

## 키토산 가수분해물의 *In Vitro* 항종양성

†박 헌 국

동남보건대학 식품영양과

### *In Vitro* Antineoplastic Effects of Chitosan Hydrolysates on Various Tumor Cell Lines

†Heon-Kuk Park

Dept. of Food and Nutrition, Dongnam Health University, Suwon 440-714, Korea

#### Abstract

In this study, the antineoplastic effects of chitosan hydrolysates were assessed. The chitosan hydrolysates showed no cytotoxicity in *in vitro* trials using the normal cell line, Vero E6(Africa green monkey kidney cells). The IC<sub>50</sub> value of the chitosan hydrolysates on Vero E6 was 1,107.95  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . The hydrolysates exhibited *in vitro* antineoplastic activity in five human tumor (lung carcinoma, bladder carcinoma, colon carcinoma, stomach carcinoma, breast carcinoma) cell lines. The IC<sub>50</sub> values of the hydrolysates on A549, J82, SNU-C4, SNU-1, and ZR75-1 cells were 421.06, 417.99, 445.54, 380.65 and 460.49  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively.

Key words: chitosan hydrolysates, cytotoxicity, antineoplastic effects.

#### 서 론

현재 우리나라에서 식품 첨가물로 지정되어 있는 키토산 올리고당은 그 우수한 기능성을 강조한 기능성 식품 소재로서 여러 가지 가공식품에 첨가되어 사용되고 있을 뿐만 아니라 건강식품으로도 개발되어 활발하게 판매되고 있다. 이와 같이 키토산 올리고당은 다수의 기업체로부터 많은 양이 생산되어 사용되고 있으며, 키토산 올리고당의 생리적 기능이 우수하다고 선전하고 있으나, 실제로 자사 제품의 생리적 기능성에 대한 연구결과는 거의 없다.

현재까지 보고된 키토산 올리고당의 생리적 기능성에 대한 연구결과로는 키토산 올리고당의 항균성(Shimojoh 등 1996; Jeon & Kim 1997; Uchida 등 1998; Park HK 2001; Park 등 2002; Hahn & Nam 2004; Jin & Oh 2004), 면역부활작용(Tokoro 등 1988; Ryu BH 1992), 항종양성(Ryu BH 1992; Nam 등 1999; Park HK 2009), 식물세포 성장촉진작용(Kendra & Hadwiger 1984), 혈중 콜레스테롤치 저하작용(Kim & Seong 2008) 등이

있었다. 그러나 아직 키토산 올리고당의 항종양성을 비롯한 다양한 생리적 기능성에 관한 기초 연구와 작용기작에 대한 연구가 부족하므로 이에 대한 지속적이고 체계적인 연구가 절실한 실정이다. 특히 다양한 키토산 올리고당들은 항종양성을 나타내는 것으로 알려져 있으나, 분자량에 따른 항종양성의 차이에 대한 연구가 거의 없어서 이에 대한 연구가 필요한 상황이다.

본 연구에서는 효소분해법으로 직접 제조한 키토산 가수분해물의 정상세포에 대한 세포 독성, 종양세포에 대한 *in vitro* 항종양성에 대하여 조사하였다.

#### 재료 및 방법

##### 1. 키토산 가수분해물의 제조

키토산 가수분해물은 전보의 방법(Park HK 1999)에 따라서 키토산에 *Trichoderma viride* 유래의 셀룰레이스(cellulase)를 처리하여 제조하였다.

† Corresponding author: Heon-Kuk Park, Dept. of Food and Nutrition, Dongnam Health University, 937 Jeongja-dong, Jangan-gu, Suwon-si, Gyeonggi-do 440-714, Korea. Tel: +82-31-249-6422, Fax: +82-31-249-6420, E-mail: foodopia@dongnam.ac.kr

생산된 키토산 가수분해물을 전보의 방법(Park HK 1999)에 따라서 HPLC 분석한 결과, 2량체(dimer)가 14.24%, 3량체(trimer)가 13.55%, 4량체(tetramer)가 6.59%, 5량체(pentamer)가 7.27%, 6량체(hexamer)가 9.04%, 7량체(heptamer)가 16.39%, 8량체(octamer) 이상이 32.93%로 6량체 이상이 전체 올리고당 중 58.36%에 달하는 비교적 중합도가 높은 화합물로 구성된 키토산 올리고당이었다.

## 2. 세포 독성과 항종양성의 측정

키토산 가수분해물의 세포 독성과 항종양성은 전보의 방법(Park HK 2009)에 따라서 측정하였다.

정상 세포주로는 Vero E6(Africa green monkey kidney cell)를 사용하였고, 종양 세포주로는 간암 세포주인 A549, 방광암 세포주인 J82, 대장암 세포주인 SNU-C4, 위암 세포주인 SNU-1, 유방암 세포주인 ZR75-1을 사용하였다. 정상 세포주와 암 세포주에 대한 세포 독성 실험은 MTT(3-[4,5-dimethyl thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 검색법에 의해 수행하였다.

항종양성 실험에 사용한 암세포주의 적정세포수는 약물처리하지 않은 대조군에서 세포 접종 당시로부터 4일 후 MTT 실험 종료 시에 모두 세포가 지수 함수적으로 활발히 증식하면서 MTT 처리 후의 OD<sub>540</sub>값이 0.6~0.7에 이를 수 있는 세포수로 정하였다. 적정수의 세포를 180  $\mu$ l의 배지에 부유시켜 96-well plate의 12개 컬럼 중 10개의 컬럼에 접종하였다. 시료는 100% DMSO(dimethyl sulfoxide)의 배지 내 최종농도가 0.02% 되도록 하였다. 20  $\mu$ l씩 각 well에 가한 시료의 최종 농도는 well당 각각 1,200, 600, 300, 150 및 75  $\mu$ g/ml가 되도록 하였다. 한 가지 농도군에 대해서는 1컬럼(8 wells)을 동일한 조건으로 사용하며, 나머지 한 컬럼에는 약물 대신 PBS(0.2% DMSO)만을 20  $\mu$ l 첨가하여 100% 생존군(control survival)으로 삼았다. 흡광도 측정 시 사용할 blank에는 세포 없는 배지만을 180  $\mu$ l 가하고 PBS 또는 약물을 20  $\mu$ l 첨가하였다. 암세포와 약물이 접종된 plate를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 4일간 배양한 후 0.1 mg의 MTT(Sigma M 2128)를 모든 well에 가하고 37°C에서 4시간 배양하였다. 배양 종료 시 plate를 450 $\times$ g에서 5분간 원심분리한 후 배지를 30  $\mu$ l 정도만 남기고 제거하였다(이 때 각 well의 바닥에 형성된 formazan 결정이 흐트러지지 않도록 주의하였다). 배지가 제거된 각 well에 DMSO를 150  $\mu$ l씩 가한 후에 formazan 결정이 녹을 때까지 약 10분간 가볍게 진탕해 주고 바로 microplate reader(scanning multiwell spectrophotometer)로 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 이 흡광도는 MTT가 세포에 의해 formazan으로 분해된 양을 나타내며, 따라서 각 well에 살아있는 세포(viable cell)의 수와 비례한다.

정상 세포주인 Vero E6 세포에 대한 세포 독성 실험도 상기와 같이 MTT법으로 검색하였으나, 시료의 농도를 3,000  $\mu$ l

ml부터 2배수 희석하여 사용하였다. 시험군에서 8개 well의 OD<sub>540</sub> 값으로부터 한 컬럼의 평균 OD<sub>540</sub> 값을 구하여 대조군(100% 생존군)의 평균 OD<sub>540</sub> 값에 대한 백분율을 산출하였다. 이 백분율은 대조군과 비교한 시험군의 세포 생존율에 해당하는 값이다. 50% 억제농도(IC<sub>50</sub>)는 이 생존율이 50%가 되도록 하는 약물의 농도로 정의하였으며, 이 IC<sub>50</sub>값을 항암효과의 지표로 사용하였다.

## 결과 및 고찰

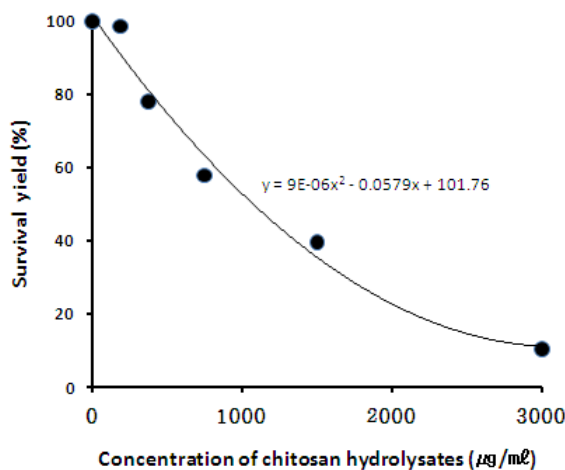
### 1. 정상세포주에 대한 세포 독성

정상세포주에 대한 세포 독성을 실험한 결과는 Fig. 1과 Table 1에 나타난 바와 같이 IC<sub>50</sub>값은 1,107.95  $\mu$ g/ml로 정상세포주에 대한 세포 독성은 거의 없었다. 따라서 키토산 가수분해물은 항균성, 면역부활기능, 항종양성 등 다양한 생리활성 기능을 활용한 기능성 식품 첨가물로 이용함에 있어서 안전성이 높은 물질이라고 판단된다.

**Table 1. Cytotoxic effect of chitosan hydrolysates on various cell lines**

Cell lines	Characteristics	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)
Vero E6	Normal cell <sup>1)</sup>	1,107.95
A549	Human lung carcinoma	421.06
J 82	Human bladder carcinoma	417.99
SNU-C4	Human colon carcinoma	445.54
SNU-1	Human stomach carcinoma	380.65
ZR75-1	Human breast carcinoma	460.49

<sup>1)</sup> Africa green monkey kidney cell.



**Fig. 1. Cytotoxic effect of chitosan hydrolysates on normal cell line, Vero E6(Africa green monkey kidney cell).**

2. 종양세포주에 대한 항종양성

폐암 세포주인 A549에 대한 세포 독성 실험 결과는 Fig. 2와 Table 1에 나타난 바와 같이 IC<sub>50</sub>값은 421.06 μg/ml로 항종양성을 나타내었다. 방광암 세포주인 J82에 대한 세포 독성 실험 결과는 Fig. 3과 Table 1에 나타난 바와 같이 IC<sub>50</sub>값은 417.99 μg/ml로 항종양성을 나타내었다. 대장암 세포주인 SNU-C4에 대한 세포 독성 실험 결과도 또한 Fig. 4와 Table 1에 나타난 바와 같이 IC<sub>50</sub>값은 445.54 μg/ml로 항종양성을 나타내었다. 위암 세포주인 SNU-1에 대한 세포 독성 실험 결과도 Fig. 5와 Table 1에 나타난 바와 같이 IC<sub>50</sub>값은 380.65 μg/ml로 항종양성을 나타내었다. 유방암 세포주인 ZR75-1에 대한 세포 독성 실험 결과도 Fig. 6과 Table 1에 나타난 바와 같이 IC<sub>50</sub>값은 460.49 μg/ml로 항종양성을 나타내었다.

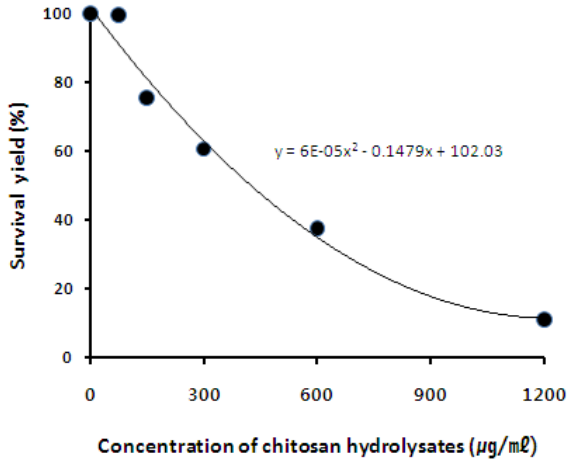


Fig. 2. *In vitro* antineoplastic effect of chitosan hydrolysates on tumor cell line, A549(Human lung carcinoma).

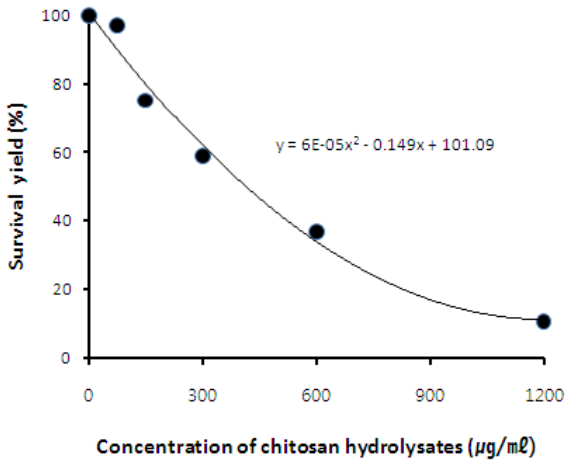


Fig. 3. *In vitro* antineoplastic effect of chitosan hydrolysates on tumor cell line, J82(Human bladder carcinoma).

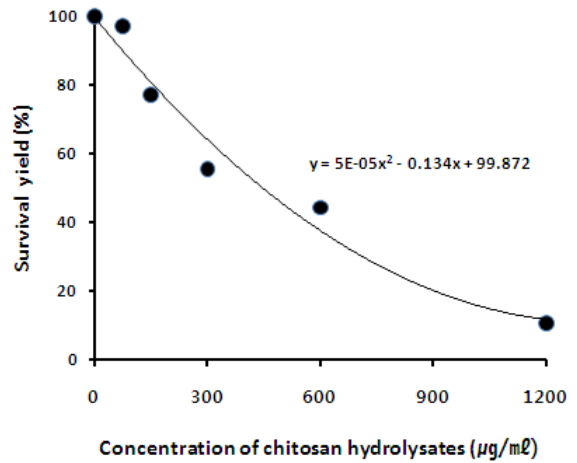


Fig. 4. *In vitro* antineoplastic effect of chitosan hydrolysates on tumor cell line, SNU-C4(Human colon carcinoma).

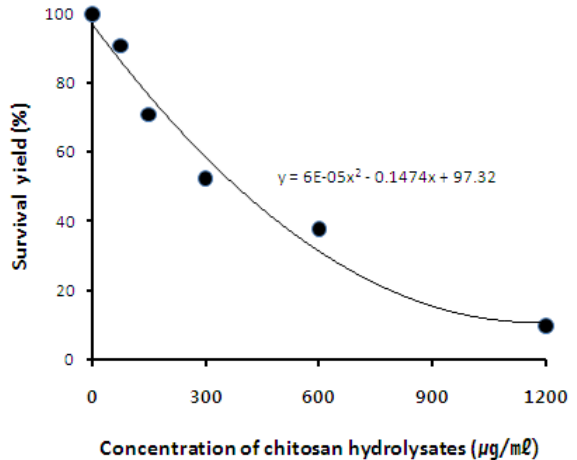


Fig. 5. *In vitro* antineoplastic effect of chitosan hydrolysates on tumor cell line, SNU-1(Human stomach carcinoma).

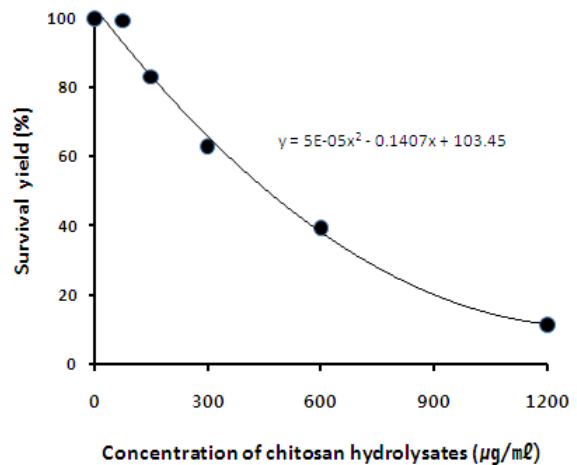


Fig. 6. *In vitro* antineoplastic effect of chitosan hydrolysates on tumor cell line, ZR75-1(Human breast carcinoma).

키토산 가수분해물은 모든 사람 종양세포에 대하여 항종양성을 나타냈는데, 이는 진보(Park HK 2009)의 경우와 마찬가지로 Ryu BH(1992)가 새우 껍질로부터 추출한 키토산을 가지고 종양 세포주에 대한 *in vitro* 항종양성을 측정 한 결과 항종양성을 나타내지 않았으며, 이는 키토산의 항종양성이 직접적인 세포 독성에 의하지 않고 면역기능의 활성화에 기인한다고 보고한 것과는 상이한 결과였다. 이와 같은 차이는 키토산과 키토산 올리고당의 분자량 차이에 따른 세포내로의 이동 가능성에 기인하는 것으로 판단된다.

Tokoro 등(1988)에 의하면 키토산 올리고당의 항종양성이 COS-6에 의하여 나타난다고 보고하였는데, 진보(Park HK 2009)의 경우와 마찬가지로 COS-6만이 항종양성을 나타낸다고 가정할 경우 키토산 올리고당 각각의 COS-6 함량과 항종양성을 비교하였을 때 활성이 잘 일치하지 않는다. 또한 진보의 결과와 비교할 때 종양세포주에 따라서 다소의 차이가 있지만 폐암 세포주, 방광암 세포주, 유방암 세포주에 대한 항종양성은 저분자량 키토산 올리고당의 경우보다 본 실험에 사용된 키토산 가수분해물이 더 높은 것을 확인할 수 있었는데, 이는 6량체 이상의 고분자량 키토산 올리고당이 항종양성에 관여할 것으로 추정된다. 그러나 어떤 크기의 키토산 올리고당이 항종양성에 관여하는지 어떠한 기작으로 항종양성을 나타내는지 밝히기 위한 추가적인 연구가 계속되어야 할 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 본 실험에 사용된 키토산 가수분해물은 독성이 없는 안전한 물질로 생각되며 *in vitro* 항종양성을 가지고 있을 뿐만 아니라 세포의 면역기능을 활성화시키는 등의 우수한 생리적 기능을 갖는 새로운 개념의 기능성 식품 소재로 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

## 요 약

키토산 가수분해물의 세포 독성 및 항종양성 실험에서 키토산 가수분해물은 정상세포주인 Vero E6(Africa green monkey kidney cell)에 대한 세포 독성을 거의 나타내지 않았다. 정상세포주에 대한 키토산 가수분해물의 IC<sub>50</sub>값은 1,107.95 µg/ml이었다. 키토산 가수분해물은 폐암 세포주인 A549, 방광암 세포주인 J82, 대장암 세포주인 SNU-C4, 위암 세포주인 SNU-1, 유방암 세포주인 ZR75-1 등과 같은 사람의 종양세포주에 대한 *in vitro* 항종양성을 나타내었다. 종양세포주에 대한 키토산 가수분해물의 IC<sub>50</sub>값은 A549, J82, SNU-C4, SNU-1, ZR75-1 세포주의 경우에 각각 421.06 µg/ml, 417.99 µg/ml, 445.54 µg/ml, 380.65 µg/ml, and 460.49 µg/ml이었다.

## 참고문헌

- Cho HR, Chang DS, Lee WD, Jeong ET, Lee EW. 1998. Utilization of chitosan hydrolysate as a natural food preservative for fish meat paste products. *Korean J Food Sci Technol* 30:817-822
- Hahn HG, Nam KD. 2004. Fungicidal activities of chitosan against plant pathogens. *J Chitin Chitosan* 9:73-78
- Jeon YJ, Kim SK. 1997. Antitumor, antibacterial and calcium absorption acceleration effects of chitosan oligosaccharides prepared by using ultrafiltration membrane enzyme reactor. *Korean J Chitin and Chitosan* 2:60-78
- Jin SS, Oh DH. 2004. Combined effect of chitosan oligosaccharide and monolaurin about *Listeria monocytogenes*. *J Chitin Chitosan* 9:68-72
- Kendra DF, Hadwiger LA. 1984. Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. *Exp Mycol* 8:276-281
- Kim HS, Seong JH. 2008. Effects of chitosan oligosaccharide supplementation on blood glucose, lipid components, and enzyme activities in hyperglycemic rats. *Korean J Food & Nutr* 21:328-335
- Nam MY, Shon YH, Kim SK, Kim CH, Nam KS. 1999. Inhibitory effect of chitosan oligosaccharides on the growth of tumor cells. *J Chitin Chitosan* 4:184-188
- Park HK. 1999. Aggregation property of chitosan and chitooligosaccharides. *Korean J Food & Nutr* 12:597-602
- Park HK. 2001. Antimicrobial activity of chitooligosaccharides. *Korean J Food & Nutr* 14:579-584
- Park HK. 2009. Antineoplastic effect of low molecular weight chitooligosaccharide on various tumor cell lines. *Korean J Food & Nutr* 22:308-312
- Park PJ, Kim SK, Lee HK. 2002. Antimicrobial activity of chitooligosaccharides on *Vibrio parahaemolyticus*. *J Chitin Chitosan* 7:225-230
- Ryu BH. 1992. Antitumor and immunological activity of chitosan extracted from shell of shrimp. *J Korean Food Nutr* 21: 154-162
- Shimojoh M, Masaki K, Kurita K, Fukushima K. 1996. Bactericidal effect of chitosan from squid pens on oral streptococci. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 70:787-792
- Tokoro A, Tatewaki N, Suzuki K, Mikami T, Suzuki S. 1988. Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose and

chitohexaose against Meth-A solid tumor. *Chem Pharm Bull*  
36:784-790

Uchida Y, Izumi M, Ohtakara A. 1988. Preparation of chitosan  
oligomers with purified chitosanase and its application.

*Annual Review of Japanese Society for Chitin and Chitosan*  
1988:93-102

---

(2009년 11월 7일 접수; 2009년 12월 14일 채택)