



Original research article

다래 화분 추출물의 LNCaP 전립선 암세포 증식 억제 효과

이혜진[§], 김세건[§], 한상미, 김효영, 김선미, 김성국, 최홍민, 문효정, 이영신, 유 식, 우순옥*

농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부

Inhibitory Effect of the Darae Pollen (*Actinidia arguta*) Extract on the Growth of LNCaP Human Prostate Cancer Cell Line

Hye-Jin Lee[§], Se-Gun Kim[§], Sang-Mi Han, Hyo-Young Kim, Seonmi Kim, Sung-Kuk Kim, Hong-Min Choi, Hyo-Jung Moon, Young-Sin Lee, Sik Ryu and Soon-Ok Woo*

Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju 55365, Republic of Korea

Abstract

Bee pollen is collected in the form of dumplings by gathering nectar and enzymes on their hind legs when bees collect nectar from flowers. Recently, nutrients in bee pollen have been reported that the nutrients are effective for various diseases such as prostate enlargement and cancer. In this study, the anti-prostate cancer effect was investigated by selecting pollen from the most research reports, darae pollen (*Actinidia arguta*). In order to confirm the purity of the pollen, it was observed using a microscope and a scanning electron microscope (SEM), and the identification of the pollen was confirmed the darae pollen (*Actinidia arguta* 85%, *Amorpha* spp. 14%) through genetic analysis. Except for Bax among the apoptosis related proteins increased in the expression level of the pollen extract. AIF was also increased, which seems to have led to the initiation of apoptosis due to the release of AIF in the mitochondria into the cytosol. Akt, a protein involved in promoting cell division, decreased and the amount of BCL-2 protein also decreased according to pollen extract concentration. In conclusion, it was confirmed that the apoptosis related protein increased and the cell division promoting protein decreased, according to this result, the darae pollen extract was effective against prostatic hyperplasia or prostate cancer.

Keywords

Darae pollen, LNCaP human prostate cancer cell line, Apoptosis

서 론

화분(Pollen)은 꽃가루라고 하며, 일벌들이 꽃의 화분을 수집하여 꿀벌의 분비물과 화밀로 경단의 형태로 뭉쳐진 화분을 벌화분(Bee pollen)이라 한다(Lee and Ahn, 2019). 화분은 꿀벌의 성충과 유충의 단백질원이며, 로열젤리의 원료이다. 또한 벌화분은 단백질, 지방, 비타민, 미네랄이 풍부한 식품으로 알려져 있으며 100 g당 270 kcal 열량을 내며 생리활성성분 등 다양한 영양분을 함유하고 있

다(Khalifa *et al.*, 2021). 화분은 밀원의 종류의 따라 구성 성분의 차이가 있으며 다래 화분의 경우 수분 4.3%, 회분 2.3%, 조단백질 35.8%, 조지방 8.7%, 조섬유 0.8%, 탄수화물 48.1%로 구성되어 있다(Hong *et al.*, 2013). 특히, 화분은 무기질 및 플라보노이드, 페놀산 등 페놀성 유기 화합물 등이 풍부한 영양성분이 함유된 천연 건강식품으로 이용되어 왔다. 또한 화분은 영양학적 이용 가치가 매우 높은 건강식품으로 소화계, 노화, 항산화 등 다양한 질환에 효과가 있다는 연구가 활발히 진행되고 있으며 그 우수성

이 보고되고 있다(Algethami *et al.*, 2022).

화분의 영양성분은 다양한 천연 생리활성물질로의 고 부가가치가 높아 항산화 효능 평가(Kim *et al.*, 2005), 항 혈전 활성(Pyo *et al.*, 2020b), 항균 및 항당뇨 활성(Pyo *et al.*, 2020a) 등 많은 약리 효과를 지니고 있다. 최근에는 전립선 비대증 및 전립선염 치료 효과(Shim, 2007)와 테스토스테론 유도 양성 전립선 비대증 관련 효능 연구(Bak *et al.*, 2018) 등 전립선 질환 관련하여 연구가 활발히 진행되고 있지만, 현재 급격히 증가하고 있는 남성 고형암인 전립선암에 대한 화분의 효과는 민간에서 알려진 바에 비하여 보고된 연구는 미흡한 실정이다. 전립선암은 남성에서 두 번째로 발생하는 흔한 암이며, 전 세계적으로 다섯 번째 주요 사망 원인으로 매년 급증하고 있다. 전립선암의 발병률과 사망률은 진단 당시 평균 연령이 66세인 연령 증가와 관련이 있으며 전립선암은 초기 단계에서 무증상일 수 있으며, 가장 빈번한 호소는 배뇨 곤란, 배뇨 빈도 증가, 야간뇨 등 전립선 비대증에서 흔하게 발생할 수 있는 모든 증상이다(Rawla, 2019). 일반적으로 암 치료를 위해 사용하고 있는 방법으로는 호르몬 치료와 방사선 치료 등 국소 치료법이 널리 사용되고 있으며 항암제의 경우, 치료 효과는 있으나 정상 세포에도 영향을 끼쳐 구토, 탈모, 면역력 저하 등 심각한 부작용을 동반하여 암 치료 시 많은 문제점을 야기시키고 있다(Hong *et al.*, 2016). 전립선암 발병률이 급증하는 추세에 따라 치료 효과와 부작용을 최소화한 항암 연구가 점차 요구되고 있으며 항암과 면역조절 효능이 뛰어난 천연물에 대한 관심도가 증대되고 있다. 이에 따라 화분과 전립선 질환과 관련하여 연구가 진행되고 있지만(Wu and Lou, 2007; Touhetti *et al.*, 2020), 항암과 관련된 연구는 미미한 수준이다.

본 연구에서는 다래 화분이 전립선암에 미치는 영향을 조사하고자 추출물 형태로 제조하여 인간의 전립선에서 유래한 LNCaP 세포주에 적용하여 암세포주에 대한 세포 독성 평가를 확인하고 항암에 대한 단백질 발현 변화를 통해 그 기전을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

오프라인 시장에서 유통되고 있는 2021년에 생산된 다

래 화분을 구매한 다음 밝고 진한 노란색의 색상을 나타내는 화분을 분류하여 -20°C 에서 냉동 보관하면서 분석에 이용하였다. 모든 시약은 Sigma Co. (St. Louis, MO, USA)에서 시약급 이상의 제품을 구매하여 분석에 사용하였다.

2. 분석 시료 추출

화분 추출물은 시료 3g에 대해 70% 에탄올 10배를 가한 후 sonicator (Branson 8510, Emerson Electric Co., Ltd., USA)를 이용하여 1시간 동안 추출하여 여과지(filter paper No. 2, Whatman, UK)로 여과하는 과정을 3회 반복하였다. 추출물은 감압 농축기(eyela Rotary evaporator N-1200, Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan)를 이용하여 conical tube에 농축하여 분석 시료로 본 실험에 사용하였다.

3. 화분의 형태 관찰 및 유전자 분석

화분의 외관은 현미경(evos XL Core microscope, Thermo Fisher Scientific, MA, USA, $\times 200$)으로 확인하였으며, 화분의 형태는 주사전자현미경(emission-scanning electron microscope, SEM, S-2460N, Hitachi, Japan)으로 관찰하였다. 유전자 분석은 Amplicon read를 이용한 metagenome 분석은 Qiime (release 2022.08)으로 분석하였다.

4. LNCaP 전립선 암세포주 배양

본 연구에 사용된 전립선암 LNCaP 세포주는 한국세포주은행에서 보관 중인 세포를 분양받아 계대 배양하여 사용하였다. LNCaP 세포는 Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640; Gibco, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS; GenDEPOT, Korea)과 100 unit/ml의 penicillin-streptomycin 항생제 용액(Gibco, USA)을 첨가하여 사용하였으며, 37°C , 5% CO_2 조건에서 배양하였다.

5. LNCaP 암세포주에 대한 다래 화분의 독성 평가

LNCaP 세포에 대한 독성을 평가하기 위해 각 시약을 농도별로 세포에 처리한 후 EZ-Cytox 평가법을 실시하였다(Park *et al.*, 2008). 세포를 96-well plate에 2×10^4 cells/well이 되도록 분주한 뒤, 24시간 동안 배양시켰다. 배양된 세포에 다래 화분을 농도 의존적으로 처리하였다(100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$). 이때, 대조구로서 아무것도

처리하지 않은 세포와 추출물의 용매에 대한 대조구로서 DMSO가 포함된 배지를 처리한 세포를 설정하였다. 배지의 1/10 부피로 시약을 처리한 후 2시간 동안 배양기에서 반응시켰고, 분광광도계를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 나타내었다. 정상 세포 독성 평가는 피부각질세포주(HaCaT)를 이용하여 상기와 동일한 방법으로 실험하여 세포 생존율을 나타내었다.

6. 세포 증식 및 사멸 관련 단백질 수준 측정

다래 화분 추출물에 의한 항암 기전을 확인하고자 Western blotting을 실시하였다(Kim *et al.*, 2019). 100 mm cell culture plate에 세포를 접종하고, 다래 화분 추출물을 100 µg/ml, 200 µg/ml, 500 µg/ml 농도로 처리하였다. 추출물을 처리한 세포를 24시간 후에 회수하고 원심분리하여 배양액을 제거한 세포만을 수거하였다. 수거한 세포를 1×phosphate buffered saline (PBS)로 3회 정도 세척한 후 lysis buffer를 첨가하여 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하고, 단백질이 용출된 상층액을 회수하여 분석에 이용하였다. 모든 시료의 단백질 양을 동일하게 실험에 적용하기 위해 bicinchronic acid (BCA, GenDEPOT) 단백질 정량법으로 농도를 측정한 후 정량된 단백질을 Western blotting에 사용하였다. 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 전개된 단백질을 PVDF membrane에 transter한 후, 세포 내의 단백질 변화를 확인하고자 1차 항체로는 AIF, Annexin V, Bak, Bax, Akt, Bcl-2, 그리고 PCNA를 각각 1 : 1,000의 희석 배율로 2% non-fat dry milk에 희석하여 overnight 반응시켰으며, GAPDH는 1 : 5,000으로 희석하여 동일하게 overnight 반응시켜 분석에 사용된 단백질이 모두 동일하게 사용되었음을 나타

내는 실험 대조구로 사용하였다. 1차 antibody 반응 후 각 antibody의 특이성에 맞춰 2차 antibody를 1시간 동안 반응시켰고, ECL pico detection system (GenDepot)으로 발색한 후 GelDoc으로 각 protein band 단백질 발현량을 분석하였다.

7. 통계처리

본 실험 결과는 평균±표준편차로 나타내었다. 통계 분석은 SPSS 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 분산 분석(ANOVA)을 실시하였으며, 시료 간의 유의성은 Duncan's multiple range test로 차이를 검정하였다 ($p < 0.05$).

결과 및 고찰

1. 화분 형태 특성

서양종 꿀벌이 수집한 다래 화분의 형태적 특성은 Fig. 1에서 나타내었다. 본 연구에서는 서양종 꿀벌이 다래 화분을 경단처럼 알갱이 형태로 뭉친 상태의 다래 화분을 수집하여 시료로 사용하였다(Fig. 1A). 화분은 크기, 모양, 발아구의 형태 등 식물의 형태에 따라 유연관계를 파악할 수 있으며, 다양한 정보를 보유하고 있어 식물 분류 연구에 있어 중요하다(Lee, 1984). 다래 화분을 광학현미경(Fig. 1B)과 주사전자현미경을 확인한 결과(Fig. 1C), 아장구형(subprolate) 모양과 단립 형태이며, 극면상이 원형을 띠고 있는 형상이다. 발아구는 3구형이며 표면에는 극히 미세한 돌기와 구멍이 존재한다고 보고한 선행 연구(Hong *et al.*, 2013)와 본 연구에 사용된 다래 화분과의 형태학적 일치함을 확인할 수 있었다. 또한 유전자 분석(metagenome)

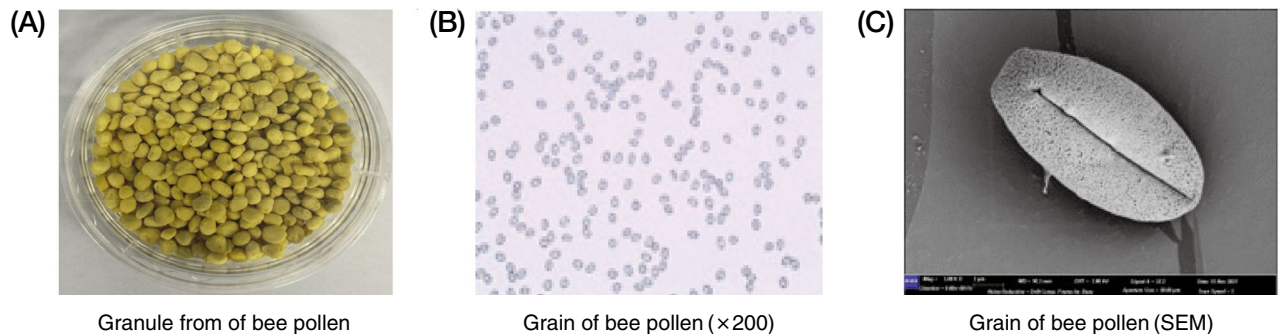


Fig. 1. Morphology of the darae pollen (*Actinidia arguta*).

결과를 통해 *Actinidia arguta* 85%, *Amorpha* spp. 14%로 다래 화분으로의 밀원 동정을 확인하였다.

2. LNCaP 세포주 이용 세포 독성 평가

다래 화분 추출물의 LNCaP 세포주 이용 세포 독성 평가는 MTT assay를 응용한 EZ-cytox detection system으로 확인하였다(Fig. 2). 세포를 96-well plate에 접종한 후 24시간 경과 후 다래 화분 추출물을 농도 의존적으로 처리하였다. 세포에 처리한 농도는 100, 200, 500 µg/ml로 처리하였으며 다래 화분 추출물 농도가 증가할수록 세포 증식이 감소하였다. 다래 화분 추출물의 가장 높은 처리 농도(500 µg/ml)에서 다래 화분 추출물에서 30% 이상의 세포 독성을

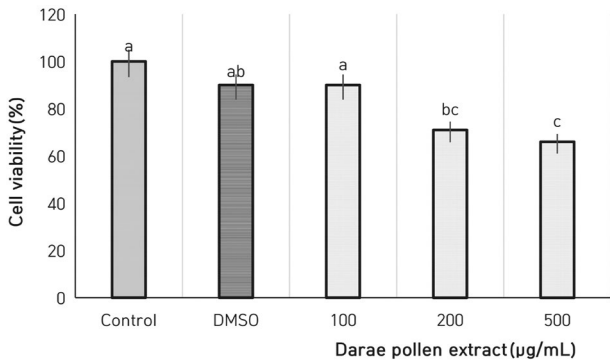


Fig. 2. LNCaP cell viability of the Darae pollen. Error bars represent the standard deviation of the mean and different letters indicate significant difference ($p < 0.05$). LNCaP cells were incubated with complete medium containing Darae pollen extracts. Darae pollen extracts were treated with dose-dependent (100, 200, 500 µg/ml) on LNCaP cells for 24 hr.

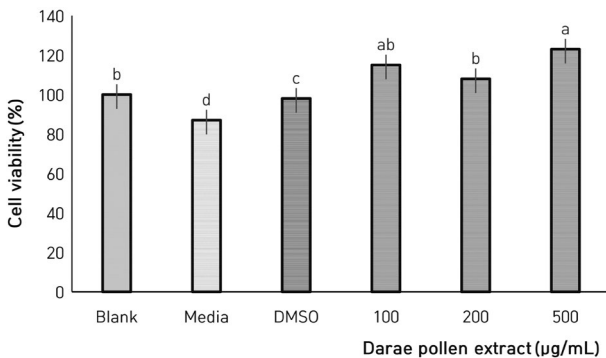


Fig. 3. HaCaT cell viability of the darae pollen. HaCaT cells were incubated with complete medium containing Darae pollen extracts. Darae pollen extracts were treated with dose-dependent (100, 200, 500 µg/ml) on HaCaT cells for 24 hr.

을 관찰하며 세포 증식 억제 효과를 나타내었다. 또한 다래 화분 추출물의 정상 세포 독성 평가를 확인하고자 피부 각질 세포주(HaCaT)를 이용한 세포 독성 평가한 결과(Fig. 3)에 따르면 다래 화분 추출물의 모든 농도를 정상 세포에 처리할 때 세포 독성이 관찰되지 않았으며, 이는 다래 화분 추출물이 정상 세포는 죽이지 않고 암세포에서만 선택적 항암 활성 효과가 있음을 확인하였다.

3. 다래 화분 추출물 처리에 따른 단백질 발현 변화 확인

다래 화분 추출물이 전립선 암세포 내의 단백질 분자 발현에 끼치는 영향을 확인하고자 Western blotting을 통해 확인하였다(Fig. 4). 단백질 발현을 확인한 단백질은 두 가지의 group으로 나누었는데, 한 group은 세포 사멸에 직접적으로 영향을 끼치는 단백질이고, 다른 group은 세포 분열을 촉진시키는 단백질로 구성하였다. 세포 사멸 촉진에 관련된 단백질은 AIF, Annexin V, Bak와 Bax이며 세포 분열 촉진에 관련된 단백질은 Akt, Bcl-2와 PCNA이다(Yun *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008). 본 연구 결과, 세포 사멸 관련 단백질 중 Bak를 제외하고 단백질 발현량은 화분 추출물의 농도 의존적으로 증가하는 양상을 보였다. 세포 사멸과 관련된 단백질 중 AIF의 증가가 나타났으며, 이는 미토콘드리아 내의 AIF가 세포질로 방출되어 양이 늘어나 이로 인해 세포 사멸 개시로 이어진 것으로 보인다(Debatin, 2004). Annexin V도 마찬가지로 세포 사멸이 시작되면서 세포에 결합된 양이 늘어난 양상을 보였다. 다만, Bak의 경우는 변화가 없으나 Bax의 양이 늘어난 것으로 확인되었다. 이는 다래 화분 추출물이 Bax를 활성화하는 것으로 보인다. 세포 분열 단백질 발현 결과를 보았을 때, 세포 분열에 직접적으로 관여하는 Akt의 양이 줄어든 양상을 보였으며 Bcl-2 단백질 역시 화분 추출물의 농도 의존적으로 단백질 발현량이 줄어든 것을 확인하였다. 대표적인 세포 분열 촉진 단백질인 PCNA도 마찬가지로 줄어든 양상을 보였다. 결과적으로 세포 사멸 단백질 발현량은 증가하고 세포 분열 촉진 단백질 발현량은 줄어드는 양상을 확인하였다. 이를 통해 다래 화분 추출물이 전립선 비대증 또는 전립선암에 대해 효과가 있음을 확인하였고, 특히 이 과정은 세포 내의 AIF 사멸 경로로 이어지게 됨을 알 수 있었다. GAPDH는 본 연구의 Western blotting 실험에 있어 단백질 발현량이 동일한 양으로 분석되었다는 loading control 역할로 사용하였다.

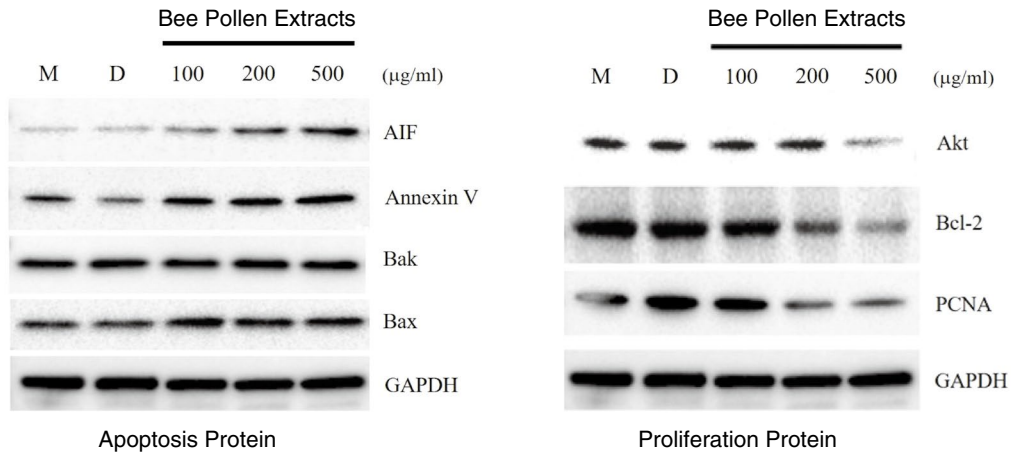


Fig. 4. Cell proliferation and apoptosis related protein expression effect of darae pollen extracts (100, 200, 500 µg/ml). All of antibodies were diluted in 2% skim milk at 1 : 1,000 except GAPDH (1 : 5,000). GAPDH was housekeeping control for western blotting.

적 요

벌화분(Bee pollen)은 꿀벌이 꽃에서 꿀을 채집할 때 뒷다리로 꿀과 효소를 모아 경단의 형태로 응집한 꽃가루를 말하며, 다양한 생리활성물질이 함유되어 각종 질환에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 벌화분 중 가장 많은 연구 보고가 된 다래 화분(*Actinidia arguta*)을 선정하여 형태학적 특성과 유전자 분석을 통해 순도와 에탄올 추출물 형태로 제조하여 항전립선암 효과를 확인하고자 하였다. 다래 화분의 형태학적 특성을 확인하고자 현미경과 주사전자현미경 (SEM)을 이용하여 관찰하였으며, 다래 화분의 동정은 유전학적 방법을 통해 다래 화분(*Actinidia arguta* 85%, *Amorpha* spp. 14%)임을 확인하였다. 세포 사멸 관련 단백질 중 Bak를 제외하고 단백질 발현량이 증가하는 양상을 나타내었다. AIF도 증가하였는데, 이는 미토콘드리아에 있는 AIF가 세포질로 방출되어 세포 사멸이 시작된 것으로 보인다. 다래 화분 추출물 농도에 따라 세포 분열 촉진에 관여하는 단백질인 Akt가 감소하였고, Bcl-2 단백질의 양도 감소하였다. 본 연구 결과를 통해 세포 사멸 관련 단백질은 증가하고 세포 분열 촉진 단백질은 감소함을 확인하였으며, 결과적으로 다래 화분 추출물은 전립선 비대증이나 전립선암에 효과가 있는 것으로 판단되며 추후 항암 효과를 나타내는 특정 성분 동정과 동물실험을 통하여 연구가 수행된다면 다래 화분 추출물을 이용한 효과적인 항암제 개발이 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원의 농업기초기반 연구(과제번호: PJ01512903)에 의하여 수행되었으므로 감사드립니다.

인용 문헌

- Algethami, J. S., A. A. A. El-Wahed, M. H. Elashal, H. R. Ahmed, E. H. Elshafiey, E. M. Omar, Y. A. Naggar, A. F. Algethami, Q. Shou, S. M. Alsharif, B. Xu, A. A. Shehata, Z. Guo, S. A. M. Khalifa, K. Wang and H. R. El-Seedi. 2022. Bee pollen: Clinical trials and patent applications. *Nutrients* 14: 2858.
- Bak, J., H. I. Pyeon, S. J. So, S. H. Lee, S. M. Lee, H. J. Suh, J. S. Kang, Y. S. Choi and I. K. Chung. 2018. Beneficial effects of nano-sized bee pollen on testosterone-induced benign prostatic hyperplasia in rodents. *J. Life Sci.* 28: 465-471.
- Debatin, K. M. 2004. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 53: 153-159.
- Hong, I. P., M. Y. Lee, S. O. Woo, H. S. Sim, Y. S. Choi, S. M. Han, H. K. Kim, K. H. Byeon, M. L. Lee and J. B. Kim. 2013. The morphological characteristics and fatty acids composition of pollens in acorn and darae (*Actinidia arguta*). *J. Seric. Entomol. Sci.* 51: 119-122.
- Hong, S. M., H. D. Cho, J. H. Kim, J. H. Lee, W. S. Song, S. T. Lee, M. K. Lee and K. I. Seo. 2016. Anti-proliferative effects of acid extract of *Gracilaria verrucosa* on primary human prostate cancer cells. *J. Life Sci.* 26: 1130-1136.
- Khalifa, S. A., M. H. Elashal, N. Yosri, M. Du, S. G. Musharraf, L. Nahar, S. D. Sarker, Z. Guo, W. Cao, X. Zou, A. A. A.

- El-Wahed, J. Xiao, H. A. Omar, M. F. Hegazy and H. R. El-Seedi. 2021. Bee pollen: Current status and therapeutic potential. *Nutrients* 13: 1876.
- Kim, K. N., S. B. Kim, W. J. Yoon, K. S. Yang and S. Y. Park. 2008. Induction of apoptosis by *Scolopendra subspinipes mutilans* in human leukemia HL-60 cells through Bcl-xL regulation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 37: 1408-1414.
- Kim, S. J., K. S. Youn and H. S. Park. 2005. Antioxidative effect of pine, oak, and lily pollen extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37: 833-837.
- Kim, S. K., S. O. Woo, S. M. Han, K. W. Bang, S. G. Kim, H. M. Choi and H. J. Moon. 2019. Cytotoxic effect and protein expression by Korean regional propolis on HeLa ovarian cancer cell line. *J. Apic.* 34: 245-254.
- Lee, G. L. and M. R. Ann. 2019. The characteristics and analysis of nutritional compositions of bee pollen from Korea. *J. Apic.* 34: 73-86.
- Lee, S. 1984. Contributions of palynological characteristers to plant systematics. *Korean J. Pl. Taxon.* 14: 13-20.
- Park, S. Y., E. J. Kim, D. Y. Lim, J. S. Kim, S. S. Lim, H. K. Shin and J. H. Yoon. 2008. Inhibitory effect of the hexane extract of *Saussurea lappa* on the growth of LNCaP human prostate cancer cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 37: 8-15.
- Pyo, S. J., J. S. Jang and H. Y. Sohn. 2020a. Evaluation of Anti-oxidant, Anti-microbial and Anti-diabetic Activities of Five Different Pollen. *J. Apic.* 35: 65-73.
- Pyo, S. J., Y. J. Lee and H. Y. Sohn. 2020b. Anti-thrombotic activities of different pollen from acorn, darea, multi-floral, pine tree and cattail. *J. Apic.* 35: 55-63.
- Rawla, P. 2019. Epidemiology of prostate cancer. *World J. Oncol.* 10: 63-89.
- Shim, B. S. 2007. Complementary and alternative therapy for chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Korean J. Urogenit. Tract Infect. Inflamm.* 2: 143-150.
- Tuoheti, T., H. A. Rasheed, L. Meng and M. Sheng Dong. 2020. High hydrostatic pressure enhances the anti-proliferative properties of lotus bee pollen on the human prostate cancer PC-3 cells via increased metabolites. *J. Ethnopharmacol.* 261: 113057.
- Wu, Y. D. and Y. J. Lou. 2007. A steroid fraction of chloroform extract from bee pollen of *Brassica campestris* induces apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells. *Phytother. Res.* 21: 1087-1091.
- Yun, K. S., Y. C. Kim, J. H. Lee and H. J. Woo. 2006. Effect of *Orostschys japonicus* A. Berger on apoptosis in K562 cell lines. *Korean J. Intern. Med.* 27: 166-177.