pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 34, No. 2, pp. 183~190 (2019)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2019.34.2.183

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

Ursolic acid의 악성 흑색종 세포주 A375SM과 A375P에서의 항암효능

우중석 · 김나원 · 이진규 · 김재혁 · 임다영 · 강신우 · 김성현 · 유은선 · 이재한 · 한소희 · 박영석 김병수 · 김상기 · 박병권 · 정지윤*
공주대학교 특수동물학과

Anti-Cancer Effect of Ursolic Acid in Melanoma Cell A375SM and A375P

Joong-Seok Woo, Na-Won Kim, Jin-Gyu Lee, Jae-Hyuk Kim, Da-Young Lim, Shin-Woo Kang, Sung-Hyun Kim, Eun-Seon Yoo, Jae-Han Lee, So-Hee Han, Young-Seok Park, Byeong-Soo Kim, Sang-Ki Kim, Byung-Kwon Park, and Ji-Youn Jung*
Department of Companion and Laboratory Animal Science, Kongju National University, Yesan, Korea
(Received December 21, 2018/Revised January 16, 2019/Accepted February 16, 2019)

ABSTRACT - Ursolic acid is recognized for various effects such as anti-cancer, antioxidant, and anti-inflammatory activity. In this study, we confirmed the anti-cancer effect of ursolic acid on human melanoma cancer cells, A375SM and A375P. Survival rate of the melanoma cells was confirmed by MTT assay and the proliferation rate was confirmed by wound healing assay. The rate of apoptotic bodies was confirmed by DAPI staining, and apoptosis rate was confirmed by flow cytometry. The induction of apoptosis protein was examined by western blotting according to the concentration of ursolic acid in melanoma cells. The survival and proliferation rates of melanoma cells were decreased according to the treatment concentrations of ursolic acid. DAPI staining showed that chromosomal condensation of melanoma cells was increased with increasing concentrations of ursolic acid, and increased apoptosis rate of melanoma cells by ursolic acid was confirmed by flow cytometry. We also confirmed by western blotting that cleaved-PARP and Bax were increased and Bcl-2 was decreased at 12 μM concentration of uricolic acid in melanoma cells. This study was carried out at low concentrations of ursolic acid, 0 to 20 μM, and analyzed 24 h after treatment. As a result of this study, it is thought that ursolic acid has the anti-cancer effect through the regulation of apoptosis-related proteins in melanoma cells A375SM and A375P.

Key words : Ursolic acid, Anticancer, A375SM cell, A375P cell, Apoptosis

사람의 피부는 자외선에 의한 손상과 자유라디칼 등 내부 혹은 외부의 요인으로부터 발생하는 다양한 자극으로 인한 지속적인 손상을 받게 된다[1]. 특히 이러한 자외선에 노출되거나 산화 스트레스(oxidative stress)로 인한 손상은 노화의 진행과 종양 발생의 원인이 되는 것으로 알려져 있다[2,3].

한편 인간의 기대수명이 꾸준히 증가하면서 피부 손상이 축적된 고령의 인구가 증가하고, 이와 더불어 악성흑색종(malignant melanoma)의 발병률 및 사망률 또한 꾸준히 증가하고 있다[4,5]. 건강보험심사평가원 2017년 연령별 진료 인원 통계자료에 의하면 60대가 37%(980명)로 가장 많았으며 70대가 25%(919명) 50대가 22%(806명) 순으로 흑색종은 대부분 노령인구에서 주로 발병하고 있다. 또한 악성흑색종으로 판정을 받은 인원은 2014년 3,267명에서 2015년 3,258명으로 소폭 감소했으나, 2016년 3,484명 2017년 3,662명으로 꾸준히 증가하는 추세이다[6]. 사람의 피부에 존재하는 멜라닌 세포의 악성화로 인해 발생하는 피부암인 악성흑색종은 모든 피부암의 4% 정도이지만 사람의 피부암으로 인한 사망원인의 80% 이상을 차지한다. 또한 흑색종이 전이된 경우 10년 후 생존율은 10% 미만으로 나타난다[7,8]. 이러한 악성흑색종은 수술이나 항암요법 등의 치료가 쉽지 않고, 계속되는 의학의 발달에도 약물저항성과 높은 독성으로 치료가 어렵다. 때문에 오랜 시간 동안 많은 연구자들은 자연에서부터 새로운 천연 항암물질을 발견하기 위해 연구하고 있다[9-11].

자연적으로 발생하는 식이 및 비식이 식물의 화학 물질은 다양한 암 예방과 치료에 엄청난 잠재력을 가지고 있

*Correspondence to: Ji-Youn Jung, Department of Companion and Laboratory Animal Science, Kongju National University, Yesan-eupYesan-gun Chungcheongnam-do, 32439, Korea
Tel: 82-41-330-1526, Fax: 82-41-330-1529
E-mail: wangza@konghu.ac.kr

다. 인도와 중국에서 전통적으로 의약 목적으로 사용되는 식물의 화학 물질 중 가장 큰 그룹인 terpenoid는 다양한 약리 효과를 가지고 있다. 이는 특히 식물에서 발생하는 2차 대사산물 중 대부분의 유기체로 알려져 있다[12,13]. 그 중 하나인 우르솔릭산(ursolic acid)은 로즈마리(*rosemarinus officinalis*), 비파나무(*eriobotrya japonica*), 히더(*calluna vulgaris*), 바질(*ocimum sanctum*) 등의 약재 식물들의 잎과 꽃, 그리고 열매 등으로부터 분리되는 pentacyclic triterpenoid로서 항염증 및 항암 작용에 탁월한 효과가 있는 것으로 보고되었다[14]. 우르솔릭산은 종양세포에 대해서 세포자멸사(apoptosis) 유도, 항전이(anti-metasis), 항혈관신생(anti-angiogenesis) 등의 항암기능을 가지고 있는 것으로 밝혀져 있다[15,16]. 또한 우르솔릭산은 그의 이성질체인 oleanolic acid와 함께 많은 야채, 허브 및 여러 가지 식물에서 발견되는 pentacyclic triterpenoid계 사포닌의 일종으로 항염효과, 항암효과 및 항균 특성이 있고 특히, 피부에 있어서 노화 방지 및 주름 개선 효과 등이 알려져 있어 일부 외용제 및 복용제 그리고 화장품 등에 사용되어 왔으며[17,18], 기존 연구에서는 우르솔릭산을 활용하여 대장암[19], 방광암, 췌장암[20], 전립선암[21], 간암, 위암[22] 등을 억제하는 효능이 밝혀져 있다. 따라서 본 연구에서는 기존 연구에서는 연구된 바 없는 인간 유래 흑색종 세포 중 전이성이 높은 A375SM 세포와 전이성이 낮은 A375P 세포에서도 우르솔릭산이 세포자멸사를 유도하는지 알아보고자 하였다.

Materials and Methods

세포 및 실험재료

흑색종 세포(A375SM, A375P human melanoma cells)는 한국 세포주 은행(KCLS, Korean cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 구입하였다. DMEM, FBS (fetal bovine serum)은 Welgene (Gyeongsan, Korea)에서 구입하였다. penicillin-streptomycin, trypsin-EDTA은 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. Ursolic acid (Fig. 1)와 본 실험에서 사용한 일반적인 시약은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Ursolic acid는 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 희석하여 사용하였다. FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit는 BD Pharmingen (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. Anti-rabbit IgG와 anti-Bax, anti-β-actin, anti-PARP은 Cell signaling Technology (Cell signaling Technology, Danvers, MA, USA)에서 구입하였으며 anti-Bcl-2는 Novus Biologicals (St. Colorado, Littleton, USA)에서 구입하였다.

세포배양

A375SM과 A375P는 5% FBS, 1% streptomycin-penicillin을 첨가한 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO_2가 유지되는 incubator에 배양하였다. 플라스크에 세포가 80~90% 정도 되었을 때 PBS를 사용하여 세포를 세척 후 trypsin-EDTA를 처리하여 계대하였다. 배지는 2~3 일마다 교환해 주었다.

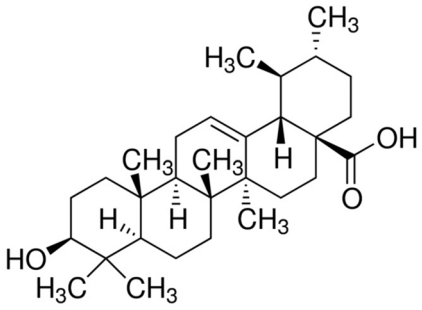

Fig. 1. Chemical structure of Ursolic acid.

세포 생존율 측정

세포 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay를 통하여 측정하였다. A375SM과 A375P를 96-well plate의 각 well에 2×10^4 cell/mL씩 분주하여 DMEM 배지에서 24 시간 동안 37°C, 5% CO_2가 유지되는 incubator에 배양하였다. 그 후 ursolic acid를 0, 4, 8, 12, 16, 20 μM로 처리하여 24 시간 동안 incubator에 배양하였다. 24 시간 후 PBS에 1 mg/mL로 녹인 MTT solution(thiazolyl blue tetrazolium bromide)을 각 well에 40 μL씩 처리하여 1 시간 30 분 동안 incubator에 배양하였다. 그 후 각 well에 DMSO를 100 μL씩 처리하여 formazan을 완전히 용해하였다. 이후 흡광도는 ELISA-reader (Bio-Rad Labora-tories Inc., Hercules, CA, USA)에서 595 nm로 측정하였다.

세포 증식률 측정

A375SM과 A375P를 60 dish에 2×10^5 cell/mL로 분주하여 48 시간 동안 배양하였다. 그 후 소독된 1 mL blue tip으로 스크래치를 하여 균일한 상처를 낸 뒤 상처 부위를 광학 현미경으로 관찰하였으며 ursolic acid를 0, 8, 12 μM로 처치하여 24 시간 동안 배양하였다. 24 시간 후 ursolic acid를 처리하기 전에 관찰한 상처 부위를 광학 현미경으로 관찰하였다.

DAPI(4', 6-diamidino-2-phenylindole) 염색

세포의 형태학적 변화는 DAPI(4', 6-diamidino-2-phenylindole) stain을 통하여 측정하였다. A375SM과 A375P를 60 dish에 2×10^5 cell/mL로 분주하여 24 시간 동안 배양하였다. 그 후 ursolic acid를 0, 8, 12 μM로 처리하여 24 시간 동안 배양하였다. 24 시간 후 4% paraformaldehyde solution을 처리

하여 15 분 동안 고정시킨 뒤 DAPI solution을 처리하여 형광현미경(Zeiss fluorescence microscope, Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA)으로 200배 시야에서 관찰하였다.

Apoptosis 측정

A375SM과 A375P를 흑색종 세포를 25-cm^2 flask에 배양하여 ursolic acid를 0, 8, 12 μM로 처리하여 24 시간 동안 배양하였다. 배양 후 PBS로 세척한 뒤 trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 수거하였다. 수거한 세포는 1X binding buffer를 사용하여 1×10^6 cells/mL로 만들었다. Fluoresceinisothiocyanate(FITC)-conjugated annexin V와 phycoerythrin(PE)-conjugated propidium iodide을 첨가하여 15 분간 반응시킨 후 유세포 분석을 통해 측정하였다.

웨스턴 블로팅

흑색종 세포 A375SM과 A375P를 1×10^6 cells/mL로 배양하여 ursolic acid가 첨가된 배양액을 처리한 후 24 시간 동안 배양하였다. 그 후 trypsin EDTA를 사용하여 세포를 수거한 후 원심분리(1,200 rpm, 5 min, 4°C)하였다. 그리고 cell lysis buffer(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 첨가하여 4°C에서 20 분간 반응시켰다. 20 분 후 13,000 rpm에서 5 분간 원심분리 하여 상층액을 취해 cell lysate로 사용하였다. Cell lysate의 단백질 농도는 Bradford assay를 사용하여 측정하였다. Cell lysate를 12% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)로 분리한 후 nitrocellulose membranes (Hercules, CA, USA)으로 이동시켰다. Membrane은 5% skim milk-TBST (20 mM Tris·HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)에서 2 시간 동안 blocking한 후 anti-Bax(1:1000), anti-Bcl-2(1:1000), anti-β-actin(1:10000), anti-PARP(1:1000)으로 측정하고자 하는 antibody를 각각 첨가하여 4°C에서 overnight하였다. 그 후 anti-rabbit IgG(1:1000)를 첨가하여 2 시간 동안 반응시켰다. 각 밴드는 imaging program인 Image J Launcher(provided by NCBI)를 이용하여 밀도를 측정하였다.

통계 분석

본 연구에서 얻은 모든 실험결과는 3회 반복하였으며, 그 결과는 평균 ± 표준편차를 사용하여 나타내었다. 각 군간의 유의성을 검증하기 위하여 one-way ANOVA에 이은 Dunnett's *t*-test 분석을 시행하였다. 대조군과 비교하여 $p<0.05$일 때를 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

Results

흑색종 세포의 생존 능력에 대한 Ursolic acid의 영향

흑색종 세포 A375SM, A375P에서 ursolic acid에 의한 세포 생존율을 확인하기 위하여 ursolic acid를 0, 4, 8, 12, 16, 20 μM의 농도로 24 h 처리 후 MTT assay를 진행하였다. A375SM의 생존율은 100 ± 3.25%, 101.29 ± 2.50%, 66.81 ± 6.67%, 29.45 ± 11.22%, 20.6 ± 8.59%, 17.82 ± 11.80%로 ursolic acid 8 μM 부터 통계적으로 유의적인 감소를 보였으며, A375P의 생존율 또한 100 ± 3.60%, 100.42 ± 2.94%, 68.85 ± 10.38%, 40.51 ± 13.68%, 35.78 ± 20.30%, 30.63 ± 15.16%로 ursolic acid 8 μM 부터 통계적으로 유의적인 세포 생존율의 감소를 확인하였다(Fig. 2).

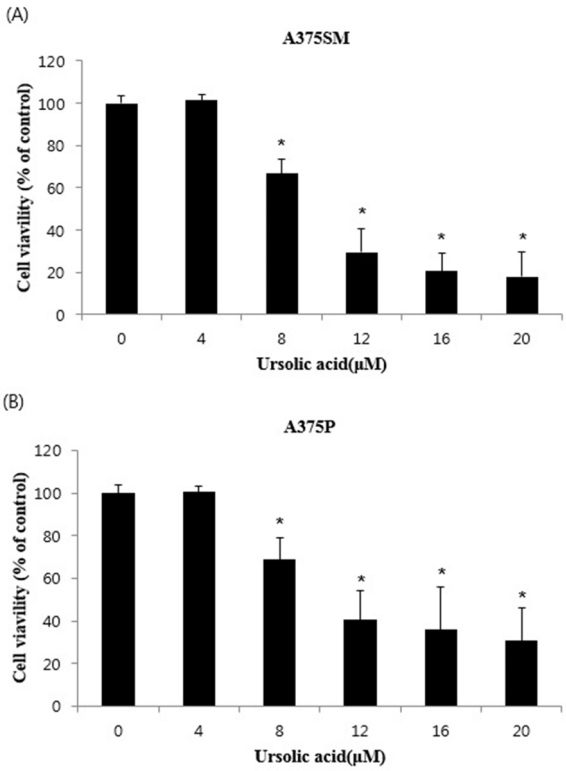

Fig. 2. Effect of ursolic acid on the cell viability in A375SM (A), A375P (B) cells. Each cell was treated with absence or presence of ursolic acid (0, 4, 8, 12, 16, 20 μM) for 24 h by MTT assay. Data are shown as mean ± SD of three independent experiments performed in triplicate. Significance was determined by Dunnett's t-test with *$p<0.05$ considered as statistically significant compared with non-treated controls.

흑색종 세포의 증식에서의 Ursolic acid의 영향

흑색종 세포에서의 증식률을 측정하기 위하여 ursolic acid를 0, 8, 12 μM로 24 h 처리 후 Wound healing assay를 진행하였다. 측정은 스크래치 안에 24 시간 동안 늘어난 세포수를 대조군과 비교하였고 대조군에서 늘어난 세포수를 100%로 설정하였다. Ursolic acid를 흑색종 세포에 각각 0, 8, 12 μM로 처리한 결과, A375SM에서는 100 ± 8.81%, 77.34 ± 18.15%, 42.47 ± 10.06%, A375P에서는 100 ± 10.06%, 79.50 ± 13.21%, 61.93 ± 9.14%로 대조군

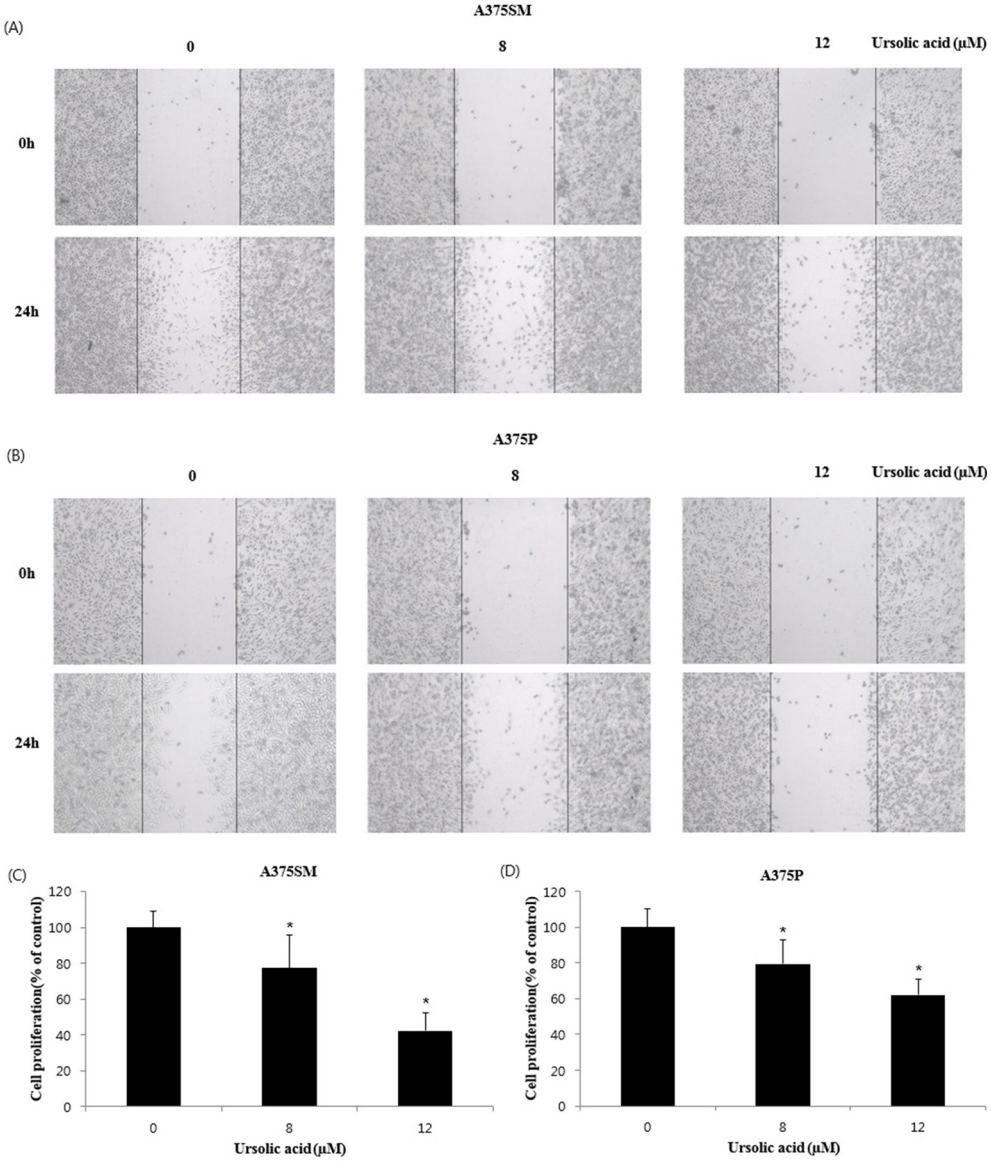

Fig. 3. Effect of ursolic acid on the cell proliferation of melanoma cells. A375SM (A) and A375P (B) melanoma cells were treated with ursolic acid 0, 8 and 12 μM for 24 h, and cell proliferation was then measured by wound healing assay. Cell proliferation of the wound for any field of view was measured at 3 different locations (C, D). Data represent the means ± SD of at least three replicates relative to the control. Significance was determined by Dunnett's t-test with *$p<0.05$ considered as statistically significant compared with non-treated controls.

과 비교했을 때 통계적으로 유의적인 세포의 증식률 억제를 관찰하였다(Fig. 3).

Ursolic acid에 의한 흑색종 세포의 형태학적 변화

흑색종 세포의 형태학적 변화를 확인하기 위하여 ursolic acid를 0, 8, 12 μM로 24 h 처리 후 DAPI 염색을 시행하였다. DAPI 형광 염색에 반응한 apoptotic body를 counting하여 apoptosis가 유도된 세포를 정량화하여 분석하였다. A375SM에서는 0.8 ± 0.83%, 18.0 ± 3.87%, 33.4 ± 4.44%, A375P에서는 3.4 ± 1.14%, 15.2 ± 2.58%, 33.0 ± 5.83%로 ursolic acid의 처치 농도에 따라 통계적으로 유의적인 apoptotic body의 증가를 확인하였다(Fig. 4).

Ursolic acid에 의한 흑색종 세포의 apoptosis 유도

흑색종 세포의 apoptosis 비율을 확인하기 위하여 ursolic acid를 각각 0, 8, 12 μM로 24 h 처치한 뒤 annexin V와 propidium iodide 염색 후 유세포 분석을 시행하였다. apoptosis 비율은 Annexin V 양성 세포의 비율로 측정하였다. 분석 결과 A375SM에서는 13.13 ± 2.22%, 25.35 ±

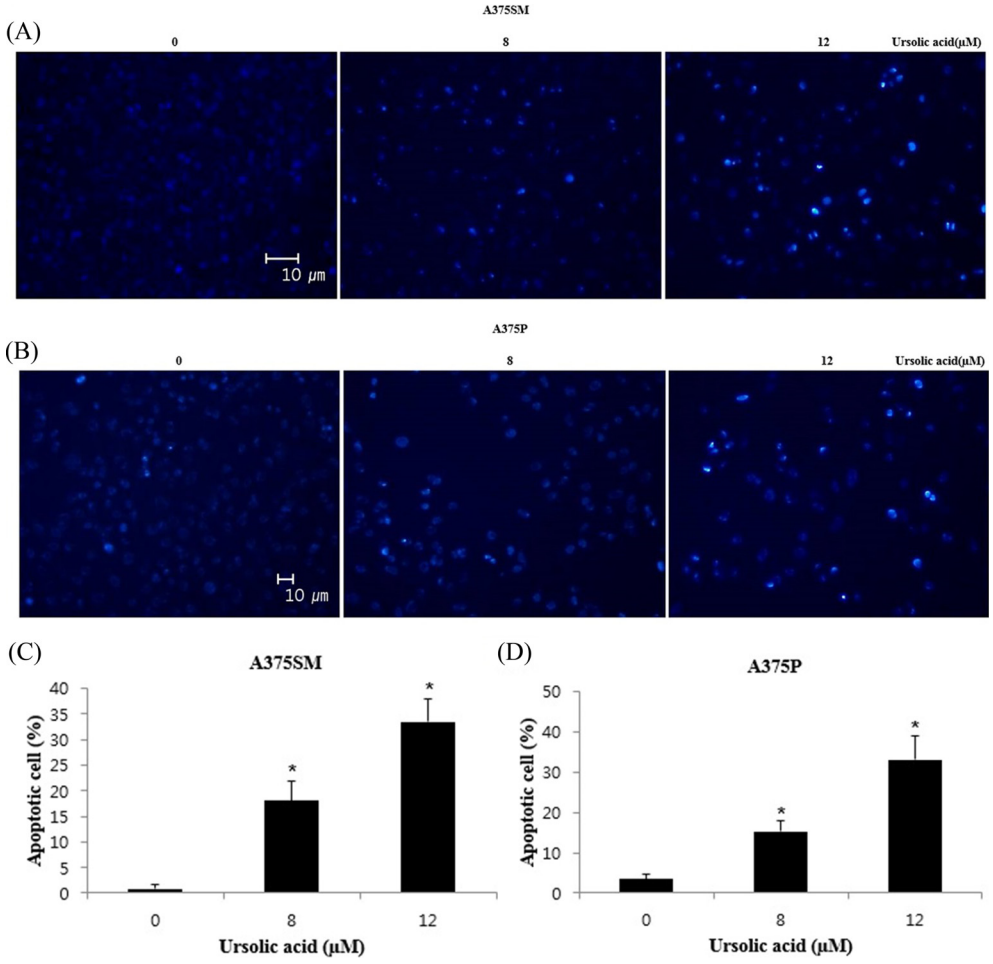

Fig. 4. Effect of ursolic acid-induced apoptosis on A375SM, A375P cells. A375SM (A), A357P (B) cells were treated with absence or presence of ursolic acid (8 and 12 μM) for 24 h and apoptotic bodies were stained with DAPI. Chromatin condensation, representing apoptotic cell death, was examined using a fluorescence microscope (×200). Indicated bar is 10 μm. The graphs show quantification of DNA fragmentation and nuclear condensation in A375SM (C), A357P (D) cell. Each bar represents the mean ± SD calculated from three independent experiments in triplicate. Significance was determined by Dunnett's t-test with *$p<0.05$ considered as statistically significant compared with non-treated controls.

2.85%, 35.53 ± 2.53%, A375P에서는 10.49 ± 3.83%, 22.47 ± 0.60%, 30.09 ± 2.09%로 ursolic acid의 처치 농도에 따라 통계적으로 유의적인 apoptosis 비율의 증가를 확인하였다(Fig. 5).

흑색종 세포에서의 Ursolic acid가 apoptosis 경로 단백질 발현에 미치는 영향

흑색종 세포의 단백질 발현 정도를 확인하기 위하여 ursolic acid를 각각 0, 8, 12 μM로 24 h 처리 후 western blot을 실시하였다. 그 결과 DNA를 수리하는 단백질로 알려진 cleaved PARP와 apoptosis를 유도하는 단백질로 알려진 Bax의 발현 정도가 12 μM 농도에서 증가한 반면, apoptosis를 억제하는 단백질로 알려진 Bcl-2의 발현 정도는 12 μM 농도에서 감소한 것을 관찰하였다(Fig. 6).

Discussion

본 연구는 식물의 terpenoid 중 하나인 ursolic acid에 의한 악성 흑색종 세포의 생존을 억제하고 세포자멸사 유도를 알아보기 위해 전이성이 높은 악성 흑색종 세포인 A375SM과 전이성이 낮은 악성 흑색종 세포인 A375P를 대상으로 진행되었다. MTT assay를 통해 두 흑색종 세포 A375SM과 A375P의 세포 생존율을 측정해본 결과 두 세포 모두 8 μM 농도에서부터 농도 의존적으로 유의적인 세포 생존율의 감소를 확인하였다. Li 등[23] 에 의하면 대장암 세포주 HCT15에서 유의적인 세포감소를 확인하였다. 대다수의 암세포는 초기 암세포가 자라던 조직에서 증식을 통해 주변 조직들로 전이된 후 체내 순환통로인 혈관과 림프관을 통하여 이동, 또 다른 조직으로 증식과 전이

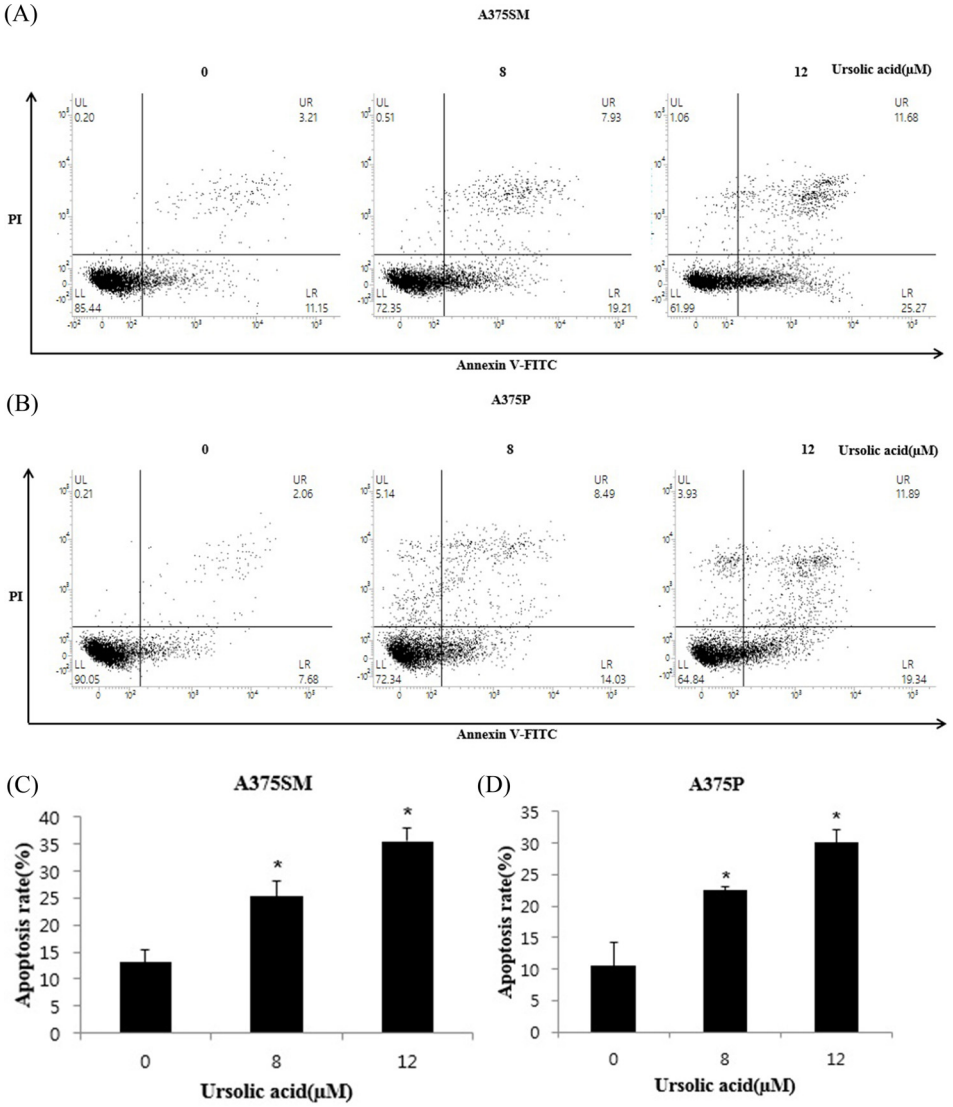

Fig. 5. Effect of ursolic acid-induced apoptosis rates on A375SM, A375P cells. A375SM (A), A375P (B) cell were treated with absence or presence of ursolic acid (8 and 12 μM) for 24 h and apoptosis and necrosis cell were stained with annexin V and propidium iodide. Apoptosis and necrosis were analyzed by flow cytometery analysis. The graphs show quantification of apoptosis rates (annexin V-positive cells) in A375SM (C), A357P (D) cell. Significance was determined by Dunnett's t-test with *$p<0.05$ considered as statistically significant compared with non-treated controls.

를 반복하며 새로운 종양을 만들어내는 특징이 있다. 이러한 증식과 전이의 반복을 암세포의 전형적인 특성 중 일부분으로 생각한 본 연구에서는 앞서 MTT assay를 통하여 A375SM과 A375P 흑색종 세포의 생존율에 유의적인 영향을 미친 ursolic acid 농도를 흑색종 세포에 처치하여 ursolic acid가 A357SM과 A375P 세포의 증식에 미치는 영향을 확인하였다. Wound healing assay를 통하여 세포 증식률을 확인한 결과 물질 처치군에서 Ray 등[24] 과 같이 증식률의 감소를 확인하였다. DAPI 염색에서는 형광현미경으로 관찰한 결과 물질 처치한 군에서는 앞의 실험 결과와 같이 세포의 증식이 억제되었으며, 억제물질 처치군에서 Choi 등[25] 과 같이 염색질 응축을 포함하는 세포자멸사인 apoptosis의 특징 중 하나인 apoptotic body의 증가를 확인하였다. 유세포 분석에서는 Shan 등[26] 과 같이 물질 처치군에서의 apoptosis의 비율의 증가를 확인하였다. Western blot를 진행한 결과 12 μM 농도에서 Bcl-2의 감소는 Shan 등[19] 의 연구에서 대장암세포주 HT-29에서 apoptosis 관련 단백질인 caspase-3과 caspase-9의 활성과 Bcl-2와 Bcl-xL감소를 확인한 것과 같이 이전의 연구들과 유사한 기전으로 apoptosis의 유도를 확인하였으며 apoptosis 관련 단백질인 cleaved PARP, Bax의 증가 또한 확인하였다.

Ursolic acid를 여러 암세포에 적용한 이전 연구들과 같

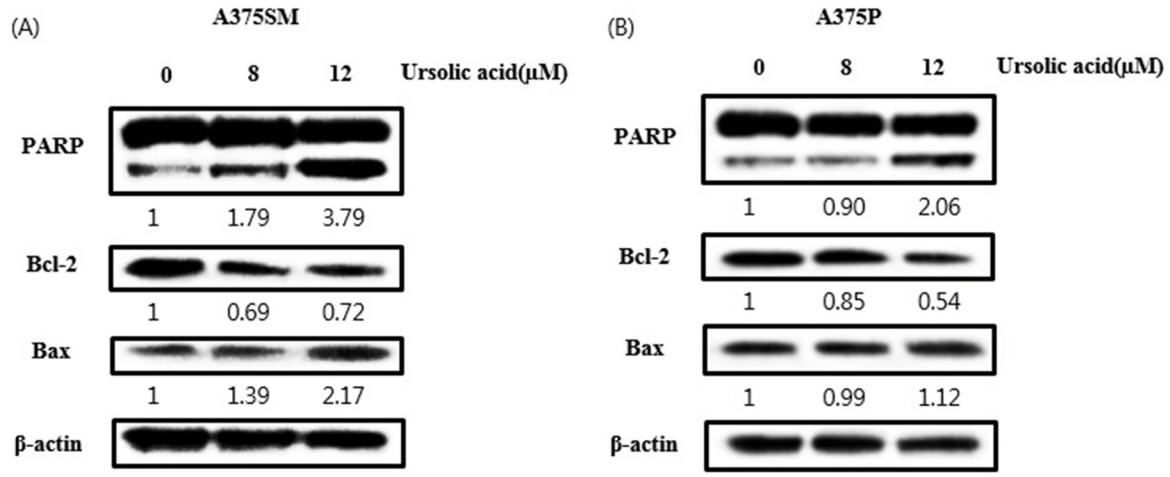

Fig. 6. Ursolic acid down-regulated the expression of Bcl-2 and activated cleaved PARP and Bax. A375SM (A), A375P (B) Cells were treated with 0, 8 and 12 μM ursolic acid for 24 h, the expression levels of Bcl-2 and the activation of cleaved PARP and Bax was detected by Western blot analysis.

이 본 연구에서 ursolic acid의 흑색종 세포 A375SM과 A375P에 대한 항암 효능을 확인하였다. Ursolic acid는 항암, 항산화 및 항염증제로서의 기능을 갖추고 있으나 Kashyap 등[27]의 연구에서 부작용으로 염증 반응이 나타난 보고서 또한 일부 밝혀진 것으로 보여진다. 따라서 추후 항암 및 예방제로서의 효능을 평가하기 위한 *in vivo* 실험에서는 ursolic acid의 투여량 설정에 주의가 필요할 것으로 사료된다.

국문요약

우르솔릭산은 항암, 항산화, 항염증 작용과 같은 다양한 효과를 지니고 있다. 본 연구에서는 우르솔릭산이 인간 흑색종 암세포인 A375SM과 A375P 세포에 항암효과가 있는지 확인하였다. 두 세포의 생존율은 MTT assay를 통하여 확인하였으며 증식률은 Wound healing assay로 확인하였다. 두 세포의 apoptotic body와 apoptosis 비율의 확인을 위한 DAPI 염색과 유세포 분석을 진행하였다. 그리고 웨스턴 블로팅을 통하여 흑색종 세포의 우르솔릭산의 농도에 따른 apoptosis 단백질의 유도를 조사하였다. 우르솔릭산의 처리 농도에 따라 흑색종 세포의 생존율 감소와 증식률 감소를 확인하였다. DAPI 염색을 통하여 우르솔릭산의 농도가 증가함에 따라 흑색종 세포의 염색체 응축이 농도 의존적으로 증가하였고, 유세포 분석을 통하여 우르솔릭산에 대하여 농도 의존적으로 흑색종 세포의 apoptosis 비율의 증가를 확인하였다. 그리고 웨스턴 블로팅을 통해 흑색종 세포 A375SM과 A375P의 우르솔릭산 12 μM 농도에서 cleaved-PARP와 Bax의 증가와 Bcl-2의 감소를 확인하였다. 본 연구는 우르솔릭산의 농도를 0 에서 20 μM 수준의 저농도에서 진행하였으며, 물질 처리 후 24 시간 뒤 결과를 가지고 분석하였다. 본 연구의 결과로 보아 우르솔릭산은 흑색종 세포 A375SM과 A375P에서 apoptosis 관련 단백질들의 조절을 통해 항암효과를 일으키는 것으로 사료된다.

Acknowledgement

이 논문은 2017년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(NRF-2017R1A2B4005516)

References

1. Wang H.M., Chen C.Y., Chen C.Y., Ho M.L., Chou Y.T., Chang H.C., Lee C.H., Wang C.Z., Chu I.M.: (-)-N-Formylanonaine from Michelia alba as a human tyrosinase inhibitor and antioxidant. *Bioorg. Med. Chem.*, **18**, 5241-5247 (2010).
2. Briganti S., Picardo M.: Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, **17**, 663-669 (2003).
3. Picardo M., Grammatico P., Roccella F., Roccella M., Grandinetti M., Del Porto G., Passi S.: Imbalance in the antioxidant pool in melanoma cells and normal melanocytes from patients with melanoma. *J. Invest. Dermatol.,* **107**, 322-336 (1996).
4. Lens M.B., Dawes M.: Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. *British Journal of Dermatology*, **150**, 179-185 (2004).
5. Rigel D.S., Russak J., Friedman R.: The evolution of melanoma diagnosis: 25 years beyond the ABCDs. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **60**, 301-316 (2010).
6. Health Insurance Review & Assessment Service. Available from http://opendata.hira.or.kr/op/opc/olapMfrnIntrsIlnsInfo.do

7. Lee J.W.: The apoptotic effect of allicin in human melanoma cell line A375.S2. Doctoral thesis. Pusan University, Busan, Korea. (2015).
8. Bhatia S., Tykodi S.S., Thompson J.A.: Treatment of metastatic melanoma: An overview. *Oncology –Williston Park Then Huntington-*, **23**, 488-495 (2009).
9. Sivastava S.K., Singh S.V.: Cell cycle arrest, apoptosis induction and inhibition of nuclear factor kappa B activation in anti-proliferative activity of benzyl isothiocyanate against human pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis*, **25**, 1701-1709 (2004).
10. Ma Y.S., Hsu S.C., Weng S.W., Yu C.C., Yang J.S., Lai K.C., Lin J.G., Chung J.G.: Crude extract of *Rheum palmatum* L induced cell death in LS1034 human colon cancer cells acts through the caspase-dependent and –independent pathways. *Environ. Toxicol.*, **29**, 969-980 (2014).
11. Koo H.N., Jeong H.J., Choi I.Y., An H.J., Moon P.D., Kim S.J., Jee S.Y., Um J.Y., Hong S.H., Shin S.S., Yang D.C., Seo Y.S., Kim H.M.: Mountain grown ginseng induces apoptosis in HL-60 cells and its mechanism have little relation with TNF-alpha production. *The American journal of Chinese medicine*, **35**, 169-182 (2007).
12. Ha D.W.: Effects of terpenoids and organosulfur-rich plant extracts on rumen methane emission. Master Thesis. Gyeongsang University, Gyeongsangnam-do, Korea. (2013).
13. Ikeda Y., Murakami A., Ohigashi H.: Ursolic acid: An anti- and pro-inflammatory triterpenoid. *Molecular Nutrition & Food Research*, **52**, 26-42 (2008).
14. Forsyth N.R., Musio A., Vezzoni P., Simpson A.H., Noble B.S., McWhir J.: Physiologic oxygen enhances human embryonic stem cell clonal recovery and reduces chromosomal abnormalities. *Cloning and Stem Cells*, **8**, 16-23 (2006).
15. Checker R., Sandur S.K., Sharma D., Patwardhan R.S., Jayakumar S., Kohli V., Sethi G., Aggarwal B.B., Sainis K.B.: Potent anti-inflammatory activity of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, is mediated through suppression of NF-κB, AP-1 and NF-AT. *PLoS One*, **7**, e31318 (2012).
16. Prasad S., Yadav V.R., Kannappan R., Aggarwal B.B.: Ursolic acid, a pentacyclin triterpene, potentiates TRAIL-induced apoptosis through p53-independent up-regulation of death receptors. Evidence for the role of reactive oxygen species and jnk. *The journal of biological chemistry*, **291**, 16924 (2016).
17. Liu J.: Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of ethnopharmacology*, **49**, 57-68 (1995).
18. Mezzetti T., Orzalesi G., Bellavita V.: Chemistry of ursolic acid. *Planta Medica*, **20**, 244-252 (1971).
19. Shan J.Z., Xuan Y.Y., Zheng S., Dong Q., Zhang S.Z.: Ursolic acid inhibits proliferation and induces apoptosis of HT-29 colon cancer cells by inhibiting the EGFR/MAPK pathway. *J. Zhejiang University. Science. B.*, **10**, 668-678 (2009).
20. Chadalapaka G., Jutooru I., McAlees A., Stefanac T., Safe S.: Structure-dependent inhibition of bladder and pancreatic cancer cell growth by 2-substituted glycyrrhetinic and ursolic acid derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry letters*, **18**, 2633-2639 (2008).
21. Shanmugam M.K., Ong T.H., Kumar A.P., Lun C.K., Ho P.C., Wong P.T., Hui K.M., Sethi G.: Ursolic acid inhibits the initiation, progression of prostate cancer and prolongs the survival of TRAMP mice by modulating pro-inflammatory pathways. *PLoS One,* **7**, e32476 (2012).
22. Wang X., Zhang F., Yang L., Mei Y., Long H., Zhang X., Zhang J., Qimuge-Suyila, Su X.: Ursolic acid inhibits proliferation and induces apoptosis of cancer cells in vitro and in vivo. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011:419343 (2011).
23. Li J., Guo W.J., Yang Q.Y.: Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15. *World journal of gastroenterology*, **8**, 493-495 (2002).
24. Ray N.: Ursolic acid inhibits cell growth in esophageal squamous cell carcinoma by inducing autophagy. Master Thesis. Chonbuk University, Korea. (2016).
25. Choi B.M., Park R., Pae H.O., Yoo J.C., Kim Y.C., Jun C.D., Jung B.H., Oh G.S., So H.S., Kim Y.M., Chung H.T.: Cyclic adenosine monophosphate inhibits ursolic acid-induced apoptosis via activation of protein kinase A in human leukaemic HL-60 cells. *Pharmacology & toxicology*, **86**, 53-58 (2000).
26. Shan J., Xuan Y., Zhang Q., Zhu C., Liu Z., Zhang S.: Ursolic acid synergistically enhances the therapeutic effects of oxaliplatin in colorectal cancer. *Protein Cell*, **7**, 571-585 (2016).
27. Kashyap D., Tuli H.S., Sharma A.K.: Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential. *Life Sciences*, **146**, 201-203 (2016).