

참가사리 분획물의 암 예방효과

정영화¹ · 정복미² · 신미옥¹ · 배송자^{1*}

¹신라대학교 식품영양학과, 마린-바이오 산업화지원센터

²여수대학교 식품영양학과

Anticarcinogenic Effects of Extracts from *Gloiopeltis tenax*

Young-Hwa Jung¹, Bok-Mi Jung², Mi-Ok Shin¹ and Song-Ja Bae^{1*}

¹Dept. of Food and Nutrition, Marine Biotechnology Center for Biofunctional Material Industries, Silla University, Busan 617-736, Korea

²Dept. of Food Science and Nutrition, Yeosu National University, Yeosu 550-749, Korea

Abstract

In this study, we investigated anticarcinogenic effects of extracts from *Gloiopeltis tenax* (GT). GT was extracted with methanol (GTM), which was then further fractionated into four fractions by using solvent fractionation method, affording methanol (GTMM), hexane (GTMH), butanol (GTMB) and aqueous (GTMA) soluble fractions. We determined the cytotoxic effects of these fractions on cancer cells by MTT assay. Among various fractions of GT, the GTMM showed the strongest cytotoxic effect at concentration of 150 µg/mL, displaying 95.97% on HepG2 cell lines and 93.64% on HT-29 cell lines, respectively. And, the anti-proliferative effect of GT was accompanied by a marked increase in levels of Bad, Bax, Bok and Bak protein and activation of caspase-3, caspase-7 and PARP protein. Also, we observed quinone reductase (QR) induced effects in all fraction layers of GT on HepG2 cells. The QR induced effects of the GTMM and GTMB on HepG2 cells at concentration of 60 µg/mL showing inductive indexes of 2.86 and 2.04 compared to the control value of 1.0.

Key words: cytotoxicity, quinone reductase, *Gloiopeltis tenax*

서 론

암은 현대의학의 가장 큰 당면과제로서 WHO의 보고에 의하면 환경성 발암인자 중 특히 식품이 차지하는 비율이 큰 것으로 알려져 있다(1). 암 발병률이 식이의 영양학적인 요인에 의해 달라질 수 있다는 것이 여러 가지 연구에 의해 보고된 바 있어 식이요인의 중요성이 지적되고 있다. 최근 식이와 관련된 암의 원인물질을 검색하는 연구가 활발히 진행되고 있으며 각 국가에서 많은 암종의 발병률과 특정 식이요소들의 소비와의 연관성이 큰 것으로 보아 식품속의 영양은 암 발생의 모든 단계에 영향을 미칠 수 있는 것으로 알려져 있다(2).

세포의 성장 및 분화조절은 세포가 정상적으로 자라는데 필요로 하는 기구로, 이 과정이 어떤 원인에 의해 균형이 깨어지게 되면 정상세포에서 비정상적인 세포로 되며 무절제한 세포의 성장은 암세포로 발전하는 계기가 된다(3,4). 화학적 암 예방의 개념을 알기 위해서는 역으로 정상세포가 암세포로 전환되는 발암과정의 생화학적 기전에 대한 이해가 필요하다. 암은 세포분화 시 DNA에 의해 조절되는 정상

적인 형태를 혼란시킴으로서 발생하는 질병으로 세포주기 조절의 교란에 의해 비정상적인 증식이 계속되면 암을 통하여 세포사멸 즉, apoptosis가 일어난다. Bcl-2 family 단백질은 apoptosis 동안 세포막에 배치되게 되고, caspase 활성화의 upstream step에서 apoptosis를 저해하거나 촉진하는 인자이다. Bad, Bax, Bok 및 Bak는 apoptosis를 촉진하고, Bcl-2과 Bcl-xL은 apoptosis를 억제하는 인자로 알려져 있다. 또한 caspase는 정상적으로 성장 중인 세포에서는 pro-enzyme 형태로 존재하지만 apoptosis 유도를 활성화시키는 신호에 의해 활성화된 cysteine-related protease 활성을 지니게 되어 직·간접적으로 세포 내 존재하는 표적단백질을 분해함으로써 apoptosis에 관여하게 된다(5-7).

현재 임상에서 널리 사용되고 있는 항암제의 대부분은 합성물질들로 부작용이 심하여 문제가 되고 있다. 이로 인해 최근 세계적으로 부작용이 적으면서 유효한 항암제를 개발하기 위해 천연산물을 대상으로 한 항암성 물질의 검색이 많이 시도되고 있다(8,9). 해양생물은 육상생물에 없는 특유의 대사과정과 독특한 환경으로 인하여 다양한 신규 생리활성물질의 탐색 가능성을 가지고 있다. 또한 육상생물은 이미

*Corresponding author. E-mail: sjbae@silla.ac.kr
Phone: 82-51-999-5462. Fax: 82-51-999-5687

많은 연구가 진행되었으나 해양생물은 아직 제한된 연구로 인하여 미지의 천연물질의 개발에 대한 기대가 높고 평가되고 있다. 따라서 본 연구는 식용으로 애용되는 해조류 중 홍조류에 속하는 참가사리 분획물의 생리활성을 이용한 암세포 성장저지 및 QR 유도활성효과를 연구함으로써 식품이 가지는 식의약 생리활성기능을 암 예방 차원에서의 역할을 검토하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용한 참가사리(*Gloiopeltis tenax*, GT)는 2004년 5월 전남 무안군에 위치한 (주)삼일물산에서 제공받았다. 세포실험에 사용된 시약 중 NP-40과 menadione은 Sigma(St. Louis, USA)사 제품을 구입하였고 Dulbecco's Eagle modified medium(DMEM)과 fetal bovine serum(FBS), phosphate buffered saline(PBS) 등은 Gibco-BRL(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며 그 외 연구에 사용된 용매 및 시약은 특급을 사용하였다.

시료의 추출 및 분획물 제조

시료로 사용된 참가사리(*Gloiopeltis tenax*, GT)는 건조 후 분쇄하여 시료와 methanol을 1:5(W/V)로 첨가한 후 상온에서 2회 추출하고, 극성과 비극성 물질을 선별하여 추출하기 위해 ethanol과 dichloromethane(CH_2Cl_2)을 1:1로 섞은 용액에 2회 추출하고 회전식 진공농축기로 감압 농축시켜 동결건조 후 참가사리의 추출물(GTM)을 얻었다. 이 추출물을 각 용매별로 분획하여 hexane층(GTMH), methanol층(GTMM), butanol층(GTMB) 및 수층분획물(GTMA)로 각각 분획하고, 각 층을 감압 농축 후 동결 건조하여 분말로 만들어 시료로 사용하였다.

암세포 배양

본 실험에 사용한 암세포주는 대장암세포인 HT-29(human colon adenocarcinoma), 간암세포인 HepG2(human hepatocellular carcinoma), 유방암세포인 MCF-7(human breast adenocarcinoma pleural effusion)과 피부암세포인 B16-F10(mouse melanoma)로서 2004년 5월 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, KCLB)에서 구입하여 배양시킨 후 실험에 사용하였다.

HT-29 세포주는 RPMI1640 medium, HepG2, MCF-7과 B16-F10 세포주는 DMEM medium을 사용하였고 medium은 10%의 fetal bovine serum(FBS)과 1% 100 units/mL의 penicillin streptomycin이 함유된 것으로 세포를 T-75 flask에 이식한 후, 37°C 5% CO_2 incubator에서 monolayer로 배양하였다.

암세포 증식억제 효과측정(cytotoxicity)

참가사리 추출 분획물의 암세포 증식억제 효과는 MTT

(3-[4,5-dimethyl thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay를 사용하여 행하였다.

MTT assay(10,11)는 세포의 생육을 측정하는 방법으로 황색수용물질인 MTT가 미토콘드리아내의 탈수소효소 작용에 의하여 dark blue formazan을 생성하는 원리를 이용한다. 이를 위해 각 세포주를 1×10^5 cells/well의 농도로 맞추고 24 well에 각각 1 mL씩 첨가하여 24시간 동안 37°C, 5% CO_2 incubator에서 배양한 후 용매종류별 분획물을 각각 일정량의 dimethyl-sulfoxide(DMSO)에 녹여서 30, 60, 90, 120, 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 첨가하였다. 일정시간동안 배양한 후 각 well에 PBS 완충용액에 녹인 MTT 용액을 100 μL 씩 첨가하여 4시간동안 다시 배양시킨 후, well 바닥에 형성된 formazan이 흡수되지 않게 상등액을 제거하고 DMSO와 ethanol을 1:1로 혼합한 용액 1 mL를 첨가하여 천천히 녹인 후 multi-detection microplate를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군 세포수를 100%로 하였을 때의 상대적인 세포성장 억제율을 구하였다.

위상차현미경을 이용한 세포형태의 관찰

각각의 암세포주를 세포배양용 petridish에 24시간동안 안정화시킨 다음 참가사리 분획물을 30, 60, 90, 120, 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 씩 농도별로 처리하여 48시간동안 배양한 후 현미경을 이용하여 200배의 배율로 각 농도에 따른 암세포의 형태변화를 관찰한 다음 Olympus DP70을 이용하여 촬영하였다.

Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석

정상 및 GTMM이 처리된 배지에서 자란 세포들을 PBS로 씻어내고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 원심분리하여 세포를 수집하였다. 이렇게 모아진 세포에 적당량의 PRO-PREP(protein extraction solution, iNtRON)를 첨가하여 반응시킨 후 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 그 상층액을 취하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)과 그 사용방법에 따라 정량한 다음 Laemmli sample buffer(Bio-Rad)를 섞어서 20 mL의 sample을 만들었다. 이렇게 만든 단백질을 sodium dodecylsulphate(SDS) poly-acrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하였다.

분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane(Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 10% skim milk를 함유한 PBS-T(0.1% Tween 20 in PBS)에 담구어 상온에서 2시간 정도 incubation 하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 PBS-T로 30분(10분간 3회)정도 세척하였다. 준비된 membrane에 1차 antibody를 처리하여 상온에서 1시간 이상 또는 4°C에서 overnight 시킨 다음 PBS-T로 세척(10분간 3회)하고 처리된 1차 antibody에 맞는 2차 antibody(PBS-T로 1:1500 희석)를 사용하여 1시간정도 반응시켰다. 다시 PBS-T로 세척(10분간 3회)하고 Enhanced

Chemiluminescence(ECL) 용액(Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 암실에서 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 양을 분석하였다.

Quinone reductase(QR) 유도 활성 측정

본 실험에서는 Prochaska와 Santamaria의 방법(12)을 일부 변형하여 측정하였다. T-75 flask에 HepG2 세포가 80% 이상 증식하게 되면 24 well plate의 각 well에 1×10^4 cells/mL가 되도록 세포를 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간동안 배양한 후 참가사리 분획물을 HepG2의 세포 생존율이 50%되는 양을 final 농도로 잡아 각각 DMSO에 녹여 15, 30, 45, 60 µg/mL의 농도로 첨가하고 다시 24시간 배양하였다. 배양액을 제거한 후 각 well에 250 µL의 lysis buffer(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 14 mM NaCl, 15 mM MgCl₂, 0.5% NP-40)를 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에 10분간 두면서 cell을 lysis한 후 reaction mixture 즉, 10 mM Tris-HCl(pH 7.4), 0.5 mg/mL BSA, 0.008% tween-20, 40 µM FAD, 0.8 mM glucose-6-phosphate, 2 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase, 25 µM NADP, 40 µg/mL MTT 및 1 mM menadione을 혼합하여 well에 1 mL씩 첨가하여 5분동안 반응시킨 후, 반응정지 용액인 0.3 mM dicumarol, 0.5% pyridine, 5 mM potassium phosphate(pH 7.4) 혼합액을 250 µL씩 첨가하여 효소반응을 정지시키고 multi-detection microplate를 이용하여 610 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

단백질량은 동일한 set의 well plate에 대한 crystal violet 염색방법으로 정량하였다. 24 well plate에 crystal violet 용액을 첨가하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후 증류수로 세척하였다. 각 well에 0.5% SDS(in 50% EtOH) 용액을 1 mL씩 가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 1시간 방치한 후 610 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

암세포 증식억제효과(cytotoxicity)

본 실험에서는 4종의 암세포주에 대한 참가사리 분획물의 암세포 증식억제효과를 조사하기 위해 MTT assay를 행하였다. 실험에는 대장암세포주인 HT29, 간암세포주인 HepG2, 유방암세포주인 MCF-7 및 피부암세포주인 B16-F10이 사용되었으며, 실험결과는 Fig. 1~4에 나타내었다.

Fig. 1은 대장암 세포주인 HT29에 각 층별 시료 분획물을 30, 60, 90, 120 및 150 µg/mL씩 농도별로 가하여 48시간동안 처리했을 때의 암세포 증식억제효과를 나타낸 그림으로 GTMM층과 GTMB층에서 농도의존적으로 높은 암세포 증식억제효과를 보였다. 즉 GTMM층의 경우 낮은 농도인 30 µg/mL 첨가에서부터 농도의존적으로 그 억제효과가 증가하여 90, 120 및 150 µg/mL의 농도에서 각각 70.91, 86.46

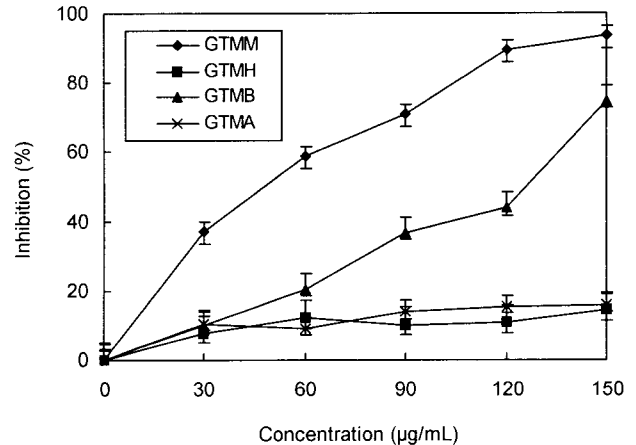


Fig. 1. Inhibitory effects on cell survival of various fractions from *Gloiopeltis tenax* on HT29 cells.

GTMM: Methanol fraction of methanol extracts of *Gloiopeltis tenax* (GTM).

GTMH: Hexane fraction of GTM.

GTMB: Butanol fraction of GTM.

GTMA: Aqueous fraction of GTM.

및 93.64%의 높은 암세포 증식억제효과를 나타내었고, GTMB층의 경우 최종농도인 150 µg/mL에서 74.71%의 효과를 보였다. Fig. 2는 간암세포주인 HepG2에 대한 결과이며 GTMM층을 120 µg/mL 첨가했을 때 이미 91.66%, 150 µg/mL 첨가했을 때 95.97%의 매우 높은 암세포 증식억제효과를 나타내었으며 GTMB층 또한 최종농도인 150 µg/mL에서 81.78%의 높은 억제수치를 보였으며 이 효과는 HT29 세포주와 비슷하였다.

유방암세포주인 MCF-7에 대한 실험결과는 Fig. 3에 나타내었으며 HT29 세포주와 유사하게 GTMM층과 GTMB층에서 높은 증식억제를 보였다. GTMM층은 120 µg/mL 농도에서 88.50%의 수치를 나타냈으며 최종첨가농도인 150 µg/mL에서는 91.82%의 높은 암세포 증식억제효과를 나타내었다. GTMB층도 농도증가에 따라 암세포 증식억제효과

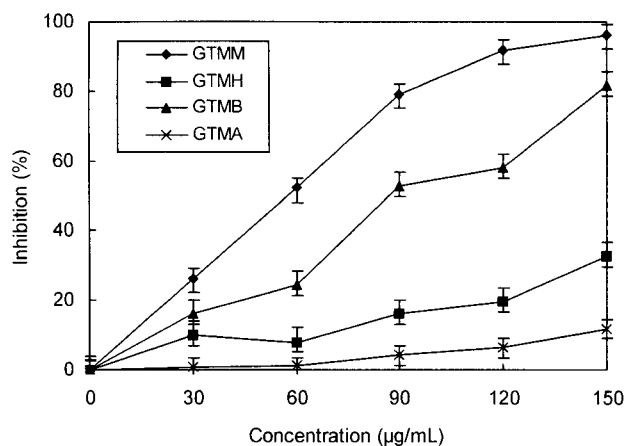


Fig. 2. Inhibitory effects on cell survival of various fractions from *Gloiopeltis tenax* on HepG2 cells.

Abbreviations are the same as in Fig. 1.

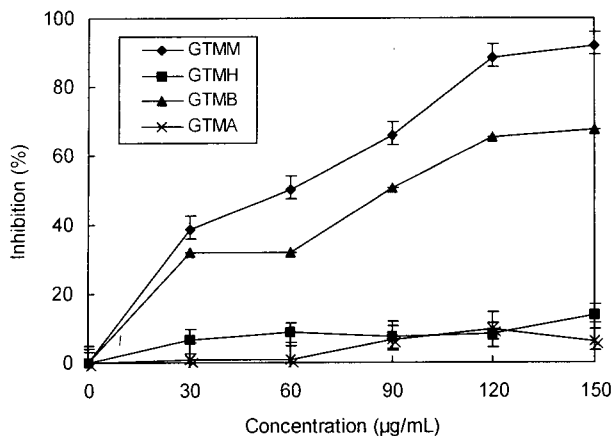


Fig. 3. Inhibitory effects on cell survival of various fractions from *Gloiopeltis tenax* on MCF-7 cells. Abbreviations are the same as in Fig. 1.

가 증가하였으며 150 µg/mL 첨가 시 67.52%의 억제효과를 보였다. Fig. 4는 피부암세포주인 B16-F10에 대한 결과를 나타낸 것으로 GTMM층에서 다른 세포주에 비해서 저 농도 첨가 시에는 전반적으로 그 효과는 낮으나 첨가농도 150 µg/mL일 때 86.20%의 억제를 나타내었다. GTMB의 경우는 MCF-7의 경우와 비슷하였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 용매별로 분획한 참가사리 분획물이 각 암세포주에 미치는 세포증식 억제효과는 methanol분획층인 GTMM층과 butanol분획층인 GTMB층에서 그 효과가 높았으며 전반적으로 GTMM층이 GTMB층에 비해 암세포증식 억제효과가 더 높게 나타났으며 농도의존적 경향은 거의 유사하였다. 특히 해양식물 중 홍조류인 참가사리의 양은 적체, 썩부쟁이 등 다른 육상생물(13,14)에 첨가한 시료량의 약 1/3에 해당되는 낮은 농도에서 높은 암세포 성장억제효과를 보였으며 또한 최종첨가농도 500 µg/mL인 모자반, 미역귀 등 다른 해조류(15,16)의 실험결과와 비교해보았을 때도 그 효과는 월등히 높았다. 그리고 암세포 성장저

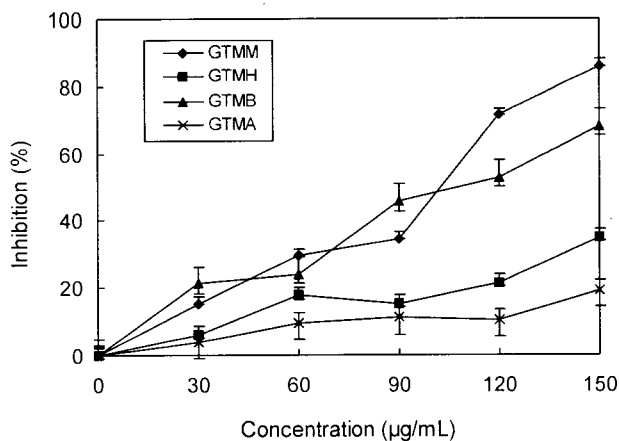


Fig. 4. Inhibitory effects on cell survival of various fractions from *Gloiopeltis tenax* on B16-F10 cells. Abbreviations are the same as in Fig. 1.

지를 일으키는 참가사리의 생리활성 물질은 약한 극성물질이 녹아있는 GTMM층과 일부 극성물질이 녹아있는 GTMB층에 주로 존재한다고 추측해 볼 수 있었으며 이 층에서의 구조적 분석과 암세포 성장을 저지시키는 물질의 존재가 주목되는 바이다.

GTMM층의 처리에 따른 암세포의 형태학적 변화

Apoptosis의 형태학적인 특징은 세포크기의 축소나 세포막으로부터 세포막용기가 돌출하는 현상 또는 여러 형태의 세포내용물이 세포막으로 쌓여져 세포로부터 떨어져 나온 apoptotic body를 형성하고, chromatin condensation이나 nuclear fragmentation 또는 DNA fragmentation 등의 현상이 일어난다(17,18).

참가사리의 암세포증식억제에서 가장 높은 효과를 보인 methanol분획층(GTMM)의 처리가 암세포의 형태에 어떠한 영향을 주는지에 대해 알아보기 위하여 HepG2 세포주에 여러 농도의 GTMM층을 48시간동안 처리한 후 위상차 현미경을 이용한 형태학적인 관찰을 시도하였다. Fig. 5에 나타난 결과는 HepG2 세포주에 농도별 시료를 첨가한 후 나타난 현상이다. 즉 시료 처리농도에 의존적으로 현저한 세포밀도의 감소현상과 형태적인 변화가 나타났으며, 시료농도의 증가에 따라 세포막의 shrinking 및 blebbing현상을 관찰할 수 있었다. 처리농도가 높은 경우 cell elongation을 포함하는 dendrite-like structure가 나타나며 암세포들의 부착력 상실과 파괴된 세포 잔여물들이 뚜렷이 관찰되었다. 이와 같은 경향은 Lee 등(19)이 도라지 추출물의 처리에서 관찰한 결과와 유사하며 이러한 형태적인 변화는 apoptosis가 일어날 때 나타나는 전형적인 현상으로 여러 시료 분획물 중 실험에 사용한 GTMM층이 HepG2 세포의 apoptosis를 유발하였음을 보여준다. 이 형태학적 변화로 보아 각 세포가 apoptosis로 가는 도중 일어나는 형태학적 변형은 시료인 GTMM층의 처리에 따른 암세포성장억제와 매우 밀접한 관련이 있음을 보여준다고 하겠다.

GTMM층의 처리에 따른 protein의 발현변화

GTMM층의 처리가 apoptosis의 유발에 어떠한 기전을 통해 관련이 있는지를 알아보기 위하여 세포사멸에 관여하는 Bcl-2 family의 발현 여부에 미치는 GTMM층의 영향을 알아보았다. Apoptosis 유발에 대표적인 Bcl-2 family 유전자 중 pro-apoptotic 분자인 Bad, Bax 등은 mitochondria로부터 cytochrome C와 같은 apoptosis 유발에 관여하는 인자를 조절하며 이들은 또한 종양억제 유전자 p53, caspase 및 DNA 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성을 조절하게 되고 이 dimer들의 발현수준 변화는 apoptosis 유발에 관여한다고 알려져 있다(20-22). Fig. 6에 나타난 바와 같이 apoptosis를 유도하는 단백질들의 발현변화를 살펴보면 GTMM층의 처리농도에 의존적으로 Bad, Bax, Bok 및 Bak 단백질들의 발현수준이 증가하는 것을 볼 수 있다. Caspase

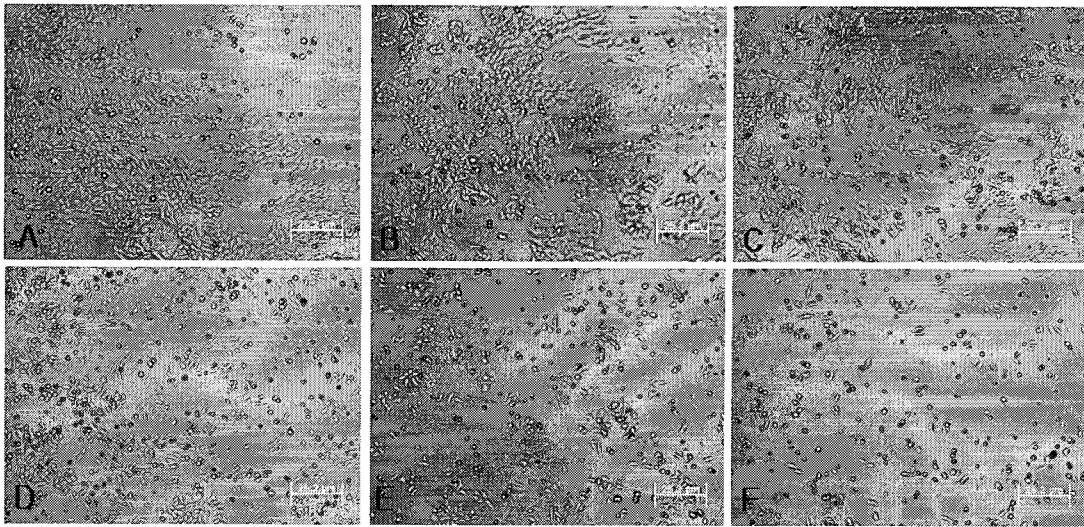


Fig. 5. Morphological changes of HepG2 human hepatocellular carcinoma cells following incubation with GTMM. Cells were treated with GTMM for indicated concentrations for 48 h and were photographed by microscope. (A) Control, (B) GTMM 30 µg/mL, (C) GTMM 60 µg/mL, (D) GTMM 90 µg/mL, (E) GTMM 120 µg/mL, (F) GTMM 150 µg/mL.

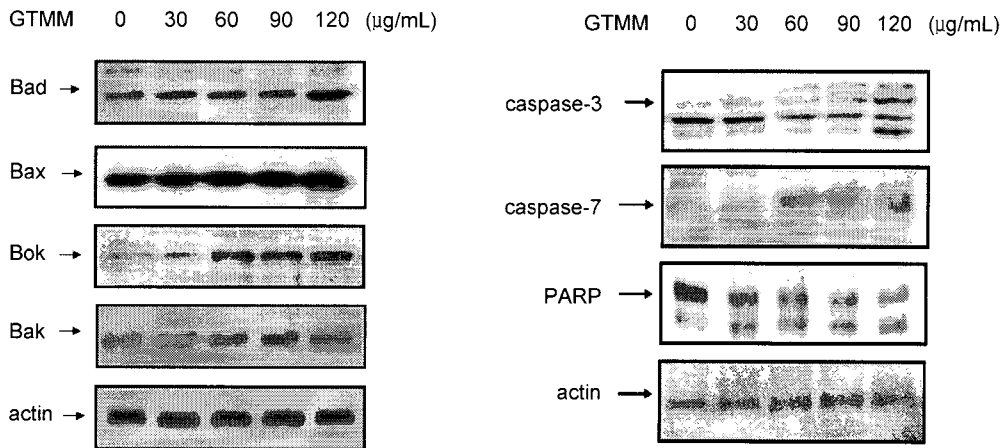


Fig. 6. Effect of GTMM on the levels of protein expression in HepG2 cells. Cells were incubated with GTMM for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

는 apoptosis 유도 활성화 신호에 의해 활성화된 cystein-related proteases로서 직접 또는 간접적으로 세포내에 존재하는 PARP 등과 같은 많은 표적단백질의 분해에 관여하게 된다(23). Apoptosis가 유발된 세포에서 높은 발현을 보이는 것으로 알려진 caspase-3과 caspase-7의 발현여부를 직접 조사한 결과 GTMM층의 처리에 의해 매우 유의적으로 발현되었음을 알 수 있다. PARP(poly(ADP-ribose)polymerase)는 정상세포의 DNA repair나 genomic stability의 유지에 중요한 역할을 하며, apoptosis 과정 중 caspase의 활성화에 의해 단백질 분해가 일어나면 PARP의 역할은 상실되어 정상적인 repair 기능이 상실된다(24). 즉, apoptosis가 일어나는 동안 116 KDa의 PARP가 caspase에 의해 85 KDa으로 분해되어 활성을 나타낸다(25). 분절된 PARP는 핵 내에서

apoptosis를 진행하게 되는데, 활성화된 85KDa PARP의 분절을 Western blot 분석을 통해 확인함으로써 apoptosis 여부를 확인할 수 있다. 이 결과를 통해 GTMM에 의한 암세포주의 사멸은 apoptosis와 관련이 있을 것으로 생각된다.

Quinone reductase 유도활성

Quinone reductase(QR)는 phase II 효소계의 지표효소로서 다양한 종류의 항암물질에 의해 그 활성이 유도되어 암 예방을 선도하는 특성을 가지고 있어서 암 예방물질의 탐색에 많이 사용되어 왔다. QR유도물질 탐색은 인체 암세포 배양법으로 행해졌으며, 참가사리 분획물의 암 예방효소 유도여부를 조사하기 위하여 암세포 증식억제효과에 사용된 4종의 암세포주 중 유일하게 quinone reductase를 가지고 있는 간암세포 HepG2를 사용하여 QR유도활성 효과를 측정

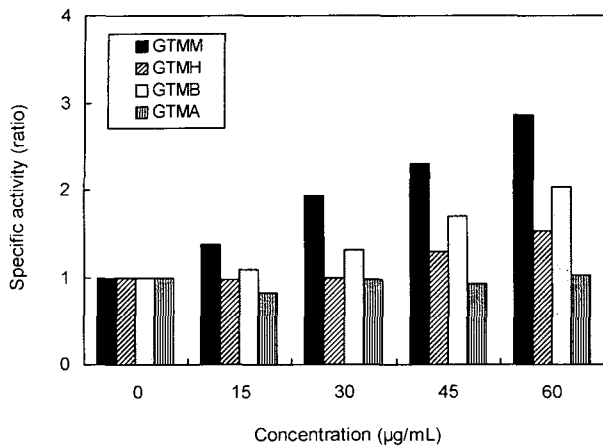


Fig. 7. Effect of the fractions from *Gloiopeltis tenax* on the induction of quinone reductase on HepG2 cells.

Abbreviations are the same as in Fig. 1.

하였으며, 그 결과는 Fig. 7에 나타내었다. 즉, HepG2 세포주에 각각의 시료 분획물을 첨가했을 때 GTMM층에서 높은 QR유도활성이 나타났고 그 다음으로는 GTMB층에서 유의적으로 QR유도활성이 나타났으며, 그 외의 분획층은 큰 영향을 미치지 않았다. GTMM층의 경우 대조군을 1.0으로 하여 비교한 결과 15, 30, 45 및 60 µg/mL의 시료첨가 농도에서 각각 1.38, 1.94, 2.34 및 2.86배로 농도의존적인 QR유도활성효과를 나타내었으며 GTMB층의 경우에서도 각각 1.09, 1.31, 1.7 및 2.04배로 서실 120 µg/mL, 홍경천 200 µg/mL 등(26,27) 다른 천연 분획물 첨가시보다 낮은 농도에서 QR유도효소활성을 나타내었다.

이상의 결과에서 암 예방효과의 척도로 사용되는 QR유도활성 효과는 참가사리의 여러 용매 분획물 중 methanol층과 butanol층에서 높은 활성을 보였으므로 이 분획층에 quinone reductase의 inducer가 존재함을 추정할 수 있었다.

요 약

본 연구에서는 해조류 중 홍조류에 속하는 참가사리를 추출, 분획하여 항발암효과를 측정하였다. 참가사리 분획물을 4종의 암세포주 HT29, HepG2, MCF-7 및 B16-F10에 처리하였을 때 암세포 증식억제실험을 한 결과 대장암세포주인 HT29의 경우 GTMM층과 GTMB층에서 농도의존적인 효과가 나타났으며 첨가농도 150 µg/mL에서 각각 93.64%와 74.14%의 수치를 보였다. 간암세포주인 HepG2의 경우 150 µg/mL 첨가 시 GTMM층과 GTMB층이 각각 95.97%, 81.78%의 높은 증식억제효과를 보였으며 유방암세포주인 MCF-7에서는 GTMM층이 120 µg/mL과 150 µg/mL 첨가농도에서 각각 88.50%와 91.82%의 높은 암세포증식 억제효과를 나타냈다. 피부암세포주인 B16-F10은 다른 세포주에 비해 미약하나 역시 GTMM층이 최종첨가농도에서 86.20%의 억제 효과를 나타내었다. 이와 같이 4종의 암세포주의 증식억제는

전반적으로 GTMM층과 GTMB층에서 높은 효과가 나타남을 알 수 있다. 한편 Western blot analysis를 통해 간암세포주인 HepG2에서 GTMM층의 처리에 따른 pro-apoptosis Bcl-2 family의 발현증가를 볼 수 있었으며, PARP 분절과 연관된 caspase-3, 7의 활성화를 확인할 수 있었다. 이처럼 GTMM층은 apoptosis의 작용에 의한 세포사멸을 유도하며, 이러한 apoptosis의 기전으로는 최소한 caspase의 활성화에 따른 절단 PARP 단백질의 증가, Bad, Bax 등의 apoptosis 관련인자가 작용하고 있음을 확인할 수 있었다. HepG2를 이용한 quinone reductase 유도활성여부를 측정 한 결과 GTMM층이 45 µg/mL 및 60 µg/mL의 시료첨가농도에서 대조군에 비해 각각 2.34, 2.86배의 QR유도활성을 나타내었으며, GTMB층의 경우 최종첨가농도인 60 µg/mL에서 2.04배의 효소활성을 나타내었다.

감사의 글

본 실험에 사용된 참가사리는 전남 무안군에 위치한 (주)삼일물산에서 제공된 것으로 (주)삼일물산 사장님께 감사드립니다.

문 헌

- Wynder EL, Gori GB. 1997. Contribution of environment to cancer medicine. *J Natl Cancer Inst* 58: 826-832.
- Reddy L, Odhav B, Bhoola KD. 2003. Natural products for cancer prevention a global perspective. *Pharmacol Ther* 99: 1-13.
- Hartwell LH, Weinert TA. 1989. Checkpoint: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246: 629-634.
- Banner SE, Pastorino U, Lippman SM, Hong WK. 1994. Second international cancer chemoprevention conference. *Cancer Res* 54: 854-860.
- Chiarugi V, Magnelli L, Cinelli BG. 1994. Apoptosis and the cell cycle. *Cell Mol Biol Res* 40: 603-612.
- Antonsson B, Martinou JC. 2000. The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* 256: 50-57.
- Reed JC. 1998. The Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17: 3225-3236.
- Ha YL, Michael WP. 1981. Naturally-occurring novel anticarcinogens: Conjugated dienoic derivatives of linoleic acid (CLA). *J Korean Soc Food Nutr* 20: 401-407.
- Chihara G, Hamuro J, Maeda Y, Arai Y, Fukuoka F. 1970. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Cancer Res* 30: 2776-2781.
- Alley MC, Scuiro DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Boyd MR. 1988. Feasibility of drug screening with panel of human tumor cell line using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* 48: 589-601.
- Carmichael J, Degraff WG, Gazder AF, Minna JD, Mitchell JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47: 936-942.
- Prochaska HJ, Santamaria AB. 1988. Direct measurement of NAD(P)H: Quinone reductase from cells cultured in mic-

- rotiter wells: A screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Anal Biochem* 169: 328-336.
13. Park YJ, Jeon KH, Kim SH, Bae SJ. 2004. The effect on antimicrobial and cytotoxicity of *Brassica oleracea* L. fractions. *J Life Sci* 14: 567-572.
 14. Jung BM, Lim SS, Park YJ, Bae SJ. 2005. Inhibitory effects on cell survival and quinone reductase induced activity of *Aster yomena* fractions on several human cancer cell lines in vitro. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 8-12.
 15. Bae SJ. 2004. Studies on the antioxidative and antimicrobial effects of *Chondria crassicaulis*. *J Life Sci* 14: 411-416.
 16. Bae SJ. 2004. Anticarcinogenic effects of *Sargassum fulvellum* fractions on several human cancer cell lines in vitro. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 480-486.
 17. Rocha AB, Lopes RM, Schwartzmann G. 2001. Natural products in anticancer therapy. *Curr Opin Pharmacol* 1: 364-369.
 18. Tounekti O, Pron G, Belehradek J, Mir LM. 1993. An apoptosismimetic drug that induces two types of cell death depending on the number of molecules internalized. *Cancer Res* 53: 5462-5469.
 19. Lee JH, Lee E, Park J, Kim J. 2003. In vivo p53 function is DNA damage-induced apoptotic signaling in *Drosophila*. *FEBS Letters* 550: 5-10.
 20. Chiarugi V, Magnelli L, Cinelli BG. 1994. Apoptosis and the cell cycle. *Cell Mol Biol Res* 40: 603-612.
 21. Antonsson B, Martinou JC. 2000. The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* 256: 50-57.
 22. Reed JC. 1998. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17: 3225-3236.
 23. Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. 1993. Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose)polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 53: 3976-3985.
 24. Steinhusen U, Badock V, Bauer A, Behrens J, Wittman-Liebold B, Dorken B, Bommert K. 2000. Apoptosis-induced cleavage of β -catenin by caspase-3 result in proteolytic fragments with reduced transactivation potential. *J Biol Chem* 275: 16345-16353.
 25. Han EK, Arber N, Yamamoto H, Lim JT, Delohery T, Pamukcu R, Piazza GA, Xing WQ, Weinstein IB. 1998. Effects of sulindac sulfide and its metabolites on growth and apoptosis in human mammary epithelial and breast carcinoma cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 48: 195-203.
 26. Jeon KH, Shin MO, Bae SJ. 2005. A study on the effects of anticarcinogenic activity of *Chondria crassicaulis*. *Korean J Nutr* 38: 503-511.
 27. Bae SJ. 2005. Anticarcinogenic and antioxidant effects of *Rhodiola sachalinensis*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 1302-1307.

(2006년 2월 23일 접수; 2006년 4월 6일 채택)