

Effect of Dietary Chlorella Complex on Anticancer Activity in Mice

Jae-Hak Jung, Kyong-Suk Jin, Yong-Ho Kim and Yong-Woo Lee[†]

Department of Biomedical Laboratory Science, Inje University, Gimhae 621-749, Korea

Dietary chlorella has known as one of the best candidates for development of multifunctional probiotic foods owing to an excellent nutritional value such as high amount of proteins and various, valuable fatty acids. So many efforts were devoted to studying the chlorella as therapeutic agents or foods fighting against many diseases in the aged people such as cardiovascular diseases and cancers. In this study, we investigated sizes and weights of tumors derived from mice injected subcutaneously with tumorigenic cells to see if antitumor activity would be found in mice dieted with the chlorella complex. After BALB/c mice were dieted with 5% organic cultured chlorella complex diet throughout for 19 weeks, the fibrosarcoma was induced by subcutaneous injection of tumorigenic cells at the 3 weeks before sacrifice. The average weight of tumors in the diet group were significantly reduced to 60% ($P=0.012$) of the one in control group, indicating that diet with the chlorella complex may have anticancer activity in mice. When the mice were dieted with 5% organic cultured chlorella complex for 4 weeks before injecting the tumorigenic cells in order to see tumor-preventive effect of the diet, the potential preventive activity of the diet against cancer was implicated by the observation that the tumors were greatly reduced in the diet group to 37% ($P=0.144$) of the control group. Especially, when the 5% diet were applied to mice after injecting with the tumorigenic cells, the tumors derived from the 5% diet group were also decreased to 95% ($P=0.002$) of those in the control group, suggesting that the diet with the organic cultured chlorella complex may also have therapeutic effect against tumor formation. As results, it was shown that the chlorella complex tested in this study had preventive and therapeutic effects on fighting against tumorigenesis. Therefore, the identification and further mechanistic study of the components which may be associated with antitumor activity from diet of the chlorella complex in the future will contribute to the development of anticancer probiotic foods, alternative therapeutic treatment against cancer, and a new anticancer drug.

Key Words: Chlorella, Diet, Tumorigenesis, Anticancer activity

서 론

통계청 발표에 의하면 2003년도 국내 주요 사망 원인별 사망률 중 암에 의한 사망률은 25.9%로 전체 사망 원인 중 가장 높은 비중을 차지하고 있다. 이러한 암 발생의 70~90%는 환경적 요인에 의해 기인하며 이 가운데 35%가 식생활과 관련이 있는데, 특히 육류 및 지방의 섭취가 많고 곡류, 과일류 및 야채류의 섭취가 적은 식습관은 장암 및 유방암을 포함한 여러 부위의 암 발생에 영향을 미치는 주요인자로 보고되고 있다 (Amstrong and Doll, 1975). 이에 따라 식습관과

관련된 암 발생률에 대한 연구 가운데 식물성 식품의 섭취가 암 발생 예방과 관련이 깊을 것으로 연구되고 있으며, 이러한 추세에 부각된 대표적인 건강 기능성 식품소재라 할 수 있는 클로렐라 (chlorella)의 생리활성 기능에 관심이 집중되고 있다.

클로렐라는 단백질 (52%), 탄수화물 (23%), 지질 (9%), 수분 (5%), 회분 (3%) 등으로 구성되어 있으며, 인 (P), 칼슘 (Ca), 마그네슘 (Mg), 철 (Fe), 구리 (Cu), 아연 (Zn) 등의 다양한 미네랄과 이노시톨, 나이아신, 아스코르빈산, 케로틴, 피리독신 등의 비타민이 함유되어 있고, 필수 아미노산의 조성이 좋은 것으로 밝혀졌다 (Robert, 1985). 또한 배양조건에 따라 구성성분의 생리적 변화로 지방 80%, 단백질 90%, 탄수화물은 37%까지 높일 수 있는 특징을 가지고 있다. 최근에는 클로렐라가 함유하고 있는 성분 중 생리활성물질 (Yasukawa et al., 1996; Hasegawa et al., 1997) 항암성분 (Morimoto et al., 1995; Noda et al., 1996) 항감염성분 (Ibusuki et al., 1990;

*논문 접수: 2005년 5월 25일

수정재접수: 2005년 6월 25일

[†]교신저자: 이용우, (우) 621-749 경남 김해시 어방동 607번지,

인제대학교 의생명공학대학 임상병리학과

Tel: 055-320-3307, Fax: 055-334-3426

e-mail: mlsywllee@inje.ac.kr

Konish et al., 1990), 성인병 예방 및 치료물질 (Okamoto et al., 1978; Sato et al., 1988), 그리고 항자외선 물질 (Chang et al., 1996) 등 다양한 효능 연구와 함께 그 유효성분들의 분리와 활용에 대한 연구가 활발하다. 클로렐라의 여러 생리활성능 중 항암활성에 관한 연구가 최근 많이 진행되고 있으나 이들은 대개 클로렐라 자체의 활성능 또는 그것의 열수 추출물에 의한 간접적인 면역활성 및 항암활성에 관한 연구가 대부분이었다. 그래서 본 실험에서는 일반적인 담수 배양방식이 아닌 유기성분이 함유된 배지에서 배양된 클로렐라에 효소와 곡물의 배아 등을 첨가하여 제조한 복합체 형식의 클로렐라를 이용해서 항암활성능을 알아보고자 하였다. 이를 위해서 실험동물에 암을 유발할 수 있는 발암세포를 이식하여 여기서 생성된 종양의 직접적인 발암억제 효과와 암 성장억제 효과를 알아보고 나아가 암 발생의 예방과 치료를 위한 대체 의약적 접근, 건강보조식품소재로서의 가능성을 모색하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포 배양

BALB/c mouse에 subcutaneous fibrosarcoma를 유발하기 위하여 사용된 발암세포주인 EJ-6-2Bam-6a (ATCC, CRL-1888)를 10% FBS (fetal bovine serum, Gibco BRL.), 1% penicillin-streptomycin (Gibco BRL.), 200 mM L-glutamine (Gibco BRL.), 4.5 g/l glucose가 첨가된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco BRL.)을 배지로 하여 5% CO₂, 37°C에서 배양하여 사용하였다 (Shih et al., 1981).

2. 실험동물의 사육

(주)대한실험동물센터에서 4주령 inbred BALB/c 수컷 mouse를 구입하여 사용하였다. 사육환경은 온도 22±1°C, 습도 55±10%로 유지하고 조명은 오전 7시부터 12시간 간격으로 소등과 점등을 반복하였다. 실험동물은 실험목적에 따라 polypropylene cage 내에 3~6마리씩 분리 수용하여 본 실험을 위한 사육을 실시하였다. 표준식은 부상용 pellet 형태로 단백질 21.1% 이상, 지방질 3.5% 이상, 섬유질 5.0% 이하, 회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상의 조성 비율로 제조된 표준고형사료 (삼양유지사료 Co.)를 매일 일정한 시간에 공급하면서 일주일 이상 건강 관찰 및 예비사육 후 본 연구를 위한 사육을 시작하였다. 실험군의 식이는 표준식이와 농도별로 클로렐라 복합체 분말을 혼합하여 전분과 멸균수를 이용하여 표준식이의 부상용 pellet 형태로 제조한 다음 60°C에서 3~4시간 건조 후 식이 전까지 ice box에 넣어 실온 보관하였다. 식이의 섭취량 및 체중은 일정한 조건 하에서 매주 1회 측정하였으며, 발암세포 피하주사 후

의 종양의 최초 생성은 측지를 통하여 관찰하였다.

3. 클로렐라 복합체의 열수 추출물 제조

실험에 사용된 클로렐라 복합체는 한국클로렐라 사 (경남 김해시 진례면 담안리)로부터 공급받아 열수 추출물의 제조나 실험동물 diet에 첨가제로 사용하였다. 클로렐라 복합체의 열수 추출물 (chlorella complex extract; 이하 CCE)에 대한 발암세포의 세포성장 억제효과를 평가하기 위해 전보에서 수행된 방법 (Takashi et al., 1995)에 약간의 수정을 가하여 다음과 같이 제조하여 사용하였다.

먼저 멸균수 100 ml에 클로렐라 복합체 분말 1 g을 섞은 후 30% power의 microwave (PROLABO, SOXWAVE 3.6 M)를 이용하여 100°C에서 30분간 끓이고, 상층액만을 취하여 4°C에서 5,000 xg로 10분간 원심분리하여 나온 상층액의 1/3을 취하여 증발시켜 10배로 농축하여 고압증기멸균 후 실험 전까지 4°C에서 보관하였다.

4. 발암세포에 대한 세포성장 억제효과 평가

발암세포에 대한 CCE의 세포성장 억제효과를 평가하기 위해 조직 배양용 plate의 well 당 1×10⁵의 발암세포를 seeding한 후 각각의 well에 0, 10, 20, 40, 80, 160 μl의 CCE를 처리하였다. 추출액 처리 1, 3, 5일 후 멸균 PBS (phosphate buffered saline)로 세척하여 CCE를 제거한 다음 다시 배양배지를 첨가하여 배양하였다. 그 후 주어진 시간마다 0.25% trypsin-EDTA (Gibco BRL.)를 처리하여 37°C에서 5분간 incubation하고 10% FBS가 첨가된 배양배지로 trypsin을 비활성화 시킨 후 분주하여 세포부유액을 만든 다음 15 ml centrifuge tube에 옮겼다. 이 cell suspension을 hemacytometer (Neuauer, BRAND)를 이용하여 발암세포수를 측정함으로써 세포성장 억제효과를 평가하였다.

5. 암세포 피하이식과 발암세포 최소 접종량 결정

먼저 본 실험의 클로렐라 복합체 식이에 의한 항암활성을 평가를 위해 실험동물에서 종양을 생성할 수 있는 발암세포 CRL-1888의 최소 접종량을 결정하였다. 이를 위해 체중 25~26 g의 10주령 inbred mouse인 수컷 BALB/c mouse 32마리를 각각 3~5마리씩 나누어 2×10³, 2×10⁴, 2×10⁵, 1×10⁶, 2×10⁶, 3×10⁶, 1×10⁷, 2×10⁷ 농도의 발암세포를 실험동물의 좌우측면에 피하주사 하였다. 발암세포 주사 후 3주에서 10주간 사육하면서 실험동물에서 종양이 촉진되는 최초 시기와 각 군 간의 종양 생성 최초 시기를 비교하여 실험동물에 피하이식 할 수 있는 발암세포의 최소 접종량을 결정하였다.

6. 종양의 조직병리학적 평가

실험동물에 생성된 종양이 피하주사된 배양세포로부터 유

래된 것임을 확인하기 위해 조직병리학적 분석을 수행하였다. 이를 위해 먼저 종양을 실험동물에서 채취하여 10% 인산염 완충 중성 formalin으로 고정하고 자동 조직과정 처리기 (Shandon Citadel 2000)로 알콜 탈수과정과 투명, 파라핀 침투, 포매과정을 거쳐 회전형 박절기로 4 μm 두께의 절편을 얻었다. 이것을 45°C 부유온수조에서 주름을 편 후 60°C 신진기에서 탈 파라핀 후, 전반적인 조직성분을 관찰하기 위해 퇴행성 염색법인 Harris Hematoxylin & Eosin 염색 (이하 H & E 염색)과 종양세포의 발생학적 기원을 분별하기 위해 Masson's trichrome 염색 (이하 MT 염색)을 실시하였다.

7. 클로렐라 복합체 식이의 항암활성 평가

체중 18~20 g의 4주령 inbred mouse인 수컷 BALB/c mouse 16마리를 이용하여 각각 정상식이 대조군 (0%)과 5% 클로렐라 복합체 식이군으로 나누어 12주간 식이를 실시하였다. 식이 종료 4주전 발암세포주인 CRL-1888을 2×10^6 농도로 실험동물의 좌우측면에 피하주사하고 식이 종료 때까지 실험동물에 생성되는 종양을 관찰하였다. 이와 동시에 클로렐라 복합체 식이 기간에 따른 변화를 관찰하기 위해 실험동물 4마리를 사용하여 각각 대조군 (0%)과 5% 클로렐라 복합체 식이군으로 나누어 19주간 식이를 실시하였다. 식이 종료 3주전 발암세포주인 CRL-1888 [2×10^6 cells]을 실험동물의 좌우측면에 피하주사하고 식이 종료 때까지 실험동물에 생성되는 종양의 무게를 측정하였다.

실험동물의 종양 생성에 있어 클로렐라 복합체 사전 섭취에 의한 예방적 항암활성을 알아보기 위해 체중 18~20 g의 4주령 BALB/c 수컷 mouse 9마리를 3개 군으로 나누어 정상식이 대조군 (0%)과 클로렐라 복합체가 2.5%, 5.0% 함유되어 있는 식이를 4주간 실시하였다. 4주 식이가 끝난 다음 발암세포 CRL-1888 (2×10^6)을 각각 실험동물의 좌우측면에 피하주사 후 3주간 모든 군에 정상식이를 실시하면서 실험동물에 생성된 종양의 최초 촉진 시기와 무게를 측정하였다.

실험동물의 종양 생성 후 종양의 증식억제에 있어 클로렐라 복합체 사후 섭취에 의한 치료적 항암활성을 알아보기 위해 발암세포주인 CRL-1888 (2×10^6)을 체중 24~26 g의 12주령 BALB/c 수컷 mouse 9마리에 각각 좌우측면에 피하주사 하였다. 그 후 1 주간 정상식이를 실시하고 클로렐라 복합체가 0%, 2.5%, 5.0% 함유되어 있는 식이를 2주간 실시하면서, 생성된 종양의 최초 촉진 시기와 무게를 측정하였다. 또한 26주령의 BALB/c mouse 사용하여 각각 정상식이 대조군 (0%) 5마리와 5% 클로렐라 복합체 식이군 10마리로 나누어 발암세포를 실험동물의 좌우측면에 피하주사 하고, 주사 후 4주간 실험식이를 실시하였다. 최종 실험식이 후 실험동물에 형성된 종양의 최초 촉진 시기와 무게를 측정하였다.

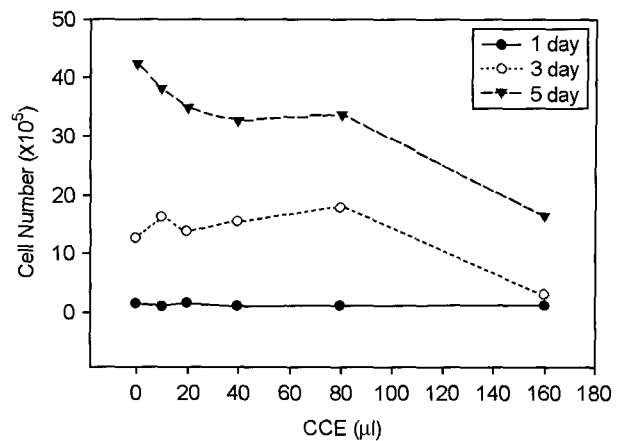


Fig. 1. Effect of the hot-water extract fraction from chlorella complex on the growth of tumorigenic cells. CRL-1888 cells were plated in 6 well culture dish at cell density of 1×10^5 cells/well. Then the cells were further cultured in the presence of various volumes of the extract fraction for 1, 3, 5 day. Cell numbers in each well were trypsinized and counted by using hemacytometer.

결 과

1. 클로렐라 복합체 열수 추출물의 발암세포에 대한 세포 성장 억제효과

클로렐라 복합체 열수추출물 (이하 CCE, chlorella complex extract)의 발암세포에 대한 세포성장 억제효과를 평가하기 위해 조직 배양용 6-well plate의 well 당 1×10^5 의 발암세포를 seeding한 후 각각의 well에 0, 10, 20, 40, 80, 160 μl 의 CCE를 가하여 1, 3, 5일 후 발암세포수를 측정하였다. 이 결과 1일간 처리하였을 때는 CCE 농도에 관계없이 세포성장에서의 영향을 미치지 않았고, 3일간 처리한 경우는 무처리 대조군 (12.7×10^5 cells)과 비교하여 10, 20, 40, 80 μl 처리군까지는 각각 약 28, 9, 21, 42%의 세포 증식율을 기록하였고, 160 μl 처리군에서는 3.0×10^5 cells 약 76% 감소되었다. 5일간 처리한 경우에는 무처리 대조군 (42.4×10^5 cells)과 비교하여 각각 10, 18, 23, 20% 세포성장률이 감소하였고, 160 μl 처리군에서도 약 61% 감소하여 CCE가 CRL-1888 발암세포에 대해 직접적인 성장억제효과가 있음을 알 수 있었다 (Fig. 1).

2. 배양 암세포의 종양 생성 최소 접종량 결정

실험동물의 피하에 종양을 생성할 수 있는 배양 발암세포의 최소 피하 접종량을 결정하기 위해 실험동물의 좌우측면에 발암세포를 농도별 (2×10^3 , 2×10^4 , 2×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7)로 피하주사 후 종양 생성유무를 촉진 관찰하였다. 이 실험 조건에서 주사 후 6일째에 2×10^7 군과 1×10^7 군에서 최초로 종양 생성이 촉진 되었다. 이 때 양쪽

Table 1. Determination of minimum inoculation size of tumorigenic, cultured cells for tumor formation in mice by subcutaneous injection

Inoculum size (cell number)	2×10^3	2×10^4	2×10^5	1×10^6	2×10^6	3×10^6	1×10^7	2×10^7
Number of mice	5	5	5	5	3	3	3	3
The first palpation time ¹	-	-	-	-	13	12	6	6
Tumor formation	No	No	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes
Survival period ²	65	65	65	65	38~44	34~40	28~30	28~30

¹. The day when tumor formation at one lateral side of mouse can be recognized by palpation after subcutaneous injection (days)

². The period while mice can survive from the subcutaneous injection of cultured tumorigenic cells (days)

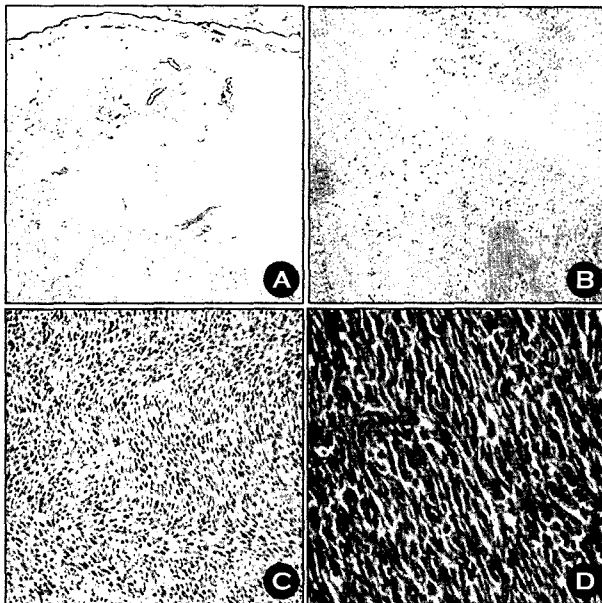


Fig. 2. Hematoxylin & Eosin and Masson's trichrome stain of neoplasia induced by subcutaneous injection of the tumorigenic cells in BALB/c mouse. **A**, round nodular mass lesion is noted beneath intact skin (H & E stain, $\times 10$); **B**, marked coagulative necrosis in center of lesion (H & E stain, $\times 10$); **C**, fibrosarcoma showing distinct fascicular arrangement of fibroblasts, herringbone pattern (H & E stain, $\times 200$); **D**, abundant fibers with blue color stained by anillin blue (MT stain, $\times 400$).

군 모두 3마리 중 1 마리씩 좌우측면 축지가 되었고, 2마리는 오른쪽 면만 축지가 되어 이틀 후 개체 모두 양쪽에서 종양이 축지가 되어 좌우측면의 종양 생성 시기에 약간의 차이를 보였다. 종양이 생성된 mouse는 종양세포 주사 28~30일 후 모두 사망하였다 (unpublished observation). 3×10^6 군과 2×10^6 군에서는 주사 후 각각 12일째와 13일째 좌우 양쪽 모두 종양이 축지 되었으며, 주사 후 각각 34~40일과, 38~44일 후 모두 사망하였다. 반면, 1×10^6 , 2×10^5 , 2×10^4 , 2×10^3 군은 종양세포 주사 후 65일간 관찰하였으나 종양의 생성은 관찰할 수 없었다 (Table 1). 이로써 본 연구에서는 발암세포 CRL-1888의 실험동물 최소 피하 접종량은 좌우측면 각각 2×10^6 cells을 주사하여 실험을 수행하였다.

Table 2. Effect of dietary chlorella complex on tumor formation by mice age

Age	Tumor weight (g)		Relative size (%)
	Normal diet (min.~ max.)	5% CC diet ^a (min.~ max.)	
4-week-old [n=16]	2.79 ± 1.81 (0.16~8.36)	1.68 ± 1.69 (0.07~5.69)	60
20-week-old [n=4]	0.82 ± 0.18 (0.58~0.99)	0.33 ± 0.06 (0.29~0.43)	40

a. Chlorella complex diet

3. 종양의 조직병리학적 평가

발암세포의 피하접종에 의해 실험동물 mouse에 생성된 신생물의 일반적인 조직성분과 발생학적 기원을 분별하기 위해 H & E 염색과 MT 염색을 실시하였다. 이 결과 중심부로 갈수록 핵의 피사율이 높아짐을 볼 수 있으며, 핵막의 표면은 일정치 않고, 정형화된 모습이 아닌 돌출상, 주름상 등의 불규칙적인 모습을 보였다. 세포질 또한 악성 종양의 일반적인 특징인 간엽세포의 형태를 보였으며, 진피의 경계 부위에는 혈관이 풍부하게 존재하며, 이 혈관 주위의 종양 세포들은 피사되지 않고 핵 내 chromatin의 condensation이 많은 것으로 보아 분화가 왕성한 것으로 관찰되었다. 또한 악성 종양 세포의 일반적인 특징을 관찰할 수 있었으며, fibrosarcoma의 특이적 형태인 Herringbone-pattern을 관찰할 수 있었고, 질병으로 인한 조직 변화 시 근섬유와 교원섬유와의 구별을 위해 MT 염색을 실시한 결과 anillin blue에 의해 청색으로 염색된 풍부한 fiber를 관찰할 수 있었다 (Fig. 2). 종합적으로 실험에서 발생된 종양은 발암성 세포주 CRL-1888 배양세포의 기원임을 확인 할 수 있었다.

4. 클로렐라 복합체 식이가 종양 발생과 크기에 미치는 영향

클로렐라 복합체를 16~22주간 식이 하였을 때 대상 mice의 연령별 피하종양 생성 수와 크기를 Table 2에 요약하였다. 먼저 4주령 수컷 BALB/c mouse를 12주간 각각 정상식이 대조군 (0%)과 5% 클로렐라 복합체 식이를 실시한 후 발

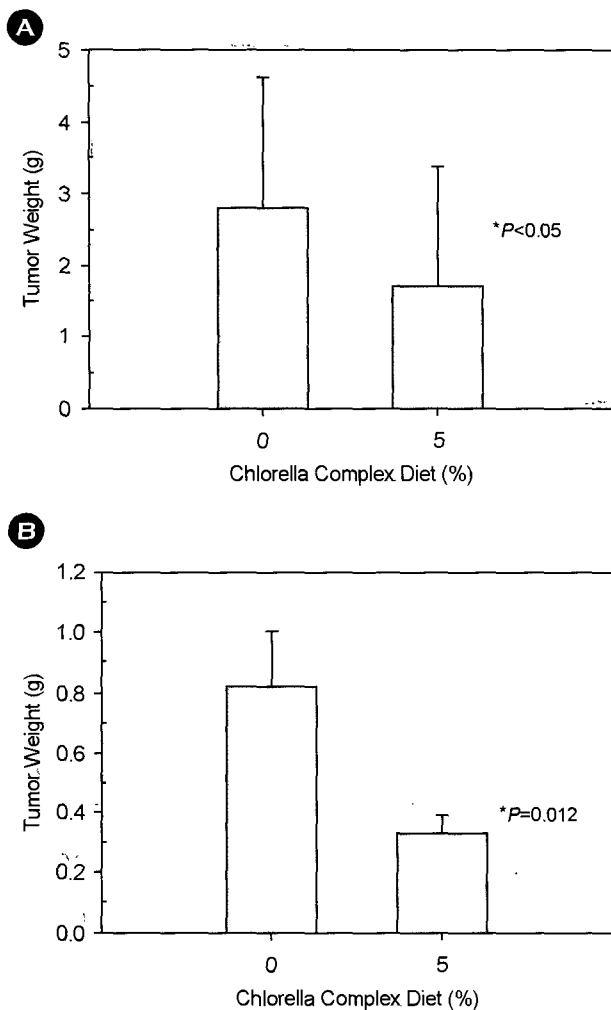


Fig. 3. Effect of chlorella complex diet on tumor formation in mice. (A) Four-week-old, male BALB/c mice had supplemented diet with 5% chlorella complex (w/w) for 12 weeks. Following subcutaneous injection of the tumorigenic cells, and the mice were further raised for 4 weeks with the same diet. The asterisk indicates the statistical significance ($P < 0.05$) as compared with the value of normal dieted group by Mann-Whitney Rank Sum test ($n=16$). (B) Twenty-week-old, male BALB/c mice were raised with given diets for 19 weeks. Following subcutaneous injection of the tumorigenic cells, and the mice were further raised for 3 weeks before sacrifice. The asterisk indicates the statistical significance ($P=0.012$) as compared with the value of normal dieted group by student's t-test ($n=4$).

암세포를 실험동물의 좌우측면에 피하주사하고, 같은 식이로 4주간 사육하였을 때 mice에 생성된 종양의 수와 무게 변화를 관찰하였다. 이 결과 두군 모두에서 다양한 크기의 종양 생성이 확인 되었으며, 정상식이 대조군의 종양의 무게는 최소 0.61 g에서 최대 8.36 g이었고 그 평균값은 2.79 g이었다. 또한 5% 클로렐라 복합체 식이군은 최소 0.07 g에서 최대 5.69 g이었으며 그 평균값이 1.68 g이었다. 따라서 이러한 평균 종양의 무게를 단순하게 비교해 보면 대조군에 비해 5%

클로렐라 복합체 식이군에서는 60% 정도로 나타나 클로렐라 식이가 종양크기를 약 40% ($P < 0.05$) 감소시킨 결과를 보였다 (Fig. 3A).

이와 동시에 20주령 수컷 BALB/c mouse를 각각 정상식이 대조군 (0%)과 5% 클로렐라 복합체 식이를 19주간 실시한 후 최소발암 접종량의 배양 발암세포를 mouse의 좌우측면에 피하주사하고, 같은 식이로 3주간 더 사육하여 생성된 종양의 수와 무게를 관찰하였다. 이 결과 역시 두 군 모두에서 종양이 생성되었음을 확인하였고, 정상식이 대조군의 종양의 무게는 최소 0.58 g에서 최대 0.99 g이었고 그 평균값은 0.82 g이었다. 또한 5% 클로렐라 복합체 식이군은 최소 0.29 g에서 최대 0.43 g이었으며 그 평균값이 0.33 g이었다. 따라서 이러한 평균 종양의 무게를 단순하게 비교해 보면 대조군에 비해 5% 클로렐라 복합체 식이군에서는 40% 정도로 나타나 클로렐라 식이가 종양크기를 약 60% ($P=0.012$) 감소시킨 결과를 보였다 (Fig. 3B).

5. 클로렐라 복합체의 식이 시기가 종양 형성에 미치는 영향

배양 발암세포 이식을 기준으로 한 클로렐라 복합체의 식이 식이별 피하종양 형성과 크기를 Table 3에 요약하였다. 먼저 클로렐라 복합체 섭취에 의한 항암활성의 예방적 측면을 알아보기 위해, 4주령 수컷 BALB/c mouse에 발암세포 이식 전, 정상식이 (0%)와 클로렐라 복합체 2.5% 또는 5.0%를 함유한 식이로 4주간 사육하였다. 그리고 최소 발암 접종량을 주사한 후 정상식이 대조군과 실험군 모두 정상식이로 3주간 더 사육하였다. Mouse에 형성된 종양의 최초 측정 시기와 무게를 측정한 결과, 발암세포 주사 9일 후 정상식이 대조군과 실험군 모두에서 좌우측면에 종양이 측지가 되어 최초 발생 시기에는 차이가 없었다. 그러나 측지 되는 종양의 크기는 실험군 모두가 대조군 보다 작았으며, 종양세포 주사 11일 이후 측지되는 종양의 크기가 2.5% 군이나 5.0% 군이 대조군보다 훨씬 작았다. 식이 종료 후 실험동물에 생성된 종양의 무게는 대조군에서 평균 0.86 g임에 반해 2.5% 클로렐라 복합체 식이 2.5% 군이 평균 0.67 g, 5.0% 군은 0.54 g을 보여 대조군에 비해 각각 78%와 63%의 크기에 해당하였다 (Fig. 4).

다음은 클로렐라 복합체 섭취에 의한 항암활성의 치료적 측면을 알아보기 위해, 12주령이나 26주령의 BALB/c mouse에 발암세포 피하주사 후 1주간 정상식이를 하였다. 이후 각각 정상식이 대조군 (0%)과 2.5% 또는 5.0%의 클로렐라 복합체를 섭취하는 실험군으로 나누어 2주간 실험군별 식이를 실시한 후 실험동물에 형성된 종양의 최초 측정 시기와 무게를 측정하였다. 이 결과 발암세포 주사 7일 후 정상식이 대조군 3마리 모두 좌우측면에 종양이 측지 되었으며, 2.5% 군

Table 3. Effect of dietary chlorella complex on tumor formation by supplementation time

Supplement time	Age	Tumor weight (g)			Relative size (2.5% / 5%)
		Normal diet (min. ~ max.)	2.5% CC diet ^a (min. ~ max.)	5% CC diet ^a (min ~ max.)	
pre-	4-week-old [n=6]	0.86±0.41 (0.49~1.65)	0.67±0.19 (0.38~0.96)	0.54±0.28 (0.20~0.91)	78/63
	12-week-old [n=6]	1.58±0.91 (0.47~2.69)	0.41±0.47 (0~1.15)	0.08±0.06 (0.02~0.18)	
post-	26-week-old [n=10/20] ^b	2.12±1.02 (0.37~4.33)	ND ^c	1.09±0.73 (0.05~2.30)	ND ^c /51

a. Chlorella complex diet, b. The number of tumors in control and chlorella complex diet groups are 10 and 20 respectively. c. Not done

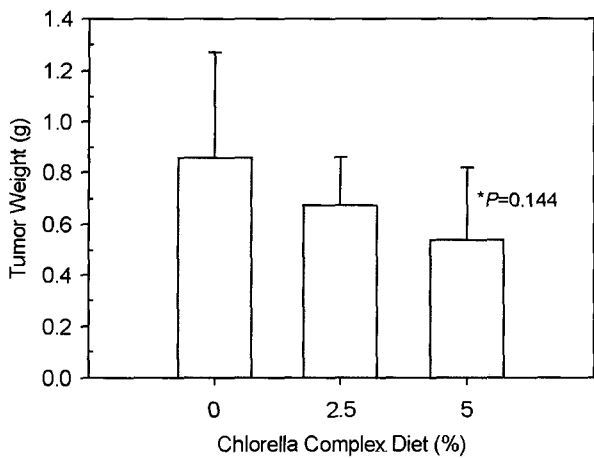


Fig. 4. Effect of pre-supplementary diet of chlorella complex on tumor formation in mice. Tumors were introduced in four week-old, male BALB/c mice by subcutaneous injection of the tumorigenic cells following diet for 4 weeks with solid chows containing 2.5% and 5.0%, chlorella complex (w/w), and the mice were further given normal diet for 3 weeks thereafter. The asterisk indicates the statistical significance ($P=0.144$) as compared with the value of normal dieted group by Mann-Whitney Rank Sum test ($n=6$).

에서는 종양 축지의 의심이 되었으며, 그 외의 실험군은 축지가 되지 않았다. 주사 9일 후의 2.5% 군에서 축지가 되었으며 5.0% 군은 종양 축지의 의심이 되었다. 주사 15일 후 모든 군에서 종양이 축지 되었으며 주사 19일 후에 5.0% 군의 축지되는 종양의 크기는 대조군의 그것보다 50% 이상 감소되어 축지 되었다. 2주간의 실험식이 종료 후 생성된 종양의 무게는 대조군에서 평균 1.58 g 임에 반해 클로렐라 복합체 2.5% 식이군은 0.41 g, 5.0% 식이군에서는 0.08 g을 보여 대조군 대비 각각 약 26%, 5%의 크기를 보였으며 5% 식이군이 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 차이 ($P=0.002$)를 보였다. 종양무게의 감소에 있어 2주간의 5.0% 클로렐라 복합체 식이군에서 가장 큰 감소를 보여 적절한 클로렐라 복합체의 식이가 암치료에 효과적인 가능성을 보였다 (Fig. 5B).

이와 더불어 26주령의 BALB/c mouse의 경우는 클로렐라

식이의 종양 치료적 효과를 좀 더 자세히 관찰하기 위해 발암세포 피하주사 직후 4주 동안 각 실험군에 따른 식이로 사육하였다. 이 때 종양의 최초 축지는 대조군과 실험군 모두 주사 6일째 있었으며, 주사 13일째 되는 날부터 대조군과 실험군의 축지되는 종양의 크기가 차이 났다. 대조군에서는 모두 좌우측면의 종양이 정형화되었고 실험군의 종양보다는 그 크기가 컸다. 4주간의 실험식이 종료 후 실험동물에 생성된 종양의 무게는 대조군에서 평균 2.12 g 임에 반해, 5% 클로렐라 복합체 식이군에서는 1.09 g을 보여 대조군의 51% 크기에 해당되며 두 군간의 통계적으로 유의한 차이를 보였다 ($P=0.004$)의 감소를 보였다 (Fig. 5C).

고 찰

클로렐라의 유용한 구성성분 중 glycoprotein-rich extract는 potent biological modifier (BRM)로서, *Chlorella vulgaris*의 열수 추출물이 미생물 감염에 대한 숙주 방어를 증가시키는 작용이 있다고 보고되었으며 (Ibusuki and Minamijima, 1990; Hasegawa et al., 1995), 실험적으로 종양을 유도한 실험동물에 대해서도 종양내부 주입이 T 세포 매개성 면역능을 증가시킨 항암활성이 관찰되었다 (Tanaka et al., 1998). 이에 nude mouse에 종양 생성능이 있는 CCL-1888 세포주를 BALB/c mouse의 피하부위에 주사하였을 때 종양이 생성된다는 점을 이용하여 클로렐라 복합체 (chlorella complex; 이하 CC)의 식이가 주사된 세포로부터 종양 형성능을 조사하여 클로렐라 복합체의 항암활성을 알아보고자 하였다.

CC의 식이 기간이 발암세포 피하주사에 의해 mouse에 생성되는 종양 생성능에 미치는 영향에 대해 조사한 결과, 4주령 mice의 경우, 19주간의 CC 식이가 12주간의 CC 식이에 비해 생성된 종양 무게의 평균이 40% 감소됨을 보여주었고 20주령의 경우는 60%가 감소됨을 보여주어 CC 식이가 피하에 생성되는 섬유육종에 대해 항암효과가 있음을 암시하였으며 (Table 2), 4주령 보다 20주령의 mice에서 그 항암효과가 월등하고 적은 편차를 보여 체내 호르몬 수준과 관련이 깊은

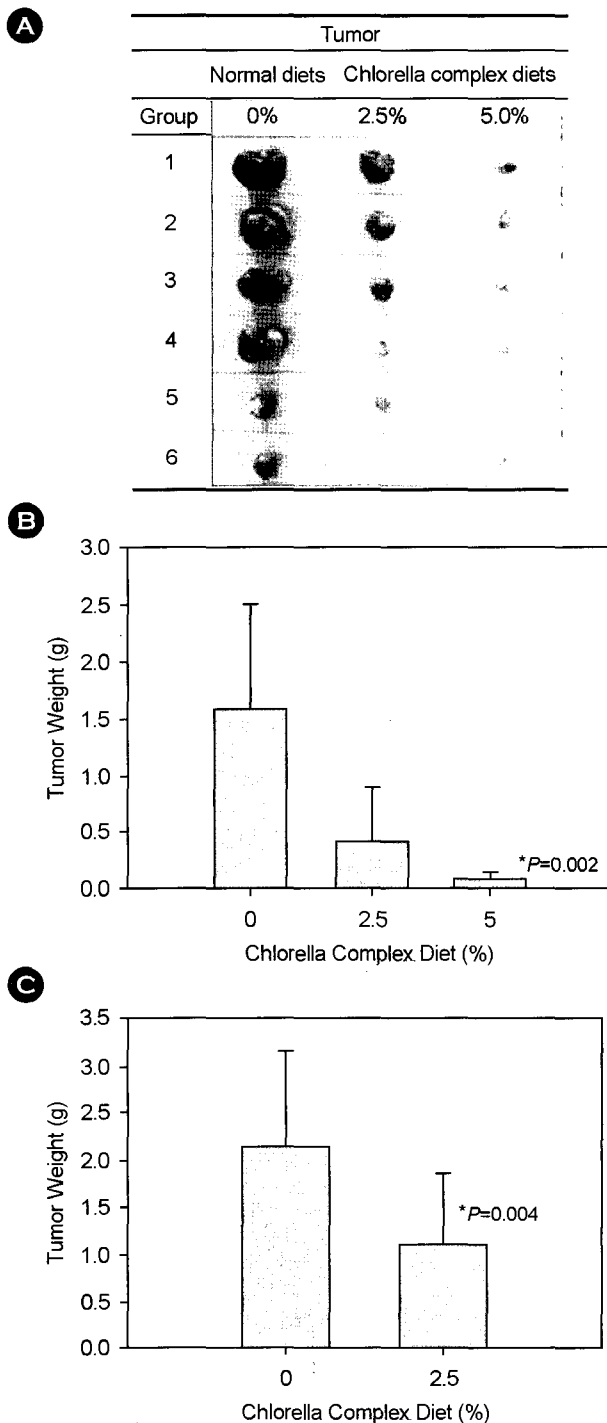


Fig. 5. Effect of the post-supplementary diet of chlorella complex on tumor formation in mice. (A) Fibrosarcomas formed in mice were removed, weighted, and displayed. (B) Tumors were introduced in the 12-week-old, male BALB/c mice by subcutaneous injection of the tumorigenic cells, and the mice were, thereafter, given solid chows containing 2.5% and 5.0% chlorella complex (w/w) for 2 weeks. (C) 26-week-old, male BALB/c mice were used to induce tumors, and further raised with 5.0% chlorella complex (w/w) for 4 weeks. The asterisk indicates statistical significance (B, $p=0.002$; C, $P=0.004$) as compared with the data of the normal diet group by student's t-test.

mouse의 연령도 항암활성에 중요한 영향인자가 될 수도 있음을 시사하였다.

4주령 mouse를 이용하여 2.5 내지 5.0% CC 식이를 4주간 가진 다음 발암세포의 이식 후에 3주간 정상식이를 하였을 때의 종양 발생에 미치는 예방적 항암활성을 알아본 결과, 대조군의 평균 종양 무게에 비해 2.5% 식이군에서 22%, 5% 식이군에서는 37%의 크기 감소를 보여 5% CC 식이군에서 가장 강한 예방적 항암활성을 보였다 (Table 3).

12주령의 실험동물에 발암세포를 피하주사한 후 정상식이 1주간 사육한 다음 2.5%, 5.0% CC를 2주간 식이를 시켰을 때 종양발생에 미치는 치료적 항암활성을 알아본 결과, 대조군의 평균 종양 무게에 비해 2.5% 식이군에서 74%, 5% 식이군에서는 95%의 크기 감소를 보여 역시 5% CC 식이군이 효과적임을 보여주었다 (Table 3). 그리고 26주령의 실험동물을 이용하여 발암세포 주사 직후부터 4주간을 5% CC 식이를 실시하였을 때는 대조군에 비해 약 50%의 크기 감소를 보여 주었다.

이로써 실험동물의 피하에 생성되는 섬유육종에 대해 클로렐라 복합체의 적절한 식이가 본 연구의 실험제에서는 그 항암활성이 매우 큰 것으로 나타났다. 비록 본 연구의 *in vitro* 시험에서 클로렐라 복합체의 열수 추출물이 발암세포주인 CRL-1888의 생존율과 성장에 어느 정도 직접적인 억제 효과가 있음을 알 수 있었지만 (Fig. 1), 클로렐라 복합체의 식이가 지금까지 밝혀진 anti-angiogenesis 등과 같은 항암활성의 여러 가지 다른 경로를 통하여 일어날 가능성도 배제할 수 없다. 따라서 장차 클로렐라 복합체로부터 항암활성성분의 분리와 그 작용 기전의 연구로 보다 많은 이해가 이루어 질 것으로 기대되며, 산야초 등이 포함된 유기배양배지에서 배양된 클로렐라와 이의 복합체의 식이가 암의 예방과 치료에 상당한 효과가 있을 것으로 생각 되어지며, 클로렐라 복합체가 함유하고 있는 항암활성성분의 분리 및 동정과 항암기전의 연구는 차세대 항암 신약제의 개발, 대체 의학적 치료법의 개발 및 항암보조 건강식품의 개발 등에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 1999년 중소기업청 지원 산학연 공동기술개발 지역컨소시엄 사업비 지원에 의해 수행되었기에 이에 감사 드리는 바입니다.

REFERENCES

- Amstrong AC, Doll R. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries with special reference to dietary practices. *Int J Cancer*. 1975. 15: 617-631.

- Chang CW, Ho JC, Hsu T. Thymidine dimer-dependent incision on ultraviolet light damaged-DNA in cell-free extracts of *Chlorella pyrenoidosa*. *Biotechnol Biochem*. 1996. 60: 490-492.
- Hasegawa T, Okuda M, Makino M, Hiromatsu K, Nomoto K, Yoshikai Y. Hot water extracts of *Chlorella vulgaris* reduce opportunistic infection with *Listeria monocytogenes* in C57BL/6 mice infected with LP-BM5 murine leukemia viruses. *Int J Immunopharmacol*. 1995. 17: 505-512.
- Hasegawa T, Kimura Y, Hiromatsu K, Kobayashi N, Yamada A, Makino M, Okuda M, Sano T, Nomoto K, Yoshikai Y. Effect of hot water extract of *Chlorella vulgaris* on cytokine expression patterns in mice with murine acquired immunodeficiency syndrome after infection with *Listeria monocytogenes*. *Immunopharmacol*. 1997. 35: 273-282.
- Ibusuki K, Minamishima Y. Effects of *Chlorella vulgaris* extracts on murine cytomegalovirus infection. *Nat. Immun. Cell Growth Regul*. 1990. 9: 121-128.
- Konish F, Tanaka K, Kumamoto S. Enhanced resistance against *Escherichia coli* infection by subcutaneous administration of the hot-water extract of *Chlorella vulgaris* in cyclophosphamide-treated mice. *Cancer Immunol Immunother*. 1990. 32: 1-7.
- Morimoto T, Nagatsu A, Murakami N, Sakakibara J, Tokuda H, Nishino H, Iwashima A. Anti-tumour-promoting lyceroglycolipids from the green alga, *Chlorella vulgaris*. *Phytochemistry* 1995. 40: 1433-1437.
- Noda K, Ohno N, Tanaka K, Kamiya N, Okuda M, Yadomae T, Nomoto K, Shoyama Y. A water-soluble antitumor glycoprotein from *Chlorella vulgaris*. *Planta Med*. 1996. 62: 423-426.
- Okamoto K, Iizuka Y, Murakami T, Miyake H, Suzuki T. Effect of *Chlorella* alkali extract on blood pressure in SHR. *Jpn Heart J*. 1978. 19: 622-623.
- Robert AK. Microalgae as food and supplement. Critical review in *Food Science and Nutrition*. 1985. 30: 555-573.
- Sano T, Kumamoto Y, Kamiya N, Okuda M, Tanaka Y. Effect of lipophilic extract of *Chlorella vulgaris* on alimentary hyperlipidemia in cholesterol-fed rats. *Artery* 1988. 15: 217-224.
- Shih C, Padhy LC, Murray M, Weinberg RA. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* 1981. 290: 261-264.
- Tanaka K, Yamada A, Noda K, Hasegawa T, Okuda M, Shoyama Y, Nomoto K. A novel glycoprotein obtained from *Chlorella vulgaris* strain CK22 shows antimetastatic immunopotentiator. *Cancer Immunol Immunother*. 1998. 45: 313-320.
- Takashi H, Masao O, Masahiko M. Hot water extracts of *Chlorella vulgaris* reduce opportunistic infection with *Listeria monocytogenes* in C57BL/6 mice infected with LP-BM5 murine leukemia viruses. *Int J Immunopharmacol*. 1995. 17: 505-512.
- Yasukawa K, Akihisa T, Kaminaga T. Inhibitory effects of steroids isolated from *Chlorella vulgaris* 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation and promotion in mouse skin. *Biol Pharm Bull*. 1996. 19: 573-576.