大韓本草學會誌 제28권 제4호(2013년 7월)
Kor. J. Herbology 2013 ; 28(4) : 33-40

ISSN 1229-1765
http://dx.doi.org/10.6116/kjh.2013.28.4.33.

미역 발효추출물의 HCT-15 대장암 세포 사멸 유도 효과

김태윤[1#], 한효상[2], 이영종[1*]

1 : 가천대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 중부대학교 보건행정학과

Apoptosis Induction of HCT-15 Cells by Extracts of Undaria pinnatifida with Fermented Micro-organism

Tae-Yun Kim[1#], Hyo-Sang Han[2], Young-Jong Lee[1*]

1 : Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Gachon University Seongnam 461-701, Korea
2 : Department of Health Administration, College of Social Sciences,
Joongbu University Geumsan 312-702, Korea

ABSTRACT

Objectives : To study the apoptosis effects of fermented *Undaria pinnatifida* extracts(FUP) against HCT-15 colon cancer cells.

Method : By measuring cell proliferation, DNA fragmentation, cell cycle, morphology, and western blot from FUP, the study investigated the effects of the extractions had upon the HCT-15 colon cancer cells, and concluded that the inhibiting effects upon cells were induced by apoptosis.

Result : FUP effectively inhibited the growth of HCT-15 colon cancer cells. After analyzing the DNA fragmentation, the study observed a DNA ladder, while examining the cells, and found an increase of sub-G1 hypodiploid cells. On the changes regarding the nucleus of the cells, a condensation of cells and chromatin, as well as an apoptotic body was clearly observed. By observing through western blot from FUP, the study found a decreased level of Bcl-2 from HCT-15 colon cancer cells, but the increased level of Bax and cleaved caspase-3, which as a result induced apoptosis, inhibiting the growth of HCT-15 colon cancer cells. FUP increased the natural death of HCT-15 colon cancer cells by the induction of apoptosis. FUP seemed to have no suppressing effect upon HL-60/MX2 cells. However, compared to the fucoidan, the study was able to clearly observe morphological changes of HCT-15 cells apoptosis, in a 1/2 concentration.

Conclusion : FUP had antiproliferative effects on different kinds of cancer cells, while proving especially efficacious against colon cancer cells.

Key words : fermented *Undaria pinnatifida*, colon cancer cell, apoptosis

서 론

미역과(翅藻科 Alariaceae) 식물인 미역 *Undaria pinnatifida* (Harv.) Sur.은 겨울에서 2~4 월까지 莖葉이 무성할 때 지상부분을 채취하여 暴乾한 후 식품 또는 약재로 사용하고 있다[1,2]. 미역은 우리나라 공정서에는 수재되어 있지 않지만, 中華本草[3]에 다시마과(海帶科 Laminariceae)에 속하는 다시마(昆布) *Laminaria japonica* Areschoung, 미역과(翅藻科 Alariaceae)에 속하는 黑昆布 *Ecklonia kurome* Okam. 와 함께 昆布로 사용된다고 하였다.

미역은 줄기와 잎 등 부위별로 함량이 다르지만, 탄수화물 35.3%, 회분 30.8%, 단백질 15%, 수분 13%, 지방 3.2%, 섬유질 2.7%, 카로틴, 비타민(A, B_1, B_2, B_3, B_{12}, C) 등의 성분과 약리작용을 갖는 요오드, 브롬, 칼슘이 약 1.8%, 유

*교신저자 : 이영종, 경기도 성남시 수정구 성남대로 1342. 가천대학교 한의과대학 본초학교실
· Tel : 031-750-5415 · E-mail : garak@gachon.ac.kr
#제1저자 : 김태윤, 경기도 성남시 수정구 성남대로 1342. 가천대학교 한의과대학 본초학교실
· Tel : 010-3691-5153 · E-mail : kimtysoo@hanmail.net
· 접수 : 2013년 6월 19일 · 수정 : 2013년 7월 17일 · 채택 : 2013년 7월 18일

기산 1.6%, 알긴산, 알라닌, 글리신, 프롤린, 팔미트산, fucosterol, fucoidan, 마니톨 등이 함유되어 있다[1,4-7]. 미역은 혈압과 혈중 콜레스테롤 수치를 내리며, 갑상선 기능 부족을 바로 잡고, 조직이나 혈액에 들어간 후 병리적 산물의 흡수를 촉진시켜 병태조직을 붕괴하고 용해시키는 작용을 하고[1], 김 등[8]이 위암치료의 식이요법으로 미역을 권한 바와 같이 미역의 항암효과가 보고되었다. 미역의 煎劑는 효과가 없었으나 流浸膏는 住血吸蟲症과 肝硬變에 효과가 있고, mouse에게 化癌丹을 먹이면 Ehrlich씨 腹水癌(ascites carcinoma)에 대한 억제작용을 나타내었으며[1], 최근 이 등[9]은 *Laminaria religiosa* 에서 추출한 fucoidan extract 의 apoptosis 작용과 세포증식 효과에 대하여 발표하였다.

癌은 정상조직을 파괴하며 인체 내에서 급속도로 자라서 주위 조직에 침윤되고, 다른 조직으로 전이되어 수개월 내지 수 년 내에 생명을 빼앗는 무서운 질병이며[10], 이러한 암을 치료하는데 사용되는 대부분 항암제는 세포사멸(apoptosis)을 유도한다[11,12]. 화학요법에 의한 암치료제는 생체내의 암세포 뿐만 아니라 정상세포 및 다른 감염증에 대한 저항까지 약하게 하는 부작용을 일으키므로[13], 천연물로부터 면역기능을 높여주고 암세포에게만 특수하게 작용하는 항암제를 개발하려는 노력이 최근 많이 시도되고 있다[14].

미역 등 해조류가 한의학에서 瘰癧, 癭瘤 등 종양치료에 사용되고 있고, 이 등[9]이 다시마 *Laminaria religiosa* 에서 추출한 fucoidan extract 가 apoptosis 와 세포증식에 효과가 있음을 보고하였으나, 미역 발효추출물의 항암작용에 대한 보고는 아직 없었다. 이에 본 연구에서는 미역 발효추출물의 항암작용을 알아보기 위하여, 미역발효추출물의 HCT-15 대장암세포에서의 세포증식 억제효과를 검색하고 세포증식 억제효과가 apoptosis 유도에 의한 것인지 알아보기 위하여 DNA 분절검사 및 cell cycle, morphology의 변화를 알아보았으며, apoptosis 유도신호전달기전에 중요한 Bcl-2, Bax 그리고 caspase-3 의 발현양상을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

제주도 서귀포시 우도면 앞바다에서 자생하는 미역(*U. pinnatifida*)을 2006년도 겨울에 채취하였으며, 채취한 미역을 水洗하여 염분과 이물질을 제거한 후 수분함량이 5~10% 되게 자연건조 보관 후 사용하였다.

2) 시약 및 기기

본 실험에 사용된 기기는 Penicillin-Streptomycin(GIBCO Inc, USA), FBS(GIBCO Inc, USA), Trypsine(GIBCO Inc, USA), RPMI 1640(GIBCO Inc, USA), MTT(Sigma, USA), DMSO(Sigma, USA), PI(Sigma, USA), H33342(Sigma, USA), Fucoidan(Sigma, USA), Caspase Detection Kit(Sigma, USA), Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit(Promega, USA), Bio-Rad Protein assay Kit(BIO-RAD, USA), Anti-Mouse Bcl-2(Santa-Cruz, USA), Anti-Rabbit Bax(Santa-Cruz, USA), Anti-Rabbit caspase-3(Santa-Cruz, USA), Rabbit-Antimouse IgG(Santa-Cruz, USA) 등이다. 본 실험에 사용된 기기는 Microplate Reader(Amersham Pharmacia Biotech, USA), UV transilluminator(Spectronics Corporation Westbury, USA), Coulter EPICS XL™ Flow Cytometer(Coulter, USA), round bottom test tube(Sigma, USA), 형광현미경(Olympus, Japan) 등이다.

2. 방 법

미역발효추출물(The fermented *Undaria pinnatifida* extracts, 이하 the FUP extracts 로 표기)은 잘 건조된 미역을 粗粉碎한 후 시료무게의 10배의 물을 가하고 100~120℃에서 10 시간 가열 추출하여 상등액과 고형물로 분리한 후 고형물을 버린다. 그런 다음 상등액 추출액을 5 Brix 될 때까지 5~10 시간동안 가온하여 추출한 후, 계속하여 Streptococcus faecalis, Bacillus mesentericus, Clostridium butyricum 을 건조물량기준으로 각각 $1.0x10^6$~$1.0x10^9$ /g 함유하는 발효균주를 추출액 1 L에 대하여 0.1~0.2 g 투입하여 40℃~45℃에서 6 시간 발효하였다. 발효 후 125℃로 30 분 가열하여 미생물과 효소를 멸균하고 불활성화하여 얻은 미역발효추출물을 냉동건조 분말하였다. 이 분말을 원하는 농도에 따라 물에 용해시킨 후 실험용 배지로 희석하여 사용하였다.

3. 세포 배양

HCT-15(human colon cancer), MCF-7(human breast cancer), HL-60(human promyelocytic leukemia), HL-60/MX2(mitoxantrone resistant human promyelocytic leukemia), HL-60/ADR(adriamycin resistant human promyelocytic leukemia), A549(human lung carcinoma) 그리고 정상 세포주인 HEL-299(human embryonic lung cell)를 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank), ATCC(American type culture collection)과 내성세포연구센터(Research Center for Resistant Cells)로부터 분양 받아 실험에 사용하였다. 배지는 100 units/㎖의 Penicillin-Streptomycin(GIBCO Inc, NY, USA)과 10% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS; GIBCO Inc, NY, USA)을 포함하는 RPMI 1640 배지를 사용하였다. 배양은 37℃, 5% CO_2 항온기에서 배양하였다.

4. 세포 독성 측정

세포의 성장증식에 대한 미역발효추출물과 후코이단(The fucoidan from *Fucus vesiculosus*, 이하 Fucoidan으로 표기)의 효과를 비교하기 위하여 MTT(Sigma, MO, USA)의 환원에 따른 formazan 침전물(N,N'-diphenyl-formazyl-benzene)의 생성 정도로 세포 독성을 검색하였다. 96-well microplate에 실험할 세포를 3.0×10^5 cells/㎖로 넣고, 미역발효추출물을 10, 30, 50, 75, 100 ㎍/㎖의 농도로, Fucoidan을 1, 10,

30, 50, 100 ㎍/㎖의 농도로 처리하여 4 일간 배양하였다. 여기에 2 ㎎/㎖의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)를 50 ㎕ 첨가하고 4 시간 더 배양한 다음, plate를 1,000 rpm에서 5 분간 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 여기에 150 ㎕ dimethylsulfoxide(DMSO : Sigma, MO, USA)를 가하여 침전물을 용해시킨 다음 microplate reader(Amersham Pharmacia Biotech, NY, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 증식억제 정도를 조사하였다[15]. 그 중 가장 효과적인 대장암세포에 대하여 미역발효추출물의 세포사멸을 실험하였다.

5. DNA fragmentation

HCT-15 세포 (1.0×10^5 /㎖)에 50 ㎍/㎖ 의 농도로 미역의 발효 추출물을 처리한 다음 6, 12, 24 시간동안 배양하였다. 세포를 수집한 후 Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, WI, USA)를 사용하여 DNA를 분리하였다. 분리한 DNA를 1.5% agarose gel에서 40 분 (100 V)동안 전기영동을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하고 UV transilluminator (Spectronics Corporation Westbury, NY, USA)하에서 DNA fragmentation 현상을 관찰 하였다.

6. 세포주기변화 측정

HCT-15 세포 (1.0×10^5 /㎖)에 50 ㎍/㎖ 의 농도로 미역의 발효 추출물을 처리한 다음 6, 12, 24, 48 시간 동안 배양한 후, 세포를 수확하여 PBS(Phosphate Buffered Saline)로 세척하였다. 그 후 -20℃에서 70% ethanol로 30 분 동안 고정 시키고 PBS 세척 후 RNase A (1 ㎎/㎖)를 처리한 다음에 propidium iodide (PI; Sigma, MO, USA)로 염색하고, Coulter EPICS XLTM Flow Cytometer (Coulter, Miami, FL, USA)로 세포주기를 분석하였다[16].

7. 핵의 형태학적 변화 관찰

HCT-15세포 (1.0×10^5 /㎖)에 미역발효추출물은 50 ㎍/㎖의 농도로, Fucoidan은 100 ㎍/㎖의 농도로 처리한 다음 6, 12, 24, 48 시간 동안 배양한 후, DNA에 특이적으로 결합하는 형광색소인 Hoechst 33342 (H33342; Sigma, MO, USA) 용액을 가하여 37℃에서 10 분간 염색한 후 형광현미경 (IX-71, Olympus, Japan)하에서 관찰하였다[17].

8. Western blot

HCT-15 세포 (1.0×10^5 /㎖)에 50 ㎍/㎖의 농도로 미역발효추출물을 처리한 다음 6, 12, 24, 48 시간 동안 배양한 후, 세포를 2~3 회 PBS로 세척 후 300 ㎕의 lysis buffer을 첨가, 30 분 동안 lysis 시킨 후 원심분리 (15,000 rpm, 4℃, 15 min)하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)을 표준화하여 Bio-Rad Protein assay kit(BIO-RAD, HC, USA) 를 사용하여 정량하였다. 20~30 ㎍의 lysate를 10% mini gel SDS-PAGE (poly acrylamide gel electrophoresis)로 변성분리하여, 이를 PVDF membrane (BIO-RAD) 에 200 mA로 2 시간 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5% skin milk가 함유된 TTBS (TBS + 0.1% Tween 20) 용액에서 상온에서 2 시간동안 실시하였다. Bcl-2의 발현 양을 측정하기 위해 1차 항체로서 Anti-Mouse Bcl-2 (Santa-Cruz), Anti-Rabbit Bax(Santa-Cruz) 와 Anti-Rabbit caspase-3 (Santa-Cruz)를 TTBS 용액에서 희석(1:1000 또는 1:500)하여 상온에서 2 시간 반응시킨 후 TTBS로 3 회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP (horse radish peroxidase)가 결합된 Antimouse IgG(Vector)와 Rabbit-Antimouse IgG(Santa-Cruz)를 1:5000으로 희석하여 상온에서 30 분 간 반응시킨 후, TTBS로 4 회 세정하여 ECL 기질 (Amersham Co.)과 1 분간 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.

lysis buffer의 조성 : 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO, 10 mM NaF, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 25 ㎍/㎖ aprotinin, 25 ㎍/㎖ leupeptin.

9. 세포막 이동능 accumulation

세포 밖으로 약물을 배출함으로써 약물의 축적을 감소시키는 세포막 이동능을 FACS를 이용하여 간접적으로 측정하였다. HL-60/MX2(1.0×10^6 cells/㎖) 세포를 무혈청 배지와 함께 microtube에 넣은 후, 미역발효추출물을 10, 30, 75, 100 ㎍/㎖의 농도로 처리하였다. 37℃, 5% CO_2 항온기에서 30 분 동안 배양한 후 5 μM mitoxantrone 이 되도록 처리하고 30 분 동안 재배양하였다. 세포 부유액을 차가운 PBS 용액으로 3 번 세척한 후 500 ㎕ PBS 로 부유한 다음, 유세포분석기로 형광을 나타내는 세포를 측정하였다.

10. 통계처리

실험에서 얻은 결과를 Student' s t-test를 이용하여 통계 처리하였고, $p<0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 세포 증식 억제 효과

1)미역발효추출물의 세포 증식 억제 효과

세포의 성장증식에 대한 미역발효추출물의 효과를 MTT assay로 검색하였다. HCT-15, MCF-7, HL-60, HL-60/MX2, HL-60/ADR, HEL-299 에서 미역발효추출물을 10, 30, 50, 75, 100 ㎍/㎖의 농도로 처리하여 세포 증식 억제 효과를 검색한 결과, HCT-15 세포에 처리한 50 ㎍/㎖에서부터 50% 이상의 growth inhibition 값을 보였고, MCF-7과 HL-60 세포에 처리한 100 ㎍/㎖에서도 40% 이상의 growth inhibition을 보였다. 그리고 정상 세포주에 대한 세

포 독성 실험을 위해 HEL-299 세포에 미역발효추출물 10, 30, 50, 75, 100 ㎍/㎖ 농도로 처리한 결과 가장 높은 농도인 100 ㎍/㎖에서 약 20% 정도의 세포 독성을 보였다 (Figure 1).

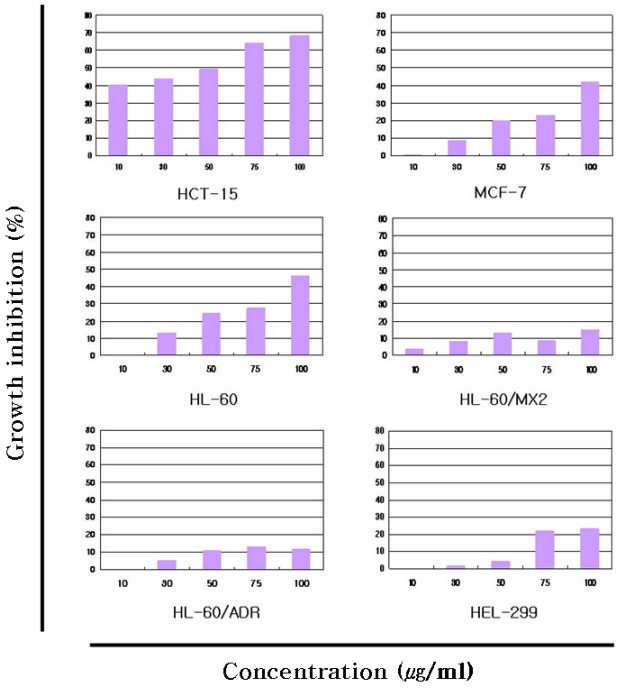

Figure 1. Inhibitory effects of the FUP extracts on the growth of different kinds of cells.
Different kinds of cells (1.0~3.0×10^5 cells/㎖) were treated with 10, 30, 50, 75 and 100 ㎍/㎖ of the FUP extracts for 4 days and measured for viability by MTT assay. All experiments were performed in triplicate. Data were presented as means ± SD from three separate experiments. * : P<0.05, ** : P<0.01 by t-test.
HCT-15 (human colon cancer), MCF-7 (human breast cancer), HL-60 (human promyelocytic leukemia), HL-60/MX2 (mitoxantrone resistant human promyelocytic leukemia), HL-60/ADR (adriamycin resistant human promyelocytic leukemia), HEL-299 (human embryonic lung cell)

2) Fucoidan의 세포 증식 억제 효과

세포의 성장증식에 대한 Fucoidan의 효과를 MTT assay로 검색하였다. HCT-15, MCF-7, HL-60, A549, HL-60/ADR, HEL-299 에서 Fucoidan을 1, 10, 30, 50, 100 ㎍/㎖의 농도로 처리하여 세포 증식 억제 효과를 검색한 결과, HCT-15 세포에 처리한 100 ㎍/㎖에서 62% 이상의 growth inhibition 값을 보였고, MCF-7 세포에 처리한 100 ㎍/㎖에서 34%, HL-60 세포에 처리한 100 ㎍/㎖에서 52%, A549 세포에 처리한 100 ㎍/㎖에서 65% 이상의 growth inhibition 값을 보였다. 또한 HL-60/ADR 세포에 처리한 100 ㎍/㎖에서 62% 그리고 정상 세포주에 대한 세포 독성 실험을 위해 HEL-299 세포에 Fucoidan 1, 10, 30, 50, 100 ㎍/㎖ 농도로 처리한 결과 가장 높은 농도인 100 ㎍/㎖에서 약 11% 정도의 세포 독성을 보였다(Figure 2).

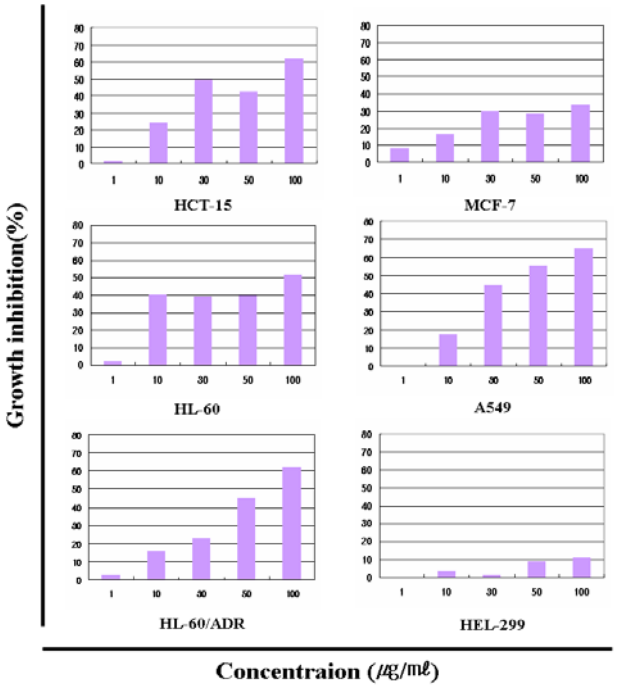

Figure 2. Inhibitory effects of the Fucoidan on the growth of different kinds of cells.
Different kinds of cells (1.0~3.0×10^5 cells/㎖) were treated with 1, 10, 30, 50 and 100 ㎍/㎖ of the Fucoidan for 4 days and measured for viability by MTT assay. All experiments were performed in triplicate. Data were presented as means ± SD from three separate experiments. * : P<0.05, ** : P<0.01 by t-test.
HCT-15 (human colon cancer), MCF-7 (human breast cancer), HL-60 (human promyelocytic leukemia), A549 (human lung carcinoma), HL-60/ADR (adriamycin resistant human promyelocytic leukemia), HEL-299 (human embryonic lung cell)

2. 미역발효추출물의 HCT-15 대장암 세포에 대한 DNA 분절 효과

미역발효추출물이 HCT-15 세포 성장증식 억제효과가 apoptosis에 의한 결과인지 조사하기 위해 DNA 분절현상을 조사하였다. HCT-15 세포 (1.0 × 10^5 /㎖)에 50 ㎍/㎖ 의 농도로 미역발효추출물을 처리한 다음 6, 12, 24 시간동안 배양하고 Internucleosomal DNA분절현상을 agarose gel 전기영동을 통하여 조사하였다. Internucleosomal DNA분절현상의 ladder pattern은 시간 의존적으로 관찰되었다. HCT-15 세포는 미역발효추출물 처리 12 시간 후부터 DNA 분절현상이 유도되었다(Figure 3).

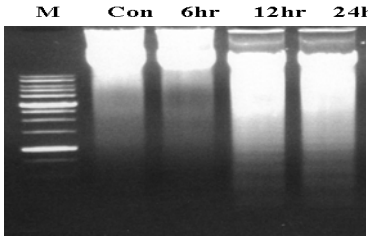

Figure 3. DNA fragmentation by the FUP extracts in HCT-15 cells. HCT-15 cells (1.0×10^5 cells/㎖) were treated with 50 ㎍/㎖ of the FUP extracts for 6, 12 and 24 hr. The first lane designated M in a 1 Kb DNA ladder [was] used as a molecular marker. Analysis for DNA fragmentation was performed as described in materials and methods. Con : Control

3. 미역발효추출물의 HCT-15 대장암 세포에 대한 세포주기변화 측정

HCT-15 세포 (1.0 × 10^5 /㎖)에 50 ㎍/㎖ 의 농도로 미역발효추출물을 처리한 다음 6, 12, 24, 48 시간 동안 배양한 후, DNA에 결합하여 형광을 나타내는 물질인 PI를 처리하여 세포주기를 유세포 분석기로 조사하였다. 그 결과, apoptotic 세포, 즉 sub-G1 hypodiploid 세포가 증가하는 것을 확인하였다(Figure 4).

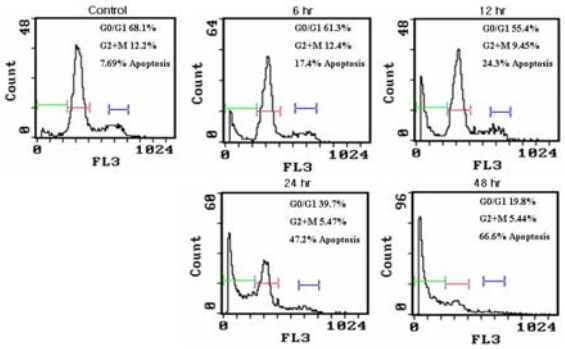

Figure 4. Cell cycle
HCT-15 cells (1.0×10^5 cells/㎖) were treated with 50 ㎍/㎖ of the FUP extracts for 6, 12, 24 and 48 hr. Cell phase distribution was determined by PI staining and FACS analysis. The flow cytometric analysis was performed as described in materials and methods. green line : sub-G1(apoptosis), red line : G0/G1, blue line : G2+M

4. Morphology

1) 미역발효추출물 처리에 의한 대장암세포의 형태학적 변화

HCT-15 세포 (1.0 ×10^5 /㎖)에 50 ㎍/㎖의 농도로 미역발효추출물을 처리한 다음 6, 12, 24, 48 시간 동안 배양한 후, apoptosis 동안에 나타나는 형태학적 변화를 DNA에 특이적으로 결합하는 형광색소인 Hoechst 33342 용액으로 염색한 후 형광현미경하에서 관찰하였다. 핵염색으로 조사한 결과, 미역발효추출물 처리에 의하여 cell shrinking, chromatin 응축 및 apoptotic body 등과 같은 형태학적 변화들이 뚜렷하게 시간 의존적으로 관찰되었다(Figure 5).

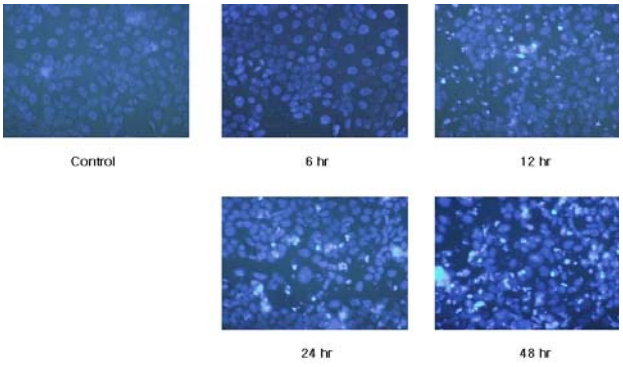

Figure 5. Photographs showing cells with highly condensed nuclei stained with H33342(10㎍/㎖ medium at final).
HCT-15 cells (1.0×10^5 cells/㎖) were treated with 50 ㎍/㎖ of the FUP extracts for 6, 12, 24 and 48 hr. The cells were photographed under microscopy(X400).

2) Fucoidan 처리에 의한 대장암세포의 형태학적 변화

HCT-15 세포 (1.0 ×10^5 /㎖)에 100 ㎍/㎖의 농도로 Fucoidan을 처리한 다음 6, 12, 24, 48 시간 동안 배양한 후, apoptosis 동안에 나타나는 형태학적 변화를 DNA에 특이적으로 결합하는 형광색소인 Hoechst 33342 용액으로 염색한 후 형광현미경하에서 관찰하였다. 핵염색으로 조사한 결과, Fucoidan 처리에 의하여 cell shrinking, chromatin 응축 및 apoptotic body 등과 같은 형태학적 변화들이 뚜렷하게 시간 의존적으로 관찰되었다(Figure 6).

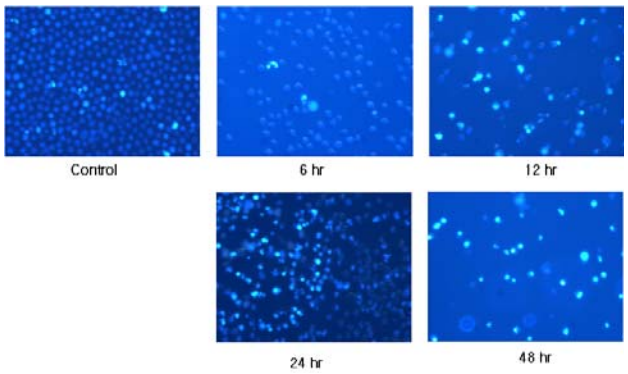

Figure 6. Photographs showing cells with highly condensed nuclei stained with H33342(10 ㎍/㎖ medium at final).
HCT-15 cells (1.0×10^5 cells/㎖) were treated with 100 ㎍/㎖ of the Fucoidan for 6, 12, 24 and 48 hr. The cells were photographed under microscopy(X400).

5. Western blot

1) Bcl-2 와 Bax 발현 변화 관찰

세포에 일률적으로 존재하는 β-actin 은 control 로 normalization으로 사용되었다. anti-apoptosis 유전자로 알려진 Bcl-2와 pro-apoptosis 유전자로 알려진 Bax의 protein level을 조사하였다. HCT-15 세포 (1.0 × 10^5 /㎖)에 50 ㎍/㎖의 농도로 미역발효추출물을 처리한 다음 6, 12, 24, 48 시간 동안 배양한 후, western blot방법을 이용하여 Bcl-2와 Bax 발현 변화를 관찰한 결과, 처리군에서 Bcl-2 발현이 감소하는 것을 확인하였으며, Bax 발현은 증가됨을 확인할 수 있었다 (Figure 7). 미역발효추출물은 HCT-15 세포의 Bcl-2 level을 down-regulation하여 apoptosis를 유도함으로써 HCT-15 세포의 성장 증식을 억제함을 확인할 수 있었다.

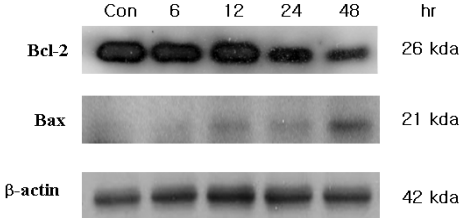

Figure 7. Western blot analysis of Bcl-2 and Bax expression in the HCT-15 cells treated with the FUP extracts.
HCT-15 cells (1.0×10^5 cells/㎖) were treated 50 ㎍/㎖ of the FUP extracts for 6, 12, 24 and 48 hr. Bax and Bcl-2 proteins were analyzed by western blotting using specific antibodies. β-actin, used as the internal control, was detected at the position corresponding to a molecular weight of 42 kda. Bcl-2 : anti-apoptotic protein, Bax : apoptotic protein

2) cleaved caspase-3 발현 관찰

HCT-15 세포 (1.0 × 10^5 /㎖)에 50 ㎍/㎖의 농도로 미역발효추출물을 처리한 다음 6, 12, 24, 48 시간 동안 배양한 후, western blot 방법을 이용하여 caspase-3 발현 변화를 관찰한 결과, 처리 군에서 caspase-3 가 cleavage 되는 것을 미역발효추출물을 처리 후 12 시간 이후부터 확인되었다(Figure 8).

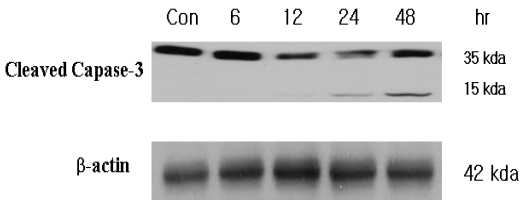

Figure 8. Western blot analysis of cleaved caspase-3 expression in the HCT-15 cells treated with the FUP extracts.
HCT-15 cells (1.0×10^5 cells/㎖) were treated 50 ㎍/㎖ of the FUP extracts for 6, 12, 24 and 48 hr. Proteolytic cleavage of caspase-3 in the HCT-15 cells treated with the FUP extracts was measured after 12 hr. by western blot analysis. β -actin, used as the internal control, was detected at the position corresponding to a molecular weight of 42 kda.

6. MX2 (mitoxantrone) accumulation

Mitoxantrone 이라는 항암제에 내성을 가지고 있는 HL-60/MX2 세포에 10, 30, 75, 100 ㎍/㎖의 농도로 미역발효추출물을 투여하고, 유세포분석기(FACS)를 통해 측정한 데이터로 control과 비교를 하였을 때, 항암제에 내성을 가진 HL-60/MX2 세포에는 억제효과가 없는 것으로 보였다 (Figure 9).

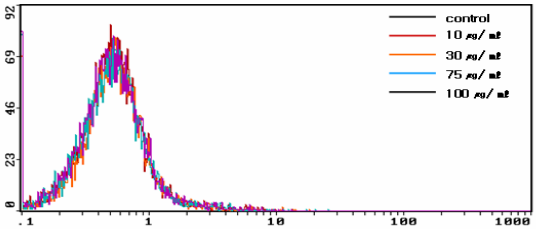

Figure 9. Flow cytometry analysis of mitoxantrone accumulation by the FUP extracts in HL-60/MX2 cells.
HL-60/MX2 cells (1.0×10^6 cells/㎖) were treated 10, 30, 75 and 100 ㎍/㎖ of the FUP extracts and flow cytometry analysis of MX accumulation was performed as described in the materials and methods. We examined the chemosensitizing properties of the FUP extracts, failed to show effects on the accumulation of MX due to the FUP extracts.
X-axis : the amount of MX accumulation. Y-axis ; level of fluorescence.

고 찰

미역과에 속하는 *Alaria*는 북극근처에서 태평양 · 대서양온대에 가장 널리 분포하며, *Egregia*, *Eisenia*, *Pterygophora*는 태평양온대에서 멕시코까지 분포하고, *Ecklonia*는 우리나라 동 · 남해안 · 제주도연안에 분포하며, *Undaria*는 우리나라 전연안과 일본주변수역에 분포한다. 따라서 우리나라에 분포하는 미역은 미역(裙帶菜) *Undaria pinnatifida* (Harv.) Sur. 과 곰피(昆布) *Ecklonia kurome* Okam. 등으로 나누고 있다[2].

昆布는 名醫別錄[18]에 "昆布 味鹹 寒無毒. 主治 十二種水腫, 癭瘤 聚結氣, 癭瘡. 生 東海." 라고 처음 수재되었으며, 本草綱目[19]에서는 미역국인 昆布臛에 반드시 高麗昆布를 사용하게 하고 있어 한국미역이 우수함을 알 수 있다.

昆布의 한의학에서 효능은 名醫別錄[18]에 十二種水腫과 癭瘤, 聚結氣, 癭瘡을 치료한다고 한 이후, 현대에 와서는 조[20]는 甲狀腺癌, 惡性淋巴腫, 淋巴轉移癌, 肺癌에 사용하고 있다.

미역은 분해되기 어려운 다당체로 구성되어 있고, 알긴산과 fucoidan과 같은 생리활성물질들은 세포간 충진물질로 존재하기 때문에 일반적인 열수추출이나 알코올추출에 의한 방법으로는 추출이 어렵고, 일부 추출된 생리활성물질도 고분자 다당체 또는 배당체 형태들로 존재한다[21]. 따라서 체내에 이를 분해할 수 있는 효소나 미생물이 존재하지 않으면 분해되지 못해 흡수율이 떨어져 대부분 체외로 배설하게 되므로, 약리적인 효과를 얻기 위해서는 미역을 효소나 미생물을 이용하여 발효 추출하는 것이 필요하다.

현대 과학적으로 분석하여 보면, 미역에 존재하는 fucoidan은 L-fucose, 황산염, 자일로스, 갈락토스, 만노스, 글루쿠론산 등을 가지는 다당체이다[22]. 그 약리학적 작용은 혈압과 혈중 콜레스테롤 수치를 내리며, 갑상선 기능 부족을 바로 잡고, 조직이나 혈액에 들어간 후 병리적 산물의 흡수를 촉진시켜 병태조직을 붕괴하고 용해시키는 작용을 하고[1], 항암작용[8]뿐만 아니라 apoptosis 유도작용도 알려져 있다[9]. 이와 같이 효능이 우수하고 식용으로 애용하는 미역을 가지고 발효한 추출액을 대장암에 적용하여 보았다.

우선 미역발효추출물의 HCT-15 세포증식에 대한 억제 효과는 MTT assay를 이용하여 검색하였다. 미역발효추출물을 10, 30, 50, 75 및 100 ㎍/㎖의 농도로 HCT-15 세포에 처리한 결과, 100 ㎍/㎖의 농도에서 68% 로 가장 높은 HCT-15 세포 증식 저해 효과를 보였다. 정상 세포의 증식을 억제하는지 알아보기 위하여 HEL-299에 같은 방법으로 미역발효추출물을 처리하여 MTT assay를 수행하였다. 그 결과, 30 ㎍/㎖의 농도에서는 1%, 50 ㎍/㎖의 농도에서는 4%, 75 ㎍/㎖의 농도에서는 21%, 100 ㎍/㎖의 농도에서는 23% 까지 HEL-299 세포 증식을 억제하는 것으로 확인되었다. 미역발효추출물이 HEL-299 세포보다 HCT-15 대장암 세포의 증식을 더 강력히 억제하는 것을 알 수 있으며, HCT-15 대장암 세포의 증식을 50% 억제하는 농도에서는 HEL-299 세포의 증식은 4% 이하로 억제 되었다.

미역발효추출물과 Fucoidan의 항암효과를 비교하기 위해서, Fucoidan을 1, 10, 30, 50 및 100 ㎍/㎖의 농도로 HCT-15 세포에 처리한 결과, 100 ㎍/㎖의 농도에서 62% 로 가장 높은 HCT-15 세포 증식 저해 효과를 보였다. HEL-299에서는 50 ㎍/㎖의 농도에 9%, 100 ㎍/㎖의 농도에 11% 까지 HEL-299 세포 증식을 억제하는 것으로 확인되었다. Fucoidan도 HEL-299 세포보다 HCT-15 대장암 세포의 증식을 더 강력히 억제하는 것을 알 수 있으며, HCT-15 대장암 세포의 증식을 50% 억제하는 농도에서는 HEL-299 세포의 증식은 4% 이하로 억제 되었다. 이상의 결과로 대장암세포에서는 미역발효추출물이 Fucoidan보다 적은 농도에서 좋은 효과를 보인다.

Apoptosis는 프로그램 된 세포사멸로 알려져 있고, 그에 따른 신호전달기전의 활성과 세포증식 · 사멸사이의 균형을 유지하는데 중요한 역할을 수행하는 선택적이고 생리적인 과정이다[23,24]. 미역발효추출물 처리에 의하여 HCT-15 세포의 apoptosis가 유도되는지 DNA 분절현상을 전기영동으로 관찰하였다. 미역발효추출물을 HCT-15 세포에 각각 50 ㎍/㎖ 농도로 6, 12, 24 시간 동안 처리하여 DNA ladder를 확인한 결과, 미역발효추출물 처리군에서 뚜렷한 DNA ladder를 관찰할 수 있었다. 그리고 HCT-15 세포의 DNA 분절을 유도하는 미역발효추출물을 50 ㎍/㎖ 농도로 6, 12, 24, 48 시간 동안 처리한 다음, DNA에 결합하여 형광을 나타내는 물질인 PI를 처리하여 세포주기를 유세포 분석기로 조사하였다. 그 결과, 미역발효추출물 처리에 의하여 apoptotic 세포, 즉 sub-G1 hypodiploid 세포가 증가하는 것을 확인하였다. 이것으로 보아 이 추출물에 의하여 HCT-15 세포의 apoptosis가 유도되는 것으로 보인다. 동일한 처리 방법으로 apoptosis 동안에 나타나는 형태학적 변화를 H33342를 이용한 핵염색으로 조사한 결과, 미역의 발효추출물 처리에 의하여 cell shrinking, chromatin 응축 및 apoptotic body 등과 같은 형태학적 변화들이 뚜렷하게 확인 되었다. 또 Fucoidan을 이용하여 apoptosis 동안에 나타나는 형태학적 변화를 관찰하려 하였지만, 50 ㎍/㎖ 농도로는 잘 나타나지 않아 100 ㎍/㎖ 농도로 H33342를 이용한 핵염색으로 조사한 결과, cell shrinking, chromatin 응축 및 apoptotic body 등과 같은 형태학적 변화들이 12 hr 이후부터 뚜렷하게 확인 되었다.

미역발효추출물에 의한 HCT-15 대장암 세포의 apoptosis 유도 기전을 밝히기 위해 anti-apoptosis 유전자로 알려진 Bcl-2와 pro-apoptosis 유전자로 알려진 Bax의 protein level을 조사하였다. Bcl-2 Family는 미토콘드리아로부터 apoptosis 동안에 AIF (apoptosis induced factor)와 cytochrome c의 방출을 방해함으로써 apoptosis를 방지한다. Bcl-2 Family는 apoptosis를 억제하는 것과 촉진하는 집단으로 나눌 수 있는데 Bcl-2 나 Bcl-xL은 apoptosis를 억제하며 Bax, Bcl-xS 등은 촉진하는 작용을 한다. 특히 세포사멸을 촉진하는 여러 가지 조건 아래서도 세포가 지속적으로 생존하는 것으로 봐서 Bcl-2가 세포생존에 중요한 역할을 한다고 판단하였고, 이어서 Bcl-2의 역할이 세포의 apoptosis를 억제하기 때문이라는 것이 증명되었다[25]. 미역발효추출물을 50 ㎍/㎖ 농도로 6, 12, 24, 48 시간 동안 처리하고, western blot방법을 이용하여 Bcl-2와 Bax 발현 변화를 관찰한 결과, 처리 군에서 시간 의존적으로 Bcl-2 발현이 감소하는 것을 확인하였으며, Bax 발현은 증가됨을 확인할 수 있었다. 미역의 발효추출물은 HCT-15 대장암 세포의 Bcl-2 level을 down-regulation하여 apoptosis를 유도함으로써 HCT-15 대장암세포의 성장 증식을 억제함을 확인할 수 있었다.

Caspase란 apotosis와 관련된 단백질 분해효소로 현재까지 13 종류의 이성단백질이 발견되었으며, 세포사멸 신호를 세포 밖에서부터 세포 내로 매개하는 역할과 세포내 단백질을 직접 분해하는 등 다양한 기능을 가진 단백질로 알려져 있다[26]. 미역발효추출물을 50 ㎍/㎖ 농도로 6, 12, 24, 48 시간 동안 처리하고, western blot방법을 이용하여 caspase-3 발현변화를 관찰한 결과 처리 군에서 12 시간부터 caspase-3가 cleavage 되는 것을 확인하였다. 즉 cleaved caspase-3가 시간 의존적으로 활성화되어 apoptosis가 이루어짐으로써 HCT-15 대장암세포의 성장증식을 억제함을 알 수 있다.

HL-60/MX2 cell은 mitoxantrone이라는 항암제에 내성을 가지고 있는 세포다. 내성을 가지게 되는 기전은 처리된 항암제에 대해서 세포내에 축적시키지 않고 세포막 이동능에 의해 약물의 축적을 방해하면서 항암제가 제 역할을 하지 못하게 하는 것이다. 유세포분석기(FACS)를 통해 측정한 데이터로 control과 비교를 했을 때 약물축적을 도와줬다면 그래프가 오른 쪽으로 이동을 하게 된다. 그러나 표에서 보듯이 농도 별로 처리를 해보았지만 그런 결과를 보이지 않았다. 따라서 미역발효추출물이 항암제에 내성을 가진 HL-60/MX2 세포에는 억제효과가 없는 것으로 보였다. 항암제에 내성을 가진 HL-60/ADR는 미역발효추출물 100 ㎍/㎖ 농도에서 12% 로 억제력이 저조하나, Fucoidan은 62% 로 억제효과를 보였다. 이러한 결과로 보아 미역발효추출물은 양약에 내성이 생기지 않은 암세포에 더욱 효과가 있다.

이러한 결과는 미역 발효추출물의 활성성분을 대장암치료에 이용할 수 있는 가능성의 근거를 제시하는 것이다. 향후 대장암치료제로 미역발효추출물을 개발하기 위해서는 폭넓은 분자기전 연구에 관한 실험을 보충하여야 하고, 임상에서의 항대장암효능을 입증하기 위하여 동물실험모델을 통하여 *in vivo* 실험연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

미역발효추출물이 HCT-15 대장암세포의 apoptosis 유도 효과 및 기전에 미치는 영향을 분자생물학적 방법으로 실험하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 미역발효추출물은 HCT-15 대장암세포의 성장증식을 효과적으로 억제하였으나, HEL-299 정상세포에서는 성장억제효과가 적었다.

2. DNA분절검사에서 DNA ladder가 나타나며, 세포주기 변화측정에서는 sub-G1 hypodiploid cells이 증가하였으며, 핵의 형태학적 변화에서는 세포와 chromatin 응축 및 apoptotic body 등과 같은 형태학적 변화가 뚜렷하게 확인 되었고, western blot에서는 Bcl-2가 감소하고, Bax 단백질이 증가하였다. 또 caspase-3의 cleavage가 확인되어 caspase-3의 활성을 확인하였다.

3. HCT-15 대장암세포의 caspase-3의 활성이 일어나고, Bcl-2가 감소되는 apoptosis 유도기전을 보임으로써 HCT-15 대장암세포의 증식억제를 확인할 수 있었다.

4. 미역발효추출물은 적은 농도에서도 HCT-15 대장암세포가 자연사멸 되었고, 양약에 내성이 생기지 않은 암세포에 더욱 효과가 있었다.

미역발효추출물은 *in vitro* 실험에서 대장 암세포에 대하여 항암효과가 인정되었으므로, 미역발효추출물을 항암에 응용할 수 있을 것으로 사료되며, 미역발효추출물의 임상에서의 항대장암효능을 입증하기 위하여 동물실험모델을 통하여 실험연구가 필요할 것으로 사료된다.

Reference

1. Lee KS, An DK, Shin MK, Kim CM. Wanyeok-Jungyakdaesajeon. Seoul : Jungdam publisher. 1997 : 393-7, 4650-2, 6076-82.
2. Kang JW. Haesansikmul-Hak. Seoul : Daehangyogwaseo Co Ltd. 1984 : 214-7.
3. State Administration of Traditional chiense medicine of the People's Republic of China. Zhonghuabencao. Vol. 10. Shanghai : Shanghai Scientific and Technical Publishers. 1999 : 453-8.
4. Lee YJ. A Study on Mineral and Alginic acid Contents by Different Parts of Sea Mustards(Undaria pinnatifida). Kor J Food Culture. 2004 ; 19(6) : 691-700.
5. Koo JG, Jo KS, Do JR, Woo SJ. Isolation and purification of fucoidans from Laminaria religiosa and Undaria pinnatifida in Korea. J Kor Fish Soc. 1995 ; 28(2) : 227-36.
6. Pettitt TR, Jones AL, Harwood JL. Lipids of the marine red algae, chondrus crispus and polysiphonia lanosa. Phytochemistry. 1989 ; 28 : 399-408.
7. Hong JS, Kwon YJ, Kim YH, Kim MK, Park IW, Kang KH. Fatty acid composition of Miyeok(Undaria pinnatifida) and Pare(Enteromorpha compressa). J Kor Soc Food Nutr. 1991 ; 20(4) : 376-80.
8. Kim JS, Ryo BH, Park DW, Ryo GW. For the prevention and treatment of tumors diet. J Kor Oriental Oncology. 1995 ; 1(1) : 231-48.
9. Lee JJ, Song YK, Lim HH. Fucoidan extract from Laminaria religiosa suppresses ischemia-induced apoptosis and cell proliferation in the hippocampus of gerbils. Kor J Oriental Medicine. 2006 ; 27(4) : 105-15.
10. Seoul National University College of Medicine. Jongyang-Hak. Seoul: Seoul National University publisher. 1989 : 1-7.
11. Nieves-Neira W, Pommier Y. Apoptotic response to camptothecin and 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) in the 8 human breast cancer cell lines of the NCI Anticancer Drug Screen: multifactorial relationships with topo isomerase I, protein kinase C, Bcl-2, p53, MDM-2 and caspase pathways. Int J Cancer. 1999 ; 82(3) : 396-404.
12. Piazza GA, Rahm AL, Krutzsch M, Sperl G, Paranka NS, Gross PH, Brendel K, Burt RW, Alberts DS, Pamukcu R et al. Antineoplastic drugs sulindac sulfide and sulfone inhibit cell growth by inducing apoptosis. Cancer Res. 1995 ; 55(14) : 3110-16.
13. Mervyn J, Mary D, Gerald MC. Antitumor activity of 1-naphthol against L1210 leukemia in vivo and enrlich ascites tumor cells in vivo and in vitro. Cancer letters. 1986 ; 33(3) : 347-54.
14. Lee CH. Studies on the Inhibitory Effect of Berberidis Ramulus to the Liver and Colorectal Ramulus. Graduate School of Kyungwoon University. 2007.
15. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colormetric assay. Cancer Res. 1987 ; 47(4) : 943-6.
16. Nicoletti I, Migliorati C, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J Immunol Methods. 1991 ; 139(2) : 271-9.
17. Luo Y, Kessel D. Initiation of apoptosis versus necrosis by photodynamic therapy with chloroaluminum phthalocyanine. Photochem Photobiol. 1997 ; 66(4) : 479-83.
18. Tao HJ. Mingyibielu. Beijing : Renminweisheng publisher. 1986 : 157.
19. Lee SS. Bonchokangmok. Seoul : Daeseongmoonhwasa. 1995 : 396-8.
20. Cho JK. Hanbanglimsangjongyanghak. Daejeon : Joomin publisher. 2005 : 753.
21. Kim HS, Bae TJ. Studies on the Hydrolysis of Seaweed Using Microorganisms and Its Application -I. Screening of Microfloras Involved in Hydrolysis of Sea Tangle (Laminaria japonica) and Sea Mustard (Undaria pinnatifida). J Kor Fish Soc. 2002 ; 35(4) : 438-44.
22. Duarte MER, Cardoso MA, Noseda MD, Cerezo AS. Structural studies on fucoidans from the brown seaweed Sargassum stenophyllum. Carbohydr Res. 2001 ; 333(4) : 281-93.
23. Evan G, and Littlewood T. A matter of life and cell death. Science. 1998 ; 281(5381) : 1317-22.
24. Piao W, Yoo J, Lee DK, Hwang HJ, Kim JH. Induction of G(2)/Mphase arrest and apoptosis by a new synthetic anti-cancer agent, DW2282, in promyelocytic leukemia (HL-60) cells. Biochem Pharmacol. 2001 ; 62(11) : 1439-47.
25. Antonsson B, Martinou JC. The Bcl-2 protein family. Exp Cell Res. 2000 ; 256(1) : 50-7.
26. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2004 ; 5(11) : 897-907.