

불등가사리 분획물의 암세포 성장 억제 효과

박성영¹ · 정복미² · 최영현³ · 배승자^{1*}

¹신라대학교 식품영양학과, 마린-바이오 산업화지원센터

²여수대학교 식품영양학과

³동의대학교 한의과대학 생화학교실

Growth Inhibition Effects of Cancer Cell Lines by *Gloiopeltis furcata* Fractions *in Vitro*

Soung-Young Park¹, Bok-Mi Jung², Yung Hyun Choi³ and Song-Ja Bae^{1*}

¹Dept. of Food and Nutrition, Marine Biotechnology Center for Biofunctional
Material Industries, Silla University, Busan 617-736, Korea

²Dept. of Food Science and Nutrition, Yeosu National University, Yeosu 550-749, Korea

³Dept. of Biochemistry, College of Oriental Medicine and Research Institute of Oriental Medicine,
Dong-Eui University, Busan 614-052, Korea

Abstract

The growth inhibitory effects on human cancer cell lines provide useful information regarding critical cellular targets. Reports on cytotoxicity of *Gloiopeltis furcata* (GF) to human cancer cell lines are conflicting. This study was performed to investigate the effects of cytotoxicity and quinone reductase activity of *Gloiopeltis furcata* on the human cancer cells. The four partition layers of methanol extracts (GFM) which are hexane (GFMH), methanol (GFMM), butanol (GFMB) and aqueous (GFMA) were screened for their cytotoxic effects on HepG2, HeLa, MCF-7, HT-29, and normal liver cell lines. The GFMM showed the strongest growth inhibition effect on all cell lines we used. The GFMM showed the highest induction activity of quinone reductase on HepG2 cells among the other partition layers.

Key words: cytotoxicity, quinone reductase, *Gloiopeltis furcata*

서 론

암에 의한 사망률이 계속 증가하여 전 세계적으로 관심의 대상이 되고 있는 이즈음 치료상의 급진적인 진보에도 불구하고 전체 사망률은 저하되지 않고 있다. 이와 더불어 항암 치료 등의 화학 치료에 의한 여러 가지 부작용 등이 심각한 문제로 대두되고 있어 이에 따른 천연물 대체 요법 등 새로운 암예방 물질의 개발에 의한 예방과 치료의 방향이 전환되고 있는 실정이다(1). 천연물이나 천연물 유래의 중간화합물은 주로 공격적인 암세포들의 증식을 막거나 약화시켜 예방하는데 사용이 되고 있고 이들 물질의 동정과 활성 여부의 판단 및 대체요법의 성공은 천연물을 이용한 생물학적 기초를 형성하는데 크게 기여하고 있다(2). 암의 발병은 주로 식생활에 의한 불균형과 유전적 소질 및 주위환경 등이 주요 원인이 되고 있으며(3), 전 세계적으로 거의 모든 암 중의 35%가 부적절한 식이로 인한 발병으로 특히 대장암의 경우 발병자의 80% 이상이 식이가 주요 원인이라고 한다(4). 암

의 화학적 예방에 대한 목적은 체내에서 발생하는 발암 과정을 중지시키거나 이미 암세포 쪽으로 변질되고 있는 세포를 다시 정상화시키고 또한 조기에 진행되고 있는 암이 침윤성 암으로 전환되는 과정을 막기 위해 비타민, 섬유질 및 미량 영양소 등을 이용해서 장기간 복용하는 방법 등이 있다(5). 특히 최근에는 해조류의 생리활성 성분들이 항암, 암 예방 및 항 돌연변이에 효과가 있다고 보고된 바 있고, 해면동물이 human skin melanoma 세포에 있어 apoptosis를 유도한다고 밝힌 바 있다(6-8).

이제까지 해조류는 소화 흡수율이 낮아 영양적인 측면에서 관심을 끌지 못하였으나 최근 해조류에 함유된 탄수화물이 혈관 내 콜레스테롤 침착 방지 및 장관운동을 원활히 하고 중금속 배출을 촉진시키며 고지혈증의 개선에 유효하다는 등 식용 해조류로부터 생리활성 물질의 확인 및 기능성 식품개발에 관심이 모아지고 있다. 콜레스테롤 저하, 변비 및 비만 개선, 중금속 배출 등의 기능을 가지고 건강식품 소재로서 각광받고 있는 해조류의 적절한 이용 방안에 대한

*Corresponding author. E-mail: sjbae@silla.ac.kr
Phone: 82-51-999-5462, Fax: 82-51-999-5687

관심이 높아지면서 다양한 건강 기능성 제품으로의 개발이 활발하게 진행되고 있다(9,10).

본 연구에 사용한 불등가사리(*Gloiopeltis furcata*)는 조간대의 바위 위나 돌 위에서 자라며 한국, 일본, 미국 태평양 연안 등에 분포하고, 줄기는 원주 모양을 하고 속이 비어 있으며 가지의 선단은 가늘고 뾰족하며 불등가사리를 시료로 하여 이를 추출 및 분획하여 암세포 증식 억제 효과 및 quinone reductase(QR) 유도효과에 관하여 연구함으로써 항 발암 효과를 가진 기능성 식품으로서의 대체 가능성 유무를 본 실험을 통해 타진해 보고자 한다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용된 불등가사리(*Gloiopeltis furcata*, GF)는 2004년 5월 전남 무안군에 위치한 (주)삼일물산에서 제공받았다.

암세포 증식억제 실험에 사용된 시약 중 NP-40, menadione, flavin adenine dinucleotide(FAD), dicumarol 및 glucose-6-phosphate dehydrogenase는 Sigma사(St. Louis, USA) 제품을 구입하였으며, minimum essential medium(MEM), Dulbecco's Eagle modified medium(DMEM)과 phosphate buffered saline(PBS) 등은 Gibco-BRL(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, 그 외 연구에 사용된 용매 및 시약은 특급을 사용하였다.

시료의 추출 및 분획물 제조

시료로 사용된 불등가사리는 건조 후 메탄올을 첨가하고 37°C에서 진탕한 후 4시간 동안 3회 반복 추출하고 회전식 진공 농축기로 감압 농축시킨 후 동결 건조하여 적체의 methanol 추출물(GFM)을 얻고, 이 추출물을 각 용매별로 분획하여 hexane층(GFMH), methanol층(GFMM), butanol층(GFMB) 및 수층분획물(GFMA)로 각각 분획하고 각 층을 감압 농축 후 동결 건조하여 분말로 만들어 시료로 사용하였다.

암세포 배양

본 실험에 사용한 암 세포주는 인체 간암 세포인 HepG2 (human hepatocellular carcinoma), 자궁 경부암 세포인 HeLa (human cervix adenocarcinoma), 유방암 세포인 MCF-7 (human breast adenocarcinoma pleural effusion), 대장암 세포인 HT-29(human colon cancer cell) 및 정상 간세포인 liver cell이며, 2004년 6월 부산대학교 의과대학 생화학교실에서 제공받았다. HepG2, HeLa, MCF-7, HT-29 및 liver 정상 세포주는 DMEM medium에 10% fetal bovine serum (FBS) 100 mL와 1% 100 units/mL의 penicillin streptomycin 10 mL가 함유된 배지를 사용하여, 37°C 5% CO₂ incubator에서 monolayer로 배양하였다.

암세포 증식억제 효과측정(Cytotoxicity)

불등가사리 추출 분획물의 암세포 증식억제 효과는 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay를 사용하여 행하였다(11,12).

실험에 사용한 각 세포주를 1×10^5 cells/well의 농도로 맞추고 24 well에 각각 1 mL씩 첨가하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후 용매 종류별 분획물을 각각 일정량의 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여서 20, 40, 60, 80 및 100 µg/mL의 농도로 첨가하였다. 48시간 동안 배양한 후 각 well에 PBS 완충액에 녹인 MTT 용액(3 mg/mL)을 100 µL씩 첨가하여 4시간 동안 다시 배양시킨 후, well 바닥에 형성된 formazan이 흡수되지 않게 상등액을 제거하고 DMSO와 ethanol을 1:1로 혼합한 용액 1 mL를 첨가하여 천천히 녹인 후 UV-visible spectrophotometer를 이용하여 570 nm, 690 nm에서 각각 흡광도를 측정하여 대조군 세포수를 100%로 하였을 때의 상대적인 세포성장 억제율을 구하였다.

Quinone reductase(QR) 유도 활성 측정

QR은 간세포에서 주로 생성되는 phase II enzyme의 한 종류로 quinone을 환원시켜 무독하게 만들고 세포내에 유도되어 여러 돌연변이 물질에 의해 일어나는 돌연변이와 종양화를 막아주고 발암물질을 무독하게 하는 역할을 한다(13).

QR생성 유도 효과는 Prochaska와 Santamaria(14)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 즉 T-75 flask에서 배양중인 HepG2세포가 80%이상 증식하게 되면 24 well plate의 각 well에 1×10^4 cells/mL 되도록 HepG2 세포를 분주하여, 37°C 5% CO₂ incubator에 24시간 동안 배양한 후 불등가사리 추출물을 각각 DMSO에 녹여 10, 20, 30 및 40 µg/mL 농도로 첨가하고, 다시 24시간 동안 배양한 다음 배양액을 제거하였다. 배지가 제거된 각 well에 250 µL의 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 14 mM NaCl, 15 mM MgCl₂)를 혼합하여 well에 1 mM씩 첨가하여 5분 동안 반응시킨 후, 반응 정지 용액인 10.3 mM dicumarol, 0.5% pyridine, 5 mM potassium phosphate(pH 7.4) 혼합액을 250 µL씩 첨가하여 효소반응을 정지시키고 UV-visible spectrophotometer를 이용하여 610 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다. 그리고 단백질량은 동일한 set의 well plate에 대한 crystal violet 염색 방법으로 정량하였다(15).

결과 및 고찰

암세포 증식억제에 미치는 불등가사리 분획물의 영향

암세포인 HepG2, HeLa, MCF-7, HT-29 cell과 정상 간세포에 대한 불등가사리 추출물 및 각 분획물의 세포 증식억제 효과에 대한 결과는 Fig. 1~5와 같다. Fig. 1은 HepG2에 불등가사리 용매별 각 시료 분획물을 20, 40, 60, 80 및 100

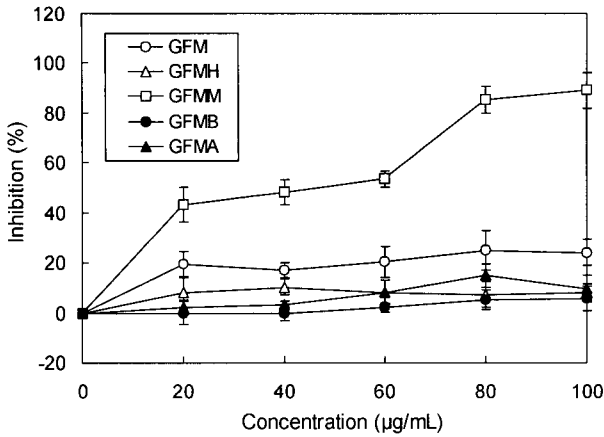


Fig. 1. Cytotoxicity of *Gloiopeltis furcata* (GF) on human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. GFMM: Methanol partition layer of methanol extracts of *Gloiopeltis furcata* (GFM), GFMH: Hexane partition layer of GFM, GFMB: Butanol partition layer of GFM, GFMA: Aqueous layer of GFM.

µg/mL씩 첨가하였을 때의 암세포 증식억제 효과를 나타낸 그림이며, 여러 용매 분획층 중 methanol 분획층인 GFMM에서 그 효과가 뛰어났다. 즉, GFMM의 시료 농도 80 µg/mL을 첨가했을 때 85.36%의 높은 암세포 증식억제 효과를 보였고, 100 µg/mL를 첨가했을 때는 89.25%의 높은 효과가 나타났으며 다른 분획물은 모두 그 효과가 미약하였다. HeLa에 대한 암세포 증식억제 실험 결과는 Fig. 2에 나타내었으며, Fig. 1의 HepG2의 결과와 비슷하게 나타났고, 여러 분획물 중 유일하게 GFMM에서 암세포 성장 저지효과가 높게 나타났다. 즉, 시료농도 60 µg/mL 첨가한 경우 이미 85.73%의 암세포증식 억제효과를 나타내었고 80 µg/mL 첨가 시에는 98.42%로서 거의 모든 HeLa 세포의 증식을 억제하였다. Fig. 3은 MCF-7세포주에 대한 결과이며 HepG2와 HeLa에서와 같이 GFMM 분획물 첨가 시 암세포증식 억제 효과가 높게 나타났다. 즉 시료 첨가농도 60 µg/mL에서

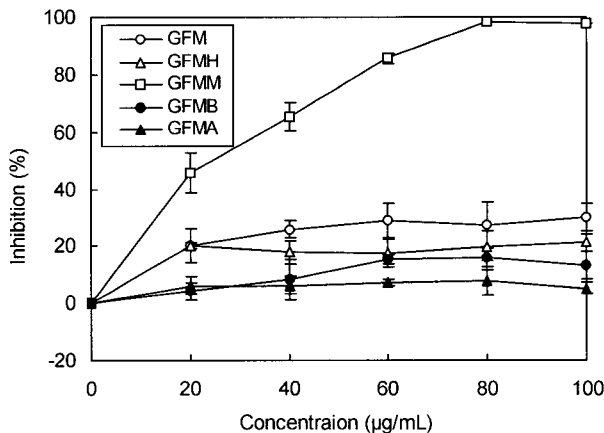


Fig. 2. Cytotoxicity of GF on human cervical adenocarcinoma HeLa cells. Abbreviations are the same as in Fig. 1.

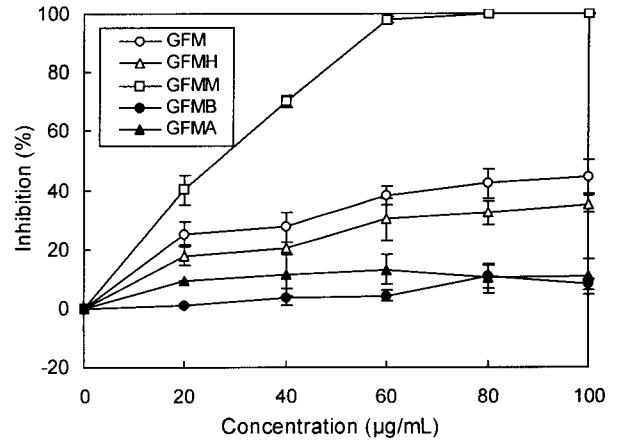


Fig. 3. Cytotoxicity of GF on human breast adenocarcinoma pleural effusion MCF-7 cells. Abbreviations are the same as in Fig. 1.

98.08%로 거의 모든 세포증식을 억제시켰고, 이후 첨가 농도에서는 성장을 거의 다 억제시켜 실험에 사용한 암세포 중에서 가장 높은 효과를 보였다. Fig. 4는 HT-29에 대한 결과이며 첨가농도 100 µg/mL에서 75.82%의 비교적 높은 암세포 증식 억제 효과를 나타내었다. Fig. 5는 정상 간세포에 대한 효과를 나타내었으며 메탄올 분획층 GFMM에서는 약 38% 정상세포 억제효과를 나타내었고, 나머지 분획층에서는 약 10~20%이하의 낮은효과를 보여 정상 세포에 미치는 시료분획물의 성장 억제효과는 아주 미약하였다. 이 결과들을 종합하여 볼 때 불등가사리의 메탄올 분획층 속에는 암세포 증식을 억제하는 극성물질이 존재할 것으로 믿으며 본 시료는 대표적인 여성암인 유방암과 자궁경부암에 그 효과가 탁월한 것으로 생각된다. 특히 첨가시료의 양은 본 연구실에서 등 다른 육상생물에 첨가한 시료 양의 약 1/5에 해당되는 낮은 농도에서 아주 높은 암세포 성장억제효과가 나타났으므로 육상생물 추출물 첨가시의 암세포성장 억제효과 (16,17)와 비교해 보면 해양식물인 불등가사리의 암세포 성

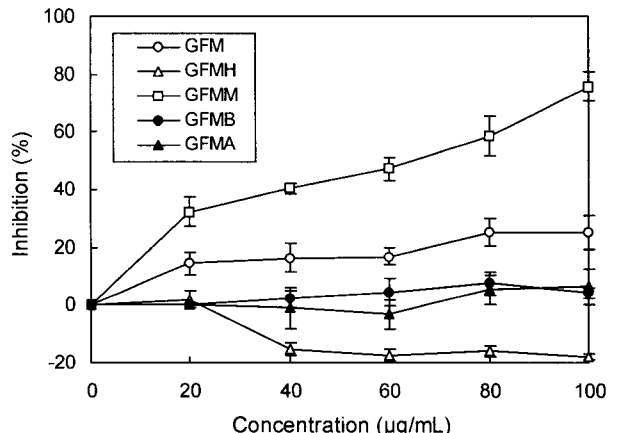


Fig. 4. Cytotoxicity of GF on human colon cancer HT-29 cells. Abbreviations are the same as in Fig. 1.

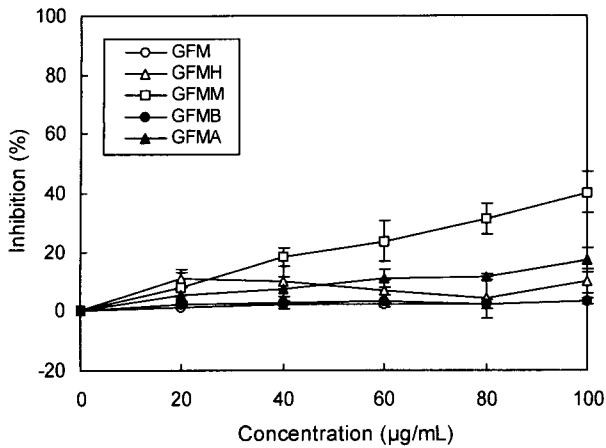


Fig. 5. Cytotoxicity of GF on normal liver cells. Abbreviations are the same as in Fig. 1.

장억제효과가 아주 높으며 또 이 결과는 다른 해조류에서 보인 암세포 성장저지 효과(18,19)보다도 월등히 높다고 하겠다. 특히 정상세포에 미치는 이들 분획물의 영향은 매우 낮아 홍조 해조류의 하나인 불등가사리가 암세포의 성장을 억제하는 기능성 항 발암제로서의 가능성이 높았으며 특히 메탄올 분획층에서의 유효 생리활성물질의 존재가 주목된다.

Quinone reductase(QR) 유도활성 효과

QR 유도 활성 측정을 보다 신속하고 정확하게 측정하기 위해 본 실험에서는 유일하게 QR 유도활성을 가진 인체간 암세포주인 HepG2를 사용하여 실험을 행하였으며, 그 결과는 Fig. 6에 나타내었다.

HepG2 세포주에 불등가사리 시료의 각 분획물을 10, 20, 30 및 40 µg/mL의 농도로 첨가했을 때 대체적으로 각 첨가물의 농도에 따라서 QR 유도활성이 증가하는 경향을 보였으며, 특히 암세포 성장저지효과가 아주 높았던 GFMM에서 아주 좋은 효과를 나타내었고 시료의 농도를 증가시킬수록 이 효과가 대체적으로 증가하는 편이었다. 즉 용매 대조군을

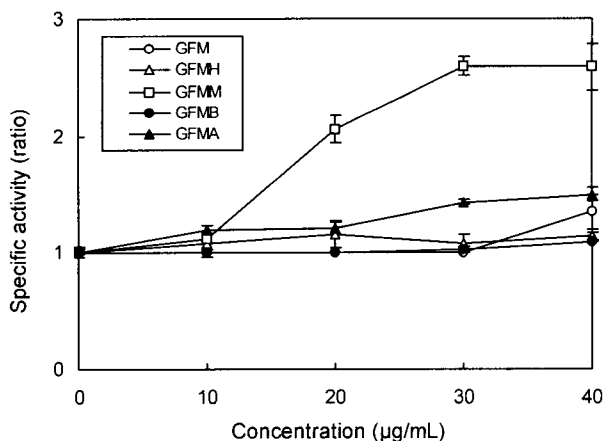


Fig. 6. Effect of various partition layers of GF on the induction of quinone reductase in HepG2 cells. Abbreviations are the same as in Fig. 1.

1.0으로 하여 비교한 결과, GFMM시료를 20, 30 및 40 µg/mL 첨가 시 대조군에 비해 각각 2.06, 2.60 및 2.58배의 효과를 나타냄으로서 이와 같은 결과도 일반적으로 본 연구실에서 사용한 해조류 분획물 첨가량의 약 1/3에 해당되므로 아주 높은 농도 의존적인 QR 유도활성효과를 나타내었다. 특히 극성 용매층인 GFMM에서 QR 유도효과가 제일 높았으므로 이 분획층에서의 quinone reductase inducer가 존재함을 추정할 수 있고 앞으로 더욱더 심도 있는 연구를 통해 불등가사리의 생리활성 물질의 구조를 추적, 동정함으로써 식품산업에 있어서의 항 발암 효과를 지닌 기능성 식품의 산업화개발에 매우 중요한 자료가 될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

본 실험은 홍조해조류의 하나인 불등가사리를 추출 후 각 용매별로 분획하여 암세포 성장억제 효과와 QR 유도활성 효과 등 생리활성을 연구하였다. 불등가사리를 이용하여 4종의 인체 암세포주 HepG2, HeLa, MCF-7 및 HT-29와 정상 간세포에 대한 암세포 증식억제 실험을 한 결과 사용한 4종의 암세포주에서 모두 시료첨가 농도에 의존적으로 증식억제 효과가 나타났고, 특히 불등가사리의 methanol 분획층인 GFMM에서는 매우 낮은 농도의 시료첨가에도 불구하고 괄목할 만한 높은 암세포 성장 억제효과를 나타내었으며, 정상 간세포에서는 모든 분획층에서 약한 세포증식 억제율을 나타내어 정상 세포에 미치는 독성이 낮음을 확인하였다. 특히 본 시료는 여성암의 대표적인 유방암과 자궁경부암의 암세포 성장저지효과가 탁월하였다. 한편, 사용한 4가지 암세포주 중 유일하게 QR을 가지고 있는 HepG2를 이용한 암 예방지표인 QR 효소 유도 활성 여부를 측정된 결과 분획물 첨가농도를 10, 20, 30 및 40 µg/mL로 첨가하였을 때 GFMM의 첨가농도 20 µg/mL에서 대조군에 비해 약 2배 이상의 높은 QR 유도효과를 나타내어 최종농도 40 µg/mL에서는 2.6의 암예방 QR 유도효과를 나타내었다.

감사의 글

본 실험에 사용된 불등가사리는 전남 무안군에 위치한 (주)삼일물산에서 제공된 것으로 (주)삼일물산 사장님께 감사드립니다.

문 헌

1. Stavric B. 1994. Role of chemopreventiers in human diet. *Clin Biochem* 27: 319-320.
2. Reddy L, Odhav B, Bhoola KD. 2003. Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacology and Therapeutics* 99: 1-13.
3. 분자암학회 한국유전자 이식 연구재단. 2000. Cancer chemo-

- prevention.
4. Doll R, Peto R. 1981. The cause of cancer. Quantitative estimates of available risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 66: 1192-1308.
 5. Banner SE, Pastorino U, Lippman SM, Hong WK. 1994. Second international cancer chemoprevention conference. *Cancer Res* 54: 854-859.
 6. Ham SS, Lee SY, Choi M, HwangBo HJ. 1998. Antimutagenicity and cytotoxicity effect of Woorimil wheat flour extracts added with wild herb and seaweed powder. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 1177-1182.
 7. Choi HJ, Bae SJ, Kim ND, Jung JH, Choi YH. 2004. Induction of apoptosis by dideoxypetrosynol A, a polyacetylene from the sponge *Petrosia* sp., in human skin melanoma cells. *Int J Mol Med* 14: 1091-1096.
 8. Ha MS, Kim DS, Ryu BH, Ji BH. 1986. Desmutagenic effect of extracts obtained from seaweeds. *J Kor Fish Soc* 19: 502-508.
 9. Ryo T, Hiroko IS, Kaeko H, Saburo H, Susumu H. 1998. Concurrence of agaroid and carrageenan chains in funoran from the red seaweed *Gloiopeltis furcata* post. et ruprecht. *Carbohydrate Polymers* 35: 81-87.
 10. Bae SJ. 2004. Anticarcinogenic effects of *Sargassum fulvellum* fractions on several human cancer cell lines *in vitro*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 480-486.
 11. Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR. 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell line using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* 48: 589-601.
 12. Carmichael J, De Graff WG, Gazder AF, Minna JD, Mitchell JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47: 936-942.
 13. Steinkellner H, Rabot S, Freywald C, Nobis E, Scharf G, Chabicovsky M, Knasmuller S, Kassie F. 2001. Effects of cruciferous vegetables and their constituents on drug metabolizing enzymes involved in the bioactivation of DNA-reactive dietary carcinogens. *Mutat Res* 480-481: 285-297.
 14. Prochaska HJ, Santamaria AB. 1988. Direct measurement NAD(P)H. Quinone reductase from cells cultured in microtiter wells. A screening assay for anticarcinogenic enzyme inducer. *Anal Biochem* 169: 328-336.
 15. Prochaska HJ, Santamaria AB. 1988. Direct measurement NAD(P)H. Quinone reductase from cells cultured in microtiter wells. A screening assay for anticarcinogenic enzyme inducer. *Anal Biochem* 169: 328-336.
 16. Park YJ, Jeon KH, Kim SH, Bae SJ. 2004. The effect on antimicrobial and cytotoxicity of *Brassica oleracea* L. fractions. *J Life Sci* 14: 567-572.
 17. Jung BM, Lim SS, Park YJ, Bae SJ. 2005. Inhibitory effects on cell survival and quinone reductase induced activity of *Aster yomena* fractions on human cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 8-12.
 18. Bae SJ. 2004. Anticarcinogenic effects of *Sargassum fulvellum* fractions on several human cancer cell lines *in vitro*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 480-486.
 19. Bae SJ. 2004. Studies on the antioxidative and antimicrobial effects of *Chondria crassicaulis*. *J Life Sci* 14: 411-416.

(2005년 4월 1일 접수; 2005년 5월 25일 채택)