

## 서실 분획물의 암예방효과

전광혜 · 신미옥 · 배송자<sup>§</sup>

신라대학교 식품영양학과, 마린-바이오 산업지원센터

### A Study on the Effects of Anticarcinogenic Activity of *Chondria Crassicaulis*

Jeon, Kwang-Hye · Shin, Mi-Ok · Bae, Song-Ja<sup>§</sup>

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

#### ABSTRACT

In this study, we investigated the biological activity of *Chondria crassicaulis* (CC) on the human cancer cells. CC was extracted with methanol and further fractionated into four different types: hexane (CCMH), methanol (CCMM), butanol (CCMB), and aqueous (CCMA) partition layers. We determined the cytotoxic effect of these layers on human cancer cells by MTT assay. Among various partition layers of CC, the CCMM and CCMB showed the strong cytotoxic effects at 150  $\mu$ g/ml which resulted 98.91%, 92.96% on HeLa cell lines and 95.47%, 77.05% on MCF-7 cell lines. And, the anti-proliferative effect of CC was accompanied by a marked inhibition of cyclooxygenase (COX-2), Caspase-3 and IAP (cIAP-1, cIAP-2 and XIAP) protein and concomitant induction of p53, p21 and Survivin protein. However, CC did not affect the level of Bax, Bcl-2 and Bcl-XL protein. Also, we observed quinone reductase (QR) induced effects in all fraction layers of CC on HepG2 cells. The QR induced effects of the CCMH and CCMM on HepG2 cells at 120  $\mu$ g/mL concentration indicated 3.73 and 2.45 with the control value of 1.0. Although further studies are needed, the present work suggests that CC may be a chemopreventive agent for the treatment of human cancer cells. (*Korean J Nutrition* 38(7): 503~511, 2005)

**KEY WORDS** : cytotoxicity, quinone reductase, *Chondria crassicaulis* (CC).

## 서 론

암에 의한 사망률이 계속 증가되어 전 세계적으로 관심의 대상이 되고 있는 이즈음 치료 상의 급진적 진보에도 불구하고 전체 사망률은 저하될 기미를 보이지 않고 있다. 이와 더불어 항암치료 등의 화학 치료에 의한 여러 가지 부작용 등이 심각한 문제로 대두되고 있어 이에 따른 천연물 대체 요법 등이 많이 연구되고 있으며 천연물 유래의 새로운 암예방 물질의 개발로 그 예방과 치료의 방향이 전환 되어가고 있는 실정이다.<sup>1)</sup> 천연물이나 천연물 유래의 중간화합물은 주로 공격적인 암세포들의 증식을 막거나 약화시켜 예방하는 데 사용되고 있으며, 이들 물질의 동정과 활성 여부의 판단 및 그 대체요법의 성공 등은 천연물을

이용한 생물학적 기초를 형성하는데 크게 기여하고 있는 실정이다.<sup>2)</sup> 암의 발병원인은 주로 부적절한 식이와 유전자적 소질 및 주위환경의 열악 등이 원인이 되고 있다. 일반적으로는 전 세계적으로 거의 모든 암의 약 35%가 부적절한 식이 그 원인이 되며, 특히 대장암 발병자의 80% 이상은 식이가 주원인 이라고 알려져 있다.<sup>3)</sup>

식이에 의한 암예방 효과는 가장 바람직한 일이며 이와 같은 항발암인자를 사전에 차단함이 궁극적 목적이 된다. 또한 최근에는 항발암 효과에 대한 천연물에서의 검색은 육상 생물에서뿐 아니라 해양 생물에서 활발히 연구되고 있으며<sup>4)</sup> 특히, 해조류는 다양한 생리활성 물질들을 가지고 있음이 보고 되고 있다. 일반적으로 해조류에는 carotenoids가 풍부하고<sup>5)</sup> 높은 항산화 효과를 나타내는 mycosporine-glycine이 많이 들어있으며,<sup>6)</sup> 항발암 물질, 항산화 물질을 함유하고 있다. 류 등<sup>7)</sup>은 미역과 다시마의 단백 다당체의 항발암 효과를 보았고, 박 등<sup>8)</sup>은 해조류 추출물을 이용하여 식품 유래의 항돌연변이원성 소재를 찾는 연구 결과 갈조류인 감태, 곰피, 다시마 및 미야베 모자반이 그 효과가 우수

접수일 : 2005년 5월 25일

채택일 : 2005년 9월 9일

<sup>§</sup>To whom correspondence should be addressed.

E-mail : sjbae@silla.ac.kr

하다고 하였고, 더 나아가 곰피 추출물에서 발암 억제 물질이 phenol과 chlorophyll 및 carotenoid 화합물, 즉 lutein,  $\alpha$ -cryptoxanthin 및  $\beta$ -carotene이라는 것을 밝혔다.<sup>9)</sup>

QR (quinone reductase)은 간세포에서 주로 생성되는 phase II enzyme의 한 종류로 quinone을 환원시켜 무독하게 만들고 세포내에 유도되어 여러 돌연변이 물질에 의해 일어나는 돌연변이와 종양화를 막아주고 발암물질을 무독하게 하는 역할을 한다.<sup>10,11)</sup> 이러한 QR 유도 활성을 통한 암예방 효과를 검색한 연구로써 Steinkellner 등<sup>12)</sup>은 십자화과 식물에서 QR 유도 활성을 보았고, 손 (Shon) 등<sup>13)</sup>은 *Phellinus linteus*, *Phellinus ignarius* 및 *grocybe cylindracea*의 추출물에서 QR 활성을 보았으며, Gerhäuser 등<sup>14)</sup>은 잘 알려진 암예방 물질들을 대상으로 하여 암예방 물질 검색을 위한 실험 방법으로 QR을 사용하여 연구하였다. 또한 Bae 등<sup>15,16)</sup>은 당근잎, 감자껍질 등의 폐기되는 농산 부산물을 이용해 높은 QR 유도 활성 효과를 확인하였다. 본 연구에 사용된 서실 (*Chondria crassicaulis* Harvey: CC)은 해조류 비단풀목 빨간검둥이 (Rhodomelaceae)과의 해양 식물로 개서실이라고 부르기도 한다. 서식장소는 조간대 바위 또는 다른 해조류 (지충이, 툯 등에 착생) 위에서 자라며 일본, 우리나라와 제주의 모든 연안에서 바위나 조류가 있는 곳에 분포하고 있다. 형태는 한 개의 뿌리에서 나온 것처럼 여러 개체가 모여서 자라고, 줄기는 약간 납작한 원통형이고, 가지를 많이 내며, 7~10 cm의 높이로 자란다. 가지는 곧봉모양이고 색은 녹색, 자홍색, 또는 황색이며 질은 다육 연골질이고 건조하면 대지에 고착하며 식용으로 애용하고 있다.<sup>17)</sup> 서실에 대한 연구로는 Edmonds 등<sup>18)</sup>이 비소 화합물의 정량을 위해 쓰이는 1-deoxy-1-dimethylarsinoylribitol-5-sulfate를 추출한 연구 결과가 있고, 박 등<sup>19)</sup>의 등우리 서실 (*Chondria nidifica*)에서의 항산화 효과에 대한 연구 등도 보고 되고 있다.

본 연구는 식용으로 애용되는 해조류 중 홍조류에 속하는 서실의 항발암 효과를 규명하기 위하여 인체암세포를 이용한 MTT assay를 행하여 서실의 암세포 성장 저지효과를 알아보았고, 암예방효소계인 quinone reductase 유도활성효과를 측정하여 암예방 효과를 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

#### 1) 재 료

본 실험에 사용된 서실 (*Chondria crassicaulis*, CC)은

2004년 1월 기장 재래시장에서 구입하였다. 이 시료를 추출하고 용매별로 분획하여 4종의 인체암 세포주에 대한 암세포 증식억제 효과 (cytotoxicity) 및 quinone reductase 유도활성 효과 (QR induced effect) 검색에 사용하였다.

### 2) 시 약

세포실험에 사용된 시약 중 NP-40과 menadione은 Sigma사 제품을 구입하였고 flavin adenine dinucleotide (FAD), dicumarol 및 glucose-6-phosphate dehydrogenase는 Amresco사 제품을 구입하였으며, minimum essential medium (MEM), Dulbecco's Eagle modified medium (DMEM)과 phosphate buffered saline (PBS) 등은 Gibco-BRL (USA)에서 구입하였으며, 그외 연구에 사용된 용매 및 시약은 특급 또는 일급을 사용하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) 시료의 추출 및 분획물 제조

시료로 사용된 서실 (*Chondria crassicaulis*, CC)은 건조 후 분쇄하여 시료와 메탄올을 1 : 5 (W/V)로 첨가한 후 상온에서 2회 추출하고, 극성과 비극성 다시 선별 물질을 추출하기 위하여 에탄올과 다이클로로메탄 ( $CH_2Cl_2$ )을 1 : 1로 섞은 용액에 2회 추출한 후 회전식 진공농축기로 감압 농축시켜 동결건조한 후 서실메탄올 추출물 (CCM)을 얻고, 이 추출물을 각 용매별로 분획하여 비극성층인 hexane층 (CCMH), 극성층인 methanol층 (CCMM), 약한 극성층인 buthanol층 (CCMB), 강한 극성층인 aqueous층 (CCMA)으로 계통 분획하고 각 분획층을 감압 농축 후 동결 건조하여 분말로 만들어 시료로 사용하였다 (Table 1).

#### 2) 암세포 배양

본 실험에 사용한 암세포주는 인체 간암 세포인 HepG2 (human hepatocellular carcinoma), 자궁경부암 세포인 HeLa (human cervix adenocarcinoma), 유방암 세포인 MCF-7 (human breast adenocarcinoma pleural effusion) 및 대장암 세포인 HT-29 (human colon adenocarcinoma)로서 2003년 12월 부산대학 병원 생화학실험

Table 1. Yields (%) of various solvent fractions of *Chondria crassicaulis*

Fraction	Yields (g)	Yields (%)
Extract	23.97 g	23.97
Hexane fr.	0.48	2.00
Methanol fr.	0.63	2.63
n-Butanol fr.	2.14	8.93
Aqueous fr.	15.51	64.71

실로부터 분양받아 사용하였으며, 정상세포는 liver normal cell을 배양하여 사용하였다. HepG2, HeLa와 MCF-7세포주는 DMEM medium, HT-29세포주는 RPMI1640 medium에 10%의 fetal bovine serum (FBS)와 1% 100 units/mL의 penicillin streptomycin이 함유된 것으로 T-75 flask에 이식한 후, 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 monolayer로 배양하였다.

**3) 암세포 증식 억제 효과 (Cytotoxicity) 측정**

서실 추출 분획물의 암세포 증식 억제 효과는 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT assay)<sup>20,21)</sup>를 사용하여 행하였다.

이를 위해 각 세포주를 1×10<sup>5</sup> cells/well의 농도로 맞추고 24 well에 각각 1 ml씩 첨가하여 24시간동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 배양한 후 용매종류별 분획물을 각각 일정량의 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여서 30, 60, 90, 120 및 150 µg/mL의 농도로 첨가하였다. 일정 시간동안 배양한 후 각 well에 PBS 완충액에 녹인 MTT 용액을 100 µl씩 첨가하여 4시간동안 다시 배양시킨 후, well 바닥에 형성된 formazan이 흩어지지 않게 상등액을 제거하고 DMSO와 ethanol을 1 : 1로 혼합한 용액 1 ml를 첨가하여 천천히 녹인 후 Multi-detection microplate를 이용하여 570 nm, 690 nm에서 측정하였다. 대조군 세포수를 100%로 정하고 상대적인 세포성장 억제율을 구하였다.

**4) RNA역전사 증합효소 연쇄반응법 (reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR))**

(1) RNA 추출

HeLa 세포주에 CCMM을 농도별로 48시간 처리한 후 세포를 모아 Homogenization, RNA washing, RNA calculation 단계를 거쳐 RNA를 추출하였다. 분리한 total RNA 2 µg, Oligo dT primer 2 µl 정도에 DEPC + water로 final volume이 10 µl 되게 준비한 후 65°C에서 10분간 반응시킨 후, 실온에서 2~3분간 incubation한다. Soln. I에 10 mM dNTP 5 µl, RNase 1 µl, AMV 역전사효소 (RTase) 1 µl, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 5 µl, 10 × buffer 5 µl 및 DEPC-water를 이용하여 총 volume이 50 µl 되게 만들고, 42°C 1시간 incubation 후 -20°C에 보관하여 실험하였다.

(2) RT-PCR 실시 및 전기영동

Denaturation temp.: 95°C 5분, 1회 → denaturation temp./annealing temp./elongation temp.: 94°C 30초/58°C

**Table 2.** Sequences of primers used for RT-PCR

Gene		Primer Sequence
GAPDH	Sense	CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT
	Anti-sense	AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC
Bax	Sense	ATG GAC GGG TCC GGG GAG
	Anti-sense	TCA GCC CAT CTT CTT CCA
Bcl-2	Sense	CAG CTG CAC CTG ACG
	Anti-sense	ATG CAC CTA CCC AGC
Bcl-X <sub>L</sub>	Sense	CGG GCA TTC AGT GAC CTG AC
	Anti-sense	TCA GGA ACC AGC GGT TGA AG
XIAP	Sense	GAA GAC CCT TGG GAA CAA CA
	Anti-sense	CGC CTT AGC TGC TCT CTT CAG T
cIAP-1	Sense	TGA GCA TGC AGA CAC ATG C
	Anti-sense	TGA CGG ATG AAC TCC TGT CC
cIAP-2	Sense	CAG AAT TGG CAA GAG CTG G
	Anti-sense	CAC TTG CAA GCT GCT CAG G
p21	Sense	CTC AGA GGA GGC GCC ATG
	Anti-sense	GGG CGG ATT AGG GCT TCC
p53	Sense	GCT CTG ACT GTA CCA CCA TCC
	Anti-sense	CTC TCG GAA CAT CTC GAA GCG
COX2	Sense	TTC AAA TGA GAT TGT GGG AAA AT
	Anti-sense	AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT

30초/72°C 30초, 30회 → final elongation temp.: 72°C 5분, 1회 → 22°C에서 hold 및 storing temp.: 4°C

전기영동은 EtBr를 첨가하여 0.8~1% 범위의 agarose gel을 사용하였고 sample은 DNA loading buffer에 혼합하여 marker와 함께 loading 하였다 (Table 2).

**5) Quinone reductase (QR) 유도 활성 측정**

Quinone reductase는 phase II 무독화 효소 중의 하나로 돌연변이 또는 발암물질 등에 의한 DNA와의 상호 작용을 차단하는 효소이며, NAD(P)H를 이용하여 quinone류의 환원을 촉매하는 flavoprotein이다.

QR생성 유도 효과는 Prochaska와 Santamaria<sup>22,23)</sup>의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. T-75 flask의 세포가 80%이상 증식하게 되면 24 well plate의 각 well에 1×10<sup>4</sup> cells/mL되도록 HepG2세포주를 분주하여, incubator에 24시간동안 배양한 후 서실 분획물을 HepG2의 세포 생존율이 50%되는 양을 final 농도로 잡아 각각 DMSO에 녹여 30, 60, 90, 120 및 150 µg/mL의 농도로 첨가하고 다시 24시간동안 배양한 다음 배양액을 제거하였다. 배지가 제거된 각 well에 250 µl의 lysis buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 14 mM NaCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5%NP-40)를 첨가한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 10분간 두면서 cell을 lysis한 후 reaction mixture 즉, 10 mM Tris-Cl

(pH 7.4), 0.5 mg/mL BSA, 0.008% tween-20, 40  $\mu$ M FAD, 0.8 mM glucose-6-phosphate, 2 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase, 25  $\mu$ M NADP, 40  $\mu$ g/mL MTT 및 1 mM menadione을 혼합하여 well에 1 mL씩 첨가하여 5분 동안 반응시킨 후, 반응 정지용액인 10.3 mM dicumarol, 0.5% pyridine, 5mM potassium phosphate (pH 7.4) 혼합액을 250  $\mu$ l씩 첨가하여 효소반응을 정지시키고 Multi-detection microplate를 이용하여 610 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다. 그리고 단백질량은 동일한 set의 well plate에 대한 crystal violet 염색방법으로 정량하였다.

6) 통계처리

본 실험에 대한 실험결과는 4번 실험하여 평균치 및 표준편차를 나타내었다.

결과 및 고찰

1. 서실 추출물의 각 용매별 분획물 수율

식용으로 애용되고 있는 해조류인 서실 (CC)을 메탄올로 2회, 다이클로로메탄과 에탄올을 1 : 1로 섞은 용매에 2회 추출하여 분획물 (CCM) 23.97%을 얻고, 이 추출물을 분획하여 hexane (CCMH) 2%, methanol (CCMM) 2.63%, butanol (CCMB) 8.93% 및 수층 (CCMA) 64.71%를 수득하였으며, 특히 수층의 수득율이 약 65%로 가장 많은 양을 얻었다 (Table 1).

2. 암세포 증식억제 효과 (Cytotoxicity)

본 실험에서는 암세포 4종과 정상 간세포를 이용하여 각 시료를 첨가시켰을 때의 MTT assay를 이용하여 암세포 증식억제 효과를 보았으며, 사용한 암세포는 자궁경부암세포인 HeLa, 유방암세포인 MCF-7, 결장암 세포인 HT29 및 간암세포주인 HepG2를 사용하였고, 정상 간세포를 사용하여 암세포증식억제 효과를 비교 검토하였다.

Fig. 1은 HeLa 세포주에 각층별 시료 분획물을 30, 60, 90, 120 및 150  $\mu$ g/mL씩 농도별로 가하여 48시간 동안 처리했을 때의 암세포 증식 억제 효과를 나타낸 그림이며 CCMB층과 CCMM층에서 농도 의존적으로 높은 암세포 증식 억제 효과를 보였다. 즉 CCMB층의 경우 낮은 농도인 30  $\mu$ g/mL 첨가에서부터 농도 비례적으로 그 억제효과가 증가하여 90, 120 및 150  $\mu$ g/mL의 농도에서 각각 94.61, 98.38 및 98.91%의 높은 암세포 증식억제 효과를 나타내었고, CCMM의 경우도 유사한 경향을 나타내었으며 최종농도인 150  $\mu$ g/mL에서는 92.96%의 높은 억제 효과를

나타내었다. MCF-7에 대한 실험 결과는 Fig. 2에 나타내었으며 서실의 용매 분획별 MCF-7 세포주에 대한 효과는 HeLa 세포주와는 달리 CCMM층에서 CCMB층 보다 높

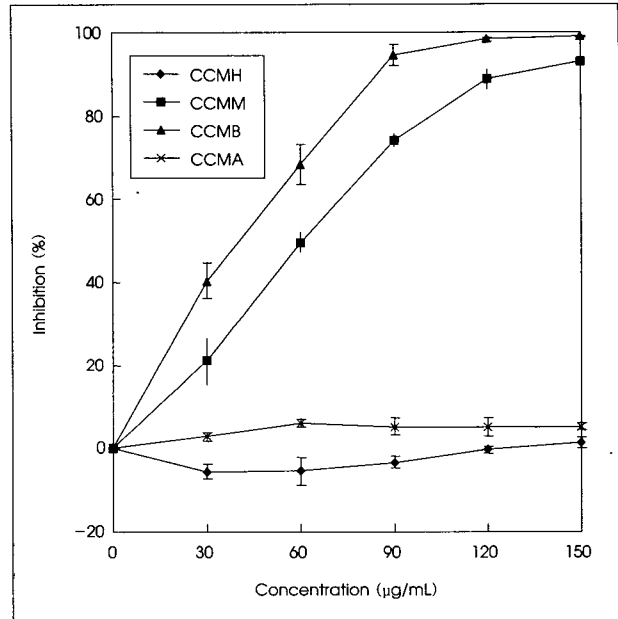


Fig. 1. Inhibitory effect on cell survival of various partition layers of *Chondria crassicaulis* on HeLa cells. Values are means  $\pm$  SD of three-independent experiments. CCMH: Hexane partition layer of methanol extracts *Chondria crassicaulis* (CCM), CCMM: Methanol partition layer of CCM, CCMB: Butanol partition layer of CCM, CCMA: Aqueous layer of CCM.

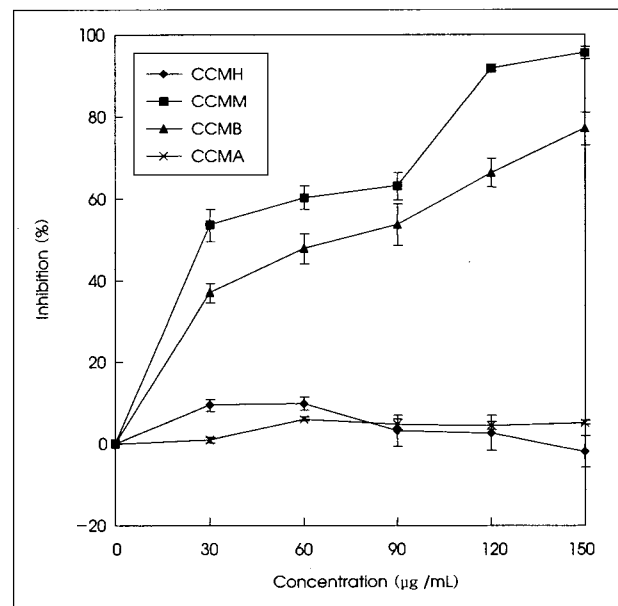
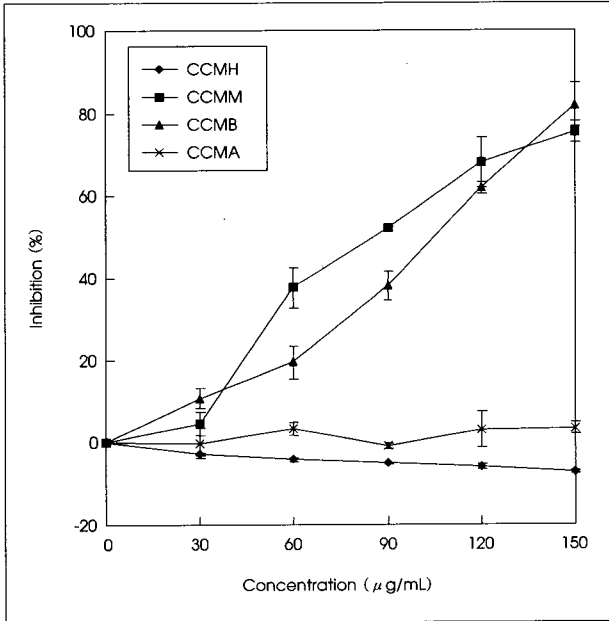


Fig. 2. Inhibitory effect on cell survival of various partition layers of *Chondria crassicaulis* on MCF-7 cells. Values are means  $\pm$  SD of three-independent experiments. CCMH: Hexane partition layer of methanol extracts *Chondria crassicaulis* (CCM), CCMM: Methanol partition layer of CCM, CCMB: Butanol partition layer of CCM, CCMA: Aqueous layer of CCM.

계 나타났다. CCMM층은 120  $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 91.81%의 높은 암세포 증식 억제효과를 나타내었고 최고농도 150  $\mu\text{g/mL}$ 에서는 95.47%를 나타내었다. CCMB층도 농도 증가에

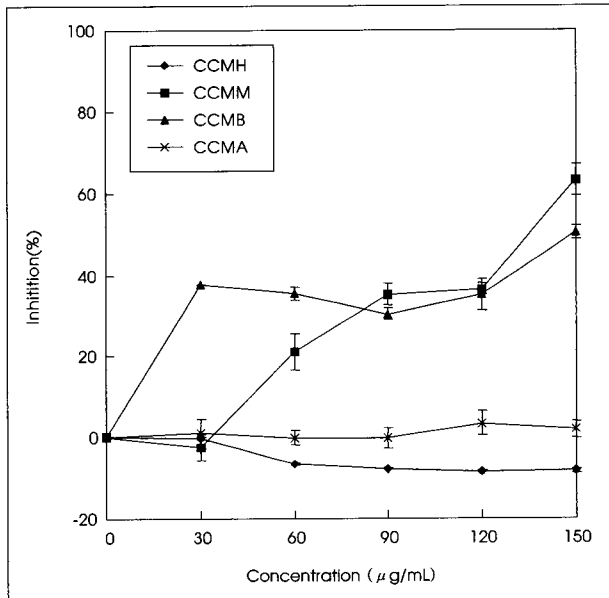


**Fig. 3.** Inhibitory effect on cell survival of various partition layers of *Chondria crassicaulis* on HT29 cells. Values are means  $\pm$  SD of three-independent experiments. CCMH: Hexane partition layer of methanol extracts *Chondria crassicaulis* (CCM), CCMM: Methanol partition layer of CCM, CCMB: Butanol partition layer of CCM, CCMA: Aqueous layer of CCM

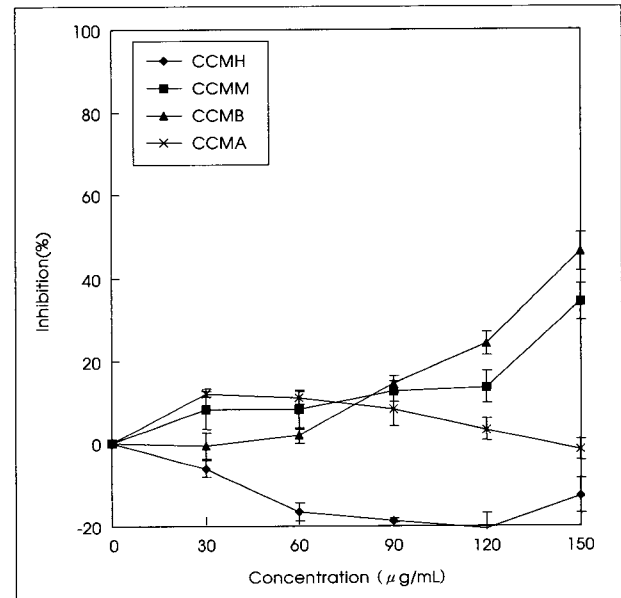
따라 암세포 증식 억제효과가 증가하였으며 150  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 77.05%의 억제 효과가 나타났다. Fig. 3은 HT29에 대한 결과로 이 세포주에서는 각 분획별 시료를 60~120  $\mu\text{g/mL}$  첨가 시 Fig. 3의 MCF-7 세포주의 결과와 같이 저농도 첨가시에는 CCMM층의 효과가 제일 좋았고 그 다음으로 CCMB층이 좋았으나 분획물의 첨가농도가 150  $\mu\text{g/mL}$ 에서는 CCMB와 CCMM이 각각 81.94%, 75.45%로 거의 비슷한 효과를 보였다. Fig. 4는 HepG2 세포주의 결과이며 다른 세포주에 비해서 전반적으로 그 효과는 낮았으나 시료 첨가 최종농도인 150  $\mu\text{g/mL}$ 에서 CCMM층은 63.2%, CCMB층은 50.35%의 암세포 성장 억제 효과를 보였다.

Fig. 5에서는 건강한 정상 간세포에 서실의 각 분획물을 첨가하여 세포사멸 효과를 살펴보았다. 그 결과, 정상세포에서는 암세포주에 비해 서실 분획물 120  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 모든 층이 30%이하의 매우 낮은 세포사멸 효과를 보였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 용매별로 분획한 4가지의 서실 분획물이 각 암세포주에 미치는 증식 억제 효과는 다른 분획층에 비해 서실의 methanol 분획층인 CCMM층과 butanol 층인 CCMB층의 효과가 월등히 높았으며 Hela의 경우 CCMB 층이, MCF-7의 경우 CCMM 층의 암세포 증식억제효과는 조금 더 높게 나타났으나 그 경향은 거의 유사하였다. 이와 같은 여러 실험 결과로 미루어 볼 때 서실

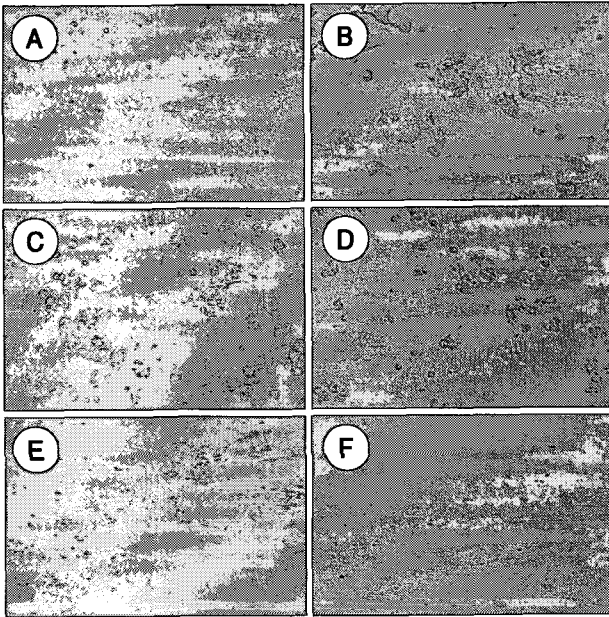


**Fig. 4.** Inhibitory effect on cell survival of various partition layers of *Chondria crassicaulis* on HepG2 cells. Values are means  $\pm$  SD of three-independent experiments. CCMH: Hexane partition layer of methanol extracts *Chondria crassicaulis* (CCM), CCMM: Methanol partition layer of CCM, CCMB: Butanol partition layer of CCM, CCMA: Aqueous layer of CCM.



**Fig. 5.** Inhibitory effect on cell survival of various partition layers of *Chondria crassicaulis* on liver normal cells. Values are means  $\pm$  SD of three-independent experiments. CCMH: Hexane partition layer of methanol extracts *Chondria crassicaulis* (CCM), CCMM: Methanol partition layer of CCM, CCMB: Butanol partition layer of CCM, CCMA: Aqueous layer of CCM.

의 암세포 성장 저지를 일으키는 생리활성 물질은 서실의 약한 극성 물질이 녹아있는 methanol층과 극성 물질이 녹아 있는 butanol층에 주로 존재한다고 추측해 볼 수 있었다. 그리고 세포의 종류에 따라 암세포증식억제효과를 비교해 볼 때 자궁경부암세포인 HeLa, 유방암세포인 MCF-7 및 대장암세포인 HT29에서의 높은 암세포 증식억제효과에 비해 간암세포인 HepG2의 경우 큰 차이가 나지 않는 점을 감안할 때, 간암에 대해서는 상대적으로 그 예방 효과가 다소 미약함을 유추할 수 있었다.



**Fig. 6.** Photomicrographs ( $\times 200$ ) of MCF-7 cells on methanol partition layers of *Chondria crassicaulis*. A : Control. B : CCMM 30  $\mu\text{g/mL}$ . C : CCMM 60  $\mu\text{g/mL}$ . D : CCMM 90  $\mu\text{g/mL}$ . E : CCMM 120  $\mu\text{g/mL}$ . F : CCMM 150  $\mu\text{g/mL}$ .

### 3. 세포의 형태학적 관찰

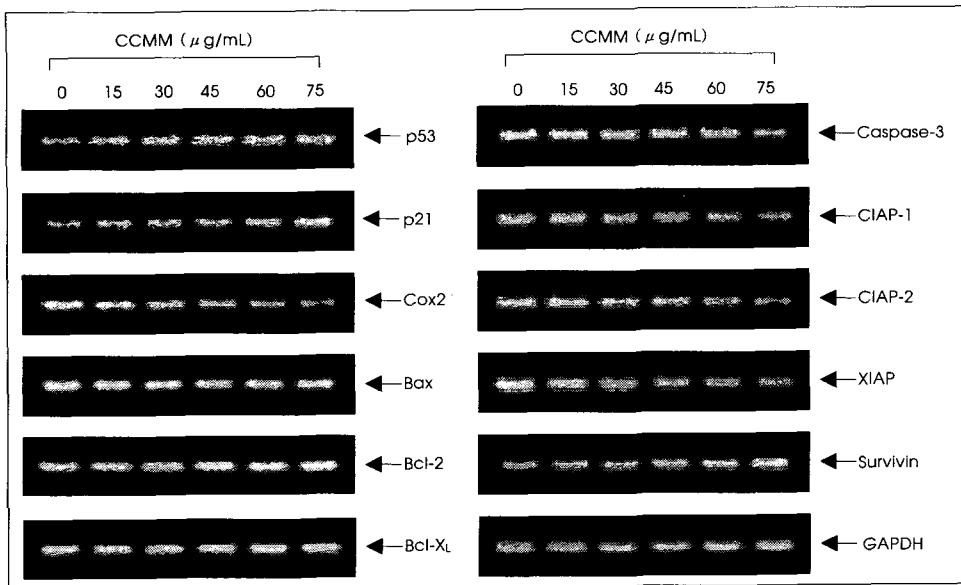
Fig. 6은 MCF-7 세포주에 서실의 CCMM층을 일정량 첨가했을 때, 세포주의 형태가 어떻게 변화하는지 알아보기 위하여 여러 농도별 시료를 가하여 48시간동안 처리 후 위상차 현미경을 이용하여 암세포주의 괴사 형태를 관찰한 결과이다. 이 사진에서 관찰할 수 있듯이 서실의 methanol 분획물의 농도증가에 따라 세포막과 세포질의 손상과 세포의 부착력이 상실됨을 알 수 있었고, 파괴된 세포 잔여물과 더불어 뚜렷한 암세포의 형태적 변화를 관찰 할 수 있었다. MCF-7 세포주에서와 같이 HeLa와 HT29 세포주에서도 유사한 경향을 보였다 (Data not shown).

### 4. 세포증식 억제효과 기전연구

암세포의 성장 억제 효과가 암세포의 apoptosis 유발과 연관성이 있을 것으로 기대되어 암세포증식 억제 효과가 좋았던 CCMM층을 우리나라 여성암 중 제일 많이 발생되고 있는 자궁경부암 세포주인 HeLa에 처리하여 세포증식 억제 효과의 기전을 관찰한 결과는 Fig. 7과 같다. 서실분획물의 CCMM층을 15, 30, 45, 60 그리고 75  $\mu\text{g/mL}$ 씩 농도를 증가시켜 첨가하여 RT-PCR을 이용하여 apoptosis와 연관성을 가지는 대표적인 유전자 산물들의 발현 변화 여부를 조사하였다.

Fig. 7에 나타난 것과 같이 CCMM 처리 농도가 증가함에 따라 종양억제유전자인 p53의 mRNA 발현이 증가되는 것을 관찰할 수 있었고, p21의 mRNA 발현도 증가되었다. 이는 p53의 증가로 p21의 생성유도가 높아져 세포분열과정을 조절한 것으로 사료되어 진다.<sup>24)</sup>

Cyclooxygenase (COX-2)의 mRNA 발현 변화 여부



**Fig. 7.** RT-PCR analysis demonstrating mRNA expression in HeLa cells after a 48h treatment by CCMM at various concentration. Cell were incubated with CCMM for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using specific primers described in Materials and Methods. GAPDH was used as a house-keeping control gene.

도 조사하였는데, CCMM의 저농도 처리군 에서부터 발현의 감소가 관찰되었으며 농도가 증가할수록 발현이 더욱 감소되었다. p53이 TBP와 COX-2의 결합을 방해함으로써 COX-2의 발현을 억제했다는 subbaramaiah 등<sup>25)</sup>의 보고와 같이 본 연구에서도 p53의 mRNA 발현의 증가와 함께 COX-2의 mRNA 발현이 감소하는 것으로 보아 p53의 발현 증가로 인해 COX-2의 발현이 억제된 것으로 사료되어 진다.<sup>26)</sup>

또한 정상세포보다 암세포에서 발현이 증가하며, 반대로 apoptosis가 진행되는 동안에는 발현이 감소되는 것으로 알려져 있는 Bcl-2 mRNA 발현 변화는 관찰되지 않았다.<sup>27)</sup> Bcl-2 단백질계에는 Bcl-XL 및 Bax 등이 포함되며, 이들의 작용은 서로 다르게 나타난다. 즉, Bcl-2 및 Bcl-XL는 cytochrome C의 방출을 억제하여 apoptosis를 억제시키는 반면, Bax는 cytochrome C의 방출을 촉진시켜 apoptosis를 유도한다. 따라서 이들에 대한 관찰은 서로의 비율이 중요하며,<sup>28)</sup> 이 등<sup>29)</sup>의 연구에서도 녹차 추출물에 의한 apoptosis 유도가 관찰되었던 것 같이 본 연구에서도 Bcl-2 단백질 함량의 변화와는 무관하게 세포 증식이 억제되었음을 알 수 있었다.

한편, 세포사멸 과정의 중요한 요소인 단백용해체계 (proteolytic system)를 이루는 caspase (cysteine aspartate proteases)는 세포사멸의 여러 단계에서 매우 중요한 역할을 한다. Caspase는 잠재적인 전구물질인 procaspase로 합성되어, 단백용해 과정에 의해서 활성 단백용해효소로 전환되며, Caspase-3는 caspase-8과 caspase-9의 초기 신호를 증폭시키며 세포사멸에 가장 직접적으로 관련된 단백용해효소이다. Caspase-3는 세포사멸의 초기 단계에 작용하며 32 kDa 효소전구체 (proenzyme)의 분리에 의해 유도된 17 및 12 kDa 이종이합체 (heterodimer)가 활성화된 형태이다.<sup>30)</sup> HeLa 세포주에 CCMM층을 농도별로 처리하였을 때, caspase-3 mRNA 발현이 감소하는 경향을 보였다.

그리고, CCMM층을 농도별로 처리하였을 때, cIAP-1, cIAP-2 및 XIAP 등의 IAP (inhibitor of apoptosis)의 mRNA 발현이 모두 감소되는 것을 관찰하였다. 그러므로 CCMM층은 세포의 증식을 유도하는 IAPs의 발현을 저해하여 세포의 증식을 억제하는 것으로 사료된다.

그러나, IAPs들 중에서 방추사의 조립을 완성시킴으로써 세포분열을 돕는 것으로 알려져 있고, Caspase-3 및 caspase-7을 억제하여 직접적으로 apoptosis 과정을 차단하는 것으로 알려져 있는 survivin의 mRNA 발현은 증가하는 것을 관찰 할 수 있었다. Survivin에 대한 연구로는 암

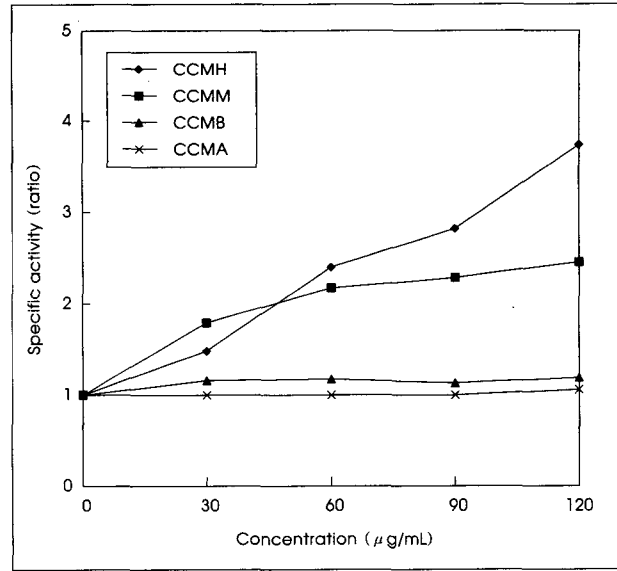


Fig. 8. Effect of the partition layers of *Chondria crassicaulis* on the induction of quinone reductase on HepG2 cells. Cells were cultured at a starting density of  $1 \times 10^4$  cells/ml in DMEM. The effects of CCM on the cytotoxicity determined by QR assay of cells treated with increasing concentration of the partition layer of CCM.

발생과 암전이, 그 예후와 관련이 있다는 보고와 없다는 보고가 서로 상반되어져 발표되고 있어 더 정확하고 많은 검증이 필요하고,<sup>31)</sup> 서실분획물의 CCMM에 의해 세포 증식 억제가 이루어지는 것과 관련된 survivin의 기전은 앞으로 더욱더 연구되어야 할 것으로 사료되어진다.

### 5. Quinone reductase 유도 활성 효과

암세포 증식 억제 효과에 사용한 4종의 암세포 중 유일하게 quinone reductase를 가지고 있는 간암세포인 HepG2 세포주를 사용하여 서실 추출물의 4가지 분획층을 이용한 QR유도활성을 측정된 결과는 Fig. 8과 같다. HepG2 암세포주에 대한 용매별 서실 분획물을 각각 30, 60, 90, 120 µg/mL씩 첨가했을 때 MTT방법으로 암세포 증식 억제 효과를 측정했을 때 그 효과가 낮았던 CCMH층에서 높은 QR유도활성이 나타났고 그 다음으로는 CCMM층에서 유의적으로 QR유도활성이 나타났다. 반면 암세포 성장억제 효과가 높았던 CCMB층은 CCMA층과 함께 그 효과가 아주 미약하였다. 이 결과는 심 등<sup>32)</sup>의 연구와 비슷한 경향으로 MTT 결과와 암 예방 QR유도효과의 상관관계는 유의성이 없는 것으로 판단된다. 즉 대조군을 1로 했을 경우 CCMH층과 CCMM은 그 효과가 농도 의존적으로 유의성 있게 증가하여 50 µg/mL에서 두 층 모두 QR 유도 활성이 2배가 되었으며, 최종농도인 120 µg/mL에서 대조군 1.0에 비해 CCMH층이 3.73배 및 CCMM층이 2.45배로 다른 천연 분

획물 첨가시의 약 1/3정도 낮은 농도에서 높은 효소활성을 나타내었다. 이상의 결과에서 서실의 여러 용매 분획물 중 CCMH층과 CCMM층에서 암예방 지표인 높은 QR유도활성을 보였으므로 이 분획층에서의 암예방 효소계 quinone reductase의 inducer가 존재함을 추정할 수 있었다. 또한 서실 (*Chondria crassicaulis*)과 등우리서실 (*Chondria nidifica*) 및 빨간 점둥이과의 항산화 효과<sup>33)</sup>에 대한 몇 연구 결과로 미루어 CCMH층과 CCMM층에서의 천연 항산화 물질들의 규명과 이의 quinone reductase inducer의 존재 여부에 관해서도 더욱더 자세한 연구동정이 이루어져야 한다고 생각 된다

## 요약 및 결론

홍조류의 하나인 서실을 추출, 분획하여 항암효과를 실험하였다.

서실을 추출, 분획하여 4종의 암세포주 (HeLa, MCF-7, HT-29, HepG2)를 이용하여 암세포 증식 억제 실험을 한 결과 HeLa 세포의 경우 CCMB층에서는 최고농도인 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 92.6%의 높은 암세포 증식 억제 효과를 나타내었고 CCMM층도 75.1%로 비교적 높은 암세포 증식 억제 효과가 나타났다. 유방암 세포주인 MCF-7 세포주에서는 CCMM층, CCMB층 순으로 각각 95.47%, 77.05%로 높은 효과가 나타났고, 대장암인 HT29에서도 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지는 CCMM층, CCMB층 순으로 각각 67.97%, 61.89%의 증식억제 효과가 나타났으나, 최종농도인 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 CCMB층은 81.94%로 CCMM층의 75.45% 보다 높은 효과를 나타내었다. 간암 세포인 HepG2에서는 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 CCMM층과 CCMB층이 각각 63.2%와 50.35%의 암세포 증식 억제 효과를 나타내어 다른 암세포주 보다 그 효과가 미약하였으며, 정상세포인 간세포에서는 모든 층에서 암세포 증식 억제효과가 매우 낮게 나타났다. 이상과 같이 4종의 암세포에 대한 증식 억제 효과 실험에서 전반적으로 CCMM층과 CCMB층이 월등히 강한 암세포 증식 억제효과를 보임을 알 수 있었다. 또한, RT-PCR을 통해 apoptosis와 연관성을 가지는 대표적인 유전자들의 발현 변화를 조사하여 서실의 암세포증식 억제효과에 대한 기전에 대해서도 관찰해 보았다. 서실의 CCMM층의 처리에 의하여 cyclooxygenase (COX-2), Caspase-3 및 IAP (cIAP-1, cIAP-2, XIAP) 단백질 발현이 저하되었으며 p53, p21 및 Survivin protein의 발현은 증가되었다. 그러나 Bax, Bcl-2 and Bcl-XL의 발현에는 영향을 주지 않았다. 이러한 결과로서 서실의 CCMM층 처리에 의한 세포

의 증식억제 및 형태적 변형이 apoptosis 유발과 어느 정도 관련이 있음을 알 수 있었다. 그리고, 인체 간암세포주인 HepG2를 이용하여 QR효소 유도 활성 여부를 측정한 결과 분획물 첨가농도 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 CCMH층과 CCMM층이 대조군에 비해 약 2배정도의 유의적 효과가 있었고 다른 천연시료 첨가농도의 1/3 정도 최종 농도인 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가에서 CCMH층과 CCMM층이 각각 3.73와 2.45배의 높은 암예방 QR 유도 활성효과를 나타내었다. 본 실험 결과를 종합 검토해 보면 CCMM층과 CCMB층에서 암세포 증식 억제 효과가 높게 나타났으며, QR 유도 활성 효과는 CCMH층과 CCMM층에서 나타나 분획층 별로 다른 성상을 가지는 생리활성 물질이 함유되어 있을 가능성이 높을 것으로 추정된다. 특히, CCMM층은 암세포 증식억제 효과 및 QR 유도 활성 효과가 아주 높게 나타났으며 앞으로 단계적인 물질의 분리 동정과 더불어 CCMM층을 이용한 생리활성 물질 개발이 기대되는 바이다. 그리고 암세포증식억제효과에 대한 항암기전을 규명하기 위해서는 더욱 더 많은 추가적인 연구가 이루어져야 하겠지만, 본 연구의 결과들에 의하여 서실이 인체암세포의 증식억제 및 항암작용이 있을 것을 시사하여 준다고 할 수 있다.

## Literature cited

- 1) Stavric B. Role of chemopreventers in human diet. *Clin Biochem* 27: 319, 1994
- 2) Reddy L, Odhav B, Bhoola K. Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacology & Therapeutics* 99: 1-13, 2003
- 3) Doll R, Peto R. The cause of cancer. Quantitative estimates of available risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 66: 1192-1308, 1981
- 4) Schwartzmann G, ha AB, Berlinck R, GS, Jimeno J. Marine organisms as a source of new anticancer agents. *Oncology* 2: 221-225, 2001
- 5) Krinsky NI. Effects of carotenoids in cellular and animal systems. *Am J Clin Nutr* 53: 38S-246S, 1991
- 6) Dunlap WC, Yamamoto Y. molecule antioxidants in marine organism: antioxidant activity of mycosporine-glycine. *Comp Biochem Physiol* 112B: 105-114, 1995
- 7) Ryu BH, Kim DS, Cho KJ, Sin DB. Antitumor activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Koran J Food Sci Technol* 21 (5): 595-600, 1989
- 8) Park YB, Kim IS, Yoo SJ, Ahn JK, Lee TG, Park DC, Kim SB. Elucidation of anti-tumor initiator and promoter derived from seaweed-2: investigation of seaweed extracts suppressing mutagenic activity of PhIP and MeIQx. *J Korean Fish Soc* 31(4): 581-586, 1998
- 9) Park YB, Kim IS, Yoo SJ, Ahn JK, Lee TG, Park DC, Kim SB. Elucidation of anti-tumor initiator and promoter derived from



- seaweed-3: anti-tumor promoters of *Ecklonia stolonifera* extracts. *J Korean Fish Soc* 31(4) : 587-593, 1998
- 10) Talalay P, Benson AM. Elvation of quinone reductase activity by anticarcinogenic antioxidants. *Advances in Enzyme Regulation* 20: 287-300, 1982
  - 11) Wefers H, Komai T, Talalay P, Sies H. Protection against reactive oxygen species by NAD(P)H: quinone reductase induced by the dietary antioxidant butylated hydroxyanisole (BHA). *Federation of European Biochemical Societies* 169(1) : 63-66, 1984
  - 12) Steinkellner H, Rabot S, Freywald C, Nobis E, Scharf G, Chabicosky M, Knasmüller S, Kassie F. Effects of cruciferous vegetable and their constituents on drug metabolizing enzymes involved in the bioactivation of DNA-reactive dietary carcinogens. *Mutation Research* 480-481: 285-297, 2001
  - 13) Shon YH, Nam K. Antimutagenicity and induction of anticarcinogenic phase II enzymes by basidiomycetes. *Journal of Ethnopharmacology* 77: 103-109, 2001
  - 14) Gerh?user C, Klimo K, Heiss E, Neumann I, Gamal-Eldeen A, Knauff J, Liu GY, Sithimonthai S, Frank N. Mechanism-based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents. *Mutation Research* 523-524: 163-172, 2003
  - 15) Shim SM, Kim MH, Bae SJ. Cytotoxicity and quinone reductase induced effects of *Daucus carota* L. leaf extracts on human cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30(1) : 86-91, 2001
  - 16) Bae SJ. The effects of anticarcinogenic activity of *Solanum tuberosum* peel fractions. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31(5) : 905-909, 2002
  - 17) Lee YP, Yoon SY. Taxonomy of Chondria (Rhodophyta) in Korea Algae. *Korean J Phycology* 11(1) : 107-139, 1996
  - 18) Edmonds JS, Shibata Y, Yang F, Morita M. Isolation and synthesis of 1-deoxy-1-dimethylarsinoylribitol-5-sulfate, a natural constituent of *Condria crassicaulis* and other red algae. *Tetrahedron Letters* 38(33) : 5819-5820, 1997
  - 19) Park JH, Kang KC, Baek SB, Lee YH, Rhee KS. Separation of antioxidant compounds from edible marine algae. *Koran J Food Sci Technol* 23(3) : 256-260, 1991.
  - 20) Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell line using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* 48: 589-601, 1988
  - 21) Carmichael J, De Graff WG, Gazder AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47: 936-942, 1987
  - 22) Prochaska HJ, Santamaria AB. Direct measurement of NAD(P)H: Quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: A screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Anal Biochem* 169: 328-336, 1988
  - 23) Prochaska HJ. Screening strategies for the detection of anticarcinogenic enzyme inducers. *J Nutr Biochem* 5: 360, 1994
  - 24) Lee JH, Lee E, Park J, Kim E, Kim J. In vivo p53 function is indispensable for DNA damage-induced apoptotic signaling in *Drosophila*. *FEBS Letters* 550: 5-10, 2003
  - 25) Subbaramaiah K, Altorki N, Chung WJ, Mestre JR, Sampat A, Dannenberg AJ. Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by p53. *J Biol Chem* 274: 10911-10915, 1999
  - 26) Min SH, Shon YH, Park CH, Lee WS, Joo YE, Choi SK, Rew JS, Park CS, Kim SJ. Expression of cyclooxygenase-2 and p53 in gastric cancer and precursor lesions. *Korean J Gastroenterology* 41(4) : 268-276, 2003
  - 27) Smali A, Zhivotovxvsky B, Jones D, Nagata S, Orrenius S. Apoptpsis: cell death defined by caspase activation. *Cell Death Differ* 6: 495-496, 1999
  - 28) Baliga BC, Kumar S. Role of Bcl-2 family of proteins in malignancy. *Hematol Oncol* 20(2) : 63-74, 2002
  - 29) Lee HM, Kim YJ, Park TS. Induction of Apoptois by (-)-epigallocatechin-3-gallate in HL-60 Cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36(4) : 382~388, 2003
  - 30) Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem* 269: 30761-30764, 1994
  - 31) Yu J, Leung WK, Ebert MP, et al. Increased expression of survivin in gastric cancer patients and in first degree relative. *Br J Cancer* 87: 91-97, 2002
  - 32) Shim SM, Choi SW, Bae SJ. Effets of *Punica granatum* L. Fraction on quinone reductase induction and growth inhibition on several cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30(1): 80-85, 2001
  - 33) Bae SJ. Studies on the antioxidative and antimicrobial effects of *Chondria crassicaulis*. *J Life Sci* 14(3) : 411-416, 2004