

보라우무 메탄올추출물의 HT-29 대장암세포 증식 억제 효과

김은지^{1†} · 박소영² · 홍지은² · 신민정² · 임순성¹ · 신현경^{1,2} · 윤정한^{1,2}

¹한림대학교 식의약품의 효능평가 및 기능성소재개발센터

²한림대학교 식품영양학과

Inhibitory Effect of the Methanolic Extract of *Sympyocladia latiuscula* on the Growth of HT-29 Human Colon Cancer Cells

Eun Ji Kim^{1†}, So Young Park², Jieun Hong², Minjeong Shin², Soon Sung Lim¹,
Hyun-Kyung Shin^{1,2} and Jung Han Yoon Park^{1,2}

¹Center for Efficacy Assessment and Development of Functional Foods and Drugs, and

²Dept. of Food Sciences and Nutrition, Hallym University, Chuncheon 200-702, Korea

Abstract

In the present study, twenty eight marine algae species were evaluated for their antiproliferative effect on HT-29 human colon cancer cells. Among these, the methanolic extract of *Sympyocladia latiuscula* (SL Ex) showed the highest inhibitory activity on HT-29 cell growth. In this study, we examined the mechanism by which SL Ex inhibited the HT-29 cell growth. Cells were cultured with various concentrations of (0~20 µg/mL) SL Ex. The SL Ex substantially decreased the viable cell numbers and induced apoptosis of HT-29 cells in a dose-dependent manner. Western blot analyses of total cell lysates revealed that SL Ex increased the levels of cleaved caspase-8, -9, -7, and -3, and poly (ADP-ribose) polymerase in HT-29 cells. In addition, SL Ex increased truncated Bid levels but moderately decreased Bax levels at only 20 µg/mL. Furthermore, SL Ex did not affect Bcl-2 protein levels but increased the levels of Fas in HT-29 cells. The present results indicate that SL Ex inhibits cell growth via inducing apoptosis in human colon cancer cells. The mechanism of apoptosis induction by SL Ex involves caspase-8 activation leading to changes in mitochondrial events and subsequent activation of the caspase-7/caspase-3 cascade. Our finding may lead to the development of new therapeutic strategies for the treatment of colon cancer.

Key words: *Sympyocladia latiuscula*, colon cancer, apoptosis, caspase, truncated Bid

서 론

대장암은 우리나라에서 위암 다음으로 흔하게 발생하는 소화기계 암으로서 식생활의 서구화로 인하여 발생 빈도가 현저히 증가하고 있다. 대장암은 치료방법이 제한적이고 완치가 어려운 암 중 하나로, 수술요법과 병행하여 방사선요법이나 항암치료 등을 행하고 있으나 치료 효과가 좋지 못한 실정이다. 또한 암 치료를 위해 현재 사용되고 있는 항암제는 암세포 뿐만 아니라 정상세포에도 영향을 미쳐 독성 및 다양한 부작용을 야기하고 있다(1). 독성과 부작용이 없는 항암제 개발을 위해 천연물로부터 항암 성분을 찾는 연구가 세계적으로 활발히 이루어지고 있으며, 특히 예로부터 식용되고 있는 천연물은 독성과 부작용이 없는 항암제 연구에 좋은 소재가 될 수 있을 것으로 생각되고 있다.

지구 표면의 70%를 차지하는 해양에는 지구상의 모든 생물종의 약 80% 이상의 많은 해양 생물이 서식하고 있다.

최근에는 육상 생물에서 신소재를 개발하는데 한계에 이르게 되어 해양 생물에서 유용물질을 개발하려는 연구가 활발히 진행 중에 있다. 특히, 해조류는 단백질, 무기물, 비타민 및 식이섬유 등의 영양소뿐만 아니라 다양한 생리활성을 나타내는 성분들을 함유하고 있는 것으로 알려지고 있다. Kim 과 Kim(2)은 고지방 식이로 고지혈증을 유발한 쥐에서 해조류에 함유된 탄수화물이 콜레스테롤 침착을 방지하고 장관 운동을 개선하였다고 보고하였다. 다시마 등의 식용 해조류 메탄올추출물(3), 해조류에 탄수화물분해 효소를 처리하여 얻은 추출물(4), *Ecklonia cava*(감태)에 함유되어 있는 다당류와 폴리페놀 성분(5)이 강한 항산화효과를 나타냄이 보고되었다. 또한 해조류의 암세포 증식 억제 효과는 다양한 연구에 의해 알려지고 있다. *Palmaria palmata*, 다시마과 해조류인 *Macrocystis integrifolia*, *Laminaria setchellii*, *Nereocystis leutkeana* 등의 식용 해조류는 자궁경부암세포 주인 HeLa 세포의 증식을 억제하였고(3), *Sargassum sten-*

[†]Corresponding author. E-mail: myej4@hallym.ac.kr
Phone: 82-33-248-3076, Fax: 82-33-244-1738

*ophylluma*에서 추출된 다당류인 SargA는 흑색소세포종인 B16F10 세포의 증식과 암전이 억제 효과를 나타내었다(6). *Ecklonia cava*(감태)에 함유되어 있는 다당류와 폴리페놀 성분이 쥐에서 유래한 대장암세포인 CT-26 세포의 증식을 억제하였으며(5), *Ecklonia cava*(감태)의 에탄올추출물은 암전이에 관련하는 matrix metalloproteinase(MMP)-2, -9의 활성을 현저히 억제하였다(7,8). 여러 연구 결과를 통해 해조류가 암세포의 증식을 억제함이 입증되어, 해조류는 항암제 연구의 좋은 소재로 관심이 증가되고 있다.

해조류가 항암제 연구의 좋은 소재가 될 수 있으므로, 본 연구에서는 우리나라에서 식용되고 있는 해조류의 메탄올추출물을 제조하여 암세포 증식 억제 효과를 탐색하였다. 그 결과 28종의 해조류 메탄올추출물 중 보라우무(*Sympyocladia latiuscula*) 메탄올추출물이 인간의 대장에서 유래한 암세포인 HT-29 세포의 증식을 가장 현저히 억제함을 밝혔다 (Table 1). 보라우무는 홍조식물 빨간검둥이과의 바닷말로 한국, 일본 등지에 주로 분포하며 우무가사리의 형태로 식용되고 있다. 보라우무 메탄올추출물은 강력한 항산화효과를 지니는 것으로 알려져 있으며(9) 항균효과 및 항돌연변이 효과를 지니는 것으로 보고되고 있다(10). 그러나 현재까지 보라우무의 암세포 증식 억제 효과 및 항암효과에 대한 연구는 보고된 바가 없으며, 그 기전에 대해서도 전혀 밝혀지지 않았다.

Programmed cell death인 apoptosis는 세포가 정상적인 상태 또는 병리학적인 요인에 노출된 후에 죽음에 이르게 되는 생리적인 과정으로 정상세포의 기능 유지에 필수적인 과정이다(10). Apoptosis는 세포 내·외적인 신호에 의해 시작하여 Bcl-2 family 단백질(11)과 caspase들(12) 등의 apoptosis 조절인자에 의해 조절된다. Apoptosis 기전의 결합이나 조절 이상은 암의 원인 중의 하나이므로 apoptosis 기전을 적절하게 회복하는 것은 암의 예방 및 암 치료의 좋은 표적이 될 수 있다(13). 실제로 다양한 항암제는 암세포의 apoptosis를 유도하여 항암제로서 작용한다(14,15). 그러므로 암세포의 apoptosis를 유도하는 식품 성분들은 항암제로 개발할 수 있는 가능성을 제시한다.

본 연구에서는 인간에서 유래한 대장암세포인 HT-29 세포를 사용하여 여러 종류의 식용 가능한 해조류 메탄올추출물의 암세포 증식 억제 효과를 비교하고, 그 중 HT-29 세포의 증식을 현저하게 억제한 보라우무 메탄올추출물의 암세포 증식 억제 기전을 조사하기 위해 HT-29 세포의 apoptosis에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

인간의 대장에서 유래한 암세포인 HT-29 세포는 American Type Culture Collection(Rockville, MD, USA)에서 구입하-

였다. 세포배양에 사용한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture Ham's F12(DMEM/F12)는 Gibco/BRL(Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. Fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin 등은 Cambrex Bio Technology(Walkersville, MD, USA)에서 구입하였다. Bovine serum albumin(BSA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), anti- β -actin 항체와 본 연구에 사용한 일반적인 시약은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Bcl-2, Bax, Fas 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc.(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고, cleaved caspase-3, cleaved caspase-8, cleaved caspase-9, cleaved poly(ADP-ribose) polymerase(PARP), Bid에 대한 항체는 Cell Signaling(Beverly, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Horse radish peroxidase-linked anti-rabbit IgG와 horse radish peroxidase-linked anti-mouse IgG는 Amersham(Buckinghamshire, England)에서 구입하여 사용하였다.

시료 추출

채취한 해조류를 물로 여러 번 씻어 염분을 제거한 후 음지에서 상온으로 건조한 후 분쇄하였다. 분쇄 시료 1 kg에 5 L의 메탄올을 가하여 환류조건하에서 70°C의 조건으로 3시간 추출하였다. 추출물을 여과지로 여과한 다음 감압농축기로 감압 농축한 후, 동결 건조하여 해조류 메탄올추출물을 얻었다.

세포 배양

HT-29 세포는 DMEM/F12 배지에 10% FBS, 100 units/mL penicillin과 100 μ g/mL streptomycin을 첨가한 세포 배양액을 사용하여 37°C 습윤한 CO₂ 배양기(5% CO₂/95% air)에서 배양하였다. 세포가 배양 접시의 80% 정도 차면 phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 세포의 단층을 셋 어낸 후 0.25% trypsin-2.65 mM EDTA로 처리하여 계대 배양하였고 배지는 2일마다 교환하였다.

세포 증식 측정

다양한 해조류 메탄올추출물 및 보라우무 메탄올추출물이 HT-29 세포의 증식에 미치는 영향을 측정하기 위해 세포를 10% FBS가 첨가된 배지로 희석하여 50,000 cells/well의 밀도로 24 well plate에 분주하였다. 24시간이 지난 후 1% FBS가 포함되어 있는 배지로 교환하여 혈청에 들어있는 여러 성분들의 효과를 최소화하였다. 세포를 1% FBS가 포함되어 있는 배지에서 24시간 배양한 후 1% FBS가 포함되어 있는 배지에 20 μ g/mL 해조류 메탄올추출물을 첨가한 배지로 교환하여 48시간 세포를 배양하거나, 또는 여러 농도의 보라우무 메탄올추출물(0, 5, 10, 20 μ g/mL)을 첨가한 배지로 교환하여 세포를 24시간, 48시간, 72시간 세포를 배양한 후 MTT assay 방법(16)을 이용하여 살아있는 세포수를 측정하였다.

세포사멸 측정(Annexin V 염색)

세포를 24 well plate에 분주한 후 위와 동일한 방법으로 보라우무 메탄올추출물을 처리하였다. 보라우무 메탄올추출물을 첨가하여 48시간이 경과한 후 trypsin-EDTA로 처리하여 세포를 수집하였다. 세포에 phycoerythrin(PE)-conjugated Annexin V와 7-amino-actinomycin D(BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA)를 넣어 15분 동안 암실에서 염색한 후 Annexin V 또는 7-amino-actinomycin D에 의해 염색된 세포를 FACScan™(Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ, USA)을 사용하여 flow cytometry 방법에 의해 측정하였다.

Western blot analysis

세포를 100 mm dish에서 위와 동일한 방법으로 세포 배양액에 보라우무 메탄올추출물을 첨가하여 48시간 배양한 후 cell lysate를 만들었다. Cell lysate를 만들기 위해 세포를 차가운 PBS로 헹구고, lysis buffer(20 mM Hepes, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 100 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM Na_3VO_4)를 첨가하여 4°C에서 40분간 교반하였다. 이 때 단백질의 분해를 방지하기 위해서 protease inhibitor cocktail tablets(Roche, Mannheim, Germany)와 0.2 mM phenyl-methylsulfonyl fluoride를 첨가하였다. 13,000 $\times g$ 에서 10분간 원심 분리하여 침전물을 제거하고 상층액을 취해 cell lysate로 사용하였다. Cell lysate의 단백질 농도는 BCA protein assay kit(Pierce, Rockford, IL, USA)을 사용하여 측정하였다. Cell lysate(50 μg 또는 100 μg protein)를 4~20% 또는 10~20% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 분리한 후 polyvinylidene difluoride membrane(Millipore, Bedford, MA, USA)에 이동시켰다. Membrane은 5% skim milk-TBST(20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)에서 1시간 동안 blocking하고, anti-bcl-2 항체(1:1000 희석), anti-bax 항체(1:1000 희석), anti-Fas 항체(1:1000 희석), anti-Bid 항체(1:1000 희석), anti-cleaved caspase-3 항체(1:1000 희석), anti-cleaved caspase-8 항체(1:1000 희석), anti-cleaved caspase-9 항체(1:1000, 희석), anti-cleaved PARP 항체(1:1000 희석), anti- β -actin 항체(1:2000 희석) 등 측정하고자 하는 항체를 각각 첨가하여 4°C에서 16시간 또는 상온에서 1시간 동안 교반하였다. 그 후 horse radish peroxidase-linked anti-rabbit IgG 또는 horse radish peroxidase-linked anti-mouse IgG를 첨가하여 1시간 교반하였다. 각 protein band는 SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate(Pierce)를 사용하여 enhanced chemiluminescence 방법으로 가시화하였다. 각 단백질 랜드의 강도는 Bioprofile Bio-1D application(Vilber-Lourmat, Marine la Vallee, France)을 사용하여 측정하였다.

통계처리

모든 분석 수치는 mean \pm SEM으로 나타내었다. 수집된 결과는 SAS(Statistical Analysis System) PC 프로그램을 이용하여 통계 분석하였으며, 각 실험군들의 평균치간의 유의성은 $\alpha=0.05$ 수준에서 analysis of variance와 Duncan's multiple range test에 의해 분석하였다.

결과 및 고찰

해조류 메탄올추출물이 HT-29 세포의 증식에 미치는 영향 해조류는 다양한 생리활성 물질을 함유하고 있어 기능성 건강식품 개발의 좋은 소재라고 할 수 있다. 독성과 부작용이 없는 안전한 항암제 소재를 탐색하기 위해 식용 가능한 28종의 해조류 메탄올추출물을 제조하여 대장암세포인 HT-29 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하였다. HT-29 세포 배양액에 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 해조류 메탄올추출물을 첨

Table 1. Effect of the methanolic extracts of various seaweeds on viable cell numbers of HT-29 cells

Seaweeds	Viable cell numbers (% of control)
<i>Callophyllis japonica</i> (볏붉은잎)	92.0 \pm 1.5
<i>Caposiphon fulvescens</i> (매생이)	97.8 \pm 0.9
<i>Chondrus ocellatus holmes</i> (진두말)	99.5 \pm 2.0
<i>Codium fragile</i> (suringar) <i>hariot</i> (청각)	103.6 \pm 2.5
<i>Corallina officinalis</i> (산호말)	93.6 \pm 3.3
<i>Ecklonia stolonifera okamura</i> (곰피)	117.6 \pm 3.0
<i>Enteromorpha linza</i> (잎파래)	86.4 \pm 2.0
<i>Enteromorpha prolifera</i> (파래)	98.5 \pm 1.3
<i>Gelidium amansii lamouroux</i> (우뭇가사리)	90.9 \pm 2.0
<i>Gigartina tenella</i> (돌가사리)	91.8 \pm 1.1
<i>Gloiopteltis furcata</i> (불등가사리)	92.3 \pm 1.8
<i>Gracilaria verrucosa (hudson) paperfuss</i> (꼬시래기)	102.0 \pm 2.4
<i>Gymnogongrus flabelliformis</i> (부채살)	94.3 \pm 2.4
<i>Hiatula boeddinghausi (lischke)</i> (째)	97.3 \pm 3.0
<i>Hizikia fusiformis</i> (톳)	78.3 \pm 1.2
<i>Kjellmaniella crassifolia</i> (다시마)	98.3 \pm 2.7
<i>Laminaria japonica areschon</i> (곤포)	88.4 \pm 2.3
<i>Pachymeniopsis (aeodes) inaeolata</i> (개도박)	101.1 \pm 1.8
<i>Pelvetia siliquosa</i> (뜸부기)	99.0 \pm 1.9
<i>Porphyra tenera kjellman</i> (김)	105.9 \pm 2.7
<i>Punctaria latifolia</i> (미역)	90.0 \pm 3.5
<i>Sargassum fulvellum (turner) cagardh</i> (모자반종)	114.9 \pm 1.8
<i>Sargassum fulvellum</i> (참모자반)	75.3 \pm 1.2
<i>Sargassum hornerii</i> (팽생이모자반)	100.9 \pm 1.9
<i>Sargassum thunbergii</i> (지총이)	87.1 \pm 1.3
<i>Seulfos schizophytae tenuifolia labiate</i> (서실)	98.9 \pm 1.2
<i>Sympyocladia latiuscula</i> (보라우무)	49.8 \pm 1.1
<i>Ulva pertusa</i> (구멍갈파래)	94.3 \pm 4.1

Cells were plated in 24-well plates at 50,000 cells/well in DMEM/F12 supplemented with 10% FBS. One day later, the monolayers were serum-deprived with serum-deprivation DMEM/F12 supplemented 1% FBS for 24 hr. After serum deprivation, cells were incubated in serum-deprivation medium with or without 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ the methanol extracts of seaweeds. Cell numbers were estimated by the MTT assay. Values represents the mean \pm SEM (n=6).

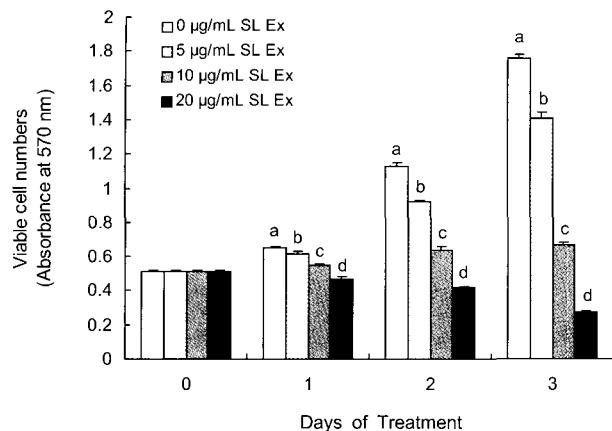


Fig. 1. Effect of the methanolic extract of *Symphyocladia latiuscula* (SL Ex) on viable cell numbers of HT-29 cells. Cells were plated in 24-well plates at 50,000 cells/well in DMEM/F12 supplemented with 10% FBS. One day later, the monolayers were serum-deprived with serum-deprivation DMEM/F12 supplemented 1% FBS for 24 hr. After serum deprivation, cells were incubated in serum-deprivation medium in the absence or presence of various concentrations of SL Ex. Cell numbers were estimated by the MTT assay. Each bar represents the mean \pm SEM ($n=6$). Values with different letters above each bar are significantly different ($p<0.05$) between concentrations of SL Ex.

가하여 세포를 48시간 배양한 후 MTT assay 방법(16)으로 살아있는 세포수를 측정하였다. Table 1에서 나타난 것과 같이 잎파래, 톳, 곤포, 참모자반, 지충이, 보라우무 메탄올추출물이 HT-29 세포의 증식을 억제하였으며, 그 중 보라우무 메탄올추출물이 가장 강한 HT-29 세포 증식 억제 효과를 나타내었다. 보라우무 메탄올추출물의 HT-29 세포 증식에 미치는 영향을 자세히 조사하기 위해 보라우무 메탄올추출물의 농도를 0, 5, 10 또는 20 μ g/mL 농도로 달리하여 세포배양액에 첨가하고 세포를 배양한 후 살아있는 세포수를 측정하였다. 보라우무 메탄올추출물 처리 농도가 증가할수록 유의적으로 세포 증식이 감소하였다(Fig. 1). 보라우무 메탄올추출물에 의한 세포 증식 감소는 추출물 처리 후 24시간부터 나타났으며 시간이 경과함에 따라 세포 증식 감소는 더욱 현저히 나타났다. Kim 등은 보라우무 메탄올추출물이 전립선암세포인 DU145 세포와 유방암세포인 MCF-7 세포의 증식을 억제하였으나 정상 섬유아세포인 CCD1108Sk 세포의 증식에는 영향을 미치지 않음을 보고하였다(17). 이는 보라우무 메탄올추출물이 독성과 부작용이 없는 안전한 항암제 개발의 좋은 소재가 될 수 있음을 제시한다.

보라우무 메탄올추출물이 HT-29 세포의 apoptosis에 미치는 영향

암세포의 apoptosis 유도는 암세포 증식 억제 기전 중의 하나이다(18). 보라우무 메탄올추출물이 HT-29 세포의 증식을 현저히 억제하였으므로(Fig. 1) 보라우무 메탄올추출물이 HT-29 세포의 apoptosis에 미치는 영향을 조사하였다.

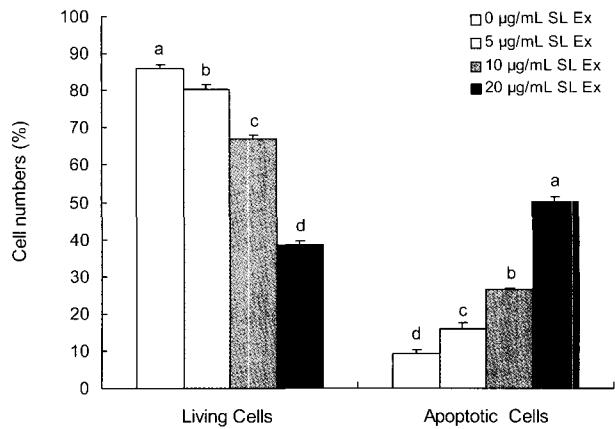


Fig. 2. Effect of the methanolic extract of *Symphyocladia latiuscula* (SL Ex) on apoptotic cell numbers in HT-29 cells. Cells were cultured and treated with SL Ex for 48 hr as described in Fig. 1. Cells were trypsinized, stained with 7-amino-actinomycin D and Annexin V, and then analyzed by flow cytometry. The number of living cells and early apoptotic cells is expressed as a percentage of total cell number. Each bar represents the mean \pm SEM ($n=6$). Values with different letters above each bar are significantly different ($p<0.05$) between concentrations of SL Ex.

농도를 달리하여 보라우무 메탄올추출물을 처리하여 세포를 48시간 배양한 후 Annexin V로 세포를 염색하여 flow cytometry 방법으로 apoptotic cell 수를 정량한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 보라우무 메탄올추출물 처리 농도가 증가 할수록 살아있는 세포수는 감소하였고, early apoptotic cell 수는 현저히 증가하였다(Fig. 2). 이를 통해 보라우무 메탄올추출물에 의한 암세포 증식 억제는 암세포의 apoptosis를 유도함으로써 이루어진다는 것을 알 수 있다. 암세포의 apoptosis 유도는 항암활성을 가지고 있는 성분들의 중요한 특징 중의 하나이며(19), 현재 이용되고 있는 많은 항암제가 암세포의 apoptosis를 유도함으로써 그 효과를 나타내는 것으로 알려지고 있다(14,15). 그러므로 HT-29 세포의 apoptosis를 효과적으로 유도한 보라우무 메탄올추출물은 향후 암예방제나 암치료제로 개발될 수 있는 가능성을 나타낸다.

HT-29 세포에서 보라우무 메탄올추출물의 apoptosis 유도 기전

Apoptosis는 세포 내·외적인 신호에 의해 시작되어 여러 종류의 apoptosis 조절 단백질에 의해 상호 유기적으로 조절된다. Apoptosis를 유도하는 다양한 성분들은 표적으로 하는 apoptosis 조절 단백질이 달라 서로 다른 경로를 통해 apoptosis를 유도한다(18,20-22). 그러므로 apoptosis를 유도하는 각 성분의 apoptosis 유도 기전 연구는 apoptosis 유도를 통해 항암활성을 나타내는 항암제 개발에 매우 중요하다. HT-29 세포에서 보라우무 메탄올추출물의 apoptosis 유도 경로를 조사하기 위해 보라우무 메탄올추출물을 세포 배양액에 첨가하여 48시간 동안 세포를 배양한 후 세포를 수거

하고 cell lysate를 만들어 Western blot을 실시하여 apoptosis 조절 단백질의 변화를 조사하였다.

보라우무 메탄올추출물이 Fas 단백질 수준에 미치는 영향: Apoptosis는 cell death receptor의 활성화에 의해 매개되는 외적 경로와 미토콘드리아 내의 변화에 의해 매개되는 내적 경로에 의해 유도된다(23). Death receptor에 의한 apoptosis 외적 경로는 Fas 또는 TNF receptor 등의 세포막에 존재하는 death receptor에 ligands가 결합함으로써 개시된다. Ligand가 결합된 receptor는 adaptor protein과 caspase-8을 차례로 결합시켜 caspase-8을 활성화하여 apoptosis를 유도한다(24). 반면 미토콘드리아를 통한 내적 경로는 미토콘드리아 막 투과성 변화에 의한다. 미토콘드리아 막 투과성은 Bcl-2 family 단백질에 의해 조절되며, 막 투과성이 증가되면 미토콘드리아에 있던 cytochrome c가 세포질로 방출된다. 세포질로 방출된 cytochrome c는 apoptosis protease-activating factor-1(Apaf-1)과 함께 caspase-9을 활성화하여 apoptosis를 유도한다(25). HT-29 세포에서 보라우무 메탄올추출물에 의해 유도된 apoptosis가 cell death receptor의 활성화에 의해 매개되는 외적 경로에 의한 것인지를 조사하기 위해 Fas와 Fas ligand(FasL)의 단백질 수준이 보라우무 메탄올추출물에 의해 변화하는지를 조사하였다. HT-29 세포에서 세포막에 결합되어 있는 FasL를 본 연구에서 사용한 방법으로 검출하지 못했으나 분자량 43 kDa인 Fas 단백질은 검출할 수 있었다. 보라우무 메탄올추출물에 의해 Fas 단백질 수준은 증가하였고, 추출물을 처리하지 않은 군에 비해 보라우무 메탄올추출물을 20 µg/mL 농도로 처리한 경우 1.9배 증가하였다(Fig. 3). 이 결과는 보라우무 메탄올추출물에 의한 apoptosis가 death receptor에 의한 외적 경로에 의해 시작됨을 제시한다.

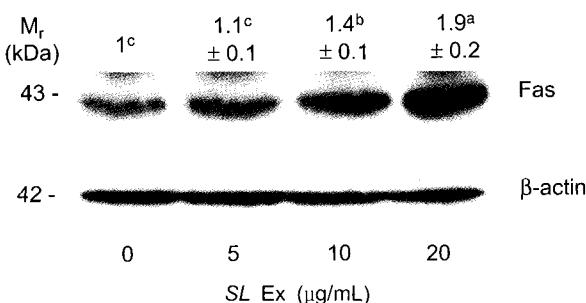


Fig. 3. Effect of the methanolic extract of *Symphyocladia latiuscula* (SL Ex) on the protein levels of Fas in HT-29 cells.

Cells were cultured and treated with SL Ex for 48 hr as described in Fig. 1. Cell lysates were analyzed by immunoblotting with an antibody against Fas or β-actin. Photograph of chemiluminescent detection of the blots, which are representative of 3 independent experiments, are shown. The relative abundance of each band to their own β-actin was quantified and the control levels were set at 1. The adjusted mean ± SEM, n=3, of each band is shown above each blot. Means without a common letter differ, p<0.05.

보라우무 메탄올추출물이 Bcl-2 family 단백질 수준에 미치는 영향: Bcl-2 family 단백질은 미토콘드리아의 막 투과성을 조절하는 단백질로 미토콘드리아를 통한 내적 경로에 의한 apoptosis의 중요한 조절인자이다. Bcl-2 family 단백질은 기능과 아미노산 서열의 유사성에 따라 anti-apoptotic 단백질과 pro-apoptotic 단백질, 그리고 Bcl-2 homology domain(BH)-3 only 단백질로 구분한다(26). Pro-apoptotic 단백질은 미토콘드리아의 막 투과성을 증가시키고, cytochrome c의 방출을 증가시킴으로써 apoptosis를 유도한다. 반면, anti-apoptotic 단백질은 pro-apoptotic 단백질과 heterodimer를 형성하여 pro-apoptotic 단백질의 활성을 억제하여 apoptosis를 막는다(27). BH3 only 단백질은 anti-apoptotic 단백질에 결합하여 anti-apoptotic 단백질에 길항 작용하여 apoptosis를 증가시킨다(28). 특히, BH3 only 단백질 중의 하나인 Bid는 세포질에서 caspase-8에 의해 분해되어 truncated-Bid(t-Bid)로 전환된다. 세포질에 있던 t-Bid는 미토콘드리아로 이동하여 Bax와 결합하고, Bax의 구조적 변화를 초래하여 cytochrome c의 세포질로의 방출을 유도한다(29). HT-29 세포에서 보라우무 메탄올추출물에 의해 초래된 apoptosis가 미토콘드리아 막 투과성 변화에 기인하는지를 알아보기 위해 보라우무 메탄올추출물에 의한 Bcl-2 family 단백질 수준의 변화를 조사하였다. 대표적인 anti-apoptotic Bcl-2 family 단백질인 Bcl-2 단백질 수준은 보라우무 메탄올추출물을 낮은 농도(0~10 µg/mL)로 첨가한 경우 변화하지 않았으나, 20 µg/mL 농도로 처리한 경우 유의적으로 감소하였다. BH3 only 단백질인 Bid 단백질 수준은 보라우무 메탄올추출물 처리에 의해 변화하지 않았으나, Bid의 분절화된 형태인 t-Bid 단백질 수준이 보라우무 메탄올추출물에 의해 유의적으로 증가하여 20 µg/mL 농도로 보라우무 메탄올추출물을 처리한 경우 추출물을 처리하지 않은 군에 비해 3.1배 증가하였다(Fig. 4). 이 결과는 보라우무 메탄올추출물이 t-Bid의 단백질 수준을 증가시켜 미토콘드리아의 막 투과성 증가를 초래하여 apoptosis를 유도했음을 제시한다.

보라우무 메탄올추출물이 caspase 활성에 미치는 영향: Cysteine aspartic acid proteases인 caspase는 apoptosis의 중요한 조절 인자로 여러 종류가 존재하며 initiator caspase와 effector caspase로 구분된다. Initiator caspase인 caspase-8과 caspase-9은 death-inducing signal에 의해 활성화되어 effector caspase들을 활성화시킨다. Initiator caspase인 caspase-8과 caspase-9은 서로 다른 경로를 통해 활성화된다(12,30). 세포막에 존재하는 cell death receptor에 cell death ligands가 결합하면 caspase-8이 활성화되는 반면, caspase-9은 미토콘드리아 막의 투과성이 증가되어 세포질로 방출된 cytochrome c에 의해 활성화된다. 활성화된

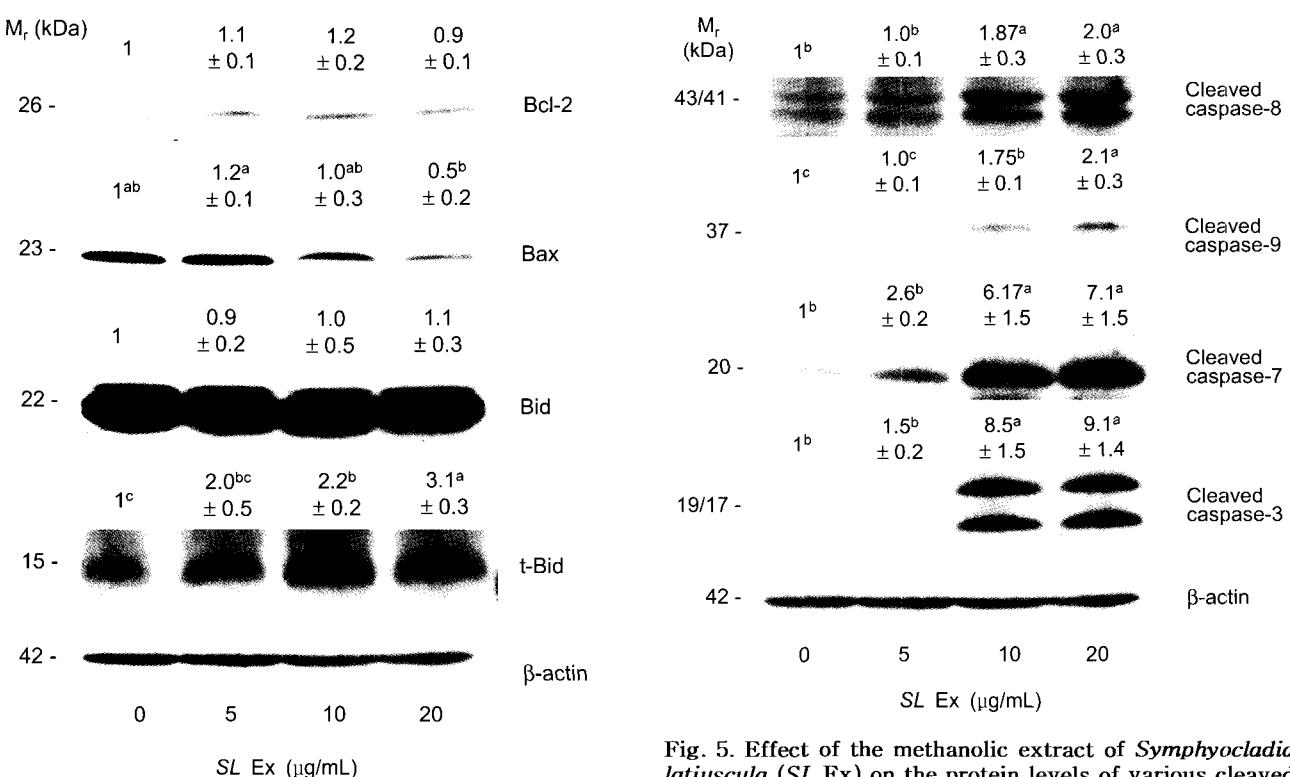


Fig. 4. Effect of the methanolic extract of *Symphyocladia latiuscula* (SL Ex) on the protein levels of Bcl-2, Bax, Bid, t-Bid in HT-29 cells.

Cells were cultured and treated with SL Ex for 48 hr as described in Fig. 1. Cell lysates were analyzed by immunoblotting with an antibody against Bcl-2, Bax, t-Bid or β-actin. Photograph of chemiluminescent detection of the blots, which is representative of 3 independent experiments, are shown. The relative abundance of each band to their own β-actin was quantified and the control levels were set at 1. The adjusted mean±SEM, n=3, of each band is shown above each blot. Means without a common letter differ, p<0.05.

caspase-8 또는 caspase-9은 effector caspase인 caspase-7 또는 caspase-3을 활성화하고, 활성화된 effector caspase은 apoptosis의 형태학적 특징에 관여하는 lamin A, α-fodrin, DNA fragmentation factor(DFF), PARP 등의 단백질을 분해하여 apoptosis를 유도한다(31-34). 여러 연구에서 다양한 항암 성분은 caspase의 활성을 조절하여 암세포의 apoptosis를 유도한다고 보고된(20-22) 바 있어 본 연구에서는 보라우무 메탄올추출물이 caspase의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 caspase의 활성화된 형태인 cleaved caspase들의 단백질 수준을 조사하였다. Initiator caspase인 caspase-8과 caspase-9의 활성화된 cleaved form 단백질 수준이 보라우무 메탄올추출물 처리에 의해 증가하였다. 보라우무 메탄올추출물을 처리하지 않은 대조군에 비해 추출물을 20 µg/mL 농도로 처리한 경우 cleaved caspase-8과 cleaved caspase-9 단백질 수준이 각각 2.0배, 2.1배 증가하였다(Fig. 5). 또한 effector caspase인 cleaved caspase-7과 cleaved caspase-3 단백질 수준이 보라우무 메탄올추출물 처리에 의

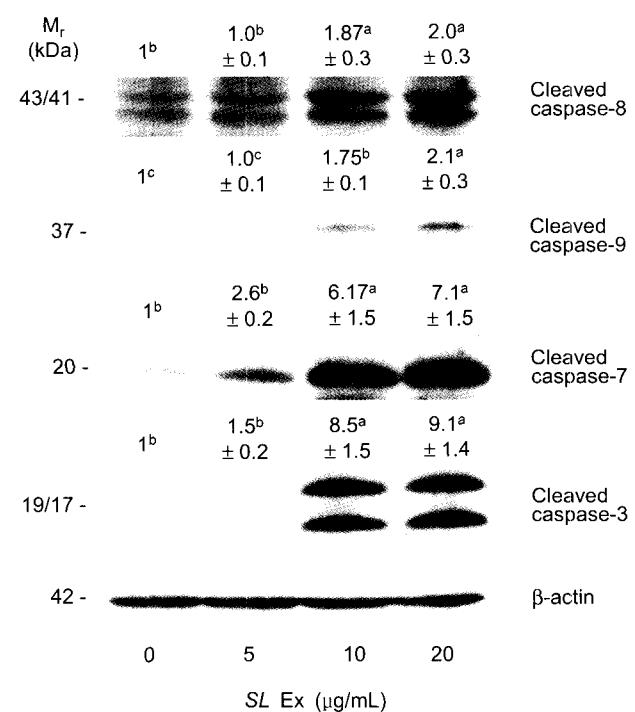


Fig. 5. Effect of the methanolic extract of *Symphyocladia latiuscula* (SL Ex) on the protein levels of various cleaved caspases in HT-29 cells.

Cells were cultured and treated with SL Ex for 48 hr as described in Fig. 1. Cell lysates were analyzed by immunoblotting with an antibody against cleaved caspase-3, cleaved caspase-7, cleaved caspase-8, cleaved caspase-9, or β-actin. Photograph of chemiluminescent detection of the blots, which is representative of 3 independent experiments, are shown. The relative abundance of each band to their own β-actin was quantified and the control levels were set at 1. The adjusted mean±SEM, n=3, of each band is shown above each blot. Means without a common letter differ, p<0.05.

해 현저히 증가하였다(Fig. 5). 이 결과는 caspase 활성 증가가 보라우무 메탄올추출물에 의한 HT-29 세포의 apoptosis에 중요 조절 인자임을 제시한다.

보라우무 메탄올추출물이 cleaved PARP 단백질 수준에 미치는 영향: PARP는 핵에 존재하고, nicotinamide adenine dinucleotide(NAD⁺)에서 poly(ADP-ribose)의 생성을 촉매하는 효소로 DNA 수선에 관여하여 세포의 생존 유지에 주요한 역할을 담당한다(35). PARP는 caspase-3의 주요한 표적 단백질 중의 하나로(36), caspase-3에 의해 조개어져 불활성화 되면 세포의 분해가 촉진되므로, cleaved PARP 수준 증가는 세포가 apoptosis 되고 있음을 나타낸다(37). 보라우무 메탄올추출물에 의해 cleaved caspase-3 단백질 수준이 현저히 증가하였기 때문에 보라우무 메탄올추출물이 PARP를 절단하여 apoptosis를 유도하는지를 알아보기 위해 보라우무 메탄올추출물이 cleaved PARP 수준에 미치는 영향을 조사하였다. 보라우무 메탄올추출물의 처리 농도가 증가할수록 cleaved PARP 단백질 수준은 현저히 증가하였으며, 추출물을 처리하지 않은 대조군에 비해 20 µg/



Fig. 6. Effect of the methanolic extract of *Sympyocladia latiuscula* (SL Ex) on the protein levels of cleaved PARP in HT-29 cells.

Cells were cultured and treated with SL Ex for 48 hr as described in Fig. 1. Cell lysates were analyzed by immunoblotting with an anti-cleaved PARP or β -actin antibody. Photograph of chemiluminescent detection of the blots, which are representative of 3 independent experiments, are shown. The relative abundance of each band to their own β -actin was quantified and the control levels were set at 1. The adjusted mean \pm SEM, n=3, of each band is shown above each blot. Means without a common letter differ, $p<0.05$.

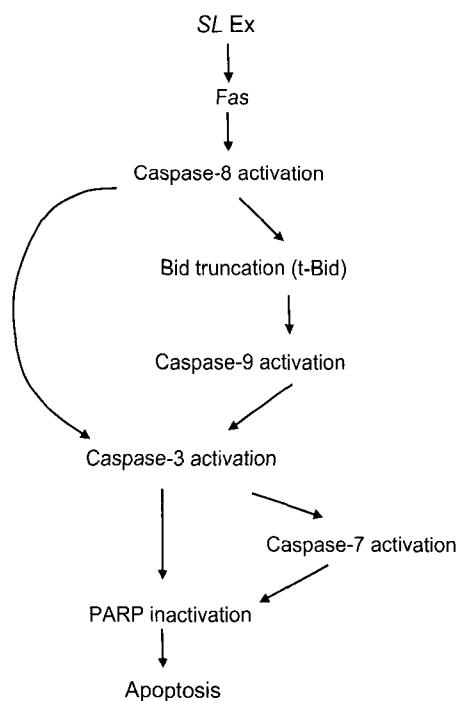


Fig. 7. A schematic representation of a possible mechanism of the methanolic extract *Sympyocladia latiuscula* (SL Ex)-induced apoptosis in HT-29 cells.

mL 농도로 추출물을 처리한 경우 cleaved PARP 단백질 수준이 7.9배 증가하였다(Fig. 6).

이상의 결과들은 보라우무 메탄올추출물이 대장암세포인 HT-29 세포에 apoptosis를 유도함으로써 암세포의 증식을 억제함을 나타낸다. HT-29 세포에서 보라우무 메탄올추출물에 의해 유도된 apoptosis는 caspase-8 활성 증가에 의한 미토콘드리아 막 투과성 변화와 caspase-7/-3 활성의 증가를 통해 apoptosis를 유도함으로써 암세포의 증식을 억제한다는 결론을 내릴 수 있다.

본 연구는 보라우무를 항암효과를 가지고 있는 기능성식품이나 항암제로 개발할 수 있는 가능성을 제시한다. 그러나 보라우무를 이용한 제품을 개발하기 위해서는 향후 보라우무 메탄올추출물에서 항암효과를 나타내는 성분을 동정하고, 그 성분의 작용 기전에 대한 면밀한 연구 수행이 필요할 것으로 사료된다.

요약

해조류는 다양한 생리활성을 나타내는 성분들을 함유하고 있어 항산화효과 등 다양한 생리활성 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서는 식용 가능한 28종의 해조류 메탄올추출물 중 보라우무 메탄올추출물이 인간의 대장에서 유래한 암세포인 HT-29 세포의 세포증식을 억제함을 밝혔고, 가장 강한 HT-29 세포 증식 억제 효과를 나타낸 보라우무 메탄올추출물의 대장암세포 증식억제 기전을 밝히고자 하였다. 보라우무 메탄올추출물을 HT-29 세포 배양액에 여러 농도(0~20 $\mu\text{g/mL}$)로 첨가하여 세포를 배양한 경우 보라우무 메탄올추출물 처리 농도가 증가할수록 세포증식이 현저히 감소하였고, apoptotic cell 수는 현저히 증가하였다. Apoptosis의 주요한 조절인자인 Bcl-2 family 단백질 중 Bcl-2는 보라우무 메탄올추출물에 의해 변화가 없었고 Bax는 고농도에서만 소폭 감소하였다. 반면, t-Bid 단백질 수준은 보라우무 메탄올추출물의 처리에 의해 현저하게 증가하였다. Bcl-2 family protein과 더불어 apoptosis의 조절에 주요한 역할을 하는 caspase 단백질의 경우 보라우무 메탄올추출물 처리에 의해 cleaved caspase-8, -9, -7, -3 단백질 수준이 현저히 증가하였고, cleaved PARP 단백질 수준도 현저히 증가하였다. 또한, caspase-8의 활성화를 유도하는 Fas 단백질 수준도 보라우무 메탄올추출물에 의해 현저하게 증가하였다. 이 결과로부터 보라우무 메탄올추출물은 caspase-8의 활성 증가에 의한 미토콘드리아 막 투과성 변화와 caspase-7/-3 활성의 증가를 통해 apoptosis를 유도함으로써 암세포의 증식을 억제한다는 결론을 내릴 수 있다. 본 연구는 보라우무를 항암효과를 지니는 기능성식품이나 항암제로 개발할 수 있는 가능성을 제시하고 있으며 향후 보라우무를 이용한 제품의 개발을 위해서는 유효성분의 동정 및 그 성분의 작용 기전에 대한 면밀한 추가 연구가 필요할 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 지방기술혁신사업(RT105-01-02) 지원으로 수행되었음.

문헌

- Yang JH. 2005. The effect of foot reflexology on nausea,

- vomiting and fatigue of breast cancer patients undergoing chemotherapy. *J Korean Acad Nurs* 35: 177-185.
2. Kim HS, Kim GJ. 1998. Effect of the feeding *Hijikia fusiforme* (Harvey) Okamura on lipid composition of serum in dietary hyperlipidemic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 718-723.
 3. Yuan YV, Walsh NA. 2006. Antioxidant and anti-proliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. *Food Chem Toxicol* 44: 1144-1150.
 4. Heo SJ, Park EJ, Lee KW, Jeon YJ. 2005. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresour Technol* 96: 1613-1623.
 5. Athukorala Y, Kim KN, Jeon YJ. 2006. Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava*. *Food Chem Toxicol* 44: 1065-1074.
 6. Dias PF, Siqueira JM Jr, Vendruscolo LF, de Jesus Neiva T, Gagliardi AR, Maraschin M, Ribeiro-do-Valle RM. 2005. Antiangiogenic and antitumoral properties of a polysaccharide isolated from the seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Cancer Chemother Pharmacol* 56: 436-446.
 7. Kim MM, Ta QV, Mendis E, Rajapakse N, Jung WK, Byun HG, Jeon YJ, Kim SK. 2006. Phlorotannins in *Ecklonia cava* extract inhibit matrix metalloproteinase activity. *Life Sci* 79: 1436-1443.
 8. Park HJ, Choi JS, Chung HY. 1998. The antioxidant activity in extracts of *Sympyocladia latiuscula*. *J Korean Fish Soc* 31: 927-932.
 9. Lim CW, Lee JS, Cho YJ. 2000. Structures and some properties of the antimicrobial compounds in the red alga, *Sympyocladia latiuscula*. *J Korean Fish Soc* 33: 280-287.
 10. Hengartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-777.
 11. Korsmeyer SJ. 1995. Regulators of cell death. *Trends Genet* 11: 101-105.
 12. Debatin KM. 2004. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 53: 153-159.
 13. Evan GI, Vousden KH. 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411: 342-348.
 14. Arends MJ, Wylie AH. 1991. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 32: 223-254.
 15. Mesner P, Budihardjo I, Kaumann SH. 1997. Chemotherapy-induced apoptosis. *Adv Pharmacol* 41: 461-499.
 16. Denizot F, Lang R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89: 271-277.
 17. Kim EJ, Lim SS, Shin MJ, Shin HK, Park JHY. 2006. Effect of *Sympyocladia latiuscula* extract on the growth of cancer cells. Abstract No P11-035 presented at 73rd Annual Meeting of Korean Society of Food Science & Technology, Jeju, Korea.
 18. Kim EJ, Lee YJ, Shin HK, Park JHY. 2006. A study on the mechanism by the aqueous extract of *Inonotus obliquus* induces apoptosis and inhibits proliferation in HT-29 human colon cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 516-523.
 19. Frankfurt OS, Krishan A. 2003. Apoptosis-based drug screening and detection of selective toxicity to cancer cells. *Anticancer Drugs* 14: 555-561.
 20. Kim EJ, Park SY, Shin HK, Kwon DY, Surh YJ, Park JHY. 2007. Activation of caspase-8 contributes to 3,3'-diindolylmethane-induced apoptosis in colon cancer cells. *J Nutr* 137: 31-36.
 21. Jung JI, Lim SS, Choi HJ, Cho HJ, Shin HK, Kim EJ, Chung WY, Park KK, Park JHY. 2006. Isoliquiritigenin induces apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes in prostate cancer cells. *J Nutr Biochem* 17: 689-696.
 22. Kim EJ, Lee YJ, Shin HK, Park JHY. 2005. Induction of apoptosis by the aqueous extract of *Rubus coreanum* in HT-29 human colon cancer cells. *Nutrition* 21: 1141-1148.
 23. Jin Z, El-Deiry WS. 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 4: 139-163.
 24. Debatin KM, Krammer PH. 2004. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene* 23: 2950-2966.
 25. Green DR, Reed JC. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1312.
 26. Cory S, Huang DC, Adams JM. 2003. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22: 8590-8607.
 27. Koesmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE, Oltvai ZN. 1993. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* 4: 327-332.
 28. Bouillet P, Strasser A. 2002. BH3-only proteins—evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* 115: 1567-1574.
 29. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94: 481-490.
 30. Thornberry N, Lazebnik Y. 1998. Caspase: enemies within. *Science* 281: 1312-1316.
 31. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Wang X. 1999. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 269-290.
 32. Ashkenazi A, Dixit VM. 1998. Death receptor: signaling and modulation. *Science* 281: 1305-1308.
 33. Nijhawan LP, Budihardjo D, Srinivasula I, Ahmad SM, Alnemri M, Wang X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91: 479-489.
 34. Baker SJ, Reddy EP. 1998. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 17: 3261-3270.
 35. Satoh MS, Lindahl T. 1992. Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature* 356: 356-358.
 36. Nichoson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M. 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376: 37-43.
 37. Oliver FJ, de la Rubia G, Rolli V, Ruiz-Ruiz MC, de Murcia G, Murcia JM. 1998. Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *J Biol Chem* 273: 33533-33539.