

Induction of Growth Inhibition and Apoptosis in Human Cancer Cells by a Brown Algae Extract

Kang-Sik Choo, Hae-Nim Lee, Seong-Ah Shin, Hyeong-Jin Kim, Young-Seok Park, Sang-Ki Kim and Ji-Youn Jung^{1*}

Department of Companion and Laboratory Animal Science, Kongju National University, Yesan 340-702, Korea

Received December 24, 2015 / Revised March 10, 2016 / Accepted April 27, 2016

In this study, we investigated the effects of *Undaria pinnatifida* (UP), *Petalonia binghamiae* (PB) and *Punctaria latifolia* (PL) extracts on the inhibition of proliferation and apoptosis in human gastric and breast cancer cells. AGS, MDA-MB-231 and SK-BR-3 cells were treated with 0, 50, 100, and 200 µg/ml concentrations of the extracts to determine their anti-proliferative effects, using the MTT assay. The UP, PB and PL extracts inhibited proliferation of AGS, MDA-MB-231 and SK-BR-3 cells in a dose-dependent manner, and the PL extract was found to be the most effective. DAPI staining was also performed to determine changes in the cell nucleus. Further, the AGS, MDA-MB-231 and SK-BR-3 cells were treated with 0, 50, 100, and 200 µg/ml of only the PL extract. DAPI staining showed increased chromatin condensation, which is indicative of apoptosis, in the 200 µg/ml group. The expression of the Bax, Bcl-2, and PARP proteins in AGS, MDA-MB-231 and SK-BR-3 cells treated with the PL extract was also determined by western blot analysis. The expression of Bax (a pro-apoptotic protein) and cleaved-PARP was increased, whereas the expression of Bcl-2 (an anti-apoptotic protein) was decreased compared with the control. These findings indicate that the PL extract may have potential as an alternative anticancer drug and nutraceutical.

Key words : Apoptosis, Bcl-2 family, *Petalonia binghamiae*, *Punctaria latifolia*, *Undaria pinnatifida*

서 론

암은 전 세계적으로 인간의 생명을 위협하는 질환 중 하나로, 국내 또한 서구화된 식생활 및 환경 등 후천적 원인으로 인하여 암의 발생빈도 및 사망률은 꾸준히 증가하고 있는 추세이다[6, 16]. 위암은 아시아에서 높은 발생률을 보이며, 남아메리카, 동유럽에서도 높은 빈도로 발생한다[31]. 현재 위암의 치료법에는 수술요법, 약물치료, 방사선 요법 등이 있지만, 수술 후에도 재발할 가능성이 높으며, 생존율이 낮아 좋은 예후를 기대하기 어렵다[19, 25, 38]. 유방암은 서구에서 가장 흔한 암으로 우리나라에서도 급속도로 증가하는 추세이며, 특히 여성에서 가장 많이 나타난다[16]. 유방암의 치료목적으로 Tamoxifen 같은 호르몬 조절제가 개발 되었으나 암세포뿐만 아니라 정상 세포에도 영향을 미치고, 내성이 생기는 등 예후가 좋지 않은 경향이 있다[8]. 암(cancer)은 여전히 그 발생기전이 불명확하고 난치성 질환으로 남아 있으며, 이를 치료하기 위하여

화학요법, 방사선 요법, 면역요법 등 다양한 치료법들이 도입되고 있으나 치료과정에서 정상세포에 영향을 주어 심각한 부작용을 유발하는 것으로 알려져 있다[10, 14]. 이를 극복하기 위해 부작용이 적은 항암제 개발과 더불어 암의 발병을 막는 의약품의 개발에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다[15, 28, 33].

오래 전부터 인류는 해양과 육상에서 얻은 천연자원을 식재료, 약품, 건강 보조제 등으로 사용해왔다[24, 29]. 특히 해양자원인 갈조류는 아시아권에서 가장 많이 소비되고 있으며, 단백질과 미네랄이 풍부하고 다양한 생리활성기능을 가진 천연자원으로 알려져 있다. 이러한 천연자원은 생체 내에서 항산화 및 항암 등의 생리 활성작용을 조절하는 유효 성분이 존재한다고 밝혀지면서 암세포에 특이적으로 작용하는 천연자원 항암제 개발에 대한 연구가 활발해지고 있다[21, 27, 32, 35].

대표적인 해양자원으로 갈조류에 속하는 미역, 다시마 등은 항암[22], 항응고제[29, 37], 항균[26], 항염증[17], 고혈압 예방[25]과 같은 다양한 생리활성을 갖는 것으로 알려져 있다. 갈조류의 주성분에는 cellulose와 같은 구조의 구조다당류와 alginic acid, laminaran, fucoidan 등의 점질 다당류가 있으며, 이러한 성분들은 생리활성조절 능력을 인정받고 다양한 연구가 진행되고 있는 중이다. 특히 fucoidan과 laminaran 성분은 항암 및 항응고제 등 생리활성이 우수한 것으로 알려져 있다 [2, 13, 29].

Hajra 등[11]의 연구에 따르면 많은 종류의 항암제에 사용

*Corresponding author

Tel : +82-41-330-1526, Fax : +82-41-330-1529

E-mail : wangza@kongju.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

되는 물질들은 암세포에서 apoptosis를 유도하여 암의 발생과 진행을 억제하는 것으로 알려져 있다. 이러한 apoptosis는 개체의 발생단계에서 정상적인 발달과 분화에 관여하며 DNA 손상 및 바이러스 감염에서 개체의 생존을 위한 방어기전으로 체내 비정상적인 세포 및 손상된 세포들을 제거한다[12, 29]. Apoptosis를 통해 암의 발생과 진행을 억제하는 것으로 알려진 Bcl-2 family는 pro-apoptotic protein과 anti-apoptotic protein으로 구별된다[9]. Pro-apoptotic protein에는 Bax, Bid, Bad 등이 있으며, 이러한 단백질들은 미토콘드리아 외벽을 깨트려 apoptosis를 유도시키는 것으로 알려져 있다. Anti-apoptotic protein에는 Bcl-2, Bcl-xL, A1 등이 있으며, 이들은 미토콘드리아의 외벽을 보존하여 apoptosis를 억제한다[1, 5, 34].

따라서 본 연구는 해양자원의 대표적인 갈조류 중 미역 (*Undaria pinnatifida*), 미역쇠(*Petalonia binghamiae*), 넓은 미역쇠(*Punctaria latifolia*)를 추출한 시료들을 이용하여 위암, 유방암 세포에서 성장에 미치는 영향을 조사하였고, 그 중 성장 억제효과가 가장 뛰어난 시료가 암세포에서 apoptosis 발현을 유도시키는지 확인하였다. 이러한 결과는 갈조류 추출물이 기능성 항암식품의 기초 데이터로 제공될 것으로 기대되는 연구이다.

재료 및 방법

세포주 및 시약

본 실험에서 사용한 세포주는 정상 간세포 WB, 위암세포 AGS, 유방암 세포 MDA-MB-231 그리고 유방암 세포 SK-RB-3이며 한국 세포주 은행(KCLB, Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양 받았다. 세포배양에 사용한 RPMI-1640, 5% fetal bovine serum은 Welgene (Gyeonsan, Korea)에서 구입하였으며, 1% streptomycin/penicillin (BRL, Grand Island, NY, USA)은 Gibco에서 구입하였다. 본 연구에 사용한 일반적인 시약은 Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. anti-rabbit IgG와 anti-Bax, anti-Bcl-2, anti- β -actin, anti-PARP은 Cell signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다.

갈조류로부터 추출물 제조

본 실험의 미역, 미역쇠, 넓은 미역쇠 추출물들은 모두 해양 갈조식물자원 기탁등록보존기관(MBRB, Marine Brown Algae Resources Bank, Gwangju, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. 채집된 샘플들은 흐르는 수돗물로 씻어 염분과 이물질을 제거한 후 건조기를 통하여 완전히 건조 시켰다. 건조된 샘플은 잘게 분쇄하여 건조된 샘플 무게의 20배 80% ethyl alcohol로 일주일 동안 유효성분을 침출 시켰다. 침출된 샘플은 회전진공농축기(EYELA N-1000, EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 45-50°C에서 감압농축시킨 후 동결건조기를 이용하여

동결건조시켜 최종 추출물을 얻었다. 얻어진 추출물은 -80°C의 초저온 냉동고에 보관하였다.

세포 배양

WB, AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포를 5% fetal bovine serum (FBS), 1% streptomycin/penicillin을 첨가한 RPMI-1640 배지를 사용하여, 37°C, 5% CO₂가 유지되는 incubator에서 배양하였다. 세포가 80%정도로 175-cm² flask를 채우면 PBS(PH 7.4)로 세포의 단층을 씻어낸 후 trypsin-EDTA로 처리하여 계대배양 하였다. 배지는 2~3일 간격으로 교환 하였다.

MTT assay

WB, AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포는 2x10⁴ cells/ml로 96 well plate에 분주 한 후 24시간 배양하였다. 그 다음 미역, 미역쇠, 넓은 미역쇠 추출물을 각각 농도 별로 처리한 후, 37°C, 5% CO₂가 유지되는 incubator에서 24시간 배양한다. 그 후 2 mg/ml의 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] solution (5 mg/ml, Sigma Chemical Co)을 각 well당 40 μ l씩 처리하여 호일로 감싼 후 incubator에서 한 시간 반 배양하였다. 이어서 MTT solution을 제거한 후, 각 well당 100 μ l의 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma Chemical Co)를 첨가하여 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 ELISA-reader (Bio-Rad Laboratories Inc. Hercules, CA, USA)로 595 nm에서 측정하였다.

DAPI staining

AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3세포에 미역, 미역쇠, 넓은 미역쇠 추출물을 처리한 후 세포의 핵 변화를 시각화하기 위해서 DAPI 염색을 수행하였다. 175-cm² flask에서 AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 를 배양한 후 80~90%가 되었을 때 60 mm dish에 1x10⁵ cells/ml로 분주하여 37°C, 5% CO₂가 유지되는 incubator에서 24시간 배양하였다. 그 후 배지를 버리고 넓은 미역쇠 추출물을 0, 50, 100, 200 μ g/ml의 농도로 처리하고 incubator에서 24시간 동안 배양한 다음 PBS로 조심스럽게 세척한 후 4% paraformaldehyde solution을 첨가하여 15분간 고정시켰다. 그 후 PBS로 다시 세척 후에 PBS로 10배 희석한 DAPI stain 용액을 2 ml 처리하였다. 처리 후 암실에서 형광현미경(Zeiss fluorescence microscope, Thornwood, NY, USA)으로 200배 배율하에서 관찰 하였다.

Western blot analysis

AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포를 1x10⁶ cells/ml 배양한 175-cm² flask에 넓은 미역쇠 추출물이 첨가된 배양액을 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 그 후 trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 떼어낸 후 원심분리(1,200 rpm, 5min, 4°C)하였다. 그리고 cell lysis buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

를 첨가하여 4°C에서 20분간 반응시켰다. 20분 후 13,000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상층액을 취해 cell lysate으로 사용하였다. Cell lysate의 단백질 농도는 Bradford assay를 사용하여 측정하였다. Cell lysate를 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리한 후 nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)에 이동시켰다. Membrane은 5% skim milk-TBST (20 mM Tris·HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)에서 2시간 동안 blocking하고, anti-Bax (1:1,000), anti-Bcl-2 (1:1,000), anti-β-actin (1:10,000), anti-PARP (1:1,000)으로 측정하고자 하는 antibody (Cell signaling Technology, Danvers, MA, USA)를 각각 첨가하여 4°C에서 overnight을 하였다. 그 후 anti-rabbit IgG를 첨가하여 2시간 반응시켰다. 각 밴드는 imaging program인 Image J Launcher (provided by NCBI)를 이용하여 밀도를 측정하였다.

통계학적 분석

모든 실험결과는 평균치와 표준편차를 사용하여 나타내고 각 구간 비교는 one-way ANOVA에 이은 t-test 분석을 실시하였다. 대조구와 비교하여 p<0.05일 때를 통계학적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

미역, 미역쇠, 넓은 미역쇠 추출물에 의한 세포의 성장억제

미역은 항산화, 항염, 항암 등의 효과가 있다고 보고되어 있다[22, 26, 37]. 이러한 연구 결과들은 같은 갈조류에 속하는 미역쇠와 넓은 미역쇠도 잠재적인 항암효과가 있다는 가능성을 보여준다. 따라서 갈조류 추출물들이 WB 정상 간세포에서의 성장과 AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 암세포의 성장에 영향을 미치는지 확인하기 위해 MTT assay를 시행하였다. 각 추출물의 농도 설정을 위하여 미역, 미역쇠, 넓은 미역쇠 추출물이 정상 간세포인 WB 세포의 성장에 영향을 미치는지 확인하였다(Fig. 1). 실험 결과, 미역, 미역쇠, 넓은 미역쇠 추출물 모두 300 µg/ml 이상에서 정상 간세포의 성장에 유의적인 감소를 확인하였으며, 이를 근거로 암세포에서의 성장억제 실험에 대한 추출물의 최대농도를 200 µg/ml 로 설정 하였다.

암세포를 2×10⁴ cell/ml로 96 well plate에 분주하고 24시간 동안 배양한 후 미역(UP), 미역쇠(PB), 넓은 미역쇠(PL) 추출물을 0, 50, 100, 200 µg/ml 의 농도로 처리하였다(Fig. 2). 그 결과 AGS와 MDA-MB-231 세포에서는 모든 추출물이 50 µg/ml 이상의 농도에서 유의적인 암세포 성장 억제효과를 확인할 수 있었다(Fig. 2A, Fig. 2B). SK-BR-3 세포에서는 넓은 미역쇠 추출물이 100 µg/ml 이상의 농도일 때와 미역과 미역쇠 추출물이 200 µg/ml 농도일 때부터 암세포 성장 억제효과를 확인할 수 있었다(Fig. 2C). 각 추출물 200 µg/ml 처리 에서

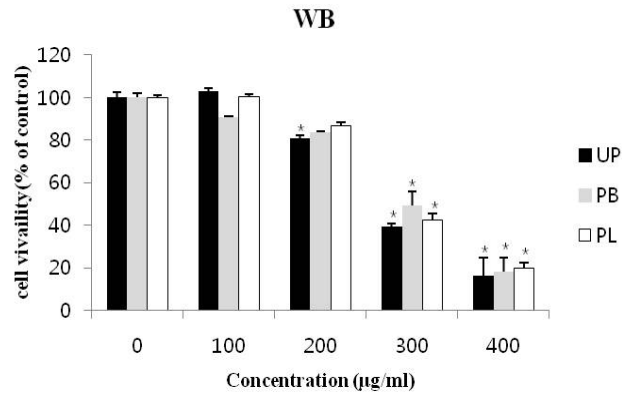


Fig. 1. Effect of brown algae extracts on the cells viability of WB cell (2×10⁴ cells/ml). WB cells were treated with 0, 100, 200, 300, 400 µg/ml brown algae extracts in RPMI-1640 medium containing 5% FBS for 24 hr. The growth inhibition was measured by the MTT assay. Data are mean standard deviation (SD) for three samples. The significance was determined by Student's t-test (*p<0.05 compared with untreated control). UP: *Undaria pinnatifida*. PB: *Petalonia binghamiae*. PL: *Punctaria latifolia*.

AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3세포의 억제율은 미역 추출물에서 43.53%, 39.95%, 14.52%, 미역쇠 추출물은 53.35%, 49.06%, 22.37%, 넓은 미역쇠 추출물은 80.56%, 50.42%, 55.2%의 억제율을 보였다. 이러한 결과로부터 미역, 미역쇠, 넓은 미역쇠 추출물은 농도 의존적으로 암세포의 성장 억제효과가 있었으며, 그 중 넓은 미역쇠 추출물이 다른 추출물에 비해 암세포 성장 억제효과가 유의적이라는 것을 확인할 수 있었다.

넓은 미역쇠 추출물이 암세포에서의 apoptosis 유도

MTT assay 수행 결과 동일 농도에서 가장 효과적으로 암세포의 성장 억제효과를 보였던 넓은 미역쇠 추출물이 AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3세포에서 세포의 핵 변화에 미치는 영향을 알아보기 위해 DNA 염기서열에 특이적 반응을 하는 DAPI 염색을 수행하였다(Fig. 3). 그 결과 넓은 미역쇠를 200 µg/ml로 처리한 각 암세포에서 apoptotic body와 세포질 수축을 포함하는 전형적인 apoptosis 형태가 다수 관찰되었으며, 각 apoptotic body를 counting 한 결과 200 µg/ml에서 통계학적으로 유의적인 증가를 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 이는 nucleosome에서 DNA 부분의 절단에 의한 DNA 단편화의 결과이므로 apoptosis 유도과 밀접한 관계가 있다[5]. 결과적으로 넓은 미역쇠 추출물 200 µg/ml은 AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포에서 apoptosis를 유도하는 것으로 사료된다.

넓은 미역쇠 추출물이 Bcl-2 family 단백질 발현양상

Bcl-2 family 단백질들은 미토콘드리아 막 투과성을 조절하는 단백질로 미토콘드리아를 통한 apoptosis의 경로를 조절하는데 중요한 역할을 담당한다[7]. Bcl-2 family는 apoptosis 유

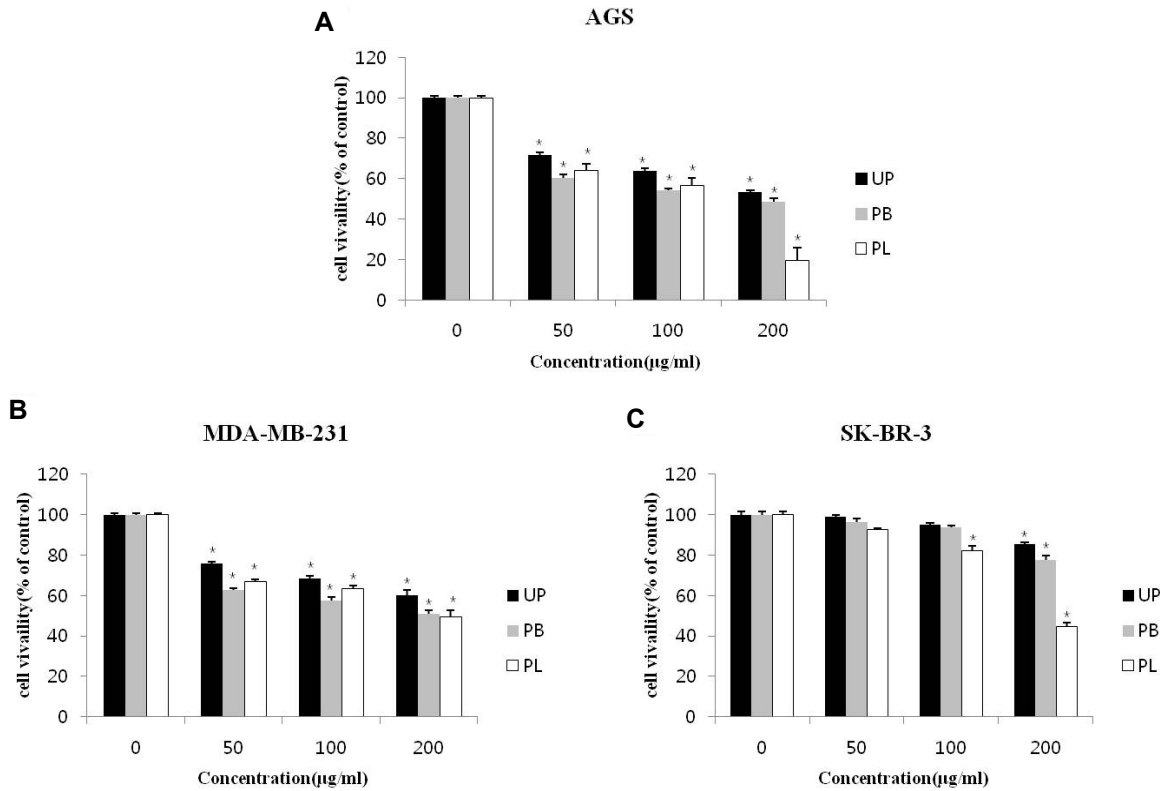


Fig. 2. Effect of brown algae extracts on the cells viability of AGS (A), MDA-MB-231 (B) and SK-BR-3 (C) cells (2×10^4 cells/ml). Each cell was treated with 0, 50, 100, 200 µg/ml brown algae extracts in RPMI-1640 medium containing 5% FBS for 24 hr. The growth inhibition was measured by the MTT assay. Data are mean standard deviation (SD) for three samples. The significance was determined by Student's *t*-test ($*p < 0.05$ compared with untreated control). UP: *Undaria pinnatifida*. PB: *Petalonia binghamiae*. PL: *Punctaria latifolia*.

도를 조절하는 대표적인 인자들이 존재하며, 그 중 Bax는 pro-apoptotic protein으로 apoptosis의 유도과 관련이 있으며 또 다른 대표인자인 Bcl-2는 anti-apoptotic protein 으로 apoptosis의 유도를 억제하는 기능을 가지고 있다[1, 9].

Western blot을 수행하여 넓은 미역쇠 추출물 0, 200 µg/ml에서 AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3세포의 apoptosis 유도 기전인 Bax, Bcl-2 단백질의 변화를 확인하였다(Fig. 4A). 넓은 미역쇠 0 µg/ml과 200 µg/ml을 비교하였을 때 AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포에서 pro-apoptotic protein인 Bax의 발현이 증가한 것을 확인 할 수 있었고, 반면에 anti-apoptotic protein인 Bcl-2의 발현이 감소한 것을 확인 할 수 있었다.

Bax/Bcl-2 ratio는 암 환자에서 임상적인 지표로 이용되고 있다. AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포에 넓은 미역쇠 200 µg/ml를 처리하여 경향을 확인 하였다(Fig. 4B). 그 결과 넓은 미역쇠 추출물 처리에 의해 β-actin에 대한 상대적인 Bax/Bcl-2 ratio가 유의적으로 증가된 것을 확인 할 수 있었다.

이러한 결과는 넓은 미역쇠 추출물이 AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포에서의 암세포 성장 억제능력이 apoptosis 기전인 Bcl-2 family 단백질과 연관이 있음을 보여주었다.

넓은 미역쇠 추출물이 PARP 단백질 발현양상

Poly ADP-ribose polymerase (PARP)는 손상된 DNA를 복구하는 단백질로 apoptosis가 유도되면 PARP 기능 상실로 인하여 정상적인 DNA 수리 과정이 억제된다[18]. 넓은 미역쇠 추출물 0, 200 µg/ml을 AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포에 각각 처리하여 PARP의 발현 양상을 확인한 결과, AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포에서 cleaved-PARP의 증가를 확인할 수 있었다(Fig. 5). 이러한 PARP의 분절 증가는 DAPI staining을 통해 확인한 apoptosis 유도 효과와 동일한 결과로 넓은 미역쇠 추출물이 AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포에 apoptosis를 유도하는 것으로 사료된다.

고 찰

최근 해양과 육상에서 얻을 수 있는 식물의 소비량이 증가하고 있으며, 이러한 식물에서 얻을 수 있는 천연물질들이 용한 항암, 항비만, 항산화, 항균 등의 기능성 물질 탐색에 관한 연구와 신약 개발이 활발하게 진행되고 있다[20, 21, 36]. 해양에서 쉽게 얻을 수 있는 천연자원으로 미역, 다시마, 툫과 같은 갈조류는 일상 생활에서 식재료, 건강보조식품 등으로

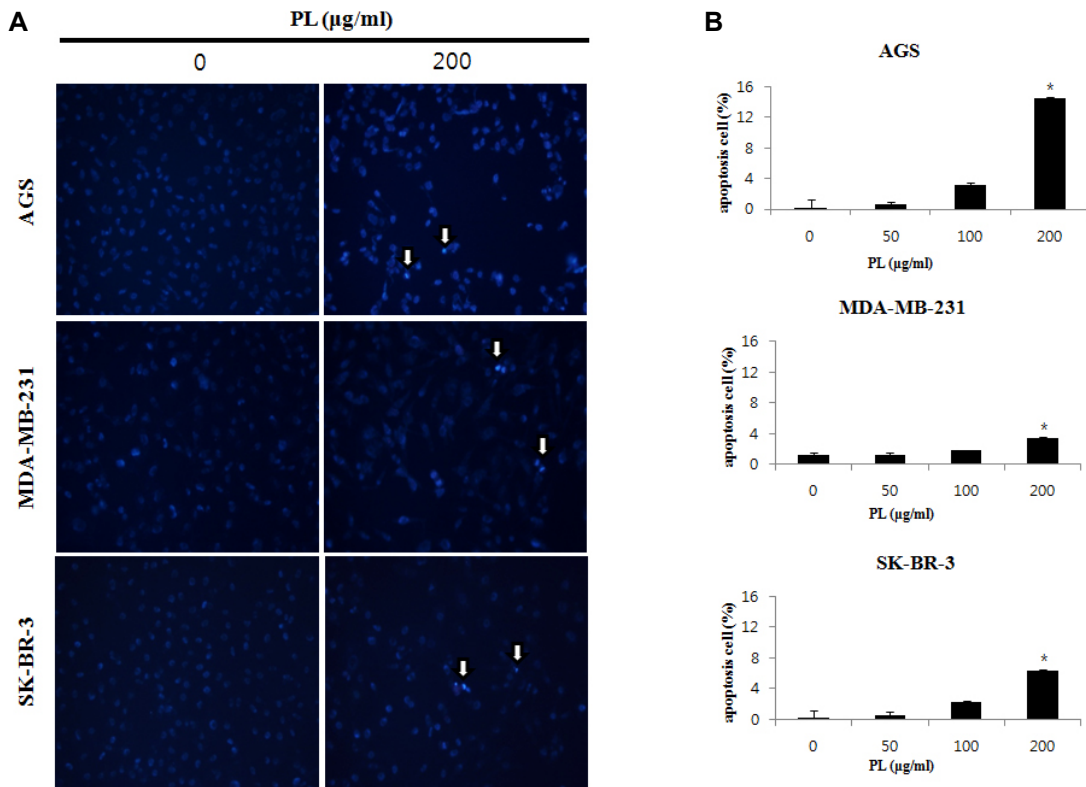


Fig. 3. Effect of *Punctaria latifolia* (PL) extract on the chromatin condensation in AGS, MDA-MB-231 and SK-BR-3 cells. (A) Each cell was treated with 0 and 200 µg/ml PL extract or vehicle in RPMI-1640 medium containing 5% FBS for 24 hr, and stained with DAPI. The arrows indicate chromatin condensation in the cancer cells. Cleaved nuclear were examined using a fluorescence microscope (×200). (B) AGS, MDA-MB-231 and SK-BR-3 cells were treated with PL extract (0, 50, 100, 200 µg/ml) for 24 hr. Apoptosis cells were counted under a light microscope and expressed as the average of five fields. Each bar represents the mean ±SD calculated from independent experiments. Significance was determined by Dunnett's *t*-test with **p*<0.05 compared as statistically significant compared with non-treated controls.

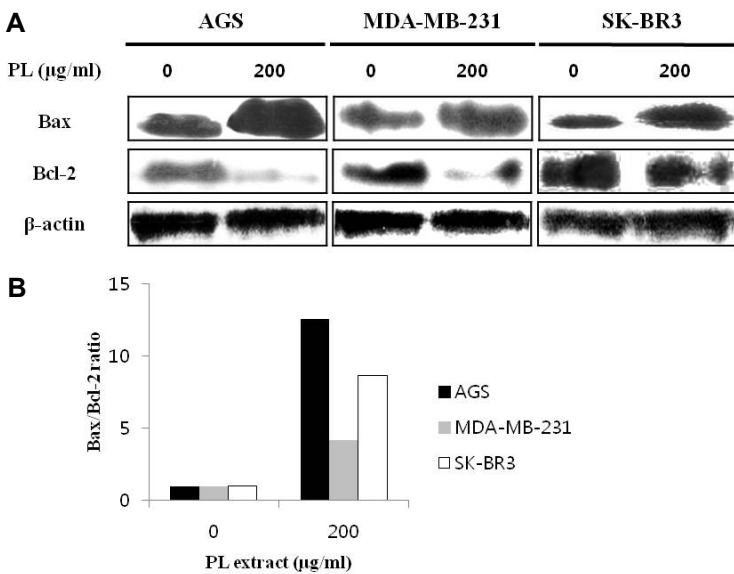


Fig. 4. The effect of *Punctaria latifolia* (PL) extract on PARP protein AGS, MDA-MB-231 and SK-BR-3 cells. Effect of *Punctaria latifolia* (PL) extract on the Bcl-2 family in AGS, MDA-MB-231 and SK-BR-3 cells. Cells were treated with PL extract 0 and 200 µg/ml for 24 hr. Cell lysates were prepared as described in the Materials and Methods and analyzed by 12% SDA-PAGE followed by Western blotting. (A) The membranes were incubated with anti-Bax antibodies and anti-Bcl-2 antibodies. (B) The Bax/Bcl-2 ratio was calculated from the Bax and Bcl-2 over β-actin ratios

널리 이용되고 있다. 이러한 갈조류는 항암, 항염증, 항균 등의 효과를 가지고 있는 것으로 보고되어 있다[17, 23, 29]. 하지만

아직 모든 갈조류의 성분이 입증된 것은 아니기 때문에 다양한 연구를 진행하고 있는 중이다. 특히 미역쇠와 넓은 미역쇠

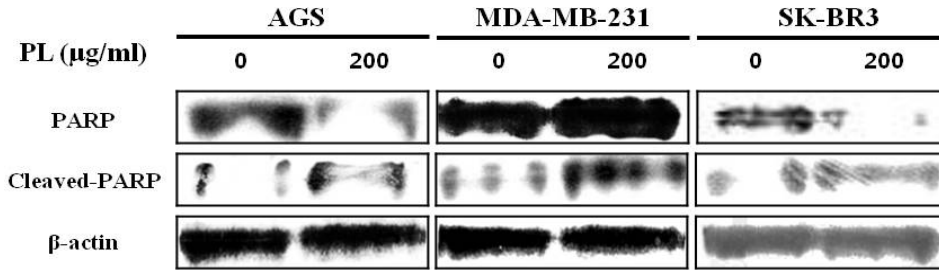


Fig. 5. The effect of *Punctaria latifolia* (PL) extract on PARP protein AGS, MDA-MB-231 and SK-BR-3 cells. Cells were treated with PL extract 0 and 200 µg/ml for 24 hr and cell harvested to measure protein levels of PARP by Western blotting. The blots were also probed with anti-β-actin antibodies to confirm equal sample loading

는 미역과 유사한 점을 가지고 있지만 이를 이용한 연구는 저조한 상태이다. 따라서 본 연구에서는 갈조류 중 미역, 미역쇠, 넓은 미역쇠 추출물이 위암 세포인 AGS와 유방암 세포인 MDA-MB-231, SK-BR-3 에서 미치는 영향을 확인하였다. 우선 미역, 미역쇠, 넓은 미역쇠 추출물이 암세포의 성장에 영향을 주는지를 확인하기 위해서 MTT assay를 수행 하였다. AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포에서 각 추출물을 0, 50, 100, 200 µg/ml의 농도로 처리한 결과, 농도 의존적으로 암세포의 성장이 억제된 것을 확인하였다. Kim 등[22]의 연구에 따르면 미역 발효추출물을 100 µg/ml의 농도로 MCF-7 세포에 처리하였을 때 40%의 암세포 성장 억제율을 보였다. 본 실험결과에서도 미역 추출물을 100 µg/ml의 농도로 각 암세포에 처리하였을 때 약 40%의 성장 억제율을 확인하였다. 추출방법에서의 차이는 있지만 암세포에서의 성장 억제효과가 동일한 경향을 보여주었다. 또, 미역보다 미역쇠, 넓은 미역쇠에서 유의적인 암세포 성장 억제효과가 보였으며, 이는 미역쇠, 넓은 미역쇠가 미역보다 효과적인 항암효능을 가지고 있을 가능성을 보여준다. 다음으로 MTT assay 결과 에서 암세포 성장 억제효과가 가장 뛰어난 넓은 미역쇠 추출물이 apoptosis를 유도하는지 확인 하기 위해 DAPI staining을 수행하였다. 넓은 미역쇠 추출물을 0, 50, 100, 200 µg/ml의 농도로 AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포에 처리하였을 때, 200 µg/ml의 농도에서 apoptosis body 양성세포가 가장 많이 관찰된 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과는 넓은 미역쇠 추출물 200 µg/ml의 농도가 AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포에서 가장 많이 apoptosis를 유도하는 것으로 사료된다.

넓은 미역쇠 추출물이 apoptosis를 유도하였을 때 변화하는 단백질의 발현 양상을 확인 하기 위해 Western blot을 수행하였다. AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포에 넓은 미역쇠 추출물을 0, 200 µg/ml로 처리한 후 24시간 뒤에 단백질을 수거하여 pro-apoptotic protein 인 Bax와 anti-apoptotic protein 인 Bcl-2를 확인하였다. 그 결과 넓은 미역쇠 추출물 200 µg/ml로 처리한 AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포에서 Bax의 증가와 Bcl-2의 감소를 확인하였으며, Bax/Bcl-2 ratio를 통하여 β-actin에 대한 상대적인 증가를 확인 할 수 있었다. 이러한 결과는

넓은 미역쇠 추출물이 apoptosis에 관여하는 인자인 Bax와 Bcl-2 발현에 영향을 주는 것으로 사료된다. Apoptosis와 관련된 신호가 활성화되면 세포 내에서 poly ADP-ribose polymerase (PARP)와 같은 표적 단백질을 분해하게 된다[18]. 본 연구결과 넓은 미역쇠 추출물 200 µg/ml로 처리한 AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포에서 cleaved - PARP의 발현이 증가한 것을 확인 할 수 있었다. Kim 등[20]의 연구에 따르면 갈조류인 보라우마 추출물이 HT-29 세포에서 농도의존적으로 PARP의 분해를 확인하였다. 본 실험결과에서 같은 갈조류인 넓은 미역쇠가 200 µg/ml에서 PARP의 분해를 확인하였다. PARP의 분해는 apoptosis 신호가 활성화 되었다는 것을 이야기하며 앞서 pro-apoptotic protein Bax의 증가와 연관이 되는 것으로 넓은 미역쇠가 위암 세포와 유방암 세포에서의 apoptosis를 유도 했다고 볼 수 있다. 본 연구는 국내에서 쉽게 구할 수 있는 갈조류 식물 중 미역, 미역쇠, 넓은 미역쇠 추출물을 이용하여 위암세포인 AGS와 유방암 세포인 MDA-MB-231, SK-BR-3 에서의 암세포 성장 억제효과를 확인하였으며, 특히 넓은 미역쇠가 기존에 미역보다 뛰어난 항암효과를 나타내었고, 추후 기능성 식품과 천연 암 치료제로서의 개발 가능성을 보이며 지속적인 연구를 통해 *in vivo*에서도 넓은 미역쇠 추출물의 항암 효과에 대한 연구가 이루어 져야 할 것으로 사료된다.

References

1. Adams, J. M. and Cory, S. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322-1326.
2. Atashrazm, F., Lowenthal, R. M., Woods, G. M., Holloway, A. F. and Dickinson, J. L. 2015. Fucoidan and cancer: A multifunctional molecule with anti-tumor potential. *Mar. Drugs*. **13**, 2327-2346.
3. Banafa, A. M., Roshan, S., Liu, Y. Y., Chen, H. J., Chen, M. J., Yang, G. X. and He, G. Y. 2013. Fucoidan induces G1 phase arrest and apoptosis through caspases-dependent pathway and ROS induction in human breast cancer MCF-7 cells. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* **33**, 717-724.
4. Chua, E. G., Verbrughe, P., Perkins, T. T. and Tay, C. Y.

2015. Fucoidans disrupt adherence of helicobacter pylori to AGS cells *in vitro*. *J. Evid. Based. Complementary Altern. Med.* **2015**, 6.
5. Danial, N. N. and Korsmeyer, S. J. 2004. Cell death: critical control points. *Cell* **116**, 205-219.
 6. Doll, S. R. 1992. The lessons of life: keynote address to the nutrition and cancer conference. *Cancer Res.* **52**, 2024-2029.
 7. Donovan, M. and Cotter, T. G. 2004. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim. Biophys. Acta.* **1644**, 133-147.
 8. Dorssers, L. C. J., van der Flier, S., Brinkman, A., van Agthoven, T., Veldscholte, J., Berns, E. M. and Foekens, J. A. 2001. Tamoxifen resistance in breast cancer. *Drugs* **61**, 1721-1733.
 9. Evans, V. G. 1993. Multiple pathways to apoptosis. *Cell. Biol. Int. Rep.* **17**, 461-476.
 10. Guidry, J. J., Greisinger, A., Aday, L. A., Winn, R. J., Vernon, S. and Throckmorton, T. A. 1996. Barriers to cancer treatment: a review of published research. *Oncol. Nurs. Forum.* **23**, 1393-1398.
 11. Hajra, K. M. and Liu, J. R. 2004. Apoptosome dysfunction in human cancer. *Apoptosis* **9**, 691-704.
 12. Han, S. I., Kim, Y. S. and Kim, T. H. 2008. Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions. *BMB Rep.* **41**, 1-10.
 13. Han, Y. S., Lee, J. H. and Lee, S. H. 2015. Antitumor effects of fucoidan on human colon cancer cells via activation of Akt signaling. *Biomol. Ther. (Seoul)*. **23**, 225.
 14. Hebert-Croteau, N., Freeman, C. R., Latreille, J. and Brisson, J. 2002. Delay in adjuvant radiation treatment and outcomes of breast cancer - a review. *Breast. Cancer. Res. Treat.* **74**, 77-94.
 15. Hu, P. J., Yu, J., Zeng, Z. R., Leung, W. K., Lin, H. L., Tang, B. D., Bal, A. H. C. and Sung, J. J. Y. 2004. Chemoprevention of gastric cancer by celecoxib in rats. *Gut*. **53**, 195-200.
 16. Jung, K. W., Won, Y. J., Kong, H. J., Oh, C. M., Lee, D. H. and Lee, J. S. 2014. Cancer statistics in Korea: incidence, mortality, survival, and prevalence in 2011. *J. Cancer Res. Ther.* **46**, 109.
 17. Kang, M. C., Lee, J. Y., Ko, R. K., Kim, H. B., Hong, S. H. and Kim, G. O. 2008. Melanin inhibitory effect and anti-inflammatory effects of *Dietyota coriacea* extracts derived from adjacent sea of the Jeju island. *KSBB J.* **23**, 311-316.
 18. Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. E. and Poirier, G. G. 1993. Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* **53**, 3976-3985.
 19. Kelley, J. R. and Duggan, J. M. 2003. Gastric cancer epidemiology and risk factors. *Int. J. Chronic. Dis.* **56**, 1-9.
 20. Kim, E. J., Park, S. Y., Hong, J. E., Shin, M. J., Lim, S. S., Shin, H. K. and YoonPark, J. H. 2007. Inhibitory effect of the methanolic extract of *Symphycaradia latiuscula* on the growth of HT-29 human colon cancer cells. *J. Kor. Soc Food Sci. Nutr.* **36**, 431-438.
 21. Kim, S. A., Kim, J., Woo, M. K., Kwak, C. K. and Lee, M. S. 2005. Antimutagenic and cytotoxic effects of ethanol extracts from five kinds of seaweeds. *J. Korean. Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 451-459.
 22. Kim, T. Y., Han H. S. and Lee, Y. J. 2013. Apoptosis induction of HCT-15 cells by extracts of *Undaria pinnatifida* with fermented micro-organism. *Kor. J. Herbology* **28**, 33-40
 23. Kong, C. S., Um, Y. R., Lee, J. I., Kim, Y. A., Lee, J. S. and Seo, Y. W. 2008. Inhibition effects of extracts and its solvent fractions isolated from *Limonium tetragonum* on growth of human cancer cells. *KSBB J.* **23**, 177-182.
 24. Kwon, M. J. and Nam, T. J. 2007. A polysaccharide of the marine alga *Capsosiphon fulvescens* induces apoptosis in AGS gastric cancer cells via an IGF-IR-mediated PI3K/Akt pathway. *Cell. Biol. Int.* **31**, 768-775.
 25. Lee, H. O., Kim, D. S., Do, J. R. and Ko, Y. S. 1999. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of algae. *Fish. Aquat. Sci.* **32**, 427-431.
 26. Lim, J. H., Jung, K. S., Lee, J. S., Jung, E. S., Kim, D. K., Kim, Y. S., Woo, Y. and Park, D. H. 2008. The study on antimicrobial and antifungal activity of the wild seaweeds of Jeju island. *J. Soc. Cosmet. Scientists. Kor.* **34**, 201-207.
 27. Min, K. J., Choung, S. H. and Koo, S. J. 1999. Studies on the anticancer effect of *Broussonetia kazinoki* extracts. *Kor. J. Soc. Food. Sci.* **15**, 231-237.
 28. Mukhtar, H. and Ahmad, N. 1999. Cancer chemoprevention: future holds in multiple agents. *Toxicol. Appl. Pharmacol. Suppl.* **158**, 207-210.
 29. Nishino, T., Yokoyama, G., Dobashi, K., Fujihara, M. and Nagumo, T. 1989. Isolation, purification, and characterization of fucose-containing sulfated polysaccharides from the brown seaweed *Ecklonia kurome* and their blood-anticoagulant activities. *Carbohydr. Res.* **186**, 119-129.
 30. Okada, H. and Mak, T. W. 2004. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 592-603.
 31. Qiu, D. and Tanaka, S. 2002. International comparisons of cumulative risk of stomach cancer, from cancer incidence in five continents vol. VIII. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **36**, 123-124.
 32. Seeram, N. P. 2008. Berry fruits for cancer prevention: current status and future prospects. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 630-635.
 33. Shon, Y. H., Lee, K. T., Park, S. H., Cho, K. H., Lim, J. K. and Nam, K. S. 2001. Induction of NAD (P) H: quinone reductase and glutathione S-transferase by *Xanthii fructus* and *Prunellae spica* extracts. *Niger. J. Nat. Prod. Med.* **32**, 269-273.
 34. Song, Q., Kuang, Y., Dixit, V. M. and Vincenz, C. 1999. Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf 1. *EMBO J.* **18**, 167-178.
 35. Stavric, B. 1994. Role of chemopreventers in human diet. *Clin. Biochem.* **27**, 319-332.
 36. Yim, H. B., Lee, G. and Chae, H. J. 2004. cytotoxicity of ethanol extract of *Raphanuse sativus* on human lung cancer cell line. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **33**, 287-290.
 37. Yoon, J. A., Yu, K. W., Jun, W. J., Cho, H. Y., Son, Y. S. and Yang, H. C. 2000. Screening of anticoagulant activity in the extracts of edible seaweeds and optimization of extraction condition. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **29**, 1098-1106.

38. Zhang, L., Hou, Y. H., Wu, K., Zhai, J. S. and Lin, N. 2010. Proteomic analysis reveals molecular biological details in

varioliform gastritis without *Helicobacter pylori* infection. *World J. Gastroenterol.* **16**, 3664-3673.

초록 : 갈조류 추출물에 의한 인간 암세포 성장 억제 및 세포 사멸 유도

추강식 · 이해남 · 신성아 · 김형진 · 박영석 · 김상기 · 정지윤*
(공주대학교 특수동물학과)

본 연구는 해양자원의 대표적인 갈조류 중 미역(*Undaria pinnatifida*), 미역취(*Petalonia binghamiae*), 넓은 미역취(*Punctaria latifolia*)를 추출한 시료들을 이용하여 위암, 유방암 세포에서 성장에 미치는 영향을 조사하였고, 성장 억제효과가 가장 뛰어난 시료가 apoptosis 발현을 유도시키는지 확인하였다. AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포에 미역, 미역취, 넓은 미역취 추출물 0, 50, 100, 200 µg/ml로 24시간 동안 처리한 뒤 MTT assay를 통하여 암세포 성장 억제효과를 확인하였다. 실험 결과 모든 추출물들이 AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포에서 농도 의존적으로 암세포의 성장을 억제 하였다. MTT assay 실험 결과에서 암세포 성장 억제효과가 가장 좋은 넓은 미역취 추출물이 apoptosis를 유도하는지 확인하기 위해 AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포에서 DAPI staining을 수행 하였고, 넓은 미역취 추출물 200 µg/ml에서 세포질 응축이 통계학적으로 유의적인 증가를 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 넓은 미역취 추출물이 AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포에서 apoptosis를 유도하여 암세포 성장을 억제 한 것으로 사료된다. 넓은 미역취 추출물이 apoptosis 발현 기전에 영향을 주는지 보기 위해 Western blotting을 수행하여, Bcl-2 family 단백질인 Bax와 Bcl-2의 발현 그리고 DNA 복구 단백질인 PARP의 발현을 확인 하였다. AGS, MDA-MB-231, SK-BR-3 세포에 넓은 미역취 추출물 0, 200 µg/ml로 24시간 처리한 결과, pro-apoptotic protein 인자인 Bax와 DNA 복구 단백질 PARP 분절이 증가 하였고, anti-apoptotic protein 인자인 Bcl-2 발현은 감소 하였다. 이러한 결과를 종합하였을 때, 미역, 미역취, 넓은 미역취 추출물은 인간 위암세포인 AGS와 유방암 세포인 MDA-MB-231, SK-BR-3에서 암세포 성장 억제효과가 있음을 확인하였고, 그 중 가장 효과가 우수한 넓은 미역취가 미역, 미역취보다 뛰어난 항암 효과를 나타내었다. 따라서 갈조류 추출물의 기능성 식품 및 항암제로서의 개발 가능성을 보여 주고 있으며, 특히 넓은 미역취 추출물의 항암효과에 대한 연구가 *in vivo*에서도 이루어 져야 할 것으로 사료된다.