pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 32, No. 1, pp. 70~74 (2017)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2017.32.1.70

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

해양생물 추출물의 대장암세포주에 대한 항암 작용 검색

정주희*
덕성여자대학교 약학대학

Anti-cancer Effect of Marine Resources Against Human Colorectal Cancer Cells

Joohee Jung*
College of Pharmacy, Duksung Women's University
(Received October 4, 2016/Revised October 27, 2016/Accepted November 27, 2016)

ABSTRACT - Recently, the area of marine resources has become concerned with sources for the next generation of the bio-industry. Until present, development of the marine resources has remained limited, although a large number of these resources are considered to have potential for various significant biological activities. Most marine sponges, marine algae and coral could be used to create specific compounds for survival against a harsh environment. Therefore, it was necessary that these materials needed to be elucidated with biological activities, such as like anti-inflammatory, anti-viral or anti-cancer effects for their utilization in the bio-industry. In this study, we screened extracts of marine resources for their anti-cancer effect on human colorectal cancer cells. These resources were collected at Kosrae of Micronesia on April, 2013 and extracted with methanol. Cytotoxicity of marine resources was observed. Of a total of 20 specimens, three specimens dose-dependently demonstration inhibition of cell viability. Furthermore, cells treated with these specimens for 48h were induced p53, p21, Bax and caspase-3. The results suggest that they involved p53-mediated apoptosis. Two positive specimens (1304KO-327 and 1304KO-329) were verified as the identical materials, which are *Hyrtios* sp. Unfortunately 1304KO-207 was not yet classified and needed to identify in the further study. There results suggested that marine resources with positive potential in anticancer effect would be good candidates as useful bio-resources.

Key words : Colorectal cancer cell, Cytotoxicity, Marine resources, Screening

해양은 지구 표면적의 70% 이상을 차지하고 있음에도 불구하고 제한적인 연구로 인하여, 해양에서 얻어지는 생물자원의 활용은 매우 미비한 상태이다. 하지만, 차세대 바이오산업의 중요한 원천으로 해양생물자원의 관심이 증대되면서 풍부한 해양생물자원의 확보와 함께 그에 대한 생리활성의 연구가 이루어지고 있다[1,2]. 해양생물자원 중에 포함된 다양한 생리활성 물질들에 대한 뛰어난 항균작용[3], 항염작용[4,5], 항바이러스작용[6,7] 및 항암작용[8,9] 등이 보고된 바 있다. 이는 대부분 해면동물, 해조류, 산호 등의 해양생물이 외부의 물질에 방어를 위하여 만들어내는 대사산물들로 여겨지고 있으며 이들의 개발이 천연유래 신소재 개발에 활용될 것으로 보인다[10]. 이를 위하여 우선적으로는 확보된 해양생물자원 중에서 생리활성을 나타내는 물질을 검색할 필요가 있다.

암은 지속적인 증식 신호, 성장 억제 무시, 면역 제어 회피, 끊임없는 복제 가능, 암 촉진 염증, 혈관신생, 침윤 및 전이, 유전체 불안정 및 돌연변이, 세포 죽음 저항, 자유로운 세포 에너지대사 등의 특징[11]을 가지고 있어 어느 하나를 표적화하여도 다른 요인들에 의해 저항성을 획득하여 내성암 혹은 전이암이 발생하여 암치료에 난황을 겪고 있는 실정이다. 세계의 사망률 1위를 차지하는 암에 대한 치료에 효과적인 항암 물질을 개발하는 것이 중요하다. 그 중에서도 천연물의 추출물은 각각의 성분들이 가지고 있는 생리 활성이 합쳐져 복잡적인 효능을 보일 수 있다는 것이 장점이다. 암 중에서도 대장암은 우리나라 남성 암 발생 중 위암에 이은 2위를 차지하고 있으며, 지난 10여 년동안 꾸준히 증가하고, 이로 인한 사망률도 전체 암 중에 4위를 차지하였다[12]. 이는 식습관의 변화에 따라 증가되고 있는 것으로 생각되며, 최근엔 여성에서도 발생률이 증가하는 추세이다. 따라서, 대장암의 예방 및 치료 효과

*Correspondence to: Joohee Jung, College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 01369, Korea
Tel: 82-2-901-8731, Fax: 82-2-901-8386
E-mail: joohee@duksung.ac.kr

를 높일 수 있는 활성 물질을 찾는 것이 중요하다. 따라서, 본 연구에서는 해양생물 추출물들을 가지고 대장암세포의 증식억제 작용을 검색하고 도출된 물질들의 항세포 증식의 기전을 살펴보였다.

Materials and Methods

실험재료

본 연구에서 사용된 시료들은 한국해양과학기술원에서 제공받은 1 mg의 해양생물의 메탄올추출물을 사용하였다. 이는 2013년 4월 마이크로네시아 코스라에(Kosrae)의 인근 바다에서 채취한 생물의 추출물들로 바로 동결건조시킨 후, 메탄올로 추출한 것이다[13]. 제공받은 시료는 멸균수로 5 mg/mL로 녹인 후 분주하여 –20ºC에 저장하고 세포독성시험 실시할 때 필요 농도로 희석하여 사용하였다.

세포 배양

대장암세포주 HCT116는 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% streptomycin/penicillin을 첨가한 RPMI-1640 배지에 배양하였다. 37ºC, 5% CO_2 배양기에서 계대배양하면서 성장기의 세포를 사용하여 실험하였다.

Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay

96-well plate의 각 well당 세포를 5×10^3 cells씩 넣고, 37ºC, 5% CO_2 배양기에서 16시간 배양하였다. 보관되어 있던 시료를 처리 전에 증류수로 2배씩 단계 희석하였다. 각 well당 2 μL씩 배지 내에 첨가하고 48시간이 경과한 후에 CCK-8를 10 μL씩 넣고 37ºC에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응 결과는 microplate reader (Infinite M200PRO, TECAN, Austria)를 사용하여 480 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다. 세포생존율을 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{시료 처치군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광}} \times 100$$

Western blot analysis

HCT116 세포(1×10^5 cell/well)를 6-well plate에 접종한 후, 하루 동안 37ºC에서 배양하였다. 세포독성시험을 통해 증식억제작용이 있는 시료들을 25, 50 또는 100 μg/mL으로 24 혹은 48시간동안 처리하였다. 세포는 RIPA buffer를 이용하여 모은 후, 4ºC에서 14,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 단백질을 추출하였다[14]. BCA assay 방법을 이용하여 단백정량하고, 12% gel에 SDS-PAGE를 실시하였다. PVDF membrane (0.22 μm pore)에 단백질을 옮기고, 항-p53항체(1:1000), 항-p21항체(1:1000), 항-PUMA항체(1:1000), 항-Bax항체(1:1000), 항-caspase-3항체(1:1000) 및 항-β-actin 항체(1:5000)를 4ºC에서 하룻밤 반응시켰다. 각각의 항체에 대응하는 2차 항체(항-마우스항체 및 항-토끼항체, 각각 1:3000)를 반응시킨 후, ECL용액으로 반응시켜 단백질의 발현 정도를 chemi-Doc으로 검출하였다.

통계학적 분석

실험결과는 평균값과 표준편차를 사용하여 나타냈다. Student *t*-test 분석을 통해 실험 결과의 유의성을 평가하고 대조군과 비교하여 p 값이 0.05 미만일 때를 통계학적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

Results and Discussion

코스라에(Kosrae)에서 2013년 4월에 채취한 시료들(1304KO그룹)로 한국해양과학기술원으로부터 무작위로 선별하여 제공받은 시료 20가지를 Table 1에 나타내었다. 본 연구에 사용된 시료들은 멸균수에 용해하여 대장암 세포주 HCT116에 처리하여 세포독성을 CCK-8 assay를 통해 살펴보았다. HCT116세포주에 100 μg/mL까지 단계 희석한 시료들을 48시간 처리한 후에 세포생존율을 비교하였으며, 대조군에 비해 세포생존율이 70% 이하로 감소한 경우에 HCT116세포주에 대한 증식억제작용이 있다고 판정하였다(Table 1). 1304KO-105와 1304KO-301에서 약간의 세포증식억제작용이 있었으나 세포생존율이 70% 이상이었기 때문에 음성으로 판정하였고, 대조군과 비교하여 세포생존율에 차이를 보이지 않은 다른 시료들도 음성으로 판단하였다(Table 1 & Fig. 1A). Fig. 1B에서 보여지는 바와 같이, 1304KO-207, 1304KO-327 및 1304KO-329는 각각 약간의 활성차이가 있으나 세 시료 모두에서 농도의존적으로 세포증식을 억제하였다. 양성으로 도출된 1304KO-207과 1304KO-327은 25 μg/mL 이상에서, 1304KO-329는 50 μg/mL 이상의 농도에서 대조군과 비교하여 유의적인 차($p < 0.001$)가 나타났다.

양성의 각 시료들에 있어서 세포증식 억제작용 기전을

Table 1. Cytotoxicity of 20 marine sources

Name	Cytotoxicity	Name	Cytotoxicity
1304KO-101	Negative	1304KO-207	Positive
1304KO-102	Negative	1304KO-208	Negative
1304KO-103	Negative	1304KO-221	Negative
1304KO-105	Negative	1304KO-223	Negative
1304KO-107	Negative	1304KO-301	Negative
1304KO-201	Negative	1304KO-302	Negative
1304KO-203	Negative	1304KO-303	Negative
1304KO-204	Negative	1304KO-326	Negative
1304KO-205	Negative	1304KO-327	Positive
1304KO-206	Negative	1304KO-329	Positive

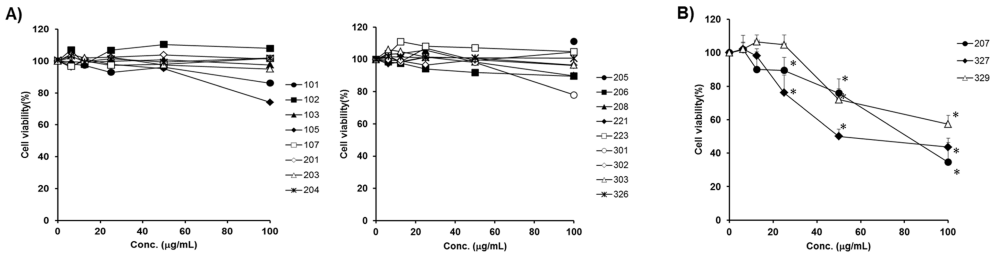

Fig. 1. Anti-proliferative activity of marine specimens collected from Kosrae. HCT116 cells treated with marine specimens were incubated for 48 h (n = 8). Cell viability was measured by CCK-8 assay as described in Materials and Methods.

살펴보기 위하여 세포증식 및 세포사멸(apoptosis)과 관련한 단백질들의 발현량을 비교하였다. p53는 p21의 발현을 유도하여 cell cycle arrest를 가져오거나, Bax를 유도하여 미토콘드리아 내에서 cytochrome C의 방출 및 caspase-9, caspase-3을 통해 세포사멸을 유도하는 대표적인 암 억제 유전자로 알려져 있다[15]. 따라서, p53의 발현을 먼저 비교한 결과, 세가지 시료 모두에서 농도의존적으로 증가됨을 확인할 수 있었다(Fig. 1B & Fig. 2). p53의 표적유전자이면서 세포 주기에 관여하는 p21은 cyclin-dependent kinase 억제제로 알려진 인자로 cell cycle arrest로 인해 세포증식을 저해하는데 관여한다[16]. 또한, PUMA는 p53-upregulated modulator of apoptosis를 일컫는 유전자로 p53에 의해 활성화되며 cytochrome c/Apaf-1 의존적으로 세포사멸을 일으키는 것으로 알려져 있다[17]. Fig. 1에서 세포 생존율의 변화는 48시간에서 비교하였으나, 그 전에 세포 내에서 세포 증식과 관련한 단백질의 변화가 있는지를 살펴보고자 24시간 동안 세 시료 1304KO-207, 327 및 329을 처리하였다. 저농도인 25 μg/mL 에서는 p21와 PUMA의 발현이 모두 증가하였으며, 특히, 세포사멸을 확인할 수 있는 Bax의 발현도 함께 증가하고 caspase-3가 활성화되어 caspase-3 (35 kDa) 및 cleavage caspase-3 (19와 17 kDa)가 증가한 것을 볼 수 있었다(Fig. 2A). 하지만 50 μg/mL 이상의 농도에서 반대로 p53을 제외한 표적유전자인 p21과 PUMA, Bax, caspase-3 모두 감소하고 있었다(Fig. 2A). Mlynarczyk 등의 연구[18]에 따르면 소포체(endoplasmic reticulum)의 스트레스는 p53 isoform을 형성하여 표적유전자의 발현을 억제하고 이에 따른 cell cycle arrest 및 세포사멸을 유도한다고 보고하였다. 본 연구 결과에서 얻어진 p53의 발현 증가에도 불구하고 표적유전자로 알려진 p21, PUMA 등의 발현 억제는 Mlynarczyk 등의 연구와 같이 소포체 스트레스를 통해 세포의 증식 억제를 보일 수 있었을 것으로 예상하였다. 이에 처리 시간을 24시간에서 세포생존율을 관찰하였던 48시간으로 연장하여 동일한 단백질들의 발현 양상을 관찰하였다. Fig. 2B에 나타난 바와 같이, p53은 증가하였는데, 24시간 처리와는 달리 48시간 처리에서는 p21가 증가함을 볼 수 있었다. PUMA의 발현에는 유의적인 변화가 보이지 않았으나 Bax의 발현 증가와 caspase-3

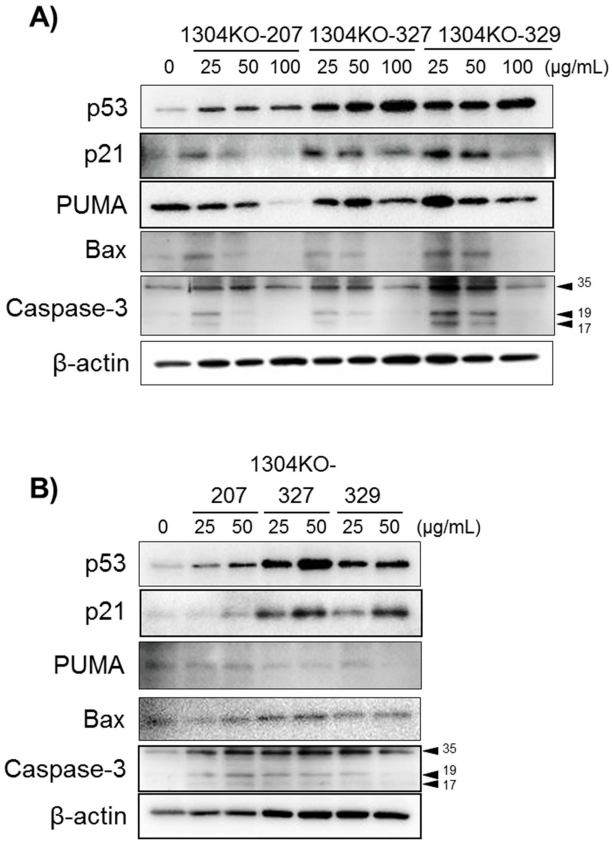

Fig. 2. Induction of apoptosis-related protein level by 1304KO-207, 327 or 329. HCT116 cells were treated with 1304KO-207, 327 or 329 (25, 50 or 100 μg/mL) for 24h (A) and 48h (B). p53, p21, PUMA, Bax and caspase-3 levels were analyzed by western blotting. β-actin as an internal control was detected.

및 cleavage caspase-3의 증가가 관찰되었다. 이는 p53의 transcriptional pathway 활성에 의해 PUMA의 발현 및 Bax를 활성화한 것이 아닌 직접적으로 Bax를 활성화[19,20]시킨 것으로 생각된다. 이 결과들로부터 HCT116세포주에 대하여 1304KO-207, 1304KO-327 및 1304KO-329 추출물 모두에서 초기에는 소포체 스트레스로 cell cycle arrest를 통한 세포증식을 억제시켰다가 지속적인 노출(48시간)에 의하여 p53-bax pathway를 통해 세포사멸을 유도한다고 보여진다.

본 연구에서 세 종류의 시료(Fig. 3)로부터 대장암 HCT116

Fig. 3. Morphology of positive marine specimens.

세포주의 항증식억제작용을 밝혔으므로, 이후 활성성분 규명 등의 지속적인 연구를 위하여 동정한 결과, 1304KO-327와 1304KO-329는 동일한 *Hyrtios* sp.으로 밝혀졌다. 아쉽게도 1304KO-207은 아직까지 동정되지 않아 앞으로 추가적인 연구가 필요한 부분이다. 본 연구결과는 해양생물자원 1304KO-207의 동정 후 개발에 있어서 해양생물유래 바이오산업에 활용될 수 있는 기반 정보를 제공할 것으로 기대된다. 또한, *Hyrtios* sp.의 해면동물로 밝혀진 시료(1304KO-327과 1304KO-329)의 결과는 이전 연구[21]에서 척(Chuuk)섬에서 채취한 *Hyrtios* sp. 추출물이 정상세포에서는 독성작용이 없이 대장암 RKO세포주에서 항암작용이 있음을 밝힌 바와 일치함을 알 수 있었다(Fig. 1 & 2). 더욱이, 본 연구 결과들로부터 유추된 초기 소포체 스트레스에 의한 세포증식 억제(early apoptosis의 증가) 및 장시간 노출에서의 세포사멸(late apoptosis 증가)을 유도한다는 것이 RKO에서 실시한 Annexin V 염색 결과[21]와 일치함으로써 이번 연구결과가 *Hyrtios* sp.의 항암작용 기전을 구체화하였다. 그 외에도 *Hyrtios* sp.에서 분리된 heteronemin은 A549, ACHN 및 A498 세포주에서 세포독성을 나타낸 바 있으며, 신장암 RCC세포주에서는 자가탐식저해제와 병용 시에 세포사멸을 촉진시킨다는 보고가 있었다[22,23]. 최근에는 항암작용 외에도 항로타바이러스와 항염작용이 있다고 보고되어[24], 앞으로 *Hyrtios* sp.추출물의 활용이 기대된다. 본 연구결과로부터 해양생물 추출물 중에 항증식억제 작용을 가진 물질을 검색하고, 이들의 작용기전을 밝힘으로써 새로운 항암제로의 개발 가능성을 보여주었다.

Acknowledgement

본 연구를 위하여 해양생물 시료를 제공해주신 한국해양과학기술원의 이희승 박사님께 깊은 감사를 드립니다. 본 연구는 2016년 덕성여자대학교 교내연구비(No. 3000002574) 지원에 의해 이루어진 것이며, 이에 감사 드립니다.

국문요약

해양생물자원은 차세대 바이오산업의 중요한 자원으로 관심이 증대되고 있다. 다양한 해양생물자원이 생물학적 활성을 가지고 있을 것으로 기대됨에도 불구하고, 지금까지는 시료 채취의 어려움 등으로 개발에 제한이 있었다. 해면동물, 해조류, 산호 등의 대부분의 해양생물자원들이 험난한 환경에서 살아남기 위해 특수한 대사산물을 만들어 낼 것으로 여겨지고 있어 이를 활용하기 위한 노력들이 기울여지고 있다. 많은 종류의 해양생물자원 중에서 바이오산업에 활용할 수 있는 항암, 항균, 항바이러스 및 항암작용 등과 같은 생물학적 활성을 가진 물질을 선별하는 것이 시급한 실정이다. 본 연구에서는 항암 작용을 갖는 해양생물자원을 도출하기 위하여 사람유래 대장암 세포주에서 세포독성시험을 실시하였다. 해양생물자원은 2013년 3월 마크로네시아에서 채취한 샘플들로 메탄올로 추출한 물질을 사용하였다. 해양생물자원의 세포독성시험을 실시하여 20개의 시료 중에서 3개의 시료에서 농도의존적인 세포 생존을 억제하는 것을 확인하였다. 검색된 시료들 중 2종만이 동정되어, 해면동물 *Hyrtios* sp.임이 밝혀졌다. 한 종은 아직 밝혀지지 않은 상태로 추가적인 연구를 통해 동정이 필요하였다. *Hyrtios* sp. 추출물(1304KO-327과 1304KO-329)의 HCT116세포 증식억제작용은 이전 연구에서 보고된 RKO에서의 작용과 일치함을 알 수 있었다. 대장암세포주의 생존 억제 활성을 밝혀낸 3종의 도출 물질은 앞으로의 지속적인 연구를 통해 추출물 중의 항암 활성 물질을 규명함으로써 바이오산업의 새로운 개발 자원으로 활용될 것이 기대된다.

References

1. Malve H.: Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **8**, 83-91 (2016).
2. Ruocco N., Costantini S., Guariniello S., Costantini M.: Polysaccharides from the Marine Environment with Pharmacological, Cosmeceutical and Nutraceutical Potential. *Molecules*, **21** (2016).
3. Xu L., Meng W., Cao C., Wang J., Shan W., Wang Q.: Antibacterial and antifungal compounds from marine fungi. *Mar. Drugs*, **13**, 3479-3513 (2015).
4. Su Y.D., Su T.R., Wen Z.H., Hwang T.L., Fang L.S., Chen J.J., Wu Y.C., Sheu J.H., Sung P.J.: Briarenolides K and L, new anti-inflammatory briarane diterpenoids from an octocoral Briareum sp. (Briareidae). *Mar. Drugs*, **13**, 1037-1050 (2015).
5. Su Y.D., Wu T.Y., Wen Z.H., Su C.C., Chen Y.H., Chang Y.C., Wu Y.C., Sheu J.H., Sung P.J.: Briarenolides U-Y, New

Anti-Inflammatory Briarane Diterpenoids from an Octocoral Briareum sp. (Briareidae). *Mar. Drugs*, **13**, 7138-7149 (2015).
6. Tian Y.Q., Lin X.P., Wang Z., Zhou X.F., Qin X.C., Kaliyaperumal K., Zhang T.Y., Tu Z.C., Liu Y.: Asteltoxins with Antiviral Activities from the Marine Sponge-Derived Fungus Aspergillus sp. SCSIO XWS02F40. *Molecules*, **21**, E34 (2015).
7. Wang J., Wei X., Qin X., Tian X., Liao L., Li K., Zhou X., Yang X., Wang F., Zhang T., Tu Z., Chen B., Liu Y.: Antiviral Merosesquiterpenoids Produced by the Antarctic Fungus Aspergillus ochraceopetaliformis SCSIO 05702. *J. Nat. Prod.* **79**, 59-65 (2016).
8. Eo H.J., Kwon T.H., Park G.H., Song H.M., Lee S.J., Park N.H., Jeong J.B.: In Vitro Anticancer Activity of Phlorofucofuroeckol A via Upregulation of Activating Transcription Factor 3 against Human Colorectal Cancer Cells. *Mar. Drugs*, **14** (2016).
9. Senthilkumar K., Kim S.K.: Anticancer effects of fucoidan. *Adv. Food Nutr. Res.* **72**, 195-213 (2014).
10. Ruiz-Ruiz F.M., Mancera-Andrade E.I., Iqbal H.M.: Marine-Derived Bioactive Peptides for Biomedical Sectors - A Review. *Protein Pept. Lett.* (2016).
11. Hanahan D., Weinberg R.A.: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **144**, 646-674 (2011).
12. Oh C.M., Won Y.J., Jung K.W., Kong H.J., Cho H., Lee J.K., Lee D.H., Lee K.H.: Cancer Statistics in Korea: Incidence, Mortality, Survival, and Prevalence in 2013. *Cancer Res. Treat.* **48**, 436-450 (2016).
13. Bae W., Lim H.K., Kim K.M., Cho H., Lee S.Y., Jeong C.S., Lee H.S., Jung J.: Apoptosis-Inducing Activity of Marine Sponge Haliclona sp. Extracts Collected from Kosrae in Nonsmall Cell Lung Cancer A549 Cells. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2015**, 717959 (2015).
14. Choi K.H., Jung J.: Anti-poliferation effect of Coscinoderma sp. extract on human colon cancer cells. *J. Food Hyg. Saf.* **31(4)**, 294-298 (2016).
15. Chiocca E. A.: Oncolytic viruses, *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 938-950 (2002).
16. Gartel A.L., Tyner A.L.: The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol. Cancer Ther.* **1**, 639-649 (2002)
17. Nakano K., Vousden K.H.: PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell*, **7**(3), 683-694 (2001).
18. Mlynarczyk C., Fahraeus R.: Endoplasmic reticulum stress sensitizes cells to DNA damage-induced apoptosis through p53-dependent suppression of p21CDKN1A. *Nat. Commun.* **5:5067**, 1-16 (2014).
19. Hemann M.T., Lowe S.W.: The p53-Bcl-2 connection. *Cell Death Differ.* **13**, 1256-1259 (2006).
20. Yu Z., Wang H., Zhang L., Tang A., Zhai Q., Wen J., Yao L., Li P.: Both p53-PUMA/NOXA-Bax-mitochondrion and p53-p21cip1 pathways are involved in the CDglyTK-mediated tumor cell suppression. *Biochem. Biophy. Res. Comm*. **386**, 607-611 (2009).
21. Lim H.K., Bae W., Lee H.S., Jung J.: Anticancer activity of marine sponge Hyrtios sp. extract in human colorectal carcinoma RKO cells with different p53 status. *BioMed Res. Int.* **2014**, 413575 (2014).
22. Wu S.Y., Sung P.J., Chang Y.L., Pan S.L., Teng C.M.: Heteronemin, a Spongean Sesterterpene, Induces Cell Apoptosis and Autophagy in Human Renal Carcinoma Cells. *BioMed Res. Int.* **2015**, 738241 (2015).
23. Al-Massarani S.M., El-Gamal A.A., Al-Said M.S., Abdel-Kader M.S., Ashour A.E., Kumar A., Abdel-Mageed W.M., Al-Rehaily A.J., Ghabbour H.A., Fun H.K.: Studies on the Red Sea Sponge Haliclona sp. for its Chemical and Cytotoxic Properties. *Pharmacog. Mag.* **12**, 114-119 (2016).
24. Koh S.I., Shin H.S.: The anti-rotaviral and anti-inflammatory effects of Hyrtios and haliclona species. *Microbiol. Biotechnol.* Jul (2016).