

암세포주에 대한 미더덕 추출물의 세포독성 효과

정은실¹ · 김주영¹ · 박은주² · 박해룡¹ · 이승철^{1*}

¹경남대학교 식품생명학과

²경남대학교 식품영양학과

Cytotoxic Effect of Extracts from *Styela clava* against Human Cancer Cell Lines

Eun-Sil Jung¹, Ju-Young Kim¹, Eunju Park², Hae-Ryong Park¹ and Seung-Cheol Lee^{1*}

¹Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea

²Dept. of Food and Nutritional Sciences, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea

Abstract

The present study describes the preliminary evaluation of the cytotoxic effect from *Styela clava* (Korean name: miduduk) extracts. *S. clava* was treated with methanol, ethanol, acetone, and water, then cytotoxic effect of the extracts were evaluated by the MTT reduction assay. The ethanol extracts from *S. clava* showed the cytotoxic activity on the HT-29 human colon cancer cells. The ethanol extracts was further fractionated with *n*-hexane, diethyl ether, ethyl acetate, and water according to the degree of polarity. The diethyl ether fraction showed high cytotoxic activity on HT-29 cells, however, the other fractions showed low cytotoxicity. The diethyl ether layer also showed the cytotoxic activity against SW620, HeLa, and MCF-7 cells. These studies support that extracts from *S. clava* may be a potential candidate as a possible chemotherapeutic agent against human cancer cells.

Key words: *Styela clava*, cytotoxic effect, MTT reduction assay, human cancer cell lines

서 론

현대 사회에서 암이 발생하는 원인은 유전적 요인보다 환경적 요인이 더 큰 비중을 차지하고 있으며, 특히 식생활에서 오는 발암율은 환경적 요인이 36%로서 매우 높다(1-3). 식이중에는 발암인자 및 항발암인자가 동시에 함유되어 있어 이들 성분들이 암 발생을 촉진시키거나 억제하기도 한다. 암은 2003년도 우리나라 전체 사망원인의 25.9%를 차지하여 사망원인 1위를 차지하고 있어 국민건강에 매우 위협적이다(4). 암은 조기에 발견되지 못할 경우 완치가 거의 불가능하고, 병이 진전될수록 환자와 가족의 고통과 경제적 손실이 막대하며, 의료보험의 재정고갈 등 사회적으로도 큰 비용을 초래한다(5). 그러므로 단순한 수명연장보다 즐겁고 건강한 삶을 원하는 삶의 질이 중요한 관심사로 대두되고 있는 요즘 암의 예방과 조기치료의 중요성은 매우 크다고 할 수 있다(6). 최근에는 암의 발생과 전이, 암세포의 생리, 암의 진단과 치료에 대한 연구와 함께 식품을 비롯한 항암효과를 지니는 물질 검색을 통하여 새로운 암 치료제가 개발되고 있는 추세이다. 이것은 암이 발병되어 진행이 계속될 경우 수술, 약물치료 및 방사선치료 등을 통한 집중적인 치료를 해야 하지만 이와 같은 약물치료는 그 독성 등의 후유증을

배제할 수 없으므로 안전성이 있는 약물개발이 절실히 요구되고 있기 때문이다(7,8). 특히, 해양생물은 육상생물에 없는 특유의 대사과정과 독특한 환경으로 인하여 다양한 생리활성물질의 탐색 가능성을 가지고 있다고 할 수 있다. 또한, 육상생물은 이미 많은 연구가 진행되었으나 해양생물은 아직 제한된 연구로 인하여 미지의 천연물질의 개발에 대한 기대가 매우 높고 평가되고 있다(9).

미더덕(*Styela clava*)은 척삭동물문 미색동물아문에 속하는 해양생물로서, 1980년대 중반부터 본격적인 양식이 시작되면서 어민의 소득증대에 기여하고 있다(10). 미더덕은 우리나라 전역에서 발견되고 있으나, 경상남도 마산시에서 우리나라 소비량의 80%정도를 생산하고 있다. 독특한 맛과 향긋한 향 때문에 연중 이용되고 있으며, 4월부터 7월 사이가 생산량이 가장 많은 시기이다. 미더덕의 소비형태는 주로 찜이나 된장찌개 등의 재료로 식품에 널리 이용되고 있으며, 그 밖에 찻감용으로 4~5월경에 채취된 것이 이용되고 있다. 미더덕에 대한 연구는 스테롤함량(11), 계절에 따른 영양 성분 조성의 변화(12,13) 등 주로 성분별에 대한 연구가 대부분이었으며, 기능성 성분으로 껍질로부터 glycosaminoglycan을 추출한 예(14)가 있었다. 근래 들어 미더덕 유래 용혈성 항균펩티드에 대한 보고가 외국에서 연구되어 보고되었으

*Corresponding author. E-mail: sclee@kyungnam.ac.kr

Phone: 82-55-249-2684. Fax: 82-55-249-2995

며(15-17), 본 연구진에 의해 미더덕의 추출물이 가지는 전반적인 항산화활성과 가공방법과 용매에 따른 미더덕 추출물이 암세포주에 대해 가지는 기본적인 항암활성이 보고된 바 있다(18).

본 연구에서는 해양생물자원으로부터 항암활성을 가지는 물질을 탐색하기 위한 목적으로 미더덕의 동결건조물을 이용하여 여러 용매별로 추출물을 제조하고 인간 유래의 다양한 암세포에 처리하여 세포독성을 확인함으로써 미더덕 추출물이 가지는 항암활성을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용된 미더덕(*Styela clava*)은 경상남도 마산시 진동면 고현마을에서 2005년 10월에 구입하였다. 구입한 미더덕의 이물질 제거하고 물로 깨끗이 여러 번 씻어 물기를 제거한 후, 분쇄기(Mixer MC 811C, (주)노비타, 한국)로 분쇄하여 사용하였다. 암세포 성장억제효과 실험에 사용된 시약 중 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)제품을 구입하였고, 그 외 연구에 사용된 용매 및 시약은 모두 일급 이상의 등급을 사용하였다.

시료의 추출

신선한 미더덕을 믹서기(Mixer MC 811C, (주)노비타, 한국)로 분쇄한 후, 심온동결기(Upright Deep freezer VX 530, 한국)로 -70°C 에서 하룻밤 저장하고, 동결건조기(Freeze Dryer FD 5512, (주)일신랩, 한국)로 4일동안 완전히 건조시켰다. 건조된 시료는 다시 분쇄기를 이용하여 분말로 만들어 27 mesh의 체로 걸러 분말의 크기를 일정하게 하였다. 시료 5 g을 100 mL의 water, methanol, ethanol, acetone 용매를 가하여 진탕배양기(HB-201s, (주)한백, 한국)에서 25°C , 100 rpm의 조건으로 48시간 추출하였다. 각각의 추출물은 여과지(Whatman No.1)로 여과한 후, 회전감압농축기(EYELA N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 37°C 에서 농축하였다. 이 중 가장 강력한 활성을 가지는 ethanol 추출물을 이용하여 정제수율을 높여 암세포 성장억제효과를 확인하기 위한 목적으로 용매의 극성에 따라 순차적으로 용매 분획하였다. 즉, *n*-hexane과 물을 같은 비율로 하여 분획하여 분획여두에서 *n*-hexane 층을 분획하고, 동일한 방법으로 남은 수용액 층에 diethyl ether, ethyl acetate, water 층으로 분획하여 각각의 용매 분획물을 얻어 감압농축하였다(Fig. 1). 각 추출물 및 분획물은 50 mg/mL의 농도로 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹여 적당한 농도로 희석해서 실험에 사용하였다.

암세포 배양

본 실험에 사용한 암 세포주들은 대장암 유래의 세포인

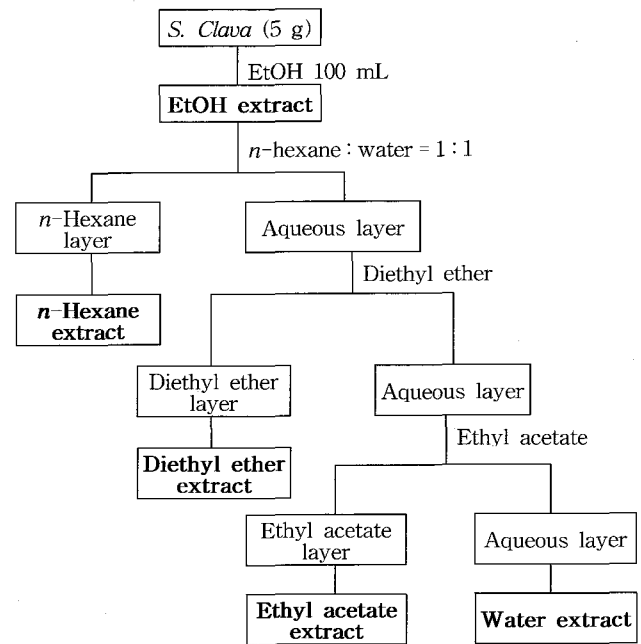


Fig. 1. Fractionation procedure of ethanol extracts from *S. clava*.

HT-29(human colon carcinoma), SW620(human colon carcinoma), 자궁경부암 세포 HeLa(human cervix adenocarcinoma) 및 유방암 세포 MCF-7(human breast adenocarcinoma pleural effusion)로 한국세포주은행(KCLB, 서울)으로부터 분양받아 실험에 사용하였다. 세포배양을 위한 배지는 HT-29, SW620, MCF-7 세포주의 경우 RPMI1640 medium을 사용하였으며, HeLa 세포주는 DMEM medium을 사용하였다. 각 배지에 10% FBS, 100 unit/mL의 penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 streptomycin을 처리하여 37°C , 5% CO_2 incubator(MCO-18AIC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 배양하였다.

암세포의 형태학적 관찰

미더덕 용매추출물에 대한 HT-29 세포주의 형태학적인 관찰을 위해 6 well plate에 1×10^5 cells/well로 24시간동안 37°C , 5% CO_2 incubator에서 배양한 후, DMSO에 녹인 미더덕 용매별 추출물을 각각 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하여 24시간 후에 inverted microscope(TS 100-F, Nikon, Tokyo, Japan)로 각 well의 세포형태를 관찰하고, 100배로 사진을 촬영하였다.

암세포 성장억제효과 측정

부위별 미더덕 추출물의 암세포 성장억제효과는 MTT assay(19)로 조사하였다. 세포주를 1×10^5 cells/well의 농도로 맞추고 96 well plate에 각각 100 μL 씩 첨가하여 24시간 동안 37°C , 5% CO_2 incubator에서 배양한 후(20), DMSO에 녹인 미더덕 용매별 추출 분획물 시료를 각각 10, 50, 100, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였다. 24시간동안 배양한 후 각

well에 PSB 완충액에 녹인 MTT(5 mg/mL) 용액을 10 µL 씩 첨가하여 1시간동안 다시 배양시킨 후, well 바닥에 형성된 formazan이 흡여지지 않게 상등액을 제거하고 DMSO 100 µL 첨가하여 녹인 후 ELISA reader(Model 680, BioRad, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 대조구 세포수를 100%로 하였을 때 상대적인 세포성장 억제율을 구하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복으로 이루어졌으며, 실험결과는 평균±표준편차로 표현하였다. 모든 처리값의 차이는 신뢰수준 95%(p<0.05)로 비교하여 분석되었다.

결과 및 고찰

암세포 성장억제에 미치는 미더덕 추출물의 영향

인간의 대장암 유래의 세포주 HT-29에 대한 미더덕 추출물의 암세포 성장억제효과에 대한 결과는 Fig. 2, 3과 같다. 먼저 각 용매에 대한 추출물이 HT-29세포주의 형태학적 변화에 미치는 영향을 알아보기 위해 inverted microscope로 세포형태를 관찰한 결과, 대조구는 암세포가 조밀하게 정상적으로 성장하는데 반해 각각 추출물을 500 µg/mL의 농도로 처리한 세포는 결속력이 감소되어 세포주위가 흐트러지고 세포가 응축되어 사멸된 것을 관찰할 수 있었다. 그 중 ethanol 추출물은 대조구와 다른 추출물에 비교하여 크게 세포의 응축과 세포수의 감소가 일어남으로 해서 암세포 성장 억제효과에 대한 활성이 가장 높음을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

이러한 형태학적인 변화에 따라 각 용매에 대한 추출물의 항암효과를 조사하기 위해 MTT reduction assay방법(18)을 이용하여 추출물을 처리하지 않은 대조구와 비교하여 암

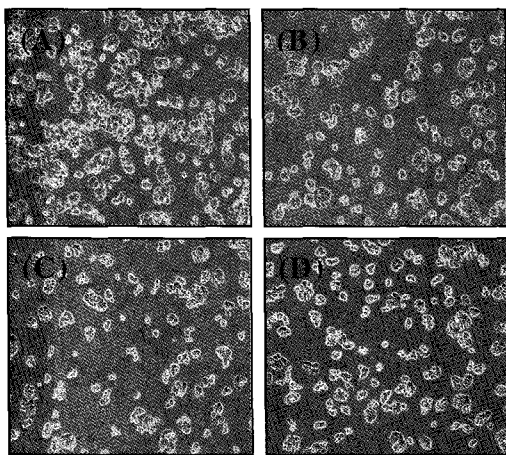


Fig. 2. Morphological change by extracts of *S. clava* in HT-29 cells (×100).
(A) Control, (B) Methanol extract, (C) Ethanol extract, and (D) Acetone extract.

세포 성장 억제효과를 확인하였다(Fig. 3). 미더덕 용매별 추출물을 10, 50, 100, 500 µg/mL의 농도로 각각 처리하였을 때 acetone과 water 추출물은 500 µg/mL의 농도에서 52.6%, 66.1%의 약한 활성을 보이는 반면, ethanol과 methanol 추출물의 경우에는 45.0%, 46.3%의 강한 항암활성을 보였다. 특히 형태학적 변화의 결과와 같이 여러 용매 추출물 중에서 ethanol 추출물이 가장 높은 항암활성을 가지고 있다는 것을 알 수 있었다.

한편, Kim 등(18)은 미더덕의 용매추출물의 항암활성은 극성에 매우 민감하다고 보고하였다. 즉, 수분을 함유하고 있는 신선 미더덕과 동결건조 미더덕의 경우, 같은 용매를 이용하여 추출물을 제조하여도 신선 미더덕에 비해 동결건조 미더덕의 추출물이 매우 높은 암세포 증식억제 활성을 나타내며, 이는 함유된 수분으로 인한 극성의 차이에 기인한다고 보고하였다. 본 연구에 이용한 추출물도 동결건조한 미더덕으로부터 유래하였으며, 높은 암세포 증식억제 활성을 나타내었다. 그러나 Kim 등(18)은 acetone 추출물이 약 40% 이하로 HT-29 세포주에 대한 증식억제 활성이 가장 높고, 그 다음으로 ethanol 추출물의 활성이 높다고 보고하였으나, 본 결과에서는 ethanol 추출물이 가장 활성이 높고 methanol, acetone 추출물의 순서대로 활성이 높았다. 이는 계절에 따른 미더덕의 성분변화 또는 HT-29 세포주의 상태에 따른 차이로 생각된다.

활성 분획물의 암세포 성장억제효과

각 용매별 분획물의 암세포 성장억제효과에 대한 결과는

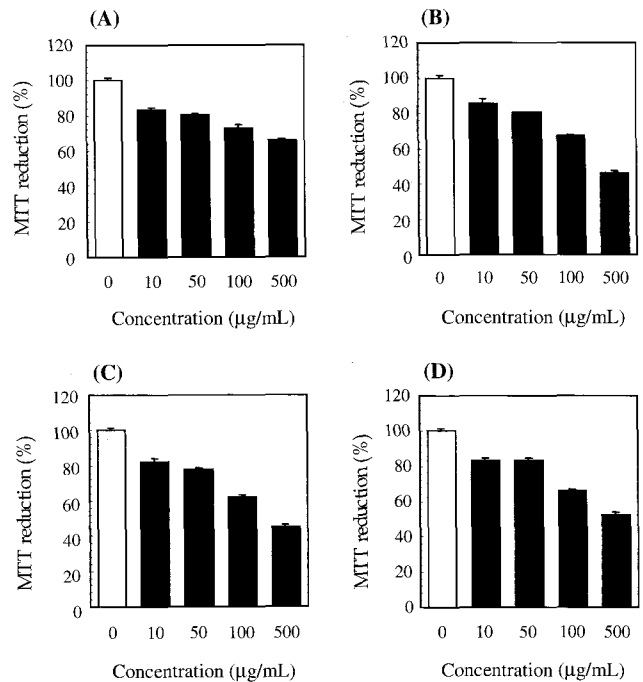


Fig. 3. Inhibitory effect on cell survival of extracts from *S. clava* in HT-29 cells.
(A) Water, (B) Methanol extract, (C) Ethanol extract, and (D) Acetone extract.

Fig. 4-A, B와 같다. HT-29 세포주에 각 분획물을 처리하였을 때 형태학적으로 대조구는 암세포가 조밀하게 정상적으로 성장하는데 반해 각각의 분획물을 500 µg/mL의 농도로 처리한 세포는 결속력이 감소되어 세포주위가 흐트러지고 세포가 응축되어 사멸되었다. 그 중 diethyl ether 분획물은 대조구와 다른 추출물에 비교하여 크게 세포의 응축과 세포수의 감소가 일어남으로 해서 암세포 성장억제효과에 대한 활성이 가장 높음을 확인할 수 있었다. 그리고 각 분획물을 50, 100, 250, 500 µg/mL의 농도로 처리하여 MTT reduction assay를 해 본 결과, 여러 용매분획물중에서 diethyl ether 분획물에서 가장 높은 항암활성효과가 있었으며 250 µg/mL을 처리했을 때 25.9%의 암세포 생존율을 보였고 500 µg/mL에서는 11.0% 이하의 생존율을 나타내었다. 이는 형태학적 관찰과도 결과가 비슷한 것으로 판단된다. 한편 ethyl

acetate 분획에서도 diethyl ether 분획물보다는 낮지만 250 µg/mL의 농도에서 50% 미만의 높은 암세포 성장억제효과를 나타내었다.

Diethyl ether 분획물의 암세포 성장억제효과

용매 분획물 중에서 가장 높은 항암활성을 보인 diethyl ether 분획물의 항암활성 스펙트럼을 확인하기 위하여 HT-29와 같은 인간대장암 유래의 세포주 SW620, 자궁경부암 세포 HeLa 및 유방암 세포 MCF-7에 처리하여 항암활성을 확인하였다(Fig. 5). HeLa세포에서는 50 µg/mL 농도에서도 26.7%로 다른 세포에 비해 암세포 성장억제효과가 가장 좋았으며, 다른 세포에서도 HT-29에 비해 50% 이하의 좋은 활성을 보였다. 그리고 250 µg/mL의 농도에서는 SW620, HeLa, MCF-7 세포 모두가 13.1%, 9.5%, 7.5%의 높은 항암

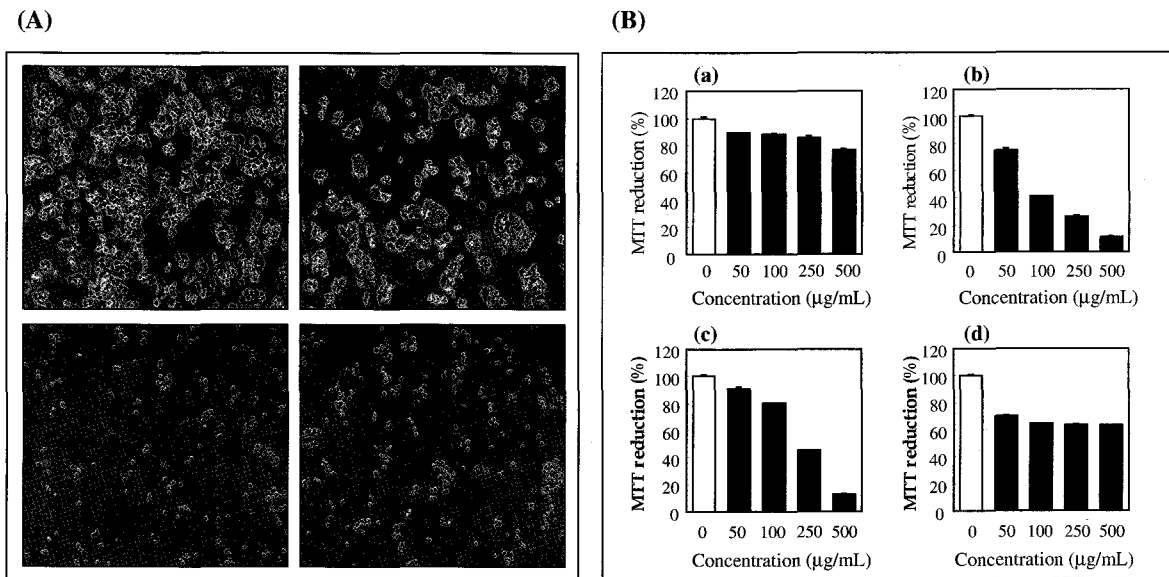


Fig. 4. Morphological change by extracts of *S. clava* in HT-29 cells (A) (×100). (a) Control, (b) *n*-Hexane extract, (c) Diethyl ether extract, and (d) Ethyl acetate extract. Inhibitory effect on cell survival of the each fraction of ethanol extracts from *S. clava* in HT-29 cells (B). (a) *n*-Hexane extract, (b) Diethyl ether extract, (c) Ethyl acetate extract, and (d) Water extract.

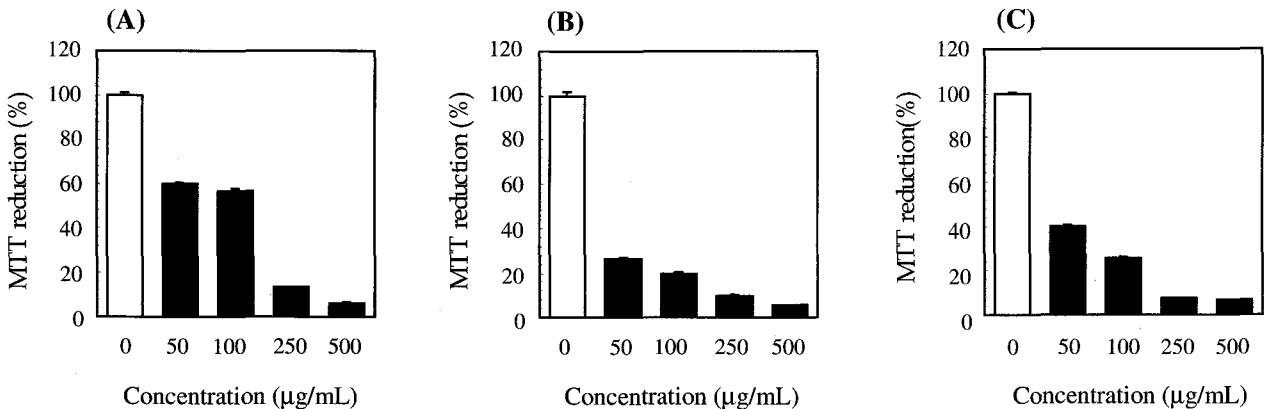


Fig. 5. Inhibitory effect on cell survival of diethyl ether extract on the human cancer cells. (A) SW620, (B) HeLa, and (C) MCF-7.

활성을 나타내었다. 따라서 미더덕 추출물은 인간대장암 세포주뿐만 아니라 다른 여러 종류의 암 세포주에서도 강력한 항암활성이 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

요 약

신선한 미더덕을 동결건조하여 분말로 만들어 water, MeOH, EtOH 및 acetone의 용매로 추출하여 항암활성을 조사하였다. 대장암 세포주 HT-29에 대한 미더덕 추출물의 암세포증식 억제효과는 ethanol 추출물이 500 µg/mL 농도에서 45.0%로 가장 높은 활성을 보였으며, 대조구와 다른 추출물에 비교하여 크게 세포의 응축과 세포수의 감소를 형태학적으로 관찰할 수 있다. 용매별 추출물 중 가장 강력한 항암활성을 가지는 ethanol 추출물을 이용하여 정제수율을 높여 암세포 성장억제효과를 확인하기 위하여 n-hexane, diethyl ether, ethyl acetate 및 water 순으로 극성을 높여 분획한 결과 diethyl ether 분획물에서 가장 높은 항암활성을 나타내었다. 그리고 diethyl ether 분획물을 인간대장암 유래의 세포주 SW620, 자궁경부암 세포 HeLa 및 유방암 세포 MCF-7에 처리하였을 때 농도 의존적으로 높은 항암활성이 나타났으며, 가장 높은 농도 500 µg/mL 처리 시 모두 10%이하의 세포 생존율을 나타내었다. 지금까지는 한약재를 비롯한 농산물 유래의 추출물이 항암효과를 보이는 연구가 보고된 바 있으나 해양생물 유래의 추출물에서 항암효과를 보이는 결과에 대해서 구체적으로 보고된 바가 없는 실정이다. 따라서 이번 연구결과는 생리활성 물질을 탐색함에 있어서 해양생물이 중요한 천연자원이 될 수 있다는 가능성을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 지방기술혁신사업(RTI04-03-07) 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Park HS, Lee YS, Han MJ. 1995. *Dietary Life and Health*. Hyo-II Publishing Company, Seoul, Korea. p 262-265.
2. Nagago M, Sugimura T. 1993. Carcinogenic factor in food with relevance to colon cancer development. *Mut Res* 290:

- 45-51.
3. Ames BN, Maron DM. 1983. Revised method for the *Salmonella typhimurium* mutagenicity test. *Mut Res* 113: 178-215.
4. National Statistical Office. 2004. *Annual Report on the Cause of Death Statistics*. Seoul, Korea.
5. Kim HJ, Kim MK. 2003. Anticancer effect of persimmon leaf extracts on Korean gastric cancer cell. *Korean J Nutr* 36: 133-146.
6. Lee SR. 1993. *Food Safety Research*. Ewha Woman's University Press, Seoul, Korea.
7. Kang TB, Liang NC. 1997. Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukemia cells. *Biochem Pharm* 54: 1013-1018.
8. Park KY, Moon SH, Rhee SH, Baek KY, Lim SY. 1995. Effect of tannin from persimmon leaves on the growth inhibition and the synthesis of mRNA of type IV collagen in AZ-521 human gastric cancer cells. *Environ Mut Carcino* 15: 32-37.
9. Park JC, Choi JW. 1996. Screening of marine natural products on inhibitory effect of the formation of lipid peroxidation. *Kor J Pharmacogn* 27: 117-122.
10. Ministry of Agriculture and Forestry. 1993. *Ministry of Agriculture and Forestry Statistical Yearbook*. Seoul, Korea. p 291.
11. Jo YG. 1978. The sterol composition of *Styela clava*. *Kor Fish Soc* 11: 97-101.
12. Lee KH, Park CS, Hong BI, Jung BC, Cho HS, Jea YG. 1995. Seasonal variations of nutrients in warty sea squirt (*Styela clava*). *J Korean Soc Food Nutr* 24: 268-273.
13. Ahn SH. 2003. Extraction of glycosaminoglycans from *Styela clava* tunic. *Biotechnol Bioproc Eng* 18: 180-185.
14. Lehrer RI. 2001. Clavanins and styelins, alpha-helical antimicrobial peptides from the hemocytes of *Styela clava*. *Adv Exp Med Biol* 484: 71-76.
15. Menzel LP, Lee IH, Sjostrand B, Lehrer RI. 2002. Immunolocalization of clavanins in *Styela clava* hemocytes. *Dev Comp Immunol* 26: 505-515.
16. Lee IH, Zhao C, Nguyen T, Menzel, Waring AJ, Sherman MA, Lehrer RI. 2001. Clavaspirin, an antibacterial and haemolytic peptide from *Styela clava*. *J Pept Res* 58: 445-456.
17. Taylor SW, Craig AG, Fischer WH, Park M, Lehrer RI. 2000. Styelin D, an extensively modified antimicrobial peptide from ascidian hemocytes. *J Biol Chem* 275: 38417-38426.
18. Kim JJ, Kim SJ, Kim SH, Park HR, Lee SC. 2006. Antioxidant and anticancer activities of extracts from *Styela clava* according to the processing methods and solvents. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 278-283.
19. Fish B. 1984. Clinical trials for the evaluation of cancer therapy. *Cancer Res* 54: 609-615.
20. Goodman GY, Yen YP, Cox TC, Crowley J. 1987. Effect of verapamil on *in vitro* cytotoxicity of adriamycin and vinblastine in human tumor cells. *Cancer Res* 47: 2295-2311.

(2006년 5월 30일 접수; 2006년 6월 26일 채택)