

博士學位論文

균소알로부터 항암 활성에
관한 연구



濟州大學校 大學院

海洋生物工學科

金源碩

2008年 02月

군소알로부터 항암 활성에 관한 연구

指導教授 全 裕 珍

金 源 碩

이 論文을 海洋生物工學 博士學位 論文으로 提出함

2008年 02月

金源碩의 海洋生物工學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長 허 문 수 (인)

委 員 김 소 미 (인)

委 員 김 기 영 (인)

委 員 김 세 권 (인)

委 員 전 유 진 (인)

濟州大學校 大學院

2008年 02月

The Study on
anticancer activity from
Sea hare (*Aplysia kurodai*) eggs

Won Suk Kim

(Supervised by Professor You-Jin Jeon)

A dissertation submitted in partial fulfillment of the
requirement for the degree of Doctor of Philosophy

Department of Marine Biotechnology

GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

2008. 02

목 차

List of Figures	iv
List of Tables	xi
Abstract	1
요 약	3
1. 서 론	5
2. 재료 및 방법	9
2.1. 재료	9
2.2. 균소알의 일반성분 분석	9
2.3. 균소알 물 추출물 (SHE) 제조	9
2.4. 암세포배양	9
2.5. In vitro 실험	11
2.5.1. 암세포 증식 억제 억제율과 IC ₅₀ 측정	11
2.5.2. 형광현미경을 이용한 cell의 형태적 관찰	11
2.5.3. 전기영동을 이용한 암세포의 DNA 단편화 측정	12
2.5.4. Alkaline comet assay를 이용한 암세포의 DNA 손상 측정	12
2.5.5. Flow cytometry analysis (FACS)를 이용한 세포 주기 측정	13
2.5.6. 세포로부터 세포질 단백질의 추출	14
2.5.7. Western blot assay에 의한 apoptosis 관련 단백질의 발현 측정	14
2.5.8. Caspase-3 활성의 측정	15
2.5.9. 통계분석	15
2.6. 동물실험	15
2.6.1. 실험동물	15
2.6.2. 실험물질 제조 및 유방암세포 투여	16
2.6.3. 투여 경로 및 투여 회수와 방법	16
2.6.4. 결과 측정	16
2.6.5. 통계분석	19

2.7. SHE로부터 활성 물질 분리	19
2.7.1. SHE 제조	19
2.7.2. 한외여과막을 이용한 SED 분자량별 분획물의 제조, 분자량 및 활성 확인	19
2.7.3. 겔 여과 크로마토그래피를 통한 30 kDa 이상 분획물로부터 활성 물질 분리	20
2.7.4. 이온 교환 크로마토그래피를 통한 30 KD 이상 분획물로부터 활성 물질 분리	20
2.7.5. SDS-PAGE 겔 전기영동을 통한 활성 분획물로부터 단백질 분자량 확인	20
3. 결과 및 고찰	22
3.1. 균소알 분말의 일반 성분 분석	22
3.2. SHE의 수율	22
3.3. 암세포 증식 억제율과 IC ₅₀ 측정	22
3.4. SHE가 미치는 암세포핵의 형태학적 변화 유도	32
3.5. SHE 처리에 의한 암세포의 DNA 단편화 유도	33
3.6. Alkaline comet assay를 통한 SHE에 의한 암세포의 DNA 손상 유도	37
3.7. 유세포 분석을 통한 SHE에 의한 암세포내의 DNA 함량 변화	41
3.8. Western blot assay를 통한 SHE의 apoptosis 관련 단백질 발현 변화	46
3.9. SHE가 처리된 U-937과 FM3A 세포세포에서 Caspase-3 활성 측정	55
3.10. <i>In vivo</i> 상에서 SHE의 FM3A 세포로 유도한 종양 크기 억제	55
3.11. SHE와 분자량별 분획물의 고형물 함량과 단백질 함량	58
3.12. SHE와 분획물들의 단백질 분자량 확인	62
3.13. SHE와 분획물의 암세포 증식 억제 활성 유도	62
3.14. 겔 여과 크로마토그래피에 의한 물질 분리	65
3.15. 이온 교환 크로마토그래피에 의한 물질 분리	68
3.16. 음이온 교환 크로마토그래를 통해 정제된 활성 분획물 내의 단백질 분자량에 따른 밴드 확인	68

4. 결론	72
5. 참고문헌	74
6. 감사의 글	82



LIST OF FIGURES

- Fig. 1. Scheme of the extract preparation from Sea hare eggs
- Fig. 2 Scheme of animal experiment. A; Prevention group (5 weeks), n=8, B; Prevention and therapy group (8 weeks), n=8.
- Fig. 3. Scheme of ultrafiltration system and application for chromatography.
- Fig. 4 Effect of cell growth inhibition on leukemic U-937 incubated with SHE prepared at different temperatures from 20°C to 60°C. The 5×10^4 cells were treated with the extracts and incubated for 24 h at 37°C. Then, MTT reagent treated into each well and absorbance of formed formazan in viable cells were measured at 540 nm. Experiments were performed in triplicates and data are expressed as average percent change from control \pm SD. a; $p < 0.05$, b; $p < 0.005$, c; $p < 0.0005$.
- Fig. 5 Effect of cell growth inhibition on leukemic HL-60 cells incubated with SHE prepared at different temperatures from 20°C to 60°C. The 5×10^4 cells were treated with the extracts and incubated for 24 h at 37°C. Then, MTT reagent treated into each well and absorbance of formed formazan in viable cells were measured at 540 nm. Experiments were performed in triplicates and data are expressed as average percent change from control \pm SD. b; $p < 0.005$, c; $p < 0.0005$.
- Fig. 6. Effect of cell growth inhibition on colon CT-26 cells incubated with SHE prepared at different temperatures from 20°C to 60°C. The 5×10^4 cells were treated with the extracts and incubated for 24 h at 37°C. Then, MTT reagent treated into each well and absorbance of formed formazan in viable cells were measured at 540 nm. Experiments were performed in triplicates and data are expressed as average percent change from control \pm SD. a; $p < 0.05$, b; $p < 0.005$, c; $p < 0.0005$.

Fig. 7. Effect of cell growth inhibition on cutaneous B-16 cells incubated with SHE prepared at different temperatures from 20°C to 60°C. The 5×10^4 cells were treated with the extracts and incubated for 24 h at 37°C. Then, MTT reagent treated into each well and absorbance of formed formazan in viable cells were measured at 540 nm. Experiments were performed in triplicates and data are expressed as average percent change from control \pm SD. b; $p < 0.005$, c; $p < 0.0005$.

Fig. 8. Effect of cell growth inhibition on breast cancer FM3A cells incubated with SHE prepared at different temperatures from 20°C to 60°C. The 5×10^4 cells were treated with the extracts and incubated for 72 h at 37°C. Then, MTT reagent treated into each well and absorbance of formed formazan in viable cells were measured at 540 nm. Experiments were performed in triplicates and data are expressed as average percent change from control \pm SD. a; $p < 0.05$, b; $p < 0.005$.

Fig. 9. Morphological changes of leukemic U-937 cells treated with different concentrations of SHE. The cells were treated with SHE and incubated for 48 h at 37°C. Then, the Hoechst 33342-stained nuclei were observed under a fluorescent microscopy using a blue filter. Magnification, $\times 400$. A; Control, B~D; the cells treated with 6.25, 12.5 and 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of SHE.

Fig. 10. Morphological changes of FM3A cells treated with different concentrations of SHE. The cells were treated with SHE and incubated for 48 h at 37°C. Then, the Hoechst 33342-stained nuclei were observed under a fluorescent microscopy using a blue filter. A; Control, B~F; the cells treated with 1, 5, 10, 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of SHE.

Fig. 11. Induction of DNA fragmentation on leukemic U-937 cells after treatment of SHE. The cells were treated with SHE at different concentrations from 6.25 to 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and incubated for 48 h at 37°C. The genomic DNA was extracted, and analyzed on 1.5% agarose gel. M indicates a size

marker of DNA ladder.

Fig. 12. Induction of DNA fragmentation on FM3A cells after treatment of SHE.

The cells were treated with SHE at different concentrations from 1 to 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and incubated for 48 h at 37°C. The genomic DNA was extracted, and analyzed on 1.5% agarose gel. M indicates a size marker of DNA ladder.

Fig. 13. Comet image of DNA damage on leukemic U-937 cells after treatment of SHE. The cells were treated with SHE at different concentrations from 6.25 to 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and incubated for 48 h at 37°C. The cells were lysed by lysis buffer and the DNA was electrophoresed in 0.7% LMPA at 25 V and 300 mA for 20 min. A; Control, B~E; DNA image of U-937 cells treated with 6.25, 12.5, 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of SHE.

Fig. 14. Effect of SHE on nucleolus DNA damage in leukemic U-937 cells. The cells were treated with SHE at different concentrations from 6.25 to 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and incubated for 48 h at 37°C. The tail in fluorescence of DNA in cells were measured by Komet 4.0 comet image analyzing system (Kinetic Imaging, UK).

Fig. 15. Comet image of DNA damage on FM3A cells after treatment of SHE. The cells were treated with SHE at different concentrations from 1 to 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and incubated for 48 h at 37°C. The cells were lysed by lysis buffer and the DNA was electrophoresed in 0.7% LMPA at 25 V and 300 mA for 20 min. A; Control, B~F; the cells treated with 1, 5, 10, 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of SHE.

Fig. 16. Effect of SHE on nucleolus DNA damage in FM3A cells. The cells were treated with SHE at different concentrations from 6.25 to 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and incubated for 48 h at 37°C. The tail in fluorescence of DNA in cells were measured by Komet 4.0 comet image analyzing system (Kinetic Imaging, UK).

Fig. 17. Effect of SHE on the cell cycle pattern and apoptotic portion in leukemic U-937 cells. The cells were treated with SHE at different

concentrations from 6.25 to 25 $\mu\text{g/ml}$ and incubated for 48 h at 37°C. The nuclear fractions of the cells were stained by propidium iodide (PI). Then, the fluorescence intensity was determined using a FACScan flow cytometer and analyzed as DNA histogram by CellQuest software. A; Control, B~D; the cells treated with 6.25, 12.5 and 25 $\mu\text{g/ml}$ of SHE.

Fig. 18. Bar graph of SHE on the cell cycle sub-G₁ and apoptotic portion in leukemic U-937 cells. The cells were treated with SHE at different concentrations from 6.25 to 25 $\mu\text{g/ml}$ and incubated for 48 h at 37°C. The nuclear fractions of the cells were stained by propidium iodide (PI). Then, the fluorescence intensity was determined using a FACScan flow cytometer and the relative cell counts (%) were analyzed by CellQuest software.

Fig. 19. Effect of SHE on the cell cycle pattern and apoptotic portion in FM3A cells. The cells were treated with SHE at different concentrations from 1 to 50 $\mu\text{g/ml}$ and incubated for 48 h at 37°C. The nuclear fractions of the cells were stained by propidium iodide (PI). Then, the fluorescence intensity was determined using a FACScan flow cytometer and analyzed as DNA histogram by CellQuest software. A; Control, B~F; the cells treated with 1, 5, 10, 25 and 50 $\mu\text{g/ml}$ of SHE.

Fig. 20. Bar graph of SHE on the cell cycle sub-G₁ and apoptotic portion FM3A cells. The cells were treated with SHE at different concentrations from 1 to 50 $\mu\text{g/ml}$ and incubated for 48 h at 37°C. The nuclear fractions of the cells were stained by propidium iodide (PI). Then, the fluorescence intensity was determined using a FACScan flow cytometer and the relative cell counts (%) were analyzed by CellQuest software.

Fig. 21. Effect of SHE on apoptosis-related protein expression level in leukemic U-937 cells. The cells were treated with SHE at different concentrations from 6.25 to 25 $\mu\text{g/ml}$ and incubated for 48 h at 37°C. Cytosolic lysates were immunoblotted with anti-Bax and Bcl-2 antibody.

Fig. 22. Effect of SHE on apoptosis-related protein expression level in FM3A

cells. The cells were treated with SHE at different concentrations from 1 to 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and incubated for 48 h at 37°C. Cytosolic lysates were immunoblotted with anti-Bax and Bcl-2 antibody.

Fig. 23. Effect of SHE on apoptosis-related protein expression level in leukemic U-937 cells. The cells were treated with SHE at different concentrations from 6.25 to 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and incubated for 48 h at 37°C. Cytosolic lysates were immunoblotted with anti-caspase-9, cleaved caspase-9, cleaved caspase-8, caspase-3 and cleaved PARP antibody.

Fig. 24. Effect of SHE on apoptosis-related protein expression level in FM3A cells. The cells were treated with SHE at different concentrations from 1 to 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and incubated for 48 h at 37°C. Cytosolic lysates were immunoblotted with anti-caspase-9, caspase-8, caspase-3, cleaved caspase-3 and cleaved PARP antibody.

Fig. 25. Effect of SHE on caspase-3 activity in U-937 cells. The cells were treated with SHE at different concentrations from 6.25 to 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and incubated for 48 h at 37°C. Cytosolic lysates (50 μg) were applied for caspase-3 assay kit. a; $p < 0.05$, b; $p < 0.005$, c; $p < 0.0005$.

Fig. 26. Effect of SHE on caspase-3 activity in FM3A cells. The cells were treated with SHE at different concentrations from 1 to 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and incubated for 48 h at 37°C. Cytosolic lysates (50 μg) were applied for caspase 3 assay kit. a; $p < 0.05$, b; $p < 0.005$, c; $p < 0.0005$.

Fig. 27. Image of tumor in breast cancer mouse model induced by FM3A cells. FM3A cells (1×10^6 cells/50 μl /mouse) were injected into the caudal vein of mouse tail and induced breast cancer mouse model. A; G8 group, B; G9 group treated SHE 30 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ for 5 weeks before induction of breast cancer in mouse, C; G10 group treated SHE 3 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ for 5 weeks before induction of breast cancer in mouse, D; G11 group treated SHE 30 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ for 5 weeks before and 3 weeks after induction of breast cancer in mouse, E; G12 group treated SHE 3 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ for 5 weeks before and 3 weeks after induction of breast cancer

in mouse.

Fig. 28. Inhibition effects of SHE on the growth of tumor volume in breast cancer mouse model induced by FM3A cells. FM3A cells (1×10^6 cells/ $50 \mu\text{l}$ /mouse) were injected into the caudal vein of mouse tail and induced breast cancer mouse model. Tumor volume were measured by caliper A; G8 group, B; G9 group treated SHE $30 \mu\text{l}$ /mouse for 5 weeks before induction of breast cancer in mouse, C; G10 group treated SHE $3 \mu\text{g}$ /mouse for 5 weeks before induction of breast cancer in mouse, D; G11 group treated SHE $30 \mu\text{g}$ /mouse for 5 weeks before and 3 weeks after induction of breast cancer in mouse, E; G12 group treated SHE $3 \mu\text{g}$ /mouse for 5 weeks before and 3 weeks after induction of breast cancer in mouse.

Fig. 29. The molecular weight (M.W) of SHE and fractions fractionated by ultrafiltration system. The fractions and SHE with or without 3-mercaptoethanol were boiled for 3 min at 100°C and loaded into each well of 15% SDS-PAGE gel for 1.5 h at 30 mA. Then, the gel were stained by Silver staining. I; Gel electrophoresed in the condition of protein denaturation, II; Gel electrophoresed in the condition of naturation, M; Maker, A; SHE, B; 1 kDa > fraction, C; 1-10 kDa fraction, D; 10-30 kDa fraction, E; 30 kDa < fraction.

Fig. 30. Effect of cell growth inhibition on leukemic U-937 incubated with SHE and four kinds of fractions obtained from SHE. The 5×10^4 cells were treated with SHE and fractions and incubated for 24 h at 37°C . Then, MTT reagent treated into each well and absorbance of formed formarzan in viable cells were measured at 540 nm. Experiments were performed in triplicates and data are expressed as average percent change from control \pm SD. a; $p < 0.05$, b; $p < 0.005$, c; $p < 0.0005$.

Fig. 31. The U-937 cell growth inhibition activities and protein contents of fractions obtained from 30 kDa < fraction by gel filtration chromatography. 30 kDa < fraction of SHE were centrifuged at 15,000

rpm for 15 min and obtained supernatant. The supernatant of 30 kDa < fraction were filtered and loaded into Sepharose G-100 resin-charged column. Then, the U-937 cell growth inhibition activities and protein contents of the fractions measured by MTT assay and BCA kit, respectively.

Fig. 32. The U-937 cell growth inhibition activities and protein contents of fractions obtained from anion exchange chromatography. The active fractions from gel filtration chromatography were applied into Sepharose Q resin-charged column for anion exchange chromatography. Then, the U-937 cell growth inhibition activities and protein contents of the fractions obtained from measured by MTT assay and BCA kit, respectively.

Fig. 33. The molecular weight (M.W) of mono Q-fraction purified from active 30 kDa < fractions obtained by gel filtration chromatography and anion exchange chromatography. The mono Q-fraction with 3-mercaptoethanol were boiled for 3 min at 100°C and loaded into each well of 12% SDS-PAGE gel for 1.5 h at 30 mA. Then, the gel were stained with commassie dye. M; Marker, A; 40 μ l of mono Q-fraction, B; 80 μ l of mono Q-fraction.

LIST OF TABLES

Table 1. Information of animal experiments.

Table 2. Chemical composition of lyophilized powder derived from Sea hare eggs.

Table 3. Recovery yield (%) of water-soluble extracts derived from Sea hare eggs (SHE) at different temperatures.

Table 4. The value of 50% growth inhibition on tumor cells incubated with SHE extracted at 20°C.

Table 5. The solid and protein contents of fractions from SHE.

Table 6. The U-937 cell growth inhibition activities of fractions obtained from 30 kDa < fraction by gel filtration chromatography

Table 7. The U-937 cell growth inhibition activities of fractions obtained from the active fractions by anion exchange chromatography

ABSTRACT

Sea hare (*Aplysia kurodai*), belonging to the order Opisthobranchia, subclass Gastropoda, is a marine shell-less snail. Recently, due to the bioactive molecules such as peptide or glycoprotein, and then their biomedical abilities including antitumor, antimicrobial, and antibacterial effect we have tried to prepare water-soluble extract from sea hare eggs (SHE: sea hare egg extract) and investigated its anticancer activities *in vitro* and *in vivo*.

On the antitumor examination, strong antitumor activities of SHE were observed for the growth of the five tumor cell lines such as CT-26 (mouse colon carcinoma cell line), U-937 (human monoblastoid leukemia cell line), HL-60 (human promyelocyte leukemia cell line), B-16 (murine melanoma cell line) and FM3A (human breast cancer cell line) and their IC₅₀ values were between 10 and 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, but around 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for the growth of normal cell line (V79-4). Especially SHE showed the strongest inhibitory effects against the growth of U-937 and FM3A tumor cells (IC₅₀ 10.42 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 10.62 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively). SHE induced dose-dependently apoptosis, which formed apoptotic body, induced DNA damage and DNA fragmentations, and increment of sub-G₁ DNA contents in U-937 and FM3A cells. In addition, SHE significantly or weakly increased the expression of Bax (pro-apoptotic protein), whereas slightly or significantly decreased the expression of Bcl-2 (anti-apoptotic protein) with the increment of concentrations in U-937 or FM3A cells, respectively. Additionally, SHE stimulated the activation of caspase 8, caspase 3, and PARP in the tumor cells.

These results indicated that SHE induced apoptosis via caspase pathway for anticancer activities *in vitro* (U-937 and FM3A cells).

In animal model, SHE administration via intradermal injection (i.d.) significantly suppressed the tumor growth induced by the treatment of FM3A cells. Especially, antitumor effect of SHE in the experimental tumor rats induced by FM3A tumor injection was dramatically observed even at a dose of 3 μg

/mouse by around 50% inhibition.

In order to identify the antitumor active compounds from SHE, the water-soluble extract of SHE was separated to the four fractions with different molecular weights under a ultrafiltration membrane separation system, and then 30 kDa < fraction was selected. The fraction was applied to a gel filtration and an anion exchange chromatography, and then the antitumor active fractions were taken on mono Q Sepharose anion exchange chromatography. The fractions were pooled and concentrated and then applied to SDS-PAGE. Five bands were observed on near 20.1 kDa and 30 kDa, between 30 kDa and 45 kDa, and 97 kDa molecular weight respectively.

According to these results, it was found that SHE strongly inhibited the tumor growths, differentiation, and proliferation of U-937 and FM3A cells as eliciting apoptosis via caspase pathway and decreased the breast tumor size *in vivo*. Therefore, this present study suggests that SHE might be a strong potential anticancer agent and it will be expected as a novel antitumor drug.

요 약

제주도 연안에 서식하고 있는 군소알로부터 수용성 추출물을 제조하여 *in vitro*에서의 항암활성과 *in vivo*에서의 항암활성에 대해 연구하였다.

군소알 (Sea hare eggs)로부터 각 20°C, 40°C와 60°C에서 24시간 동안 처리하여 수용성의 물 추출물 (SHE)을 제조하였다. 그 중, 20°C에서 추출된 SHE가 40°C와 60°C에서 추출된 군소알 물 추출물보다 암세포 증식 억제 활성이 좋은 것으로 확인되었다. 따라서, 20°C에서 추출된 SHE를 항암 활성 실험에 사용하였다.

SHE는 대장암세포인 CT-26, 백혈병 세포인 U-937과 HL-60, 피부암세포인 B-16, 유방암세포인 FM3A에 대한 세포 성장 억제 활성을 측정한 결과, 모든 암세포 중에서 상당한 억제 활성을 보였다. 특히, 혈액암세포인 U-937과 유방암세포인 FM3A에 대한 IC₅₀ 값은 각각 10.42 μg 과 10.62 μg 으로 다른 암세포들에 비해 상당히 높은 억제 활성을 보였다. SHE를 U-937과 FM3A 세포에 처리하였을 때 농도가 증가함에 따라 핵 응축, apoptotic body 형성, DNA 단편화 및 같은 성상이 증가되어 결국 apoptosis를 유도하였다. Comet assay 결과로부터 SHE의 농도가 증가함에 따라 U-937과 FM3A 세포에서 모두 DNA 손상이 증가되었다는 것을 알 수 있었다. 또한 apoptosis 구간으로 알려져 있는 sub-G₁기의 DNA 양이 U-937과 FM3A 세포에서 대조군에 비해 농도 의존적으로 증가한다는 것을 확인하였다. 특히, U-937과 FM3A 세포에 SHE 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 각각 처리하였을 때, 대조군에 비해 sub-G₁기에 해당하는 DNA 양이 각각 약 5 배와 6 배 정도 증가하였다는 것을 확인하였다.

또한, SHE를 U-937 세포에 처리하였을 때, pro-apoptotic 단백질인 Bax의 발현이 상당히 증가되었으나, Bcl-2의 발현은 거의 변화가 없었고, FM3A 세포에 처리하였을 때는 Bax의 발현이 다소 증가하였으나, Bcl-2의 발현은 상당히 감소되었다는 것을 확인하였다. 또한, caspase-3의 발현은 두 세포 모두에서 활성화되었고, cleaved caspase-3에 의해 유도되는 PARP의 활성화는 U-937과 FM3A 세포에서 모두 대조군에 비해 농도 의존적으로 증가되었다.

In vivo 상에서 FM3A 세포를 투여하여 마우스에서 유방암을 유도하고, SHE의 유방암 종양 크기 억제 효과를 6주간 확인한 결과, 마우스 한 마리당 SHE 30 μg 과 3 μg 을 처리하였을 때, 대조군에 비해 종양크기가 상대적으로 감소한 것을 알 수 있었다. 특히, SHE 3 μg 을 처리한 예방군은 대조군에 비해 약 2 배 정도 유방암의

종양크기 (부피/mm³)를 감소시키는 상당한 효과를 보였다. 또한 예방치료군과 예방군 모두 농도에 의존적으로 종양크기를 감소시키진 않았지만, 대조군에 비해서는 유방암 종양 크기의 감소를 유도한 억제 활성을 확인하였으며, 예방군이 예방 치료군보다 다소 좋은 억제활성을 가졌다는 것을 확인하였다. 항암 활성을 가지는 SHE의 활성 단백질을 찾아내고자 수행한 겔 여과 크로마토그래피로부터는 19개의 분획물이 U-937 세포에 대한 성장 억제 효과를 보였고, 그 분획물을 모아서 음이온 교환 크로마토그래피를 수행한 결과, 24개의 분획물로부터 암세포 성장 억제 효과를 확인했다. 이렇게 얻은 24개의 분획물을 가지고 mono Q sepharose column을 이용하여 분획물을 정제하였고, 그것을 가지고 단백질 분자량을 확인한 결과, 20 kDa 부근과 30 kDa 부근 등 SHE의 30 kDa 이상 분획물이 함유하고 있는 단백질들과 유사함을 보여주었으나, 14 kDa과 66 kDa의 분자량 부근에서 새로운 단백질 분자량들이 확인되었다.

이러한 결과를 종합해 볼 때, SHE가 혈액암세포와 유방암세포에 대하여 apoptosis를 유발하여 성장 및 활성을 억제한다는 것을 확인할 수 있었고, 동물실험으로부터 예방처리하였을 때 유방암 종양 크기를 가장 많이 억제하였다는 것을 확인하였다. 따라서, 군소알로부터 유래한 추출물은 다양한 암세포에 대한 강력한 항암효과를 확인하였기 때문에 향후 해양 천연물 유해 항암 소재로서 충분히 이용 가능할 것으로 사료된다.

서 론

암은 식습관, 자극물, 화학물질, 방사성 물질 및 바이러스 인자와 같은 환경적 요인과 유전적 요소, 노화 및 호르몬의 부조화 등의 내인성 요인이 관여하여 인체가 가지는 적절한 세포 사멸과 분화, 성장의 조절 메커니즘을 방해함으로써 세포의 비정상적이고 무절제한 증식을 이끌면서 세포수의 균형을 무너뜨려 마침내 다른 조직에 침투되는 질병이라고 알려져 있다 (Lee et al., 1992, Watso et al., 1986, Jung et al., 2006, Hartwell et al., 1989, Banner et al., 1994). 또한 2005년도 한국의 사회지표에 따르면 2004년 기준으로 인구 10 만명당 133.5 명이 암으로 사망하는 것과 암 질환 다음으로는 뇌혈관질환 (70.3 명), 심장질환 (36.9 명), 자살 (25.2 명), 당뇨병 (24.3 명), 간질환 (19.1 명) 및 만성질환 (17.3 명)등의 순으로 주된 사망원인이 암이라고 밝혀졌다. 그러나, 전 세계의 문화, 사회 발전은 각 종 환경문제, 수명의 연장, 식문화의 서구화 등을 이끌었으며, 이러한 것들은 암 환자의 발생을 더욱 증가시킬 것으로 예상하고 있다. 또한, 암은 조기에 발견하게 될 가능성이 극히 적으며, 조기에 발견되지 못할 경우 완치가 거의 불가능하고, 병이 진전될수록 환자와 가족의 고통과 경제적 손실이 막대하여, 의료보험의 재정고갈 등 사회적으로도 큰 비용을 초래한다. 최근 들어 많은 과학기술과 의학의 발전이 이루어지고 있음에도 불구하고 아직까지 정확한 암의 발생 기전과 치료법을 찾지 못하고 있어 시급한 항암제의 개발이 요구되어지는 실정이다. 또한 암세포를 죽이는 항암제처리와 세포의 분열을 막기 위한 방사선 조사 등이 암을 치료하기 위한 방법으로 사용되어지고 있으나, 대부분의 항암제가 합성물질이라는 점과 방사선 조사 시 정상세포들의 세포분열상 DNA 변성을 초래한다는 점에서 독성작용이나 다른 부작용들이 대두되면서 그 사용이 제한되어지고 있는 실정이다 (Kim et al., 2006a). 이러한 부작용들로 인해, 최근 들어 천연 소재의 항암 기능성 식품이나 천연항암제에 대한 관심이 높아지고 있다. 21세기 생명공학의 발달과 건강에 대한 욕구 증대 등으로 식품의 생체 조절 기능에 주목하며 식품 안전성이 강조되고 있어, 영양 가치 외에도 개인의 건강이나 신체적 활동, 정신 상태 등에 긍정적인 영향을 줄 수 있는 식품이나 식품 소재를 말하는 기능성 식품 (Functional Food)이란 용어가 대중매체에 등장하게 되었다. 이러한 기능성 식품은 천연 소재에서 유도된 성분으로 일상의 식이로 소비될 수 있는 것이어야 하며 섭취 시 특별한 기능이 나타나야 한다. 따라서, 암을 예방하거나 발암물질을 소거 해독시

키거나 암세포를 죽이기 위한 면역능력의 증가를 유도하는 천연소재 기능성 식품이 주목받고 있다. 현재, 시판되어지고 있는 항암 기능성 식품 소재로는 영지버섯, 우뚝가사리, 모자반과 죽엽나무, 파김치 등이 있다 (Shin et al., 1999, Yang et al., 2000, Kim et al., 1999, Lee et al., 2002). 2003년 538억 달러 (약 53조원)였던 항암, 면역강화 기능성 식품의 시장규모가 그 이후로 지속적으로 상당히 증가하고 있다는 것을 감안할 때, 이런 시장 규모는 기능성 천연 소재의 중요성을 인식시켜 준다. 따라서, 많은 연구자들은 독성을 가지지 않고 안전하게 암을 치료할 수 있는 새로운 천연소재의 치료제와 기능성 식품을 개발하기 위해 천연물질에 관심을 갖고 있다. 이전 연구에서 암을 유발하는 돌연변이원의 활성을 억제하거나 경감시키는 항돌연변이 물질이 식품을 비롯한 각종 천연물 중에 존재하며, 항돌연변이원은 질병은 물론 유전독성물질에 의해 유도되는 돌연변이를 차단하여 암의 예방에 기여하므로 매우 중요하다고 보고되어졌다 (Kada et al., 1978, Song et al., 1997a and b, Kuroda et al., 1988). 뿐만 아니라, Kim 등은 제주도에 서식하고 있는 해조류 추출물이 백혈병 세포 (U-937과 HL60 세포)와 자궁경부암세포 (HeLa 세포)에 대한 증식 억제 활성을 가진다는 것을 제시하였다 (Kim et al., 2006b). 또한 많은 연구자들은 천연 해양생물 소재로부터 추출된 추출물들이 돌연변이원성인 PhIP와 MeIQx의 억제, 발암성 물질인 Heterocyclic Amine의 억제, 대장암을 유도하는 Aberrant Crypt 형성 억제, 간암세포 (HepG2 세포), 자궁 경부암세포(HeLa 세포), 유방암세포 (MCF-7 세포), 대장암세포 (HT-29 세포)의 증식 억제효과를 가진다고 보고하였다 (Park et al., 2005, Park et al, 1998a, b and c, Lee et al., 2001).

이와 같은 천연 소재의 원천으로 바다를 들 수 있다. 바다는 지구상에 남아 있는 마지막 자원의 보고로서 많은 종류의 생물이 서식하고 있으며, 50만종 이상의 풍부한 해양생물이 해수중이라는 폐쇄계의 특이한 환경에 적응하면서 살아가고 있다. 따라서 해양생물은 그 진화 과정에 있어서 육상 생물과는 극히 다른 대사계 혹은 생체 방어계, 생합성 경로를 발전시켜 왔다. 이러한 해양생물 중, 해조류는 큰 비중을 차지하고 있다. 일반적으로, 해조류는 xanthophylls, fucoxanthin, phycoerythrin과 chlorophyll a, b, c와 같은 다양한 색소의 우성정도에 따라 크게 갈조류 (Phaeophyta), 홍조류 (Rhodophyta), 녹조류 (Chlorophyta)로 나누어진다 (Hashim et al., 2004). 이러한 해조류는 fucoxanthin, 식이섬유, 포피란, 비타민, 미네랄, 폴리페놀, 다당류 등의 생리활성성분을 함유하고 있으며, 해조류 내의 탄수화

물이 혈관 내 콜레스테롤 침착 방지 및 장관운동을 원활히 하고, 중금속 배출을 촉진시키며 고지혈증의 개선에 유효하다는 등 식용해조류로부터 생리활성 물질들이 확인되면서 기능성 식품으로서의 개발이 활발히 진행되고 있다 (Ebihara et al., 1990, 김한수 등, 1998, Amano et al., 1991, Mackie et al., 1974). 이처럼 해조류와 같은 해양식물 종들의 다양한 생리활성들이 밝혀지고 있는 가운데, 해양 동물 종들에 대한 연구 또한 진행되고 있다.

일반적으로, 제주도에 분포하는 해면동물은 196 종으로 국내 해면동물의 86% 이상을 차지하고 있으며, 특히 22 종은 제주 고유종으로 보고되고 있다. 그 중, 한국산 산호류의 70%가 제주 연안에 분포하고 있고 이중 51%는 제주연안에서만 자생하는 것으로 알려져 있다. 또한 극피동물은 바다나리류 16 종 중 13 종, 불가사리류는 33 종 중 20 종, 거미불가사리류는 57 종 중 34 종, 성게류는 29 종 중 16 종, 해삼류 35 종 중 18 종 등이 제주에서 특징적으로 분포하고 있으며 어류는 3 강 34 목 169 과 638 종이 출현하고 있다. 따라서, 최근 들어 제주도를 비롯한 전 세계, 국내의 많은 연구자들과 연구기관들은 해양생물이 새로운 생리활성물질 탐색이나 의약품 개발 등을 통해 이용되어야 할 생물자원이라고 발표하였고, 그에 따른 보존과 관리의 균형이 필요하다고 주장하였다. 또한 최근 생명공학기술이 급속히 발전함에 따라 해양 바이오산업의 활성화가 가속화될 것으로 예측되고 있으며, 특히 신규 유용해양생물 유전체 발굴과 활용기술에 대한 원천기술·핵심기술개발이 치열하게 벌어질 것으로 전망하면서, 빠른 시일 내의 해양 동물로부터의 활성 연구가 진행되어야 함을 시사하고 있다. 현재까지 연구된 물질로는 대표적으로 게나 새우 등의 갑각류, 곤충류, 연체동물, 조개류 등의 세포벽 등에 분포해있는 물질인 키틴/키토산은 천연고분자 다당류를 들 수 있다. 이것은 키틴을 N-탈아세틸화시킨 물질로 <본초강목>에 보면 게 가루를 첨가한 완자가 중기, 부스럼 치료에 특효약으로 명시되어 있으며. 일본에서도 민간에서 게나 새우 껍질을 이용하여 해열, 정장, 화상 및 피부병 치료에 효험을 보아 왔다고 전해지고 있고, 우리나라의 <동의보감>에도 항알레르기, 부종, 면역 증강에 유효하다고 명시되어 있다.

또한, 황산 콘드로이친은 우렁챙이와 미더덕의 껍질에 있는 탄수화물의 일종으로 끈적거리는 액체형태를 띤 산성뮤코다당이다. 황산 콘드로이친은 피부, 근육, 장기 등의 생체 각 조직 내의 수분과 영양분을 축적하는 역할을 하기에 황산 콘드로이친은 피부미용 외에도 노화방지, 동맥경화 억제, 뼈형성 작용, 세균감염억제, 피로

억제 등에 탁월한 효과가 있는 것으로 밝혀졌다. 국내에서 발표된 해양동물의 생리활성으로 해삼, 불가사리 성체 껍질과 우렁쉥이껍질, 해삼 등으로부터 분리된 해삼 당단백질과 황산콘드로이친, 렉틴 등의 생리활성 물질이 항돌연변이 및 항암효과, 항산화, 항균 효과를 가진다고 보고 되었다 (Hye et al., 1998, Shon et al. 1998)

그러나, 이러한 다양한 종의 해양 동물이 있음에도 불구하고 생리활성의 연구가 진행되고 있거나 연구가 수행되어진 것은 드문 실정이다.

현재 연구에서 사용된 군소는 우리나라와 일본, 대만 등지에 서식하고 있는 무순목 군소과에 속하고 얕은 바다에서 서식하고 있으며 20-30 cm의 크기를 가지고 한국, 일본, 대만에 주로 분포하는 흑갈색의 연체동물이다. 군소알은 황토색의 라면 형태를 띠고 있으며, 주로 3월에서 7월까지 개체 당 1 개월에 1 억 개 정도의 알을 산란한다고 보고되어졌다. 이전 연구에 의하면, 군소는 펩타이드성과 당단백성분의 항암이나 항균 등의 다양한 활성을 가지는 생리활성 성분을 함유하고 있다고 보고하고 있다 (Kamiya et al., 2006, Iijima et al., 2003, Yamazaki., 1993, Luesch et al., 2002, Ortega MJ et al., 1997, Todd B., 2006). 그러나 군소알이 가지는 다양한 암세포들에 대한 증식 억제와 구체적인 항암 활성에 대해서는 연구되어진 바 없다.

따라서, 이 연구에서는 제주도 연안에 서식하고 있는 군소의 알을 채집하고, 그것으로부터 수용성 추출물을 얻어 *in vitro*상에서의 혈액암세포인 U-937과 유방암세포인 FM3A에 대한 항암 활성과 유방암이 유도된 마우스 상에서의 종양 크기 억제 활성을 확인하고, 그 활성이 군소 알에 함유되어있는 어떤 성분에 의해 유도되는 것인지를 알아보도록 하겠다.

재 료 및 방 법

2.1. 재료

제주도 해안 지역에서 서식하고 있는 군소알 (Sea hare eggs)을 채집하여 염분과 이물질을 제거하기 위해 세척한 후, 약 48시간 동안 동결 건조하였다. 이것을 25 mesh 이하가 되도록 체과하고, 분말화한 후 실험에 사용하였다.

2.2. 군소알의 일반성분 분석

동결 건조된 군소알에 대한 일반성분 분석은 AOAC법 (2002)에 따라서 수분은 105°C 상압건조법, 조회분은 550°C 회화로에서 12시간 이상 태운 후 정량하는 건식 회화법, 조단백질은 킬달자동분석장치 (Kjeltec™2300, Foss Co. Ltd., Denmark)에 의해 분석하였다. 또한, 조지방은 에테르를 이용하는 Soxhlet 법 (Sohxlet system 1046, TicatorAB, Sweden)으로, 탄수화물 정량은 phenol sulfuric acid 법으로 측정하였다.

2.3. 물을 이용한 군소알 추출물 제조

동결 건조된 군소알 파우더 10 g을 증류수 (D.W) 1 L에 넣고 각 20°C, 40°C, 60°C에서 교반하면서 24시간 동안 추출하였다. 3,500 rpm에서 20분간 원심분리 시킨 후, 추출액을 Whatman No. 1 여과지로 여과한 다음 상등액을 동결 건조하여 실험에 사용하기 전까지 -20°C에 보관하였다 (Fig. 1).

2.4. 암세포배양

혈액암 U-937 세포와 지방암 FM3A 세포는 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS)과 항생제가 함유된 RPMI 1640 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기 내에서 배양하면서 실험에 사용하였다.

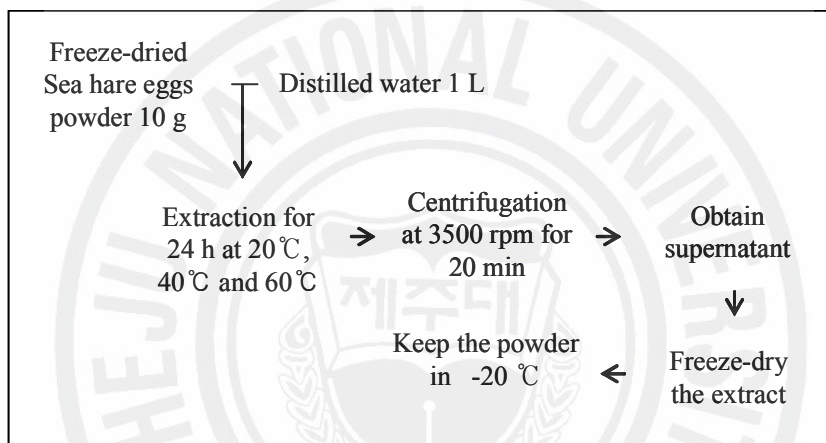


Fig. 1. Scheme of the extract preparation from Sea hare eggs

2.5. *In vitro* 실험

2.5.1. 암세포 증식 억제 억제율과 IC₅₀ 측정

혈액암 세포인 U-937 세포들을 well당 약 5×10^4 세포수가 되도록 96 well plate에 각 접종한 후에 SHE를 다양한 농도로 처리한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 각 24시간과 72시간 동안 배양하였다. 또한 유방암 세포인 FM3A 세포들은 well당 5×10^4 세포수가 되도록 96 well plate에 각각 접종한 후에 16시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 세포가 잘 붙도록 한다. SHE를 다양한 농도로 처리한 후, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 각 24시간과 72시간 동안 배양하였다. 배양기에서 well plate를 꺼내어 MTT 시약 (stock 2 mg/ml)을 50 μ l씩 가한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 배양하였다. 1,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 조심스럽게 버린 후, DMSO를 150 μ l씩 가하여 잘 섞어주었다. MTT가 살아있는 세포의 미토콘드리아 내에서 NADPH가 NADH로 전환되면서 진한 적자색의 불용성의 formazan을 형성하는 정도를 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정함으로써 세포 생존율을 구하였다.

$$\text{Cell growth inhibition activity (\%)} = \{(A - B) / A\} \times 100$$

A; Absorbance of non-treated cells

B; Absorbance of SHE-treated cells

2.5.2. 형광현미경을 이용한 cell의 형태적 관찰

Apoptosis의 한 현상으로 세포내 핵의 응축과 apoptotic body의 형성이 SHE에 의해서 유도되는 지 확인하기 위해, Hoechst 33342를 이용하여 핵 염색법을 수행하였다. U-937과 FM3A 세포를 well당 1×10^5 세포가 되도록 24 well plate에 각각 접종하였다. 그리고 난 후에 SHE를 다양한 농도별 (6.25, 12.5, 25 μ g/ml 와 1, 5, 10, 25, 50 μ g/ml)로 처리한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 배양 후, Hoechst 33342 형광 염색액 (0.5 μ g/ μ l; Sigma) 5 μ l를 가하고, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 30분간 배양한 후, 형광 현미경으로 관찰하였다. 핵 응축 정도를 관찰하기 위해 염색된 세포들은 CoolSNAP-Pro color digital camera가 장착된 형광 현미경

으로 관찰하였다.

2.5.3. 전기영동을 이용한 암세포의 DNA 단편화 측정

혈액암 U-937 세포들을 well당 약 5×10^5 세포수가 되도록 6 well plate에 각 접종한 후에 SHE를 다양한 농도 (6.25, 12.5, 25와 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 또한 유방암 FM3A 세포들은 well당 5×10^5 세포수가 되도록 6 well에 각각 접종한 후에 16시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 세포가 잘 붙도록 한 다음, SHE를 다양한 농도 (1, 10과 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 각 well의 세포를 코니칼 튜브로 모아 PBS (phosphate buffered saline)로 세척하고, 세척된 세포는 e-tube로 옮겨져 다시 PBS를 처리해 10,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상등액을 제거하였다. Quigen DNA kit을 이용해 genomic DNA를 추출한 다음, ethidium bromide (EtBr)가 포함된 1% LE agarose gel 상에서 100 V로 30분간 전기영동하여 DNA 단편을 확인하였다.

2.5.4. Alkaline comet assay를 이용한 암세포의 DNA 손상 측정

Alkaline comet assay는 Singh (1995)의 방법을 수정, 보완하여 실시하였다. 혈액암 U-937 세포들을 well당 약 5×10^5 세포수가 되도록 6 well plate에 각 접종한 후에 SHE를 다양한 농도 (6.25, 12.5, 25와 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 또한 유방암 FM3A 세포들은 well 당 5×10^5 세포수가 되도록 6 well에 각각 접종한 후에 16시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 세포가 잘 붙도록 하였다. SHE를 다양한 농도 (1, 5, 10, 25와 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양한 다음, 각 well의 세포를 모아 PBS로 세척하였다. 그 다음 100 μl 의 0.7% low melting point agarose (LMPA)과 섞은 후, 0.5% normal melting point agarose (NMPA)가 미리 코팅된 슬라이드 위로 각 세포와 LMPA의 현탁액이 골고루 분산되게 한 후 cover glass로 덮어 4°C 냉장고에 약 10분간 보관하였다. Gel이 굳으면 cover glass를 벗기고 다시 0.7% LMPA 용액 75 μl 를 그 위에 떨어뜨린 후 다시 cover glass를 덮어 gel이 굳

을 때까지 냉장 보관하였다. Gel이 굳은 것을 확인한 뒤, cover glass를 벗기고 미리 준비해 둔 차가운 alkali lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris)에 사용 직전에 1% triton X-100를 섞은 후 슬라이드를 담가 저온, 암실에서 1시간 동안 침지시켜 DNA의 이중 가닥을 풀어주었다. Lysis가 끝난 슬라이드를 전기영동 탱크에 배열하고 실험직전 제조하여 냉장 보관하였던 전기영동 버퍼 (300 mM NaOH, 10 mM Na₂EDTA, pH>13)를 채워 20분 동안 unwinding시켜 DNA의 alkali labile sites가 드러나게 한 후 25 V/300 mA의 전압을 걸어 20분간 전기영동을 실시하였다. 빛에 의해 DNA가 부가적으로 손상되는 것을 방지하기 위해 위의 과정은 전기영동 탱크를 어두운 천으로 덮은 채 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 0.4 M Tris 완충용액 (pH 7.4)에 10분씩 담구어 세척하는 과정을 3회 반복한 후, 슬라이드를 건조시켰다. 20 µg/ml 농도의 ethidium bromide로 핵을 형광 염색하고 cover glass로 덮은 뒤 형광현미경 (Leica, Germany)상에서 관찰하였다. CCD camera (Nikon, Japan)를 통해 보내진 각각의 세포핵 image는 Komet 4.0 comet image analyzing system (Kinetic Imaging, UK)이 설치된 컴퓨터상에서 분석하였다. 각 세포의 DNA 손상정도는 핵으로부터 이동한 DNA 파편의 거리 (tail length, TL) 또는 tail length에 tail 내 함유된 DNA%를 곱해준 tail moment (TM) 값을 측정하여 나타내었다.

2.5.5. Flow cytometry analysis (FACS)를 이용한 세포 주기 측정

Apoptotic sub-G₁ hypodiploid cells (Nicoletti et al., 1991)의 비율을 결정하기 위해 flow cytometry analysis (FACS: Fluorescence activated cell sorter)를 수행하였다. 혈액암 U-937 세포들을 well당 약 5×10^5 세포수가 되도록 6 well plate에 각 접종한 후에 SHE를 다양한 농도 (6.25, 12.5와 25 µg/ml)로 처리한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 또한 유방암 FM3A 세포들은 well당 5×10^5 세포수가 되도록 6 well plate에 각각 접종한 후에 16시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 세포가 잘 붙도록 하였다. SHE를 다양한 농도 (1, 5, 10, 25와 50 µg/ml) 로 처리한 후, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 각 well의 세포를 모아 PBS로 세척한 후, 세포들은 13,000 rpm으로 3분간 원심분리하여 pellet을 모은 후, PBS로 한 번 씻어내고, 1% BSA로 다시 한 번 씻어내었다.

다시 원심분리 후, PBS 300 μ l를 첨가하고, 고정액 (70% 에탄올, 0.5% Tween 20, 4.5% 증류수) 1 ml를 첨가하여 4°C에서 약 12시간 동안 고정시켰다. 그 다음 PBS로 두 번 세포를 씻은 후, 10 μ g PI와 10 μ g RNase가 포함된 PBS 용액 1 ml를 첨가하여 37°C에서 30분간 암소에 두었다. Flow cytometry analysis는 FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, USA)를 이용하여 분석하였다.

Cell cycle의 효과는 cell cycle의 각 phase에서 cell 분포 %의 변화로 결정하고, computer program Cell Quest와 Mod-Fit (Wang et al., 1999)에 의해 생성된 막대 그래프로 평가하였다.

2.5.6. 세포로부터 세포질 단백질의 추출

혈액암 U-937 세포는 dish당 약 4×10^6 세포수가 되도록 10 cm culture dish에 각 접종한 후에 SHE를 다양한 농도 (6.25, 12.5와 25 μ g/ml)로 처리한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 또한 유방암 FM3A 세포는 dish당 약 4×10^6 세포수가 되도록 10 cm culture dish에 각 접종한 후 16시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 세포가 잘 붙도록 하였다. SED를 다양한 농도 (1, 10과 50 μ g/ml)로 처리한 후, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 배양된 세포는 원심분리 (1,000 rpm, 5분)하여 상등액을 버린 후, PBS를 가지고 세척하였다. 세척된 세포에 미리 차갑게 해 둔 protease inhibitor (phenylmethyl sulfonylfluoride; PMSF), proteinase inhibitor cocktail (0.02 mM aprotinin, 2 mM leupeptin, 5 mM phenanthroline, 28 mM benzamidine-HCl)가 포함된 lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM EDTA, 130 mM NaCl, 1% Triton X-100) 100 μ l를 처리하고 vortex시킨 후, ice에서 15분간 반응시켰다. 반응 후, 15,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 그 상등액을 새 e-tube로 옮기고 실험할 때까지 -20°C에서 보관하였다.

2.5.7. Western blot assay에 의한 apoptosis 관련 단백질의 발현 측정

위에서 추출된 세포질 단백질을 가지고 BCA kit (Sigma, BCA assay)를 가지고 단백질을 정량하고, 80 μ g의 단백질을 15% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동한

다음, nitrocellulose paper (Millipore Co.)로 전이하였다. 5% non fat milk로 1000 배 희석한 각 종 1차 항체와 1시간 동안 반응시키고, TBS용액으로 membrane을 3 회 씻어내고 2% milk용액에 2000 배 정도 희석된 HRP가 conjugate된 2차 항체를 처리하여 1시간 동안 실온에서 반응하였다. 그리고 3번 TBST (TBS containing 0.2 % Tween solution) 용액으로 membrane을 씻어낸 후, ECL kit을 이용하여 암실에서 X-ray film에 밀착시켜 발현된 band를 현상하였다. 사용한 1차 및 2차 항체들은 다음과 같다 (caspase-3, Santa Cruz Biotechnology Inc.; Bax, Santa Cruz Biotechnology Inc.; PARP, Enzyme System products; Bcl-2, Santa Cruz Biotechnology Inc.; β -actin, Cell signal Inc.). Goat anti-mouse IgG (HRP); Amersham, goat anti-mouse IgG (AP); Santa Cruz, goat anti-rabbit IgG (HRP) ; Amersham)

2.5.8. Caspase-3 활성의 측정

위에서 추출된 세포질 단백질을 50 μ g을 가지고 Caspase 3 assay kit (Sigma, Saint Louis, USA)에 제시된 방법에 따라 caspase-3 활성을 측정하였다. 이 때, positive control로 caspase-3 효소를 사용하였다.

2.5.9. 통계분석

데이터는 Window상에서 SPSS package를 이용하여 분석하였으며, 수치는 mean \pm standard error (SE)로 표현하였다. 수치는 Duncan's multiple range test에 따라 variance (ANOVA)의 one-way analysis 사용 비교하여 얻어진 tail intensity 를 의미한다.

2.6. 동물실험

2.6.1. 실험동물

SHE의 항암효능을 평가하기 위해서 동물실험을 진행하였다. 이 동물실험에서는

혈액암보다 유방암의 발병 빈도가 높은 점을 고려하여 유방암세포인 FM3A 세포를 이용하였으며, 동물모델은 (주) 샘타코에서 구입하여 C3H/He 마우스를 이용하였다. 실험동물은 암컷 (18.5 ± 1.4 g)으로 6주령 된 마우스를 사용하였고, 마우스는 polycarbonate cage (폭 20 cm, 길이 26 cm, 높이 13 cm)에 각각 8 마리씩을 넣어 매일 물과 사료를 일정 시간에 공급하여 일주일 동안 순치한 후 실험하였다 (Table 1).

2.6.2. 실험물질 제조 및 유방암세포 투여

SHE를 멸균한 PBS에 녹인 다음, 유방암세포주로부터 형성된 종양모델에 주사 (n=8)하여 종양형성에 대한 지연 (치료효과) 및 예방효과를 조사하였다. 미리 배양된 FM3A 세포를 마우스 당 1×10^6 cells/50 μ l가 되도록 하여 종양형성을 위해 시험 기간 내 1 회 마우스에 투여하였다.

2.6.3. 투여 경로 및 투여 회수와 방법

FM3A 세포는 특정 종양을 장기에 유발시키기는 어렵기 때문에 마우스 꼬리의 미정맥 (I.V.)으로 투여하여 피부바깥으로 종양형성을 유발하였다. 예방그룹에서 SHE 투여는 종양세포 투여 전 주 1 회 5주간 전 투여하였고, 예방 치료군에서는 종양세포 투여 전 주 1 회 5주간 전 투여를 실시하고, 종양세포투여 후 주 1 회 3주간 추가 투여하였다 (Fig. 2).

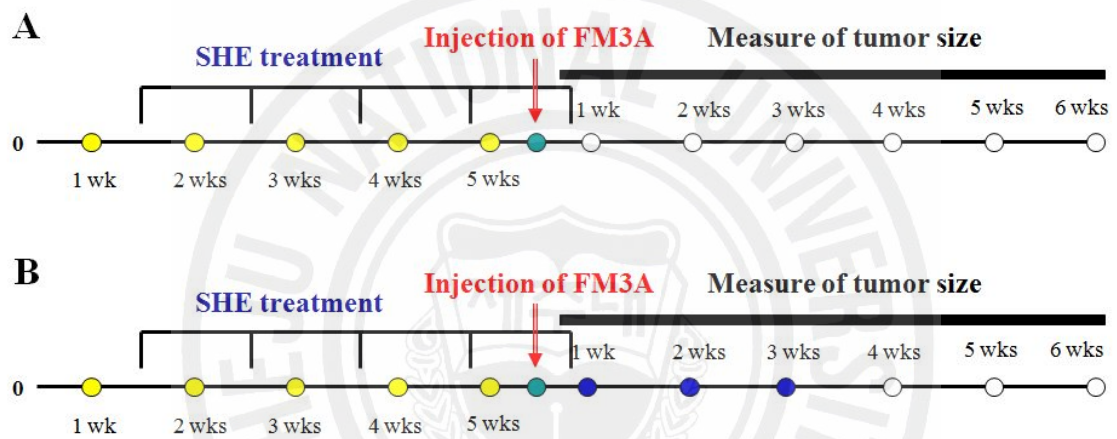
2.6.4. 결과 측정

예방그룹은 매주 1 회씩 총 5주간 SHE를 투여하고, 7일 후 종양세포를 주사한 다음, 1주일 간격으로 6주 동안 종양 형성을 관찰하면서 주 1 회 이상 종양크기를 캘리퍼 (caliper)를 이용하여 측정하였다. 예방 치료 그룹에서는 매주 1 회씩 총 5주간 SHE를 투여하고, 7일 후 FM3A 유방암세포를 주사하였다. 주사 1주일 후, SHE를 매주 1 회씩 총 3주간 투여하면서 동시에 1주일 간격으로 6주 이상 종양 형성을 관찰하여 종양 크기를 측정하였다.

Table 1. Information of animal experiments

Group	Sex	Mouse No.	Concentration	Injection	투여경로
G8 (음성군)	Female	8	0 ug/50 ul/마리	주 1회	미정맥
G9 (예방군)	Female	8	30 ug/50 ul/마리	주 1회	미정맥
G10 (예방군)	Female	8	3 ug/50 ul/마리	주 1회	미정맥
G11 (예방치료군)	Female	8	30 ug/50 ul/마리	주 1회	미정맥
G12 (예방치료군)	Female	8	3 ug/50 ul/마리	주 1회	미정맥

Prevention (5 weeks), n=8



Prevention & therapy (8 weeks), n=8

Fig. 2. Scheme of animal experiment. A; Prevention group (5 weeks), n=8, B; Prevention and therapy group (8 weeks), n=8.

종양의 일반 증상관찰시간은 투여 당일로부터 매일 1 회씩 관찰하였고, 사망률은 대조군이 사망할 때까지를 기준으로 하여 이와 동시에 생존율도 확인하였다 (Fig. 2).

2.6.5. 통계분석

엑셀 통계처리에 의해 평균값을 구한 다음, SPSS를 이용하여 통계적 유의검정을 실시하였다.

2.7. SHE로부터 활성 물질 분리

2.7.1. SHE 제조

동결 건조된 균소 알 파우더 30 g을 distilled water (D. W) 3 L에 넣고 20℃에서 교반하면서 24시간 동안 추출하였다. 3,500 rpm에서 20분간 원심분리시킨 후, 추출액을 Whatman No. 1 여과지로 여과한 다음, 상등액을 동결 건조하여 사용할 때까지 -20℃에서 보관하였다.

2.7.2. 한외여과막을 이용한 SHE 분자량별 분획물의 제조, 분자량 및 활성 확인

동결 건조된 SHE를 증류수에 녹인 후, 분자량 1 kDa, 10 kDa와 30 kDa의 막을 사용하는 한외여과막 분리 시스템을 이용하여 분자량별로 분획물들을 제조하였다 (Fig. 3). 이렇게 분리된 분획물을 가지고 단백질과 고형물 함량을 측정하였고, 소단위체로의 단백질 변성을 이끌기 위해 SDS와 mercaptoethanol을 첨가하거나 첨가하지 않았다. 그 후, 100℃에서 약 4분간 끓여 15% SDS-PAGE 겔에 40 μ l씩 loading 하여 30 mA에서 약 1시간 30분 동안 전기영동 하였다. 또한, 세포 증식 억제 활성을 검색하였다.

2.7.3. 겔 여과 크로마토그래피를 통한 30 kDa 이상 분획물로부터 활성 물질 분리

가장 좋은 암세포 증식 활성을 나타낸 30 kDa 이상 분획물을 가지고 겔 여과 크로마토그래피를 수행하였다. Sephadex G-100 수지가 충전된 컬럼은 유속 분당 1.25 ml로 버퍼 (20 mM Tris-HCl, pH 8.0)를 가지고 평형상태가 되도록 씻어줬다. 30 kDa 이상 분획물을 15,000 rpm에서 15분간 원심분리시켰고, 컬럼에 적용하였다 (Fig. 4). 이동상 용매는 유출속도를 분당 1.25 ml로 하여 PBS를 사용하였고, 분획물 수집기로 1 ml씩 70개의 분획물을 얻었다. 이렇게 얻은 분획물을 가지고 280 nm에서 흡광도를 측정하였고, 암세포 증식 억제 활성을 검색하였다.

2.7.4. 이온 교환 크로마토그래피를 통한 30 kDa 이상 분획물로부터 활성 물질 분리

겔 여과 크로마토그래피를 통한 30 kDa 이상 분획물로부터 좋은 암세포 증식 활성을 가지는 분획물들을 모은 후, Resource Q 음이온 교환 크로마토그래피를 수행하였다. Sepharose Q 수지로 충전된 컬럼에 2 ml를 loading 하였다 (Fig. 4). 20 uM Tris-HCl (pH 7.4)을 가지는 버퍼를 가지고 컬럼을 씻은 후, 20 uM Tris-HCl (pH 7.4)에서 NaCl (0 M에서 1 M)의 구배 용매 조성에 따라 분당 1 ml의 유속으로 분획물 수집기를 통해 0.5 ml씩 54개의 분획물을 얻었다. 이렇게 얻은 분획물을 가지고 280 nm에서 흡광도를 측정하였고, 암세포 증식 억제 활성을 검색하였다. 암세포 증식을 검색한 후, 암세포 증식 억제 활성을 가지는 분획물들을 모아 더 강한 음이온 교환 크로마토그래피의 적용을 위해 Sepharose Mono Q 수지로 충전된 컬럼으로부터 분획물을 정제하였다.

2.7.5. SDS-PAGE 겔 전기영동을 통한 활성 분획물로부터 단백질 분자량 확인

30 kDa 이상 분획물을 가지고 순차적으로 수행한 겔 여과 크로마토그래피와 음이온 교환 크로마토그래피로부터 정제된 분획물을 농축하여 40 μ l와 80 μ l를 15-7% gradient SDS-PAGE 겔에 loading한 후, 30 mA로 약 1시간 동안 전기영동하여 Commassie 염색법을 수행하였다.

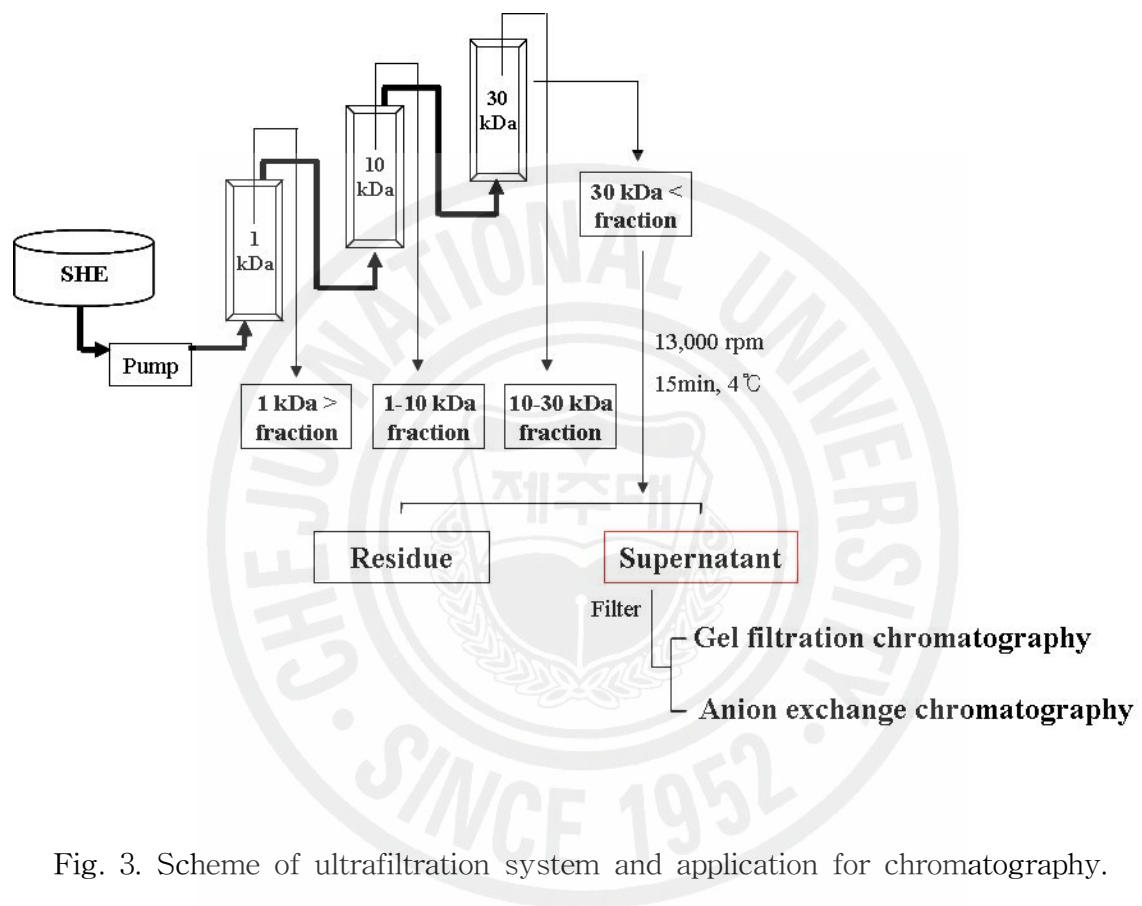


Fig. 3. Scheme of ultrafiltration system and application for chromatography.

결 과 및 고 찰

3.1. 군소알 분말의 일반 성분 분석

채집한 군소알로부터 불필요한 이물질을 제거하여 세척, 동결건조 다음 25 mesh 이하가 되도록 체과하고 분말화하였다. 얻은 분말을 가지고 일반성분을 분석한 결과, 군소알이 포함하고 있는 단백질 함량은 전체의 약 38.6%였고, 탄수화물 함량은 24.8%였다. 수분함량은 4.7%, 지질함량은 4.3%, 회분함량은 23%였다 (Table 2).

3.2. SHE의 수율

군소알 1 g을 100 ml의 증류수로 24시간 동안 각 20°C, 40°C, 60°C에서 교반시킨 후, 얻은 군소알 추출물 (Sea hare eggs water extract; SHE)의 수율을 확인한 결과는 각각 26, 28, 40% 였다 (Table 3). 그 결과로부터, 다소 추출물의 온도가 높아짐에 따라 추출 효율이 증가함을 알 수 있었다.

3.3. 암세포 증식 억제율과 IC₅₀ 측정

대장암 세포 (CT-26), 백혈병 세포 (U-937과 HL-60), 피부암 세포 (B-16)와 유방암 세포 (FM3A)에 대한 cell growth inhibition activity 측정을 위해 제조된 SHE를 사용하여 MTT 분석을 수행하였다. 각 암세포에 SHE를 24시간 처리하였을 때, 20°C에서 추출된 SHE가 40°C와 60°C에서 추출된 SHE보다 암세포 증식 억제 효과가 높게 나타났으며, 실험에 사용된 암세포 중에 대한 다소 높은 성장 증식 억제 활성을 보였다 (Fig. 4-8).

IC₅₀을 측정하기 위하여 암세포에 SHE를 처리하였을 때, 대장암 세포 (CT-26), 백혈병 세포 (U-937과 HL-60), 피부암 세포 (B-16)와 유방암 세포 (FM3A)의 IC₅₀은 각각 20.95, 10.42, 29.58, 22.16, 10.62 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났다 (Table 4).

Table 2. Chemical composition of lyophilized powder derived from Sea hare eggs
(Unit: %)

Moisture	Ash	Protein	Carbohydrate	Lipid
4.7 ± 0.25	23.0 ± 0.30	38.6 ± 0.56	24.8 ± 0.15	4.3 ± 0.47

Table 3. Recovery yield (%) of water-soluble extracts derived from Sea hare eggs (SHE) at different temperatures

Temperature	20°C	40°C	60°C
Yield (%)	26	28	40

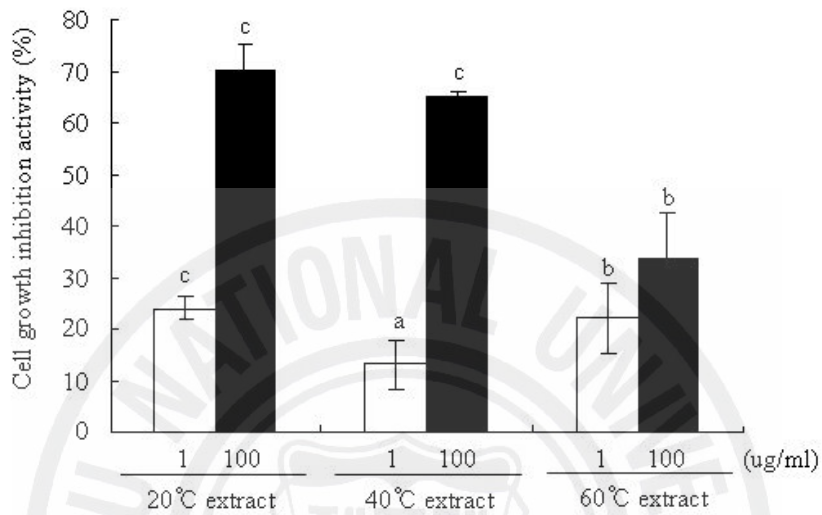


Fig. 4. Effect of cell growth inhibition on leukemic U-937 incubated with SHE prepared at different temperature from 20°C to 60°C. The 5×10^4 cells MTT reagent treated into each well and absorbance of formed formazan in viable cells were measured at 540 nm. Experiments were performed in triplicates and data are expressed as average percent change from control \pm SD. a; $p < 0.05$, b; $p < 0.005$, c; $p < 0.0005$.

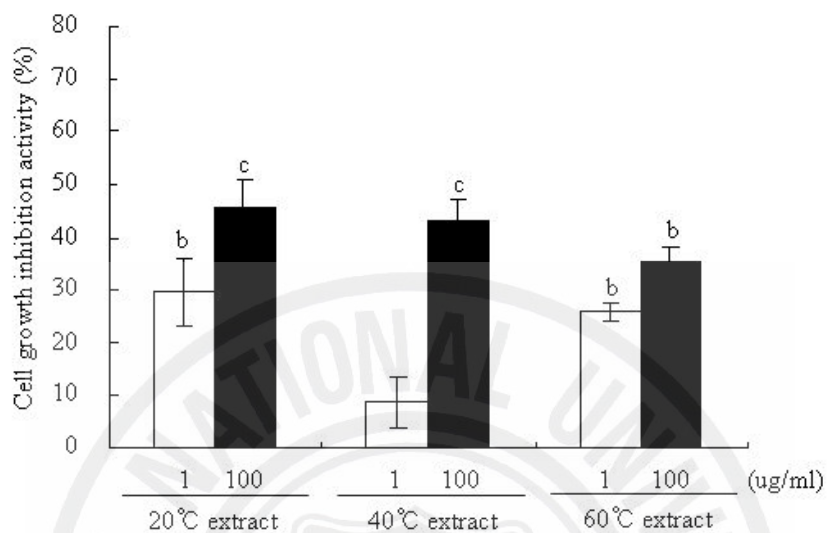


Fig. 5. Effect of cell growth inhibition on leukemic HL-60 cells incubated with SHE prepared at different temperature from 20°C to 60°C. The 5×10^4 cells were treated with the extracts and incubated for 24 h at 37°C. Then, MTT reagent treated into each well and absorbance of formed formazan in viable cells were measured at 540 nm. Experiments were performed in triplicates and data are expressed as average percent change from control \pm SD. b; $p < 0.005$, c; $p < 0.0005$.

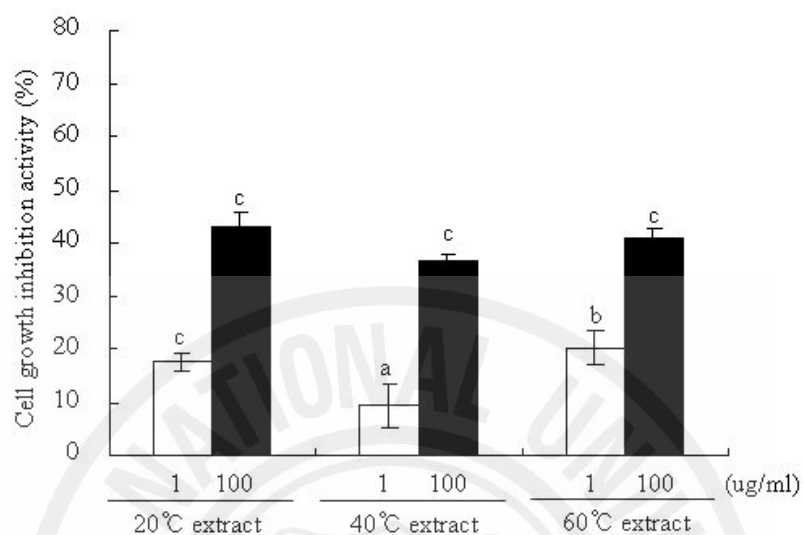


Fig. 6. Effect of cell growth inhibition on colon CT-26 cells incubated with SHE prepared at different temperature from 20°C to 60°C. The 5×10^4 cells were treated with the extracts and incubated for 24 h at 37°C. Then, MTT reagent treated into each well and absorbance of formed formazan in viable cells were measured at 540 nm. Experiments were performed in triplicates and data are expressed as average percent change from control \pm SD. a; $p < 0.05$, b; $p < 0.005$, c; $p < 0.0005$.

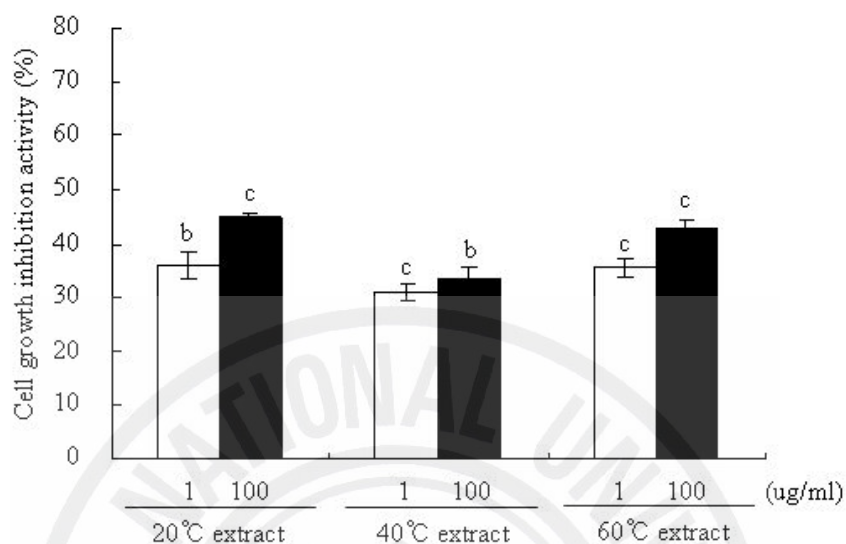


Fig. 7. Effect of cell growth inhibition on cutaneous B-16 cells incubated with SHE prepared at different temperature from 20°C to 60°C. The 5×10^4 cells were treated with the extracts and incubated for 24 h at 37°C. Then, MTT reagent treated into each well and absorbance of formed formazan in viable cells were measured at 540 nm. Experiments were performed in triplicates and data are expressed as average percent change from control \pm SD. b; $p < 0.005$, c; $p < 0.0005$.

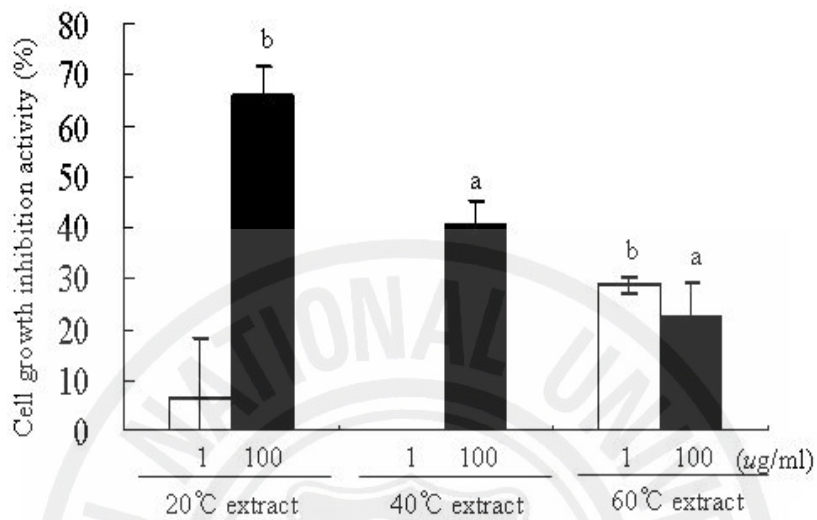


Fig. 8. Effect of cell growth inhibition on breast cancer FM3A cells incubated with SHE prepared at different temperature from 20°C to 60°C. The 5×10^4 cells were treated with the extracts and incubated for 72 h at 37°C. Then, MTT reagent treated into each well and absorbance of formed formazan in viable cells were measured at 540 nm. Experiments were performed in triplicates and data are expressed as average percent change from control \pm SD. a; $p < 0.05$, b; $p < 0.005$.

Table 4. The value of 50% growth inhibition on tumor cells incubated with SHE extracted from 20°C.

Name of cell line		IC ₅₀ (μg)
B-16	Murine melanoma	22.16
U-937	Human monoblastoid leukemia	10.42
CT-26	Mouse colon carcinoma	20.95
HL-60	Human promyelocyte leukemia	29.58
FM3A	Human breast cancer	10.62
V79-4	Normal (Hamster Chinese lung cell)	87.59

이 연구에서 SHE는 5 종의 암세포에 대해서 항암능력을 가지는 IC₅₀ 값은 모두 30 $\mu\text{g/ml}$ 이하였고. 정상세포인 V79-4 세포는 87.59 $\mu\text{g/ml}$ 였다. 이 연구에서 SHE는 특히 혈액암세포 (U-937)와 유방암세포 (FM3A)에 대해서 낮은 IC₅₀ 값을 나타냈는데, IC₅₀ 값은 각각 10.42 $\mu\text{g/ml}$ 과 10.62 $\mu\text{g/ml}$ 로 다른 암세포들에 비해 상당히 강한 억제 활성을 가진다는 것을 알 수 있었다. 또한 SHE를 U-937과 FM3A 세포에 처리하였을 때 처리하지 않은 대조군에 비해 세포 수는 유의적으로 감소하였다. 특히, 각 세포의 IC₅₀ 농도인 10.42 $\mu\text{g/ml}$ 과 10.62 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 이후부터는 급격한 세포의 사멸을 확인할 수 있었다.

기존의 항암효과가 있다고 알려진 해조류의 에탄올 추출물은 톳, 다시마, 미역, 파래, 김 등이 있으며, 자궁경부암세포인 Hela 세포와 유방암세포인 MCF-7 세포, 위암세포인 SNU-638 세포에 효과가 있다고 Kim 등 (2005)은 보고하였다. 또한, Ju 등 (2004)은 약용식물 *B. platyphylla* var. *japonica* 추출물을 대장암세포인 HL-60 세포에 처리하였을 때, 세포의 생존율이 농도 의존적으로 감소한다고 보고하였다. 상기의 추출물은 유기용매를 이용하여 추출한 것인데, 유기용매로 추출하면 효능은 좋으나, 다소 부작용이 있을 가능성을 배제할 수 없다. 그러나, 물로 추출하여 항암 효능이 보고된 추출물은 그리 많지 않다. 이번 연구에서는 군소알을 물로 추출하여 얻었으므로 부작용이나 독성이 적다고 할 수 있다. Hwang 등 (2003)은 대장암세포인 HT-29 세포에 차가버섯 열수추출액을 처리하였을 때 대조군에 비해 농도 의존적으로 세포 수가 감소하였다고 보고하였다. 또한 위암세포인 SNU-484 세포에 처리하였을 때도 역시 유사한 결과를 나타내었다고 보고하였다. 간암세포인 H22 세포와 백혈병 세포인 L1210 세포에 표고버섯과 느타리버섯의 추출물을 처리하였을 때도 역시 농도가 증가할수록 세포 수가 감소하여 암세포의 생존율이 감소하였다고 보고하였다 (Park et al., 1998). 이 등 (2003)은 한약재인 길경의 수용액 추출물을 폐암세포에 처리하였을 때, 농도 의존적으로 암세포의 증식을 억제하고 세포의 형태적인 변화를 동반하여 apoptosis를 유발한다고 하였다. 따라서, 이번 연구에서 물로 추출된 SHE는 기존의 용매를 이용한 추출물보다 독성이 적을 뿐 아니라 U-937과 FM3A 세포에 강한 항암 효능을 가진다고 할 수 있겠다.

온도별로 추출한 SHE의 항암 효능을 조사하였을 때, 모든 암세포에서 20°C에서 추출한 SHE가 가장 강한 항암 활성을 나타냈다. 아마도 온도가 높아지면서 그 구조나 효능이 소실된 것으로 사료되어 20°C에서 추출한 SHE가 가장 안정적인 구조

를 가지며, 가장 강한 항암활성을 가지는 것으로 사료된다.

이 연구에서 SHE 처리에 대해 정상세포인 V79-4세포의 IC₅₀ 값은 87.59 $\mu\text{g/ml}$ 로 약간 영향을 받았지만, 암세포에 비해서는 그다지 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 군소의 체액에서 얻어진 추출물에서 항암 효과를 나타낸다는 Yamazaki (1989a)와 Yamazaki 등 (1993)의 연구결과와 아주 유사했다. 또한 Kisugi 등 (19887)은 군소의 알에서, Yamazaki 등 (1989b)은 군소류의 일종인 고동벌 (*Dolabella auricularia*)의 체액에서도 각각 항암효과를 나타내는 성분이 있다고 보고하였다. Yamazaki 등 (1997)은 해양 무척추동물로부터 추출된 추출물질 중 당단백 (glycoprotein)이 항암효과를 나타낸다고 보고하였으며, 정상세포에는 영향을 주지 않고, 암세포에만 영향을 주는 세포용해 요인 (cytolytic factor)을 함유하고 있다고 보고하였다. 따라서, 이러한 결과를 종합해 볼 때 군소류를 포함하는 해양생물에는 항암효과를 나타내는 성분이 많이 함유되어 있다는 것을 확인할 수 있었다.

3.4. SHE가 미치는 암세포 핵의 형태학적 변화 유도

신체를 구성하고 있는 기본단위인 세포는 조직의 항상성을 유지하기 위하여 세포분열과 죽음을 조절하는 시스템이 존재하게 되고 그러한 능동적인 죽음을 자가사멸 (apoptosis) 또는 programmed cell death라고 한다 (Steller et al., 1995). 이 과정에서 원하지 않거나 손상을 입은 세포는 제거된다. 이러한 apoptosis는 세포 내에 본래부터 존재하고 있던 자살 기작이 세포 내부와 외부의 자극에 의하여 활성화되어 계획한 대로 스스로 죽는 현상으로 세포의 괴사 (necrosis)와는 달리 죽어 가는 세포의 내용물이 세포 외로 유리되지 않아 다른 세포나 조직에 손상이나 영향을 주지는 않는다. 형태학적으로는 세포의 비중 감소와 세포막의 파괴 및 염색체의 응축과 더불어 apoptotic body의 형성을 유도하며 식세포 작용을 끝으로 그 작용을 마치게 되고, 생화학적으로는 염색체 DNA가 큰 조각에서 작은 조각으로 갈라지는 DNA 단편화를 유도하게 된다 (Lee et al., 2000a, Jaruga et al., 1998). 따라서, 이러한 apoptosis signal pathway에 의한 암세포의 자살 유도는 다른 정상세포에 대한 손상이나 영향을 최소화 시키면서, 항암 효과를 극대화시키기 위해 요구되어진다. 일반적으로, 중요하게 연구되고 있는 분야로 암세포 성장 억제 기전인 apoptosis에 의해 죽는 세포에 있어서 DNA 측면의 특징 중 하나가 apoptotic body의 형성과 DNA ladder와 같은 DNA의 분절현상이다

(Bortner et al., 1995). 따라서, 세포의 증식을 억제하는 활성이 apoptosis에 의한 DNA 분절현상과 같은 형태학적인 변화와 연관되는 지를 확인하기 위해, 세포 손상 정도를 Hoechst 33342 형광 염색약으로 핵을 염색하여 핵의 손상 정도를 형광 현미경으로 관찰하는 방법을 수행하였다.

20°C에서 추출된 SHE를 U-937 세포에 처리하였을 때, SHE를 처리하지 않은 대조군은 세포핵의 형태가 뚜렷하고 타원형의 모양을 하고 있지만, SHE를 처리한 실험군에서는 세포핵의 형태학적 변화에 영향을 미쳤다. 핵 응축 (nuclear pyknosis)과 apoptotic body의 형성이 농도 의존적으로 증가하는 현상을 확인하였다 (Fig. 9). SHE를 유방암세포인 FM3A 세포에 처리하였을 때도 U-937세포의 결과와 거의 유사하게 나타났다. FM3A 세포에 SHE를 다양한 농도(1, 5, 10, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리하였을 때, 처리하지 않은 대조군에 비해 세포핵의 응축된 형태와 apoptotic body가 역시 많이 관찰되었다 (Fig. 10). 이러한 결과는 Reveiro 등 (2007)의 결과와 유사하였다. Reveiro 등은 U-937 세포에 hydroxycoumarins을 처리하였을 때 핵 응축과 DNA 분절현상을 거쳐 apoptosis를 유도하여 항암 효과를 나타낸다고 보고하였다. 또한 Ajiro (2000)는 Nucleosomal core (H2B)를 처리하였을 때 핵 응축과 DNA 분절현상을 나타낸다고 보고하였다. 이처럼 U-937과 FM3A 세포는 외부로부터 어떠한 자극을 받으면 핵의 내부에서 응축현상을 일으키고, 결국에는 DNA가 깨지는 분절현상을 통해 apoptosis로 유도된다는 것을 알 수 있었다. 따라서, SHE 역시 U-937과 FM3A 세포에서 항암 효과를 나타낼 때, 핵 응축과 apoptotic body의 형성을 유도하여 항암효과를 나타낸다는 것을 확인할 수 있었다.

3.5. SHE 처리에 의한 암세포의 DNA 단편화 유도

DNA 단편화는 DNA 분자가 큰 조각에서 작은 조각으로 갈라지는 현상으로 apoptosis에서 흔히 일어나는 한 현상으로 알려져 있다. 따라서, SHE가 apoptosis의 한 현상인 DNA 단편화에 의한 ladder의 형성을 유도하여 항암 활성을 가지는 지를 확인하기 위해, DNA 전기영동을 통해 DNA 단편화를 측정하였다. 그 결과, 혈액암 세포인 U-937 세포에서 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해, 48시간 동안 SHE와 함께 배양된 경우, 거의 모든 농도 (6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서 DNA 단편화가 농도 의존적으로 유도되었다는 것을 확인하였다 (Fig. 11). 특히, SHE를 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$

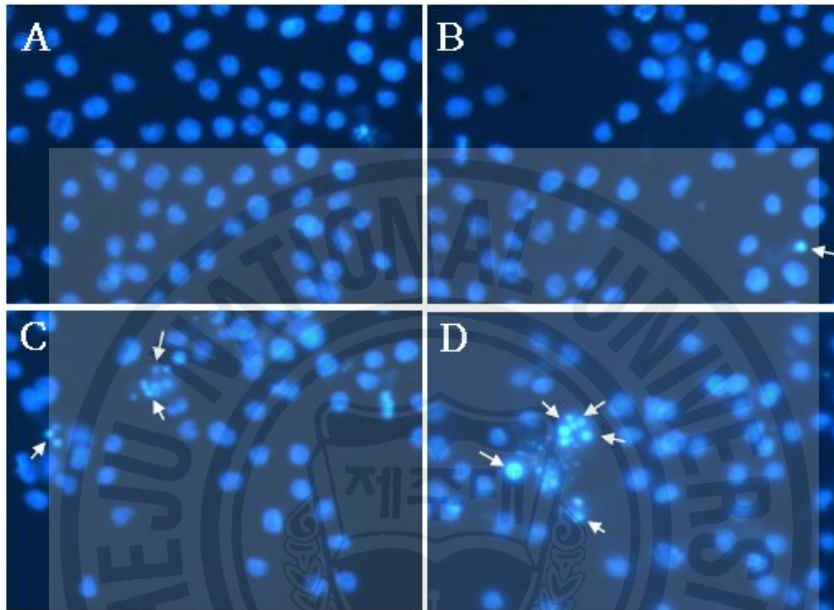


Fig. 9. Morphological changes of leukemic U-937 cells treated with different concentrations of SHE. The cells were treated with SHE and incubated for 48 h at 37°C. Then, the Hoechst 33342-stained nuclei were observed under a fluorescent microscopy using a blue filter. Magnification, $\times 400$. A; Control, B~D; the cells treated with 6.25, 12.5 and 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of SHE.

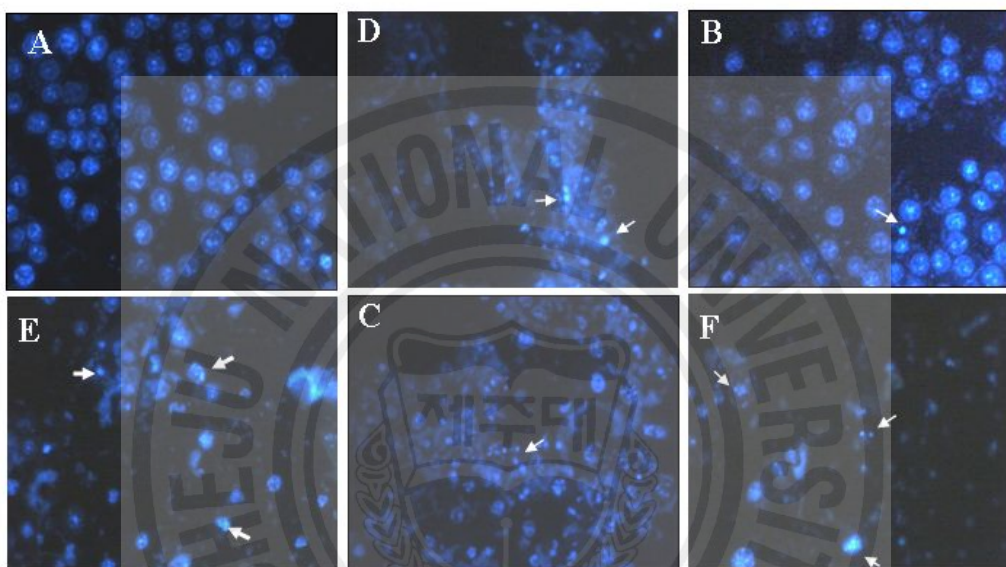


Fig. 10. Morphological changes of FM3A cells treated with different concentrations of SHE. The cells were treated with SHE and incubated for 48 h at 37°C. Then, the Hoechst 33342-stained nuclei were observed under a fluorescent microscopy using a blue filter. A; Control, B~F; the cells treated with 1, 5, 10, 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of SHE.

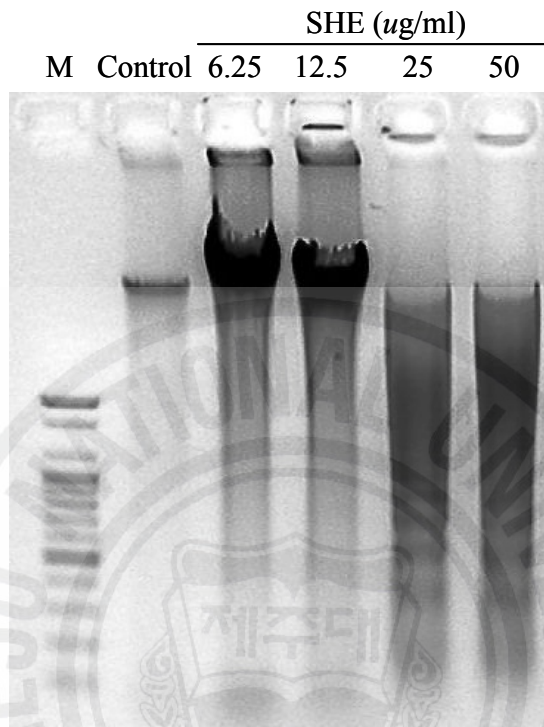


Fig. 11. Induction of DNA fragmentation on leukemic U-937 cells after treatment of SHE. The cells were treated with SHE at different concentrations from 6.25 to 50 $\mu\text{g/ml}$ and incubated for 48 h at 37°C. The genomic DNA was extracted, and analyzed on 1.5% agarose gel. M indicates a size marker of DNA ladder.

이상의 농도로 처리하였을 때, 그 이상의 농도부터는 DNA 단편화가 강하게 유도되면서 DNA ladder의 형성이 급격히 증가되었다는 것을 확인할 수 있었다.

유방암세포인 FM3A 세포에도 SHE를 농도별 (1, 10, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리하였을 때, 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해 다소 DNA 단편화가 유도되었다는 것을 확인하였고, 특히 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 부터 분절화 현상이 나타나기 시작하여 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 농도 의존적인 경향성을 나타내었다 (Fig. 12). 이 결과로부터, SHE는 apoptosis의 현상인 DNA의 단편화를 유도하여 ladder의 형성을 이끌면서 U-937과 FM3A 세포에 대한 항암 효과를 가진다는 것을 알 수 있었다.

이전 연구에서, Amirgofran 등 (2006 and 2007)은 *Linum persicum*, *Euphorbia Cheiradenia*와 *Dionysia termeana*의 추출물이 혈액암인 K562와 Jurkat cell line을 비롯한 human cancer cell line에서 DNA 분절현상을 통해 apoptosis를 유도한다고 보고하였다. 또한, Ajiro (2000)는 FM3A 세포를 mutation시키면 DNA 분절현상은 일어나지 않으며, Jeong 등 (2000)은 키토산 올리고당을 HL-60 세포에 처리하였을 때 농도가 증가할수록 DNA 분자가 갈라지는 apoptotic DNA ladder가 관찰된다고 보고하였다. 이러한 현상은 apoptosis에서 DNA 분절화 단계가 매우 중요한 지표로 적용될 수 있다는 것을 의미하며, 항암 능력의 여부를 조사하는 방법으로도 DNA 분절 현상을 확인하는 것이 매우 중요하다는 것을 직접적으로 보여주는 것이라 하겠다.

따라서, 이 연구에서 사용된 U-937과 FM3A 세포에 SHE를 처리하였을 때, DNA 분절 현상을 통해 apoptosis로 유도된 것은 의미 있는 현상으로 사료된다.

3.6. Alkaline comet assay를 통한 SHE에 의한 암세포의 DNA 손상 유도

Alkaline comet assay는 근본적으로 분자량에 따라 그 이동속도가 반비례되는 전기영동의 원리에 기초하고 있다. 즉 DNA 손상을 입은 세포를 lysis시켜 핵만 남긴 후 전기영동을 하게 되면 DNA 분자량의 크기가 작을수록 핵으로부터 멀리 이동되므로 손상되어 잘려진 DNA 가닥이 많을수록 혜성 꼬리처럼 긴 모양의 DNA tail을 형성하게 된다.

U-937 세포에서 SHE가 DNA 손상을 이끌면서 세포의 성장이나 증식 억제를 유도했는지를 확인하기 위해 SHE를 처리한 결과, Fig. 13과 14에서 보이는 바와 같



Fig. 12. Induction of DNA fragmentation on FM3A cells after treatment of SHE. The cells were treated with SHE at different concentrations from 1 to 50 $\mu\text{g/ml}$ and incubated for 48 h 37°C. The genomic DNA was extracted, and analyzed on 1.5% agarose gel. M indicates a size marker of DNA ladder.

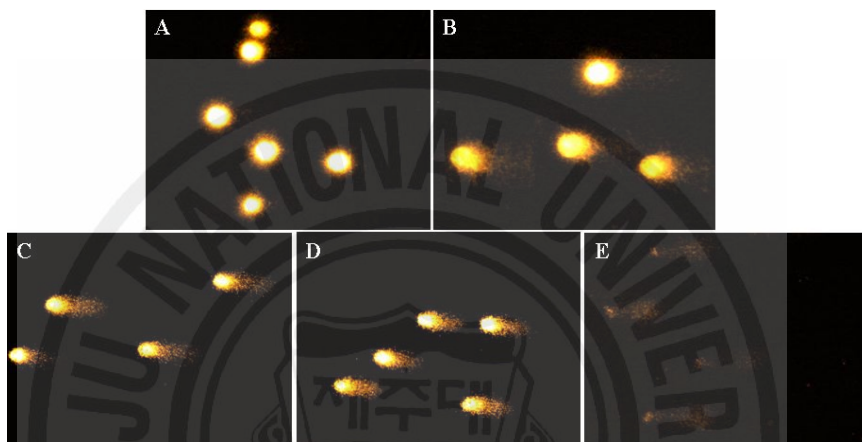


Fig. 13. Comet image of DNA damage on leukemic U-937 cells after treatment of SHE. The cells were treated with SHE at different concentrations from 6.25 to 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and incubated for 48 h at 37°C. The cells were lysed by lysis buffer and the DNA was electrophoresed in 0.7% LMPA at 25 V and 300 mA for 20 min. A; Control, B~E; DNA image of U-937 cells treated with 6.25, 12.5, 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of SHE.

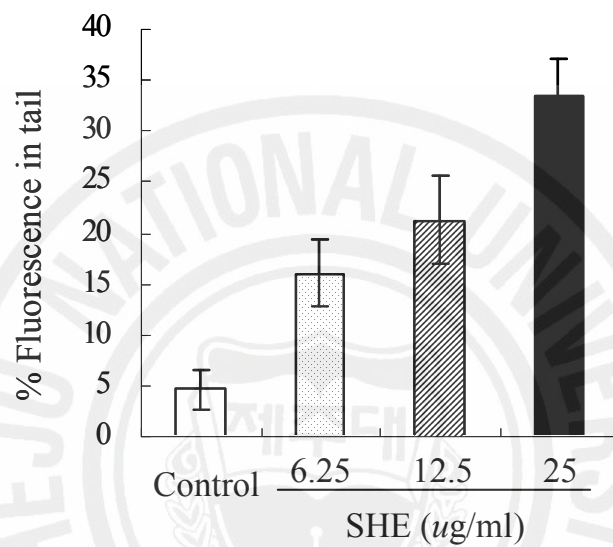


Fig. 14. Effect of SHE on nucleolus DNA damage in leukemic U-937 cells. The cells were treated with SHE at different concentrations from 6.25 to 25 $\mu\text{g/ml}$ and incubated for 48 h at 37°C. The tail in fluorescence of DNA in cells were measured by Komet 4.0 comet image analyzing system (Kinetic Imaging, UK).

이, DNA 손상이 없어 DNA tail의 형성이 거의 없는 대조군에 비해 SHE가 농도별 (6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리된 세포에서는 농도 의존적으로 DNA tail이 각각 약 16.04%, 21.28%, 33.37%, 100%까지 증가되었다는 것을 확인하였다. 특히, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 SHE를 처리하였을 때, DNA tail의 형성이 대조군에 비해 약 8 배나 증가되었으며, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 SHE를 처리하였을 때에는 거의 모든 세포의 DNA가 손상을 입어 DNA tail이 급격히 증가된 것을 확인하였다. 또한, FM3A 세포에 SHE를 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 부터 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 다양한 농도로 처리하였을 때, SHE의 처리농도가 증가됨에 따라 DNA tail의 형성이 대조군의 7.25%에 비해 46.88%까지 증가되었다는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 15와 16). 이러한 결과는 Comet assay를 통하여 다른 약용식물 *B. platyphylla* var. *japonica* 추출물을 HL-60 세포에 처리하였을 때, 처리 시간과 농도에 의존적으로 DNA가 분절화 되는 현상을 증명한 결과와 유사했다 (Ju et al. 2004).

이 결과는 앞에서 제시한 형태학적인 변화에 있어서, 농도 의존적으로 apoptotic body나 DNA ladder의 형성이 증가되었던 것과 연관성 있는 결과였고, SHE가 U-937과 FM3A 세포에 있어 apoptosis 경로의 DNA 분절현상을 이끌면서 암세포의 성장이나 증식을 억제하는 효과와 연관되어진다고 할 수 있다.

3.7. 유세포 분석을 통한 SHE에 의한 암세포내의 DNA 함량 변화

Apoptosis가 유도되게 되면, 일정한 DNA로 절단이 되고, 그렇게 절단된 DNA는 Sub-G₁기에 해당하는 2n보다 적은 DNA 함량을 가지게 된다. 따라서, 암세포의 주기에 따른 암세포 내의 DNA 함량을 유세포 분석기인 flow cytometry assay를 이용하여 측정하였다.

U-937과 FM3A 세포에 다양한 농도의 SHE를 48시간 동안 처리하여 세포의 주기 변화를 확인하였다. 그 결과, U-937 세포에 있어서 아무것도 처리하지 않은 대조군이 sub-G₁가 4.47%인 것에 비해 6.25, 12.5, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 SHE를 처리하였을 때, 농도 의존적으로 8.12%, 9.71%, 23.42%까지 sub-G₁ 수치가 증가되었다는 것을 확인하였다 (Fig. 17과 18). FM3A 세포에 있어서도, SHE를 처리한 후, sub-G₁의 DNA 함량이 농도 의존적으로 증가되었다는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 SHE를 FM3A 세포에 처리한 경우, sub-G₁기의 수치를 상당히 증가시켰고,

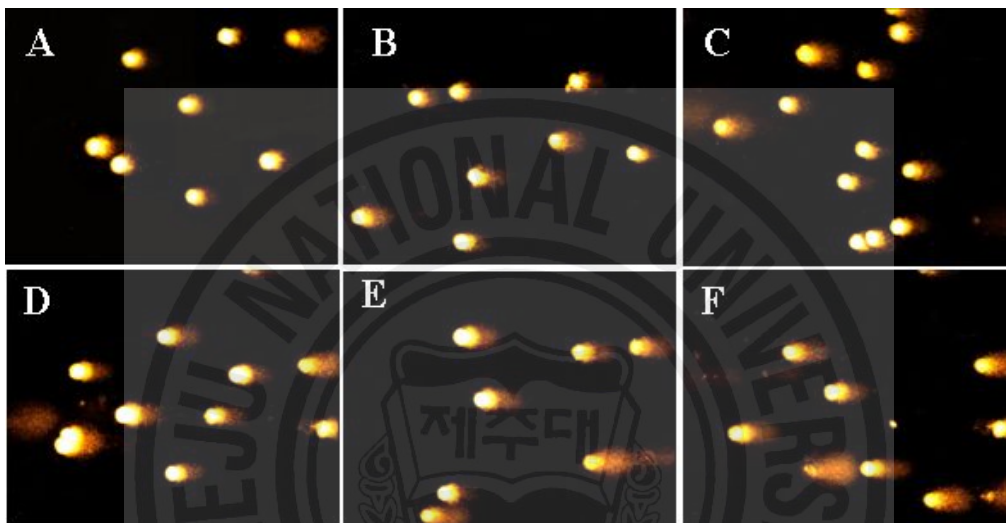


Fig. 15. Comet image of DNA damage on FM3A cells after treatment of SHE. The cells were treated with SHE at different concentrations from 1 to 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and incubated for 48 h at 37°C. The cells were lysed by lysis buffer and the DNA was electrophoresised in 0.7% LMPA at 25 V and 300 mA for 20 min. A; Control, B~F; the cells treated with 1, 5, 10, 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of SHE.

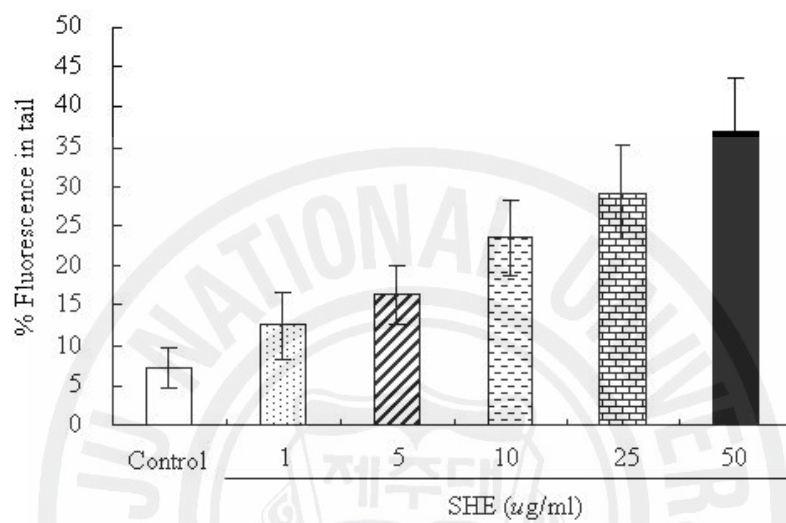


Fig. 16. Effect of SHE on nucleolus DNA damage in FM3A cells. The cells were treated with SHE at different concentrations from 1 to 50 $\mu\text{g/ml}$ and incubated for 48 h at 37°C. The tail in fluorescence of DNA in cells were measured by Komet 4.0 comet image analyzing system (Kinetic Imaging, UK).

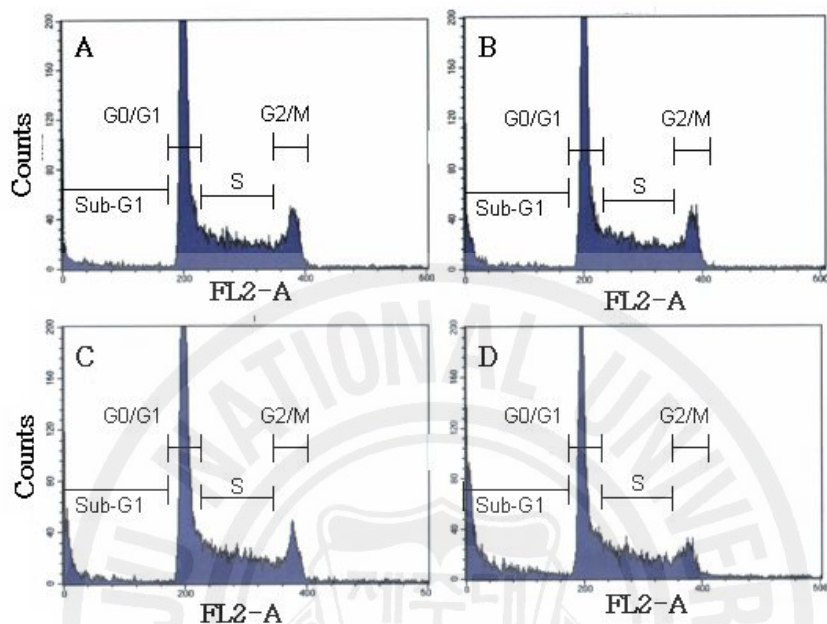


Fig. 17. Effect of SHE on the cell cycle pattern and apoptotic portion in leukemic U-937 cells. The cells were treated with SHE at different concentrations from 6.25 to 25 $\mu\text{g/ml}$ and incubated for 48 h at 37°C. The nuclear fractions of the cells were stained by propidium iodide (PI). Then, the fluorescence intensity was determined using a FACScan flow cytometer and analyzed as DNA histogram by CellQuest software. A; Control, B~D; the cells treated with 6.25, 12.5 and 25 $\mu\text{g/ml}$ of SHE.

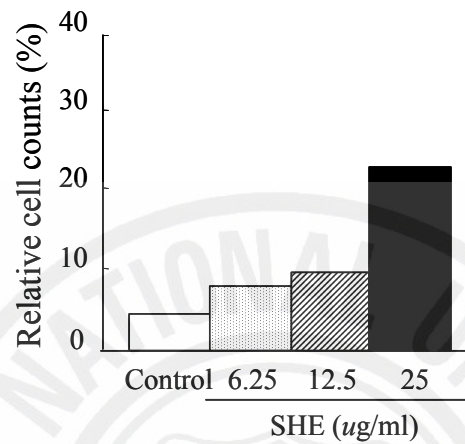


Fig. 18. Bar graph of SHE on the cell cycle sub-G₁ and apoptotic portion in leukemic U-937 cells. The cells were treated with SHE at different concentrations from 6.25 to 25 µg/ml and incubated for 48 h at 37°C. The nuclear fractions of the cells were stained by propidium iodide (PI). Then, the fluorescence intensity was determined using a FACScan flow cytometer and the relative cell counts (%) were analyzed by CellQuest software.

sub-G₁ 주기가 아닌 다른 세포 주기에서는 apoptosis가 너무 많이 일어나서 측정조차 할 수 없었다 (Fig. 19와 20). 위의 결과로부터, SHE는 U-937과 FM3A 세포에 있어 세포 주기 중 sub-G₁에 관여하여 DNA의 합성을 억제함으로써 항암효과를 증대시킨다는 것을 알 수 있었다.

이러한 현상은 Amirgofran 등의 결과와 유사했다. Amirgofran 등 (2006 and 2007)은 식물 추출물을 여러 암세포에 처리하였을 때 sub-G₁기 단계에서 DNA함량이 농도 의존적으로 높게 나타났다고 보고하였다. Tian 등 (2008)은 식물추출물의 일종인 dulxanthone A을 HepG2 세포에 처리하였을 때 S 단계에서 DNA를 arrest 해서 apoptosis를 유도한다고 보고하였다. 또 Yang (2007)은 큰잎모자반 효소추출물을 U-937과 HL-60 세포에 처리하였을 때, 대조군의 sub-G₁기보다 추출물을 처리한 sub-G₁기의 DNA 함량이 높았다고 보고하였으며, Ju 등 (2004)은 *B. platyphylla* var. *japonica*의 추출물을 처리하였을 때 역시 대조군의 sub-G₁기보다 처리군의 sub-G₁기의 DNA 함량이 높아 apoptosis를 유도한다고 보고하였다. 최근에 버섯류인 *Albatrellus confluens*의 grifolin을 human nasopharyngeal carcinoma 세포인 CNE1 세포에 처리하였을 때도 sub-G₁기에서의 DNA 함량 증가와 암세포 증식 억제의 증가를 보고하였다 (Mao et al., 2007). 이러한 경향은 암세포 종마다 다소 차이가 있지만, 항암 능력이 있는 추출물을 처리하면 대부분의 암세포는 sub-G₁기에서 DNA의 함량이 높아져서 apoptotsis가 가장 잘 일어나는 것을 제시해 준다. 따라서, SHE 역시 암세포에 있어서 세포 주기 중, sub-G₁기의 DNA 함량을 높이고, 암세포의 증식을 억제시켜 apoptosis를 유도한다는 것을 확인할 수 있었다.

3.8. Western blot assay를 통한 SHE의 apoptosis 관련 단백질 발현 변화

일반적으로 미토콘드리아를 경유하는 apoptotsis 경로는 주로 Bax와 Bcl-2 단백질의 상호 경쟁적인 발현으로 설명되고 있다 (Boner, 2003, Cory et al., 2002, Gross et al., 1999, Strasser et al., 2000, Suzanne et al., 2003). 또한, apoptosis는 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2 family 단백질과 pro-apoptotic 단백질인 Bax 단백질이 미토콘드리아의 투과성과 cytochrome c의 방출을 제어함으로써 조절된다고 보고되었다 (Korsmeyer et al., 1995).

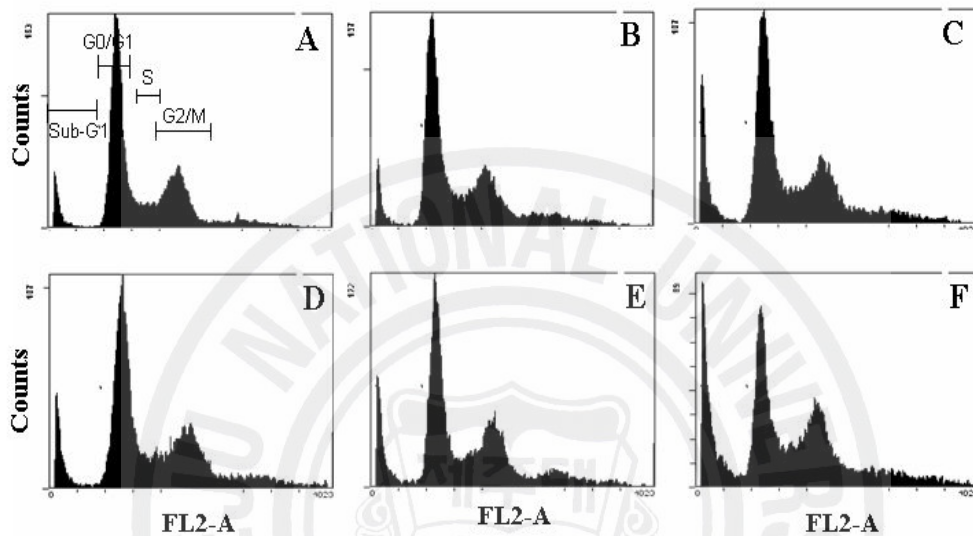


Fig. 19. Effect of SHE on the cell cycle pattern and apoptotic portion in FM3A cells. The cells were treated with SHE at different concentrations from 1 to 50 $\mu\text{g/ml}$ and incubated for 48 h at 37°C. The nuclear fractions of the cells were stained by propidium iodide (PI). Then, the fluorescence intensity was determined using a FACScan flow cytometer and analyzed as DNA histogram by CellQuest software. A; Control, B~F; the cells treated with 1, 5, 10, 25 and 50 $\mu\text{g/ml}$ of SHE.

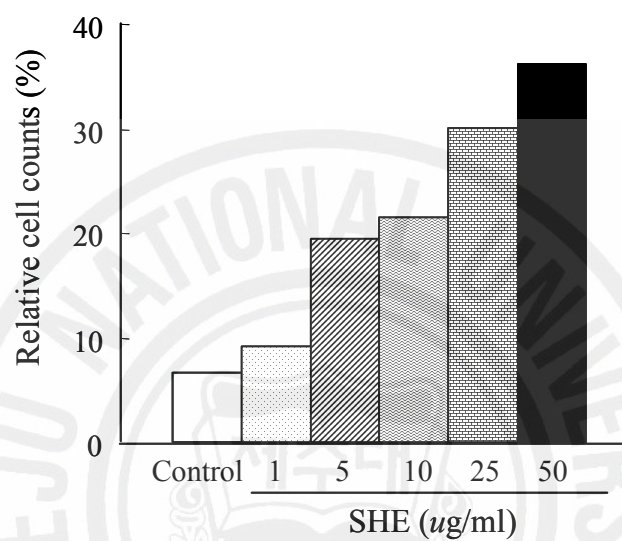


Fig. 20. Bar graph of SHE on the cell cycle sub-G₁ and apoptotic portion in FM3A cells. The cells were treated with SHE at different concentrations from 1 to 50 $\mu\text{g/ml}$ and incubated for 48 h at 37°C. The nuclear fractions of the cells were stained by propidium iodide (PI). Then, the fluorescence intensity was determined using a FACScan flow cytometer and the relative cell counts (%) were analyzed by CellQuest software.

특히, Bcl-2 family 단백질은 apoptosis를 조절하는 아주 중요한 단백질로서, Bcl-2는 Bax와 결합하여 heterodimer를 형성하고 Bax의 활성을 억제함으로써 apoptosis를 억제하는 반면, Bax는 미토콘드리아 막의 투과성과 cyto-chrome c의 방출을 억제함으로써, apoptosis를 증가시킨다고 보고되어져 왔다 (Farrow et al., 1996). 게다가, Bcl-2 family는 Bax의 활성을 억제하는 Cystein acid proteases 계열인 caspase 단백질들에 영향을 주고, 이런 caspase 단백질들은 항암제에 의해 유도된 apoptosis에 있어서 중요한 조절인자로 작용하고 있다 (Hengartner et al., 2000, Thornberry et al., 1998, Debatin et al., 2004). 특히, caspase-3는 apoptosis의 형태학적 특징에서 관여하는 lamin A, α -fodrin, DNA fragmentation factor (DFF), PARP 등의 단백질을 분해하여 apoptosis를 유도한다고 알려져 있다 (Baker et al., 1998).

이 연구에서 U-937과 FM3A 세포에서 SHE가 apoptosis의 유도와 관련이 깊은 Bax나 Bcl-2의 단백질 발현에 어떠한 영향을 주는 지를 알아보기 위해, western blot assay를 수행하였다.

SHE (6.25, 12.5, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 U-937 세포에 처리하였을 때, Bax는 농도 의존적으로 대조군에 비해 그 발현이 증가되는 것을 확인하였으나, Bcl-2의 발현은 거의 변화가 없었다. (Fig. 21). 따라서, SHE는 U-937 세포에서 pro-apoptotic 단백질인 Bax 단백질의 발현을 유도하여 apoptosis를 유도한다는 것을 추정할 수 있었다. 한편, FM3A 세포에서는 Bax의 발현이 대조군에 비해 상대적으로 모든 농도 (1, 10, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서 증가하였고, 반면 Bcl-2의 발현은 농도가 증가함에 따라 상당히 감소되어 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 소실되었다 (Fig. 22). 이러한 경향은 유 등 (2005)의 결과와 유사하였다. 유 등은 피지두와 미숙과의 추출물을 유방암세포주인 MDM-MB-231 세포에 처리하였을 때, Bax는 농도 의존적으로 증가하였으나, Bcl-2는 오히려 감소한다고 하였다. 서 등 (2006)은 유방암세포인 MDM-MB-231 세포에 [6]-gingerol을 처리하였을 때 Bax는 증가하고 Bcl-2는 감소한다고 보고하였으며, Lee 등 (2008)은 sodium fluoride (NaF)를 인간 gingival fibroblast 세포에 처리하였을 때, Bax의 발현은 변화가 없으나, Bcl-2의 감소로 apoptosis가 일어났다고 보고하였다. 따라서, SHE의 자극으로 인해 U-937과 FM3A 세포에 apoptosis가 일어날 때 Bcl-2 family인 Bax와 Bcl-2 단백질의 상호작용에 의해 apoptosis가 조절된다는 것을 확인할 수

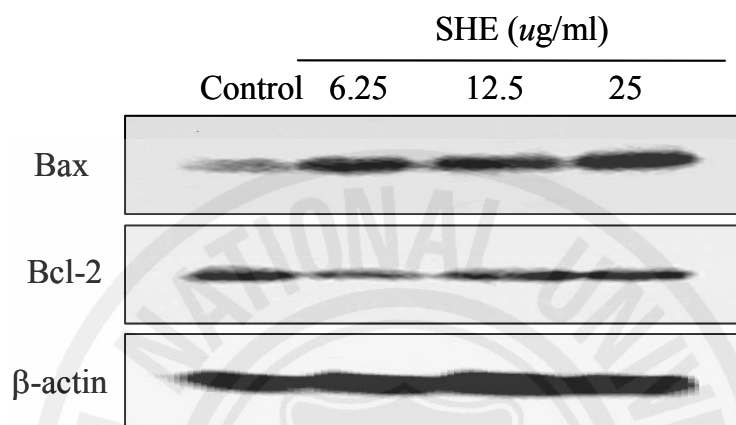


Fig. 21. Effect of SHE on apoptosis-related protein expression level in leukemic U-937 cells. The cells were treated with SHE at different concentration from 6.25 to 25 $\mu\text{g/ml}$ and incubated for 48 h at 37°C. Cytosolic lysates were immunoblotted with anti-Bax and Bcl-2 antibody.

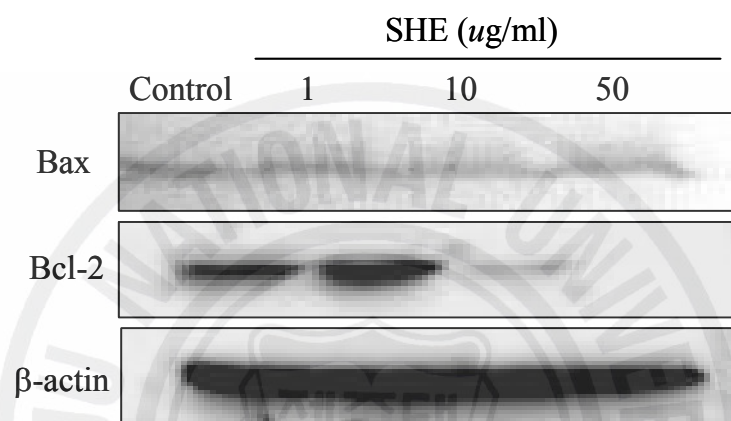


Fig. 22. Effect of SHE on apoptosis-related protein expression level in FM3A cells. The cells were treated with SHE at different concentration from 1 to 50 $\mu\text{g/ml}$ and incubated for 48 h at 37°C. Cytosolic lysates were immunoblotted with Bax and Bcl-2 antibody.

있었다.

Apoptosis의 기전을 규명하는 데 있어서, caspase 단백질의 연쇄적 (cascade) 반응을 규명하는 것은 매우 중요한 의미를 가진다 (Debatin, 2004). Bax와 Bcl-2의 발현 변화와 caspase 단백질과의 연관성을 확인하기 위하여 caspase-8, caspase-9, caspase-3, poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)의 단백질 발현을 조사하였다. U-937 세포에서 SHE에 의한 caspase-8의 발현은 농도 의존적으로 증가하였고, caspase-9의 발현은 대조군과 별다른 차이가 없었다. 또한 caspase-3의 발현은 농도가 증가됨에 따라 다소 감소되었으나, cleaved PARP의 발현은 농도 의존적으로 증가된 것을 확인하였다 (Fig. 23). 그리고, FM3A 세포에서는 SHE 농도가 증가할수록 cleaved caspase-8의 발현은 증가하였고, caspase-9의 발현은 감소하였다. Caspase-3의 발현은 대조군에 비해 농도가 증가함에 따라 다소 감소되었으나, cleaved caspase-3의 발현과 cleaved PARP의 발현은 농도 의존적으로 증가되었다. 또한 PARP의 발현은 감소하였으나, cleaved PARP의 발현은 SHE 농도가 증가할수록 증가하는 경향을 보여주었다 (Fig. 24). 이것은 세포질 내의 apoptosis를 유도하는 caspase cascade 중에서 시작 단계로 알려진 caspase-8의 발현 (Muzio et al., 1998)이 관여한다는 이전 연구와 일치했다. 또한 U-937과 FM3A 세포에서 SHE가 유도한 caspase-8의 발현이 apoptosis의 시작에 관여했다는 것을 의미하고, 세포내에서 apoptosis 신호를 증폭시켜주는 caspase-9의 발현 (Rodriguez et al., 1999, Stennicke et al., 1999, Renatus et al., 2001)은 FM3A 세포에서만 경유하는 것을 사료된다.

일반적으로 암세포의 apoptosis를 유도하는 추출물은 caspase의 활성을 증가시킨다고 보고되고 있는데 (Ye et al., 2005, Joet al., 2005), 복분자 추출물을 대장암 세포인 HT-29에 처리하였을 때 caspase 활성이 증가한 것을 알 수 있었다 (Kim et al., 2005). 이전 연구에서 isoliquilinaen (ISL)을 자궁경부암 세포인 HeLa 세포에 처리하거나 NaF를 인간 gingival fibroblast 세포에 각각 처리하였을 때 농도가 증가할수록 PARP의 발현은 감소하였지만, cleaved PARP의 발현은 증가한다고 보고하였다 (정 등, 2006, Lee et al, 2008). 또한, 견과류에 많이 포함되어 있는 polyphenolic phytoalexin 계열인 resveratrol (RSVL)을 유방암 세포주인 MDM-MB-231에 처리하였을 때, caspase-3와 PARP의 발현은 감소하고, cleaved caspase-3와 cleaved PARP의 발현은 증가한다고 보고하였다 (Alkhalaf et al., 2008).

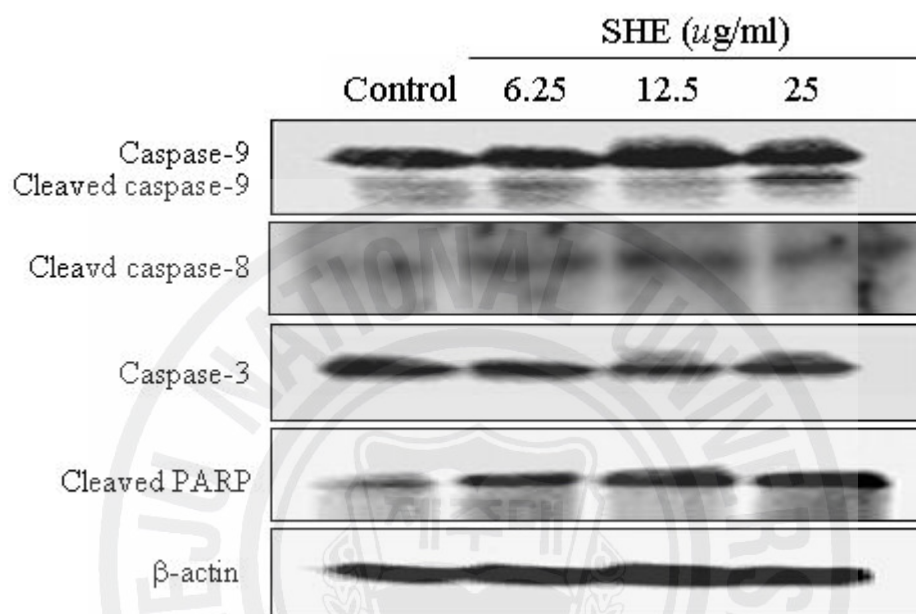


Fig. 23. Effect of SHE on apoptosis-related protein expression level in leukemic U-937 cells. The cells were treated with SHE at different concentration from 6.25 to 25 $\mu\text{g/ml}$ and incubated for 48 h at 37°C. Cytosolic lysates were immunoblotted with anti-caspase-9, cleaved caspase-9, cleaved caspase-8, caspase-3 and cleaved PARP antibody.

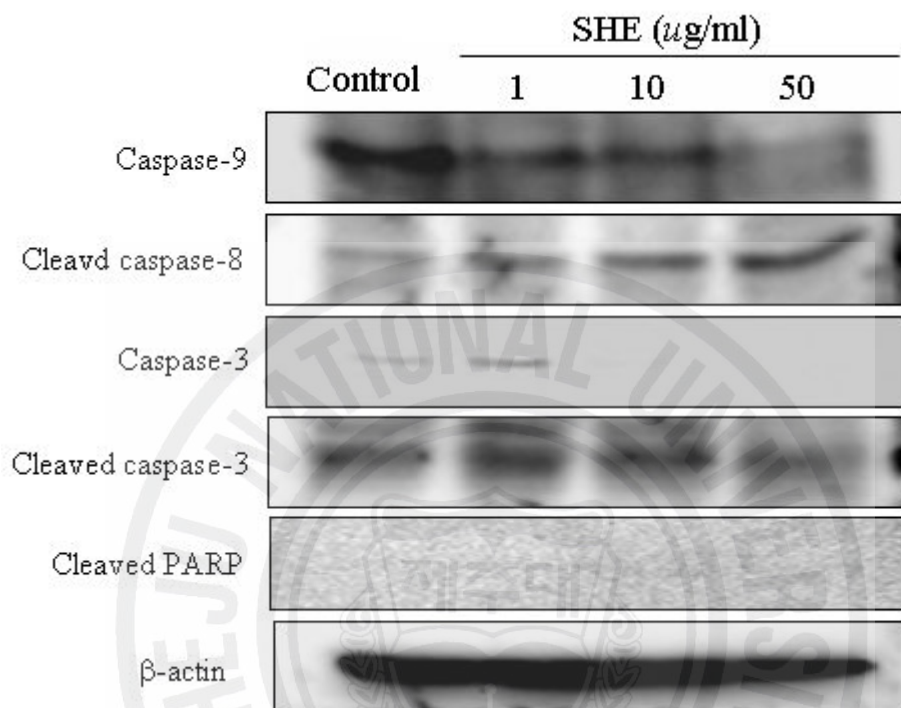


Fig. 24. Effect of SHE on apoptosis-related protein expression level in FM3A cells. The cells were treated with SHE at different concentration from 1 to 50 $\mu\text{g/ml}$ and incubated for 48 h at 37°C. Cytosolic lysates were immunoblotted with anti-caspase-9, caspase-8, caspase-3, cleaved caspase-3 and cleaved PARP antibody.

따라서, SHE의 처리에 의해서 U-937과 FM3A 세포는 일련의 caspase 경로를 통해 중단의 caspase-3를 거쳐 PARP를 활성화시키는 apoptosis가 유도되는 것이라고 사료된다.

3.9. SHE가 처리된 U-937과 FM3A 세포에서 Caspase-3 활성 측정

SHE를 U-937과 FM3A 세포에 처리하였을 때 SHE에 의해 유도된 Caspase-3 단백질 활성을 측정한 결과, U-937 세포에서 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리했을 때를 제외하고는 유의성 있게 농도 의존적으로 증가하였다 (Fig. 25). FM3A 세포에서도 역시 SHE의 농도가 증가함에 따라 caspase-3 단백질 활성이 증가하였고, 특히, SHE 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 그 활성이 상대적으로 상당히 크게 증가하였다는 것을 확인하였다 (Fig. 26). 이것은 앞에서 설명한 caspase-3 단백질 발현 양상과 유사한 결과였다. 특히, caspase-3는 apoptosis downstream 기전에 있어서 매우 중요한 역할을 한다. Caspase-3 단백질이 없으면 다양한 기질 용해성 (substrate cleavage), DNA 분절화 chromatin marginalization과 같은 대부분의 downstream event를 억제한다고 한다 (Slee et al., 2001). 또한, 동물 모델에서도 역시 같은 결과가 증명되었는데, caspase-3 $-/-$ knockout 시키면 membrane blebbing, DNA degradation, nuclear fragmentation과 같은 징후가 완전히 억제된다고 보고하였다 (Woo et al., 1998, Zheng et al., 1998). 이것은 caspase-3 단백질이 apoptosis에 가장 중요하게 작용하는 단백질들 중 한 요소라는 것을 의미한다.

위의 결과를 종합해 볼 때, SHE를 처리하면 U-937과 FM3A 세포는 caspase 의존성 경로를 거쳐서 apoptosis를 유도하는 것으로 사료된다.

3.10. In vivo 상에서 SHE의 FM3A 세포로 유도한 종양 크기 억제

암세포에서 항암 활성을 보인 SHE가 *in vivo* 상에서도 항암 활성을 가지는지를 평가하기 위해, FM3A 세포를 이용하여 유방암을 유도한 마우스에 대한 종양 크기 억제 활성을 평가하였다. 실험은 SHE를 마우스 꼬리 미정맥을 통해 예방 치료군과 예방군으로 나누어 투여하였고, 투여 5주 후에 FM3A 세포를 마우스 피하에 접종함으로써 유방암을 유도하였다. 그 후, 6주간 유발된 종양 크기를 측정함으로써

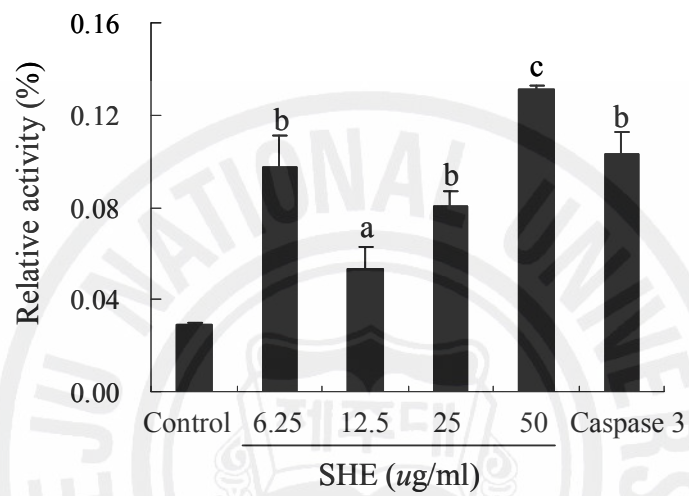


Fig. 25. Effect of SHE on caspase-3 activity in U-937 cells. The cells were treated with SHE at different concentration from 6.25 to 50 $\mu\text{g/ml}$ and incubated for 48 h at 37°C. Cytosolic lysates (50 μg) were applied for caspase-3 assay kit. a; $p < 0.05$, b; $p < 0.005$, c; $p < 0.0005$.

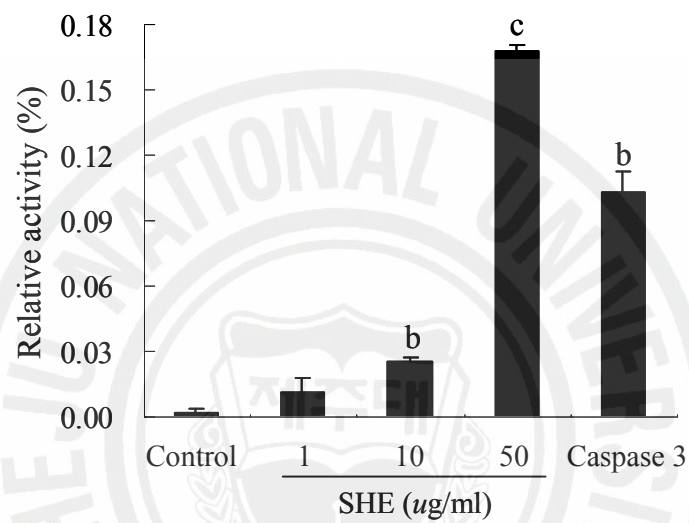


Fig. 26. Effect of SHE on caspase-3 activity in FM3A cells. The cells were treated with SHE at different concentration from 1 to 50 $\mu\text{g/ml}$ and incubated for 48 h at 37°C. Cytosolic lysates (50 μg) were applied for caspase 3 assay kit. a; $p < 0.05$, b; $p < 0.005$, c; $p < 0.0005$.

항암 활성을 확인하였다. Fig. 27과 28에서 보는 바와 같이, 마우스 한 마리당 SHE 30 μg 과 3 μg 을 처리하였을 때, 아무것도 처리되지 않은 대조군에 비해 종양크기가 상대적으로 감소한 것을 알 수 있었다. 특히, SHE 3 μg 을 처리한 예방군은 대조군에 비해 약 2 배정도 유방암의 종양 크기 (부피/ mm^3)를 감소시키는 상당한 효과를 보였다.

또한 예방 치료군과 예방군 모두 농도에 의존적으로 종양 크기를 감소시키진 않았지만, 대조군에 비해서는 유방암 종양 크기의 감소를 유도한 억제 활성을 확인하였으며, 예방군이 예방 치료군보다 다소 좋은 억제 활성을 가졌다는 것을 확인하였다. 이것은 FM3A 세포에 대한 항암 활성과 연관성 있는 결과였다. 세포 상에서 FM3A 세포는 시간이 경과할수록 세포의 성장과 증식을 억제하고, apoptosis라는 세포의 자살시스템을 경유시키면서 DNA의 단편화, 절단, $2n$ 이하의 DNA 형성, apoptotic body 형성 등의 형태적, 유전적인 결과를 초래하였다.

이 결과들로부터, SHE가 FM3A 세포의 성장, 증식을 억제함으로써, 유방암이 유도되었던 마우스에서 FM3A 세포의 덩어리인 종양이 성장, 분화, 증식하는 것을 억제하여 종양의 크기를 감소시켜 항암 효과를 가진 것으로 사료된다.

3.11. SHE와 분자량별 분획물의 고형물 함량과 단백질 함량

이전 연구에서 유채박 단백질로부터 유용한 단백질을 효율적으로 분리하기 위해 한외여과막 분리 시스템을 이용하였고 이것은 이온 강도가 약해지는 것을 억제하고, 단백질 용해도가 증가함으로써 단백질의 손실이 유도되는 것을 보완할 수 있다고 보고하였다 (Lee et al., 1990). 현재 연구에서도 보다 효율적인 단백질의 분리를 위해, SHE를 한외여과막 시스템을 이용하여 분자량별로 분획하여 4 종의 분획물 (1 kDa 이하, 1-10 kDa, 10-30 kDa와 30 kDa 이상 분획물)을 얻었다. 4 종의 분획물과 SHE의 고형물 함량과 단백질 함량을 측정된 결과는 Table 5에 제시하였다. 분획물과 SHE의 고형물 함량은 30 kDa 이상의 분획물이 가장 높았으며, 총 단백질량은 1 kDa 이하의 분획물이 높았다. 그러나, 결과에는 제시하지 않았으나, ml 당 단백질량은 30 kDa 이상의 분획물이 높은 것을 확인하였다. 총 고형물 함량에 대한 단백질 회수율은 1-10 kDa 분획물이 상대적으로 높았다.

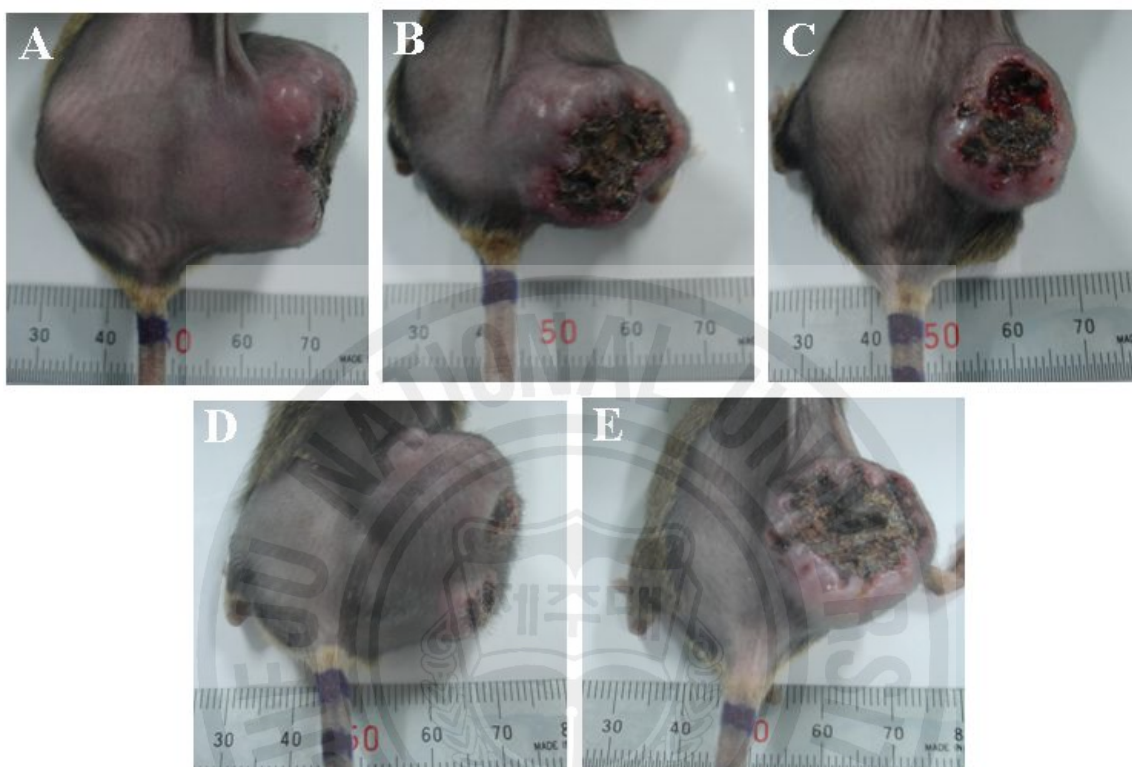


Fig. 27. Image of tumor in breast cancer mouse model induced by FM3A cells. FM3A cells (1×10^6 cells/ $50 \mu\text{l}$ /mouse) were injected into the caudal vein of mouse tail and induced breast cancer mouse model. A; G8 group, B; G9 group treated SHE $30 \mu\text{g}$ /mouse for 5 weeks before induction of breast cancer in mouse, C; G10 group treated SHE $3 \mu\text{g}$ /mouse for 5 weeks before induction of breast cancer in mouse, D; G11 group treated SHE $30 \mu\text{g}$ /mouse for 5 weeks before and 3 weeks after induction of breast cancer in mouse, E; G12 group treated SHE $3 \mu\text{g}$ /mouse for 5 weeks before and 3 weeks after induction of breast cancer in mouse.

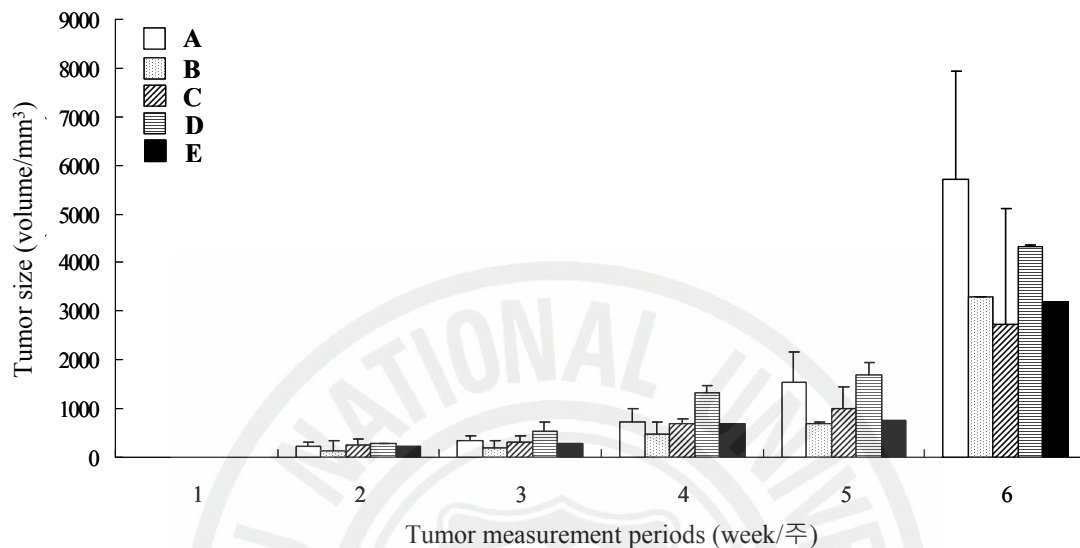


Fig. 28. Inhibition effects of SHE on tumor volume in breast cancer mouse model induced by FM3A cells. FM3A cells (1×10^6 cells/ $50 \mu\text{l}$ /mouse) were injected into the caudal vein of mouse tail and induced breast cancer mouse model. Tumor volume were measured by caliper. A; G8 group, B; G9 group treated SHE $30 \mu\text{l}$ /mouse for 5 weeks before induction of breast cancer in mouse, C; G10 group treated SHE $3 \mu\text{g}$ /mouse for 5 weeks before induction of breast cancer in mouse, D; G11 group treated SHE $30 \mu\text{g}$ /mouse for 5 weeks before and 3 weeks after induction of breast cancer in mouse, E; G12 group treated SHE $3 \mu\text{g}$ /mouse for 5 weeks before and 3 weeks after induction of breast cancer in mouse.

Table 5. The solid and protein contents of fractions from SHE

	Solid (mg/ml)	Total solids (mg)	Total amounts (ml)	Total proteins (mg)	Recovery rate (%) of Protein (mg)
SHE	2.97	8158	2750	1142	14
1 kDa > fraction	1.33	3000	2250	430	14.3
1~10 kDa fraction	0.67	97	145	39	40.2
10~30 kDa fraction	2.33	163	70	22	13.5
30 kDa < fraction	8.97	2555	285	180	7

3.12. SHE와 분획물들의 단백질 분자량 확인

SHE와 여러 가지 분자량의 한외여과막 분리 시스템에서 얻어진 1 kDa 이하, 1-10 kDa, 10-30 kDa, 30 kDa 이상의 분획물 등 분획물 4가지 시료를 가지고, 단백질 분자량을 확인했다.

일반적으로 단백질들은 20가지의 다른 아미노산들이 펩타이드 결합이라고 하는 화학 결합을 통해 길게 연결된 폴리펩티드를 형성하고 이러한 펩타이드가 사슬을 이루어 4차 구조를 형성하고 있다. 이러한 단백질은 SDS에 의해 음 전하를 띄게 되고 강력한 수소결합이 깨지면서 소단위체를 형성한다. 그러나, 때로는 이황화다리(disulphide bridges: cystine)로 결합할 수 있으며, SDS는 이 결합을 깨뜨릴 수 없어 mercaptoethanol을 사용하여 결합을 깨뜨리면 소단위들을 얻을 수 있다.

따라서, 1 kDa 이하, 1-10 kDa, 10-30 kDa과 30 kDa 이상의 분획물에 SDS와 mercaptoethanol을 첨가하여 변성을 시킨 것 (I)과 시키지 않은 것 (II)을 가지고, 15% SDS-PAGE 겔에서 단백질 분자량을 확인한 결과는 Fig. 29에 제시되었다. 그 결과, 두 경우 모두에서 다양한 밴드를 확인할 수 있었으나, 그 밴드들은 분자량에 있어 다소 차이를 보였다. 특히, 항암활성을 보인 30 kDa 이상의 분획물의 경우, 변성 단백질 전기영동에서 20 kDa과 35 kDa 부근에서 두터운 밴드 2개를 확인하였다. 변성시키지 않은 경우에는 30 kDa 이상 분획물에서 35 kDa 부근에서 강력한 단백질 밴드를 확인하였다. 하지만 변성시킨 단백질의 주 밴드인 20 kDa 부근의 단백질 밴드는 거의 나타나지 않은 것을 확인할 수 있었다. 이러한 사실은 변성시키기 전의 35 kDa 부근 단백질들이 변성에 의해 20 kDa으로 전환된 것으로 사료된다. 또한, 분자량이 증가할수록, ml 당 해당하는 단백질량이 다소 증가하는 경향이 있어, 영동 시 단백질에 해당하는 밴드들이 다소 증가한다는 것을 확인하였다.

3.13. SHE와 분획물의 암세포 증식 억제 활성 유도

SHE와 4 종의 분획물 (1 kDa 이하, 1-10 kDa, 10-30 kDa와 30 kDa 이상 분획물)을 가지고 어느 분획물이 U-937 암세포 종에 대한 증식 억제 활성을 가지는지를 확인하기 위해, MTT 분석을 수행하였다. SHE와 4 종의 분획물을 1, 10과 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 24시간 동안 U-937 세포와 함께 배양한 결과는 Fig. 30에 제시하였다.

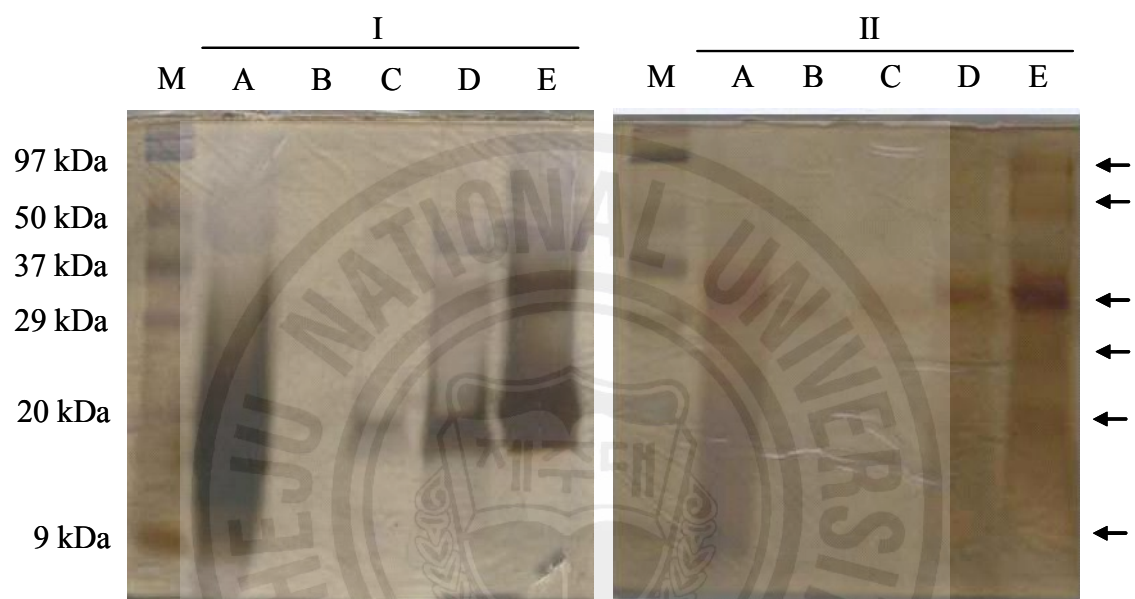


Fig. 29. The molecular weight (M.W) of SHE and fractions fractionated by ultrafiltration system. The fractions and SHE with or without 3-mercaptoethanol were boiled for 3 min at 100°C and loaded into each well of 15% SDS-PAGE gel for 1.5 h at 30 mA. Then, the gel were stained by Silver stain. I; Gel electrophoresed in the condition of protein denaturation, II; Gel electrophoresed in the condition of naturation, M; Maker, A; SHE, B; 1 kDa > fraction, C; 1-10 kDa fraction, D; 10-30 kDa fraction, E; 30 kDa < fraction.

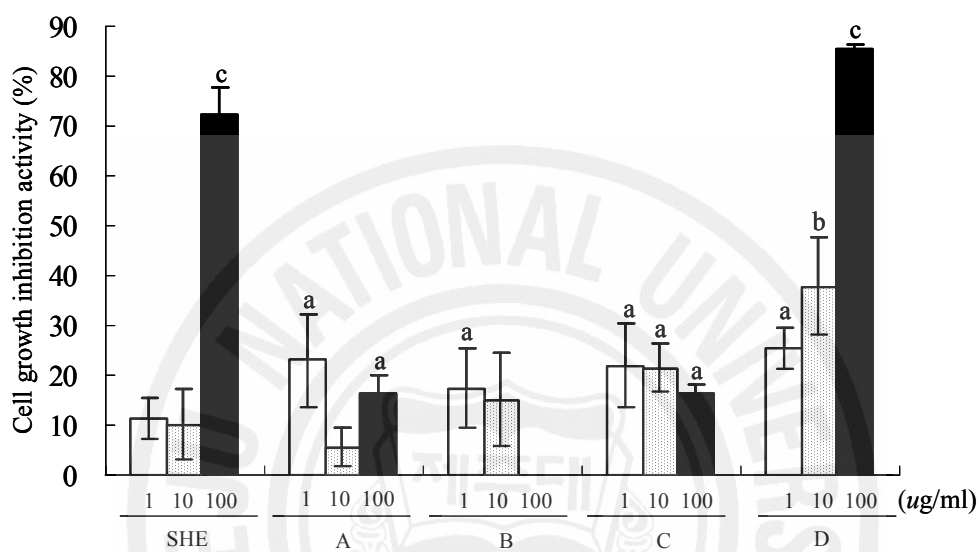


Fig. 30. Effect of cell growth inhibition on leukemic U-937 incubated with SHE and four kinds of fractions obtained from SHE. The 5×10^4 cells were treated with SHE and fractions and incubated for 24 h at 37°C. Then, MTT reagent treated into each well and absorbance of formed formazan in viable cells were measured at 540 nm. Experiments were performed in triplicates and data are expressed as average percent change from control \pm SD. a; $p < 0.05$, b; $p < 0.005$, c; $p < 0.0005$.

그 결과, 30 kDa 이상의 분획물은 다른 세 개의 분획물에 비해 상당히 높은 증식 억제 활성을 보였다. 뿐만 아니라, 그 활성은 SHE를 처리하였을 때보다 높았으며, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 약 90%의 세포 증식 억제 활성을 보였다. 게다가, 30 kDa 이상의 분획물은 농도가 증가함에 따라, 세포 증식 억제 활성을 유의적으로 증가시켰다. 이전 연구에서 군소나 군소알로부터 분리된 단백질인 aplysianin A, P, E와 Dolabellin A 와 C 등이 항종양성의 세포독성 활성과 항균 효과를 가진다고 보고하였다 (Kisugi et al., 1987, 1989a, b, c and 1992, Yamazaki et al., 1989a, b, c and 1990, Kamiya et al., 1989, Iijima et al., 1994). 이것은 30 kDa 이상의 분획물 내에 함유되어있는 다양한 성분들 중, 특징적인 단백질 성분이 암세포의 성장 억제와 연관성을 가질 수 있다는 것을 부여해준다. 이 결과로부터, SHE가 가지는 암세포 증식 활성이 30 kDa 이상의 분획물과 연관됨을 확인하였고, 이것에 의해 분획물 ml 당 단백질 함량과 암세포 증식 억제 활성이 연관되어짐을 확인하였다.

3.14. 겔 여과 크로마토그래피에 의한 물질 분리

30 kDa 이상의 분획물이 가장 좋은 암세포 증식 억제를 유도하였고, 그것과 연관되어지는 활성 단백질의 분리를 위해, 겔 여과 크로마토그래피를 수행하였다. 30 kDa 이상 크기의 분획물이 겔 여과 크로마토그래피를 통하여 총 70개의 분획물을 얻었으며 이들로부터 단백질 함량과 암세포 증식 억제 활성을 측정하였다. 그 결과, 총 70개의 분획물 중, 약 19개의 분획물 (No. 3-21)이 약 50% 이상의 세포 증식 억제 활성을 보였다 (Table 6). 그러나, 나머지 분획물들은 상당수가 암세포의 증식을 유도하였는데, 이것은 특정 분획물들이 SHE와 30 kDa 이상의 분획물이 유도한 암세포 증식 억제 활성과 연관된다는 것을 제시해줬다. 뿐만 아니라, 단백질 함량을 측정하여 암세포 증식 억제 활성과 상대적으로 비교하였을 때, 특이적으로 높은 상관관계를 찾을 수는 없었으나, 이 결과로부터, 소량의 특정 단백질이 암세포 증식 억제 활성과 연관되어질 수 있고, 소량의 단백질 임에도 불구하고 높은 암세포 성장 억제 활성을 가진다는 것을 확인하였다 (Fig. 31).

이 결과로부터, 겔 여과 크로마토그래피로부터 얻어진 특정 분획물 내의 특정 단백질이 암세포 증식 억제 활성을 유도한다는 것을 확인하였다.

Table 6. The U-937 cell growth inhibition activities of fractions obtained from 30 kDa < fraction by gel filtration chromatography

Fractions (No.)	Inhibition activity (%)	Fractions (No.)	Inhibition activity (%)	Fractions (No.)	Inhibition activity (%)	Fractions (No.)	Inhibition activity (%)
A	17.74	16	70.72	34	-53.19	52	-17.38
B	93.03	17	73.37	35	-50.30	53	-17.23
C	72.25	18	68.08	36	-38.01	54	-28.13
Fraction 1	1.56	19	60.44	37	-18.98	55	-44.72
2	19.25	20	54.47	38	-22.59	56	-60.71
3	51.58	21	51.81	39	-40.76	57	-47.05
4	68.60	22	42.42	40	-28.22	58	-51.39
5	77.66	23	33.25	41	4.28	59	-70.79
6	79.02	24	24.11	42	-20.06	60	-21.21
7	81.40	25	39.36	43	-31.13	61	-27.65
8	82.43	26	16.78	44	-32.01	62	-23.02
9	83.86	27	12.54	45	-3.60	63	-9.40
10	80.07	28	-1.86	46	-13.84	64	0.46
11	79.62	29	-4.56	47	-11.39	65	-23.50
12	78.78	30	-36.38	48	-18.23	66	-41.73
13	78.12	31	-44.46	49	-3.03	67	-8.71
14	75.01	32	-48.28	50	-10.57	68	-26.13
15	74.76	33	-41.98	51	-13.14	69	-29.89

* P; PBS, 30 kDa <; SHE 30 kDa< fraction, F-30 kDa<; Filtered 30 kDa < fraction

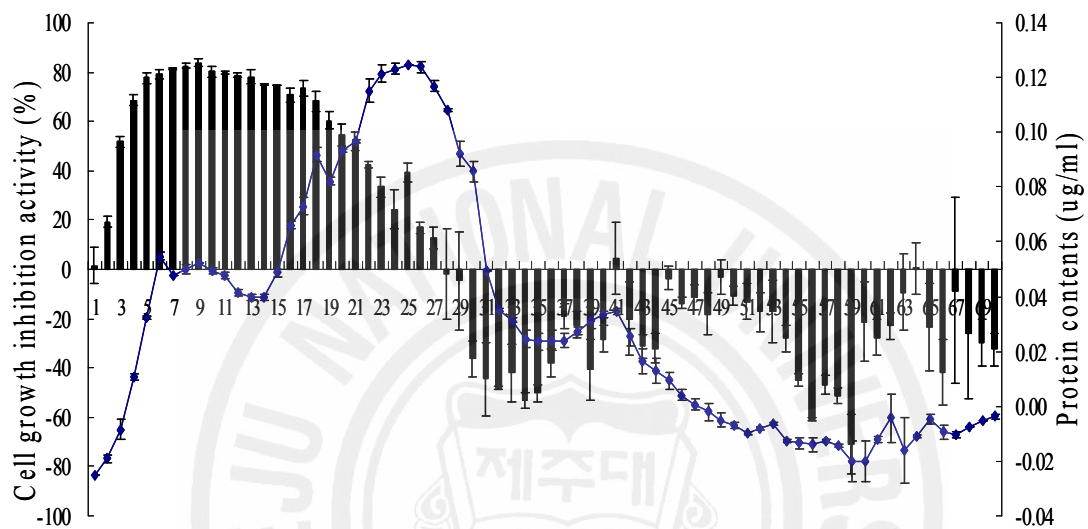


Fig. 31. The U-937 cell growth inhibition activities and protein contents of fractions obtained from 30 kDa < fraction by gel filtration chromatography. 30 kDa < fraction of SHE were centrifuged at 15,000 rpm for 15 min and obtained supernatant. The supernatant of 30 kDa < fraction were filtered and loaded into Sepharose G-100 resin-charged column. Then, the U-937 cell growth inhibition activities and protein contents of the fractions measured by MTT assay and BCA kit, respectively.

3.15. 음이온 교환 크로마토그래피에 의한 물질 분리

30 kDa 이상의 분획물을 가지고 수행한 겔 여과 크로마토그래피를 통해 얻은 분획물 중, 암세포 성장 억제효과를 보이는 분획물들을 모아 활성 단백질의 효과적인 분리를 위해, 음이온 교환 크로마토그래피를 수행하였다. 그것으로부터, 총 58개의 분획물을 얻었고, 그것을 가지고 단백질 함량과 암세포 증식 억제 활성을 측정하였다. 그 결과, 총 58개의 분획물 중, 약 24개의 분획물이 약 40% 이상의 암세포 증식 억제 활성을 보였다 (Table 7). 그러나, 나머지 분획물들은 상당수가 암세포의 증식을 유도하였는데, 이것은 겔 여과 크로마토그래피를 통해 얻은 활성 분획물들이 유도한 암세포 증식 억제가 특정한 분획물과 연관된다는 것을 제시해줬다. 뿐만 아니라, 단백질 함량을 측정하여 암세포 증식 억제 활성과 상대적으로 비교하였을 때, 큰 상관관계를 찾을 수는 없었으나 (Fig. 32), 특정 분획물 내의 함유된 특정한 소량의 단백질이 암세포 증식 억제를 유도했다는 것을 확인할 수 있었다.

3.16. 음이온 교환 크로마토그래피를 통해 정제된 활성 분획물 내의 단백질 분자량 확인

30 kDa 이상 분획물을 가지고 순차적으로 수행한 겔 여과 크로마토그래피와 음이온 교환 크로마토그래피로부터 얻은 활성 분획물을 가지고 보다 더 강한 음이온 교환 크로마토그래피인 mono Q Sepharose 수지를 이용하여 활성성분을 정제하였다. 그것으로부터 얻은 정제된 분획물을 농축하였고, 15-7%의 농도 구배 SDS-PAGE 겔에 각각 40 μ l와 80 μ l를 loading한 결과, 정제된 분획물 내의 함유되어 있는 특정 단백질이 다양한 분자량을 가지고 있으며, 약 5개의 단백질 소단위체를 가진다는 확인하였다. 그 단백질 밴드는 20 kDa 부근과 30 kDa 부근 등 SHE의 30 kDa 이상 분획물이 함유하고 있는 단백질들과 유사함을 보여주었으나, 14 kDa과 66 kDa의 분자량 부근에서 새로운 단백질 분자량들이 확인되었다. (Fig. 33).

Table 7. The U-937 cell growth inhibition activities of fractions obtained from the active fractions by anion exchange chromatography

Fraction (No.)	Inhibition activity (%)	Fraction (No.)	Inhibition activity (%)	Fraction (No.)	Inhibition activity (%)	Fraction (No.)	Inhibition activity (%)
A	14.21	10	69.30	26	37.42	42	-37.99
B	89.60	11	72.29	27	51.85	43	-55.12
C	83.31	12	69.92	28	56.69	44	-48.93
UB1	-87.09	13	66.52	29	52.75	45	-49.76
UB2	-78.73	14	69.51	30	58.53	46	-58.56
UB3	-39.42	15	67.95	31	65.40	47	-57.67
UB4	-57.49	16	63.10	32	65.45	48	-51.16
1	-76.51	17	73.70	33	60.48	49	-37.18
2	-34.27	18	72.28	34	26.55	50	-38.23
3	-7.13	19	68.07	35	-23.76	51	-65.66
4	-12.52	20	64.08	36	-30.41	52	-57.75
5	9.62	21	56.78	37	-43.13	53	-21.18
6	-7.81	22	47.88	38	-40.38	54	-20.44
7	-31.18	23	44.87	39	-38.34		
8	40.39	24	48.41	40	-35.89		
9	63.78	25	36.72	41	-27.44		

* P; PBS, 30 kDa <; SHE 30 kDa< fraction, F-30 kDa<; Filtered 30 kDa < fraction

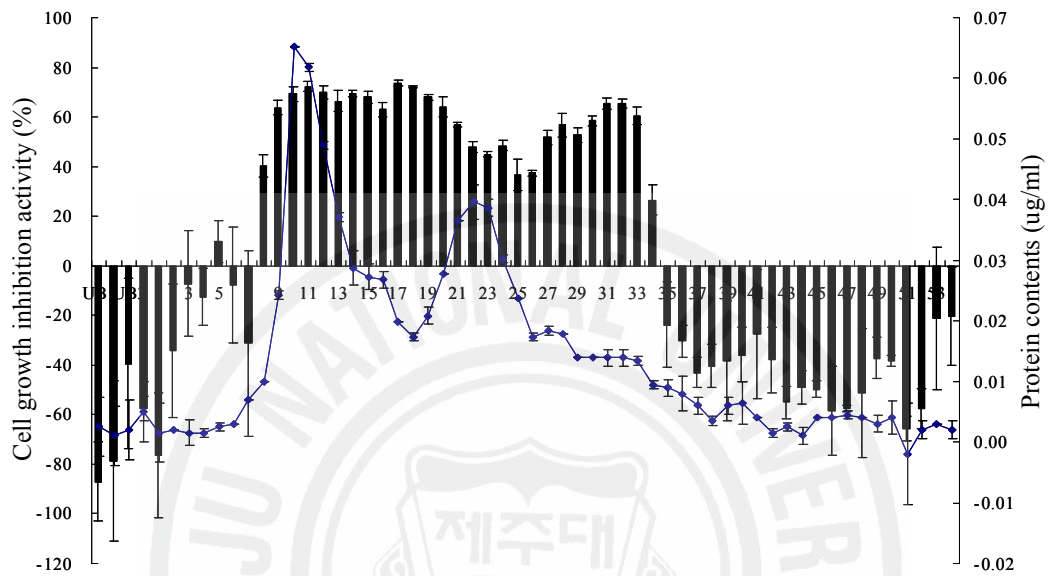


Fig 32. The U-937 cell growth inhibition activities and protein contents of fractions obtained from anion exchange chromatography. The active fractions from gel filtration chromatography were applied into Sepharose Q resin-charged column for anion exchange chromatography. Then, the U-937 cell growth inhibition activities and protein contents of the fractions obtained from measured by MTT assay and BCA kit, respectively.

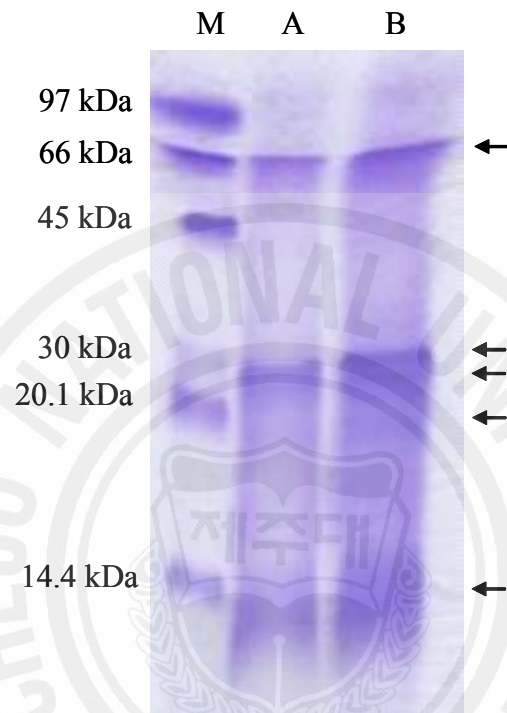


Fig. 33. The molecular weight (M.W) of mono Q-fraction purified from active 30 kDa < fractions obtained by gel filtration chromatography and anion exchange chromatography. The mono Q-fraction with 3-mercaptoethanol were boiled for 3 min at 100°C and loaded into each well of 15-7% gradient SDS-PAGE gel for 1.5 h at 30 mA. Then, the gel were stained with commassie dye. M; Marker, A; 40 μ l of mono Q-fraction, B; 80 μ l of mono Q-fraction.

결 론

제주도 연안에서 채집된 군소알 (Sea hare eggs)로부터 수용성의 물 추출물인 SHE를 제조하였고, SHE는 혈액암세포인 U-937 세포와 유방암세포인 FM3A 세포에 있어서 세포 성장 및 증식을 억제하고, 핵 응축, apoptotic body의 형성, DNA의 단편화와 손상을 유도하며, 세포 주기에 있어서 sub-G₁기에 해당하는 2n 이하 DNA의 절단을 유도하여 결국 apoptosis를 유도한다는 것을 확인하였다.

또한, SHE를 U-937 세포에 처리하였을 때, pro-apoptotic 단백질인 Bax의 발현이 상당히 증가되었으나, Bcl-2의 발현은 거의 변화가 없었고, FM3A 세포에 처리하였을 때는 Bax의 발현이 다소 증가하였으나, Bcl-2의 발현은 상당히 감소되었다는 것을 확인하였다. 뿐만 아니라, apoptosis의 중요 조절인자인 caspase 연속반응 중에서도 시작단계인 caspase-8을 경유하였고, U-937 세포에서는 caspase-9의 발현이 유도되지는 않았지만, FM3A 세포에서는 현저한 발현이 유도되었다. U-937과 FM3A 세포는 모두 caspase-3 단백질의 발현을 억제하고 cleaved caspase-3와 cleaved PARP 단백질의 발현을 증가시켰고 caspase-3 단백질의 활성을 유도하였다는 것을 확인하였다.

그리고 이러한 결과는 FM3A 세포를 가지고 유도한 *in vivo* 상에서의 유방암 마우스 모델에 대한 항암활성 평가 결과와 연관성을 가졌다는 것을 확인하였다. 특히, 3 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 이라는 매우 낮은 용량으로 주사하였을 때에도 약 50%의 높은 항암 효과를 나타내었다. 항암 치료에 대한 방법적인 측면에서 보면, 암의 치료로서의 이용보다는 암의 예방차원으로 이용하는 것이 초기 발암에서 더욱 효과적인 것으로 나타났다. 즉, 세포 수준에서의 apoptosis라는 기작이 동물 실험에서 생성된 종양의 증식, 분화, 성장을 억제시킴으로써, 아마도 SHE가 유방암이 유도된 마우스에서 종양 크기를 감소시킨 것으로 사료된다.

이렇게 항암 활성을 가지는 SHE 유래 활성 물질을 규명하고자, 여러 가지 분자량 크기의 한외여과막 분리 장치를 이용하여 분리하여 30 kDa 이상의 분자량획분에서 높은 항암 활성이 관찰되었다. 이것을 순차적으로 수행한 겔 여과 크로마토그래피와 음이온 교환 크로마토그래피를 통하여 얻어진 특정한 분획물들이 암세포에 대한 성장을 효과적으로 억제할 수 있다는 것을 확인하였다. 특히, 적은 양의 단백질을 함유하고 있는 특정한 범위의 분획물들에서 매우 높은 항암 활성을 보인다는

것을 확인하였다. 또한, 그 분획물을 더 강한 음이온 교환 수지인 mono Q Sepharose에 적용하여 얻은 정제된 분획물을 가지고 전기영동 한 결과, 20 kDa 부근과 30 kDa 부근 등 SHE의 30 kDa 이상 분획물이 함유하고 있는 단백질들과 유사함을 보여주었으나, 14 kDa과 66 kDa의 분자량 부근에서 새로운 단백질 분자량들이 확인되었다. 아마도 이 단백질이 SHE가 가지는 암세포의 성장 억제 활성과 연관되어 있는 것으로 판단되어졌다.

본 연구의 결과를 종합해 보면, SHE는 apoptosis signal pathway를 통해 혈액암 세포와 유방암 세포내 DNA의 단편화, 손상, 절단을 이끌어 성장, 증식, 분화를 억제하고 *in vivo* 상의 유방암 동물 모델에서도 생성된 종양 크기를 억제함으로써 상당한 항암 효과를 가진다는 것과 이 활성은 SHE 내의 특정 단백질에 의해 유도될 수 있음을 알 수 있었다. 또한, 이것은 항암 소재의 개발이나 기능성 소재 측면에서의 천연 소재로서의 매우 높은 잠재성을 가지고 있다고 볼 수 있다.



참 고 문 헌

- Alkhalaf, M., Abdulla E.-M., Waleed, R., Ousama R., Ahmed A. and Rajaa A.-A. (2008). Resveratrol-induced apoptosis in human breast cancer cell is mediated promarily through the caspaase-3dependent pathway. *Archiv. Med. Res.* 39, 162-168.
- Amirgofran Z., Bahmani M., Azadmehr A. and Javidnia K., (2006) Induction in leukemia cell lines by *Linum persicum* and *Euphorbia cheiradenia*. *J/ Cancer Res. Clin Oncol.* 132(7), 427-32.
- Amigofran Z., Bahmani M., Azadmehr H., Ashouri E and, Javidnia K. (2007). Antitumor activity and apoptosis induction in human cancer cell line by *Dionysia termeana*. *Cancer Invest.* 25(7), 550-554.
- Ajiro, K. (2000). Histone H2B phosphorylation in mammalian apoptotic cells. An association with DNA frangmentation. *J. Biol. Chem.* 275(1), 439-443.
- Baker S.J., and Reddy E.P. (1998). Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 17, 3261-3270.
- Banner, S.E., Pastorino, U., Lippman, S.M., and Hong, W.K. (1994). Second internationalcancer chemoprevention conference. *Cancer Res.* 54, 854-860.
- Boner C. (2002). The Bcl-2 protein family : sensorsand checkpoint for life-or-death decisions. *Mol. Biol.* 39(11), 615-647.
- Cory S. and Adams J.M. (2002). The Bcl-2 family : regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer.* 2, 647-656.
- Cory S., Huang D.C.S. and Adams J.M. (2003). The Bcl-2 family : roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22, 8590-8607.
- Debatin K.M. (2004). Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother.* 53, 153-159.
- Farrow S.N and, Brown R. (1996). New members of the Bcl-2 family and their protein partners. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6, 45-49.
- Gross A., McDonnell J.M. and Korsmeyer S.J. (1999). Bcl-2 family members and

- the mitochondria in apoptosis. *Genes. Dev.*, 13(15), 1899-1911.
- Hartwell, L.H. and Weinert, T.A., (1989). Checkpoint: controls that ensure the order of cell cycle events. *Sci.* 246, 629-634.
- Hwang, Y.J., Noh, G.W. and Kim, S.H. (2003). Effect of *Inonotus Obliquos* Extracts on Proliferation and Caspase-3 Activity in Human Gastro-Intestinal Cancer Cell Lines. *Korean Nutri. Soc.* 36(1), 18-23.
- Hengartner M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-777.
- Mun, J.H., Ryu, H.S., Yang, H.S. and Seo, J.S. (1998). Antimutagenic and Anticancer Effects of Glycoprotein and Chondroitin Sulfates from Sea Cucumber (*Stichopus japonicus*). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27(2), 350-358.
- Iijima, R., Kisugi, J., Yamazaki, M. (1994). Antifungal property of Dolabellin A, a putative selfdefense molecule of the sea hare, *Dolabella auricularia*. *Biol. Pharm. Bull.* 17, 1144-1146.
- Iijima, R., Kisugi, J. and Yamazaki, M., (2003). A novel antimicrobial peptide from the sea hare *Dolabella auricularia*. *Dev. Comp. Immunol.* 27(4), 305-311.
- Jaruga, E., Sokal, A., Chrul, S. and Bartosz, Z. (1998). Apoptosis-independent alteration in membrane dynamics induced by curcumin. *Exp. Cell. Res.* 245, 303-312.
- Jeong, Y.W., Kim, K.S., Oh, J.Y., Park, J.C., Lee, J.C., Yoo, K.J., Kim, J.W., Chang, S.J., Baek, W.K., Suh, S.I., Suh, M.H. and Cho, J.W. (2000) Chitosan-oligosaccharides Inhibits HL-60 Cell Growth through Induction of Apoptosis. *J. Chitin Chitosan.* 5(2), 74-78.
- Jo E.H., Kim S.H., Ra J.W. Aruoma O.I., Kim T.Y., Lee Y.S. Kang K.S. and Kang K.S. (2005). Chemopreventive properties of the ethanol extract of chinese licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) root: induction of apoptosis and G1 cell cycle arrest in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Lett.* 230, 239-247.
- Ju, E.M., Lee, S.E., Hwang, H.J. and Kim, J.H. (2004). Antioxidant and anticancer

- activity of extract from *Betula platyphylla* var. *japonica*. Life Sciences 74, 1013-1026.
- Jung, Y.H., Jung, B.M., Shin, M.O. and Bae, S.J., (2006). Anticarcinogenic Effects of Extracts from *Gloiopeltis tenax*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 35(4), 395-401.
- Kada, T., Morita, K. and Inoue, T., (1978). Antimutagenic action of vegetable factors on the mutagenic principle of *Tryptophan Pyrolysate*. Mutat. Res. 53, 351-353
- Kamiya, H., Muramoto, K., Goto, R., Sakai, M., Endo, Y., Yamazaki, M. (1989). Purification and characterization of an antibacterial and antineoplastic protein secretion of a sea hare, *Aplysia kurodai*. Toxicon. 27, 1269-1277.
- Kamiya, H, Sakai, R. and Jimbo, M., (2006). Bioactive molecules from sea hare. Prog. Mol. Subcel. Biol. 43, 215-239.
- Kim E.J., Lee Y.J., Shin H.K. and Park J.H. (2005). Induction of apoptosis by the aqueous extract of *Rubus coreanum* in HT-29 human colon cancer cells. Nutrition 21, 1141-1148.
- Kim, S.A., Kim, J., Woo, M.Y., Kwak, C.S. and Lee, M.S. (2005). Antimutagenic and Cytotoxic Effects of Ethanol Extracts from Five Kinds of Seaweeds. J. Korean Soc. Food Sci Nutr. 34(4), 451-459.
- Kim, K.N., Lee, K.W., Song, C.B. and Jeon, Y.J., (2006). Cytotoxic activity of green and brown seaweeds collected from Jeju Island against four tumor cell lines. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 11, 17-24.
- Kisugi, J., Kamiya H. and Yamazaki M. (1987) Purification and characterization of aplysianin E, an antitumor factor from sea hare eggs. Cancer Res. 47(21), 5649-5653.
- Kisugi, J., Ohye, H., Kamiya, H., Yamazaki, M. (1989a). Mode of action of an antibacterial glycoprotein, Aplysianin E, from eggs of a sea hare, *Aplysia kurodai*. Chem. Pharm. Bull. 37, 3050-3053.
- Kisugi, J., Kamiya, H., Yamazaki, M. (1989b). Purification of Dolabellanin-C an antineoplastic glycoprotein in the body fluid of a sea hare, *Dolabella*

- auricularia*. Dev. Comp. Immunol. 13, 3-8.
- Kisugi, J., Yamazaki, M., Ishii, Y., Tansho, S., Muramoto, K., Kamiya, H. (1989c). Purification of a novel cytolytic protein from albumen gland of the sea hare, *Dolabella auricularia*. Chem. Pharm. Bull. 37, 2773-2776.
- Kisugi, J., Ohye, H., Kamiya, H., Yamazaki, M. (1992). Characterization of an antibacterial protein, Dolabellanin A, from the albumen gland of the sea hare, *Dolabella auricularia*. Chem. Pharm. Bull. 40, 1537-1539.
- Korsmeyer, S.J. (1995). Regulators of cell death. *Trends Genet* 11: 101-105.
- Kuroda, Y. and Inoue, T., (1988). Antimutagenesis by factors affecting DNA repair in bacteria. *Mutat. Res.* 202, 387-391.
- Lee, C.H., Chung, M.C., Lee, H.J. and Kho, Y.H. (2000). An apoptosis regulator isolated from *Petasites japonicum*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32(2), 448-453.
- Lee, E.J. and Sung, M.K., (2001). Effect of Fiber-Rich Sea Mustard Feeding on AOM-Induced colon Aberrant Crypt Formation and Colonic Cell Proliferation in Sprague Dawley Rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30(3), 535-539.
- Lee, J.H., Jung, J.Y., Jeong, Y.J, Park, J.H. Yang, K.H., Choi, N.K., Kim, S.H. and Kim W.J. (2008). Involvement of both mitochondrial- and death receptor-dependent apoptotic pathway regulated by Bcl-2 family in sodium flouride-induced apoptosis of the human gingival fibroblasts. *Toxicol.* 243, 340-347.
- Lee, J.S., Kang, D.S., Kang, Y.J. (1990). Extraction and Purification of Rapeseed Protein. *Korean J. Food SCI. Technol.* 22(7), 780-785.
- 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. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 21(5), 544-550.
- Luesh, H., Harrigan, GG., Goetz, G. and Horgen, FD., (2002). The cyanobacterial orgen of potent anticancer agents originally isolated from sea hares. *Curr. Med. Chem.* 9(20), 1791-1806.

- Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS and Dixit VM. (1998). An Induced Proximity Model for Caspase-8 Activation. *J. Biol. Chem.* 273, 2926-2930.
- Ortega, M.J., Zubia, E. and Salv, A.J., (1997). New polyhalogenated monoterpenes from the sea hare *Aplysia punctata*. *J. Nat. Prod.* 60(5), 482-484.
- Park, M.H., Oh, K.Y. and Lee, B.W. (1998). Anti-cancer of *Lentinus edodes* and *Pleurotus ostreatus*. *Korean J Food Sci Technol* 30(3), 702-708.
- Park, S.Y., Jung, B.M., Choi, Y.H. and Bae, S.J., (2005). Growth Inhibition Effects of Cancer Cell Lines by *Gloiopeltis furcata* Fractions in Vitro. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 35(4), 395-401.
- Park, Y.B., Ahn, J.K., Yoo, S.J., Park, D.C., Kim, I.S., Park, Y.H. and Kim, S.B. (1998a). Elucidation of Anti-Tumor Initiator and Promotor Derived from Seaweed-4: Desmutagenic Principle of *Ecklonia stolonifera* Extracts against Carcinogenic Heterocyclic Amines. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27(3), 537-542.
- Park, Y.B., Kim, I.S., Yoo, S. J., Ahn, J.K., Lee, T.G., Park, D.C. and Kim, S.B. (1998b). Elucidation of Anti-Tumor Initiator and Promotor Derived from Seaweed-2: Investigation of Seaweed Extracts Suppressing Mutagenic Activity of PhIP and MeIQx. *J. Korean Fish. Soc.* 31(4), 581-586.
- Park, Y.B., Kim, I.S., Yoo, S.J., Ahn, J.K., Lee, T.G., Park, D.C. and Kim, S.B. (1998c). Elucidation of Anti-Tumor Initiator and Promotor Derived from Seaweed-3: Anti-tumor Promoters of *Ecklonia stolonifera* Extracts. *J. Korean Fish. Soc.* 31(4), 587-593.
- Renatus, M., Stennicke, H.R., Scott F.L, Liddington R.C. and Salvesen, G.S. (2001). *PNAS*, 98(25), 14250-14255.
- Reveiro, M.E., Monglioni, A., Vazquez, R., Gomez, N., Facorro, G., Piero, L., de Celis E.R., Shayo, C and, Davio, C. (2007). Structural insights into hydroxycoumarin-induced apoptosis in U-937 cells. *Bioorg. Med. Chem.* [Epub ahead of print].
- Rodriguez, J. and Lazebnik Y. (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active

- holoenzyme. *Genes Dev.* 13(24), 3179-3184.
- Shon, Y.H., Jeune K.H. and Choi S.J., (1998). Chung S.R. *Life Science ; Antitumor Effect of Asterina pectinifera Lectin on Ascitic Tumor.* *Yakhak Hoeji.* 42(4), 99-105.
- Singh, N.P. Graham, M.M. Singh, V. and Khan, A. (1995). Induction of DNA single-strand breaks in human lymphocytes by low doses of X-rays. *Int. Radiat. Biol.* 68, 563-569.
- Slee E.A., Adrain C. and Martin S.J. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276, 7320 - 7326.
- Song, G.S., Ahn, B.Y., Maeong, I.K., Kwon, Y.J., Han, S.B. and Choi, D.S., (1997a). Antimutagenicity screening of water extracts from Chinese herbs with SOS Chromotest with several direct mutagens. *Food Sci. Biotechnol.* 6: 214-218.
- Song, G.S., Ahn, B.Y., Lee, G.S., Maeong, I.K. and Choi, D.S., (1997b). Effect of hot water extracts from medicinal plants on the mutagenicity of indirect mutagens. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29, 1288-1294.
- Steller H. (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267, 1445-1449.
- Stennicke, H.R., Deveraux Q.L., Humke, E.W., Reed, J.C., Dixit, V.M. and Salvesen G.S. (1999). Caspase-9 Can Be Activated without Proteolytic Processing. *J. Biol. Chem.* 274(13), 8359-8362.,
- Strasser A., O'Connor L. and Dixit V.M. (2000). Apoptosis signaling. *Ann. Rev. Biochem.* 69, 217-245.
- Thornberry N. and Lazebnik Y. (1998). Caspase; enemies within. *Science* 281, 1312-1416.
- Tian Z., Shen J., Moseman A.P., Yang Q., Yang J., Xiao P., Wu E. and Kohane I.S. (2008). Dulxanthone A induces cell cycle arrest and apoptosis via up-regulation p53 through mitochondrial pathway in HepG2 cells. *Int. J. Cancer.* 122(1), 31-38.

- Toddy, B. (2006). Drug discovery and seahares: bigger is better. Trends. Biotechnol. 24(1),
- Watson, R.R. and Leonard, T.K., 1986. Selenium and vitamin A, E and C: nutrients with cancer prevention properties. J. Am. Diet Assoc. 86, 505-510.
- Woo M., Hakem R., Soengas M.S., Duncan G.S., Shahinian A., Kagi D., Hakem A., McCurrach M., Khoo W., Kaufman S.A., Senaldi G., Howard T., Lowe S.W. and Mak T.W. (1998). Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. Genes Dev. 12, 806 - 819.
- Yamazaki, M. Kimura K., Kisugi J., Muramoto K. and Kamiya H. (1989a). Isolation and characterization of a novel cytolytic factor in purple fluid of the sea hare, *Aplysia kurodai*. Cancer Res. 49(14), 3834-3838.
- Yamazaki, M., Tansho S., Kisugi J., Muramoto K. and Kamiya H. (1989b). Purification and characterization of a novel cytolytic factor in purple fluid of the sea hare, *Dolabella auricularia*. Chem. Pharm. Bull. 37(8), 2179-2182.
- Yamazaki, M., Kisugi, J., Kamiya, H. (1989c). Characterization of an antineoplastic glycoprotein, Dolabellin A, from the albumen gland of a sea hare, *Dolabella auricularia*. Chem. Pharm. Bull. 37, 3343-3346.
- Yamazaki, M., Ohye, H., Kisugi, J., Kamiya, H. (1990). Bacteriostatic and cytolytic activity of purple fluid from the sea hare. Dev. Comp. Immunol. 14, 379-383.
- Yamazaki, M. (1993). Antitumor and antimicrobial glycoproteins from sea hares. Comp. Biochem. Physio. C. 105(2), 141-146.
- Yamazaki, M., Kisugi, J. and Iijima, R. (1997). Antineoplastic glycoproteins in marine invertebrate. Gan To gaku Ryoho, 24(11), 1477-1185.
- Ye M., Xiangian L., Lili L., Ying S., Ming T., Xinxian W., Wei L., Jikai L., and Ya C. (2007). Grifolin, a potential antitumor natural products from the mushroom *Albatrellus confluens*, induces cell cycle arrest in G1 phase via the ERK1/2 pathway. Cancer Lett. 258(2), 199-207.
- Zheng T.S., Schlosser S.F., Dao T., Hingorani R., Crispe I.N., Boyer J.L. and Flavell R.A. (1998). Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events

associated with Fas-mediated apoptosis in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 13618 - 13623.

김성환. 영지버섯 다당체의 항미생물작용 및 항암작용에 관한 연구. (1999). 한국식품영양과학회지. 27(6). 1183-1188.

서은경 김우경.(2006). [6]-Gingerol이 인체 유방암세포 MDA-MB-231에서 Bcl-2와 Bax 발현에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지. 35(6), 671-676.

신동화. (1999). 우리나라 고유 식용 생물자원으로부터 향균, 향암, 향종양 및 향산화 물질의 분리 및 이용. 농림부.

양민석, 박기훈, 최상도, 김만배. (2000). 지리산 자생약초로부터 신기능성 물질의 개발;1. 향암 및 향균 활성물질의 탐색과 분리;2. 신기능성 식품첨가제 개발; 3. 신기능성물질의 구조동정 및 천연물 전합성;4. 자생약초 수집과 재배기술 확립. 농림부.

양형필. (2007). 큰입모자반 효소추출물의 항산화 및 항암물질 연구. 제주대학교 박사 학위논문.

이성열, 이재훈, 김원일, 배송자, 박동일, 최영현. (2003). 길경 수용액 추출물에 의한 인체 폐암세포의 apoptosis 유발에 관한 연구. Kor. J. Life Sci. 13(2), 154-162.

이홍금, 이유경. (2002). 해양 생물공학 (2): 조류 (Algae) 의 산업적 이용. 한국미생물생명공학회. 15(2). 19-25.

유미희, 임효권, 황보미향, 이지원, 이인선. (2005). 피자두 (*Prunus salicina* Lindl. cv. Soldam)미숙과의 apoptosis 유도 효과. 한국식품과학회지. 37(2), 221-227.

정선욱, 김윤옥, 김숙현, 권상훈, 조치흠, 차순도. (2006). 자궁경부암 세포주에서 isoliquiritzenin의 세포자멸사 유도 효과. 부인종양. 17(1), 47-53.

감사의 글

나 자신이 변화가 필요할 때 마침 다시 공부할 수 있는 기회가 주어져 감사한 마음과 한번 해보자는 마음으로 도전을 했고, 조금 늦게 다시 학업을 시작하는 것이라 혹시 열심히 공부하는 후배들에게 누가 되지 않을까 내심 조심하면서 항상 모범이 되고 최선을 다하고자 매번 다짐하며 무사히 학위과정을 마치게 되었습니다. 심적 부담을 털고 학업을 포기하지 않게 상담과 조언을 해주시고, 또한 이 논문이 나오기 까지 물심양면으로 지도해 주신 전유진 교수님께 머리숙여 감사드립니다. 좋은 논문이 될 수 있도록 많은 조언과 도움을 주신 심사위원장 허문수 교수님께 감사드리며, 또한 심사를 맡아주신 김소미 교수님, 김기영 교수님께도 감사드립니다. 특히 멀리 부경대학교에서 애정을 가지시고 손수 심사하여 주신 김세권 교수님께 무한한 감사를 드립니다. 대학원 과정에서 많은 가르침을 주신 이기완 교수님, 송춘복 교수님, 여인규 교수님, 이제희 교수님께도 감사드립니다. 또한 학교에 갈 때마다 항상 따뜻하게 맞아주신 김수현 교수님, 하진환 교수님, 이경준 교수님, 이영돈 교수님께도 감사 드립니다.

이 논문이 나오기까지 많은 조언을 해주신 진창남 박사님, 정창화 박사님, 이정석 박사님, 양현필 박사님, 허수진, 김길남, 차선희 후배님과 따뜻하게 학업을 할 수 있도록 환경을 만들어 주고, 잘 챙겨 준 세종선 전무이사님, 양문휴, 김만철, 문영건, 오철홍 후배님께도 감사 드립니다. 특히 이 논문이 완성될 때 까지 실험과 관련하여 많은 도움을 준 안경진 박사님, 안긴내 후배님께 정말 고마운 마음을 전합니다. 이 밖에도 연구실에서 같이 생활한 이승홍, 강성명, 고석천, 김아름다슬, 한선영, 신우석 후배님에게도 고마운 마음 전합니다. 현재 (주) 바이넥스에 몸을 담고 근무하면서 학위과정을 무사히 마칠 수 있도록 시간을 허락해 주시고 격려를 해주신 존경하는 이백천 회장님께 감사드리며, 또한 아낌없이 성원해 주신 안경출 사장님, 임영식 이사님, 나채국 이사님께도 감사한 마음 전합니다. 무한 신뢰로 저의 업무공백을 잘 메꾸어 준 (주) 바이넥스 사우님들께도 무한한 감사를 드립니다.

항상 장손인 큰아들이 잘 되기를 소원하시는 아버지, 어머니께 머리숙여 감사드립니다. 더불어 염려해 주신 큰처남, 큰처형등 처가 가족들에게 고마움 마음을 전합니다. 사랑하는 동생 막내 원출이 가족, 두 여동생 점화, 수정이 가족들에게도 고마운 마음 전합니다. 끝으로 늘 옆에서 힘든 가게 일에도 불구하고 진심으로 따뜻한 내조를 아끼지 않는 아내 영란에게 표현할 수 없는 고마움과 기쁜 마음을 전합니다. 이제 고3이 될 아들 상민이, 제일로 사랑하는 고1이 되는 공주 다솔이에게 부족하지만 최선을 다하고, 열심히 노력한 작은 결실인 이 논문을 바칩니다. 일일이 열거하지 못한 지인들에게도 이 지면을 통해 고마움을 전합니다.