

Anti-proliferative Effects of Acid Extract of *Gracilaria Verrucosa* on Primary Human Prostate Cancer Cells

Seong-Min Hong¹, Hyun-Dong Cho², Jeong-Ho Kim³, Ju-Hye Lee⁴, Woo-Si Song⁵, Sung-Tae Lee⁶, Mi-Kyung Lee³ and Kwon-Il Seo^{7*}

¹Institute of Agricultural Life Sciences, Dong-A University, Busan 49315, Korea

²Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

³Department of Food Nutrition, Suncheon National University, Suncheon, Jeonnam 57922, Korea

⁴Functional Food & Nutrition Division, National Institute of Agricultural Science, Rural Development Administration, Wanju, Jeonbuk 55365, Korea

⁵Marine Service Co., Ltd. Suncheon 540-811, Korea

⁶Department of Pharmacy, Suncheon National University, Suncheon, Jeonnam 57922, Korea

⁷Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 49315, Korea

Received April 20, 2016 / Revised September 19, 2016 / Accepted October 18, 2016

The purpose of this study was to investigate the anti-proliferative and apoptotic effects of acid extract of *Gracilaria verrucosa* (AEG) on RC-58T/h/SA#4 primary human prostate cancer cells. AEG significantly decreased the cell viability of prostate cancer cells in a dose-dependent manner. AEG also showed relatively low cytotoxicity on normal cell (RWPE-1). The morphology of prostate cancer cells treated with AEG was distorted to shrunken cell masses. In addition, it was revealed that AEG induced cell death as evidenced by increased formation of apoptotic body and nuclear condensation. Furthermore, AEG clearly modulated the down regulation of Bcl-2 (anti-apoptotic)/Bax (pro-apoptotic) family and activated caspase-3 as an effector caspase in a dose-dependent manner. AEG inhibited cell proliferation induced by environmental hormones as a bisphenol A in a dose-dependent manner. These results indicate that AEG act as anti-proliferative effects as a potential therapeutic agent on primary human prostate cancer cells.

Key words : Anti-proliferative effect, apoptosis, environmental hormone, *Gracilaria verrucosa*

서 론

암은 서구화된 식생활, 인구의 노령화 및 외부적인 스트레스 등으로 사망원인 1위를 점하는 주요 질병으로서 당뇨병, 고혈압 등과 같은 다른 만성질환들의 사망률은 감소하는 반면에 암의 의한 사망률은 점진적으로 증가하고 있는 추세이다 [16, 23]. 특히, 전립선암은 북미나 서유럽에서 남성 암 발생률 1위를 차지하고 있는 암이며, 국내에서도 또한 발생률이 남성 10만 명당 37.6명으로 80년도에 비해 약 10배 이상으로 증가된 것으로 나타나 전립선암에 대한 연구가 시급한 실정이다 [10]. 전립선암의 발병원인으로는 비만, 남성호르몬, 동물성 지방의 과다 섭취 등을 들 수 있으며, 현재까지 전립선암을 예방하기 위하여 다양한 연구들이 진행되고 있다 [7, 12]. 하지만 대부분의 연구에서 LNCaP 및 PC-3 세포와 같은 상피나 척추로 전이

된 형태의 전립선 암세포만을 이용해왔을 뿐, 순수한 primary 전립선암세포를 사용한 연구는 미흡한 실정이다 [13, 25].

한편, 현재 암 치료를 위해서 사용되고 있는 방법으로는 적극적 관찰요법, 근치적 수술, 호르몬 치료 및 방사선 요법 등과 같은 국소 치료법이 널리 사용되고 있으나, 여전히 재발 및 전이의 위험이 존재하기 때문에 완치가 될 때까지 항암제 투여를 병행하면서 지속적인 관리가 필요하다 [3]. 그러나 항암제들은 현재까지 암세포뿐만 아니라 정상세포에게도 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 구토, 탈모 및 면역력 저하 등의 부작용들도 동반하기에 암 치료 시에 많은 문제점이 거론되고 있는 실정이다 [14]. 이러한 문제점을 해결하기 위해서 치료효능이 뛰어나며 부작용이 거의 없는 새로운 물질의 개발이 요구된다. 최근 일부 동·식물로부터 얻어진 천연물들이 항암 및 면역조절 효능이 뛰어나다는 것이 보고됨에 따라 그와 관련된 관심이 증가되고 있으나, 육상에서 생산되는 자원으로부터 얻을 수 있는 소재들은 거의 한계점에 달한 추세이다 [11]. 따라서 높은 잠재력이 있으나 상대적으로 연구가 이뤄지고 있지 않고 있는 해양자원에 대한 관심이 증가되고 있으며, 그 속에 함유된 성분의 생리활성 효능 및 구조를 규명하려는 연구가 다방면으로 진행되고 있다.

꼬시래기(*Gracilaria verrucosa*)는 국내 해조류 중 홍조류 과

*Corresponding author

Tel : +82-51-200-5788, Fax : +82-51-200-6536

E-mail : kseo@dau.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.

의 하나이며 미역, 톳, 다시마, 김 등과 같이 식용으로 사용될 수 있는 주요 무기물 급원 식품이다[20]. 홍조류에는 탄수화물의 함량이 가장 많고, 무기질, 단백질, 지질 등과 같은 성분을 함유하고 있다고 보고되었다[14]. 다당류는 인체에서 소화율이 매우 낮아 흡수율 및 영양가는 높지 않다고 보고된 바 있으나, 해조류 중의 탄수화물은 일반적으로 섭취하는 채소류 속에 함유된 식이섬유소와 달리 장의 활동을 원활하게 하고 중금속 배출, 혈관 내 콜레스테롤 침적억제 등의 효과가 알려져 있어 많은 관심을 받고 있다[2, 11, 19]. 꼬시래기는 우리나라 외에 일본, 사할린, 타이완 등 세계각지에 분포하며 arachidonic acid 나 eicosapentaenoic acid 등의 불포화지방산이 풍부하며 항산화, 항염증 등의 생리활성에 대한 보고가 되어 있다[4, 9, 24]. 그러나 전립선암에 대한 구체적인 연구는 여전히 미비한 상태이며, 환경호르몬과 같은 내분비교란물질들이 전립선암과 같은 호르몬 관련 질병들을 일으키는 원인이 될 수 있다고 보고됨에 따라 심각성이 대두되고 있지만 이에 대한 연구 또한 미흡한 실정이다[17].

따라서 본 연구에서는 서두에 거론한 바와 같이 전이되기 전의 형태인 primary cancer 조직으로부터 분리된 전립선암세포인 RC-58T/h/SA#4 세포를 이용하여 꼬시래기로부터 얻은 추출물의 처리에 따른 항암효능 및 apoptosis 유도 효과를 확인하였으며, 환경호르몬인 bisphenol A에 의해 성장이 유도된 전립선암세포에서 꼬시래기 추출물들의 처리가 세포성장을 효과적으로 억제하는지 알아보았다.

재료 및 방법

꼬시래기 추출물의 제조

실험에 사용한 꼬시래기는 2015년 전라남도 장흥군 인성수 산에서 구입하여 증류수로 염분을 제거 후, 건조 및 분쇄과정을 거쳐 분말을 획득하였다. 산처리 추출물(acid extraction of *Gracilaria verrucosa*, AEG)의 제조는 분말에 10배(w/v) 용량의 0.1 N acetic acid과 혼합하고 실내에서 72시간 추출하여 여과한 후 동결건조하여 실험에 사용하였다. 산처리후 중화추출물(acid-base extraction of *Gracilaria verrucosa*, ABEG)의 제조는 산처리 추출물을 0.1 N NaOH로 중화 적정한 후 농축하여 동결 건조한 것을 실험에 사용하였다. 건조시료는 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma chemical Co., St Louis, MO)를 이용하여 50 mg/ml의 농도로 녹여 stock solution을 각각 만든 다음 적정 농도로 배지에 희석하여 사용하였다.

세포 배양

본 실험에 사용한 LNCaP과 PC-3 전립선 암세포 한국세포주은행(KCLB)에서 분양 받았으며, primary 인체 전립선 암세포인 RC-58T/h/SA#4 및 RWPE-1 전립선상피세포는 Center for Prostate Disease Research (Department of Surgery,

Uniformed Services University of Health Sciences, Bethesda, MD, USA)로 부터 분양 받아 100 unit/ml의 Antibiotic Antimycotic (GIBCO®/Invitrogen™, Gran Island, NY, USA)와 10% FBS (Fetal Bovine Serum, GIBCO®/Invitrogen™)가 첨가된 DMEM (GIBCO®/Invitrogen™)을 이용하여 37°C, 5% CO₂ incubator (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)에서 계대 배양하여 사용하였다.

암세포 증식 억제능 측정

암세포 증식 억제능은 생존 세포 내의 단백질 총량을 흡광도로 나타내어 세포 사멸 정도를 확인하는 방법인 sulforhodamine B (SRB, SigmaAldrich Co., St. Louis, MO, USA)법을 이용하여 측정하였다. Trichloroacetic acid (TCA, SigmaAldrich Co.)에 의해 생존 세포만 well plate에 부착되며 이 세포의 단백질 내 염기성 아미노산 잔기가 SRB와 결합하여 마지막에 처리하는 Tris buffer에 녹아 나와 흡광도를 나타낸다[18]. 암세포 증식 억제능은 세포를 2×10⁴ cells/ml가 되도록 희석하여 48 well plate에 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하여 시료를 첨가하고 24시간 동안 반응시켰다. 반응 종료 후 12% TCA를 넣어 4°C에서 세포를 고정시키고 well을 세척한 후 0.4% SRB 용액을 첨가하여 염색하였다. 염색 종료 후 1% acetic acid (Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan)로 세척하고 10 mM Tris buffer (Sigma-Aldrich Co.)를 첨가 하여 SRB를 녹였다. 상등액을 96 well plate에 옮겨 microplate reader (Titertek Multiscan Plus, Labsystems, Espoo, Finland)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

암세포 형태의 관찰

암세포를 1×10⁵ cells/ml가 되도록 희석하여 6 well plate에 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하여 시료를 well plate에 처리하고 24시간 동안 반응 시켰다. 이후 세포의 형태학적 변화는 200배율의 광학현미경(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)으로 관찰하고 사진을 촬영하였다.

Hoechst staining

암세포를 5×10⁵ cells/ml가 되도록 희석하여 6 well plate에 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후, 시료를 처리하여 48시간 동안 반응시켰다. 반응이 종료된 세포를 수거하여 200 μl Hoechst 33258 (bis-benzimidazole, 1 μg/ml, Sigma-Aldrich Co.)을 첨가하여 실온에서 10분 간 염색시킨 후 PBS로 2회 세척하였다. 염색된 핵을 형광현미경으로 관찰하였다.

Western blot을 이용한 단백질 측정

Western blot을 이용한 단백질 측정 Monolayer로 배양한 세포를 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 처리하여 single cell로

만든 후 배양액으로 최종농도가 1×10^5 cells/ml가 되도록 희석하여 10 cm dish에 첨가한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간이 지난 후 각 dish의 배양액을 제거한 후 AEG를 다양한 농도로 준비한 시료가 포함된 배양액을 dish에 첨가하고 48시간 더 반응시켰다. 반응이 종료된 dish에서 회수한 세포를 PBS로 3회 세척 후 500 µl lysis buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM NaF, 30 mM Na₂P₂O₇, 1 mM PMSF, 2 µg/ml aprotinin)를 첨가하여 얼음에서 용해하였다. 세포 용해액과 2×sample buffer를 동량으로 섞어 65°C에서 5분간 끓인 후 8%와 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 nitro-cellulose membrane으로 transfer한 후 blocking buffer (2.5%, 5% BSA)로 상온에서 1시간 반응시킨 후 primary antibody (anti-Bax, anti-Bcl-2, anti-Bid, anti-caspase 3)를 희석하여 4°C에서 하루 동안 반응시켰다. T-TBS로 1시간 이상 세척하고 secondary anti-rabbit IgG conjugated HRP를 희석하여 4°C에서 1시간 반응시켰다. 반응 종료 후 membrane을 T-TBS로 1시간 이상 세척하고 enhanced chemiluminescence kit (ECL kit)를 사용하여 필름에 노출시켜 단백질을 확인하였다[13].

Charcoal-treated FBS 제조

환경호르몬으로부터 유도된 암세포의 증식 억제 효과를 측정하였다. Serum의 호르몬 활성을 최소화하기 위하여 FBS에 5% charcoal을 처리하여 55°C에서 30분 동안 교반한 후 3,000 rpm, 4°C, 20분간 원심분리 하여 상등액을 취하고, 이를 2회 반복하여 얻은 상등액을 여과하여 charcoal-treated FBS (cFBS)를 얻은 후 -20°C에서 보관하여 실험에 사용하였다. 환경호르몬으로부터 증식이 유도된 암세포를 1×10^5 cells/ml가 되도록 희석하여 24 well plate에 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하여 5% cFBS, 5% cFBS+bisphenol A, 5% cFBS+bisphenol A 또는 bisphenol A+AEG를 농도별로 첨가하고 48시간 동안 반응시켰다. 반응 종료 후 12% TCA를 넣어 4°C에서 세포를 고정시키고 well을 세척한 후 0.4% SRB 용액을 첨가하여 염색하였다. 염색 종료 후 1% acetic acid 로 세척하고 10 mM Tris buffer를 첨가하여 SRB를 녹였다. 상등액을 96 well에 옮겨 microplate reader (Titertek Multiscan Plus)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

실험결과는 3 반복에 대한 평균 및 표준편차로 표시하였으며, 각 실험군을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 각 군 간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Student's *t*-test를 실시하여 유의성 여부를 판정하였다(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

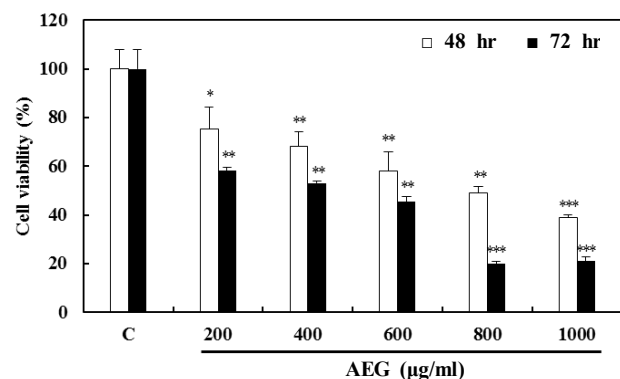
결과 및 고찰

AEG 및 ABEG가 전립선 암세포의 성장 억제에 미치는 영향

AEG 및 ABEG 처리가 전립선 암세포의 증식억제에 미치는 영향을 정량적으로 측정하기 위하여 LNCaP, PC-3 및 RC-58T/h/SA#4의 3종의 전립선 암세포에 각 추출물을 0, 200, 400, 600, 800 및 1,000 µg/ml 농도로 처리하여 24시간 동안 반응시킨 후 SRB assay를 이용하여 확인하였다(Fig. 1). AEG는 처리 농도에 비례하여 전립선암세포의 증식을 억제하였다. 특히, PC-3 및 RC-58T 세포에서 200 µg/ml의 농도부터 유의적인 세포사멸을 보였으며 LNCaP 세포는 400 µg/ml의 농도부터 유의적인 암세포 증식 억제 효능이 있음을 확인할 수 있었다. 반면, 200, 400, 600, 800 및 1,000 µg/ml의 AEG를 24시간 동안 RWPE-1 전립선상피세포에 처리하였을 때 유의적인 세포성장 억제효능이 관찰되지 않았으나(Fig. 1), 48 및 72시간을 처리하였을 때 200 µg/ml의 농도부터 유의적인 세포사멸이 관찰되었다(supplementary data. 1). 따라서 24시간의 AEG 처리는 인체 전립선 암세포 증식을 억제하는 효과가 있는 것으로 판단되며, RWPE-1 세포에서 거의 독성을 나타내지 않았기 때문에 암세포의 성장만을 선택적으로 억제함을 추측할 수 있었다. 한편, ABEG는 LNCaP, PC-3 및 RC-58T/h/SA#4 세포에서 유의적인 성장억제효능을 나타내지 못하였다.

Do 등[5]과 Lee 등[19]은 홍조류과속에서 함유된 당류성분에서 항암효능이 나타나며, pH가 낮아짐에 따라 높은 수득률을 얻을 수 있다고 보고한 바 있다. 이는 본 연구에서 낮은 암세포 성장 억제능을 보인 ABEG는 NaOH의 중화작용으로 인하여 pH가 높아짐에 따라 꼬시래기 속에 있는 생리활성 성분이 AEG보다 낮은 수율로 추출되어 전립선 암세포의 성장억제효능이 낮아진 것으로 추측된다.

AEG와 ABEG의 처리에 따른 RC-58T/h/SA#4 전립선 암세포의 형태학적 변화를 확인한 결과는 Fig. 2와 같다. 대조군



Supplementary data.1. Effect of AEG (acid extract from *Gracilaria verrucosa*) on RPWE-1 cell growth. The cells were treated with 200, 400, 600, 800 and 1,000 µg/ml *Gracilaria verrucosa* acid extract for 48 and 72 hr. Data values are expressed as mean ± S.D. (n=3). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ by Student's *t*-test.

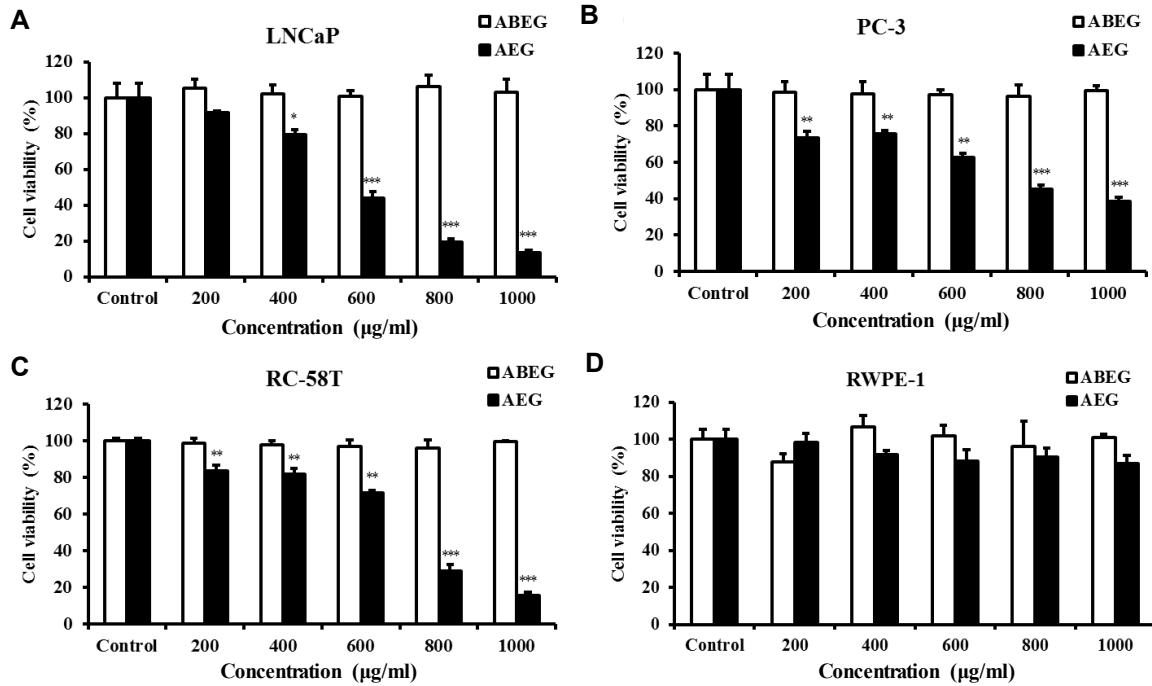


Fig. 1. Effect of extracted samples (ABEG, acid-base extract of *Gracilaria verrucosa*; AEG, acid extract from *Gracilaria verrucosa*) on LNCaP (A), RC-58T/h/SA#4 (B), PC-3 (C), RPWE-1 (D) cell growth. Each type of cell was treated with 200, 400, 600, 800 and 1,000 µg/ml *Gracilaria verrucosa* extract for 24 hr. Data values are expressed as mean ± S.D (n=3). *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 by Student's t-test.

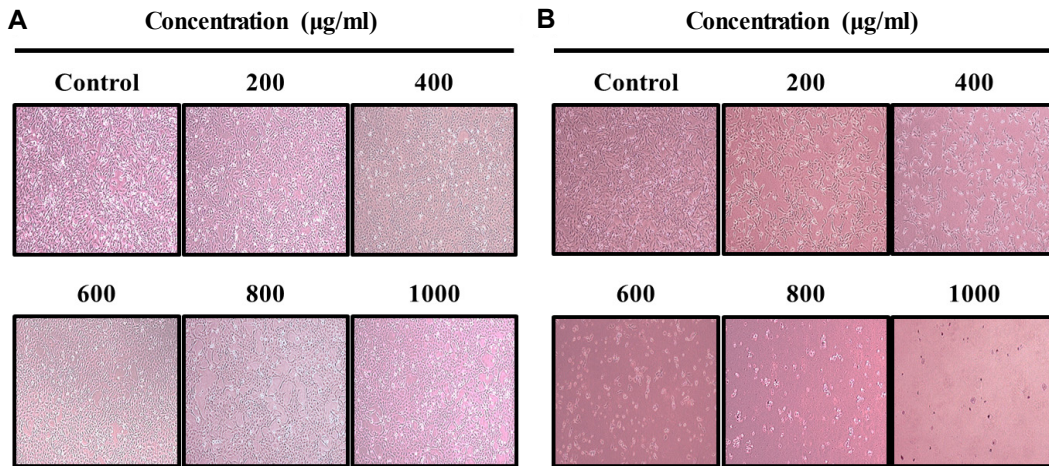


Fig. 2. Photomicrographs (×200) of the RC-58T/h/SA#4 cells treated with ABEG (A) and AEG (B) for 24 hr. Morphological changes were observed by microscopy at ×200 magnification.

에서는 안정적으로 부착되어 정상적으로 암세포가 증식되는 모습을 확인할 수 있었으며, AEG를 처리한 세포는 농도가 높아짐에 따라 세포가 부착되지 못하고 부유하였으며, 세포의 수가 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 특히, 800 µg/ml의 농도에서는 거의 모든 세포가 외형이 붕괴되어 부유하는 것을 확인할 수 있었다. 반면 ABEG를 처리한 군에서는 형태학적 변화가 거의 관찰되지 않았으며, 이는 SRB assay와 동일한 경향을 나타내었다.

AEG와 ABEG가 RC-58T/h/SA#4 세포 핵의 형태변화에 미치는 영향

Apoptosis는 programmed cell death 라고도 불리며, 세포가 정상적인 또는 병리학적인 요인에 의해 영향을 받아 스스로 죽음에 이르게 되는 현상을 말한다[27, 29]. 특히, Apoptosis가 일어난 세포는 DNA의 절단에 의해 염색질이 응축되는 현상을 나타내며[6] RC-58T/h/SA#4 세포에서 AEG와 ABEG를 각각의 농도로 처리한 후, hoechst 33258 염색법을 통한 세포

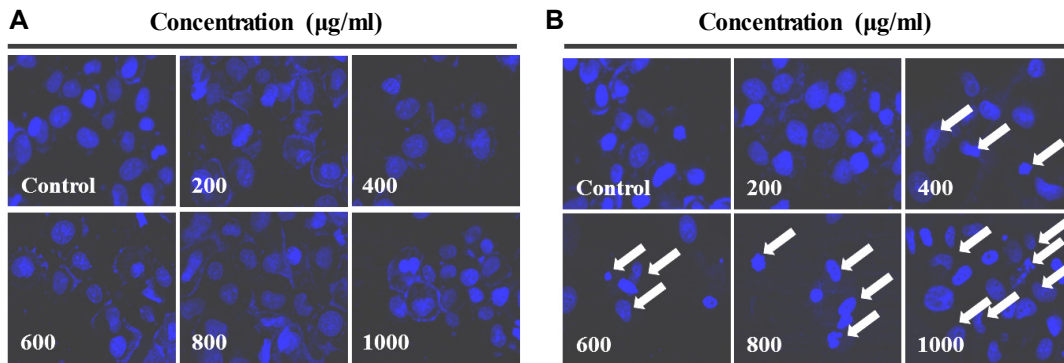


Fig. 3. Nuclear fragmentation induced by ABEG and AEG for 24 hr in RC58T/h/SA#4 cancer cells. Sample treated or non-treated cells were washed once with PBS and stained with 10 µg/ml of Hoechst 33258, and finally, examined by fluorescence.

의 핵 형태변화를 관찰하였다(Fig. 3). 대조구에서는 암세포 핵의 손상이 관찰되지 않았으나, AEG 처리농도가 증가됨에 따라 DNA 절단에 의한 염색질의 응축된 형태인 apoptotic body가 증가하는 경향을 나타내었다. 특히, 600 µg/ml 이상의 농도에서 세포 수축 및 apoptotic body의 증가가 확연히 관찰되었다. 한편, ABEG를 처리한 세포에서는 핵의 응축을 유도하지 못하였으며 이를 통해 Fig. 1 및 2의 결과와 마찬가지로 암세포의 사멸에 영향을 미치지 못한다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 AEG의 처리에 따른 암세포 성장억제효과는 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있는 것으로 판단된다.

AEG가 RC-58T/h/SA#4 세포의 Bcl-2/Bax family 발현에 미치는 영향

AEG 처리에 의한 세포성장 억제와 연관된 apoptosis 유발에 영향을 주는 관련인자를 확인하기 위하여, apoptosis의 메커니즘에 관여하는 대표적 발현 단백질을 확인하였다. Apoptosis 유발은 크게 mitochondrial pathway라고 알려진 intrinsic pathway와 death receptor pathway로 알려진 extrinsic pathway로 나누어진다[8]. 특히, apoptosis를 유도하는 핵심 단백질로 세포 내 mitochondrial pathway에 관여하는 Bcl-2/Bax family를 들 수 있다. Bcl-2는 anti-apoptotic 인자로서 암세포의 apoptosis의 억제하는 반면 pro-apoptotic 인자인 Bax는 apoptosis를 유도하는 역할을 수행한다[15]. Bcl-2/Bax의 조절을 통해 cytochrome c 단백질이 mitochondria로부터 세포질로 방출되고 이는 종양억제인자인 p53 및 caspase 등과 같은 endonuclease 등의 활성을 조절하여 암세포의 자가 사멸을 유도한다[28].

AEG에 의한 전립선 암세포의 apoptosis 유도가 Bcl-2/Bax family의 단백질 발현변화와 관련되어 있는지를 western blot을 통하여 확인한 결과는 Fig. 4와 같다. RC-58T/h/SA#4 세포에 AEG를 농도 별로 처리하였을 때 Bax의 발현은 농도의존적으로 증가하는 반면 Bcl-2의 발현은 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 4). 따라서, RC-58T/h/SA#4 전립선 암세포 모델에서

AEG 처리로 인한 암세포 증식억제 및 apoptosis 유도효과는 Bcl-2 단백질의 감소 및 Bax 단백질의 증가와 관련이 있음을 확인할 수 있었다.

AEG가 RC-58T/h/SA#4 세포의 Caspase-3의 활성화에 미치는 영향

Apoptosis 유도에 중요한 조절인자로 작용하는 caspase protease는 세포 내에서 핵과 mitochondria 외막에 붙어 불활성 상태인 pro-enzyme 형태로 존재하다가 외부의 death signal이나 endoplasmic reticulum stress 등의 자극에 의해 활성화되는 것으로 알려져 있다[6]. 일반적으로 caspase-9은 mitochondria에서 유리된 cytochrome c와 결합하여 apoptosome을 형성하여 apoptosis를 유도하고 caspase-8은 death receptor에 의해 활성화되어 최종적으로 caspase-3의 활성화를 통해 apoptosis를 유도한다[1].

RC-58T/h/SA#4 세포에서 AEG의 처리에 의한 caspase-3

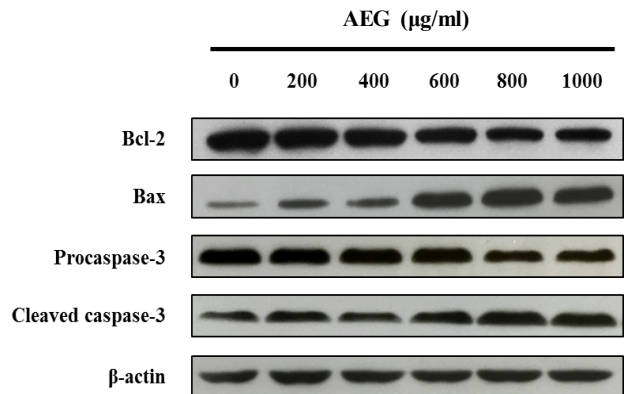


Fig. 4. Effect of AEG on expression of Bcl-2 family protein and caspase activation in RC-58T/h/SA#4 cells. Cells were treated with AEG for 24 hr. Bcl-2, Bax, Procaspase-3 and Cleaved caspase-3 activation was assessed by Western blot analysis. Cell +lysates were subjected to 12% SDS-PAGE.

의 활성변화를 확인한 결과, AEG를 처리한 군에서 농도의존적으로 procaspase-3는 감소되면서 active caspase-3가 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이러한 결과를 통해 AEG에 의한 인체 암세포의 증식억제 및 apoptosis 유도효과는 caspase-3 활성화와 밀접한 연관을 가진다는 것을 확인할 수 있었다.

환경호르몬을 처리한 RC-58T/h/SA#4 세포에서 AEG의 암세포 증식 억제효과

환경호르몬은 유기용제, 플라스틱 등의 인공화합물로부터 발생하는 유해 화학물질 중의 하나로 체내로 들어가서 호르몬과 유사한 작용을 하여 내분비계에 교란을 일으키고 호르몬의 생산, 분비, 대사 및 결합 등에 영향을 미친다고 알려져 있다[18]. 특히, 남성호르몬과 같은 호르몬 작용에 관여하여 인체의 생식, 발달, 면역저하, 정자 감소 및 전립선암 유발과 같은 피해를 일으킨다[22]. 대표적인 환경호르몬으로는 bisphenol A가 있으며, 이는 주로 플라스틱 제조의 원료로 사용되며 강한 세제를 사용하거나 산성 또는 고온의 열을 가할 시에 용출되어 나온다[21]. 이 물질은 인체에 유입되었을 경우 낮은 농도(하루 최대 섭취량 = 1 µg/ml)에서 내분비계 교란물질로 작용하며, 당뇨병, 암 및 피부병 등과 같은 만성질환에 관여하는 것으로 알려져 있다[22].

환경호르몬인 bisphenol A를 처리한 인체 전립선 암세포에서 AEG의 암세포 증식 억제 효능을 알아본 결과는 Fig. 5와 같다. 대조구와 비교하여 bisphenol A를 처리한 군에서는 세포의 성장을 비정상적으로 촉진시켜 암세포의 성장이 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 5). 반면에 bisphenol A를 처리한 세포에 AEG를 각각의 농도로 처리 하였을 때에 200, 400, 600, 800 및 1,000 µg/ml 농도에서 각각 41.70, 63.22, 86.64, 102.45 및 103.23% 유의적인 암세포의 성장 억제효과를 나타내었다. 반면 ABEG를 처리하였을 때 bisphenol A에 의해 증가된 암세포의 성장을 억제하지 못하는 것으로 나타났다. Park 등[21]과

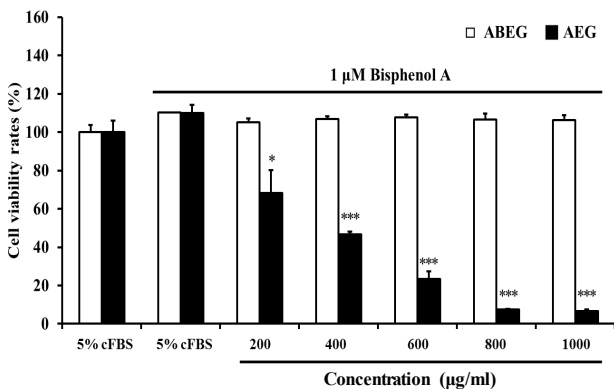


Fig. 5. Anti-proliferation effects of AEG in RC-58T/h/SA#4 cancer cells treated with 1 µM bisphenol. Data values are expressed as mean ± S.D (n=3.) *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 by Student's t-test.

Kwon 등[17]은 당귀 산수유 추출물의 처리가 환경호르몬에 의해 증식이 유도된 유방암 암세포 및 전립선 암세포의 증식을 억제한다고 보고 하였으며, 이는 해조류 추출물이 환경호르몬에 의한 전립선암세포의 비정상적인 증식을 억제할 수 있다는 것을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 교육부 지역혁신창의인력양성사업 일환으로 수행하였기에 이에 감사드립니다.

References

- Banerjee, S. K., Banerjee, S., Li, S. A. and Li, J. J. 1994. Induction of chromosome aberrations in Syrian hamster renal cortical cells by various estrogens. *Mutat. Res.* **311**, 191-197.
- Cho, K. J., Lee, Y. S. and Ryu, B. H. 1990. Antitumor effect and immunology activity of seaweeds toward Sarcoma-180. *Bull. Kor. Fish Soc.* **23**, 345-352.
- Chung, M. K. 2004. Review of the treatment outcome in the adenocarcinoma of the prostate. *J. Kor. Med. Assoc.* **47**, 432-440.
- Dang, H. T., Lee H. J., Yoo, E. S., Shinde, P. B., Lee, Y. B., Hong, J. K., Kim, D. H. and Jung, J. H. 2008. Anti-inflammatory constituents of the red alga *Gracilaria verrucosa* and their synthetic analogues. *J. Nat. Prod.* **72**, 232-240.
- Do, J. R., Kim, E. M., Koo, J. G. and Jo, K. S. 1997. Dietary fiber contents of marine algae and extraction condition of the fiber. *J. Kor. Fish. Soc.* **30**, 291-296.
- Fulda, S. and Debatin, K. M. 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **25**, 4798-4811.
- Gomez, S. L., Noone, A. M., Lichtensztajn, D. Y., Scoppa, S., Gibson, J. T., Liu, L., Morris, C., Kwong, S., Fish, K., Wilkens, L. R., Goodman, M. T., Deapen, D. and Miller, B. A. 2013. Cancer incidence trends among Asian American populations in the United States, 1990 to 2008. *J. Natl. Cancer Inst.* **105**, 1096-1110.
- Gupta, S. 2003. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Int. J. Oncol.* **22**, 15-20.
- Imbs, A. B., Bologodskaya, A. A., Nevshupova, N. V., Khotimchenko, S. V. and Titlyanov, E. A. 2001. Response of prostaglandin content in the red alga *Gracilaria verrucosa* to season and solar irradiance. *Phytochemistry* **58**, 1067-1072.
- Jung, K. W., Won, Y. J., Kong, H. J., Oh, C. M., Seo, H. G. and Lee, J. S. 2013. Cancer statistics in Korea: incidence, mortality, survival and prevalence in 2010. *Cancer Res. Treat.* **45**, 1-14.
- Jung, W. S., Park, E. K., Kang, S. P., Park, S. H. and Lee, M. J. 2010. Ultraviolet-A blocking effect and antioxidant activity of *Gracilariopsis chorda* extract. *Kor. J. Fish. Aquat. Sci.* **43**, 277-279.

12. Kalish, L. A., McDougal, W. S. and McKinlay, J. B. 1995. Family history and the risk of prostate cancer. *Urology* **56**, 803-806.
13. Kang, H. I., Kim, J. Y., Cho, H. D., Park, K. W., Kang, J. S. and Seo, K. I. 2010. Resveratrol induces apoptosis in primary human prostate cancer cells. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **39**, 1119-1125.
14. Kim, E. J., Park, S. Y., Hong, J. E., Shin, M. J., Lim, S. S., Shin, H. K. and Yoon, 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.
15. Kim, G. H., Lee, M. H., Han, M. H., Park, C., Hong, S. H. and Choi, Y. H. 2013. Induction of apoptosis by *Citri Pericarpium* methanol extract through reactive oxygen species generation in U937 human leukemia cells. *J. Life Sci.* **23**, 1057-1063.
16. Kim, J. H. and Kim, M. Y. 2015. Anticancer effect of citrus fruit prepared by gamma irradiation of budsticks. *J. Life Sci.* **25**, 1051-1058.
17. Kwon, S. H., Kwon, S. J., Kim, J. Y., Park, K. W., Shim, K. H. and Seo, K. I. 2009. Protective effect of *Corni fructus* ethanol extracts against environmental hormones in human prostate cancer cells. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 663-666.
18. Lee, S. M., Choi, H. K. and Yu, G. H. 2003. Effect of bisphenol A, nonylphenol, pentachlorophenol on the proliferation of MCF-7 and PC-3 cells. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **18**, 424-428.
19. Lee, Y. S., Kim, D. S., Ryu, B. H. and Lee, S. H. 1992. Antitumor and immunomodulating effects of seaweeds toward Sarcoma-180 cell. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **21**, 554-550.
20. Ortega-Calvo, J. J., Mazuelos, C., Hermosin, B. and Sá iz-Jiménez, C. 1993. Chemical composition of spirulina and eucaryotic algae food products marketed in Spain. *J. Appl. Phycol.* **5**, 425-435.
21. Park, K. W., Choi, S. R., Yang, H. S., Cho, H. W., Kang, K. S. and Seo, K. I. 2007. Anti-proliferation effects of decursin from *Angelica gigas* Nakai in the MCF-7 cells treated with environmental hormones. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **36**, 825-831.
22. Poland, A. and Knutson, J. C. 1982. 2,3,7,8-Tetrachlorodiben-zop-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons; examination of the mechanism of toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **22**, 517-554.
23. Raddy, L., Odhay, B. and Bhoola, K. D. 2003. Nature products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacol. Ther.* **99**, 1-13.
24. Shin, J. H., Choi, D. J., Lim, H. C., Seo, J. K., Lee, S. J., Choi, S. Y. and Sung, N. J. 2006. Nutrients and antioxidant activity of red seaweeds. *J. Life Sci.* **16**, 400-408.
25. Yasunaga, Y., Nakamura, K., Ko, D., Srivastava, S., Moul, J. W., Sesterhenn, I. A., McLeod, D. G. and Rhim, J. S. 2001. A novel human cancer culture model for the study of prostate cancer. *Oncogene* **20**, 8036-8041.
26. Youn, H. J. and Jung, S. H. 2011. Care for alopecia during chemotherapy of cancer patients. *Kor. J. Clin. Oncol.* **6**, 34-39.
27. Yu, M. H. 2003. Antitumor and antioxidant immature effect of *Prunus salicina* Lindl. cv. Soldam. MS Thesis, Keimyung University, Daegu, Korea.
28. Wen, X., Lin, Z. Q., Liu, B. and Wei, Y. Q. 2012. Caspase-mediated programmed cell death pathways as potential therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* **45**, 217-224.
29. Wyllie, A. H., Kerr, J. F. and Currie, A. R. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**, 251-306.

초록 : 꼬시래기 산추출물의 primary 인체 전립선 암세포 증식억제 효과

홍성민¹ · 조현동² · 김정호³ · 이주혜⁴ · 송우시⁵ · 이성태⁶ · 이미경³ · 서권일^{7*}

(¹동아대학교 농업생명과학연구소, ²경북대학교 식품공학부, ³순천대학교 식품영양학과, ⁴농촌진흥청 국립농업과학원, ⁵MS, ⁶순천대학교 약학과, ⁷동아대학교 생명공학과)

본 연구에서는 꼬시래기 산추출물(acid extraction of *Gracilaria verrucosa*, AEG)을 이용하여 RC-58T/h/SA#4 primary 인체 전립선 암세포에 대한 증식억제 및 apoptosis 유도효과를 밝히고자 하였다. AEG의 처리는 전립선 암세포에서 24시간에서 농도 의존적으로 증식 억제능을 보이는 반면 정상세포에서는 독성을 나타내지 않아 암세포의 증식만을 선택적으로 억제시킴을 확인할 수 있었다. 또한 RC-58T/h/SA#4 세포에서 AEG의 처리는 apoptotic body 형성 및 핵의 형태 변화를 유도하였으며, anti-apoptotic 인자인 Bcl-2 단백질은 감소시키고 pro-apoptotic 인자인 Bax 단백질은 증가시키는 것으로 나타났다. Apoptosis의 유발과 관련된 주요인자인 caspase-3 단백질의 발현은 대조구와 비교하여 AEG를 처리한 군에서 caspase-3의 발현을 농도 의존적으로 증가시키는 것으로 나타났다. 한편, bisphenol A에 의해 비정상적으로 증식된 전립선 암세포에서 AEG의 처리는 유의적인 전립선암세포 성장억제효능을 나타내었다. 본 연구에서는 AEG가 RC-58T/h/SA#4 전립선암 세포에서 암세포 성장억제효과 및 apoptosis 유도효과를 나타낸다는 것을 확인하였으며, 환경호르몬에 의해 증식된 암에 대해서도 성장을 억제할 수 있는 효능을 가지고 있음을 증명하였다.