

산천어(*Oncorhynchus masou*) 에탄올 추출물의 *in vitro* 및 *in vivo*에서 항암활성

오현택¹ · 정미자² · 함승시^{1*}

¹강원대학교 BT특성화학부(대학) 식품생명공학전공

²강원대학교 BK21 사업단(뉴트라슈티컬 바이오)

Anticancer Activity on Ethanolic Extract of the Masou Salmon (*Oncorhynchus masou*) *in vitro* and *in vivo*

Hyun-Taek Oh¹, Mi-Ja Chung², and Seung-Shi Ham^{1*}

¹Dept. of Food Science and Biotechnology, Division of Biotechnology,
School of Bioscience and Biotechnology, and

²The Nutraceutical Bio Brain Korea 21 Project Group,
Kangwon National University, Gangwon 200-701, Korea

Abstract

The cytotoxic activity against human cancer cells and anti-tumor effect in Balb/c mice of a 70% ethanol extract from masou salmon (MSE) was investigated. The cancer cell lines including human breast adenocarcinoma (MCF-7), human lung carcinoma (A549), human hepatoblastoma (HepG2), human gastric carcinoma (AGS), human cervical adenocarcinoma (HeLa) and transformed primary human embryonal kidney (293) exposed to MSE decreased cell viability as indicated by the MTT assay. The MSE shows significant cytotoxicity on MCF-7, A549, HepG2, AGS and HeLa cells, and are more active than 293 cells. The treatment with 1 mg/mL MSE resulted in 9.2%, 12.7%, 16.6%, and 16.9% cell survival against A549, MCF-7, HepG2, and AGS cells, respectively. Moreover, anticancer effect *in vivo* of MSE was tested in the animal system using Balb/c mice transplanted sarcoma-180 cells. MSE showed inhibition of tumor growth and the rate of inhibition was 44.7% and 55.7% at the 25 mg/kg body weight and 250 mg/kg body weight, respectively. Thus, we suggest that MSE could be a beneficial material for human cancer prevention.

Key words: *Oncorhynchus masou*, cytotoxicity, antitumor effects

서 론

산천어는 최초 연구된 우리나라의 연어속 어류 중 하나로 1934년 Mori(1)에 의해 13종의 연어류가 보고되었으며 1974년 연구결과에 의하면 우리나라에는 시마연어(*O. masou* var *masou*), 연어(*O. keta*), 낙연어(*O. lagocephalus*), 곱사연어(*O. gorbuscha*), 산천어(*O. masou* var *ishikawai*), 은연어(*O. kisutch*) 및 무지개송어(*O. mykiss*)로 7종의 연어과 어류가 보고되었다(2). 그러나 현재 우리나라 하천에 서식하거나 하천으로 회귀하는 어종은 연어, 시마연어, 무지개송어 및 산천어뿐이다. 이들은 하천에서 산란 부화되며 그 후 연어, 시마연어 및 무지개송어는 바다로 내려가지만 산천어는 1년에서 수년간을 담수에서 서식한다(3-6). 우리나라의 대표적인 민물어종인 산천어에 대한 다양한 연구가 진행되어 왔지만 산천어 그대로를 요리하여 식용하는 식품으로 이용되고 있어서 기능성식품 소재로 활용가능한지에 대한 연구와 개발이 미흡한 실정이다. 이미 소비자들은 식품의 역할에

있어서 맛과 기호도 뿐만이 아니라 영양, 생체기능의 증진과 더불어 질병의 예방과 치료에까지 높은 기대와 관심을 갖고 있다(7-9). 선행연구에서 산천어 가용부위의 화학적 성분분석(10)을 실행하여 기능성식품 이용의 과학적 기초 자료를 제시한 바 있으며 또한 산천어 70% 에탄올 추출물의 항산화 활성, 돌연변이원성 유무와 항돌연변이원성(11)을 확인하였다. 이에 본 연구에서는 산천어에 대하여 이루어진바 없는 생리활성 검색을 위하여 인간 암세포와 실험동물을 이용해 *in vitro* 및 *in vivo*에서의 항암효과를 알아보았다. 본 연구는 상기에 명시한 실험을 통하여 산천어의 국민 건강 증진 효과와 기능성에 대한 과학적인 자료를 제시함에 그 의의가 있으며 또한 산천어 추출물이 웰빙 기능성 식·의약소재로 이용될 수 있을 가능성을 제시해 주는 기초 자료를 확보하고자 하였다. 따라서 본 연구 결과에 의해 산천어가 국내산 양식 어종으로서의 그 부가가치를 높일 수 있을 것이라고 사료되며 뿐만 아니라 식품산업에도 기능성 소재로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

*Corresponding author. E-mail: hamss@kangwon.ac.kr
Phone: 82-33-250-6453, Fax: 82-33-250-6453

재료 및 방법

실험재료 및 추출물 제조

본 실험에 이용한 산천어 시료는 강원도 화천군 나라축제 조직위원회로부터 제공받아 암수 개체의 구분 없이 실험에 이용하였으며 머리, 꼬리 및 지느러미를 제거한 뒤 가용 부위만 취하여 동결건조 후 분쇄하였다. 분쇄를 통해 얻은 산천어 분말에 중량의 10배인 70% 에탄올을 첨가하고 80°C에서 24시간 동안 3회에 걸쳐 추출한 후, 감압여과 장치에서 뜨거운 상태로 여과한 후 감압농축기를 사용하여 추출용매를 제거한 후 동결건조를 통해 추출물을 얻었다. 동결 건조한 시료는 DMEM 배지에 녹여 즉시 *in vitro*와 *in vivo* 항암 실험을 위해 사용하였다.

MTT assay를 이용한 *in vitro*계 항암실험

암세포 세포주로 인간 폐암세포 A549(Human lung carcinoma, KCLB No. 10185), 인간 위암세포 AGS(Human gastric carcinoma, KCLB No. 21739), 인간 간암세포 HepG2(Human hepatoblastoma, KCLB No. 88065), 인간 유방암세포 MCF-7(Human breast adenocarcinoma, KCLB No. 30022) 및 인간 자궁암세포 HeLa(Human cervical adenocarcinoma, KCLB No. 1002)가 이용되었고, 정상세포로는 293(Transformed primary human embryonal kidney, KCLB No. 21573)을 Korea Cell Line Bank로부터 구입하여 사용하였다. HeLa, HepG2, MCF-7 및 293 세포주는 DMEM 배지를 AGS 및 A549 세포주는 RPMI 1640 배지를 이용하여 10% FBS(fetal bovine serum), 37°C, 5% CO₂에 적응시켜 각각 배양시킨 후 산천어 70% 에탄올 추출물이 인간 암세포에 미치는 영향을 Chung 등(12)이 사용한 MTT[3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 환원 방법을 이용하여 측정하였다.

측정 시 공시료는 DMSO로 하였고, 세포의 생존율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{세포생존율(\%)} = \left(\frac{\text{시료처리군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

Sarcoma-180 cell을 이용한 *in vivo*계 항암실험

실험에 사용한 동물은 웅성 Balb/c mice로 5주령의 체중 20~22 g인 개체를 사용하였으며 표준사료로 사육하였고 동물실험실 온도는 23±2°C, 습도 50±5%를 유지하였으며 12시간 간격의 light-dark cycle을 유지하였다.

실험에 이용한 sarcoma-180 종양세포는 Korea Cell Line Bank로부터 구입하여 DMEM 배지에 배양한 후 Balb/c mouse의 복강에 주입하여 복강 내에 7~10일 간격으로 계대배양 하여 보존하면서 사용하였다. 즉 실험동물의 복강 내에서 7~10일간 배양된 sarcoma-180 세포를 복수와 함께 취하고 phosphate buffered saline(PBS)과 함께 원심분리(1,200 rpm, 10 min)하여 종양세포를 분리하였다. 분리된 세

포를 다시 PBS에 부유시켜 재차 원심분리하여 상등액을 제거한 후 1.0×10⁶ cells/mL가 되도록 종양세포 부유액으로 만들어 1 mL씩을 복강 주사하여 이식 보존하면서 실험에 사용하였다(13).

고형암 성장저지 실험은 각 군당 6마리의 마우스의 왼쪽 서혜부(left groin)에 sarcoma-180 종양세포 부유액 0.2 mL(6×10⁶ cells/mouse)씩을 피하 이식하고, 24시간 후부터 20일간 매일 1회씩 시료 용액 200 μL를 복강으로 투여하였다. 종양세포 이식 26~30일째 되는 날 치사시켜 생성된 고형암을 적출하고 그 무게를 측정된 후 다음 식에 따라 종양 성장 저지 백분율(tumor growth inhibition ratio, I.R: %)을 계산하였다.

$$\text{I.R. (\%)} = \frac{Cw - Tw}{Cw} \times 100$$

Cw: 대조군의 평균 종양무게, Tw: 처리군의 평균 종양무게

통계처리

실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 SPSS(statistical package for social sciences) program을 이용하여 실험군당 평균±표준편차로 표시하였고, 각 군의 평균차의 통계적 유의성을 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 검정하였다.

결과 및 고찰

MTT assay를 이용한 *in vitro*계 항암효과

산천어 70% 에탄올 추출물이 암세포 성장억제에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay와 5종의 암세포와 1종의 정상세포 모델을 이용하였다. 인간 자궁암(HeLa), 간암(HepG2), 유방암(MCF-7), 위암(AGS) 및 폐암(A549) 세포에 산천어 추출물을 처리한 후 세포 생존율을 알아 본 결과는 Fig. 1과 같다.

산천어 70% 에탄올 추출물은 본 실험에 사용된 모든 암세포에 대하여 농도 의존적으로 암세포 성장 억제효과를 나타내었다(Fig. 1). 시료의 최고농도인 1 mg/mL를 인간 폐암세포(A549)에 처리한 결과 세포 생존율은 9.2%로 5종류의 암세포 중 가장 낮은 세포 생존율을 보여주었다. 또한 시료 최고농도인 1 mg/mL에서 유방암세포(MCF-7), 간암세포(HepG2) 및 위암세포(AGS)에 대하여 각각 12.7%, 14.6% 및 16.9%의 세포 생존율을 나타내었다. 이는 산천어 70% 에탄올 추출물이 다양한 암세포의 성장을 80% 이상 억제하는 결과를 보여 주었다. 그러나 자궁암세포(HeLa)의 경우 동일한 시료농도에서 40% 이상의 세포 생존율이 나타나 암세포 성장 억제 효과가 비교적 낮게 나타났다.

5종류의 암세포에 산천어 에탄올 추출물을 처리했을 때는 5종류 암세포 중에 폐암세포(A549)와 위암(AGS)에서 세포 독성이 가장 높았고, 고농도에서는 폐암세포(A549)가 위암(AGS)세포보다 세포 생존율이 낮거나 유사하였지만 저농

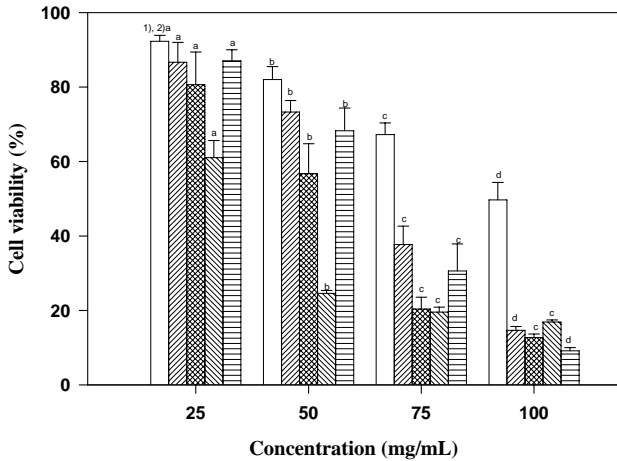


Fig. 1. Cytotoxicity of 70% ethanolic extracts from *masou salmon* on human cancer cells. □ : HeLa (human cervical adenocarcinoma), ▨ : HepG2 (human hepatoblastoma), ▩ : MCF-7 (human breast adenocarcinoma), ▪ : AGS (human gastric carcinoma), ▤ : A549 (human lung carcinoma). ¹⁾Values are the mean±SD (n=3). ²⁾Means with the different letters in same cell line are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

도에서는 5종류의 암세포 중 위암(AGS)세포가 가장 낮은 세포 생존율을 나타내었다. 이와 같이 산천어 에탄올 추출물의 암세포 사멸효과는 세포주에 따라, 추출물 첨가 농도에 따라 차이가 있으며 5종류 암세포들 중 위암(AGS) 세포에 대한 사멸효과가 전반적으로 높았는데 이는 위암 예방 및 치료에 사용될 수 있을 산천어 성분이 에탄올에 잘 녹는 물질일 것으로 추정된다. 뿐만 아니라 산천어 70% 에탄올 추출물은 다양한 암 예방이나 치료를 위해 사용될 수 있을 가능성 역시 제시하였고, 저농도에서는 위암(AGS)세포를 그리고 고농도에서는 폐암세포(A549)를 효과적으로 사멸시키는 천연 소재라는 것을 알 수 있었다.

Kim 등(14)의 인진쑥 추출물에 대한 실험에서 마우스 유래 암세포에 대해서 세포 성장 억제효과가 50% 이상이 되면 항암효과가 있다고 가정하였다. 이에 따르면 산천어 70% 에탄올 추출물은 시료농도 0.75 mg/mL에서 HeLa 세포를 제외한 HepG2, MCF-7, AGS 및 A549 세포에 대하여 항암 효과가 있는 것으로 나타났다.

또한 인간신장 정상세포(293)에 대한 산천어 70% 에탄올 추출물의 세포독성을 확인한 결과 0.25, 0.5 및 0.75 mg/mL의 시료 농도에서 90% 이상의 세포 생존율을 나타내었으며 1 mg/mL의 시료 최고농도에서 역시 60% 이상의 세포 생존율을 나타내어 암세포보다 정상 세포에서 낮은 세포독성을 나타낸다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

Sarcoma-180 cell을 이용한 *in vivo*계 항암효과

산천어 70% 에탄올 추출물의 *in vivo*에서의 항암효과를 검토하기 위하여 복수암 세포(sarcoma-180)를 이용한 실험 동물에서의 고형암 성장 억제 효과를 알아보았으며, 그 결과

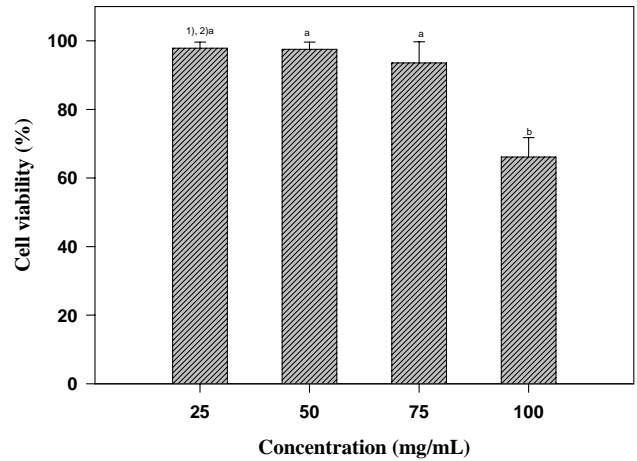


Fig. 2. Cytotoxicity of 70% ethanolic extracts from *masou salmon* on 293 cells (transformed primary human embryonal kidney). ¹⁾Values are the mean±SD (n=3). ²⁾Means with the different letters are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

를 Table 1에 나타내었다. 시료를 투여하지 않은 대조군과 비교하여 산천어 70% 에탄올 추출물은 항종양 활성이 있는 것으로 평가되었으며 저농도 투여 시보다 고농도에서 고형암 성장 억제 효과가 약간 높았다. 시료를 투여하지 않은 대조군은 3.2±0.7 g의 고형암 무게를 나타내었으며, 산천어 70% 에탄올 추출물 저농도(50 mg/kg body weight)와 고농도(250 mg/kg body weight)에서 각각 1.8±0.1 g 및 1.4±0.0 g으로 대조군과 비교하여 고형암의 성장이 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다. 이와 관련해 인진쑥 메탄올 추출물로 항종양실험을 실시한 Kim 등(15)의 연구를 보면 종양 유발 후 7일 간격으로 7주간 종양의 무게를 측정하여 4주 이후부터 유의적으로 종양 무게가 감소하는 효과를 확인하였다. 즉, 시료 투여 기간 역시 항종양효과에 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다. Lee 등(16)은 곤피의 당단백질 50 mg/kg을 투하였을 때 sarcoma-180 cell에 의해 유도된 종양 성장에 대항하여 종양 성장 저지율이 43.04%라고 보고하였

Table 1. Antitumor activities of 70% ethanolic extracts from *masou salmon* against tumor bearing Balb/c mouse with sarcoma-180 cell

	Dose (mg/kg body weight)	Tumor weight (mean±SD) ¹⁾	Inhibition ratio (%)
Control	—	3.2±0.7 ^{a3)}	—
MSE ²⁾	25	1.8±0.1 ^b	44.7±4.6
	250	1.4±0.0 ^b	55.7±0.7

Three groups were fed with commercial chow diet. After implantation of S-180 cells (6×10⁶ cells/mouse), all mice were injected with PBS (phosphate buffered solution, control), 25 mg/kg body weight and 250 mg/kg body weight, respectively every day for 20 days.

¹⁾Values are mean±SD of 6 mice.

²⁾Masou salmon extract.

³⁾Means with the different letters are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

는데 이것은 산천어 에탄올 추출물보다 낮은 종양 성장 저지 효과를 나타낸 것이다.

암세포는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생성하며, 이들 활성산소종이 세포를 공격하므로 암을 유발하거나 더 암을 악화시킨다(17). 따라서 많은 종류의 항산화 물질들이 다양한 암 유발을 억제하는 것으로 알려져 있다(18). 어류나 해산물로부터 다양한 생리활성 물질이 보고되었고(19,20), 어류들은 오염된 환경으로부터 자신을 보호하기 위해 metallothioneins(MTs), glutathione-S-transferase(GST), glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PD) 등과 같은 항산화 방어 시스템을 다량 함유하고 있다(12). 산천어 에탄올 추출물에도 MTs, GST, G6PD와 같은 항산화 물질이 다량 함유되어 있을 것으로 추정되면 이들 물질들이 항암 그리고 항종양 활성을 나타내었을 것으로 생각된다.

모든 결과를 종합해 보면, 산천어 70% 에탄올 추출물은 *in vitro*와 *in vivo*에서 강한 항암효과를 나타내었으므로, 웰빙 기능성 식·의약소재로 이용될 수 있을 가능성을 제시해주는 기초 자료를 확보하였다. 따라서 식품산업 등 다양한 분야에서 기능성 소재로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

산천어 70% 에탄올 추출물(MSE)이 암세포 성장억제와 Balb/c 마우스에서의 종양 성장 억제에 미치는 영향을 알아보았다. 인간 자궁암(HeLa), 간암(HepG2), 유방암(MCF-7), 위암(AGS), 폐암(A549) 세포 그리고 인간신장 정상세포(293)에 MSE를 처리했을 때 세포생존율이 감소하였고 이들 감소율을 MTT assay로 알아보았다. MSE는 정상세포 293에서보다 인간 암세포주인 MCF-7, A549, HepG2, AGS 그리고 HeLa세포에서 현저하게 더 높은 세포독성이 나타났다. 시료 최고농도인 1 mg/mL를 인간 폐암세포(A549), 유방암세포(MCF-7), 간암세포(HepG2) 및 위암세포(AGS)에 처리한 결과 각각 9.2%, 12.7%, 14.6% 및 16.9%의 세포 생존율을 나타내었다. 더하여 복수암 세포(sarcoma-180)를 이용한 실험동물(Balb/c mice)에서의 고형암 성장 억제 효과를 알아보았으며, 각각 25 mg/kg body weight와 250 mg/kg body weight의 MSE를 투여하였을 때 종양 성장 억제율은 각각 44.7%와 55.7%였다. 따라서 우리는 MSE가 암 예방을 위해 인간에게 유익한 기능성 소재일 것이라는 것을 제안하였다.

문 헌

- Mori T. 1934. On the geographical distribution of Korean Salmonidae. *Proc Fifth Pac Sci Kong* (Canada, 1933) 5: 3775-3793.
- Kang YJ. 1974. A study on the racial classification of Asian

- chum, *Oncorhynchus keta* (Walbaum) based on scale characteristics. *Bull Korean Fish Soc* 7: 91-97.
- Myoung JG, Kim YU. 1993. Morphological study of *Oncorhynchus* spp. (Pisces: Salmonidae) in Korea-IV-Comparison of morphological characters of chum salmon *Oncorhynchus keta*, masu salmon, *Oncorhynchus masou* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Korean J Ichthyol* 5: 96-112.
- 이종래. 1991. 한·영·일 수산물 식물영사전. 현대해양사, 서울. p 112.
- 최기철. 1993. 우리 민물고기 백가지. 현암사, 서울. p 484-487.
- 김인배. 1974. 한국산 담수어류. 태화출판사, 서울. p 40-41.
- Ham SS, Oh HT, Kim SH, Yoo SJ. 2007. The antimutagenic effects and cytotoxic activities of *Agaricus blazei* murill mycelium extracts and fractions. *J East Asian Soc Dietary Life* 17: 563-570.
- Kim GH, Han HK. 1998. The effect of mushroom extracts on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 326-332.
- Choi JW, Ryu DY, Kim YK, Hong EG, Kwun MS, Han JS. 2000. Extraction and purification of bioactive materials from *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Korean J Biotechnol Bioeng* 15: 293-298.
- Oh HT, Kim SH, Yoo SJ, Choi HJ, Chung MJ, Ham SS. 2008. Component analysis of masou salmon (*Oncorhynchus masou*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 886-890.
- Oh HT, Kim SH, Choi HJ, Chung MJ, Ham SS. 2008. Antioxidative and antimutagenic activities of 70% ethanol extract from masou salmon (*Oncorhynchus masou*). *Toxicol in Vitro* 22: 1484-1488.
- Chung MJ, Walker PA, Brown RW, Hogstrand C. 2005. ZINC-mediated gene expression offers protection against H₂O₂-induced cytotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 205: 225-236.
- Ham SS, Kim SH, Yoo SJ, Oh HT, Choi HJ, Chung MJ. 2008. Antimutagenicity and cytotoxic effects of methanol extract from deep sea water salt and sea tangle added soy-bean paste (*Doenjang*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 416-421.
- Kim HT, Kim JW, Lim MK, Jin TW, Yeo SG, Jang KH, Oh TH, Lee KW. 2007. Cytotoxic effect of *Artemisia capillaris* extracts on the cancer cells on *in vitro*. *J Vet Clin* 24: 367-371.
- Kim HT, Kim JW, Jin TW, Kim JE, Lim MK, Yeo SG, Jang KH, Oh TH, Lee KW. 2007. Effects of blood biochemistry and tumors' weights of *Artemisia capillaris* methanol extract in mice bearing cancer cells. *J Vet Clin* 24: 372-378.
- Lee YS, Kim DS, Ryu BH, Lee SH. 1992. Antitumor and immunomodulating effects of seaweeds toward sarcoma-180 cell. *J Korean Soc Food Nutr* 21: 544-550.
- Oberley TD, Oberley LW. 1997. Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histol Histopathol* 12: 525-535.
- Slaga TJ. 1995. Inhibition of the induction of cancer by antioxidants. *Adv Exp Med Biol* 369: 167-174.
- Ha BS, Baek SH, Kim SY. 2000. Carotenoids components of tunicate, shellfish and its inhibitory effects on mutagenicity and growth of tumor cell. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 922-934.
- Baek SH, Kim SY, Geong KI, Kweon MJ, Choi OS, Kim JH, Kim HS, Ha BS. 1999. Comparison of carotenoid pigments in Korean bittering, *Cheilognathus signifier* and bride bittering, *Rhodeus ukekii* in the subfamily cyprinidae. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 1220-1225.

(2008년 12월 2일 접수; 2009년 1월 16일 채택)