

## 참치 추출물의 항암 및 면역효과

황우익<sup>†</sup> · 백나경 · 황윤경\* · 이성동\*\*

고려대학교 의과대학 생화학교실

\*고려대학교 부설 한국 영양문제 연구소

\*\*고려대학교 병설 보건전문대학 식품영양학과

## Antitumor and Immunological Effects of Tuna Extract

Woo-Ik Hwang<sup>†</sup>, Na-Gyung Baik, Yoon-Kyung Hwang\* and Sung-Dong Lee\*\*

Dept. of Biochemistry, College of Medicine, Korea University, Seoul 136-701, Korea

\*Korea Nutrition Research Institute, Korea University

\*\*Dept. of Food and Nutrition, Junior College of Public Health and Medical Technology, Korea University

### Abstract

This study was devised to purify the compound from tuna that have cytotoxic activities against various cancer cell lines and to observe its immunopotentiating activities. The cytotoxic compound was partially purified 277 fold, from petroleum ether extract (crude extract) of tuna by silicic acid column chromatography (fraction D) and thin layer chromatography (Spot I). Cytotoxic activity was monitored using human colon cancer cell, HCT-48. The active compound (Spot I) was composed of seven materials which are fatty acids of four kinds (C<sub>14:0</sub>, C<sub>16:0</sub>, C<sub>17:1</sub> and C<sub>18:0</sub>) and unknown three fat materials. The active compound has cytotoxic activities against various cancer cell lines, that is, murine leukemic lymphocytes (L1210, P388) and human rectal (HRT-18) and colon cancer cells (HCT-48, HT-29). The patterns of size distribution of HCT-48 cells in the medium containing tuna extract were shifted to direction of the small size region. Also, the microscopic shape of HCT-48 cells were shrunk and distracted. The number of plaque forming cell and immunoglobulin fraction of serum protein obtained from tuna-treated mice were increased, but natural killer cell activity was not affected.

**Key words** : antitumor activity, tuna extract, immunological effects

### 서 론

우리나라도 국민의 경제적 생활 수준이 향상됨에 따라 식생활도 점차 영양과 질병 예방 위주의 경향으로 변하고 있다. 이러한 식품중 참치는 고단백식품으로 영양적으로 우수할 뿐만 아니라 혈중 cholesterol 농도를 낮춰 동맥 경화를 예방하며<sup>1-5)</sup> 항암 작용이 있다

고 알려져 각광을 받는 식품중의 하나가 되었다. 또한 불포화지방산의 일종인 docosaehaenoic acid (DHA) 나 eicosapentaenoic acid (EPA)가 항암 효과가 있다는 최근 보고와 함께 참치에 DHA가 다량 들어 있어 참치를 암의 예방 또는 억제에 이용하려는 연구가 국내외에서 활발하게 추진되고 있다<sup>6-9)</sup>. 즉, 북 Greenland의 에스키모들은 해산물을 통해 w-3계 지방산인 eicosapentaenoic acid (EPA)와 docosaehaenoic acid (DHA)을 많이 섭취하여 동맥 경화증이 적음이 알려져 있다.

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

뿐만 아니라 fish oil을 유일한 fat source로 줄때 corn oil만을 준 rat에 비해 chemically induced colon tumor 발생률이 낮았다는 미국에서의 연구가 있었다. 참치류의 눈부위에 DHA함량이 30~40%로 참치 기름에서 DHA를 추출, 정제 하려는 노력이 일본에서도 활발하며, 국내에서도 참치의 EPA 와 DHA를 대상으로 항암제 개발 가능성을 타진하고 있다.

저자들은 흰쥐의 백혈병성 세포인 P388 과 L1210 그리고 인체 장암 세포(HRT-18, HCT-48, 그리고 HT-29)를 대상으로 *in vitro* 에서 참치 석유에텔 추출물의 암세포 증식 억제 효과를 측정하여 의미 있는 결과를 얻은 바 있다<sup>10)</sup>.

본 연구에서는 참치 추출물로부터 항암효과가 있는 유효 성분을 분리 정제하면서 단계별로 얻어지는 성분의 항암 활성을 측정하고, 그 물질의 생체내 (*in vivo*)에서의 작용 기전을 밝히기 위하여 여러가지 면역학적 실험을 수행하여 그 결과를 보고한다.

## 재료 및 방법

### 참치

본 실험에 사용한 참치는 동원 참치 주식회사로부터 기증받은 것이다.

### 암세포

암세포는 미국 NIH에서 항암제 screening에 응용하고 있는 암 세포들중, 본 연구실에서 실험이 가능한 흰쥐의 백혈병성 임파모 세포인 L1210 과 P388, 그리고 인체 장암세포인 HRT-18, HCT-48, HT-29 및 흰쥐의 육종 암세포의 일종인 sarcoma 180(이하 S-180)을 사용하였다. 한편 natural killer(NK) cells의 표적 세포로서는 mouse lymphoma인 YAC-1 세포를 사용하였다.

### 실험동물

실험 동물은 본 연구실의 동물 사육실에서 번식시킨 ICR mice(20g 내외)와 C57BL/6J mice(20g 내외)를 사용하였다.

### 시약

L1210 및 P388 암세포의 배양에 사용된 배양액은

Fischer's medium이었으며, HRT-18, HCT-48 및 HT-29 암세포의 배양액은 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM), YAC-1 및 splenocyte는 RPMI 1640배지였고, 이들은 horse serum, fetal bovine serum(FBS), Trypsin-EDTA와 더불어 모두 GIBCO(Grand Island Biological Co.) 제품을 사용하였다. 활성 성분 정제에 관련된 시약으로 adsorption chromatography에 사용한 resine 은 Bio-silR silica로 Bio-Rad 제품을, TLC plate는 Merck 제품을 사용하였으며, 면역기전 관련 실험에 사용된  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (350~600mCi/mg-Cr)는 Amersham제품을, agar는 Difco제품을, guinea pig complement는 GIBCO제품을, 그의 시약은 Sigma제품을 사용하였다.

### 기구

본 실험에서 사용한 세포수 측정기는 Coulter Counter Model ZBI를, 세포 크기 분포 측정기는 Coulter counter의 부속기기인 Model P64 size distribution analyzer 및 X-Y recorder를, freeze dryer 및 그 부속 기구들은 Labconco제품을 사용하였고 세포 모양 관찰은 Olympus 제품의 inverted microscope를 이용하였으며 L1210, P388 및 S-180 암세포 배양용 항온기는 Enconap 제품을, HRT-18, HCT-48 및 HT-29 암세포 배양용 항온기는 Queue 사의  $\text{CO}_2$  항온기를 사용하였다. 또한 NK세포 활성을 측정하기 위해서는 Berthold사의  $\gamma$ -counter를 사용하였고 densitometer는 Bio-Rad것을 사용하였다. Millipore filter disc 및 그 부속품은 Millipore corp를 세포 배양용기 T-75 flask 35mm petri dish는 Nunc제품을 사용하였다.

### 암세포의 배양

흰 쥐의 백혈병성 임파모 세포인 L1210, P388 및 육종암 세포의 일종인 S-180은 Fischer와 Sartorelli법<sup>11)</sup>에 의하여 배양하였다<sup>12,13)</sup>. 즉, L1210, P388세포는 10% horse serum을 함유하는 Fischer's medium에 각각 일정수씩 첨가하여 16×25mm pyrex 시험관에 5ml 씩 분배한 다음 37°C incubator 내에서 수평을 유지시켜 배양하였다. 사람의 장암세포 HRT-18, HCT-48 및 HT-29는 fetal bovine serum이 5% 함유된 DMEM배지로 T-75 flask에 이식시킨 후 5%  $\text{CO}_2$ 가 공급되는 37°C incubator에서 monolayer로 배양하였으며, 암세포가  $4 \times 10^6$  cells/ml 정도로 증식되면 PBS(Phosphate Bu-

ffered Saline)로 세척하고 0.05% Trypsin-EDTA로 분리시켜 계대 배양하였다. 동물 실험에 사용하기 위한 S-180 암세포는 ICR mice의 복강에  $1 \times 10^6$  cells/head로 주사하여 10~15일 경과후 복수가 차면, 복강에서 S-180 세포를 채취하여 다른 mice에 접종하는 방식으로 계대 배양하였다. 그리고 NK 세포의 활성을 측정하기 위한 표적 세포인 YAC-1은 10% FBS가 함유된 RPMI 1640 배지에서 인체 장암세포와 같은 방법으로 계대 배양하였다.

참치 성분의 추출

동원 참치 주식회사로 부터 기증받은 냉동 참치를 잘게 썰어 blender에서 간 후, freeze dryer에 의해 완전히 냉동 건조시킨후 48시간이상 석유에텔로 추출하였다. 석유 에텔 추출물을 실험에 사용한 이유는 물, 아세트, 석유에텔 추출물로 행한 실험에서 석유 에텔 추출물이 암세포 증식 억제 효과가 가장 뛰어난 효과를 보였기 때문이다<sup>9,10</sup>. 추출액 중 용매는 증류시켜 제거하고, 남은 참치 추출 성분은 건조 중량을 측정된 뒤 소량의 무수에탄올에 녹여 millipore filter disc로 제균하고 실험시에는 필요한 농도로 배양액에 희석하여 사용하였다.

참치 추출물의 암세포 증식 억제 효과 측정

원 생쥐의 백혈병성 임파모 세포의 경우에는 참치 추출물이 농도별로 함유된 Fischer's medium에 세포를  $2 \times 10^4$  cells/ml이 되도록 첨가한 후, 여러군의 시험관에 배분하여 37°C에서 배양하면서 배양 시간별, 추출물 농도별로 각군의 세포수를 Coulter counter로 측정하여 대조군(추출물을 넣지않은 군)과 비교하였다. 인체 장암세포의 경우는 암세포를 35mm petri dish에 이식하고 24시간 배양하여 세포수가  $3 \sim 4 \times 10^4$  cells/dish로 되었을때 참치 추출물이 농도별로 함유된 새로운 DMEM배양액으로 교체한 후 다시 CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하면서 배양 시간별, 추출물 농도별 등 각군의 세포수를 Coulter counter로 측정하여 대조군(추출물을 넣지않은 군)과 비교하였다<sup>14,15</sup>. 추출물의 암세포 증식 억제효과를 비교하기 위하여, 대조군에 비하여 실험군의 doubling time을 2배로 연장시키는데 소요되는 배양액 미당 함유된 추출물의 건조중량을 1단위 (unit)로 정하였다<sup>16</sup>.

암세포 형태의 조직학적 관찰 및 암세포 크기 분포 측정

HCT-48 암세포에 참치 추출물을 첨가하여 배양하면서, 24시간 경과후 부터 72시간까지 암세포의 모양을 inverted microscope로 관찰하였다<sup>17</sup>. 또한 참치 추출물을 첨가하여 배양하면서 시간별로 암세포 크기 분포에 미치는 영향을 Size distribution analyzer와 X-Y recorder 이용하여 확인하였다.

참치 추출물의 활성성분 정제

Silicic acid column chromatography

Silicic acid 50g을 125ml의 chloroform에 녹인 후 deairation하고 유리 column(2.5×30cm)에 부어 packing 하였다. 그 column은 먼저 125ml의 chloroform으로 씻은 후 다시 petroleum ether 125ml로 씻었다. Sample은 petroleum ether 5ml에 crude extract(0.70g)을 녹여 column에 loading 하였다. Petroleum ether, petroleum ether : ethyl ether (19 : 1, v/v), petroleum ether : ethyl ether (8 : 2, v/v), petroleum ether : ethyl ether (7 : 3, v/v)의 각 125ml로 stepwise elution을 수행하였다<sup>18,19</sup>. Eluate는 각 단계의 solvent별로 각 fraction (Fraction A, B, C, & D)을 받아 모았다.

Thin-layer chromatography (TLC)

Silicic acid column chromatography에서 얻은 활성 성분을 더욱 분리 정제 하기 위해 silica-gel thin layer chromatography를 수행하였다<sup>19</sup>. 사용한 전개용매는 petroleum ether : ethyl ether : acetic acid의 혼합 비율이 90 : 10 : 1 (v/v/v)인 것으로 사용하였으며 Marinette법<sup>20</sup>에 의해 0.01% rhodamine 6G 용액을 분무한 후, 245nm에서 관찰하여 전개된 부위를 확인하였다. 활성 성분이 어느 전개 부위에 위치하는지를 알기 위하여 각 부위를 긁어 모아 ethyl ether로 추출하여 활성을 측정하였다.

참치 성분중 DHA 와 EPA 함량 측정

Sample은 methyl ester 화하여<sup>21</sup> 지방산으로 가수분해 하였다. 이렇게 전처리한 시료를 gas chromatography로 capillary column BP-20(25m×0.33mm ID×0.25µm film)을 이용하여 column 온도를 180°에서 200°C까지 1°C/min 으로 올리면서 분석하였다.

Gas Chromatography/Mass Spectrometry(GC/MS)

TLC에서 얻은 Spot I (Fig. 6 참조)의 성분을 규명하기 위해서 한국과학재단 기초과학연구지원센터 질량분석실에 GC/MS 를 의뢰하였다. 사용기기는 Hewlett-packard 5980 II GC와 Hewlett-packard 5988 MS이며 이온화 방법으로 전자 이온화법 (electron ionization, EI)을 사용하였다.

#### 항암 활성의 면역 기전 관련 실험

자연 살해 세포(Natural killer cell)의 활성에 미치는 영향

주요 세포 (Effector cell) : C57BL/6J 생쥐 24마리를 4개의 군으로 나누어 제 1군은 대조군으로서 정상 생쥐이고 제 2군은 참치 추출물(fraction D)을 1mg/head로 실험 시작일로부터 9일간 복강 주사한 군, 제3군은 S-180세포를 실험 시작일로부터 10일째 날  $1 \times 10^6$  cells/head로 복강 주사한 군, 그리고 제4군은 참치 추출물을 9일간 주사한 후 10일째 날 S-180 세포를 투여하였다. 이와같이 처치한 후 16일째 날 희생하여 각각의 생쥐로부터 무균적으로 비장을 채취하였다. 이 비장을 stainless sieve (200mesh)를 통과시켜 단세포 부유액을 만들고 적혈구를 제거하기 위해 0.83%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 에 부유시켜 2분간 방치한 후 원심 침전하여 세포를 모았다. 이를 다시 RPMI 1640, FBS 10% 배지에 부유시킨 다음 flask에 넣어 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 1시간 배양한 후 가볍게 흔들여 부유된 세포 (non adherent cells)만을 채취하여  $1 \times 10^7$  cells/ml로 만들어 주요 세포로 사용하였다.

표적 세포 (Target cell) : 표적세포로 사용한 YAC-1 세포  $3 \times 10^6$  cells/0.5ml을  $100 \mu\text{Ci}$   $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$  (350 ~ 600mCi/mgCr)와 37°C incubator에서 1시간 표지화 (labelling)시켰다. 그후 3회 세척하여 표지화된 세포를  $1 \times 10^4$  cells/100 $\mu\text{l}$ 되게 RPMI 1640, FBS 10%배지에 부유시켰다.

NK세포의 활성 측정<sup>22)</sup> : 표지된 YAC-1세포를 이용하여 4시간  $^{51}\text{Cr}$ 방출방법 (4hr- $^{51}\text{Cr}$  release assay)를 이용하여 수행하였다. 즉  $^{51}\text{Cr}$ 이 표지된 세포를 microplate (Nunc, 96well)를 well당  $1 \times 10^4$  cells/100 $\mu\text{l}$  되게 넣고, 주요 세포와 표적 세포의 비율이 100 : 1이 되도록 NK세포를  $1 \times 10^6$  cells/100 $\mu\text{l}$  씩 넣어 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 4시간 작용시켰다. 이때 최대 방출

(maximum release)을 측정하기 위해서는 0.25% Triton X-100을 가하였고 자연 방출 (spontaneous release)을 측정하기 위해서는  $^{51}\text{Cr}$ 이 표지된 세포만을 배양시켰다. 작용 4시간 후 상층액 100 $\mu\text{l}$ 를 수거하여 gammacounter로 방사능을 측정하였으며, NK세포의 활성은 다음과 같이 계산하였다.

% Cytotoxicity

$$= \frac{\text{Test release} - \text{spontaneous release}}{\text{Maximum release} - \text{spontaneous release}} \times 100$$

용혈반 형성 세포수에 미치는 영향

비장 세포 : C57BL/6J mice 10마리를 5마리씩 2개 군으로 나누어 제 1군 (대조군)에는 아무것도 처리하지 않고, 제 2군에는 참치 추출물(fraction D)을 1mg/head로 5일간 복강내로 투여하여 전처리하였다. 6일째날 2개군 모두 면역 적혈구 ( $5 \times 10^8$  cells/head)로 감염시킨 다음, 5일후에 희생하여 비장을 적출하여 splenocytes를 얻었다.

용혈반 형성 세포 시험 (Plaque forming cell assay)<sup>23-25)</sup> : 적출한 spleen을 ice cold EBSS로 homogenize 하고 원심 침전시켜, 0.83%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  용액으로 hemolysis 시키고 원심 침전하여 적혈구를 제거한 뒤, EBSS로 희석하였다. 0.5% agar용액 350 $\mu\text{l}$ 에 50%면양 적혈구, 25 $\mu\text{l}$  비장 세포 100 $\mu\text{l}$ 와 guinea pig complement 40 $\mu\text{l}$ 를 잘 혼합하여 이중 200 $\mu\text{l}$ 를 취하여 petridish에 떨어 뜨리고 cover glass로 덮어 37°C에서 2시간 incubation 한 후, 형성된 용혈반의 수를 세었다.

면역 globulin의 농도에 미치는 영향

실험군으로부터 비장을 적출하기전 heart puncture를 통해 생쥐의 혈액을 얻었다. 이를 상온에서 30분간 방치한 후, 3000rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 얻어 Helena의 표준 조작법<sup>26)</sup>에 의해 cellulose acetate electrophoresis를 수행한 후, densitometer를 이용하여 525nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

참치 성분의 추출 및 추출물의 HCT-48세포의 증식 억제율

참치를 잘게 썰어 blender로 간 것 1000g을 냉동 건조하여 285g을 얻었다. 이를 석유 에틸로 48시간 추출한 후, 석유 에틸은 evaporator와 N<sub>2</sub> gas로 완전히 제거하고 남은 crude extract의 양은 24.9g이었다. Fig. 1은 HCT-48 암세포 배양액에 crude extract를 30 $\mu$ g/ml, 60 $\mu$ g/ml 및 120 $\mu$ g/ml씩 첨가 하였을때의 growth curves 이다. 출발 세포수가 3.5 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/dish에서 24시간, 48시간 및 72시간 배양시 대조군은 7.4 $\times$ 10<sup>4</sup>, 1.4 $\times$ 10<sup>5</sup>, 및 2.7 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/dish로 증식하였다. 그러나 crude extract를 30 $\mu$ g/ml 첨가한 군은 72시간 배양시 26%의 증식 억제를 보였으며, 60 $\mu$ g/ml 및 120 $\mu$ g/ml 첨가한 군은 49%와 99%의 증식 억제를 가져왔다. 따라서 crude extract의 첨가량 증가에 따라 암세포의 증식 억제율도 증가됨을 알 수 있었다.

Silicic acid column chromatography에 의한 crude extract의 분리 및 각 분획의 HCT-48 세포

증식 억제율

석유 에틸의 crude extract 를 silicic acid column chromatography하여 얻은 네개의 fraction을 가지고 암세포 증식 억제 효과를 측정된 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Fraction A, B 및 C는 100 $\mu$ g/ml 농도에서 거의 억제 효과를 보이지 않았으나, fraction D를 첨가하여 24시간 배양하였을 때 초기 농도보다도 세포수가 24% 감소하였으며, 72시간 배양시는 60% 감소하여 세포가 사멸되는 현상을 보였다.

참치 crude extract 및 silicic acid column chromatography 에서 얻은 각 fraction의 활성을 Table 1에 정리하여 나타내었다. Crude extract의 HCT-48 cells에 대한 1 unit, 즉 doubling time을 2배로 연장시키는데 필요한 배지 1ml당 양은 약 60 $\mu$ g이었으며, chromatography에서 가장 활성이 높은 fraction D의 1unit은 약 22 $\mu$ g으로 (Table 3 참조) specific activity가 17에서 46으로 증가하였으며 activity의 회수율은 51%를 보였다. 따라서

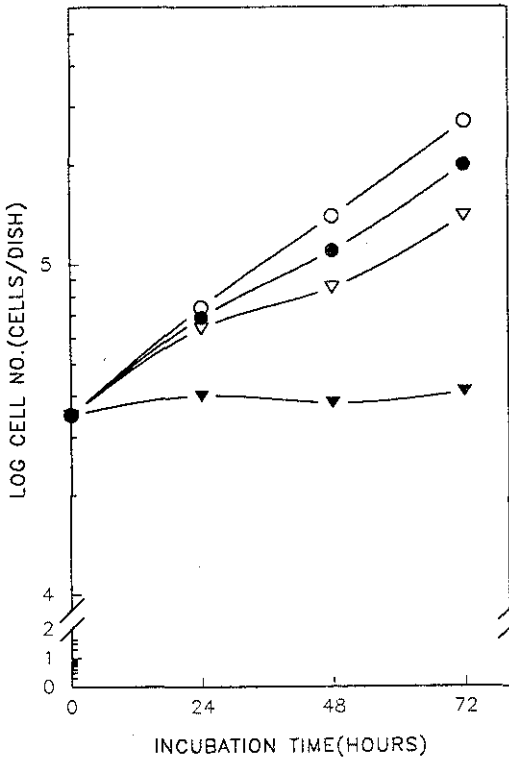


Fig. 1. Growth curves of HCT-48 cells in the culture medium containing various amount of crude tuna extract.  
 ○-○ : Control      ●-● : 30 $\mu$ g/ml  
 ▽-▽ : 60 $\mu$ g/ml      ▼-▼ : 120 $\mu$ g/ml

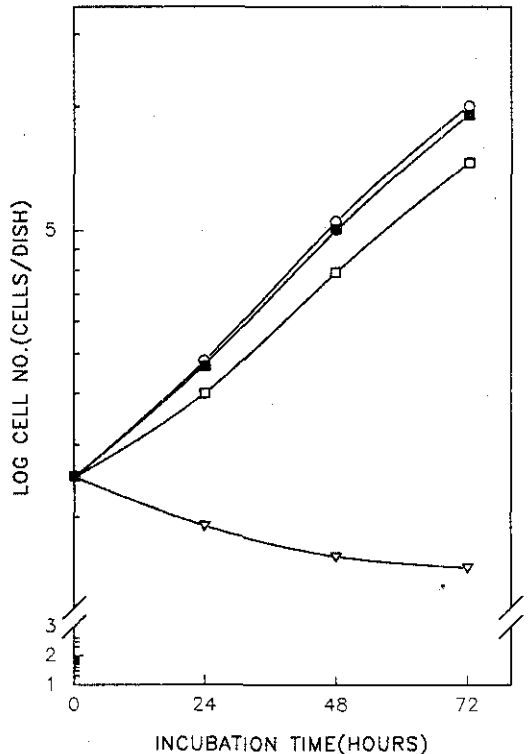


Fig. 2. The cytotoxic activity of each fraction (100 $\mu$ g/ml) separated by silicic acid column chromatography against growth of HCT-48 cells.  
 ○-○ : Control      ●-● : Fraction A or B  
 ▽-▽ : Fraction C      ▼-▼ : Fraction D

**Table 1. The cytotoxic activity of each fraction separated by silicic acid column chromatography against HCT-48 cells**

Fraction	Weight yield (mg)	Total activity (units)	Activity (units/mg)	Recovery (%)
Crude extract*	700	11900	17	
Fraction A**			No activity	ND <sup>a</sup>
B	105		No activity	ND
C	40	2891	7	24
D	133	6118	46	51

\*Crude extract (700mg of petroleum ether extract) was loaded on silicic acid column (2.5 x 28cm)

\*\*Fraction A : Only petroleum ether fraction

B : Pet. ether : ethyl ether ; 9 : 1 (v/v) fraction

C : Pet. ether : ethyl ether ; 8 : 2 (v/v) fraction

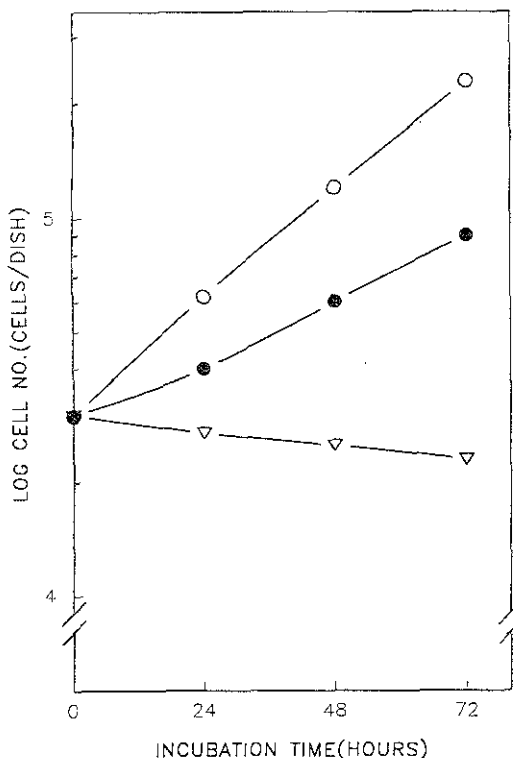
D : Pet. ether : ethyl ether ; 7 : 3 (v/v) fraction

ND<sup>a</sup> : Not determined

column chromatography 수행후 얻은 fraction D는 암 세포 증식 억제력이 crude extract에 비해 약 3배 정도 증가되었음을 알 수 있다.

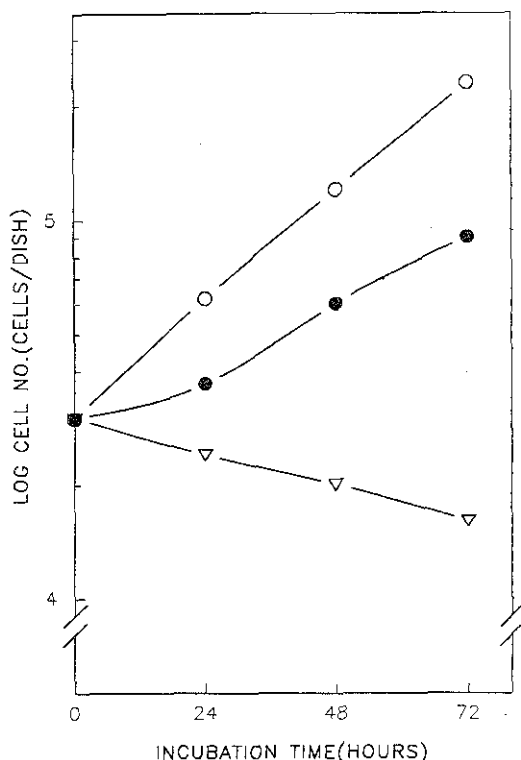
#### HT-29, HRT-18, 및 P388세포에 대한 crude extract 와 fraction D의 활성

인체 장암세포인 HT-29 및 HRT-18세포에 tuna crude extract 및 silicic acid column chromatography에 서 얻은 fraction D를 100 $\mu$ g/ml 농도로 첨가하여 72시간 배양하면서 시간별로 세포수를 측정하여 얻은 결과를 Fig. 3과 Fig. 4에 나타내었다. 이 결과도 HCT-48세포의 경우와 같이 fraction D에서 강한 활성을 나타내어 crude extract중 활성성분이 silicic acid column에 의해 정제되었음을 나타내었다. 한편 HT-29세포에서 crude extract 및 fraction D의 1unit에 해당하는 양은 각각 64 $\mu$ g 및 34 $\mu$ g이었고, HRT-18세포에서는 각각 54 $\mu$ g과 34 $\mu$ g으로서 HRT-18세포에 대해 약간 더 강한 활



**Fig. 3. Growth curves of HT-29 cells in the medium containing tuna extract (100 $\mu$ g/ml).**

○—○ : Control      ●—● : Crude extract  
▽—▽ : Fraction D



**Fig. 4. Growth curves of HRT-18 cells in the medium containing tuna extract (100 $\mu$ g/ml).**

○—○ : Control      ●—● : Crude extract  
▽—▽ : Fraction D

성을 보였다(Table 3 참조).

또한 Fig. 5는 생쥐 백혈병성 임파모세포인 P388에 대해 crude extract와 fraction D를 3 $\mu$ g/ml로 첨가하여 배양하면서 시간별로 세포수를 측정된 결과를 나타낸 것이다. 72시간 배양시 crude extract를 첨가한 군은 대조군에 비해 54%의 성장이 억제되었으며 fraction D를 첨가한 군은 초기 세포 수보다도 감소하는 양상을 보였다. P388세포의 경우 crude extract와 fraction D의 1 unit에 해당하는 양은 각각 2.5 $\mu$ g, 1.4 $\mu$ g으로서 (Table 3 참조) 인체 장암 세포에서 보다 훨씬 적은 양으로 같은 활성을 나타내는 이유는, 생쥐 임파모세포는 suspension type으로 증식하나 인체 장암세포는 monolayer type으로 증식하므로 활성 성분과 암세포와의 상호 접촉 작용에서 차이를 가지며 또한 각 암세포의 species차이에 의한 것으로 보인다.

Thin layer chromatography에 의한 추출물의 정제 및 정제된 성분의 활성

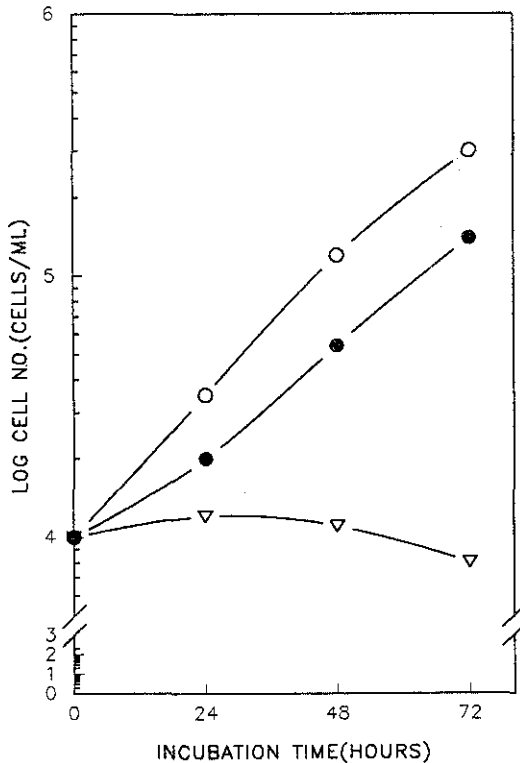


Fig. 5. Growth curves of P388 cells in the culture medium containing tuna extract (3 $\mu$ g/ml).  
 ○—○ : Control      ●—● : Crude extract  
 ▽—▽ : Fraction D

Crude extract와 silicic acid column chromatography에서 얻은 각 fraction을 가지고 TLC를 수행한 chromatogram을 Fig. 6에 나타내었다. Fig. 6에 나타난 바와 같이 silicic acid column chromatography에서 가장 활성이 좋은 fraction D는 TLC 상에서 3개의 spot을 보였다. 따라서 이 fraction을 preparative TLC를 수행하여 각 전개 부위를 끊어 내어 다시 추출하여 활성을 측정 한 결과 Rf 값이 0.25의 spot이 가장 강한 활성을 보였다 (Fig. 7). 즉 HCT-48세포에 각 spot을 100 $\mu$ g 첨가시, Spot II와 III (Fig. 6참조)은 72시간 배양하였을때 대조군에 비해 64% 및 44% 증식 억제 효과를 나타냈으며, Spot I이 가장 큰 활성을 보여 24시간 배양시 세포가 초기 농도의 96%가 사멸하고 4%정도만이 살아 남아 있었다.

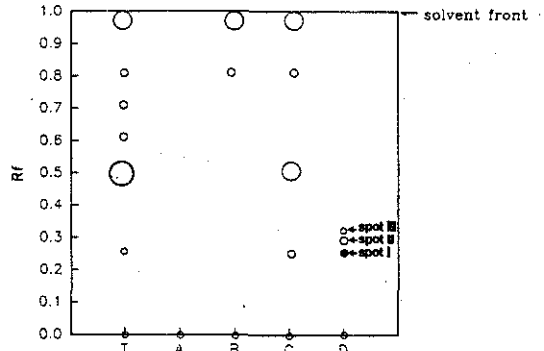


Fig. 6. Silica-gel thin layer chromatogram of crude tuna extract and each fraction by silicic acid column chromatography.

- T : Crude tuna extract
- A : Only pet. ether fraction
- B : Pet. ether : ethyl ether (9 : 1) fraction
- C : Pet. ether : ethyl ether (8 : 2) fraction
- D : Pet. ether : ethyl ether (7 : 3) fraction
- : Active compound

한편 Fig. 8은 생쥐 백혈병성 임파모세포인 L1210에 대한 결과로서 대조군 세포는 72시간 배양시 4.0 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/ml로 증식하였으며, 각 추출물을 3 $\mu$ g/ml 농도로 첨가시 crude extract를 첨가한 군은 96% 억제되었다. Spot I를 첨가한 군은 초기 농도의 12%만이 살아남는, 즉 사멸함을 보였다.

Fig. 9는 참치 crude extract로부터 각 정제 단계별로 얻은 성분들의 HCT-48세포에 대한 활성을 비교한 것이다. TLC에서 가장 큰 활성을 갖는 Spot I의 1unit에 해당하는 양은 9 $\mu$ g (Table 3 참조)으로서 specific

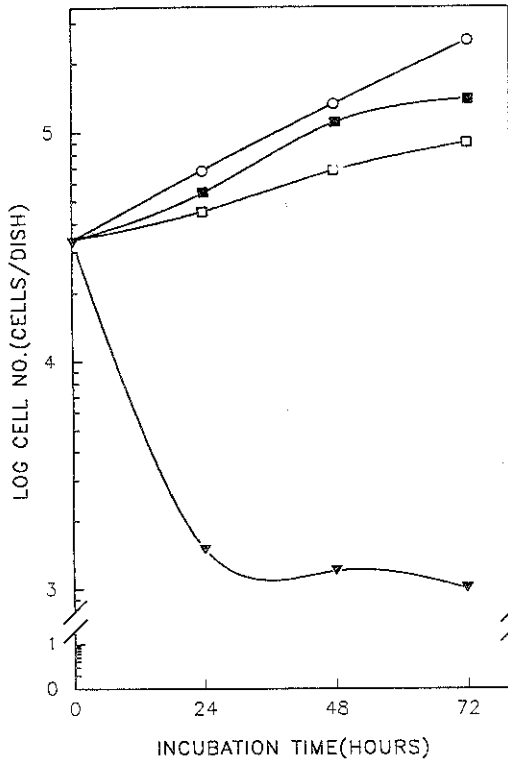


Fig. 7. The cytotoxic activity of each fraction (100µg/ml) separated by TLC against growth of HCT-48 cells.

○-○ : Control      ●-● : Spot I  
▽-▽ : Spot II      ▼-▼ : Spot III

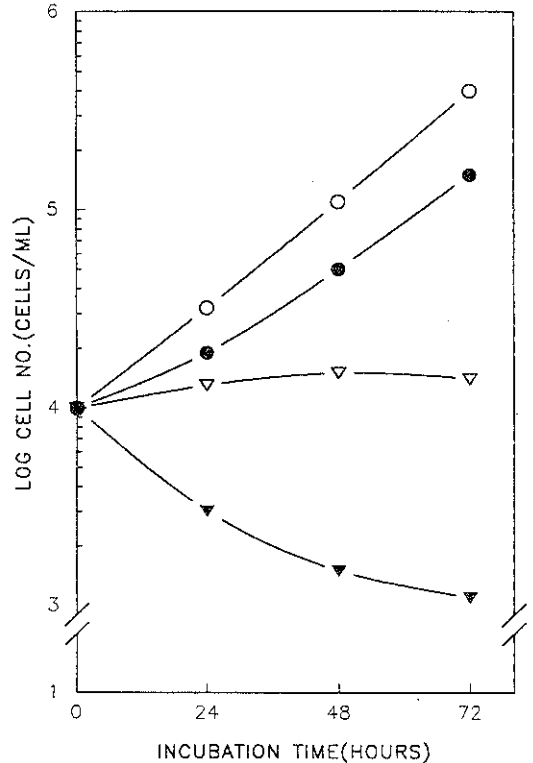


Fig. 8. Growth curves of L1210 cells in the culture medium containing compound (3µg/ml) obtained from each step of purification.

○-○ : Control      ●-● : Crude extract  
▽-▽ : Fraction D      ▼-▼ : Spot I

Table 2. The partial purification of cytotoxic active compound from tuna

Procedure	Weight yield (g)	Total activity (units)	Activity (units/mg)	Purification fold
Tuna	1000	415,060	8.4	1
Pet. ether extraction	24.9	415,000	16.7	42
Silicic acid column chromatography : Fraction D	4.7	211,650	45.0	112.5
Thin layer chromatography : Spot I	0.07	7,778	111.1	277.7

activity (units/mg)가 각 정제 단계별로 16.7, 45.0 및 111.1로 증가하였다. 참치로부터의 활성 성분의 정제 과정을 Table 2에 정리하였고 Table 3에는 활성 성분의

1unit에 해당되는 양을 나타내었다.

암세포 형태의 조직학적 관찰 및 크기 분포 측정 참치로부터 얻은 활성 성분이 암세포의 형태 변화에 미치는 영향을 보기 위해 silicic acid column chromatography에서 얻은 fraction D를 100µg/ml 농도로 HCT-48 세포 배양액에 첨가하여 72시간 동안 배양하면서, 세포 모양을 현미경으로 관찰한 사진을 Fig. 10에 나타내었다. 사진 A, B, C는 대조군으로서 세포들이 모두 건강하고 배양 시간이 경과함에 따라 세포 밀도가 조밀한 점으로 미루어, 정상적으로 증식되었음을 볼 수 있다. 그러나 참치로부터 얻은 활성 성분 fraction D를 100µg/ml을 넣고 배양한 사진 D, E, F에서는 대조군 세포에 비해 기형적으로 변형되었고, 세포의 밀도도 낮아 증식이 억제되었음을 볼 수 있고 또한 세포의 죽은 잔유물들을 관찰할 수 있었다. 한편 배양시



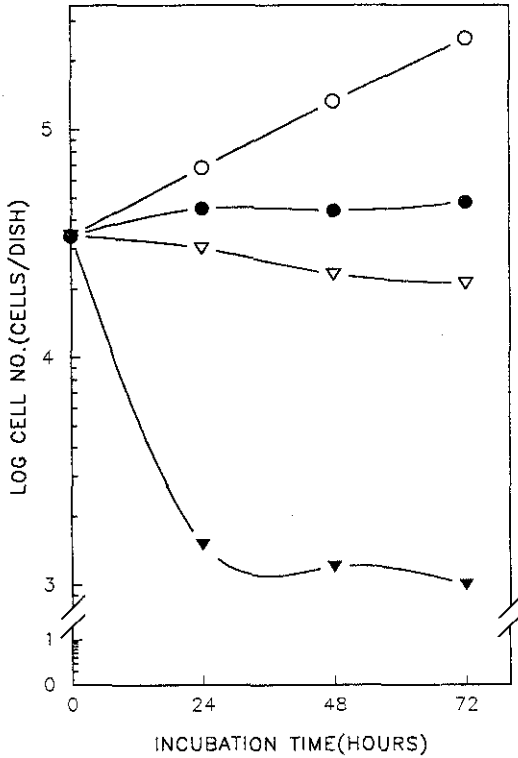


Fig. 9. Growth curves of HCT-48 cells in the medium containing compounds (100  $\mu$ g/ml) obtained from each step of purification.

○-○ : Control      ●-● : Crude extract  
 ▽-▽ : Fraction D    ▼-▼ : Spot 1

Table 3. One unit ( $\mu$ g) of active compound obtained from each step of purification

	L1210	HCT-48	HT-29	HRT-18	P388
Crude extract	2.2	60	64	54	2.5
Fraction D	1.2	22	34	34	1.4
Spot 1	0.7	9			

간별로 세포의 크기 분포를 size distribution analyzer를 이용하여 얻은 결과를 Fig. 11에 도식 하였다. Fig. 11 (A)는 fraction D를 100 $\mu$ g/ml 첨가하여 배양하면서 0, 24, 48시간에 측정 한 HCT-48 세포의 size distribution (at manometer)을 나타낸 것이다. 0 hour에 30~50 cubic micron (c.m.)에 주로 분포하던 것이 시간이 경과함에 따라 10~20 c.m.으로 분포를 옮겨감을 보였다. (B), (C)는 size distribution analyzer (stop at full scale)로 활성 성분과 함께 24시간, 48시간 배양한 후

세포의 크기 변화를 대조군 세포와 비교하여 나타낸 것이다. Fraction D와 함께 배양한 HCT-48 cells의 size peak는 24시간 incubation하는 동안 약 10c.m.에서 major peak를 보이며, 10~70c.m.에 걸쳐서도 세포의

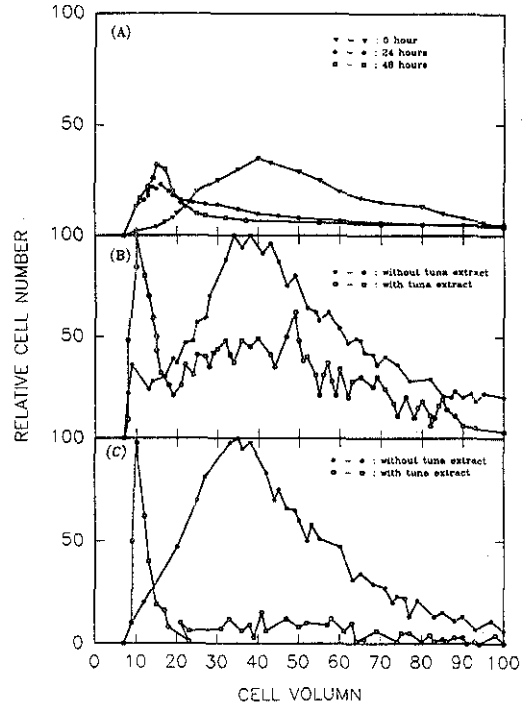


Fig. 11. Size distribution curves of HCT-48 cells incubated with or without tuna extract\*.

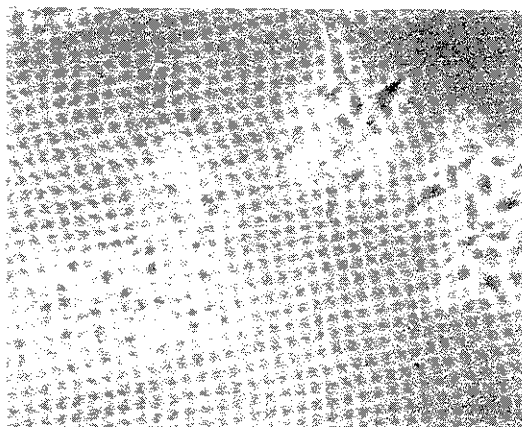
(A) Overall changes of size distribution curves of HCT-48 cells incubated with tuna extract for 0, 24 and 48 hours.

(B) Peaks of size distribution curves of HCT-48 cells incubated with or without tuna extract for 24 hours.

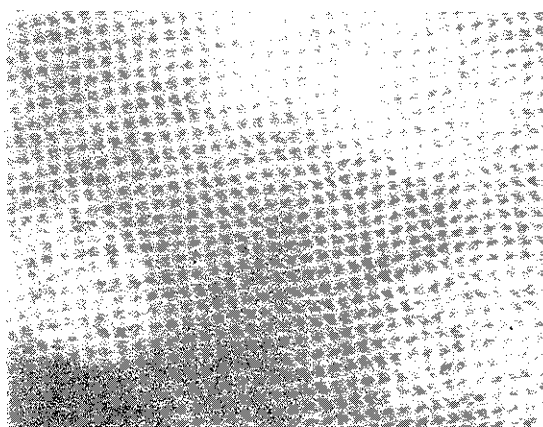
(C) Peaks of size distribution curves of HCT-48 cells incubated with or without tuna extract for 48 hours.

\*Tuna extract : fraction D (100  $\mu$ g/ml)

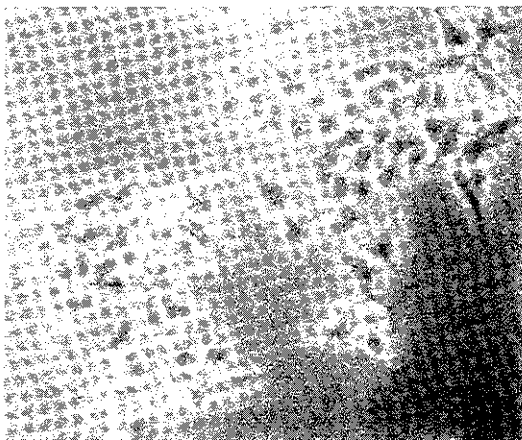
분포를 나타내지만 더욱 시간이 경과한 48시간에는 10 c.m. 부근으로 size peak가 전부 옮겨감을 보였다. 그러나 대조군의 세포는 30~50 c.m.에서 major size peak를 보였다. 따라서 fraction D가 암세포에 작용하여 cell volume이 줄어지며 마침내는 사멸시킴을 알 수 있다.



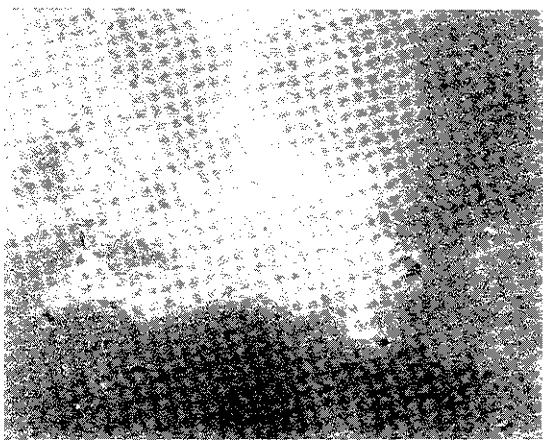
A : Control cells cultured for 24hrs



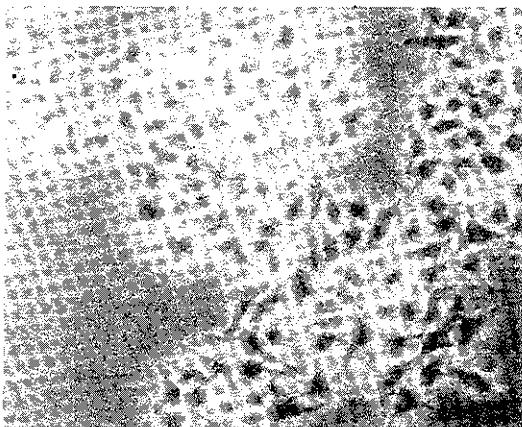
D : treated with 100µg/ml for 24hrs



B : Control cells cultured for 48hrs



E : treated with 100µg/ml for 48hrs



C : Control cells cultured for 72hrs



F : treated with 100µg/ml for 72hrs

**Fig. 10.** Photomicrographs of HCT-48 cells incubated with or without fraction D (100µg/ml) from tuna extract (x200).

참치 추출물중 DHA와 EPA함량 측정

Tuna extract내의 DHA와 EPA의 함량을 알기 위해 여러가지 지방산 standard(C<sub>14-22</sub>) 및 DHA와 EPA로 retention time을 결정한 후 시료를 주입하여 얻은 gas chromatogram의 분석 결과를 Table 4에 나타내었다. Peak no. 3이 24.7%로 가장 많은 양을 차지 하는 C<sub>16:0</sub>의 palmitic 이며 다음으로 peak no. 20인 DHA가 18.8%를 차지하였다. Peak no. 9는 C<sub>18:1</sub>인 oleic acid로서 13.3%로 세번째 많은 지방산이었다. EPA는 peak no. 17로서 3.25%가 포함되어 있었다.

한편 암세포에 대해 증식억제 효과가 있는 fraction D에 대한 gas chromatogram의 분석 결과를 Table 5에 나타내었다. 3개의 major peak가 있는데 DHA나 EPA는 존재하지 않았다.

Table 4. Gas chromatographic analysis\* of tuna crude extract on capillary column

PkNo	Conc	PkNo	Conc	PkNo	Conc
1	3.6615	9	13.3541	17	3.2512
2	1.1592	10	3.315	18	1.5279
3	24.7890	11	1.267	19	1.1264
4	5.8977	12	0.8311	20	18.8777
5	1.2108	13	0.4468	21	4.6258
6	1.5665	14	0.3781	22	0.8731
7	0.832	15	0.7171	23	2.2197
8	6.5188	16	1.5507		
Total	100				

\*GC conditions : See Table 5

Table 5. Gas chromatographic analysis\* of fraction D from tuna extract on capillary column

PkNo	Conc	PkNo	Conc	PkNo	Conc
1	1.1138	6	3.0478	11	1.3939
2	0.7129	7	9.9124	12	0.8222
3	36.142	8	23.3467	13	0.9116
4	4.0568	9	19.9214		
5	0.6561	10	6.9625		
Total	100				

\*GC conditions

Bp-20 (25m x 0.33 $\mu$ m x 0.25 $\mu$ m) Oven temperature : 180 $^{\circ}$ C to 200 $^{\circ}$ C (1 $^{\circ}$ C/min)  
 Detector : FID (range 102, atten. 3) Carrier gas : Helium (0.5Kg/cm<sup>2</sup>)

참치에는 DHA가 많이 포함되어 있는 것으로 알려져 있는데 본 실험의 석유 에틸 추출물에서도 추출물의 18.8%가 DHA로서 기존의 보고와 일치함을 알 수 있다. 그러나 fraction D에는 DHA가 없음에도 암세포에 대해 증식억제효과를 보이는 점으로 보아 DHA와는 다른 항암 활성을 가지는 성분이 존재하는 것으로 생각된다.

Gas Chromatography/Mass spectrometry (GC/MS)

Fig. 12는 Spot 1의 GC를 수행하여 얻은 chromatogram으로서 Spot 1이 7가지 성분이 혼합되어 있음을 보여주고 있다. 7개의 각 peak성분에 대해 mass spectrometry를 수행한 결과를 Fig. 13에 나타내었다. A, B, C, 및 D에 나타난 retention time이 1.472, 2.936, 4.805 및 5.457인 4가지 성분은 library search를 통하여 기존 물질인 tetradecanoic acid(C<sub>14:0</sub>), hexadecanoic acid(C<sub>16:0</sub>), heptadecene-(8)-carbonic acid(1)(C<sub>17:1</sub>) 및 octadecanoic acid(C<sub>18:0</sub>)로 확인 되었다. E, F 및 G에 나타난 retention time이 8.541, 16.614 및 22.485인 물질은 library search를 통해 어떤 물질인지 확인할 수 없었다. 구조가 확인된 4가지 성분은 tuna crude extract의 gas chromatography에서도 많이 존재하는 것으로 확인된 성분들로서, 이들이 활성 성분은 아닐 가능성이 크다. 따라서 확인되지 않은 3가지 성분

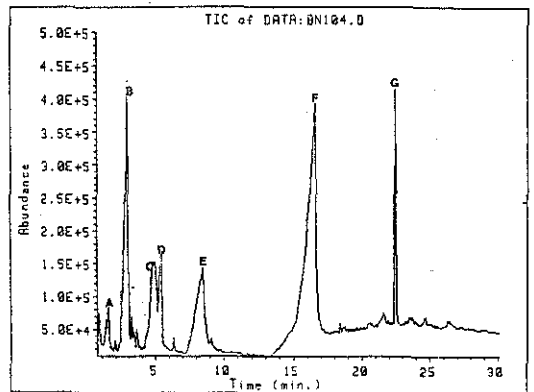


Fig. 12. Gas Chromatogram of tuna extract(Hewlett-Packard 5980 II GC/Hewlett-Packard 5988 MS) : Seven major peaks were detected. GC condition : Column HP-1(10m x 0.33  $\mu$ m x 0.2mm) Det. temp. : 280 $^{\circ}$ C Inj. temp : 300 $^{\circ}$ C Carrier gas : He (1ml/min).  
 \*TIC : Total ion current

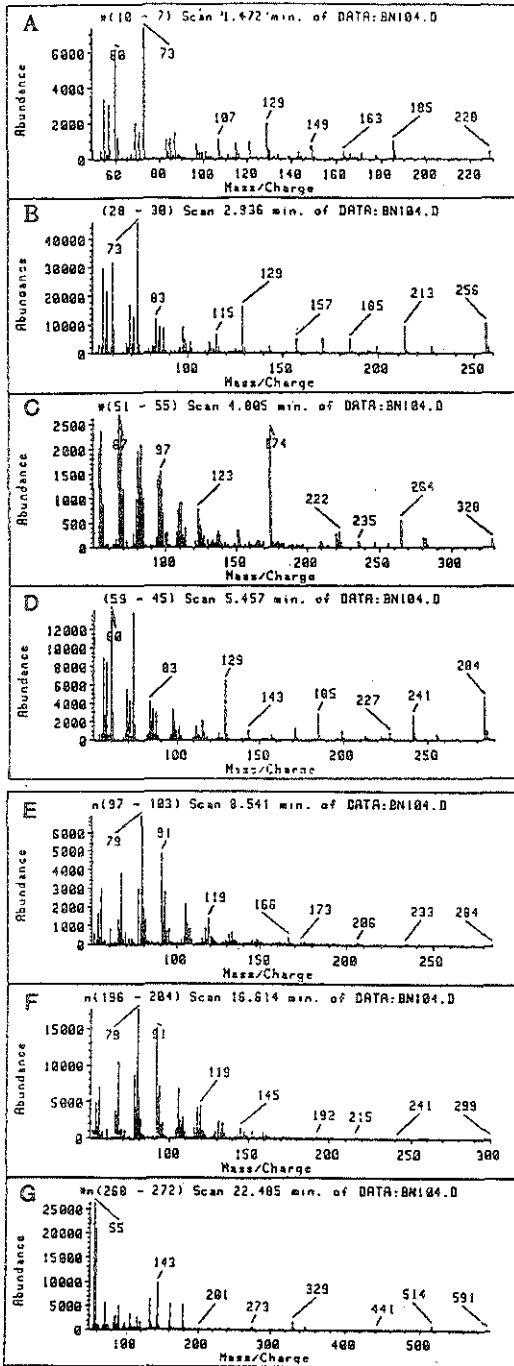


Fig. 13. Mass spectrometric analysis of seven peaks (A, B, C, D, E, F, & G) from gas chromatography of tuna extract.

중에 활성 성분이 있는 것이 아닌가 추측되며, 이를 확인하기 위해서는 시료의 회수가 가능한 HPLC(High Pressure Liquid Chromatography)를 수행하여 각 fraction을 모아서 항암 활성을 측정하고 이중 활성이 있는 성분에 대해 원소 분석, NMR(Nuclear Magnetic Resonance) 및 MS 등을 다시 수행하므로써 그 성분을 규명할 수 있을 것으로 생각된다.

항암 활성의 면역 기전 관련 실험

자연 살해(NK) 세포의 활성에 미치는 영향

대조군, 참치 추출물만 투여한 군, S-180세포만 투여한 군 그리고 참치 추출물과 S-180 세포 모두 투여한 군(S-180과 참치 추출물 동시 투여시의 영향을 보기위함)에서 얻은 NK 세포의 활성을 Table 6에 나타내었다. 다른 모든 실험군이 대조군보다는 약간의 활성 증가를 보이나 의미 있는 활성증가를 볼 수 없었다. 각 group 당 생쥐의 수가 적어 같은 조건의 반복 실험을 하였으나 유사한 결과를 얻었으므로 (data unknown) 참치 추출물이 NK 세포의 활성 증가에는 영향을 주지 않음을 알 수 있었다.

용혈반 형성 세포수에 미치는 영향

Lymphoid cells에 의한 항체 형성능을 알아보기 위해, 아무 처리 하지 않은 대조군과 참치 추출물(fraction D)로 5일간 투여한 군을 T-dependent antigen인 sheep RBC로 생쥐를 감염하여 5일후 splenocytes을 얻어 용혈반 형성 세포수를 측정 한 결과를 Table 7에 나타내었다. 대조군은 spleen cell 10<sup>6</sup>당 40개의 용혈반 형성 세포가 측정되었으나 시험군은 10<sup>6</sup>당 90개로 2배 가량 증가하였다. 이러한 용혈반 형성 세포는 plasma

Table 6. The effect of tuna-extract treatment on natural killer (NK) cells activity of mice

Group	% Cytotoxicity			Mean ± S. E.
	Animal no. 1	2	3	
C(Control group)	1.5	3.2	1.7	2.13±0.53
T(Tuna treated)	5.4	3.3	2.8	3.83±0.79
S(S-180 inoculated)	7.2	6.3	3.7	5.43±1.04
TS(S-180&Tuna treated)	5.0	4.3	4.6	4.63±0.20

S.E.\* : Standard error

**Table 7. Plaque forming cells by spleen of mice treated with tuna extract**

Group	PFC/10 <sup>6</sup> cells of spleen					Mean ± S.E.*
	Animal no.					
	1	2	3	4	5	
Control	47	44	16	54	40	40.2 ± 6.4
Tuna extract treated group	90	87	99	96	80	90.4 ± 3.3

S.E.\* : Standard error

cell로서 이들이 생성한 항체의 secretion에 의해 plaque가 형성된다. 따라서 그 작용 기전은 모르지만 참치 추출물의 투여는 항체 형성 세포수의 증가를 가져 옴을 보였다.

혈청 면역 globulin의 농도에 미치는 영향

Control군은 정상 생쥐 군을 말하여, S군은 sRBC (sheep Red Blood Cell)로 감작된 생쥐 군이고 TS군은 tuna extract로 5일간 복강 주사한 뒤 sSRBC로 감작된 group이다. 각 group의 생쥐로부터 혈청을 얻어 cellulose acetate electrophoresis를 수행하여 혈청 단백질의 조성을 얻은 결과를 Table 8에 정리하였다.

**Table 8. Fraction of serum protein from mice treated with sRBC and tuna**

Fraction	Mean ± S.E.* (Relative %)		
	C group	S group	TS group
Albumin	66.6 ± 1.4	36.3 ± 1.5	44.0 ± 1.8
α <sub>1</sub> -globulin	7.6 ± 0.8	11.7 ± 0.8	7.4 ± 0.5
α <sub>2</sub> -globulin	4.9 ± 0.7	5.8 ± 1.0	5.0 ± 0.6
β-globulin	5.8 ± 0.9	28.5 ± 1.2	24.0 ± 0.7
γ-globulin	6.5 ± 1.1	17.5 ± 2.4	19.5 ± 1.4

\*S. E. : Standard error

C group : Normal animal

S group : Group with sRBC

TS group : Group with tuna ext & sRBC

C군의 albumin의 relative %가 66.6%인데 비해 S군과 TS군은 36.4% 및 44.6%를 보였다. 즉 albumin fraction의 상당한 감소를 가져왔으나, TS군은 S군에 비해 적은 감소를 보였다. 그리고 γ-globulin fraction의 경우는 C군에 비해 S군 및 TS군 모두 현격한 증가를 보였으며 TS군이 S군보다 γ-globulin fraction이 차지하는 %가 높았다. γ-globulin은 여러 종류의 immunoglobulin

으로 구성된 것으로 용혈반 형성 세포수에 미치는 영향에 대한 실험 결과에서 plasma cell수의 증가는 immunoglobulin의 혈청 농도의 증가를 가져올 것이라는 기대와 일치한다고 생각된다.

## 요 약

본 연구는 참치의 석유 에틸 추출물로 부터 항암 효과가 있는 활성 성분을 분리 정제하고, 흰생쥐의 임파모 세포인 L1210 과 P388, 인체 장암세포인 HCT-48, HT-29 및 HRT-18를 대상으로 단계별로 얻어지는 성분의 항암 활성을 측정하고, 그물질의 생체내에서의 작용 기전을 밝히기 위해 여러가지 면역학적 실험을 수행하였다. *In vitro* 배양액에서의 인체 결장암세포인 HCT-48에 대해, crude extract는 배양액 1ml당 60μg 첨가시 증식이 2배로 억제되었으며 (1 unit), 이를 column chromatography 수행하여 얻은 fraction D의 1 unit은 22μg이며, 다시 TLC를 하여 얻은 Spot I의 1 unit은 9μg으로서 정제했을때 277배 증가하였다. Spot I은 GC/MS에 의해 7가지 성분이 섞여있는 혼합물로서 이중 4가지 성분은 C<sub>14</sub>:0, C<sub>16</sub>:0, C<sub>17</sub>:1, 및 C<sub>18</sub>:0인 지방산으로 확인이 되었으며, 나머지 3가지는 지방 성분으로 분자식은 확인되지 않았다. 다른 인체 장암 세포인 HT-29과 HRT-18에 대한 crude extract의 1 unit은 64 μg 및 54μg이었으며 fraction D의 1 unit에 해당하는 양은 두 세포 모두 약 34μg이었다. 또한, 생쥐의 백혈병성 임파모 세포인 L1210과 P388의 경우 crude extract의 1 unit에 해당하는 양은 2~2.5μg이며, fraction D의 경우는 1.2~1.4μg으로서 참치 추출물의 세포 증식 억제력은 백혈병성 임파모세포에서 인체 장암세포보다 높았으며, 암세포의 종류에 따라 효과의 차이가 있었다. 참치 추출물(fraction D)을 첨가한 배양액에서 배양한 HCT-48 세포의 크기 분포도는 배양시간이 경과함에 따라 세포의 크기가 작아지며, 현미경 사진에서 보면 본래의 형태가 위축되거나, 세포의 주위가 흐트러지면서 사멸 현상을 보였다. 참치 석유 에틸 추출물에는 DHA가 18.8%를 차지하며 EPA는 3.25% 포함되어 있었다. 대조군 생쥐에 비해 S-180을 접종한 후 참치 추출물을 투여한 생쥐에서 용혈반 형성 세포수와 혈청 단백질 중 immunoglobulin의 relative %가 현저히 증가되었다. 그러나 비장의 자연 살해 세포의 활성에는 변화를 주지 않았다. 이상의 결과로 보아, 참치의 석유

에틸 추출물중에 *in vitro*에서 인체 장암세포 및 백혈병성 임파모세포의 증식 억제 및 생체내에서 면역 증강 효과를 나타내는 성분이 존재함을 알 수 있다.

## 문 헌

- Carrill, K. K. : Biological effects of fish oils in relation to chronic diseases. *Lipids*, **21**, 732(1986)
- Sanders, T. : Fish and coronary artery disease. *Br. Heart J.*, **57**, 214(1987)
- Kromhout, D. : The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *New Engl. J. Med.*, **312**(19), 1205(1985)
- Phillipson, B. E., Rothrock, D. W., Connor, W. E., Harris, W., Ellingworth, R. : Reduction of plasma lipoprotein and apoprotein by dietary fish oils in patients with hypertriglyceridemia. *New Engl. J. Med.*, **312**(19), 1210(1985)
- Mehta, J. : Eicosapentaenoic acid, its relevance in atherosclerosis and coronary heart disease. *Am. J. Cardiol.*, **59**, 155(1987)
- Hunter, E. : PUFA and eicosanoid research. *JAOCS*, **64**(8), 1088(1987)
- 국민일보 제 754호, 1991. 5. 28.
- Nestel, P. J. : Polyunsaturated fatty acids (n-3, n-6). *Am. J. Clin. Nutr.*, **45** (suppl.), 1161(1987)
- 황우익 : 참치 성분의 항암성 연구 (I)보고서(동원참치 주식회사). p.8(1987)
- 황우익 : 참치 성분의 항암성 연구 (II)보고서(동원참치 주식회사). p.6(1988)
- Fischer, G. A. and Sartorelli, A. G. : Development maintenance and assay of drug resistance. *Meth. Med. Res.*, **10**, 247(1964)
- Bladley, T. R. and Metcalf, D. : The growth mouse bone marrow cell *in vitro*. *Aust. Exp. Biol. Med. Sci.*, **44**, 287(1966)
- Goldburg, E., Nitowsky, H. and Colowick, S. : The role of glycolysis in the growth of tumor cells. *J. Biol. Chem.*, **24**, 2791(1965)
- Isove, N. N., Senn, J. S., III, J. E. and McCulloch, E. A. : Colony formation by normal and leukemic human marrow cells in culture. *Blood*, **37**, 1(1971)
- Hayflick, L. and Moorhead, P. : The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.*, **25**, 585(1961)
- Jwang, W. I., Park, G. H. and Paik, J. M. : Cytotoxic effects of red ginseng extract against murine leukemic cells. *Korean J. Biochem.*, **19**, 15(1987)
- 김교식, 백정미, 황우익 : 국산 항암성 생약제로부터 항암 성분의 추출 및 그의 항암 활성 측정. *고대의대 논문집*, **25**, 759(1988)
- Kuksis, A. : Lipid chromatographic analysis. Dekker Inc., **1**, 239(1967)
- Kates, M. : Techniques of lipidology. North-Holland Publishing Company. p.431(1972)
- Marinette, G. V. : New biochemical separations, Van Nostrand, Princeton, N. J., p.339(1964)
- Walter, W., Wolfgang, S., Hans-jorg, L. and Ernst, M. : Rapid analysis of non-esterified fatty acid as methyl esters from different biological specimens by gas chromatography after one-step esterification. *J. Chrom.*, **526**, 320(1990)
- Haward, D. E., Theodor, B. and Jean, C. C. : Methods in enzymology. Academic Press, Inc. p.132, 440(1986)
- Garvey, J. S., Cremer, N. E. and Sussdorf, D. H. : PF-CL methods in immunology, 3rd ed., p.411(1983)
- Weir, D. M. : Handbook of experimental immunology, 3rd ed., p.28(1979)
- Fanci, A. S. and Pratt, K. R. : Activation of human B lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **144**, 674(1976)
- 서덕재 : 혈청 단백질분획상, 대학서림. p.48(1982)  
(1992년 6월 9일 접수)