

Anticancer Effect of Ferulic Acid on Cultured Human Skin Melanoma Cells

Byoung-Kwan Son, Yu-Sun Choi and Young-Woo Sohn[†]

Sanbon Medical Center, Wonkwang University, Gyeonggi-do, Gunpo 435-040, Korea

It is demonstrated that phenolic compound has cytotoxic effect on cancer cells. Recently, ferulic acid is involved in anticancer activity by showing the decrease of cell viability in cancer cells. But, the anticancer mechanism of ferulic acid is left unknown. The purpose of this study was to examine the anticancer activity of ferulic acid on NIH3T3 fibroblasts and human skin melanoma cells (SK-MEL-3). The anticancer activity was measured by determining the cytotoxicity of ferulic acid on these cells. The cytotoxicity was measured by cell viability via XTT assay in these cells. In this study, ferulic acid decreased cell viability according to the dose-dependent manners after human skin melanoma cells were treated with various concentrations of ferulic acid for 48 hours. especially, ferulic acid remarkably decreased cell viability at a concentration of 120 μ M compared with control in human skin melanoma cells. While, ferulic acid did not show the significant decrease of cell viability at concentrations of 30~120 μ M in NIH3T3 fibroblasts. These results suggest that ferulic acid showed anticancer activity in cancer cells such as human skin melanoma cells by the decrease of cell viability significantly.

Key Words: Anticancer activity, NIH3T3 fibroblasts, Human skin melanoma cells

서 론

암은 현대의학이 풀어야 할 과제중의 하나로 아직도 암에 대한 자세한 기전이 잘 밝혀져 있지 않다 (Wattenberg, 1985). 암의 발생은 갑자기 인체내의 암유전자 (oncogene)가 작동함으로써 암이 유발하게 된다는 것이 밝혀지면서 암유전자의 발견에 많은 연구가 진행되어 왔다 (Takemura et al., 2001). 특히, *erbA* 암유전자를 비롯하여 *fos* 암유전자, *jun* 암유전자와 같은 다양한 암유전자들이 밝혀져 있으며 이들이 독립적으로 또는 복합적으로 작용함으로써 암이 발생한다고 알려져 있다 (Lewin, 1991). 암의 치료에 있어서 현재로서는 수술을 비롯하여 항암제 및 방사선요법을 시행하고 있으며 암의 진행상태에 따라 이들을 복합치료 하고 있다. 특히, 암은 빠르게 진행할 뿐만 아니라 이의 전이 또한 매우 위험하다 (Sharma et al., 1994). 따라서 세계 각국은 암의 정복을 위하여 새로운 항암물질을 개발에 많은 노력과 투자를 아끼지 않고 있다 (Husniye & Kucukali, 1998). 지금까지 항암제는 암 치료에 있어 가장 널리 사용되고 있는 약제로서 암세포의

DNA나 RNA의 합성을 저해함으로써 항암작용을 나타내는 가 하면 암세포내의 단백질합성의 저해나 또는 암세포 내 신호전달체계를 차단함으로써 항암작용을 나타내기도 한다 (Lewin, 1991; Jung et al., 1997). 그러나 항암제들은 암세포 뿐만 아니라 정상세포에도 손상을 주기 때문에 항암제에 의하여 치료가 된다 할지라도 이의 후유증으로 환자는 심한 부작용과 고통으로 많은 어려움을 겪게 된다 (Goodman et al., 1987). 따라서 오래 전부터 세계 각국은 정상세포에는 독성이 없으면서 암세포만 선택적으로 죽일 수 있는 항암제의 개발에 많은 관심이 집중되었다. 최근에 식물에서 추출한 페놀화합물이 항암효과가 뛰어난 약리활성성분을 가지고 있다는 것이 제시되면서 이에 대한 연구가 지속적으로 이루어져 왔다 (Goldberg et al., 1999; Kamada et al., 2001). 페놀화합물은 치환할 수 있는 수산기 (OH)기를 가지고 있는 방향족고리 구조를 가지고 있는 화합물로서 과일을 비롯하여 채소나 포도주나 녹차와 같은 음식물에 다량 함유되어 있다 (Khan & Hadi, 1998). 지금까지 추출된 페놀화합물에는 탄닌산을 비롯하여 갈릭산, 피크린산, 페루릭산 및 시린직산 등 여러 종류들이 추출 정제되었다 (Haslam, 1979; Duthie & Alan, 2000). 이들은 모두 수산기를 비롯하여 카르복실기, 메틸기 및 질산기와 같은 구조를 모두 가지고 있거나 아니면 이중 몇 개만을 가지고 있어 이들의 작용에 따라 만약 이들이 다른 물질과 치환되면 항암작용이나 항산화작용을 나타낸다고

*는 문 접 수: 2006년 11월 15일

수정재접수: 2006년 12월 14일

[†]교신저자: 손영우, (우) 435-040 경기도 군포시 산본동 1142, 원광대학교 의과대학 산본병원

Tel: 031-390-2202, e-mail: giyoung@wonkwang.ac.kr

한다 (Li et al., 1999; Heilmann et al., 2000). 페놀화합물 중 탄닌산은 수산기와 같은 자유산소를 생산하여 세포 내 DNA와 같은 핵산물질의 분해를 일으킨다고 알려져 있다 (Khan & Hadi, 1998). 또한 피크린산 (picric acid)은 하나의 수산기를 가지고 있으며 카르복실기를 갖고 있지 않는 페놀화합물인데 비하여 갈릭산 (gallic acid)이나 시린직산 (syringic acid) 및 페루릭산 (ferulic acid)들은 모두 수산기와 카르복실기를 가지고 있으며, 또한 두 개 이상의 자유산소기를 가지고 있어 피크린산에 비하여 항암효과가 훨씬 강하다고 알려져 있다 (Yang, 2003). Li et al. (1999)은 수산기와 카르복실기가 동시에 작용할 경우 정상적인 세포에는 독성을 나타내지 않으나 암세포에는 선택적으로 독성을 나타낸다고 하였다. 이중 페루릭산은 위에서 살펴본 바와 같이 수산기와 카르복실기를 다같이 가지고 있는 페놀화합물의 일종으로 이의 구조식에 수산기 하나와 카르복실기 하나 및 메틸기 하나의 구조식을 이루고 있어 매우 유용한 항암효과가 있다고 알려져 있으나 아직까지 이의 항암작용에 대해서는 많은 연구가 되어 있지 않았다 (De Heredia et al., 2001; Yang, 2003). 근래에 세포 배양기술이 발달되면서 멜라닌세포를 비롯한 각종 세포의 배양이 가능하게 되면서 배양세포를 재료로 한 항암실험이 많이 행하여지고 있다 (Mosmann, 1983). 특히, 세포배양에 있어서 멜라닌세포는 다른 세포들과는 달리 특히, 태양의 자외선이나 방사선 등에 매우 민감하기 때문에 이의 배양이 다소 어렵고 동시에 여러 화학물질이나 독성물질에도 민감하게 반응하기 때문에 이들에 의한 영향을 정확하게 측정할 수 있는 잇점도 있다 (Michikawa et al., 1994). 특히, 인체멜라닌흑색종은 각종 항암제를 비롯한 화학약제 및 독성물질에 대한 효과를 정량적으로 검증하는데 매우 적합한 재료로 선택되고 있으며 동시에 약제의 독성이나 효능을 단시간 내에 정확히 검색하는데 널리 이용되고 있다 (Borenfreund & Puerner, 1984). 본 연구는 페놀화합물의 일종인 페루릭산의 항암효과에 대한 기전을 규명하기 위하여 페루릭산이 정상 세포인 NIH3T3 섬유모세포와 인체피부흑색종에 미치는 영향을 colorimetric assay에 의하여 정량적으로 분석 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 약제 제조

본 실험에 사용한 페루릭산 (ferulic acid, Sigma Co.)은 각각 1 M, 100 mM, 10 mM, 1 mM의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 다음 실험 당일 최종 농도로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

2. 세포배양

배양용기에 배양중인 섬유모세포 (NIH3T3 fibroblast)와 인체피부흑색종세포 (SK-MEL-3)의 분리는 효소해리술에 의하여 행하였다. 세포는 혈구계산기를 이용하여 배양액에 1×10^5 cells/well의 밀도로 96-multiwell에 넣어 분주하였다. 분주가 완료된 세포는 CO₂ 배양기에서 5일 동안 배양한 후 실험에 사용하였으며, ferulic acid가 포함되지 않은 배양액을 대조군으로 하여 실험군과 비교 조사하였다.

3. 페루릭산의 처리

페루릭산이 배양 NIH3T3 섬유모세포와 인체흑색종세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 30 μ M에서 120 μ M까지의 농도로 페루릭산이 각각 포함된 배양액에서 두 세포종을 48시간 동안 배양한 후 독성효과를 세포생존을 측면에서 조사하였다.

4. 세포생존을 조사

배양 NIH3T3 섬유모세포와 인체피부흑색종세포에 여러 농도의 페루릭산을 각각 48시간 동안 처리한 후 약제가 세포들에 미치는 영향을 Mosmann (1983)의 XTT분석법에 의하여 조사하였다. 즉, PBS (phosphate buffered saline)에 녹인 1 mg laminin의 저장액을 냉장고에 보관한 후 실험 당일 필요한 양을 희석한 다음 24 well plate에 200 μ l씩 분주하여 하룻밤 동안 건조시켰다. 건조 완료 후 PBS로 3회 세척한 다음 3% BSA (Bovine serum albumin, Sigma Co.)를 각 well당 200 μ l씩 첨가하여 잘 진탕한 후 다시 이를 PBS로 두 세 번 세척하였다. 배양된 두 종류의 세포를 5×10^6 cells/ml 밀도로 배양용기에 넣고 24 시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 페루릭산을 각각의 농도를 처리하여 48시간 동안 배양한 다음 PBS로 3회 세척하였다. 세척 완료 후 XTT와 혼합 후 각 배양용기에 200 μ l씩을 주입하여 4시간 동안 배양한 다음 450 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다. 분석방법의 개요는 Fig. 1과 같다.

5. 통계처리

대조군과 실험군의 차이에 대한 통계적 유의성은 Student's t-test로 비교하였다. 통계적 유의수준은 P값이 0.05 미만인 경우로 하였다.

결 과

1. 페루릭산의 독성효과 측정

1) NIH3T3 세포섬유모세포에 대한 세포생존율
NIH3T3 섬유모세포에 페루릭산이 30~120 μ M의 농도로

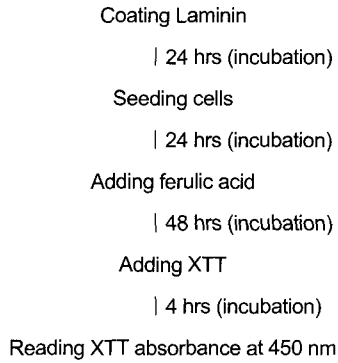


Fig. 1. Flow Scheme of XTT assay

Table 1. The cell viability of ferulic acid on NIH3T3 fibroblasts by XTT assay

Concentration of ferulic acid (μM)	Group	
	Mean \pm SD	(% of control)
Control	9.58 \pm 0.83	100
30	9.42 \pm 0.76	98.3
60	9.31 \pm 0.89	97.2
90	9.25 \pm 0.91	96.6
120	9.26 \pm 0.74	96.7

NIH3T3 fibroblasts were incubated with or without 30~120 μM ferulic acid for 48 hours. The value represent the mean \pm SD for triplicate experiments

각각 포함된 배양액에서 48시간 동안 배양한 후 페룰릭산의 독성효과를 XTT 분석법에 의하여 조사하였다. 결과 30 μM 페룰릭산의 처리에서는 세포생존율이 대조군인 100% (9.58 \pm 0.83) 비하여 98.3% (9.42 \pm 0.76)로 나타났으며 60 μM 의 처리에서는 97.2% (9.31 \pm 0.89)로 나타났다. 또한 90 μM 페룰릭산의 처리에서는 세포의 생존율이 96.6% (9.25 \pm 0.91)로 나타났으며 120 μM 페룰릭산의 처리에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 96.7% (9.26 \pm 0.74)로 나타났다. 이들은 모두 대조군에 비하여 유의성이 없는 것으로 나타났다 (Table 1).

2) 인체피부흑색종세포에 대한 세포생존율

인체피부흑색종세포에 페룰릭산이 30~120 μM 의 농도로 각각 포함된 배양액에서 48시간 동안 배양한 후 페룰릭산의 독성효과를 XTT 분석법에 의하여 조사하였다. 결과 30 μM 페룰릭산의 처리에서는 세포생존율이 대조군인 100% (5.19 \pm 0.47) 비하여 95.5% (4.93 \pm 0.36)로 나타났으며 60 μM 의 처리에서는 89.6% (4.65 \pm 0.51)로 나타났다. 또한 90 μM 페룰릭산의 처리에서는 세포의 생존율이 81.9% (4.25 \pm 0.40)로 나타났으며 120 μM 페룰릭산의 처리에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 74.8% (3.88 \pm 0.27)로 나타났다. 특히, 120 μM 의 페룰릭산의 처리에서는 대조군에 비하여 세포생존율이 유의하게 감소한 것으로 나타났다 (Table 2).

Table 2. The cell viability of ferulic acid on human skin melanoma cells (SK-MEL-3) by XTT assay

Concentration of ferulic acid (μM)	Group	
	Mean \pm SD	(% of control)
Control	5.19 \pm 0.47	100
30	4.93 \pm 0.36	95.5
60	4.65 \pm 0.51	89.6
90	4.25 \pm 0.40	81.9
120	3.88 \pm 0.27	74.8*

Human skin melanoma cells were incubated with or without 30~120 μM ferulic acid for 48 hours. The value represent the mean \pm SD for triplicate experiments. * P <0.05 (Student's t-test)

Table 3. The cytotoxicity in NIH3T3 fibroblasts and human skin melanoma cells (SK-MEL-3) by XTT assay

Ferulic acid	XTT assay (cell viability)	
	NIH3T3	SK-MEL-3
120 μM	96.7%	74.8%*

NIH3T3 fibroblasts and human skin melanoma cells (SK-MEL-3) were incubated with 120 μM ferulic acid, respectively. The values were determined by XTT assay. * P <0.05 (Student's t-test)

3) 세포종에 대한 페룰릭산의 세포독성

NIH3T3 섬유모세포와 인체피부흑색종세포에 대한 페룰릭산의 세포독성에 있어서 각각 120 μM 페룰릭산을 48시간 동안 처리한 결과 NIH3T3 섬유모세포에서의 세포생존율은 대조군인 100% (9.58 \pm 0.83)에 비하여 96.7% (9.26 \pm 0.74)로 나타난 반면 인체피부흑색종세포의 처리에서는 세포생존율이 대조군인 100% (5.19 \pm 0.47) 비하여 74.8% (3.88 \pm 0.27)로 나타났다 (Table 3).

고 찰

최근 각국 선진국들은 천연물로 부터 독성이 적은 항암물질을 개발하려는 목적으로 1990년대부터 수 많은 식물의 성분추출조사에 착수하였다 (Li et al., 1999; Takemura et al., 2001). 식물성 추출성분으로는 주로 페놀산을 비롯하여 알카로이드, 카로틴 및 스테로이드 등 다양한 물질들이 포함되었으며 특히, 분리된 페놀성분이 약 8,000종 이상 되었다고 보고되었다 (Duthie & Alan, 2000). 그 밖에도 항암작용을 비롯하여 항산화작용 및 항염증성작용과 관련된 다양한 추출물에 관한 연구가 계속 진행되어 왔다 (Haslam, 1979; Goldberg et al., 1999). 특히, 페놀화합물의 추출물 중 페룰릭산을 비롯한 시린직산, 갈릭산 등은 이의 분자구조에 다른 물질과 치환할 수 있는 수산기를 가지고 있으며 이들이 carboxyl group의 에스테르화와 hydroxyl group의 메틸화 됨으로써 암세포에 대하여 항암작용을 나타낸다고 알려져 있다 (Sakaguchi et

al., 1998; Kawada et al., 2001). 시린직산의 경우 이에 대한 약리작용의 연구는 그리 많지 않으며 단지 항산화작용과 DPPH radical-scavenging 활성에 관한 연구가 보고된 바 있다 (Goldberg et al., 1999, Yang et al., 2003). 갈릭산의 경우에는 phenolic hydroxyl group의 메틸화와 carboxyl group의 에스테르화에 의하여 세포독성을 경감하는 약리활성을 나타낸다고 알려진 바 있다 (Sakaguchi et al., 1998; Li et al., 1999). 특히, 페루릭산은 이의 분자구조에 수산기와 카르복실기를 가지고 있어 에스테르화와 메틸화를 할 수 있는 능력이 있어 갈릭산과 함께 뛰어난 항암작용이 있다고 제시된 바 있다 (Khan & Hadi, 1998). 그러나 페루릭산의 약리활성에 대한 자세한 기전은 잘 밝혀져 있지 않으며 더욱이 항암작용에 관한 연구는 소수에 불과하다 (Haslam, 1979). 본 연구는 페루릭산의 항암효과를 조사하기 위하여 암세포종인 인체피부흑색종세포를 배양하여 이에 독성을 정상세포인 NIH3T3 섬유모세포와 비교 조사하였다. 먼저 페루릭산이 정상세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 페루릭산이 30~120 μM 농도로 각각 포함된 배양액 내에서 NIH3T3 섬유모세포를 48시간 동안 배양한 후 이에 대한 영향을 세포생존을 측면에서 조사하였다. 그 결과 페루릭산을 처리한 농도에 따라 약간의 세포생존율의 감소가 있었으나 120 μM 의 갈릭산의 처리에서 세포생존율은 대조군인 100%에 비하여 95.0%로 나타남으로써 유의한 세포생존율의 감소를 보이지 않았다. 이러한 본 실험결과는 페루릭산이 NIH3T3 섬유모세포에는 아무런 세포독성을 나타내지 않음으로써 정상세포에 대해 페루릭산은 세포손상을 초래하지 않은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 아마도 Li et al. (1999)과 Sagaguchi et al. (1998)에 근거하여 카르복실기와 수산기가 동시에 작용하면 암세포에만 선택적인 독성효과를 보인다는 연구결과와 일치한다고 생각된다. 따라서 본 연구에서는 페루릭산이 암세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 NIH3T3 섬유모세포에 처리하였던 동일 농도를 처리하였던 바 처리 농도에 비례하여 세포생존율의 감소를 보였으며 특히, 120 μM 페루릭산의 처리에서는 세포생존율이 대조군인 100%에 비하여 74.8%로 나타나 유의한 감소를 나타냈다. 본 실험결과는 페루릭산이 인체피부흑색종세포에 세포독성효과를 나타낸 것을 알 수 있었으며 이러한 현상은 페루릭산이 선택적으로 세포독성을 나타낸 것을 알 수 있다. 본 연구결과는 Yang (2003)이 식물이나 견과류에서 다량 함유되어 있는 페루릭산을 정상세포와 암세포에 처리한 결과 정상세포에는 무독성으로 나타난 데 비하여 암세포에는 고독성을 나타냈다는 실험결과와 일치함을 알 수 있었다. Heilmann et al. (2000)은 페루릭산과 같은 페놀화합물이 정상세포에는 독성효과를 보이지 않으면서 암세포에 선택적으로 독성효과를 보인 것은 이들의 구조식을 이루고 있는 수산기와 카르복실기의 상호작용이며 또한 세포내 칼슘이온이나 활성산

소와 같은 세포 내 인자의 변화와도 밀접한 관련이 있다고 보고한 바 있다. 그 밖에도 페놀화합물은 항암작용 외에도 항산화작용을 비롯하여 항균작용, 항염작용 등이 알려져 있으나 이에 대한 자세한 기전에 대해서도 잘 밝혀져 있지 않다 (Kawada et al., 2001). 그러나 이에 대한 자세한 기전규명을 위해서는 페루릭산의 항암효과와 단백질합성간의 상호작용을 비롯하여 암유전자를 억제하는 효소활성에 대한 생리활성의 기전, 세포의 핵산물질인 DNA의 합성 및 세포 내 protein kinase C와 같은 신호전달체계와 같은 측면에서 더욱 체계적인 분석이 필요할 것으로 생각한다.

감사의 글

이 논문은 2004년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨.

REFERENCES

- Borenfreund E, Puerner JA. A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). *J Tiss Cult Meth.* 1984. 9: 7-9.
- De Heredia JB, Torregrosa J, Dominguez JR, Peres JA. Kinetic model for phenolic compound oxidation by Fenton's reagent. *Chemosphere* 2001. 45: 85-90.
- Duthie Garry C, Alan. Plant-derived phenolic antioxidants. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care.* Lippincott williams and wilkins. 2000. 3: 447-451.
- Goldberg DM, Hoffman B, Yang J, Soleas GJ. Phenolic constituents, furans, and total antioxidant status of distilled spirits. *J Agric Food Chem.* 1999. 47: 3978-3985.
- Goodman GE, Yen YP, Cox TC, Crowley J. Effect of verapamil on in vitro cytotoxicity of adriamycin and vinblastine in human tumor cells. *Cancer Res.* 1987. 47: 2295-2304.
- Haslam E. Vegetable tannins. *Res Adv Phytochem.* 1979. 12: 475-523.
- Heilmann J, Calis I, Kirmizibekmez H, Schuhly W, Harput S, Sticher O. Radical scavenger activity of phenylethanoid glycosides in FMLP stimulated human polymorphonuclear leukocytes: structure-activity relationship. *Planta Med.* 2000. 66: 746-748.
- Husniye Dilek F, Kucukali T. Mucin production in carcinomas of the uterine cervix. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1998. 79: 149-151.
- Kawada M, Ohno Y, Ri Y, Ikoma T, Yuugetu H, Asai T, Watanabe M, Yasuda N, Akao S, Takemura G, Minatoguchi S, Gotoh K, Fujiwara H, Fukuda K. Anti-tumor effect of gallic acid on

- IL-2 lung cancer cells transplanted in mice. *Anticancer Drugs*. 2001. 12: 847-852.
- Khan Nelofer S, Hadi SM. Structural features of tannic acid important for DNA degradation in the presence of Cu(II). *Mutat Res*. 1998. 13: 271-274.
- Lewin B. Oncogene conversion by regulatory changes in transcription factors. *Cell*. 1991. 64: 303-312.
- Li Z, Inou M, Nose M, Kojima K, Sakaguchi N, Isuzugawa K, takeda T, Ogihara Y. Metabolic fate of gallic acid orally administrated to rat. *Biol Pharm Bull*. 1999. 22: 326-329.
- Michikawa M, Lim KT, McLarnon JG, Kim SU. Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *Neurosci Res*. 1994. 37: 62-70.
- Momann T. Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth*. 1983. 65: 55-63.
- Sakaguchi N, Inoue M, Ogihara Y. Reactive oxygen species and intercellular Ca^{2+} , common signals for apoptosis induced by gallic acid. *Biochem Pharmacol*. 1998. 55: 1973-1981.
- Sharma S, Jil DS, Kelloff GJ, Vernon ES. Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Res*. 1994. 54: 5848-5855.
- Takemura G, Minatoguchi S, Gotoh K, Fujiwara H, Fukuda K. Anti-tumor effect of gallic acid on IL-2 lung cancer cells transplanted in mice. *Anticancer Drugs*. 2001. 12: 847-852.
- Wattenberg LW. Chemoprevention of cancer. *Cancer Res*. 1985. 45: 1-8.
-