

저분자량 키토산 올리고당의 항종양성

†박 헌 국

동남보건대학 식품영양과

Antineoplastic Effect of Low Molecular Weight Chitooligosaccharide on Various Tumor Cell Lines

†Heon-Kuk Park

Dept. of Food and Nutrition, Dongnam Health University

Abstract

In this study, the effects of low molecular weight chitooligosaccharides were assessed. Low molecular weight chitooligosaccharide evidenced no cytotoxicity in *in vitro* trials with the normal cell line, Vero E6(Africa green monkey kidney cell). The IC_{50} of low molecular weight chitooligosaccharide was 923.20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Low molecular weight chitooligosaccharide exhibited *in vitro* antineoplastic activity in five human tumor(lung carcinoma, bladder carcinoma, colon carcinoma, stomach carcinoma, breast carcinoma) cell lines. The IC_{50} values of low molecular weight chitooligosaccharide on A549, J82, SNU-C4, SNU-1 and ZR75-1 were 477.42 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 480.40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 436.84 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 373.55 $\mu\text{g}/\text{ml}$, and 539.95 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively.

Key words: low molecular weight chitooligosaccharide, cytotoxicity, antineoplastic effect.

서 론

키토산 올리고당은 현재 우리나라에서 식품첨가물로 지정되어 있으며, 여러 가지 가공식품에 기능성 식품 소재로서 첨가되어 사용되고 있을 뿐만 아니라 키토산 올리고당의 기능성을 이용한 건강식품으로도 개발되어 시판되고 있다. 이와 같이 키토산 올리고당은 다수의 기업체로부터 많은 양이 생산되어 이용되고 있으며, 자사 제품의 생리적 기능이 우수하다는 것을 내세워 선전하고 있으나 실제로 그 생리적 기능성에 대한 연구 결과는 극히 미미한 실정이다.

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), 면역 부활 작용(Tokoro 등 1988; Ryu BH 1992), 항종양성(Ryu BH 1992; Nam 등 1999), 식물세포 성장촉진작용(Kendra & Hadwiger 1984),

혈중 콜레스테롤치 저하작용(Kim & Seong 2008) 등이 있었다.

Park HK(2001)는 키토산을 효소분해하여 얻어진 키토산 올리고당을 이용하여 11종의 식중독 세균과 1종의 효모에 대한 항균성을 조사하였으며, 다양한 식중독균에 대한 우수한 항균활성을 가지며, 특히 그람 양성세균에 대한 항균성이 높았다고 보고하였다.

Uchida 등(1998)은 키토산 및 키토산 올리고당의 항균작용에 대한 실험에서 40~50 mg 환원당/g 키토산 가수분해물이 키토산보다 높은 항균성을 보였으며, 중합도 3~4를 주체로 하는 가수분해물보다는 중합도 5~6 이상의 것이 주성분인 가수분해물이 항균성이 강하였다고 보고하였다. 그러나 Uchida 등의 연구는 곰팡이 3종 세균 4종의 극히 제한된 균종에 대한 항균성을 측정하여 보고한 것이었다. 따라서 식중독 세균을 비롯한 여러 가지 세균에 다양하게 적용하여 항균 스펙트럼을 관찰하는 것은 키토산 올리고당의 용도를 개발하는데 있어서 매우 중요한 일이라고 생각된다. 국내에서는 Cho 등

† 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: +82-31-249-6423, Fax: +82-31-249-6420, E-mail: foodopia@dongnam.ac.kr

(1998)이 키토산 및 그 부분 가수분해물을 이용한 항균실험을 수행하여 분자량 280만의 고분자 키토산보다는 분자량 수만의 저분자 키토산이 높은 항균성을 갖는다고 보고하였다.

Tokoro 등(1988)은 중합도 6인 키토산 올리고당이 BALB/c 계 마우스에 이식한 고형 종양 Meth-A에 대한 종양 생육 저지 활성을 나타내었다고 보고하였다. 국내에서는 Ryu(1992)가 새우 껍질로부터 추출한 키토산의 항암 및 면역 활성화에 대해서 조사하여 보고하였다. Ryu는 키토산이 ICR 마우스에 이식한 고형종양 Sarcoma-180에 대해 항종양 활성을 나타내지만 *in vitro* 실험을 수행한 결과 Sarcoma-180에 대해 직접적인 세포 독성작용은 보이지 않았으므로 키토산이 나타내는 항종양작용은 종양세포에 대한 직접적인 세포 독성에 기인하지 않고 간접적인 세포 독성 또는 체내의 면역 반응을 자극함으로써 나타나는 효과일 것이라고 주장하였다. Tokoro 등(1988)의 실험결과는 중합도 6인 키토산 올리고당의 *in vivo* 항종양 활성을 조사한 결과이고, Ryu(1992)의 실험결과는 키토산 올리고당이 아닌 키토산을 가지고 *in vivo* 및 *in vitro* 실험을 수행한 결과이다. 따라서 아직까지 키토산 올리고당을 가지고 *in vitro* 항종양 활성에 관한 실험을 수행한 연구결과는 보고된 바 없다.

Kendra 등(1984)에 의하면 키토산 올리고당이 식물병원균에 대한 항균활성을 나타내며, 특정 식물이 생성하는 항균성 물질의 생성에 영향을 미친다고 보고한 바 있다.

이러한 키토산 올리고당의 생리적 기능성을 이용하여 식품의 보존료, 면역부활제, 항종양제, 식물의 면역 기능 강화와 성장촉진제로서의 이용이 기대되고 있다. 그러나 전술한 바와 같이 아직 키토산 올리고당의 생리적 기능성에 대한 연구 결과는 아직 부족한 실정이며, 키토산 올리고당의 새로운 용도를 개발하기 위해서는 다양한 생리적 기능성에 대한 보다 체계적인 연구가 절실한 실정이다.

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

실험방법

1. 저분자량 키토산 올리고당의 제조

저분자량 키토산 올리고당은 진보의 방법(Park HK 1999)에 따라서 제조하였다. 0.8% lactic acid 수용액에 chitosan이 5%가 되도록 첨가하여 완전히 녹이고 포화 NaHCO_3 수용액을 가하여 pH를 5.5가 되도록 조절하였다. 제조된 chitosan 용액에 *Bacillus pumilus* BN-262 유래의 chitosanase를 반응액 ml 당 0.05 unit씩 가하고 45°C에서 3시간 동안 반응시켰다. 분해된 용액은 중화하여 불용성 물질을 제거하고 ultrafiltration하

여 저분자 물질을 제거한 다음 분무 건조하였다.

생산된 저분자량 키토산 올리고당을 진보의 방법(Park HK 1999)에 따라서 HPLC 분석한 결과, 2량체가 8.69%, 3량체가 19.66%, 4량체가 23.98%, 5량체가 20.65%, 6량체가 12.46%, 7량체가 8.77%, 8량체 이상이 5.8%로 3~5량체가 전체 올리고당 중 64.3%에 달하는 비교적 저분자 화합물로 구성된 키토산 올리고당이었다.

2. 세포 독성과 항종양성의 측정

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 종료시에 모두 세포가 지수 함수적으로 활발히 증식하면서 MTT 처리 후의 OD_{540} 값이 0.6~0.7에 이를 수 있는 세포수로 정하였다. 적정수의 세포를 180 μl 의 배지에 부유시켜 96-well plate의 12개 컬럼중 10개의 컬럼에 접종하였다. 시료는 100% DMSO(dimethyl sulfoxide)의 배지내 최종농도가 0.02%되도록 하였다. 20 μl 씩 각 well에 가한 시료의 최종 농도는 well당 각각 1,200, 600, 300, 150 및 75 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 가 되도록 하였다. 한 가지 농도군에 대해서는 1컬럼(8 wells)을 동일한 조건으로 사용하며, 나머지 한 컬럼에는 약물 대신 PBS(0.2% DMSO)만을 20 μl 첨가하여 100% 생존군(control survival)으로 삼았다. 흡광도 측정시 사용할 blank에는 세포 없는 배지만을 180 μl 가하고 PBS 또는 약물을 20 μl 첨가하였다. 암세포와 약물이 접종된 plate를 37°C, 5% CO_2 하에서 4일간 배양한 후 0.1 mg의 MTT(Sigma M 2128)를 모든 well에 가하고 37°C에서 4시간 배양하였다. 배양 종료시 plate를 450 \times g에서 5분간 원심분리한 후 배지를 30 μl 정도만 남기고 제거하였다(이 때 각 well의 바닥에 형성된 formazan 결정이 흐트러지지 않도록 주의하였다). 배지가 제거된 각 well에 DMSO를 150 μl 씩 가한 후에 formazan 결정이 녹을 때까지 약 10분간 가볍게 진탕해주고 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 μl ml부터 2배수 희석하여 사용하였다. 시험군에서 8개 well의

OD₅₄₀ 값으로부터 한 컬럼의 평균 OD₅₄₀ 값을 구하여 대조군 (100% 생존군)의 평균 OD₅₄₀ 값에 대한 백분율을 산출하였다. 이 백분율은 대조군과 비교한 시험군의 세포 생존율에 해당하는 값이다. 50% 억제농도(IC₅₀)는 이 생존율이 50%가 되도록 하는 약물의 농도로 정의하였으며, 이 IC₅₀ 값을 항암 효과의 지표로 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 정상세포주에 대한 세포 독성

정상세포주에 대한 세포 독성을 실험한 결과는 Fig. 1과 Table 1에 나타난 바와 같이 IC₅₀ 값은 1,060.28 µg/ml로 정상세포주에 대한 세포 독성은 거의 없었다. 따라서 키토산 올리고당의 항균성, 면역 부활 기능, 항종양성 등 다양한 생리활성 기능을 활용한 기능성 식품첨가물로 이용함에 있어서 안전성이 높은 물질이라고 판단된다.

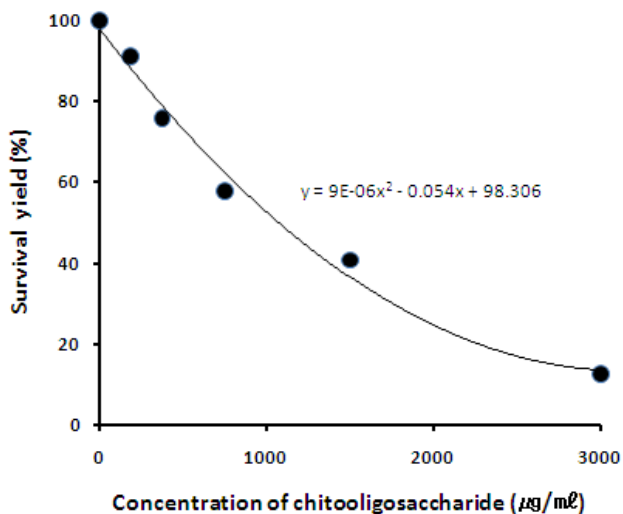


Fig. 1. Cytotoxic effect of low molecular weight chito oligosaccharide on normal cell line, Vero E6(Africa green monkey kidney cell).

Table 1. Cytotoxic effect of low molecular weight chito oligosaccharide on various cell lines

Cell lines	Characteristics	IC ₅₀ (µg/ml)
Vero E6	Normal cell ¹⁾	1,060.28
A549	Human lung carcinoma	477.42
J 82	Human bladder carcinoma	480.40
SNU-C4	Human colon carcinoma	436.84
SNU-1	Human stomach carcinoma	373.55
ZR75-1	Human breast carcinoma	539.95

¹⁾ Africa green monkey kidney cell.

2. 종양세포주에 대한 항종양성

폐암 세포주인 A549에 대한 세포 독성 실험 결과는 Fig. 2와 Table 1에 나타난 바와 같이 IC₅₀ 값은 477.42 µg/ml로 항종양성을 나타내었다. 방광암 세포주인 J82에 대한 세포 독성 실험 결과는 Fig. 3과 Table 1에 나타난 바와 같이 IC₅₀ 값은 480.40 µg/ml로 항종양성을 나타내었다. 대장암 세포주인 SNU-C4에 대한 세포 독성 실험 결과도 또한 Fig. 4와 Table 1에 나타난 바와 같이 IC₅₀ 값은 436.84 µg/ml로 항종양성을 나타내었다. 위암 세포주인 SNU-1에 대한 세포 독성 실험 결과도 Fig.

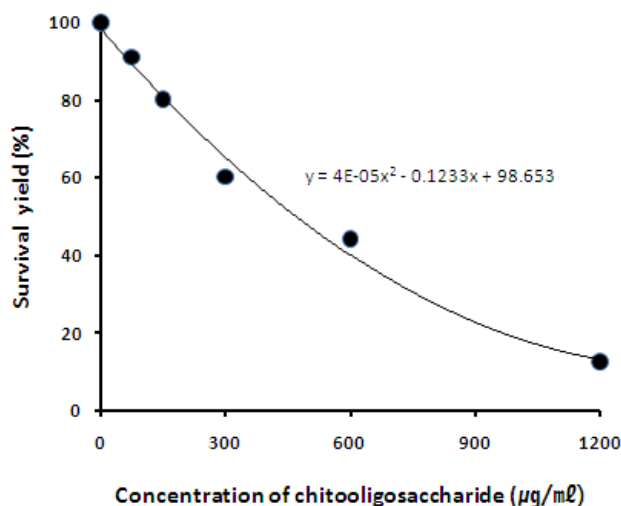


Fig. 2. Antineoplastic effect of low molecular weight chito oligosaccharide on tumor cell line, A549(Human lung carcinoma).

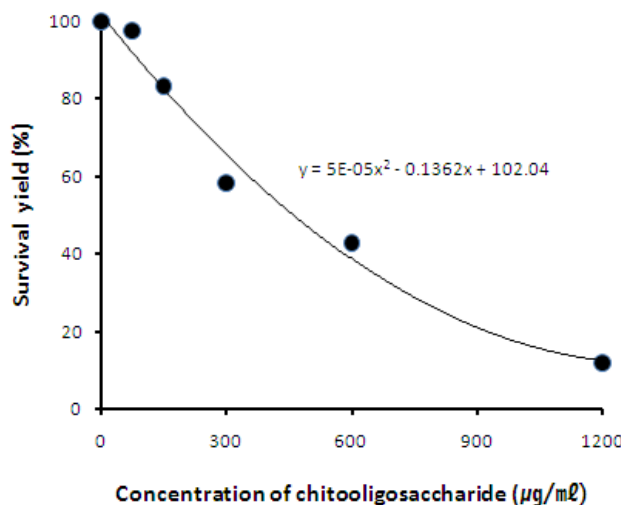


Fig. 3. Antineoplastic effect of low molecular weight chito oligosaccharide on tumor cell line, J82(Human bladder carcinoma).

5와 Table 1에 나타낸 바와 같이 IC₅₀값은 373.55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 항종양성을 나타내었다. 유방암 세포주인 ZR75-1에 대한 세포 독성 실험 결과도 Fig. 6과 Table 1에 나타낸 바와 같이 IC₅₀값은 539.95 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 항종양성을 나타내었다.

이와 같은 결과는 Ryu(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

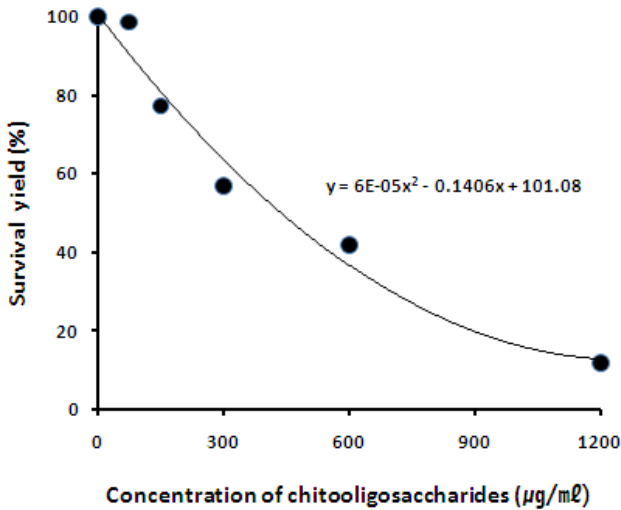


Fig. 4. Antineoplastic effect of low molecular weight chitooligosaccharide on tumor cell line, SNU-C4(Human colon carcinoma).

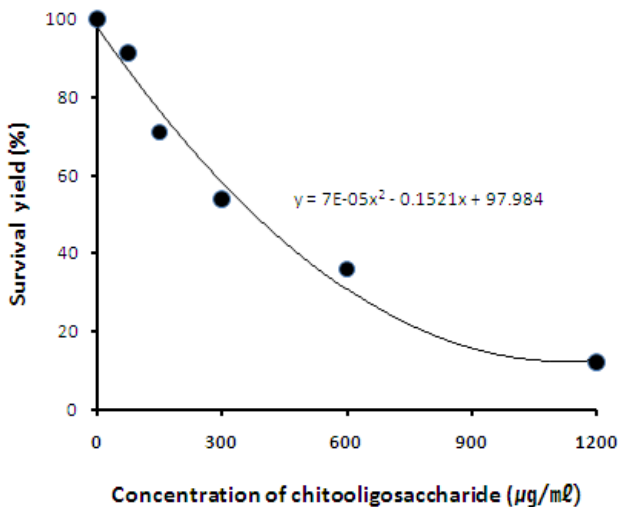


Fig. 5. Antineoplastic effect of low molecular weight chitooligosaccharide on tumor cell line, SNU-1(Human stomach carcinoma).

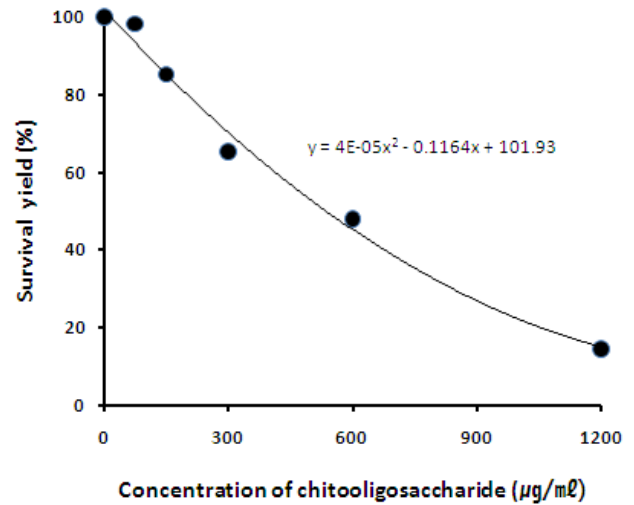


Fig. 6. Antineoplastic effect of low molecular weight chitooligosaccharide on tumor cell line, ZR75-1(Human breast carcinoma).

연구결과의 차이는 키토산의 경우는 거대분자이므로 세포 내로의 이동이 불가능하나 키토산 올리고당의 경우는 세포내로의 이동이 가능하다는 차이점에 의한 것으로 판단되나, 이를 밝히기 위해서는 보다 자세한 연구가 필요하다고 생각된다.

Tokoro 등(1988)에 의하면 COS-6를 암세포에 10 mg/kg 농도로 처리하였을 때 40% 이상의 저해를 보였다고 하였다. 이와 같은 결과는 본 실험의 결과와 비교하여 상당히 낮은 농도에서도 효과를 나타내고 있다는 사실을 나타내고 있는데, 이는 키토산 올리고당이 갖는 항종양성은 세포 독성에만 의존하지 않고 키토산의 경우와 마찬가지로 세포의 면역 부활 작용을 도와서 항종양성을 높이는 데 관여하고 있기 때문일 것이라고 판단된다. 또한, Tokoro 등은 항종양성이 COS-6에 의하여 나타난다고 보고하였는데, 이 실험에서 사용한 키토산 올리고당은 혼합물을 사용하였으며, COS-6만이 항종양성을 나타낸다고 가정할 경우 키토산 올리고당 각각의 COS-6 함량과 항종양성을 비교하였을 때 활성이 잘 일치하지 않는다. 따라서 COS-6 이외의 물질이 역시 항종양성에 관여할 것이라고 생각된다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 저분자량 키토산 올리고당은 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

저분자량 키토산 올리고당의 세포 독성을 실험하였다. 저

분자량 키토산 올리고당은 정상세포주인 Vero E6(Africa green monkey kidney cell)에 대한 세포 독성을 거의 나타내지 않았다. 정상세포주에 대한 저분자량 키토산 올리고당의 IC₅₀값은 1,060.28 $\mu\text{g/ml}$ 이었다. 저분자량 키토산 올리고당은 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 저분자량 키토산 올리고당의 IC₅₀값은 A549, J82, SNU-C4, SNU-1, ZR75-1 세포주의 경우에 각각 477.42 $\mu\text{g/ml}$, 480.40 $\mu\text{g/ml}$, 436.84 $\mu\text{g/ml}$, 373.55 $\mu\text{g/ml}$, and 539.95 $\mu\text{g/ml}$ 이었다.

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 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. 2001. Antimicrobial activity of chitooligosaccharides. *Korean J Food Nutr* 14:579-58
- Park HK. 1999. Aggregation property of chitosan and chitooligosaccharides. *Korean J Food Nutr* 12:597-602
- Park PJ, Kim SK, Lee HK. 2002. Antimicrobial activity of chitooligosaccharides on *Vibrio parahaemolyticus*. *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. *Nippion 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*. pp.93-102

(2009년 5월 20일 접수; 2009년 6월 3일 채택)