(Vit.C)	
Model	LC-10Avp (Shimadzu Co., Kyoto, Japan)
Column	Phenomenex Bondclone 10 um C18, 300×3.9 mm
Mobile phase	50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : Acetonitrile(60:40)
Oven temperature	30 °C
Flow rate	1.0 mL/min
Inj.Volume	20μℓ
Detection	UV-VIS Detector(254 nm)

## 7. 구성 아미노산 분석

구성 아미노산의 분석방법은 다음과 같다. 분해관에 건조된 시료 0.5g에 6N HCl 3 mL를 혼합하여 탈기하고 121℃에서 24시간 동안 가수분해 시켰다. glass filter로 여액을 여과한 후에 rotary vaccum evaporator로 감압·농축하고 sodium phosphate buffer (pH 7.0) 10 mL로 정용하였다. 용액 1 mL를 취하여 membrane filter (0.2 μm)로 여과한 후에 아미노산자동분석기(S433-H, SYKAM, Eresing, Germany)를 이용해 분석하였다. 분석조건은 Table 5와 같다.

**Table 5. Operating conditions of amino acid auto - analyzer**

Instrument	S433-H(SYKAM, Eresing, Germany)
Column	Cation separation column(LCA K06/Na)
Column size	4.6 × 150mm
Column temperature	57 ~ 74℃
Flow rate	Buffer 0.45 ml/min, reagent 0.25 ml/min
Buffer pH range	3.45 ~ 10.85
Wavelength	fluorescence spectrophotometer (440 nm and 570 nm)

## 8. 무기질 분석

구성 무기질 분석은 A.O.A.C.방법(27)에 준하여 실시하였다. 시료 0.5 g에 20% HNO<sub>3</sub> 10 mL, 60% HClO<sub>4</sub> 3 mL를 가하여 투명하게 변할 때까지 가열하였다. 그 후 0.5 M HNO<sub>3</sub>로 50 mL를 정용하였다. 각각의 항목별 표준용액을 혼합하고, vial 병에 8 mL씩 취하여 표준용액으로 한 다음 0.5 M HNO<sub>3</sub>를 대조군으로 하여 유도 결합플라즈마 분광분석기(ICP-OES, PerkinElmer, Massachusetts, USA)로 측정하였다. 분석조건은 Table 6과 같다.

**Table 6. Operating conditions of Inductively Coupled Plasma Spectrometer for minerals**

Item	Condition							
Instrument	ICP-OES (PerkinElmer, Massachusetts, USA)							
Lamp Item	Ca	K	Mg	Fe	Na	Mn	Cu	Zn
Wavelength	317.93	766.49	285.21	238.20	589.59	257.61	327.39	206.20
Plasma Unit	RF Power 1.4 Kw Gas Flow Rate 15 L/min							

## 9. 총 polyphenol 함량 측정

총 polyphenol 함량은 Folin-Denis법(30)에 따라 측정하였고 추출물의 농도를 1mg/mL 농도로 하여 사용하였다. 시료 0.5 mL와 Folin reagent 0.5 mL를 혼합하여 실온에서 3분간 방치한 다음 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.8 mL을 첨가한 후 40분간 방치하였으며, UV-spectrophotometer (Bio-rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. tannic acid를 표준물질로 하여 표준검량곡선을 적용해 추출물의 총 polyphenol 함량을 산출하였다.

## 10. 총 flavonoid 함량 측정

총 flavonoid 함량은 Davis법을 변형한 방법(31)에 따라 측정하였다. 5개의 시료를 1mg/mL 농도로 맞추어 시료로 사용하였다. 시료 0.5 mL와 diethylene glycol 0.5 mL를 넣은 다음, 1 N NaOH 10  $\mu\text{L}$ 을 넣고 37°C heating block에서 1시간 동안 반응을 시키고 UV-spectrophotometer(Bio-rad, Hercules, CA, USA)로 420 nm로 흡광도를 측정하였다. rutin을 표준물질로 하여 표준검량곡선을 적용해 추출물의 총 flavonoid 함량을 산출하였다.

## 11. DPPH 라디칼 소거능 측정

금전초 추출물의 0.2 mM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거능은 Blois의 방법(32)에 따라 다음과 같이 측정하였다. 0.2 mM DPPH 시약(Sigma, St. Louis, MO, USA) 900  $\mu$ L에 농도별 시료 100  $\mu$ L를 첨가하여 37°C heating block에 30 분간 반응시켰다. 96 well plate에 200  $\mu$ L씩 분주하고 UV-spectrophotometer(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 517 nm로 흡광도를 분석하였다.

## 12. ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거능 측정

금전초 추출물의 2,2'-Azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid(ABTS) radical 소거능은 Re 등의 방법(33)을 변형하여 다음과 같이 분석하였다. 7 mM ABTS와 2.4 mM potassium persulfate를 1 : 1로 혼합한 다음 실온인 암소에서 24시간 방치하여 라디칼의 생성을 유도하였다. 그 후, 734 nm에서 흡광도 값이 0.7~1.0 정도가 되도록 희석하여 이용하였다. 희석한 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 용액 900  $\mu$ L와 금전초 추출물 100  $\mu$ L을 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 UV-spectrophotometer(Bio-rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 734 nm로 흡광도를 측정하여 라디칼 소거능을 분석하였다.



## 13. 세포배양

본 실험에 이용된 인체 유방암세포주 MCF-7과 HCC 38은 한국세포주은행 (Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea) 에서 분양받아 본 실험실에서 배양 후 사용하였다. RPMI 1640(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)배지에 1% penicillin/streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS)을 포함하여 배양배지로 사용하였다. 배양조건은 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator(MCO-18AIC, Sanyo, Osaka, Japan) 이다.

## 14. MTS assay

MCF-7, HCC 38 세포를 96 well plate에  $2 \times 10^3$ /well로 분주하여 24시간 배양한 후, dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹인 금전초 추출물을 각 well 당 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mg/mL의 농도로 처리하였다. 24시간 및 48시간 후 CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay(MTS) 용액(Promega Co., CA, USA) 20 µL 씩을 각 well에 첨가하였다. 그리고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator 조건에서 30분 단위로 4시간 동안 UV-spectrophotometer(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 490 nm로 흡광도를 분석하였다.

## 15. 인체 유방암 세포 형태 관찰

MCF-7과 HCC 38 암세포의 형태변화를 광학현미경(CKX41, OLIMPUS Co., Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였다. 세포를 60 mm dish에  $5 \times 10^5$  cell/well이 되도록 분주하였다. 그 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator(MCO-18AIC, Sanyo, Osaka, Japan) 에서 24시간 안정화 시키고 금전초 추출물을 각각 0, 0.2, 0.4 mg/mL로 처리한 후 48시간 동안 반응시켰다. 금전초 추출물에 의한 인체유방암 세포의 형태학적 변화를 100배율로 관찰하였다.

## 16. DAPI staining

MCF-7, HCC 38 세포를 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI) 염색 후 암세포 핵의 형태변화를 관찰하였다. MCF-7, HCC 38 세포를 12 well plate에  $1 \times 10^5$ /well로 분주하고 안정화시킨 후, 금전초 추출물을 각각 0, 0.2, 0.4 mg/mL 처리하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator(MCO-18AIC, Sanyo, Osaka, Japan) 조건에서 배양하였다. 48시간 후, 배지를 제거하고 phosphate buffered saline(PBS)로 세척한 후에 4% paraformaldehyde solution(Biosesang, Seongnam, Korea)을 첨가하여 1시간 동안 실온에서 고정하였다. 상층액을 제거하고 0.5% Triton X-100 solution(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시켰다. 그 후 DAPI staining 용액(Vector laboratories, Burlingame, CA, USA)을 처리하여 실온에서 염색한 다음 암실에서 형광현미경(BX41, OLIMPUS, Tokyo, Japan)을 이용해 200배의 배율로 각 농도별 apoptosis 형태 변화를 관찰하였다.

## 17. Western blotting

금전초 추출물을 0, 0.2, 0.4 mg/mL 처리한 MCF-7과 HCC 38 세포의 apoptosis 관련 단백질의 발현을 분석하기 위하여 Western blotting을 수행하였다. 금전초 추출물을 농도별로 처리한 세포를 회수하여 lysis buffer(150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, and 50 mM Tris-HCl, pH 8.0)를 세포에 첨가하여 4°C에서 30 분간 반응시킨 후 14,000 rpm에서 25분 동안 원심분리하여 상층액에 있는 총단백질을 분리하였다. 상층액 단백질을 정량한 후에 Laemmli sample buffer(Bio-Rad, CA, USA)을 넣어 protein sample을 만들었다. 동일한 양의 단백질을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)에서 전기영동하여 분리한 후에 polyvinylidenedifluoride(PVDF) membranes에 transfer시켰다. transfer가 끝난 membrane을 5% skim milk를 이용하여 1시간동안 blocking한 후 1차 항체를 처리하여 4°C에서 overnight 반응시킨 후, 2차 항체를 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 단백질 분석을 위해 사용된 Akt, phospho-Akt, poly(ADP-ribose) polymerase(PARP), Bcl-2, p53,  $\beta$ -actin, cleaved PARP등 1차 antibody 및 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse antibody는 Santa Cruz(Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 반응이 끝난 후 암실에서 enhanced chemiluminescence solution(Amersham Biosciences Co., Buckinghamshire, UK)을 적용하여 필름에 노출시켜 특정단백질의 발현 양을 확인하였다.

## 18. 통계처리

모든 실험은 독립적으로 3회 반복을 시행하였다. 각 실험군 간의 유의성 검증은 GraphPad Prism 5 program (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)을 사용하였다. 그 결과는 평균 (mean)과 표준편차 (SD)로 나타내었다. 각 시료간의 통계적 유의성은  $p < 0.05$  수준에서 Student *t*-test에 의해 검정하였다.

## 제3장 실험결과 및 고찰

### 1. 일반성분 분석

금전초 분말의 일반성분을 분석한 결과는 Table 7과 같다. 건조한 금전초 분말의 일반성분 함량은 수분 8.17%, 조회분 7.09%, 조지방 0.72%, 조단백질 5.83%, 및 탄수화물 78.19%이었다. 금전초와 같은 꿀풀과 식물인 초석잠은 수분 4.13%, 조회분 10.49%, 조지방 1.57%, 조단백질 27.86% 및 탄수화물 55.95%로(34) 금전초 분말이 초석잠에 비해 탄수화물 함량이 높은 것으로 나타났다. 또 다른 꿀풀과 식물인 배초향(35)은 수분 77.80%, 조회분 2.34%, 조지방 0.63%, 조단백질 4.39% 및 조섬유질이 1.40%로 나타났다. 금전초는 배초향에 비하여 수분 함량이 본 연구와 차이를 보였다.

Table 7. Proximate compositions of *Lysimachia christinae* Hance (%)

Composition	Sample	<i>Lysimachia christinae</i> Hance
Moisture		8.17±0.02 <sup>2)</sup>
Crude ash		7.09±0.65
Crude fat		0.72±0.01
Crude protein		5.83±0.80
Carbohydrate <sup>1)</sup>		78.19±1.02

<sup>1)</sup>Carbohydrate = 100 - (moisture + crude protein + crude fat + crude ash).

<sup>2)</sup>All values are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

## 2. 지방산

금전초의 지방산 조성은 Table 8과 같다. 금전초의 지방산 조성은 포화지방산 5종, 단일불포화지방산 3종, 다가불포화지방산 3종의 총 11종의 지방산이 검출되었다. 포화지방산은 palmitic acid의 함량이 29.84%로 가장 높았고, heptadecanoic acid의 함량이 5.50%로 다음으로 높았다. 불포화지방산은 cis-11,14,17-eicosatienoic acid의 함량이 21.20%로 가장 높았고, linoleic acid의 함량이 17.78%로 다음으로 높았다. 따라서 금전초의 주요 지방산은 palmitic acid, cis-11,14,17-eicosatienoic acid, heptadecanoic acid, linoleic acid로 나타났다. 금전초와 같은 꿀풀과 식물인 초석잠 잎의 지방산 함량을 보면 포화지방산은 heneicosanoic acid가 63.40%로 가장 높았고, 다음으로 palmtic acid가 높았다. 불포화지방산은 linoleic acid가 12.27%로 가장 높았고 다음으로 linolenic acid가 높았다(34). 따라서 본 연구에서 다른 꿀풀과 식물의 연구와 유사하게 palmtic acid와 linoleic acid가 주요 지방산으로 나타났다.

Table 8. Compositions of fatty acids in *Lysimachia christinae* Hance  
(% total fatty acids)

Fatty acid	<i>Lysimachia christinae</i> Hance
Myristic acid (C14:0)	0.97±0.04 <sup>1)</sup>
Pentadecanoic acid (C15:0)	0.44±0.02
Palmitic acid (C16:0)	29.84±0.02
Heptadecanoic acid (C17:0)	5.50±0.13
Stearic acid (C18:0)	3.17±0.02
Saturated	39.92
cis-10-Heptadecenoic acid (C17:1)	1.54±0.01
Oleic acid (C18:1n9c)	11.43±0.04
cis-11-Eicosenoic acid (C20:1)	0.93±0.01
Monounsaturated	13.91
Linoleic acid(C18:2n6c)	17.78±1.12
Linolenic acid(C18:3n3)	7.19±0.05
cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid (C20:3n3)	21.20±2.52
Polyunsaturated	46.18
Total	100.00

<sup>1)</sup>All values are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

### 3. 유기산

금전초의 유기산 함량을 분석한 결과는 Table 9과 같다. 총 7종의 유기산이 11982.34 ppm 으로 검출되었으며, 이 중 malic acid가 4960.68 ppm으로 가장 높았고, 다음으로 citric acid가 2411.30 ppm, tartaric acid가 1757.95 ppm, succinic acid 1393.63 ppm, formic acid 972.59 ppm, acetic acid 486.17 ppm 순으로 나타났다. 같은 꿀풀과 식물인 초식잠 뿌리의 경우 malic acid가 가장 높았고 다음으로 citric acid, formic acid, acetic acid 순으로 나타났다(34). 또 다른 꿀풀과 식물인 배암차즈기의 경우 succinic acid, citric acid, malic acid, tartaric acid 순으로 나타났다(36). 따라서 본 연구의 금전초를 비롯하여 다른 꿀풀과 식물들은 malic acid가 주요 유기산 이라는 점을 확인할 수 있었다.



Table 9. Contents of organic acids in *Lysimachia christinae* Hance

(ppm)

Organic Acid	<i>Lysimachia christinae</i> Hance
Citric acid	2411.30±4.34 <sup>1)</sup>
Tartaric acid	1757.95±3.21
Malic acid	4960.68±5.17
Succinic acid	1393.63±1.87
Lactic acid	N.D.
Formic acid	972.59±2.51
Acetic acid	486.17±1.24
Total	11982.34

<sup>1)</sup>All values are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

## 4. 비타민

금전초의 비타민 A, E 및 C 함량을 식품공전법의 시험방법(27)에 의거하여 분석한 결과는 Table 10과 같다. 금전초의 비타민 C 함량은 4695.53 ppm 으로 가장 높게 나타났으며 비타민 E 함량은 43.21 ppm 으로 나타났고 비타민 A는 검출되지 않았다. 항산화 비타민인 A, C 및 E는 세포의 활성산소를 제거하여 산화적 스트레스를 감소시키는 영양소이다. 비타민 C는 수용성 비타민으로 주로 채소나 과일 속에 들어있으며 체내 생물학적 반응을 돕는 기능을 하는데 주로 수용성 환경에서 강한 생물학적 환원제로 쓰이는 항산화 역할을 하고, 비타민 E는 지용성 비타민으로 체내에서는 합성이 되지 않으며 세포막을 안정시키는 역할에 작용 한다(37). 같은 꿀풀과 식물인 초석잠(34) 의 경우 비타민 A는 397.9 ppm, 비타민 E는 114.9 ppm이 검출되었으나, 비타민 C는 검출되지 않았다고 보고되었다. 또 다른 꿀풀과 식물인 배초향(35) 에서는 비타민 C가 81.6 ppm 검출되었다. 다른 꿀풀과 식물들과 비교했을 때 금전초의 비타민 함량은 높음을 알 수 있다. 또한 금전초의 비타민 C 함량은 비타민이 풍부하기로 알려진 대표적 식품인 감귤 2890 ppm, 딸기 1540 ppm(38) 보다도 함량이 높음을 알 수 있다.

Table 10. Contents of vitamin A, C and E in *Lysimachia christinae* Hance  
(ppm)

Vitamin	<i>Lysimachia christinae</i> Hance
vitamin A	N.D.
vitamin C	4695.53±4.27 <sup>1)</sup>
vitamin E	43.21±1.71

<sup>1)</sup>All values are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

## 5. 구성 아미노산

금전초의 구성아미노산 함량은 Table 11과 같다. 금전초의 구성 아미노산은 필수아미노산 8종과 비필수아미노산 8종이 검출되어 도합 16종의 아미노산이 검출되었다. 필수아미노산의 총 함량은 1555.56 mg/100g으로 조성을 보면 leucine이 가장 많았고, methionine이 가장 적었다. 비필수아미노산 에서는 glutamic acid가 가장 많았고 tryosine이 가장 적었다. 총 구성 아미노산의 함량은 3,593.39 mg/100g 이었다. 같은 꿀풀과 식물인 잎들개는 L-aspartic acid이 가장 많고(39) 총 아미노산 함량은 3,094.20 mg/100g으로 같은 꿀풀과 식물에 비해 금전초의 총 아미노산 함량이 높은 것으로 나타났다. 또한 금전초의 필수 아미노산은 1555.56 mg/100g으로 필수아미노산의 비율은 43.28%로 이었으며 잎들개의 경우 필수아미노산 비율은 28.05%로 나타났다. 같은 꿀풀과 식물에 비해 금전초의 필수아미노산 비율이 높은 것을 확인할 수 있었다.

Table 11. Contents of total amino acids in *Lysimachia christinae* Hance  
(mg/100g)

Amino acid	<i>Lysimachia christinae</i> Hance
Essential	
Threonine	224.43±3.32 <sup>3)</sup>
Valine	243.00±1.14
Methionine	40.41±2.25
Isoleucine	182.13±0.85
Leucine	333.51±1.58
Phenylalanine	220.42±2.33
Histidine	124.00±1.58
Lysine	187.62±0.84
Total EAA <sup>1)</sup>	1555.56
Non-essential	
Aspartic acid	415.07±3.34
Serine	161.84±0.66
Glutamic acid	442.76±2.86
Proline	203.18±1.47
Glycine	229.30±2.61
Alanine	275.03±0.73
Tryosine	130.72±1.29
Arginine	179.90±1.83
Total AA <sup>2)</sup>	3,593.39
EAA/AA(%)	43.28

<sup>1)</sup>Total EAA: Total essential amino acid.

<sup>2)</sup>Total AA: Total amino acid.

<sup>3)</sup>All values are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

## 6. 무기질

무기질은 체내 여러 생리기능의 조절 및 유지에 필수적이며, 식품을 통한 섭취가 매우 중요한 영양소다(40). 금전초의 무기질 함량은 Table 12와 같다. 총 무기질의 함량은 3639.19 mg/100g 으로 8종의 무기질이 검출되었다. 이중 K의 함량이 2624.00 mg/100g으로 가장 많이 검출되었고, 다음으로 Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu 순서로 나타났다. K은 Na 이온과 같이 산 염기 평형에 관여하고, 세포내액에서 Na과 함께 체액의 수분평형과 삼투압을 조절하는 무기질이며(41), K의 섭취는 고혈압의 예방 및 치료에 효과적이라 보고되었다(42). 같은 꿀풀과 식물인 배초향(35)의 무기질 함량은 K이 519 mg/100g로 가장 많이 검출되었으며, 그 다음으로는 Ca, Na, Mg 순이었다. 꿀풀과 다른 식물에 비해 금전초의 무기질 함량이 높은 것으로 확인되었다.

Table 12. Contents of minerals in *Lysimachia christinae* Hance

(mg/100g)

Mineral	<i>Lysimachia christinae</i> Hance
Ca	717.60±2.24 <sup>1)</sup>
K	2624.00±3.25
Mg	242.00±1.74
Fe	39.06±3.19
Na	2.66±2.67
Mn	9.08±1.23
Cu	0.76±2.57
Zn	4.03±1.36
Total	3639.19

<sup>1)</sup>All values are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

## 7. 총 polyphenol 함량

본 연구에서는 금전초, 맥문동, 총백, 박하, 익모초 에탄올 추출물의 총 polyphenol 함량 측정을 위해 tannic acid를 기준물질로 사용하였고, 총 polyphenol 함량은 Table 13에서와 같다. 각각의 총 polyphenol 함량은 금전초가 311.31 mg TAE/g, 맥문동은 206.10 mg TAE/g, 총백은 200.79 mg TAE/g, 박하는 131.18 mg TAE/g, 익모초는 188.65 mg TAE/g로 나타났다. 다른 식물에 비해 금전초의 총 polyphenol 함량이 유의하게 높았다. Polyphenol은 식물에서 발견되는 화학물질 중 하나로 분자 하나당 페놀그룹이 한 개 이상 있으면 tannin, flavonoid, lignin 등으로 분류되고 두 개 이상의 (-OH)기로 치환된 것이다. 식물체에 존재하는 Polyphenol류는 대표적인 항산화성 물질이며, 항암, 항균 등의 다양한 생리활성 역할을 하는 것으로 알려져 있다(43). 페놀 화합물은 벤젠고리 탄소에 phenolic hydroxyl (-OH)기가 자유라디칼과 결합하여 안정화된 공명구조의 phenoxyl radical을 형성하여 직접적으로 자유 라디칼들을 소거하거나, 항산화 효소와 함께 간접적으로 자유 라디칼을 제거하여 항산화 효과, 항암 및 항균, 간보호 작용 등의 생리활성을 가지고 있다(44). 금전초와 같은 꿀풀과인 다른 식물들의 총 polyphenol 함량을 살펴보면 초석잠 잎이 236.35 mg/g(34), 황금 추출물이 103.53 mg TAE/g(45)인 것을 알 수 있다. 본 연구를 통해 금전초의 총 polyphenol 함량이 같은 꿀풀과 다른 식물들에 비해 유의하게 높은 것을 알 수 있었다.



Table 13. Total polyphenol

	Total polyphenol (mg TAE/g)
금전초 ( <i>Lysimachia christinae</i> Hance)	311.31 ± 3.73
맥문동 ( <i>Liriope platyphylla</i> )	206.10 ± 12.53
총백 ( <i>Allii Fistulosi</i> Bulbus)	200.79 ± 7.38
박하 ( <i>Mentha piperascens</i> )	131.18 ± 5.65
익모초 ( <i>Leonurus sibiricus</i> )	188.65 ± 4.67

All values are expressed as the mean ± SD of triplicate determinations.

## 8. 총 flavonoid 함량

식물체에 존재하는 flavonoid류는 대표적인 항산화성 물질이며, 향균, 항암 등의 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(43). flavonoid는 식물성 polyphenol계 화합물의 가장 큰 부류이며, 약 4000개의 화합물로 이루어진 화합물로 노란색 계열의 항산화 물질이다. 화학적 구조 차이에 의해 flavanol, flavanone, flavone, isoflavone, anthocyanidin의 5가지 하위그룹으로 나뉘며, 생리활성, 분포와 대사에 있어 차이점을 가지며 효능에도 차이가 있다(46). 본 연구에서는 금전초, 맥문동, 총백, 박하, 익모초 에탄올 추출물의 총 flavonoid 함량 측정을 위해 rutin을 기준물질로 사용하였고, 총 flavonoid 함량은 Table 14와 같다. 각각의 총 flavonoid 함량은 금전초가 184.68 mg RE/g, 맥문동은 7.97 mg RE/g, 총백은 11.00 mg RE/g, 박하는 5.51 mg RE/g, 익모초는 109.85 mg RE/g로 나타났다. 다른 식물에 비해 금전초의 총 flavonoid 함량이 유의하게 높았다. 금전초와 같은 꿀풀과인 다른 식물들의 총 flavonoid 함량을 살펴보면 초석잠 잎이 101.76 mg/g(34), 황금 추출물이 101.98 mg RE/g(45)인 것을 알 수 있다. 본 연구를 통해 금전초의 총 flavonoid 함량이 같은 꿀풀과 다른 식물들에 비해 유의하게 높은 것을 알 수 있었다.

Table 14. Total flavonoid

	Total flavonoid (mg RE/g)
금전초 ( <i>Lysimachia christinae</i> Hance)	184.68 ± 1.80
맥문동 ( <i>Liriope platyphylla</i> )	7.97 ± 1.33
총백 ( <i>Allii Fistulosi</i> Bulbus)	11.00 ± 1.67
박하 ( <i>Mentha piperascens</i> )	5.51 ± 0.67
익모초 ( <i>Leonurus sibiricus</i> )	109.85 ± 7.25

All values are expressed as the mean ± SD of triplicate determinations.

## 9. DPPH 라디칼 소거능

활성산소는 에너지 생성을 위한 산화과정 등에서 발생하게 되고, 그로 인해 과하게 증가된 활성산소는 체내 방어기전에 작용하여 노화 및 암 등의 원인이 된다(47). 그에 따라 질병을 막기 위해선 항산화능을 보유한 생리활성 물질의 확인이 중요하다. 이러한 물질의 가장 특징적인 기작은 유리기와 반응하는 것이다. 자유라디칼 소거 작용은 인체에서 노화를 억제하는 척도 또는 항산화 효과의 척도로 이용되고 있으며 이를 측정하기 위해 DPPH가 대표적으로 쓰이고 있다. 본 연구 결과, 금전초 에탄올 추출물을 이용한 DPPH 라디칼 소거능은 Table 15와 같다. 0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL 농도에서 각각 19.52%, 26.42%, 49.77%, 70.55%로 나타났고 50% 라디칼 소거능인 IC<sub>50</sub>을 구한 결과, DPPH의 IC<sub>50</sub>은 0.62 mg/mL로 나타났다. 금전초와 같은 꿀풀과에 속하는 초석잠 잎의 DPPH 라디칼 소거능은 0.5 mg/mL 농도에서 39.36%로 나왔으며 본 연구결과보다는 더 높은 함량에서 동일한 효과를 나타내었다(34).

Table 15. DPPH radical-scavenging activity of *Lysimachia christinae* Hance

Concentration (mg/mL)	DPPH radical scavenging activity(%)
0.125	19.52 ± 4.34
0.250	26.42 ± 1.22
0.500	49.77 ± 0.79
1.000	70.55 ± 3.56
IC <sub>50</sub> (mg/mL)	0.62

All values are expressed as the mean ± SD of triplicate determinations.

## 10. ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거능

ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거능은 potassium persulfate를 암소에서 24시간 반응시켜 생성된 ABTS<sup>+</sup>유리 라디칼이 항산화력 물질에 의해 환원되고 색이 변화되는 것을 이용하여 측정하였다(48). 본 연구 결과, 금전초 에탄올 추출물을 이용한 ABTS 라디칼 소거능은 Table 16과 같다. 금전초의 ABTS<sup>+</sup> radical 소거능은 0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL 농도에서 각각 46.36%, 78.49%, 95.24%, 95.20%로 나타났고, 50%의 라디칼 소거능의 값인 IC<sub>50</sub>을 구한 결과, ABTS<sup>+</sup>의 IC<sub>50</sub>은 0.15 mg/mL로 나타났다. 꿀풀과에 속하는 들깨 새싹 추출물의 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거능은 0.5 mg/mL 농도에서 79.4%로 나왔으며 본 연구결과보다는 더 높은 함량에서 유사한 효과를 나타내었다(49).

Table 16. ABTS<sup>+</sup> radical-scavenging activity of *Lysimachia christinae*  
Hance

Concentration (mg/mL)	ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activity(%)
0.125	46.36 ± 0.60
0.250	78.49 ± 0.41
0.500	95.24 ± 0.08
1.000	95.20 ± 0.13
IC <sub>50</sub> (mg/mL)	0.15

All values are expressed as the mean ± SD of triplicate determinations.

## 11. 금전초 추출물이 유방암세포의 성장에 미치는 영향

인체유방암세포 증식억제 효과를 확인하기 위해 금전초 추출물 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mg/mL의 농도를 MCF-7과 HCC 38 세포에 24시간 또는 48시간 동안 처리하여 MTS assay를 통해 측정하였으며 그 결과는 Fig.1과 같으며 금전초 추출물에 의해 농도 의존적으로 암세포 성장률이 감소하였으며 MCF-7 세포주에 0.8 mg/mL 농도, 24시간 처리한 경우 32.2%, 48시간 처리한 경우 62.2% 세포 성장억제율을 보였고 HCC 38 세포주에 금전초 0.8 mg/mL 농도, 24시간 처리한 경우 27.8%, 48시간 처리한 경우 59.4% 세포 성장 억제율을 보였다. 같은 꿀풀과에 속하는 황금 추출물을 Caki-1 신세포암 세포주에 48시간 처리한 경우, 0.2 g/mL 농도에서부터 세포증식 억제효과를 보였으며 0.8 g/mL 농도에 이르러 72%의 증식 억제효과를 나타내었고(50), 다른 꿀풀과 식물인 곰보배추 추출물을 MCF-7 유방암 세포주에 72시간 처리한 경우도 0.8 g/mL 농도에 이르러 70%의 증식 억제효과를 나타내는 결과로써(51) 대체적으로 본 연구결과와 유사한 경향을 보였다. 그리고 인체유방암 세포의 형태는 Fig.2와 같으며 48시간 동안 금전초 추출물 처리에 따른 MCF-7과 HCC 38 세포주의 형태학적인 변화를 살펴보았을 때, 금전초 추출물의 처리 농도가 증가할수록 세포가 부착된 형태를 잃으며 세포 형태의 변화가 심하고 또한 세포수도 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과를 통해 금전초는 MCF-7과 HCC 38 인체 유방암세포에서 증식억제 효과가 있는 것으로 사료된다.



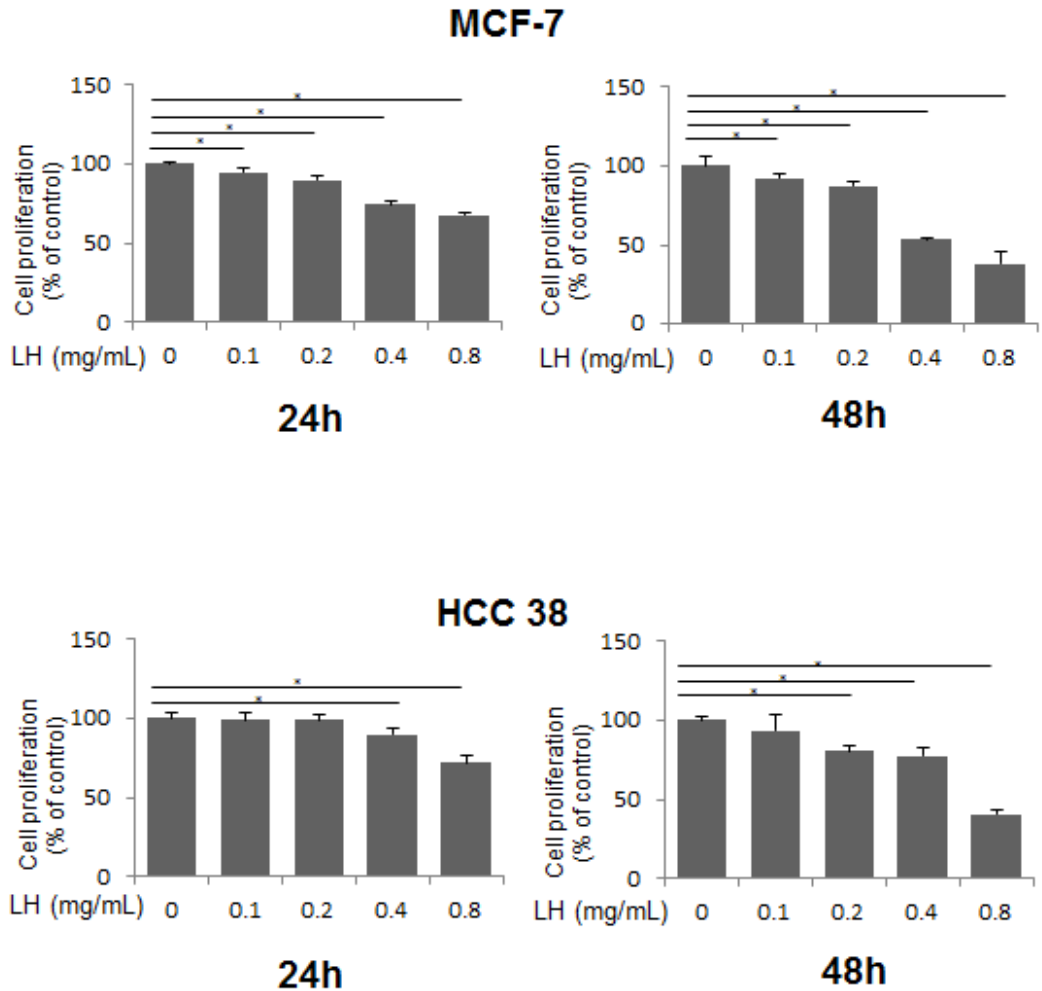


Fig. 1. Viability of MCF-7 and HCC 38 breast cancer cells after treatment with the indicated concentrations of *Lysimachia christinae* Hance extract for 24 and 48 h by a MTS assay.

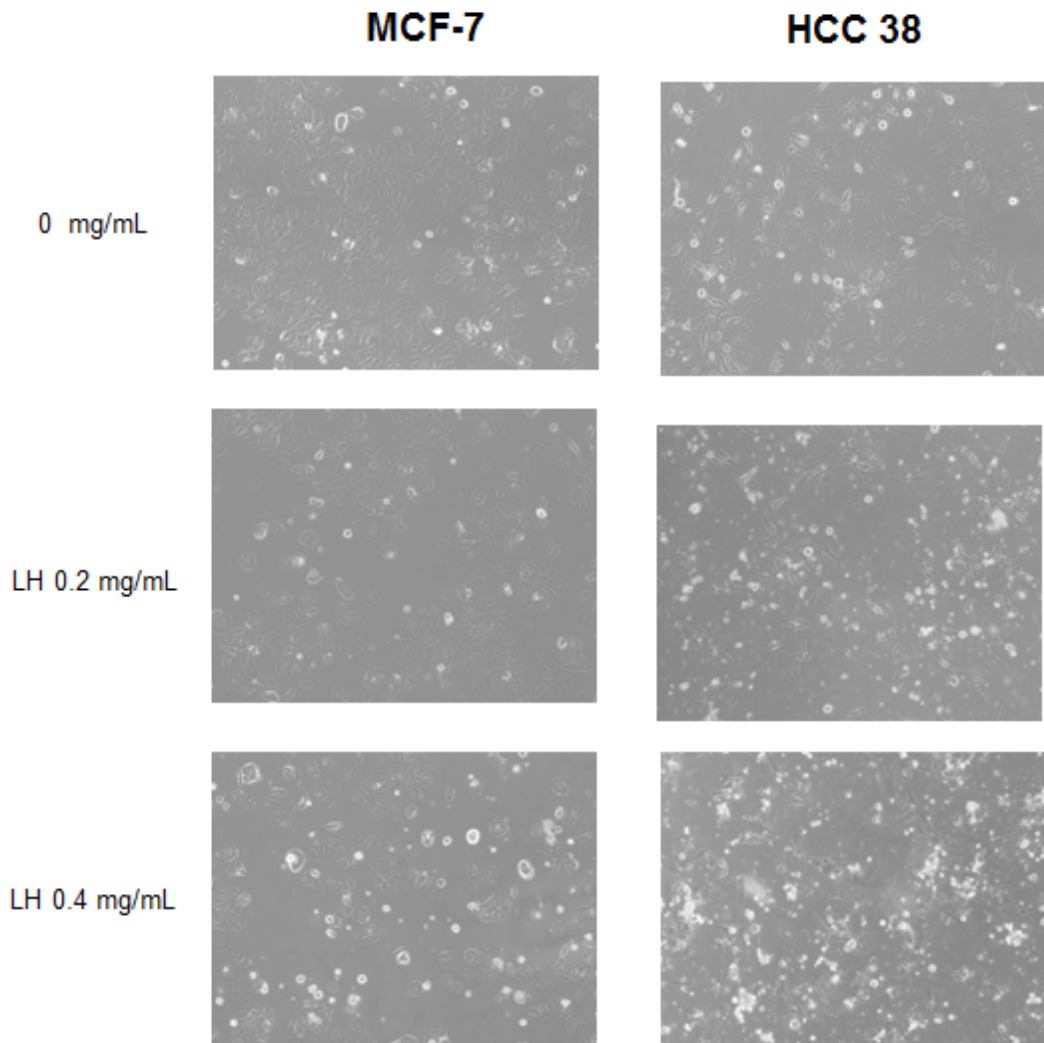


Fig.2. The cell morphology was visualized by optical microscopy after the *Lysimachia christinae* Hance extract treatment for 48h (magnification  $\times 100$ ). All values are expressed as the mean  $\pm$  SD of at least three replicate experiments. Significantly different ( $p < 0.05$ ) compared to the DMSO-control.

## 12. DAPI 형광염색을 이용한 apoptosis 확인

apoptosis는 병리적 원인에 노출된 세포를 죽음에 이르게 하는 세포내의 자발적 파괴과정을 말하며 nucleosome의 linker DNA 부분이 절단되고 단편화 되어 세포막의 수포화 현상, 염색질 및 핵의 응축에 의한 분절(apoptotic body)이 생성되며 이것은 염색시약에 의해 관찰된다(52). 이러한 apoptosis가 억제 되는 것이 암의 주요 특징이다(53). 따라서 본 연구에서는 금전초에 의한 유방암세포의 증식억제가 apoptosis에 의한 것인지 확인하기 위해 DAPI staining을 시행하였고 그 결과는 Fig. 3과 같다. 연구 결과 유방암세포에 48시간 동안 금전초를 처리했을 경우, 처리하지 않은 대조군은 비교적 일정한 반면 금전초 처리군에서는 핵이 손상되어 응축이 일어났으며 apoptosis의 특징인 apoptotic body가 증가되었다. 특히 MCF-7, HCC 38 암세포 모두에서 0.2 mg/mL 이상의 농도에서 apoptotic body증가와 세포 수축이 확연히 나타났다. 따라서 금전초 추출물의 처리에 따른 유방암세포 성장억제 효과는 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있는 것으로 분석된다.

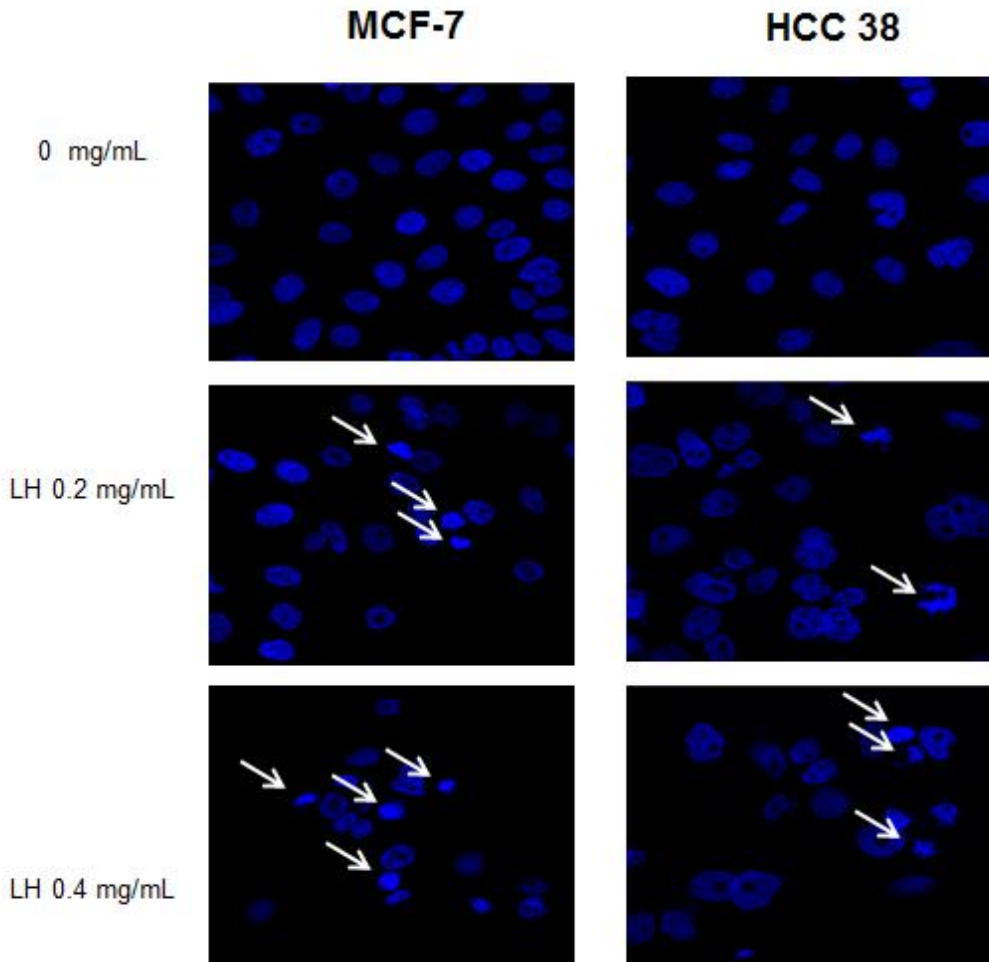


Fig. 3. Induction of apoptosis by *Lysimachia christinae* Hance extract in MCF-7 and HCC 38 breast cancer cells. The nuclear morphology was analyzed by DAPI staining for 48h (magnification  $\times 200$ ).

### 13. 금전초 추출물이 유방암세포의 apoptosis 관련 단백질 발현에 미치는 영향

Bcl-2 family 단백질, p53 등과 연관되어 세포 내·외부로 부터 자극을 받으면 death signal 들이 활성화되고 apoptosis가 유도되며, 이 과정 중 관련 단백질들의 발현과 억제가 일어난다. mitochondria 막전위가 변화되어 투과성이 증가되면 종양 억제자인 p53을 활성화 시키며 DNA 손상을 복구하는 poly-ADP ribose polymerase(PARP) 단백질이 분절되고 그 결과 암세포의 apoptosis가 유도된다(54). 그 결과는 Fig. 47와 같으며 genomic stability에 관여하는 apoptosis 표적단백질 PARP의 경우 금전초 처리군에서 단편화 현상이 관찰되었으며 pro-apoptotic 단백질인 cleaved PARP는 증가하였고 anti apoptotic 단백질인 Bcl-2는 감소하였고 암 억제 단백질로 알려진 p53 은 증가하였다. 따라서 MCF-7과 HCC 38 유방암세포에 금전초 추출물을 처리했을 때 apoptosis를 유도한다는 것을 알 수 있었다.

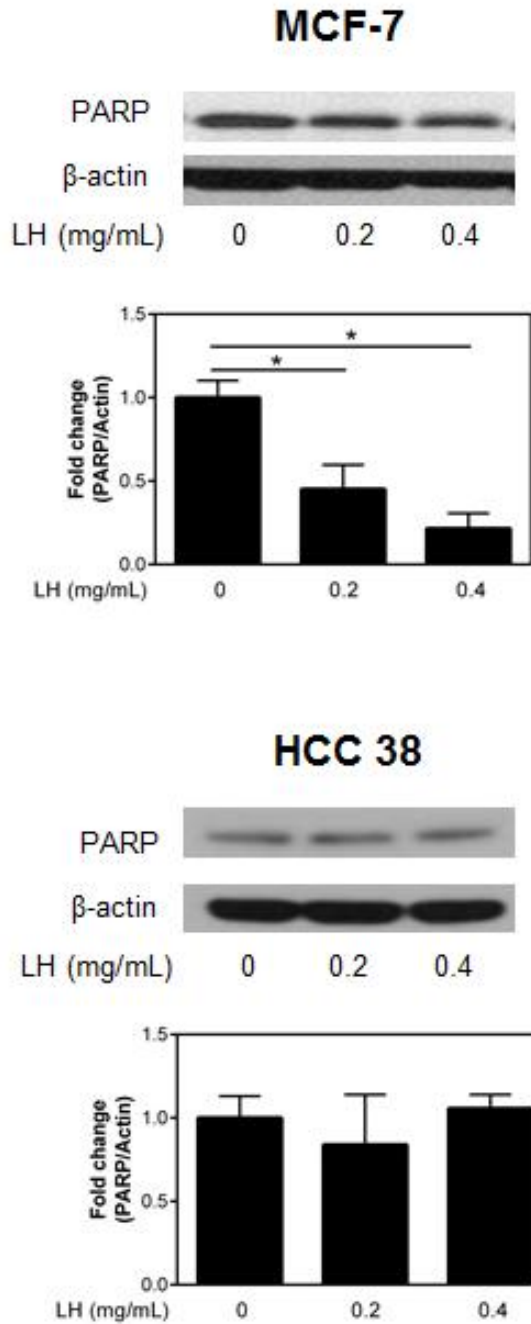


Fig.4. The changes of PARP expressions in MCF-7 and HCC 38 cells

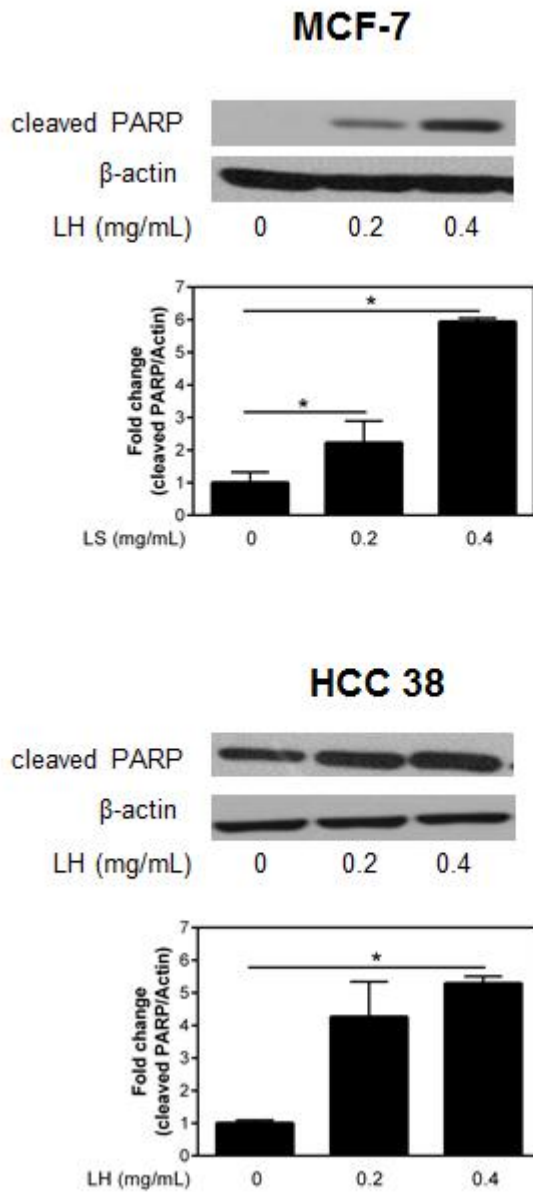


Fig.5 The changes of cleaved PARP expressions in MCF-7 and HCC 38 cells

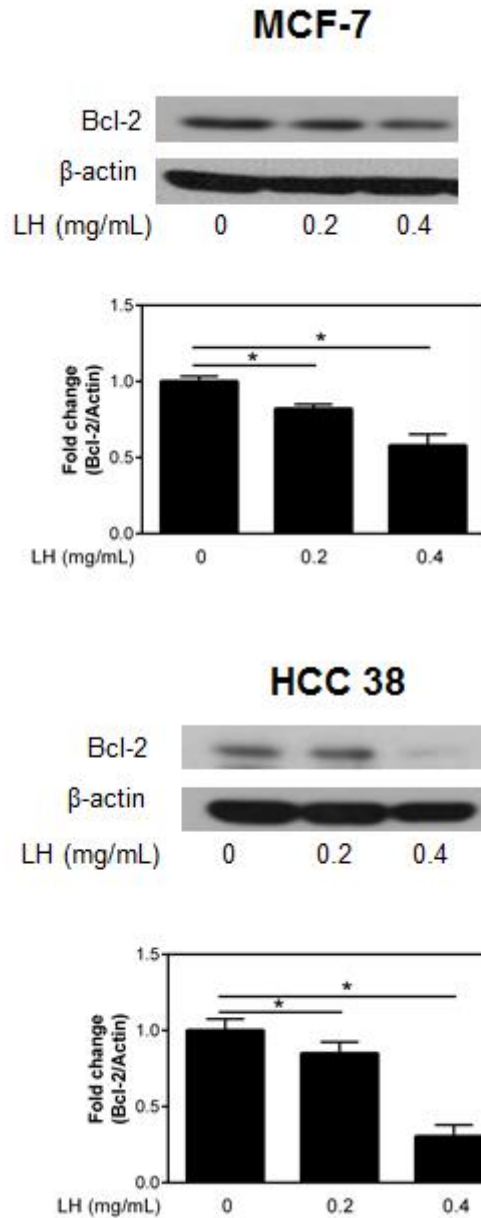


Fig. 6. The changes of Bcl-2 expressions in MCF-7 and HCC 38 cells



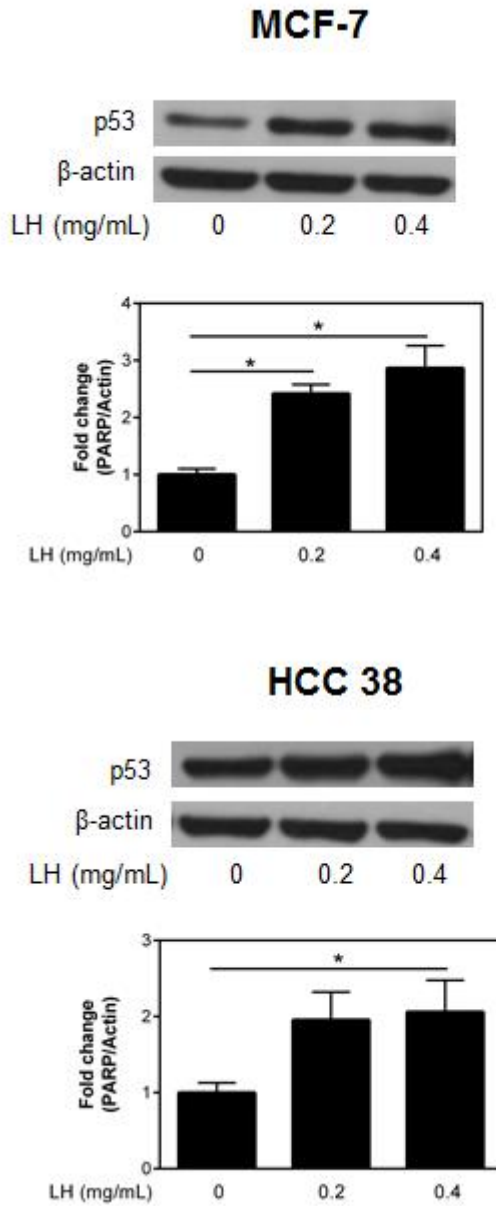


Fig. 7. The changes of P53 expressions in MCF-7 and HCC 38 cells

## 14. PI3K/Akt 경로의 발현에 미치는 금전초 추출물의 영향

본 연구에서는 금전초 추출물을 다양한 농도로 지방암세포에 처리했을 때 일어나는 apoptosis가 phosphatidylinositol 3 kinase(PI3K)/Akt의 작용에 의한 것인지 확인하고자 하였다. Akt는 serine/threonine을 인산화에 관여하며 PI3K에 의해 활성화되어 세포의 생존과 관련된 증식 및 분화, 세포 주기 진행에 관여하는 등 여러 생리활성을 조절한다(55). PI3K의 활성화는 Akt를 활성화 시켜서 pro-apoptotic 단백질 발현을 저해하여 apoptosis를 억제하는 것으로 알려져 있다(50). 실험 결과는 Fig. 8,9와 같으며, MCF-7과 HCC 38 지방암세포주에 금전초 추출물 0.2 mg/mL, 0.4 mg/mL 농도로 처리하였을 때, Akt는 단백질 변화가 관찰되지 않았으며, phospho Akt의 발현은 감소였다. 이에 금전초가 MCF-7과 HCC 38 지방암세포의 apoptosis와 연관된 PI3K/Akt 세포신호전달계에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

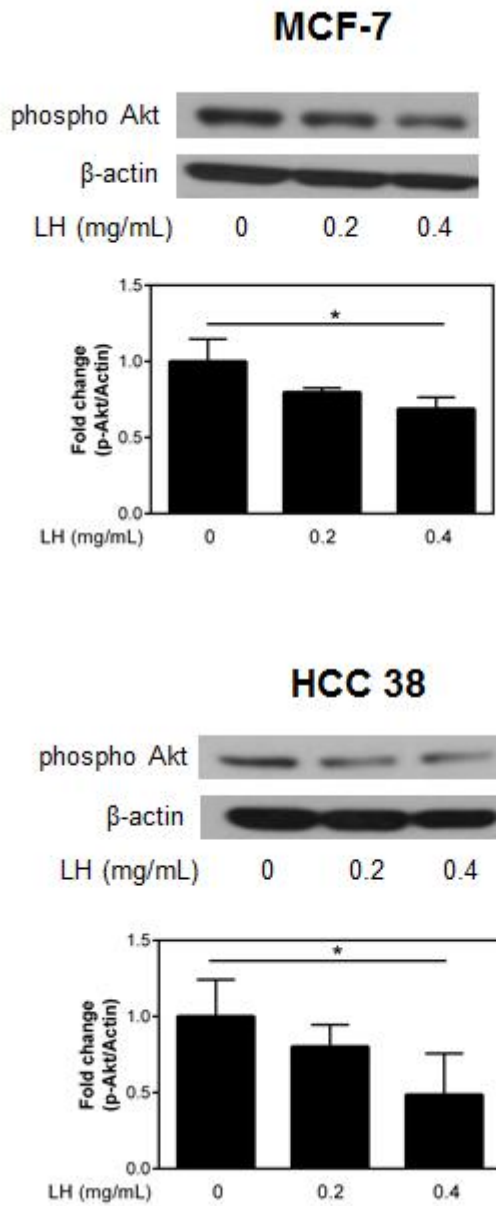


Fig. 8. The changes of phospho Akt expressions in MCF-7 and HCC 38 cells

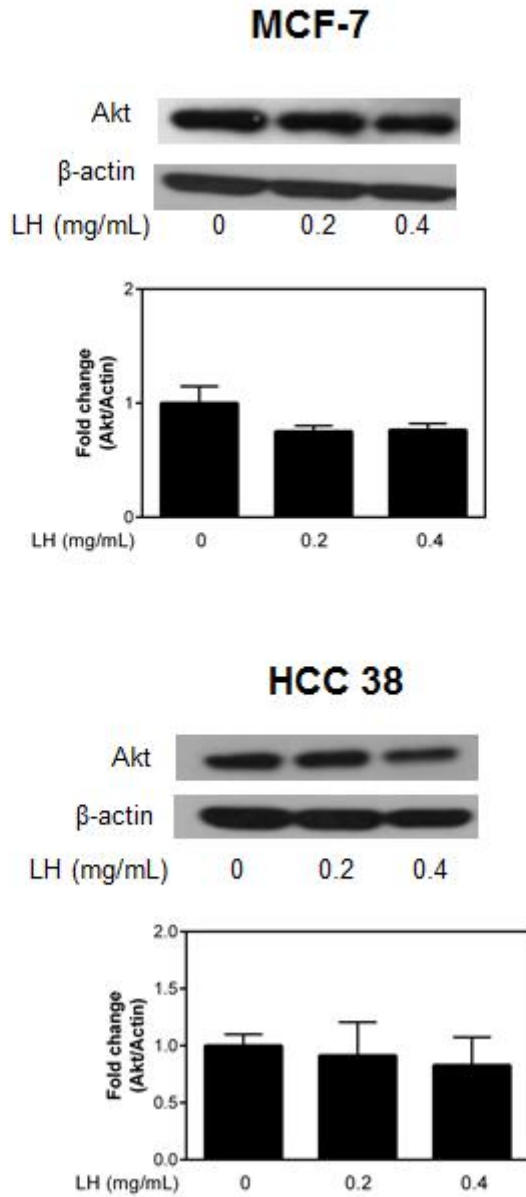


Fig. 9. The changes of Akt expressions in MCF-7 and HCC 38 cells

## 제4장 요약

본 연구는 금전초의 항산화효과, 항암효과를 확인하기 위해 일반성분 분석, 항산화 물질의 함량과 DPPH와 ABTS<sup>+</sup> assay를 이용한 소거능을 측정하였다. 항암효과의 확인은 금전초 추출물을 MCF-7과 HCC 38 인체유방암세포에 처리하여 apoptosis와 암세포 증식억제와 관련하여 연구하였다. 그 결과는 다음과 같으며 금전초가 영양 기능과 항산화 기능을 하는 식품으로 사용 가능하다는 것으로 사료된다. 또한 인체유방암세포에서 apoptosis 유발에 의한 항암효과를 지니는 것으로 분석되며, 향후 암 치료를 위한 근거로 사용될 것으로 기대된다.

### 1. 금전초의 이화학적 성분 분석 결과

일반성분은 수분 8.17%, 조회분 7.09%, 조지방 0.72%, 조단백질 5.83%, 및 탄수화물 78.19% 이었다. 금전초의 주요 지방산은 palmitic acid 이며, 유기산 함량은 2411.30 ppm 으로 malic acid 함량이 가장 높았다. 비타민은 비타민 C 함량이 가장 높았으며 비타민 A는 검출되지 않았다. 아미노산을 살펴보면 총 함량은 1,555.56 mg/100g 으로 leucine, Glutamic acid, Aspartic acid 등이 주요 구성 아미노산이며 전체 아미노산에 대한 필수아미노산의 비율은 43.28 %였다. 무기질 함량은 K> Ca> Na> Mg 순이었다.

### 2. 금전초 추출물의 항산화물질 함량 및 활성

금전초의 총 polyphenol 함량은 311.31 mg TAE/g, 총 flavonoid 함량은 184.68 mg RE/g 로 나타났다. DPPH radical 소거능의 IC<sub>50</sub>이 0.62 mg/mL, ABTS<sup>+</sup> radical 소거능의 IC<sub>50</sub> 이 0.15 mg/mL 로 나타났다.

### 3. 금전초 추출물의 인체유방암세포에 대한 apoptosis 유발과 관련한 항암효과

금전초 추출물(0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mg/mL)에 의해 MCF-7과 HCC 38 인체유방암세포의 증식이 억제되었으며 apoptosis에 의한 염색질 및 핵의 응축에 의한 분절인 apoptotic body가 형성됨이 관찰되었다. apoptosis 관련 단백질 발현은 western blotting을 통해 관찰하였으며, PARP의 단편화 현상이 나타났고 cleaved PARP, p53은 증가, Bcl-2는 감소, PI3K/Akt 경로의 발현은 억제되는 것이 관찰되었다.

## 참 고 문 헌

1. Hue GB. 1990. Pathology of obesity. *Kor J Nutr* 23: 333-336.
2. Pike J, Chandra RK 1995. Effect of vitamin trace element supplementation on immune indices in healthy elderly, *Int. J Vitam Nutr Res* 65(2): 117-121
1. Magnani L, Gaydou EM, Hubaud, JC. 2000. Spectrophotometric measurement of antioxidant properties of flavones and flavonols against superoxide anion. *Analytica Chimica Acta*. 411: 209-216.
3. Simic MG. 1988. Mechanisms of inhibition of free radical processes in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 202(2): 386-399.
4. Huang MT, Ho CT, Lee CY. 1992. Phenolic compounds in food. In *Phenolic compounds in food and their effects on health II*. Maple Press, New York, USA. 99: 2-7.
5. Jeong CH, Bae YI, Park SJ, Lee SK, Hur SJ. 2012. Antioxidant activities of aqueous extracts from three cultivars of guava leaf. *Food Sci Biotechnol*. 21(6): 1557-1563
6. Paik NS. 2014. Current status of breast cancer in Korea. *Ewha Med J* 37(2): 69-74.
7. National Cancer Information Center. 2015. Cancer fact and figures 2015 in the Republic of Korea. Available from <https://www.cancer.go.kr> [cited 2018 April 23].
8. Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. 2006. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol*. 24(14): 2137-2150.
9. Lee KW, Bode AM, Dong Z. 2011. Molecular targets of phytochemicals for cancer prevention. *Nat Rev Cancer* 11(3): 211-218.
10. Columbano A. 1995. Cell death: current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo. *J*

- Cell Biochem 58(2): 181-190.
11. Jin Z, El-Deiry WS. 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther.* 4(2): 139-163.
  12. Nicotera P, Leist M, Ferrando-May E. 1999. Apoptosis and necrosis: different execution of the same death. *Biochem Soc Symp* 66: 69-73.
  13. Lieberthal W, Koh JS, Levine JS. 1998. Necrosis and apoptosis in acute renal failure. *Semin Nephrol* 18(5): 505-518.
  14. Korsmeyer SJ. 1995. Regulators of cell death. *Trends Genet.* 11(3): 101-105.
  15. Evans VG. 1993. Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol* 17(5): 461-476.
  16. Huerta S, Goulet EJ, Livingston EH. 2006. Colon cancer and apoptosis. *Am J Surg.* 191(4): 517-526.
  17. Gao F, Zhao D, Deng J. 2013. New Flavonoids from *Lysimachia christinae* Hance, *Chim Acta*, 96(5): 985-989.
  18. Tian LJ, Yang NY, Chen WQ. 2008. Triterpene saponins from *Lysimachia christinae*. *J Asian Nat Prod Res.* 10(3-4): 291-269.
  19. Yasukawa K, Takido M. 1993. Flavonoid Glycosides from *Lysimachiae Herba* and *Lysimachia christinae* var. typical. *Planta Med.* 59(6): 578.
  20. Tian YQ, Ding P, Yan XH, Hu WJ. 2010. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. *Zhonqquo Zhong Yao ZaZhi.* 33(3): 339-341.
  21. Deng J, Ren M, Dai X, Qu D, Yang M, Zhang T, Jiang B. 2015. *Lysimachia christinae* Hance regresses preestablished cholesterol gallstone in mice. *J. Ethnopharmacol.* 166: 102-108.
  22. J. W. Choi, J. C. Park, C. K. Lee. 1997. Biological activities of *Lysimachiae Herba* II-analgesic and antiinflammatory effects of ethyl acetate fraction and a phenyl propanoid component. *Nat Prod Sci.* 3(2): 135-140.
  23. Gan RY, Kuang L, XZu XR, Zhang Y, Xia EQ, Song FL, Li HB. 2010. Screening of natural antioxidants from traditional Chinese medicinal plants associated with treatment of rheumatic disease. *Molecules.* 15(9): 5988-5997.
  24. Tian LJ, Yang NY, Chen WQ. 2008. Triterpene saponins from *Lysimachia christinae*, *J Asian Nat Prod Res.* 10(3-4): 291-296.
  25. Ozben T. 2007. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *J*

- Pharm Sci 96(9): 2181-2196.
26. AOAC. 2005. Official methods of analysis. 18th ed. Association of official analytical chemists, Washington, DC, USA.
  27. Wungaarden DV. 1967. Modified rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. Anal Chem 39(7): 848-849.
  28. Korea Food and Drug Association. 2005. Food standards codex. Korean foods Industry Association. Seoul, Korea. 367-368, 383-385.
  29. Folin O, Denis W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. J Biol Chem 12(2): 239-249.
  30. Chae SK, Kang GS, Ma SJ, Bang KW, Oh MW, Oh SH. 2002. Standard good analysis. 381-382.
  31. Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature. 181: 1199-1200.
  32. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med 26(9-10): 1231-1237.
  33. Kim YK, Son HK, Lee JJ. 2017. Nutritional Components and Antioxidant Activities of Various *Stachys Sieboldii* Miq Parts. Korean J Community Living Sci. 28(2): 203-215.
  34. Choi KS, Lee HY. 1999. Characteristics of Useful Components in the Leaves of Baechohyang(*Agastache rugosa*, O. Kuntze). J Korea Soc Food Sci Nutr. 28(2): 326-332.
  35. Jung JS, Kim YJ, Choi BR, GO GB, Son BG, Gang SW, Moon SM. 2014. Antioxidant and Physicochemical Changes in *Salvia plebeia* R. Br. after Hot-air Drying and Blanching. J Korean Soc Food Food Sci Nutr. 43(6): 893-900.
  36. Bieri JG. 1990. Vitamin E, Present knowledge in Nutrition, Sixth Edition. Internatonal life science institute, Nutrition Foundation, Washington D.C..
  37. Kim AR, Lee JJ, Jung HO, Lee MY. 2010. Physicochemical Composition and Antioxidative Effects of Yacon. J Life Sci. 20(1): 40-48.
  38. Choi YW, Lee YG. 2004. Comparative Studies on the Amino Acids and



- Flavor Compounds Among Some Varieties of Perilla Leaves Cultivated in Miryang Area. *J Life Sci.* 14(6): 93-937.
39. Bae YK, Cho MS. 2008. Analysis of hair tissue mineral contents according to body mass index. *Korean J Food Nutr* 21(2): 256-262.
  40. Suter PM. 1998. Potassium and hypertension. *Nutr Rev* 56(5): 151-153.
  41. Lee SJ, Shin SR, Yoon KY. 2013. Physicochemical Characteristics of Black Doragi (*Platycodon grandiflorum*). *Korean J Food Sci Technol.* 45(4): 422-427.
  42. Ames BN, Saul RL. 1987. Oxidative DNA damage, cancer and aging. *Ann Inter Med* 107: 536-539.
  43. Lee JH, Lee SR. 1994. Some physiological activity of phenolic substances in plant foods. *Korean J Food Sci Technol* 26(3): 310-316.
  44. Joo SY. 2013. Antioxidant Activities of Medicinal Plant Extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42(4): 512-519.
  45. Yoon S, Kwak HK, Kim YK, Kim HK, Park MS, Yeum KJ, Oh HS, Lee MJ, Lee JH, Ji GE. 2006. Functional foods. Life Science Publishing Co., Seoul, Korea. 222-231.
  46. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20(7): 933-956.
  47. Wursch P. 1979. Influence of tannin-rich Carob pod fiber on the cholesterol metabolism in the rat. *J Nutr* 109: 685.
  48. Jeong SI, Kim HS, Jeon IH, Kang HJ, Mok JY, Cheon CJ, Yu HH, Jang SI. 2014. Antioxidant and Antiinflammatory Effects of Ethanol Extracts from *Perilla frutescens*. *Korean J Food Sci Technol* 46(1): 87-93.
  49. Hwang WD, Im YG, Son BY, Park C, Park DI, Choi YH. 2013. Induction of Apoptosis by Ethanol Extract of *Scutellaria baicalensis* in Renal Cell Carcinoma Caki-1 Cells. *J Life Sci* 23(4): 518-528.
  50. Kim HA, Lee JM. 2016. Effect of Antioxidant Activities and Apoptosis Induction of *Salvia plebeia* R. BR. in Human Breast Cancer MCF-7 Cells. *Korean J community Living Sci.* 29(2): 197-205.

51. Shi L, Nishioka WK, Th'ng J, Bradbury EM, Litchfield DW, Greenberg AH. 1994. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. *Science*. 263(5150): 1143-1145.
52. Vidya Priyadarsini R, Senthil Murugan R, Maitreyi S, Ramalingam K, Karunagaran D, Nagini S. 2010. The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NFkappaB inhibition. *Eur J Pharmacol* 649(1 - 3): 84-91.
53. Wen, X., Lin, Z. Q., Liu, B., Wei, Y. Q. 2012. Caspase-mediated programmed cell death pathways as potential therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 45: 217-224.
54. Osaki M, Oshimura M, Ito H. 2004. PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* 9(6): 667-676.