

## 왕거머리말의 인체 암세포에 대한 세포독성 효과

홍주완<sup>1</sup>, 정명은<sup>1</sup>, 이정임<sup>1</sup>, 김호준<sup>1</sup>, 장계수<sup>2</sup>, 서영완<sup>1\*</sup>

## Cytotoxic Effect of *Zostera asiatica* on Growth of Human Cancer Cells

Joo Wan Hong<sup>1</sup>, Myung Eun Jung<sup>1</sup>, Jung Im Lee<sup>1</sup>, Hojun Kim<sup>1</sup>, Jae-Soo Chang<sup>2</sup>, and Youngwan Seo<sup>1\*</sup>

접수: 2012년 8월 10일 / 게재승인: 2012년 8월 24일  
© 2012 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** Whole plants of *Zostera asiatica* were extracted twice with acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) in turn. The combined crude extracts were evaporated *in vacuo* and then the residue was partitioned between water and methylene chloride. The aqueous layer was fractionated into H<sub>2</sub>O and *n*-butanol and then the organic layer was also fractionated into 85% *aq.* MeOH and *n*-hexane, successively. The crude extracts and their solvent fractions were evaluated for their inhibitory effect on growth of human cancer cells AGS, HT-29, MCF-7, and HT-1080 cells by MTT reduction assay. Among samples tested, 85% *aq.* MeOH and *n*-hexane fractions showed strong cytotoxic effect against AGS, HT-29, and MCF-7 cells. On the other hand, for HT-1080 cell, 85% *aq.* MeOH fraction exhibited the strongest cytotoxic effect.

**Keywords:** *Zostera asiatica*, human cancer cells, cytotoxic effect, MTT assay

### 1. 서론

해초 (seagrass)는 해조류와 명확히 구분되는 다년생의 해산 현화식물로 그 중 거머리말과 (*Zosteraceae*)의 거머리말속

(*Zostera*)은 약 12종으로 주로 온대와 아열대 해역에 분포한다 [1]. 거머리말과는 잎 정단부의 형태, 엽맥 및 섬유가닥 (fibrous strands)의 수, 열매의 종피 등에 근거하여 분류되며 [2,3], 한반도 연안에서는 왕거머리말 (*Zostera asiatica*), 애기거머리말 (*Zostera japonica*), 포기거머리말 (*Zostera caespitosa*), 수거머리말 (*Zostera caulescens*) 등이 자생하는 것으로 알려져 있으며 [4,5], 동해안과 남해안의 수심 3~10 m 깊이의 모래바닥에서 자생한다. 그 중 본 연구에 사용한 왕거머리말은 강원도 장호, 추암, 용화항과 경상북도 마산리항, 경상남도 창원시 명동에 분포하는 것으로 알려져 있다 [2]. 거머리말속에 속하는 종에 대한 연구는 서식지에 따른 생태 및 형태적 특성에 대한 연구가 대부분이며 [6-13], 천연물화학적인 연구는 거의 이루어지지 않았다. 지금까지 거머리말 (*Zostera marina*)과 애기거머리말 (*Z. japonica*)에 대한 항산화, 항미생물, 항염증 활성 등과 같은 단편적인 연구만이 보고되었다 [14-19].

본 연구는 거머리말속 중 왕거머리말의 항암활성효과를 알아보기 위해 인체 암세포주를 이용하여 암세포에 미치는 세포독성을 측정하여, 앞으로 항암제 개발의 새로운 원천으로의 활용 가능성을 탐색하고자 하였다. 이를 위해 인체 암세포인 AGS (위암세포), HT-29 (결장암세포), MCF-7 (유방암세포), HT-1080 (섬유육종암세포)을 이용하여 왕거머리말이 각종 암세포 증식에 미치는 영향을 알아보았다.

### 2. 재료 및 방법

#### 2.1. 실험재료

실험에 사용한 왕거머리말 (*Zostera asiatica*)은 2007년 7월 경상남도 창원시 진동면 다구리 해변에서 직접 채집하였으며 응달에서 건조한 후 추출하기 전까지 -25°C에서 냉동

<sup>1</sup>한국해양대학교 해양환경·생명과학부

<sup>1</sup>Division of Marine Environment & Bioscience, Korea Maritime University, Busan 606-791, Korea  
Tel: +82-51-410-4328, Fax: +82-51-404-4750  
e-mail: ywseo@hhu.ac.kr

<sup>2</sup>한국해양대학교 환경공학과

<sup>2</sup>Department of Environmental Engineering, Korea Maritime University, Busan 609-791, Korea

보관하였다.

## 2.2. 사용시약

세포배양을 위해 DMEM, RPMI 1640, Fetal bovine serum (FBS), 0.05% Trypsin-0.02% EDTA 그리고 100 units/mL Penicillin-Streptomycin과 phosphate buffered saline (PBS) 는 GIBCO사 (USA)로부터 구입하였으며, 그외 연구에 사용된 용매 및 시약은 특급 또는 일급을 사용하였다.

## 2.3. 시료의 추출 및 순차분획

응달에 건조한 왕거머리말을  $-25^{\circ}\text{C}$ 의 냉동고에 보관하였다가 해빙한 후, methylene chloride ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )와 acetone을 1:1로 혼합한 용매 (A+M)를 사용하여 24시간 추출한 후 여과하였으며, 이 과정을 2번 반복하였다. 추출 후 남은 잔사에 methanol (MeOH)을 사용하여 위와 동일한 과정을 반복하여 추출액을 얻었다. 얻어진 추출액은  $40^{\circ}\text{C}$  수욕 상에서 회전 진공증발기 (EYELA JAPAN, N-N series)를 이용하여 농축하여 두 가지 조추출물을 얻었다 (A+M 추출물: 15.12 g, methanol 추출물: 229.33 g). 두 조추출물을 합한 후에 용매 극성에 따라 순차적으로 분획하고 각 분획층을 감압농축한 후 건조하여 사용하였다. 이 때 얻어진 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH,  $\text{H}_2\text{O}$  분획물은 각각 14.58 g, 9.56 g, 22.41 g, 171.39 g이었다. 각 조추출물들은 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 희석하여 실험에 사용하였다.

## 2.4. 암세포배양

본 실험에 사용한 암세포주인 AGS 인체 위암세포 (AGS human gastric adenocarcinoma cell)와 HT-29 인체 결장암 세포 (HT-29 human colon cancer cell), MCF-7 인체 유방암세포 (MCF-7 human breast cancer cell), HT-1080 인체 섬유육종세포 (HT-1080 human fibrosarcoma cell)는 한국 세포주 은행 (서울의대)으로부터 분양받아 배양하면서 실험에 사용하였다. AGS와 HT-29 암세포는 RPMI 1640 배지를 사용하였고, MCF-7과 HT-1080 암세포는 DMEM 배지를 사용하였으며, 각 배지에는 100 units/mL의 penicillin-streptomycin과 10%의 FBS를 첨가하였다. 실험에 사용된 암세포는  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator (Forma Scientific, Japan)에서 배양하였으며, 배양된 각각의 암세포는 일주일에 2-3회 refeeding하고 6-7일 만에 PBS로 세척한 후 0.05% Trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심분리한 후 집적된 암세포에 배지를 넣고 피펫으로 암세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 75 mL cell culture flask에 10 mL씩 일정 수 분할하여 주입하고 계속 6-7일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

## 2.5. MTT assay

MTT assay는 생존 암세포의 미토콘드리아 내의 dehydrogenase의 효소작용에 의해 황색의 수용성 물질인 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)가 환원되어 보라빛의 formazan crystal로 생성하는 원리를 이용한 실험 방법으로 [20], formazan crystal이 침전되는 정도를 흡광도로

측정하여 암세포가 사멸 또는 증식 억제되는 정도를 파악할 수 있다. 배양된 암세포는 well당  $2 \times 10^4$  cells/mL가 되도록 96 well plate에 분주하여  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 배양기에서 24시간 배양 후 전 배양에 사용된 배지를 제거하고 배지 90  $\mu\text{L}$ 와 일정농도의 시료 10  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 배양기에서 24시간 배양하였다. 대조군에는 시료 대신 phosphate buffered saline (PBS) 20  $\mu\text{L}$ 를 첨가하였다. 24시간 배양 후 시료가 첨가된 배지를 제거한 뒤 5 mg/mL의 농도로 제조한 MTT 용액 100  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 동일한 배양 조건에서 4시간 동안 더 배양하였다. 생성된 formazan결정은 DMSO로 충분히 녹여낸 후 ELISA reader (Bio-Tek instruments, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 억제율 (%)을 구하였다.

## 2.6. 통계처리

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 결과들의 유의성을 검정하기 위하여 분산분석 (ANOVA)을 행한 후  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였으며, 그 결과는 평균 (Mean)  $\pm$  표준편차 (Standard deviation, SD)로 표시하였다. 모든 통계 분석은 Statistic Analysis System (v8.2 SAS Institute Inc., NC, USA) 통계프로그램을 이용하여 처리하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 조추출물의 인체 암세포 증식 억제 효과

왕거머리말로부터 암세포를 억제하는 효과가 있는 생리활성물질을 탐색하기 위해 조추출물을 200, 100, 50, 10, 5, 1  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 희석한 후 암세포 AGS, HT-29, MCF-7, HT-1080에 처리하여 왕거머리말 조추출물이 암세포의 증식 억제에 미치는 효과를 관찰하였다. 실험결과, 각 암세포에 처리한 시료의 농도가 증가할수록 암세포 증식율이 농도의존적으로 억제되는 경향을 보였다 (Fig. 1).

인체 위암세포인 AGS에 시료를 처리한 결과, 암세포의 생존율은 농도 의존적으로 감소함을 보였다. A+M 추출물은 200, 100  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리한 인체 위암세포의 생존율은 대조군에 비해 각각 19, 24%로 높은 항암효과를 나타내었다. MeOH 추출물은 200, 100  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 52, 58%의 생존율을 보였으며, 이는 A+M 추출물 보다는 높지 않았지만 비교적 높은 생존율을 보였다.

또다른 인체 암세포인 HT-29, MCF-7, HT-1080에도 동일한 농도의 시료를 처리한 결과, 모두 AGS 세포와 유사하게 농도 의존적으로 암세포 생존율이 감소함을 관찰할 수 있었다.

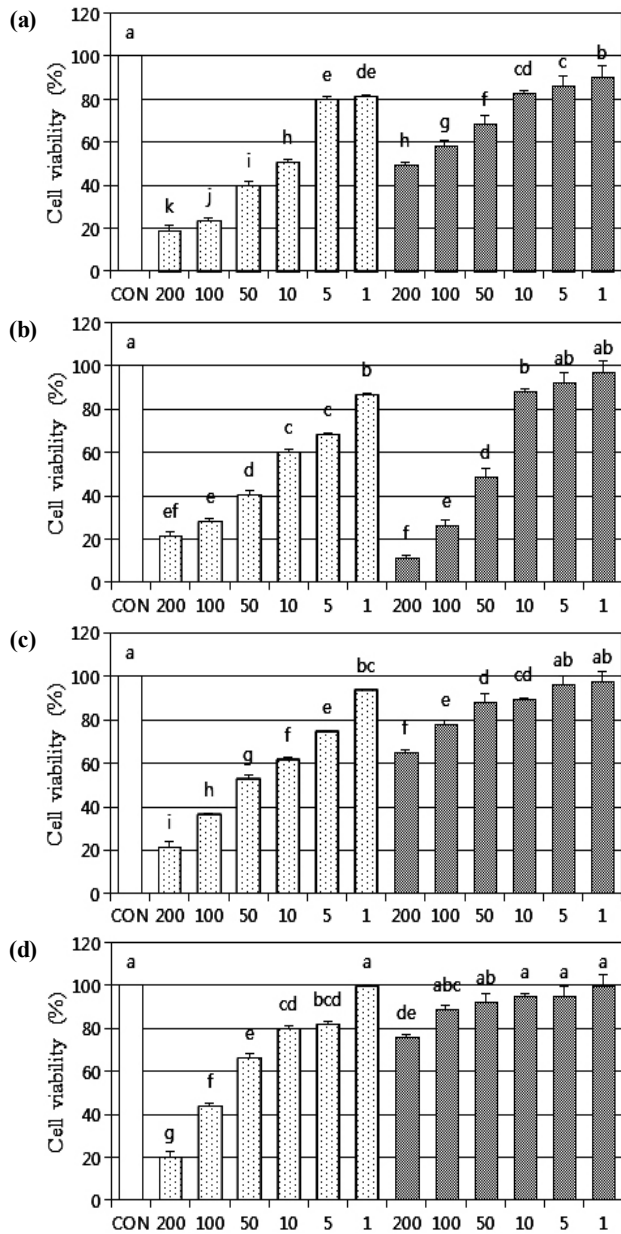
결장암세포인 HT-29에서 A+M 추출물 200, 100  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 21, 36%의 낮은 생존율이 관찰되었고, methanol 추출물은 동일농도에서 65, 78%의 생존율이 관찰되어 AGS 암세포에서와 같이 A+M 추출물에서 보다 더 뛰어난 암세포 증식 억제 효과를 보였다.

유방암세포인 MCF-7에서 A+M 추출물은 200, 100  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 21, 29%, MeOH 추출물은 동일농도에서 12와 27%의 생존율을 보여 두 가지 추출물에서 모두 뛰어난 암세

포 증식 억제 효과를 관찰할 수 있었다.

섬유육종암세포인 HT-1080에서의 A+M 추출물은 200, 100 µg/mL 농도에서 20, 44%의 낮은 생존율이 관찰된 것에 반해, MeOH 추출물은 동일농도에서 76, 89%의 높은 생존율이 관찰되어 낮은 암세포 증식 억제 효과를 보였다.

두 가지 조추출물 중에 비교적 극성이 낮은 A+M 추출물이 실험에 사용한 4가지 암세포에서 모두 높은 암세포 증식 억제 효과가 관찰된 것으로 보아, 비교적 극성이 낮은 여러 가지 생리활성 물질들이 인체 암세포 증식을 억제하는 것으로 여겨진다.

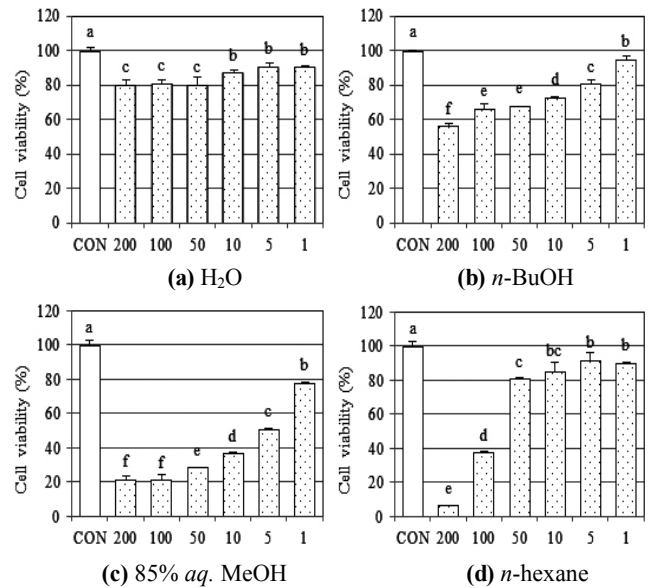


**Fig. 1.** Inhibitory effects of crude extracts from *Zostera asiatica* on the growth of human cancer cell lines (a) AGS, (b) HT-29, (c) MCF-7, (d) HT-1080. Data represents the mean values of three replicates. <sup>a-k</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

### 3.2. 용매 분획물의 암세포 증식 억제 효과

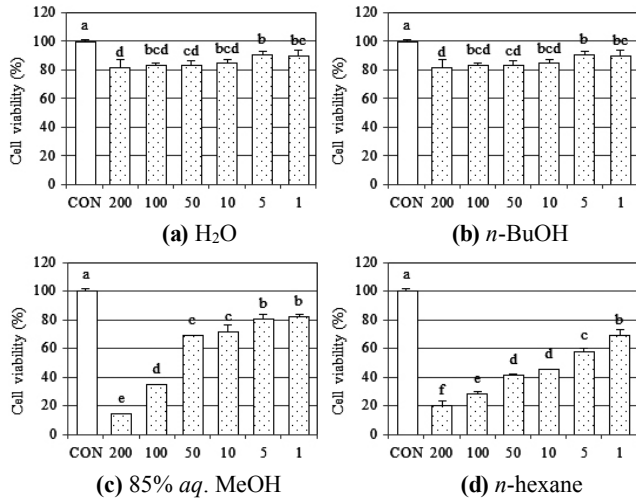
왕거머리말의 acetone/methylene chloride (A+M)와 methanol (MeOH) 조추출물에서 암세포에 대한 높은 증식 억제효과를 보였으므로 이들의 용매 분획물 또한 암세포에 대해 높은 증식 억제율을 가질 것으로 기대할 수 있다. 따라서 acetone/methylene chloride (A+M)와 methanol (MeOH) 추출물들을 혼합하여 극성에 따라 H<sub>2</sub>O, *n*-BuOH, 85% aq. MeOH, *n*-hexane 용매 분획물을 얻었으며 각각의 분획물을 이용하여 인체 암세포의 성장에 미치는 영향을 관찰하였다.

인체 위암세포인 AGS에 각 분획물을 200, 100, 50, 10, 5, 1 µg/mL 농도로 처리하여 그 생존율을 관찰한 결과는 Fig. 2와 같다. 실험결과는 대조군과 비교하여 H<sub>2</sub>O 분획물에서는 81, 80, 81, 92, 96, 95%의 생존율을 보였고, *n*-BuOH 분획물에서는 71, 75, 78, 92, 93, 100%의 생존율을 보여 암세포 증식 억제에 큰 효과를 보이지 못했다. 반면에 85% aq. MeOH 분획물에서는 20, 43, 78, 87, 90, 95%의 생존율을 보였고, *n*-hexane 분획물에서는 11, 53, 86, 90, 90, 96%의 생존율을 보여 농도 의존적으로 높은 암세포 증식 억제율을 보였다.



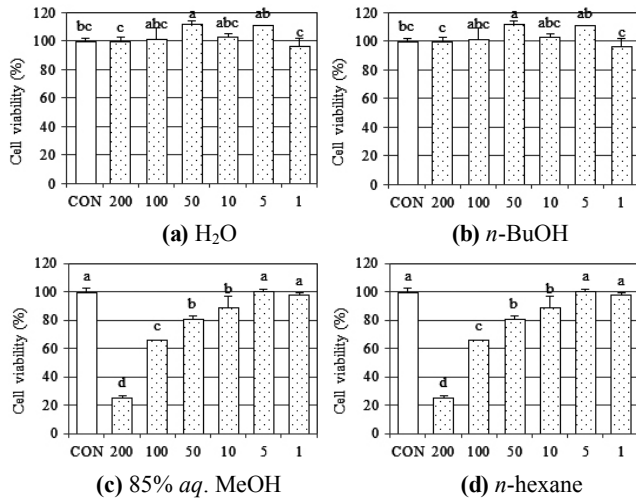
**Fig. 2.** Inhibitory effects of solvent fractions (a) H<sub>2</sub>O (b) *n*-BuOH (c) 85% aq. MeOH and (d) *n*-hexane from *Zostera japonica* on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells. Data represents the mean values of three replicates. <sup>a-f</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

인체 결장암세포인 HT-29에서도 동일한 농도의 시료를 처리하여 실험한 결과, H<sub>2</sub>O 분획물에서는 82, 83, 83, 84, 91, 90%의 낮은 암세포 성장 억제율을 보였고, *n*-BuOH 분획물에서는 39, 43, 46, 56, 64, 78%의 생존율을, 85% aq. MeOH 분획물에서는 20, 28, 41, 45, 58, 69%의 생존율을, *n*-hexane 분획물에서는 14, 34, 69, 71, 80, 82%의 생존율을 보여 H<sub>2</sub>O 분획물을 제외한 3가지 분획물에서 농도 의존적으로 높은 암세포 증식 억제율을 보였다 (Fig. 3).



**Fig. 3.** Inhibitory effects of solvent fractions (a) H<sub>2</sub>O (b) *n*-BuOH (c) 85% aq. MeOH and (d) *n*-hexane from *Zostera japonica* on the growth of HT-29 human colon cells. Data represents the mean values of three replicates. <sup>a-f</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

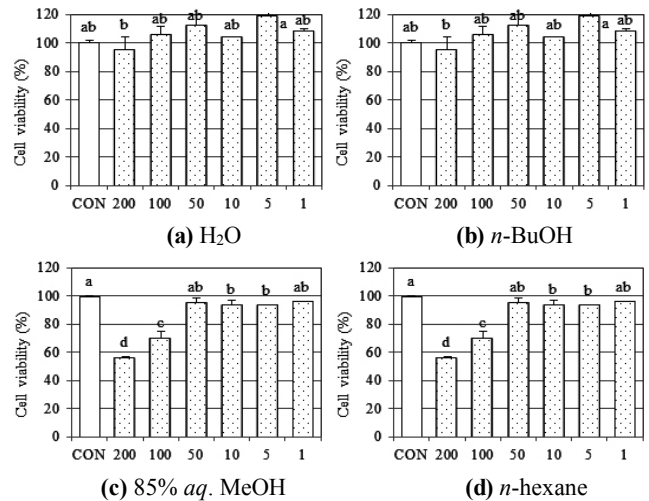
동일한 조건하에서 왕거머리말의 용매 분획물을 1, 5, 10, 50, 100 및 200 μg/mL의 농도로 MCF-7 인체 유방암 세포에 처리하고 세포독성을 확인한 결과 H<sub>2</sub>O 분획물에서는 102, 99, 114, 103, 111, 97%의 생존율을 보여 암세포 증식 억제 효과가 거의 없는 것으로 나타났다 (Fig. 4). *n*-BuOH 분획물에서는 51, 57, 56, 76, 76, 95, 96%의 생존율을 보였으며, 85% aq. MeOH 분획물에서는 20, 42, 51, 59, 74, 83%의 생존율을, *n*-hexane 분획물에서는 26, 66, 80, 86, 98, 95%의 생존율을 보여 85% aq. MeOH, *n*-hexane 분획물에서 높은 암세포 증식 억제율이 관찰되었다.



**Fig. 4.** Inhibitory effects of solvent fractions (a) H<sub>2</sub>O (b) *n*-BuOH (c) 85% aq. MeOH and (d) *n*-hexane from *Zostera japonica* on the growth of MCF-7 human breast cancer cells. Data represents the mean values of three replicates. <sup>a-f</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

인체 섬유육종 암세포인 HT-1080에도 동일한 농도의 시

료를 처리한 결과 (Fig. 5), H<sub>2</sub>O 분획물에서는 92, 103, 109, 101, 115, 105%의 생존율을 보여 MCF-7과 마찬가지로 암세포 증식 억제에 효과가 없는 것으로 나타났다. *n*-BuOH 분획물에서는 46, 57, 63, 83, 91, 98%의 생존율을 보였고, 85% aq. MeOH 분획물에서는 16, 38, 61, 65, 82, 86%의 생존율을, *n*-hexane 분획물에서는 49, 74, 95, 93, 93, 96%의 생존율을 보여 85% aq. MeOH 분획물에서 높은 암세포 증식 억제율이 관찰되었다.



**Fig. 5.** Inhibitory effects of solvent fractions (a) H<sub>2</sub>O (b) *n*-BuOH (c) 85% aq. MeOH and (d) *n*-hexane from *Zostera japonica* on the growth of HT-1080 human fibrosarcoma cells. Data represents the mean values of three replicates. <sup>a-d</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

이상의 결과로부터 암세포의 종류에 따라 각기 다른 암세포 증식 억제율을 보였지만, 왕거머리말의 높은 항암활성을 확인할 수 있었으며 특히 용매분획들중에 극성이 낮은 85% aq. MeOH과 *n*-hexane 분획물에서 공통적으로 높은 암세포 증식 억제율이 농도에 의존적으로 나타나, 이들 분획층에 항암물질의 존재 가능성을 확인할 수 있었다. 따라서 수중에서도 꽃을 피우는 해양 현화식물 중 하나인 왕거머리말이 기존 해조류와는 매우 다른 이차 대사물질을 함유할 가능성이 매우 높을 것으로 여겨지며, 집중적인 연구를 통해 새로운 항암물질의 발견이 기대된다.

**사사**

본 연구는 2010년 농림수산식품부 수산기술개발사업 (No. 20100293) 연구비 지원에 의해 수행되었으며 국토해양부의 지원으로 수행한 해양에너지 전문인력양성사업의 연구 결과입니다.

**References**

1. den Hartog, C. (1970) The Seagrass of the World. pp. 275. North-

- Holland Publishing Company, Amsterdam, Netherlands.
2. Shin, H. and H. K. Choi (1998) Taxonomy and distribution of *Zostera* (Zosteraceae) in eastern asia, with special reference to korea. *Aquat. Bot.* 60: 49-66.
  3. Cho, T. O. and S. M. Boo (1998) Marine flora of oeyondo islands on the yellow sea, korea: green algae and seagrass. *Algae* 13: 1-11.
  4. Miki, S. (1932) On seagrass new to japan. *Bot. Mag.* 46: 774-788.
  5. Miki, S. (1933) On the seagrass in Japan (I) *Zostera* and *Phyllospadix*, with special reference to morphological and ecological characters. *Bot. Mag.* 47: 842-862.
  6. Lee, S. Y., C. J. Kwon, T. J. Kim, Y. B. Suh, and C. I. Choi (1999) Morphological examination of *Zostera asiatica* Miki (Zosteraceae) from various habitats. *Korean J. Environ. Biol.* 17: 503-512.
  7. Kim, J. B., J. I. Park, and K. S. Lee (2009) Seagrass distribution in deukryang bay. *Kor. J. Fish Aquat. Sci.* 42: 509-517.
  8. Huh, S. H., S. N. Kwak, and K. W. Nam (1998) Seasonal variations of eelgrass (*Zostera marina*) and epiphytic algae in eelgrass beds in kwangyang bay. *J. Kora Fish. Soc.* 31: 56-62.
  9. Choi, T. S., K. Y. Kim, B. G. Lee, and J. S. Lee (2005) Preliminary study on the toxicity and transfer of heavy metals and tributyltin to seagrass *Zostera marina*. *Algae* 20: 157-166.
  10. Khotimchenko, M. Y., K. V. Lenskaya, M. Y. Petrakova, Y. S. Khotimchenko, and V. V. Kovalev (2006) The mercury binding activity of pectin isolated from the seagrass *Zostera marina*. *Russian Journal of Marine Biology* 32: 312-215.
  11. Kim, J. B., J. I. Park, W. J. Choi, J. S. Lee, and K. S. Lee (2010) Spatial distribution and ecological characteristics of *Zostera marina* and *Zostera japonica* in the seomjin estuary. *Kor. J. Fish Aquat. Sci.* 43: 351-361.
  12. Lee, S. H., S. M. Ma, Y. S. Lim, H. K. Choi, and H. C. Shin (2004) Genetic diversity and its implications in the conservation of endangered *Zostera japonica* in korea. *J. Plant Biol.* 47: 275-281.
  13. Lee, S. M., S. Y. Lee, and C. I. Choi (2005) Reproductive phenology of four korean seagrasses, *Zostera caespitosa*, *Z. caulescens*, *Z. japonica* and *Z. marina*. *Ocean and Polar Research* 27: 125-133.
  14. Kumar, C. S., D. V. L. Sarada, T. P. Gideon, and R. Rengasamy (2008) Antibacterial activity of three south indian seagrasses. *Cymodocea serrulata*, *Halophila ovalis* and *Zostera capensis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 1989-1992.
  15. Yang, L., J. Guoliang, and W. Zhiqiang (2010) Antibacterial activity of extracts from *Zostera marina* against pathogens of *Apostichopus japonicus* skin ulceration disease. *J. Ocean Univ. Chin.* 9: 68-70.
  16. Choi, H. G., J. H. Lee, H. H. Park, and F. A. Q. Sayegh (2009) Antioxidant and antimicrobial activity of *Zostera marina* L. extract. *Algae* 24: 179-184.
  17. Kolenchenko, E. A., L. N. Sonina, and Y. S. Khotimchenko (2005) Comparative *in vitro* assessment of antioxidant activities of low-etherified pectin from the eelgrass *Zostera marina* and antioxidative medicines. *Russian Journal of Marine Biology* 31: 331-334.
  18. Roth, N. C. and A. M. Pregnall (1988) Nitrate reductase activity in *Zostera marina*. *Mar. Biol.* 99: 457-463.
  19. Sonina, L. N. and M. Y. Khotimchenko (2007) Effectiveness of pectin extracted from the eelgrass *Zostera marina* for alleviating lead-induced liver injury. *Russian Journal of Marine Biology* 33: 204-206.
  20. Hansen, M. B., S. E. Nielsen, and K. Berg (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* 119: 203-210.