

## 해양성 광천수의 암세포 성장, 전이 및 신생 혈관 생성 억제 효과

김완재 · 리 화 · 윤택준\* · 심재만\*\* · 최선강\*\* · †이광호

건국대학교 의료생명대학 생명공학과, \*유한대학 식품영양과, \*\*강릉과학산업진흥원

### Inhibitory Activity of Brine Mineral Water on Cancer Cell Growth, Metastasis and Angiogenesis

Wan-Jae Kim, Hua Li, Taek-Joon Yoon\*, Jae-Man Sim\*\*, Seon-Kang Choi\*\* and †Kwang-Ho Lee

Dept. of Biotechnology, College of Biomedical & Health Science, Konkuk University, Chungju 380-701, Korea

\*Dept. of Food & Nutrition, Division of Natural Science, Yuhan University, Bucheon 442-749, Korea

\*\*Gangneung Science Industry Foundation, Gangneung 210-340, Korea

#### Abstract

Brine mineral water(BMW) has recently gained attention as a new water resource due to its biological activities. In this study, BMW from the Geumjin area(Gangneung-city, Korea) was evaluated for its growth inhibition, anti-metastasis and anti-angiogenesis activity against cancer cells. The *in vitro* cytotoxicity was measured by CCK assay, and the anti-metastasis activity was estimated by lung metastasis *in vivo*. The *in vitro* incubation of mouse splenic cells with BMW that had been diluted more than 4-fold showed no effect on the cell growth when compared to a control group. Additionally, BMW inhibited the growth of the EL-4, L5178Y-R and colon26-M3.1 cancer cell lines in a dose-dependent manner. *In vivo* evaluation of the anti-metastasis activity of BMW in BALB/c mice inoculated with the colon26-M3.1 cell line revealed dose-dependent inhibition in response to treatment with samples that were diluted by up to 9 times. Finally, treatment with BMW effectively suppressed the growth of vascular endothelial growth factor(VEGF) added human umbilical vein endothelial cells. Overall, these results suggest that BMW has anti-cancer activity.

Key words: brine mineral water, anti-cancer, anti-metastasis, anti-angiogenesis.

#### 서 론

최근 건강에 관한 관심이 고조되면서 다양한 수자원에 대해서도 그 기능성이 주목받고 있다. 특히 2007년 8월에 ‘해양 심층수의 개발 및 관리에 관한 법률’이 제정되면서 담수자원 뿐 아니라 염수자원을 이용한 생리활성에 관한 연구활동이 이루어지고 있으며, 이러한 연구결과를 토대로 하여 상품화 작업도 활발히 추진 중에 있다(Yoo SH 2007; Jeong & Lee 2008).

일반적으로 그 효능이 널리 알려져 있어 연구활동과 상품화가 꾸준히 이루어지고 있는 해양심층수와 더불어서 염수자원으로써 주목받고 있는 것이 지하염수의 하나인 해양성 광천수(brine mineral water)이다(Kim 등 2008). 해양성 광천수

는 연안이나 해안의 지하 심층부 암반층에서 암반의 공극이나 균열을 따라 해양 심층부의 해수가 틈입, 육지의 지하 심층 대수층을 따라 흘러 내려온 천연 암반 지하수와 지질학적 시간과 공간의 조건에서 상호 교호작용, 저류, 숙성, 이온화된 것을 일컫는다(국정브리핑 2007). 해양성 광천수는 해양심층수에 비해 Ca, Sr, Mn, Zn, Fe, Cu, Ni, V, Se 등의 미네랄이 풍부한 것은 물론, Ca과 Mg의 미네랄 밸런스가 인간의 체액과 유사하다(Moon 등 2004). 이러한 해양성 광천수의 유용성을 응용하여 항산화 및 면역반응 등에 관하여 연구가 이루어지고 있다(Jung 등 2006; Kim 등 2008).

본 연구에서는 미네랄 함량이 풍부한 강릉 금진 지역의 해양성 광천수가 지닌 생리활성을 탐색하기 위한 일환으로 암

† Corresponding author: Kwang-Ho Lee, Dept. of Biotechnology, College of Biomedical & Health Science, Konkuk University, Chungju 380-701, Korea. Tel: +82-43-840-3613, Fax: +82-43-851-5235, E-mail: kwangho@kku.ac.kr

세포의 성장, 전이 및 신생 혈관 생성에 미치는 영향에 관하여 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료 준비

강릉시 옥계면 금진리 해안 인근의 산 지하 1,100 m 지점에서 취수한 해양성 광천수 원수를 1.0  $\mu\text{m}$ 의 필터로 처리한 후, 처리수를 분무건조장치(Spray Dryer, L-8, Japan)로 수분을 제거한 분말을 원액농도(2.8%)가 되도록 재용해하여 본 실험의 재료로 사용하였다.

미네랄 분석은 한국과학기술연구원과 강릉과학산업진흥원에서 유도상 플라즈마 질량 분석기(ICP-MS, DRC11, Perkin-Elmer, USA) 및 원자흡광분광광도계(AAS, Analyst800, Perkin-Elmer, USA)를 이용하여 분석을 실시하였다.

용해시킨 해양성 광천수를 3,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층을 회수한 후에 DMEM powder와  $\text{NaHCO}_3$ (Sigma)를 넣고 pH 7로 조정하였다. 200 nm filter(Whatman International Ltd, Kent, UK)로 여과한 후에 10% FBS 및 antibiotics(100 U/ml of penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of streptomycin)를 첨가하여 시료로 사용하였다.

### 2. 시약 및 배지

본 연구에 사용된 배지 RPMI 1640, MEM, DMEM, FBS, nonessential amino acids 그리고 antibiotics는 Hyclone사의 제품을 사용하였다. Cell counting kit-8은 DOJINDO(Tokyo, Japan)사, Lysing buffer는 BD Biosciens사의 제품, 그리고 mytomycin-C 및 MTT 시약은 Sigma(ST. Louis, Mo, USA) 제품을 사용하였다.

### 3. 세포주 및 실험동물

본 시험에서는 mouse T lymphoma cell line인 EL-4, mouse lymphoma cell line인 L5178Y-R, mouse lung carcinoma cell line인 colon26-M3.1 그리고 human umbilical vein endothelial cells(HUVEC) 등의 세포주가 사용되었다. EL-4와 L5178Y-R 세포주는 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin이 첨가된 DMEM 및 RPMI 1640 배지에서 각각 배양하였다. colon26-M3.1은 6% FBS, nonessential amino acids, 100 U/ml penicillin과 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin이 첨가된 EMEM 배지에서 배양하였다. 그리고, HUVEC은 bFGF(basic fibroblast growth factor, 3 ng/ml), 10% FBS가 첨가된 RPMI-1640에서 배양하였다. 모든 세포들은 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ 의 배양조건을 유지하였다.

실험동물은 7~8주령의 암컷 BALB/c mouse를 (주)오리엔트 바이오로부터 구입하여, 고형 사료와 물은 자유급여로 1주 정도 실험 동물실에서 적응시킨 후에 사용하였다.

### 4. 마우스 비장세포의 분리 및 배양

마우스를 경추탈골법으로 희생시킨 후에 비장을 무균적으로 적출하여 10% FBS와 antibiotics(100 U/ml of penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of streptomycin)가 함유된 RPMI-1640 배양액으로 씻은 후에 분쇄하여 세포를 유리시켰다. 분리된 세포액은 lysing buffer를 이용하여 적혈구를 제거한 후에 hemocytometer를 이용하여 세포수를 측정하였다. 세포농도  $10^6$  cell/ml로 분산시키고 96-well plate에 100  $\mu\text{l}$ 씩 분주한 후에 세포 증식능 측정에 사용하였다.

### 5. 광천수의 비장세포 및 암세포의 증식에 미치는 영향

생쥐로부터 비장을 적출하여, 비장 세포로부터 적혈구를 제거한 후, well 당 세포수가  $1 \times 10^5$ 가 되도록 96 well plate에 100  $\mu\text{l}$ 씩 plating하였다. 세포를 plating 한 후에 흡착세포는 8 시간동안 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  incubator 내에서 pre-incubation시켰다. 각 well 당 100  $\mu\text{l}$ 의 시료를 처리한 후, 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  incubator 내에서 24시간 또는 48시간 배양했다. 배양이 끝난 후, 60% CCK를 well 당 20  $\mu\text{l}$  씩 첨가하고 microplate reader로 450 nm로 측정하여 650 nm로 측정한 reference 치를 뺀 값으로 하였다. 1 mM의 mytomycin-C를 독성검사의 positive control로 사용하였다.

### 6. 암전이 억제능 검사

BALB/c mouse에 암 접종 하루 전에 해양성 광천수를 200  $\mu\text{l}$ 를 주사한 후, colon26-M3.1세포를  $3 \times 10^4$ 로 i.v. 주사하였다. 암세포 주사 2주 후에 폐로 전이 된 암세포의 colony 수를 측정하였다.

### 7. 해양성 광천수의 인간 혈관 내피세포의 증식에 미치는 영향

세포는 HUVEC을 사용하였으며, bFGF(basic fibroblast growth factor, 3 ng/ml), 10% FBS가 첨가된 RPMI-1640, 5%  $\text{CO}_2$ , 37°C의 조건에서 배양하며 사용하였다. *In vitro* 세포독성 효과를 조사하기 위하여 96 well에서 각 well당  $5 \times 10^3$  세포를 24시간 배양 후에 well당 시료 100  $\mu\text{l}$ 씩을 96 well plate에 분주하였다. 24시간 배양한 후 well당 0.5% MTT를 5  $\mu\text{l}$ 씩 넣고 4시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 plate를 PBS로 세척한 후 DMSO 50  $\mu\text{l}$ 를 넣고 상온에서 20분 방치한 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 8. BrdU Incorporation Assay를 이용하여 VEGF를 첨가한 인간 혈관 내피세포의 증식에 미치는 효과

혈관내피세포의 세포증식 확인 실험은 BrdU assay 방법을 이용하여 수행하였으며, BrdU assay는 5-bromo-2'-deoxy-uridine

lableing kit(Roche)를 이용하여 수행하였다. 혈관내피세포를 0.1% gelatin이 코팅된 96 well plate에  $5 \times 10^3$ 으로 분주하여 24 시간 배양시킨 후, 5% FBS만 첨가된 RPMI 1640배지로 6시간 동안 starvation시켰다. 5% VEGF와 5 units/ml heparin이 첨가된 RPMI 1640 배지에 해양성 광천수를 각각 농도별로 희석하여 100  $\mu$ l씩 첨가하여 30시간 동안 배양시켰다. 배양이 끝나면 각각의 세포들을 고정시킨 후에 BrdU를 각각의 well에 넣어 anti-BrdU로 반응시켜 Luminometer로 측정하였다.

9. 통계처리

모든 실험결과와 측정치는 Mean $\pm$ S.E로 나타내었고, 각 평균치간 차이에 대한 유의성은 GraphPad Prism(version 2.0, San Diego, USA)을 이용하여 one way analysis of variance(ANOVA)와, 사후검정으로는 Tukey test를 실시하였다. 통계적 유의성은 5% 수준에서 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 금진 해양성 광천수 원수의 미네랄 분석

해양성 광천수 원수를 분석한 결과, 일반 천연수에 존재하기 어려운 Se, V 등 희귀 기능성 미네랄이 다량 측정되었으며, Ca과 Mg의 농도가 인체에 흡수하기 쉬운 비율로 존재하였다. 인체에 유해한 중금속인 Hg, Pb, Cd 등은 검출되지 않았다(Table 1).

2. 금진 해양성 광천수의 정상 면역세포에 미치는 영향

해양성 광천수가 일반 세포의 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위해, 해양성 광천수를 배지에 희석비율로 mouse 비장 세포에 첨가한 경우 1/2의 희석농도에서는 약간의 저해효과를 가지나 1/4 희석비율에서는 배지와 같은 형태로 세포의 성장에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Fig. 1). 따라서 해양성 광천수 1/4 이상의 희석 농도에서는 정상 면역세포에 세포독성을 나타내지는 않는다고 볼 수 있겠다.

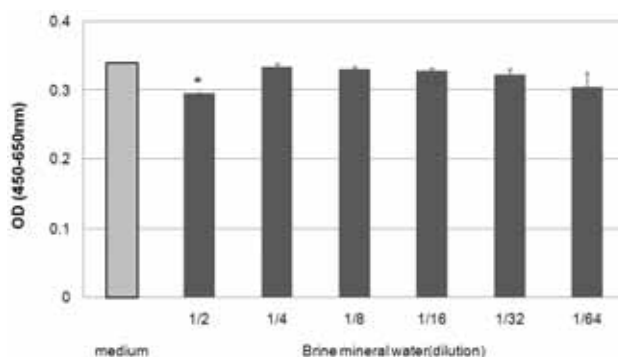


Fig. 1. Effect of brine mineral water on mouse splenic cell growth. Data are expressed as means $\pm$ SEM. Significant differences between control(medium) and BMW treated groups are indicated by \* $p$ <0.05.

3. 금진 해양성 광천수의 암세포에 미치는 영향

1) EL-4에 미치는 영향

해양성 광천수는 정상세포에서는 1/4로 희석한 조건에서는 세포의 성장에 영향을 미치지 않았으나, C57BL/6 생쥐 아래의 백혈병 세포주인 EL-4 세포에는 1/4에서부터 1/16의 희

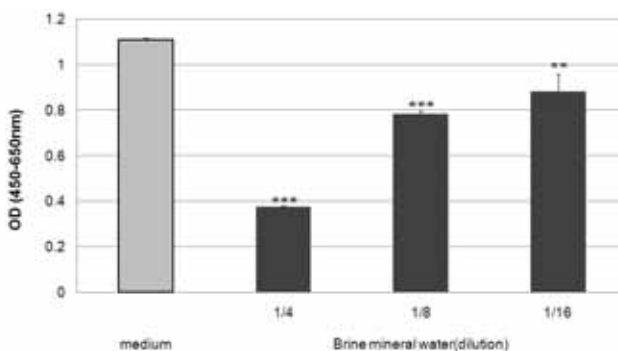


Fig. 2. Effect of brine mineral water on EL-4 cell growth. Data are expressed as means $\pm$ SEM. Significant differences between control(medium), BMW treated groups are indicated \*\* $p$ <0.01 and \*\*\* $p$ <0.001.

Table 1. Mineral contents analysis of the brine mineral water

Component	mg/ l	Component	mg/ l	Component	$\mu$ g/ l
K	204	Li	0.089	Se	112
Na	9,070	Mo	10	V	90
Ca	1,520	Cl	19,243	Ge	1.4
Mg	990	F	2.6	Mn	11
Fe	2.3	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	4,402	Co	2.8
Zn	8.46	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	10	Ti	620
Sr	30.4	SiO <sub>2</sub>	13.1	Cu	12

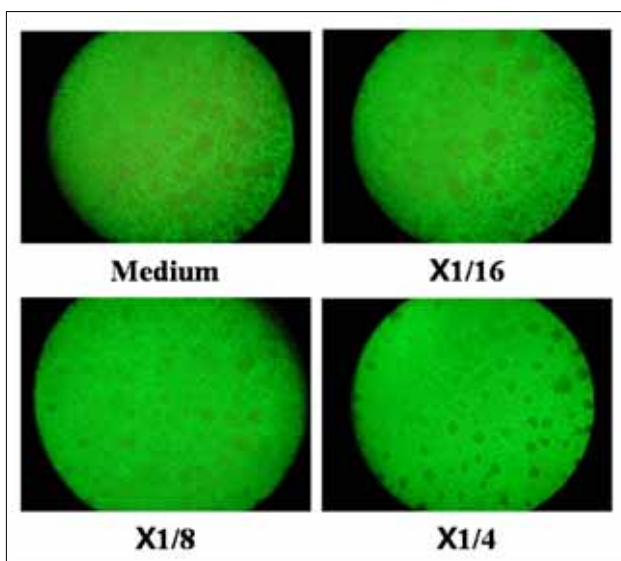


Fig. 3. Microscopic analysis of EL-4 cell clusters grown on brine mineral water.

석 비율로 첨가한 해양성 광천수에서 농도 의존적으로 암세포 증식억제의 유의적인( $p < 0.01$ ) 효과를 보였다(Fig. 2).

Fig. 3은 해양성 광천수의 처리에 의한 EL-4 세포의 변화를 현미경으로 관찰한 결과이다. 1/4, 1/8, 1/16로 희석한 해양성 광천수를 각각 EL-4 세포에 첨가한 후 세포의 형태를 현미경으로 관찰한 결과, 사진과 같이 해양성 광천수 농도가 높아짐에 따라 세포 cluster의 형태에 변화가 나타나는 것을 관찰할 수 있으며, 희석배율이 높아짐에 따라 medium 단독군에서 배양한 세포의 모양과 유사한 것을 관찰할 수 있었다.

2) L5178Y-R에 미치는 영향

Mytomycin-C를 positive control로 사용하여 해양성 광천수가 생쥐 백혈병 세포인 L5178Y-R의 증식억제에 미치는 영향을 관찰하였다. Fig. 4와 같이 1/32배까지는 농도 의존적으로 세포활성을 억제하는 결과를 보였다. 이러한 결과로 볼 때, 일부 실험적 오차가 있음을 배제할 수 없겠으나, 최소한 1/16배의 희석의 경우까지는 유의한 종양세포 억제효과가 있는 것으로 판단된다.

3) Colon26-M3.1에 미치는 영향

생쥐의 대장암 세포주인 colon26-M3.1에서는 EL-4 또는 L5178Y-R 세포와 같이 강한 암세포 증식억제의 효과를 나타내지는 않았지만 1/8 이하로 희석한 농도에서, 해양성 광천수의 농도에 비례하여 암세포 증식억제 효과를 보였다(Fig. 5).

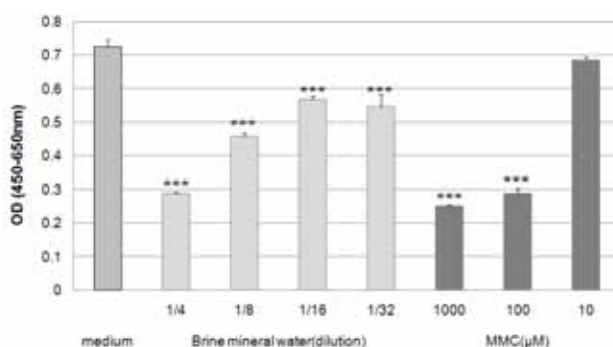


Fig. 4. Effect of brine mineral water on growth of mouse lymphoma cell line. MMC is Mytomycin-C. Data are expressed as means±SEM. Significant differences between control(medium), BMW treated groups and MMC treated groups are indicated \*\*\* $p < 0.001$ .

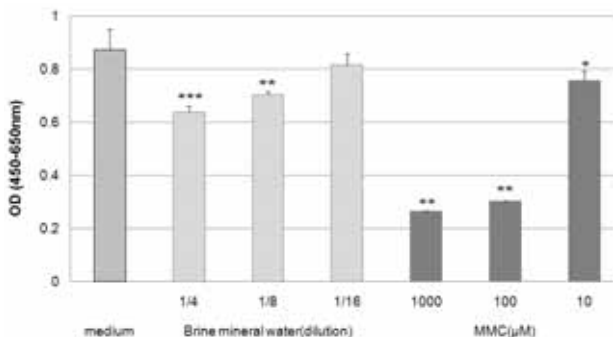


Fig. 5. Effect of brine mineral water on growth of colon26-M3.1 cell line. MMC is Mytomycin-C. Data are expressed as means ± SEM. Significant differences between control(medium), BMW treated groups and MMC treated groups are indicated \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ .

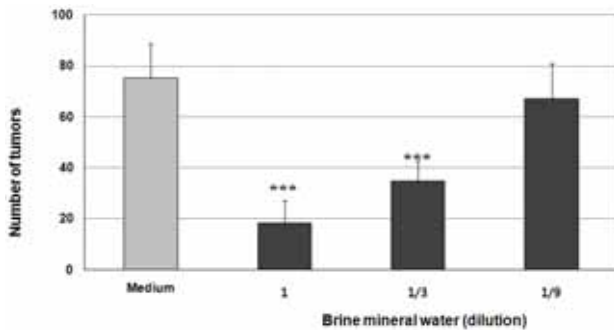
4. 금진 해양성 광천수가 암세포 전이에 미치는 효과

Balb/C mouse를 이용하여 *in vivo*에서 colon26-M3.1 세포를  $3 \times 10^4$ 이 되게 i.v. 주사한 후에 폐로의 암세포 전이 억제력을 측정한 결과 Fig. 6과 같이 해양성 광천수가 원액과 1/3 희석군에서 농도 의존적으로 암세포 전이 억제력을 보였다.

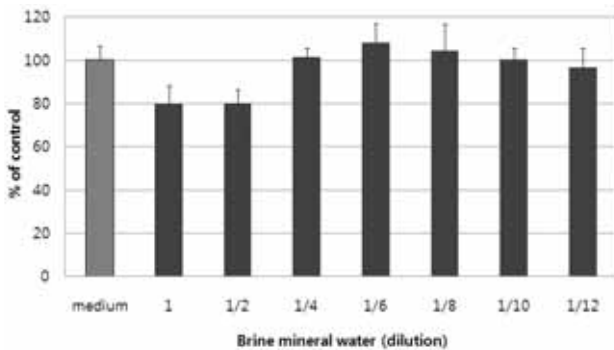
5. 금진 해양성 광천수의 혈관내피세포 증식에 미치는 영향

1) HUVEC에 대한 세포독성

HUVEC을 bFGF(basic fibroblast growth factor, 3 ng/ml)와 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 배양하여 해양성 광천수를 첨가한 후에 MTT를 이용하여 세포 독성을 측정된 결과, 해양성 광천수 원액에서도 유의적



**Fig. 6. Inhibitory activity of brine mineral water on cancer cell metastasis.** Data are expressed as means±SEM. Significant differences between control(medium) and BMW treated groups are indicated \*\*\* $p < 0.001$ .



**Fig. 7. Effect of brine mineral water on growth of HUVEC.** Data are expressed as means±SEM.

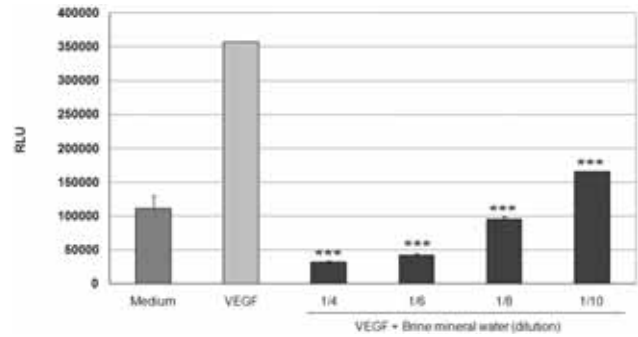
인 세포 독성이 관찰되지 않았으나(Fig. 7), 1/2로 희석한 시료 처리군과 원액 처리군에서는 세포에 약간의 증식억제 효과가 보였다.

따라서 인간 혈관 내피세포에서는 해양성 광천수가 1/4 이하의 농도로 희석한 염농도에서는 세포에 독성효과가 없는 것으로 판단된다.

## 2) VEGF에 의한 HUVEC의 증식억제

혈관 신생은 암의 발달 시에 VEGF의 분비로 혈관 내피세포가 증식하는 것이 관찰되는 현상이며, 암 발달시 혈관 신생을 억제하는 것은 암치료에 중요한 치료 방법이다. 본 실험에서 인간의 혈관 내피세포에 VEGF를 첨가하여 인위적으로 혈관 내피세포를 증식시켰을 때 해양성 광천수 원액부터 1/10으로 희석한 실험군에서 VEGF의 첨가에 의한 증식을 유의적으로( $p < 0.001$ ) 억제하였다(Fig. 8).

따라서 해양성 광천수는 양성대조군인 VEGF 단독 처리의 경우에 비하여 증식억제가 유도된다고 볼 수 있으며, 해양성 광천수가 암의 전이에 필수적인 혈관 신생을 억제할 수 있음



**Fig. 8. Effect of brine mineral water on growth of VEGF added HUVEC.** RLU: relative luminescence unit. Data are expressed as means±SEM. Significant differences between control(VEGF treated group) and BMW treated groups are indicated \*\*\* $p < 0.001$ .

을 시사한다.

## 결론

강릉 금진의 해양성 광천수가 정상세포에 대한 독성은 1/2 희석 비율에서 일반 세포에 약간의 증식억제력을 보였으나, 그 이하의 농도에서는 일반세포의 증식에 영향을 미치지 않음을 알 수 있다.

일반 세포의 경우와는 달리 해양성 광천수는 생쥐 백혈병 세포주(EL-4, L5178Y-R)나 대장암 세포주(colon26-M3.1)의 증식을 억제하며, VEGF가 첨가된 인간혈관내피세포(HUVEC) 증식 저해를 유도함으로써 angiogenesis를 억제하는 효과가 있다는 것을 알 수 있었다. 또한, *in vivo*에서의 colon26-M3.1 세포의 전이 억제력을 나타낸 것을 볼 때, 해양성 광천수의 항암활성 가능성을 시사하고 있다.

해양성 광천수에 포함되어 있는 Na, K, Mg, Ca 등의 각종 미네랄 등에 관해서는 이미 각종 생리활성 효능 및 기능이 연구되어져 있으며, 이 중 Mg의 종양억제 효능이 보고되었다(Fraga CG 2005; Ham 등 2005; Wolf 등 2007). 그리고 Se의 섭취가 유방암, 폐암 등의 다양한 암 관련 질환을 억제할 수 있다는 연구보고가 있으며(Gromadzińska 등 2008; Naithani R 2008; Suzana 등 2009), V의 경우에는 UMR106 osteosarcoma cells을 이용한 실험에서 V 복합체가 cell adhesion, migration 및 colony 형성을 저해한다는 보고(Molinuevo 등 2008) 등이 있다. 따라서 강릉 금진의 해양성 광천수는 천연수에서 검출되지 않는 미량 미네랄인 Se, V, Si, Mo 등이 다량 존재하고 있으므로 이들 미량 미네랄 성분이 항암활성을 나타낸다고 볼 수 있다.

향후, 해양성 광천수의 항암작용에 대하여, 각각의 미네랄 단독 또는 혼합 처리에 의한 활성 변화에 대한 구체적인 연구

를 통해 해양성 광천수의 정확한 항암 작용기전의 파악과 규명이 필요하다고 본다.

## 감사의 글

이 논문은 건국대학교 학술진흥연구비 지원에 의한 논문임.

## 참고문헌

- Fraga CG. 2005. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Mol Aspects Med* 26:235-44
- Gromadzińska J, Reszka E, Bruzelius K, Wasowicz W, Akesson B. 2008. Selenium and cancer: biomarkers of selenium status and molecular action of selenium supplements. *Eur J Nutr* 47 Suppl 2:29-50
- Ham SS, Kim SH, Moon, SY, Jeon MS. 2005. Antioxidative, antimutagenic and cytotoxic effects of the mineral water. *J Fd Hyg Safety* 20:53-57
- Jeong GT, Lee SH. 2008. Current status of domestic and overseas research of the characteristics and use of deep sea water. *Korean J Food Nutr* 21:592-598
- Jung SJ, Joo EJ, Yoo JY, Kim YK, Cho YJ, Yoon BS, Cho JK, Nam KT, Hwang SG. 2006. Effect of the supply of natural water from deep sea rock on the immune response and antioxidant activity in rats. *Korean J Anim Sci* 48:211-218
- Kim YJ, Jung IS, Song HJ, Choi EY, Choi IS, Choi YJ. 2008. Study of deep ground sea-like water on antioxidant activity and the immune response in RAW264.7 macrophages. *J Life Sci* 18:329-335
- Molinuevo MS, Cortizo AM, Etcheverry SB. 2008. Vanadium(IV) complexes inhibit adhesion, migration and colony formation of UMR106 osteosarcoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 61:767-773
- Moon DS, Jung DH, Kim HJ, Shin PK. 2004. Comparative analysis of resources characteristics for deep ocean water and brine groundwater. *J Korean Soc for Marine Environ Engi* 7:185-189
- Naithani R. 2008. Organoselenium compounds in cancer chemoprevention. *Mini Rev Med Chem* 8:657-668
- Suzana S, Cham BG, Ahmad Rohi G, Mohd Rizal R, Fairulnizal MN, Normah H, Fatimah A. 2009. Relationship between selenium and breast cancer: A case-control study in the Klang Valley. *Singapore Med J* 50:265-269
- Wolf FI, Maier JA, Nasulewicz A, Feillet-Coudray C, Simonacci M, Mazur A, Cittadini A. 2007. Magnesium and neoplasia: from carcinogenesis to tumor growth and progression or treatment. *Arch Biochem Biophys* 458:24-32
- Yoo SH. 2007. The effects of industrializing the deep sea water on the national economy using inter-industry analysis. *Indust Econ Res* 20:1345-1357
- 문화체육관광부. 2007. 국정브리핑 정책/자료. <http://www.korea.kr>. 2009. 4. 22 방문

---

(2009년 9월 25일 접수; 2009년 12월 13일 채택)