

참곱슬이(*Plocamium telfairiae*) 추출물의 암세포 성장억제 효과

김주영 · 황지환 · 차미란 · 최병대¹ · 최선욱 · 박해룡 · 황용일*

경남대학교 식품생명학과, ¹경상대학교 해양생물이용학부

Received April 6, 2006 / Accepted May 4, 2006

Growth-inhibitory Effects of the *Plocamium telfairiae* Extracts on Cancer Cells. Ju-Young Kim, Ji-Hwan Hwang, Mi-Ran Cha, Byeong-Dae Choi¹, Sun-Uk Choi, Hae-Ryong Park and Yong-Il Hwang*. Department of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea, ¹Division of Marine Bioscience, Gyeongsang National University, Tongyeong 650-160, Korea – The extracts of *Plocamium telfairiae* using several solvents with different polarities were prepared and their growth inhibitory effects were examined on the human cancer cells. We investigated the cytotoxic effects of *P. telfairiae* extracts on HT-29 cells by the MTT reduction assay and examining the morphological change under the inverted microscope. Among three extracts, the methanol extract showed the strongest inhibitory effect on the growth of HT-29 cells. The methanol extract was further fractionated sequentially with *n*-hexane, diethyl ether, ethyl acetate, and aqueous for purifying crude methanol extract. The *n*-hexane layer among the fractioned layers showed remarkable inhibitory activity on the growth of HT-29 cells. Moreover *n*-hexane layer showed the notable growth inhibition effects with a dose-dependent manner against SW620, HeLa, and MCF-7 cells as well as HT-29 cells. These results indicated that *P. telfairiae* extracts may be contained bioactive materials with inhibitory effect on the growth of human cancer cells.

Key words – *Plocamium telfairiae*, growth inhibition, anticancer, cancer cells

현대 과학의 발달과 더불어 많은 치명적인 질병들에 대한 효과적인 치료법이 개발되었음에도 불구하고 아직까지 암이라는 질병에 대해서는 효과적이면서 부작용이 없는 치료법이 개발되지 못하고 있는 실정이다. 현재 암 치료의 성공 여부를 결정하는 것은 암의 조기 발견과 그에 따른 외과적 절제 혹은 방사선 치료를 통해 국한된 암세포의 치료와 같은 방법들이 가장 효과적으로 이용되고 있으나 이러한 치료방법은 암의 재발, 환자의 극심한 고통 등을 유발 시키는 문제점들을 가지고 있다. 이와 더불어 최근 항암제 등의 화학 치료에 의한 여러 가지 부작용 등이 심각한 문제로 대두됨에 따라 천연물 대체요법 등 새로운 암 예방 물질의 개발에 의한 예방과 치료의 방향이 전환되고 있는 실정이다[19]. 암의 발병은 주로 식생활에 의한 불균형과 유전적 소질 및 주위환경 등이 주요 원인이 되고 있으며, 전 세계적으로 거의 모든 암 중의 35%가 부적절한 식이와 관련 있는 것으로 보고되고 있다[5,14]. 우리가 일상생활에서 섭취하는 식품에는 암의 발생을 억제하거나 지연시키는 효과가 있으며[2,17] 천연식품은 합성화학약제와는 달리 생체 내에서 항산화 및 항암 등의 생리활성 작용을 나타내는 유효 성분들이 많이 있다[4,11,13,16]. 특히 최근에는 해조류의 생리활성 성분들이 항암 및 항돌연변이에 효과가 있다고 보고된 바 있고, 해면동물이 melanoma세포에 있어 apoptosis를 유도한다고 밝힌 바 있다[3,7,8,11,15].

이제까지 해조류는 소화 흡수율이 낮아 영양학적인 측면에서 관심을 끌지 못하였으나, 최근 해조류에 함유된 탄수화물이 혈관 내 콜레스테롤 침착 방지 및 장관 운동을 원활히 하고, 중금속 배출을 촉진시키며 고지혈증의 개선에 유효하다는 등 식용 해조류로부터 생리활성 물질들이 확인되면서 기능성 식품으로서의 개발에 관심이 모아지고 있다. 콜레스테롤 저하, 변비 및 비만 개선, 중금속 배출 등의 기능을 가지고 건강식품 소재로서 각광받고 있는 해조류의 적절한 이용 방안에 대한 관심이 높아지면서 다양한 건강 기능성 제품으로의 개발이 활발하게 진행되고 있다[1,10,18].

본 연구에 사용된 참곱슬이(*Plocamium telfairiae*)는 돌가사리목 곱슬이과(Plocamiaceae)의 여러해살이 해조로 일본에 주로 분포하고, 우리나라에서는 부산, 여수, 오동도, 돌산도, 추자도, 제주도 등 남해안 일대의 온난한 해역에 서식하는 천연자원식물이다. 참곱슬이에 관한 연구는 lipophilic 함유량과 항산화 효과에 관한 연구[9,12]만 보고 되어있을 뿐 다른 해조류에 비해 항암활성을 비롯한 생리활성 관련연구가 미비한 실정이다.

본 연구에서는 해·수산 생물자원인 해조류로부터 항암활성을 가지는 생리활성물질의 탐색 일환으로 참곱슬이를 이용하여 methanol, ethanol, acetone 등 용매별 추출하여 인간 대장암 유래의 세포주 HT-29에 대한 성장억제 효과를 검색하고, 여러 종류의 용매를 순차적으로 분획하여 활성 분획물을 분리한 후, 이를 HT-29에 대해서 뿐만 아니라 3종의 암세포주 SW620, HeLa 및 MCF-7에 대하여 항암활성을 확인하였다.

***Corresponding author**

Tel : +82-55-249-2685, Fax : +82-55-249-2995

E-mail : yihwang@kyungnam.ac.kr

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용된 참곱슬이는 2006년 1월 통영 주변 바닷가에서 채취하여 물로 깨끗이 여러 번 씻어 물기를 제거한 후, 음건하고 이 시료를 추출·분획하여 실험에 사용하였다. 암세포 성장억제 효과 실험에 사용된 시약 중 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하였고, Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) 및 penicillin-streptomycin 등은 Gibco-BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, 그 외 연구에 사용된 용매 및 시약은 모두 일급 이상의 등급을 사용하였다.

시료의 추출 및 분획물 제조

건조된 참곱슬이 5 g에 200 ml의 methanol, ethanol, acetone을 각각 첨가하여 24시간 동안 상온에서 침출시켜 추출한 후, 여과지(5C. 110mm, Advantec, Tokyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)로 여과하였다. 이 추출여액을 회전감압농축기(EYELA N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)에서 농축하여 용매추출물을 얻었다. 이 중 methanol 추출물은 용매의 극성에 따라 순차적으로 용매분획 하였다. 즉, n-hexane과 물을 같은 비율로 하여 분획여두에서 n-hexane 층을 분획하고, 동일한 방법으로 남은 수용액 층에 diethyl ether, ethyl acetate, water 층으로 분획하여 각각의 용매 분획물을 얻어 감압농축 하였다(Fig. 3). 각 추출물 및 분획물은 5 mg/ml로 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 녹여 적당한 농도로 희석해서 실험에 사용하였다.

암세포 배양

본 실험에 사용한 암 세포주는 대장암 유래의 세포인 HT-29 (human colon carcinoma), SW620 (human colon carcinoma), 자궁 경부암 세포 HeLa (human cervix adenocarcinoma) 및 유방암 세포 MCF-7 (human breast adenocarcinoma pleural effusion)로 한국세포주은행(KCLB, Seoul)으로부터 분양 받아 실험에 사용하였다. 세포배양을 위한 배지는 HT-29, SW620, MCF-7 세포주는 RPMI1640 medium, HeLa 세포주는 DMEM medium을 사용하였으며 10% FBS와 항생제는 100 unit/ml의 penicillin, 100 mg/ml의 streptomycin을 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator (MCO-18AIC, SANYO, Osaka, Japan)에서 배양하였다.

암세포의 형태학적 관찰

참곱슬이 용매추출물에 대한 HT-29 세포주의 형태학적인 관찰을 위해 6 well plate에 1×10⁵ cells/well로 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후, DMSO에 녹인 참

곱슬이 용매별 추출물을 각각 50 mg/ml의 농도로 처리하여 24시간 후에 inverted microscope (TS 100-F, Nikon, Tokyo, Japan)로 각 well의 세포형태를 관찰하고, 100배로 사진을 촬영하였다.

암세포 성장 억제효과 측정

참곱슬이 추출 분획물의 암세포 성장 억제효과는 MTT assay[6]로 행하였다. 각 세포주를 1×10⁵ cells/well의 농도로 맞추고 96 well plate에 각각 100 µl씩 첨가하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후, DMSO에 녹인 참곱슬이 용매별 추출 분획물 시료를 각각 0.5, 5, 50 mg/ml의 농도로 처리하였다. 24시간 동안 배양한 후 각 well에 PBS 완충액에 녹인 MTT (5 mg/ml) 용액을 10 µl씩 첨가하여 1시간 동안 다시 배양시킨 후, well 바닥에 형성된 formazan이 용해되지 않게 상등액을 제거하고 DMSO 100 µl 첨가하여 녹인 후 ELISA reader (Model 680, BioRad, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 대조구 세포수를 100%로 하였을 때 상대적인 세포성장 억제율을 구하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복으로 이루어졌으며, 실험결과는 평균±표준편차로 표현하였다. 모든 처리 값의 차이는 신뢰수준 95% (p<0.05)로 비교하여 분석되었다.

결과 및 고찰

암세포 성장 억제에 미치는 참곱슬이 추출물의 영향

인간 대장암 유래의 세포주 HT-29에 대한 참곱슬이 추출물의 암세포 성장 억제효과에 대한 결과는 Fig. 1, 2와 같다. 먼저 각 용매에 대한 추출물이 HT-29 세포주의 형태학적 변화에 미치는 영향을 알아보기 위해 inverted microscope로 세포형태를 관찰한 결과, 대조구는 암세포가 조밀하게 정상적으로 성장하는데 반해 각각 추출물을 50 mg/ml의 농도로 처리한 세포는 결속력이 감소되어 세포 주위가 흐트러지고 세포가 응축되어 사멸된 것을 관찰 할 수 있었다. 그 중 methanol 추출물은 대조구와 다른 추출물에 비교하여 크게 세포의 응축과 세포수의 감소가 일어남으로 해서 암세포 성장 억제효과에 대한 활성이 가장 높음을 확인 할 수 있었다(Fig. 1). 이러한 형태학적인 변화에 따라 각 용매에 대한 추출물의 항암효과를 조사하기 위해 MTT reduction assay 방법을 이용하였으며 추출물을 처리하지 않은 대조구와 비교하여 각 추출물의 암세포 성장 억제효과를 확인 하였다. Fig. 2는 참곱슬이 용매별 추출물을 0.5, 5, 50 mg/ml의 농도로 각각 처리하였을 때 암세포 성장 억제효과를 나타낸 결과이며, 각 추출물에 대해 전체적으로 농도에 의존하여 암세포 성장 억제효과가 증가 되었다. 특히 형태학적 변화의 결과와 같이 여러 용매추출물 중 methanol 추출물이 가장 활성이

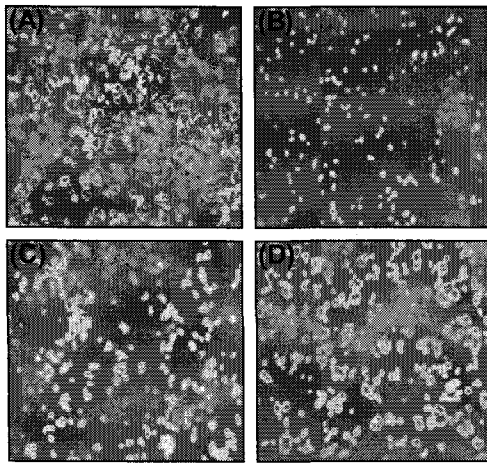


Fig. 1. Morphological change by extracts of *P. telfairiae* in HT-29 cells. (x100). (A) Control, (B) Methanol extract, (C) Ethanol extract, (D) Acetone extract.

높음을 확인할 수 있었다. 즉, ethanol 추출물과 acetone 추출물을 5 mg/ml의 농도로 첨가했을 때 60.6%, 65.5%로 약한 활성을 보였지만, 50 mg/ml로 처리했을 때 각각 20.5%, 27.4%로 급격히 활성이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 그러나 methanol 추출물의 경우 5 mg/ml의 농도에서 36.4%의 생존률을 보였으며 50 mg/ml의 농도에서는 12% 이하의 가장 강한 암세포 성장 억제효과를 보임을 알 수 있었다.

활성 분획물의 암세포 성장 억제효과

참곱슬이 용매별 추출물 중 가장 강력한 항암 활성을 가지는 methanol 추출물을 이용하여 정제수율을 높여 암세포

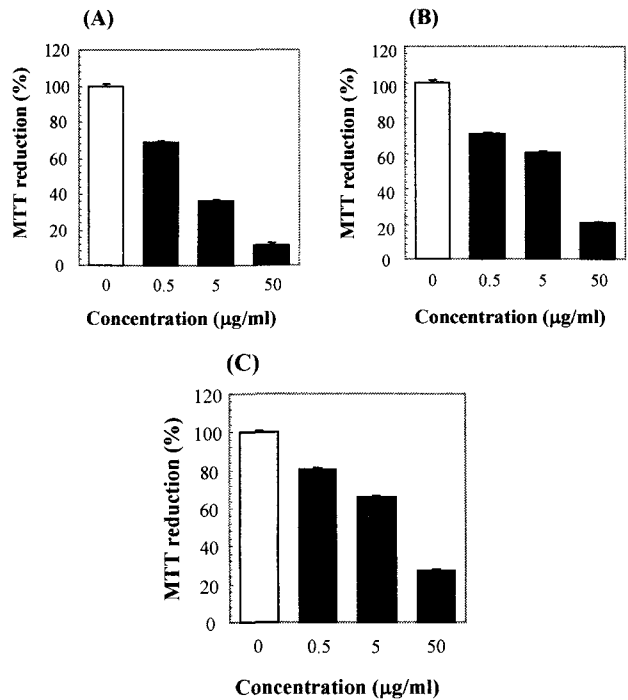


Fig. 2. Inhibitory effect of extracts from *P. telfairiae* on cell survival of HT-29 cells. (A) Methanol extract, (B) Ethanol extract, (C) Acetone extract.

성장 억제효과를 확인하기 위한 목적으로 *n*-hexane, diethyl ether, ethyl acetate 및 water 순으로 점차 극성을 높이면서 분획 추출하였다(Fig. 3). 각 용매별 분획물의 암세포 성장 억제효과에 대한 결과는 Fig. 4와 같다. HT-29 세포주에 참곱슬

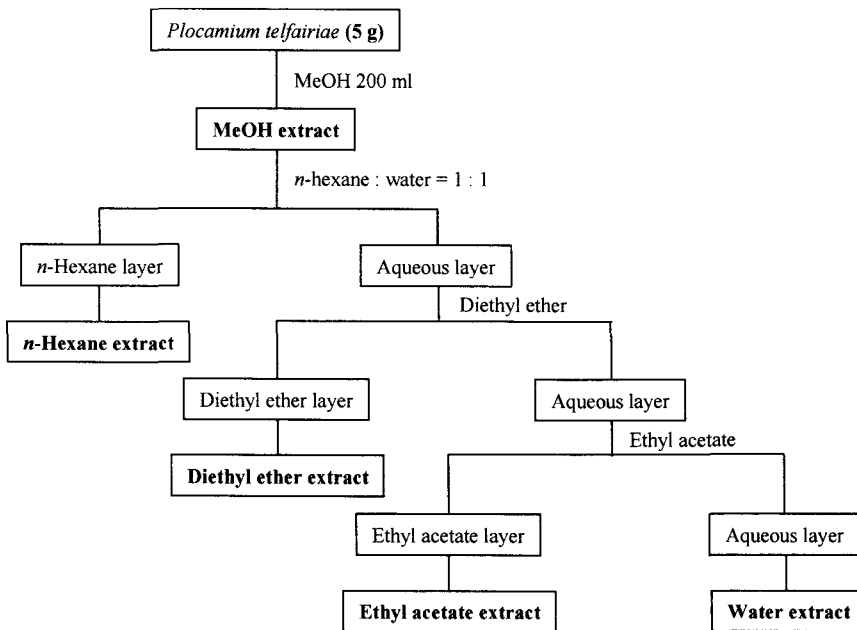


Fig. 3. Fractionation procedure of methanol extracts from *P. telfairiae*.

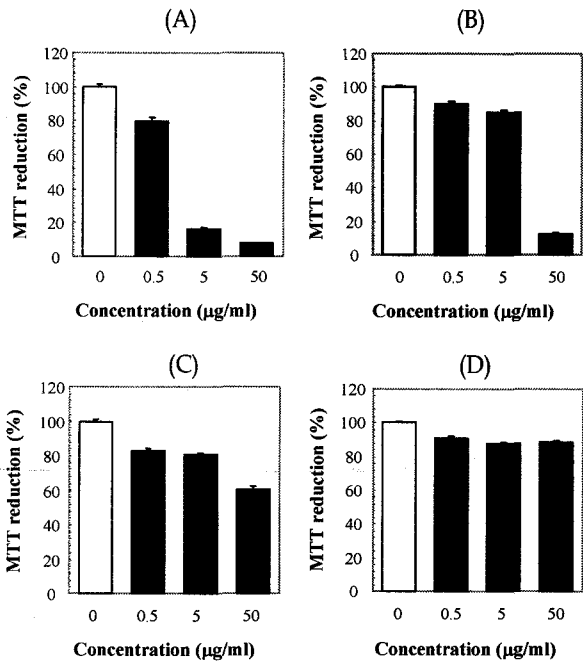


Fig. 4. Inhibitory effect on cell survival of the each fraction of methanol extracts from *P. telfairiae* in HT-29 cells. (A) *n*-Hexane extract, (B) Diethyl ether extract, (C) Ethyl acetate extract, (D) Water extract.

이 methanol 추출물에 대한 각 분획물을 0.5, 5, 50 mg/ml의 농도로 처리하였을 때, 여러 용매 분획물 중 *n*-hexane 분획물에서의 효과가 가장 높았다. 즉, *n*-hexane 분획물 5 mg/ml을 처리했을 때 16.6%의 암세포 생존율을 보였고 50 mg/ml에서는 7%이하의 생존율을 보임에 따라 높은 암세포 성장 억제 효과를 나타냈으며, diethyl ether 분획물에서도 50 mg/ml의 농도 처리 시 12.7%로 활성이 증가하였으나 *n*-hexane 분획물과 비교하였을 때 효과가 낮음을 알 수 있다. ethyl acetate에서는 가장 높은 농도에서 아주 미약한 활성을 보였으며 water 층에서는 전혀 활성을 보이지 않았다. 따라서 HT-29 세포주에 대한 가장 강한 암세포 성장 억제효과를 보이는 *n*-hexane 분획물을 HT-29와 같은 인간 대장암 유래의 세포주 SW620, 자궁경부암 세포 HeLa 및 유방암 세포 MCF-7에 처리해 봄으로써 여러 암세포주에 대한 참고술이 *n*-hexane 분획물의 항암활성을 확인하였다(Fig. 5). 결과로부터 실험에 사용된 모든 세포주에서 농도에 비례하여 강한 암세포 성장 억제효과를 확인 하였으며 실험상에서 가장 높은 농도인 50 mg/ml으로 처리하였을 경우 모두 10% 이하의 세포생존율을 관찰할 수 있었다.

요 약

해조류로부터 항암활성을 가지는 생리활성물질을 탐색하기 위하여 홍조해조류의 하나인 참고술이를 용매별 추출한

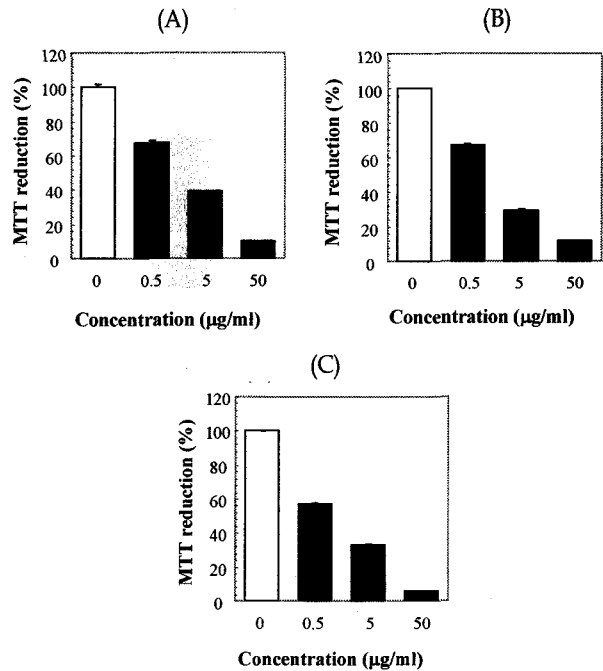


Fig. 5. Inhibitory effect on cell survival of *n*-hexane extract on the human cancer cells. (A) SW620, (B) HeLa, (C) MCF-7.

후, 분획하여 암세포 성장 억제효과를 연구하였다. 참고술이를 이용하여 대장암 세포주 HT-29에 대해 methanol, ethanol 및 acetone 추출물을 처리했을 때 모두 농도에 의존적으로 성장저해 효과가 나타났고, 그 중에서도 methanol 추출물에서는 50 mg/ml 농도 처리 시 12% 이하의 생존율을 보이는 가장 강한 암세포 성장 억제효과를 보였다. 또한 HT-29 암세포 성장에 대한 현미경 관찰 결과 methanol 추출물은 대조구에 비하여 암세포 성장 억제 정도와 세포의 수축등 형태변화가 두드러지게 나타났다. 그리고 가장 활성이 좋은 methanol 추출물을 용매 분획하여 얻은 분획물 중 *n*-hexane과 diethyl ether 분획물에서 암세포 성장 억제효과를 보였으며, *n*-hexane 분획물이 HT-29 세포주에 대하여 가장 높은 항암활성을 나타내었다. 따라서 *n*-hexane 분획물에 대한 여러 인체 암세포주에 대해 항암활성을 확인하기 위하여 HT-29와 같은 대장암 유래의 세포주 SW620, 자궁경부암 세포 HeLa 및 유방암 세포 MCF-7에 대한 암세포 성장 억제효과를 확인한 결과, 3종의 암세포주에서 모두 농도 의존적으로 높은 항암활성을 보임에 따라 참고술이에 여러 인체 암세포 성장 억제효과를 가지는 생리활성 물질이 함유되어 있음을 알 수 있다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 및 한국산업기술평가원으로부터 지원받은 경남대학교 산학협력단 연안역 폐자원 및 환경 연구센터(CRERC)의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Bae, S. J. 2004. Anticarcinogenic effects of *Sargassum fulvellum* fractions on several human cancer cell lines *in vitro*. *J. Korea Soc. Food Sci. Nutr.* **33**, 480-486.
2. Bissett, D. L., R. Chatterjee and D. P. Hannon. 1991. Chronic ultraviolet radiation -induced increase in skin iron and the photoprotective effect of topically applied iron chelators. *Photochem. Photobiol.* **54**, 215-223.
3. Choi, H. J., S. J. Bae, N. D. Kim, J. H. Jung and Y. H. Choi. 2004. Induction of apoptosis by dideoxypetrosynol A, a polyacetylene from the sponge *Petrosia* sp. in melanoma cells. *Int. J. Mol. Med.* **14**, 1091-1096.
4. Chung, Y. Z. 2004. Apoptotic effects of some plants on MCF-7 mammary gland adenocarcinoma cells. *J. Korea Life Science* **14**, 61-66.
5. Doll, R. and R. Peto. 1981. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.* **66**, 1192-1308.
6. Fisher, B. 1984. Clinical trials for the evaluation of cancer therapy. *Cancer* **54**, 2609-2617.
7. Ha, M. S., D. S. Kim, B. H. Ryu and B. H. Ji. 1986. Desmutagenic effect of extracts obtained from seaweeds. *J. Kor. Fish Soc.* **19**, 502-508.
8. Ham, S. S., S. Y. Lee, M. Choi and H. J. Hwang Bo. 1998. Antimutagenicity and cytotoxicity effect of Woorimil wheat flour extracts added with wild herb and seaweed powder. *J. Korea Soc. Food Sci. Nutr.* **27**, 1177-1182.
9. Huang, H. L. and B. G. Wang. 2004. Antioxidant capacity and lipophilic content of seaweeds collected from the qingdao coastline. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 4993-4997.
10. Kim, H. S. and G. J. Kim. 1998. Effects of the feeding *Hijikia fusiforme* (Harvey) Okamura on lipid composition of serum in dietary hyperlipidemic rats. *J. Korea Soc. Food Sci. Nutr.* **27**, 718-723.
11. Kim, S. A., J. Kim, M. K. Woo, C. S. Kwak and M. S. Lee. 2005. Antimutagenic and cytotoxic effects of ethanol extracts from five kinds of seaweeds. *J. Korea Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 451-459.
12. Lee, H. J., K. E. Park, J. S. Yoo, J. W. Ahn, B. J. Lee and Y. W. Seo. 2004. Studies on screening of seaweed extracts for peroxynitrite and DPPH radical scavenging activities. *Ocean Polar Res.* **26**, 59-64.
13. Min, K. J., S. H. Choung and S. J. Koo. 1999. Studies on the anticancer effect of *Broussonetic kazinoki* extracts. *J. Korea Soc. Food Sci.* **15**, 231-237.
14. Nagao, M. and T. Sugimura. 1993. Carcinogenic factors in food with relevance to colon cancer development. *Mutat. Res.* **290**, 43-51.
15. Park, S. Y., B. M. Jung, Y. H. Choi and S. J. Bae. 2005. Growth inhibition effects of cancer cell lines by *Gloiopeltis furcata* Fractions *in vitro*. *J. Korea Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 771-775.
16. Park, Y. J., K. H. Jeon, S. H. Kim and S. J. Bae. 2004. The effects on antimicrobial and cytotoxicity of *Brassica oleracea* L. fraction. *J. Korea Life Science* **14**, 567-572.
17. Piper, J. T., S. S. Singhal, M. S. Salameh, R. T. Torman, Y. C. Awasthi and S. Awasthi. 1998. Mechanisms of anticarcinogenic properties of curcumin: the effect of curcumin on glutathione linked detoxification enzymes in rat liver. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **30**, 445-456.
18. Ryo, T., I. S. Hiroko, H. Kaeko, H. Saburo and H. Susumu. 1998. Concurrence of agaroid and carrageenan chains in funoran from the red seaweed *Gloiopeltis furcata* post. et ruprecht. *Carbohydrate Polymers* **35**, 81-87.
19. Stavric, B. 1994. Role of chemopreventers in human diet. *Clin. Biochem.* **27**, 319-332.