해수배양 *Spirulina platensis* 초음파 추출물의 항암효과

김효성 · 김철희 · 권민철 · 송영규 · 조정환[1] · 곽형근[2] · 황보영[2] · 김진철 · 이현용*
강원대학교 바이오산업공학부, [1]금영식품(주), [2]SKY007(주)

Anticancer Activity of Ultrasonified Extracts from Seawater-based Culture of the Microalga *Spirulina platensis*

Hyou-Sung KIM, Cheol-Hee KIM, Min-Chul KWON, Young-Kyu SONG, Jung-Hwan CHO[1], Hyeong-Geun GWAK[2], Bo-Young HWANG[2], Jin-Chul KIM and Hyeon-Yong LEE*
School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea
[1]Kum-young food, 1207-22, Kyohwang-ri, Jumunjin-eup, Kangnung-si, 210-801, Korea
[2]Daejeon-dong, Kangneung-si, Kangwon-do, 210-340, Korea

Ultrasonified extracts from seawater-based cultures of the microalga *Spirulina platensis* were obtained using water and ethanol at 60 and 100℃. The yield of the aqueous fraction of *S. platensis* extracted using ultrasonification was about 33.46%. The cytotoxicity against HEK293 and inhibition ratios of the cancer cell lines A549, AGS, MCF7, and Hep3B were measured using the sulforhodamine-B (SRB) assay. The cytotoxicity of all extracts at 1.0 mg/mL was below 26%. The cytotoxicity of the ultrasonified extracts from the seawater-based culture of the microalga *Spirulina platensis* was about 4% less than that of *Spirulina platensis* without ultrasonification. The inhibition ratio of cancer cell growth was approximately 80% for 1.0 mg/mL extracts. The inhibitory effect on cancer cell growth was greater for seawater containing ultrasonified *Spirulina platensis* extracts than for extracts without ultrasonification. The differentiation ratio of HL-60 cells was 160.9%. Densitometric analysis of Bcl-2 revealed that the ultrasonified extracts had greater anticancer activity than the extracts without ultrasonification .

Key word: *Spirullina platensis*, Cytotoxicity, Anticancer activity, Ultrasonification

서 론

미세조류 Spirulina는 주로 열대 지방의 염호에서 서식하며 길이 300-500 μm, 너비 8 μm이다. 35억 년 전에 지구상에 나타났으며 그 모양이 나선형 (spiral)이어서 *Spirulina*라는 이름이 붙여졌다 (Saiki, 1990). 섬유소가 없어 세포막으로 인해 체내에서 소화와 흡수가 빠르고, 100 g당 498 Kcal의 열량을 가지고 있다 (Saiki, 1990). 현재 35종 정도가 밝혀져 있으며 온대지방과 한대지방에도 분포되어 있으나 식량으로 이용되는 것은 대형이며 증식력이 강한 아프리카와 중남미의 열대 및 아열대 지방의 호수에서 성장한다. 그 중 산업용으로 배양 생산되고 있는 *Spirulina*는 *Arthrospira maxima*와 *Arthrospira platensis*이다 (Kay, 1991; Yang et al., 1997).

여러 연구에서 Spirulina 성분 중 carotinoid 색소와 phycocyanin, Ca-SP (Calcium spirulan), α-tocopherol, sulfated polysaccharide 등이 잠재적인 항암 효과 (Saiki, 1990) 및 항노화 (Grinstead et al., 2000), 종양 전이 억제 (Diego et al., 2004), 항산화와 염증 방지에 대한 효과 (Kaji et al., 2002)를 제시하였으며 기능성식품으로의 그 기능성 (Lee et al., 2003)이 밝혀지고 있다. 또한 스피룰리나 추출물의 섭취로 인해 항바이러스 활성능 향상과 항산화와의 관계 (Hernandez et al., 2002), 신장결석과의 관계 (Herrero et al., 2004), 국소 빈혈과 대뇌경색과의 관계 (Frooq et al., 2005), 폐경기 이후 질병예방 능력 등 면역체계를 강화시키고 생체 방어능력을 증가시키는 것을 확인하였다. 그밖에 잉어의 생장촉진, 색상의 선명도 증가 (Nandeesha et al., 2001) 등 어류 사료로서의 가치도 인정받고 있다.

이와 같은 연구는 담수에서 성장하는 담수 미세조류를 이용한 실험의 결과들이고, 해수에서 성장한 해수 미세조류에 대한 연구에는 Cadmium (II)의 체외배출 (Pairat and Qiming 2001), sporochnols의 합성 (Susumu et al., 1998), 그리고 해수 Chlorella에 대한 배양 시 최적화 연구 (Casey et al., 1963) 등으로 해수 미세조류를 이용한 생리활성과 관련된 연구는 거의 이루어지고 있지 않다.

본 연구는 유용생리활성 물질 추출상의 이점을 가진 초음파 병행 추출법 (Kim et al., 2005) 을 이용하여 기존의 연구에서 밝혀진 *Spirulina platensis*의 항암효과와 이를 이용하여 기능성 식품에 관련된 분야에 바탕 자료로서 영양학적 가치를 지니게 하기 위해 본 연구를 수행하였다.

*Corresponding author: hyeonl@kngwon.ac.kr

재료 및 방법

재료 및 추출

본 실험에 사용한 해수배양 *Spirulina platensis*는 artificial seawater를 이용하여 염도는 35%, pH는 9.08로 맞추어 옥외 광합성 배양법으로 배양하여 사용하였다.

추출 방법으로는 증류수를 이용하여 추출온도는 60℃와 100℃, 에탄올을 이용하여 추출온도는 60℃에서 수직 환류 냉각기가 부착된 추출 flask에 시료 중량에 대하여 각각 10배의 용매를 이용하여 12시간 동안 2회 반복 추출하였다.

다시 초음파 추출기 (Asia Industry, Korea.)를 통하여 각각의 온도인 60, 100℃에서 40 KHz의 초음파로 30분간 초음파 추출을 병행하였다. 얻어진 각각의 추출물들은 감압 여과장치로 여과하여 농축 후 동결건조한 뒤에 각각의 수율을 계산하였다.

항암에 관한 물질의 분리 동정을 위한 선결 작업으로 이전 연구로 활성이 알려진 *S. platensis*의 색소 단백 물질의 영향의 유무를 확인하기 위하여 단백질의 변성 온도를 기준으로 60℃와 100℃를 선정하였다.

시 약

세포배양에 필요한 배지로 RPMI 1640과 DMEM F12는 Gibco (USA)로부터 구입하였고, 혈청은 Hyclone (USA)사의 fetal bovine serum을 이용하였다. Hepes buffer, gentamycin sulfate, trysin-EDTA는 Sigma사의 것을 사용하였고, 세포염색을 위해서 필요한 sulforth odamine B (SRB)는 Sigma사로부터 구입하여 실험에 사용하였다. 세포 분화도를 측정하기 위한 시약인 Triton X-100, 4-nitrophenyl phosphate는 Sigma사로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

세포 주 및 세포배양

실험에 이용된 세포주는 암세포로 인간 폐암세포인 A549 (Lung carcinoma, human, ATTC #CCL-185, USA), 인간 위암세포인 AGS(Stomach adenocarcinoma, human, ATTC #CRL-1739, USA), 인간 간암세포인 Hep3B (Hepatocillular carcinima, human, ATCC #HB-8064, USA), 인간 유방암세포인 MCF7 (Breast adenocarcinoma, human, ATCC #HTB-22, USA)를 사용하였고, 시료 자체의 세포 독성을 알아보기 위한 정상세포로는 인간 신장세포인 HEK293 (Kidney nomal, human, ATTC #CRL-1573, USA)를 사용하였다. 그리고 세포 분화도를 측정하기 위해서 인간 전과립 세포 (human promyelocytes; HL60, ATCC #CRL-1964, USA)를 사용하였다. 실험에 사용된 암세포는 RPMI 1640배지 (A549, AGS)와 DMEM F12배지 (Hep3B, MCF7)를 정상세포는 DMEM배지에 10% heat-inactivated FBS를 첨가시켜 배양하였다.

세포 독성실험 및 암세포의 생육 저해 효과 측정

SRB (sulforhodamine B) assay는 Kim et al. (2005)를 참고하였으며 세포 단백질을 염색하여 세포의 증식이나 독성을 측정하는 방법으로 실험에 사용된 세포주로는 인간 정상 신장세포인 HEK293를 이용하여 세포독성을 측정하였고, 인간 폐암세포인 A549와 인간 위암세포인 AGS, 인간 간암세포인 Hep3B와 인간 유방암세포인 MCF7를 이용하여 함암 활성을 측정하였다. 실험 대상 세포의 농도를 4-5×10^4 cells/mL으로 96 well plate의 각 well에 100 μL씩 첨가하여 24시간 동안 배양 (37℃, 5% CO_2)한 후, 각각의 시료를 최종농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 g/L로 100 μL씩 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양이 완료된 후에 상등액을 제거하고 차가운 10% (w/v) TCA (trichloroacetic acid) 100 μL를 가하여 4℃에서 1시간 동안 방치한 후 증류수로 4-5회 세척하여 TCA를 제거하고 실온에서 plate를 건조한 뒤 각 well에 1% (v/v) acetic acid에 녹인 0.4% (w/v) SRB용액을 100 μL씩 첨가하고 상온에서 30분 동안 염색시켰다. 결합되지 않은 SRB 염색액은 1% acetic acid로 4-5회 정도 세척, 건조시킨 후에 10 mM Tris buffer 100 μL를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 540 nm에서 microplate reader (Molecular Devices, THERMO max, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

Selectivity 측정은 SRB assay를 이용하여 정상세포 (HEK-293)에 대한 각 sample 농도에서 세포독성을 측정하고, SRB assay를 이용하여 각 암세포주의 생육 억제 활성을 측정한 후 각 농도에서의 세포 독성에 대한 암세포 생육 억제 활성의 비로 selectivity를 계산한다.

세포의 분화도 측정

세포 분화 측정에 사용된 세포주는 인간 전과립 세포 (human promyelocytes; HL60)를 사용하였고 ATCC (American Type Culture Collection)에서 구입하였으며 RPMI 1640배지에 10% heat-inactivated FBS (fetal bovin serum)으로 37℃, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. 세포분화의 정량적인 수치를 측정하기 위해 세포의 농도가 4-5×10^4 cells/mL로 포함된 배지를 24 well plate에 900 μL씩 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. Sample을 농도별로 100 μL씩 첨가하여 24시간 다시 배양하였다. 이것을 24시간 간격으로 배양하면서 배지를 pippeting하여 15 mL C-Tube에 옮겨 320×g에서 10분간 원심분리 하였다. 배지를 제거한 후 0.1% Triton x-100을 200 μL씩 첨가한 후 incubator에서 30분간 용해하였다. 용해된 solution 20 μL를 96 well plate에 옮긴 후 3 mg/μL의 4-nitrophenyl phosphate가 든 50 mM acetate buffer (pH 5.0)를 100 μL씩 넣은 후 37℃에서 1시간 동안 반응시켰으며 반응 정지를 위해 0.1 N NaOH 100 μL를 첨가한 후 ELISA Leader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Bang et al., 1993).

Bcl-2 발현 실험

1×10^6 정도의 세포를 사용하여 cytochrome c의 Western blotting을 위한 세포질성 단백질을 분리하였다. 일단 플라스크에 있는 배지를 제거하고 cold PBS를 첨가한 후 scraper로 세포를 수집하였다. 10초간 원심분리하여 상등액을 버린 후 400 μL의 cold buffer A (10 mM Hepes-KOH[pH7.9], 1.5 mM

$MgCl_2$, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 0.1% NP-40)에 잘 현탁하여 얼음에서 30분간 방치하였다. 30분 후 10초간 pipette으로 균질화한 후 원심분리하여 상등액을 취하여 단백질의 농도를 측정한 후 -70℃에서 보관하면서 사용하였다.

위에서 분리한 각 암세포주의 단백질 40 μL을 9% SDS-polyacrylamide gell에서 Tris-glycine buffer로 전기 영동하였다. 전기영동이 끝난 gel을 분리하여 Western blotting 장치에 설치한 후 여기에 transter buffer를 채우고, 50V로 2시간 전이하고 membrane을 분리하여 30분간 blocking solution으로 blocking한 후 BclXL 혹은 Mcl-1에 대한 1차 항체를 첨가하여 1시간 동안 반응시켰다. Membrane을 blocking solution으로 잘 soaking 한 후 여기에 horseradish peroxidase 또는 alkaline phosphatase가 중합되어 있는 anti-mouse immunoglobulin G 항체 또는 anti-rabbit immmunogolbulin G 항체를 첨가하여 30분간 반응하였다. 위에서와 같이 PZBS, PBST를 바꾸어 가면서 membrane을 세척한 다음 membrane에 ECL 발색 시약을 첨가하여 반응시킨후 X-선 필름에 적정 시간 동안 노출시켰다. 이 감광된 필름의 수치적 데이터를 위하여 densitometer로 측정하였다 (Lee et al., 2002).

통 계

모든 data는 평균±표준오차 (Mean±standard error)로 나타내었으며, ANOVA로 통계검정한 뒤 Newman-Keuls 방법을 사용하여 사후 분석하였다.

결과 및 고찰

추출 수율

해수 미세조류인 *S. platensis*와의 추출 수율은 Table 1과 같다. Table 1에서 확인할 수 있듯이 해수의 추출방법에 따른 수율을 비교했을 때, 초음파를 병행 물 60℃ 추출물이 33.46%로 가장 높았다.

기존의 물 추출에 비하여 초음파 병행 추출물의 수율이 높게 나타나는 것은 초음파 조사 시 용존 산소나 기포를 액외로 방출시키는 탈기현상을 일으켜 이들이 서로 용매와 상호작용하면서 상승작용을 일으키기 때문이다 (Kim et al., 2005). 이런 상승작용으로 인하여 기존의 물 추출보다 낮은 온도에서 더 효율적인 추출이 이루어져 초음파 병행 추출물의 수율이 높게 나타나는 것으로 보이며 이는 초음파를 병행한 추출물에 더 많은 활성성분을 함유하고 있는 것으로 판단된다.

세포 독성 실험 측정 결과

S. platensis 추출물의 인간 신장 정상세포에 대한 세포독성을 sulforhodamine B assay를 사용하여 측정한 결과 모든 추출물에서 세포독성은 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었고, 최고 투여농도인 1.0 mg/mL에서 100℃ 물 추출물이 22.2%로 가장 높은 독성을 보였다. 가장 낮은 세포 독성 효과를 나타낸 것은 60℃ 초음파 병행 물 추출물에서 19.4%의 효과를 나타내었다. 대체적으로 초음파를 병행한 추출물에서 비교적 낮은 세포 독성을 나타내었고, 22.2% 이하의 세포 독성을 나타내어 비교적 정상세포에 대한 세포 독성이 적은 것으로 나타났다 (Fig. 1).

선택적 사멸도는 정상 세포의 세포독성에 대한 암세포 생육억제 활성의 비로 나타낸 것으로 보통 1.5 이상일 때 암세포에 대한 선택성이 있어 선택적으로 정상세포보다 암세포의 생육을 억제한다고 할 수 있다. 각 농도에서 정상 세포에 대한 암세포의 생육억제 활성의 비를 나타내는 선택적 사멸도를 구한 결과 인간 폐암세포와 인간 위암세포의 경우 모든 농도에서 1.5에서 4 사이의 높은 선택적 사멸도를 나타냈으며 (Fig. 2-5) 인간 유방암세포, 인간 간암세포의 경우도 추출물에서 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타냈으며 1.5 이상의 높은 선택적 사멸도를 보였다 (Table 2).

이 결과를 바탕으로 *S. platensis*는 인체에 큰 독성을 나타내지 않는 것으로 사료되어지며 이미 생리 활성이 알려진 *S. platensis*의 색소 단백 계열 물질은 60℃에서 변성이 일어나지 않고 초음파의 공동현성을 이용한 증류수 추출방법에서 가장 많이 추출되는 것으로 사료되어 진다.

암세포 생육 저해 효과

암세포 생육 저해 효과는 인감 폐암세포와 위암세포, 유방암 세포와 간암세포 (Hep3B)를 이용하여 SRB 방법을 이용하여 암세포 억제 활성을 측정하였다.

먼저 인간 폐암세포에 대한 생육 억제 활성을 측정한 결과 억제활성의 경우 대부분의 시료에서 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었으며, 대체적으로 초음파 병행 *S. platensis*가 더 높은 암세포 억제 활성을 나타내었다. 그 중 가장 좋은

Table 1. The fraction yield of ultrasonificated extract, according to temperature at 60℃, 100℃ from seawater *Spirulina platensis*

Sample	Temp. (°C)	Ultrasonification (40 kHz)	Yield (%. w/w)	
			Fraction solvents	
			Water Fr.	Ethanol Fr.
Seawater Spirulina platensis	60	-	27.16±0.30*	10.3±0.21***
		○	33.46±0.06**	8.89±0.11*
	100	-	19.8±0.04**	-
		○	20±0.13**	-

Each data represents mean±standard error (n=6).
Significant differences from extracts are indicated by *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001.

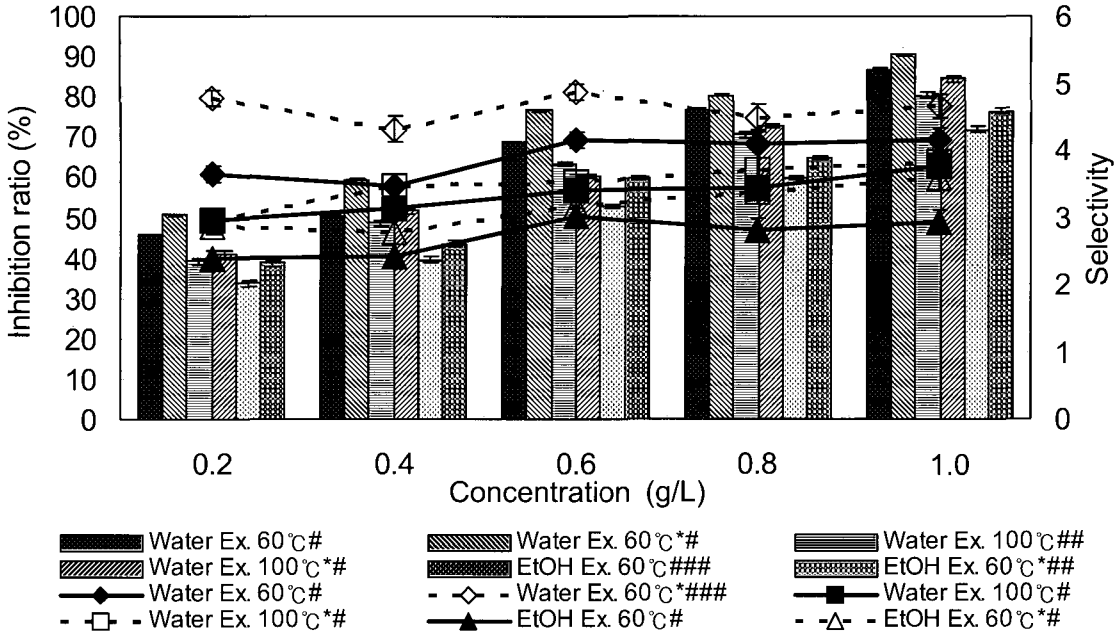

Fig. 1. Cytotoxicity of the extracts with ultrasonification (*) from the seawater (line) of *Spirulina platensis* on normal cell lines, HEK293. Significant differences from extracts are indicated by #p<0.05, ##p<0.01 and ###p<0.001.

Table 2. Inhibition ratio of growing of MCF7, Hep3B and selectivity in adding the extracts from seawater *Spirulina platensis* with ultrasonifacation (*)

Spifulina platensis	Concentration (mg/mL)	Inhibition ratio (%)		Selectivity	
		MCF7	Hep3B	MCF7	Hep3B
Water Ex. 60°C	0.2±0.16***	45.7±0.07***	43.7±0.16***	3.66±0.11	3.5±0.07**
	0.4±0.07**	54.8±0.06**	52.4±0.07***	3.75±0.03**	3.59±0.06**
	0.6±0.06**	63.2±0.03**	66.8±0.06*	3.81±0.11***	4.02±0.03***
	0.8±0.03**	70.4±0.11**	76.9±0.03*	3.74±0.07***	4.09±0.11**
	1.0±0.04***	80.4±0.07**	83.4±0.04***	3.85±0.05*	3.99±0.11**
Water Ex. 60°C*	0.2±0.11**	42.7±0.07***	47.5±0.11***	4.03±0.15***	4.48±0.04**
	0.4±0.15***	55.3±0.06*	60.8±0.15**	4.01±0.11***	4.41±0.16**
	0.6±0.20*	69.4±0.03**	75.9±0.20***	4.42±0.20	4.83±0.18
	0.8±0.18**	76.7±0.16***	93.6±0.18***	4.28±0.18***	4.67±0.19***
	1.0±0.07**	82.6±0.15	90.6±0.04**	4.26±0.04**	4.67±0.16**
Water Ex. 100°C	0.2±0.06*	46.3±0.20***	42.9±0.06*	3.51±0.03*	3.25±0.02*
	0.4±0.06***	50.4±0.9	54.8±0.07***	3.23±0.05	3.51±0.02
	0.6±0.04**	59.6±0.19**	60.8±0.16***	3.2±0.08**	3.27±0.20***
	0.8±0.01**	70.3±0.11**	72.6±0.15	3.43±0.06**	3.54±0.16***
	1.0±0.15*	78.9±0.04***	82.6±0.20	3.7±0.01***	3.88±0.20
Water Ex. 100°C*	0.2±0.20***	47.3±0.16	42.7±0.18	3.43±0.20	3.1±0.09
	0.4±0.18***	57.3±0.07**	59.4±0.19**	3.85±0.18**	3.99±0.14**
	0.6±0.04**	69.4±0.18**	67.5±0.16**	4.03±0.16*	3.92±0.11**
	0.8±0.03***	76.5±0.16	77.8±0.17**	3.90±0.14**	3.97±0.01**
	1.0±0.07*	81.4±0.14**	85.4±0.06**	3.67±0.11**	3.85±0.16**
EtOH Ex. 60°C	0.2±0.16***	42.5±0.11**	43.7±0.07*	3.04±0.07*	3.12±0.16**
	0.4±0.20**	55.7±0.01*	52.7±0.16**	3.42±0.16**	3.23±0.11**
	0.6±0.18*	64.5±0.23**	60.5±0.20**	3.69±0.20*	3.46±0.04**
	0.8±0.04***	73.4±0.15***	72.5±0.09*	3.45±0.09*	3.4±0.18
	1.0±0.11**	76.4±0.16**	77.7±0.14**	3.12±0.14*	3.17±0.16*
EtOH Ex. 60°C*	0.2±0.15*	50.8±0.16**	43.7±0.1**1	3.76±0.11***	3.24±0.18***
	0.4±0.20**	56.3±0.05	51.9±0.01**	3.61±0.01**	3.33±0.07***
	0.6±0.18**	67.8±0.21***	63.7±0.23**	3.61±0.23**	3.39±0.01***
	0.8±0.16**	73.5±0.18***	75.8±0.18***	3.83±0.16	3.95±0.23***
	1.0±0.07*	80.6±0.19*	82.4±0.04*	3.78±0.05*	3.87±0.16**

Each data represents mean±standard error (n=6).
Significant differences form the extracts are indicated by *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001.

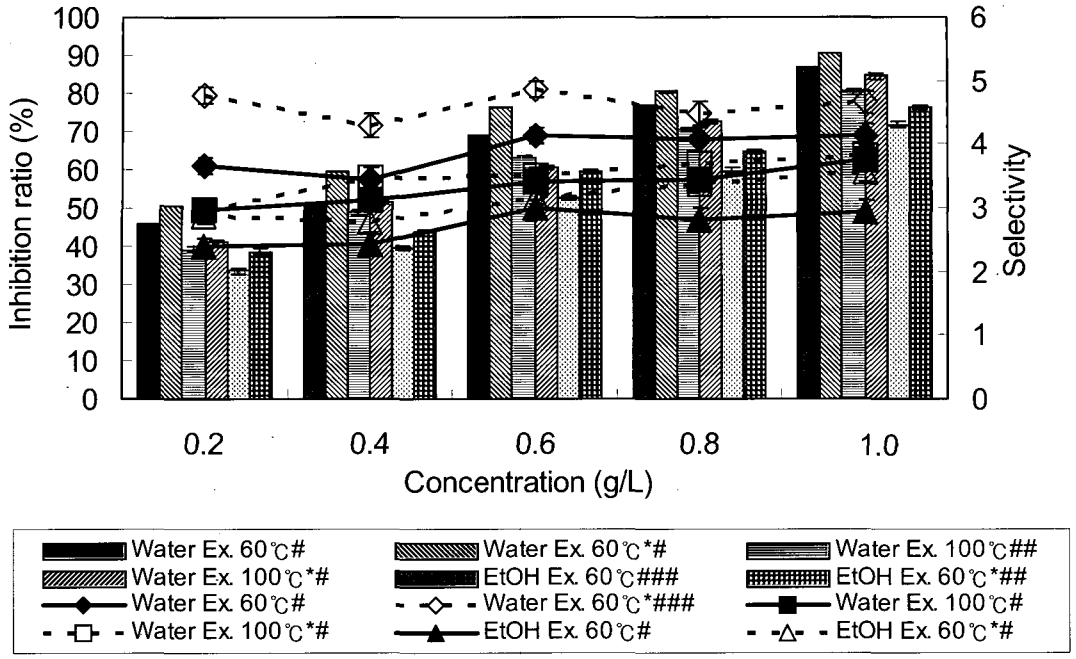

Fig. 2. Inhibition ratio of growth of A549 (bar chart, %) and selectivity (scatter line) in adding the extracts with ultrasonification (*) from seawater of *Spirulina platensis*. Significant differences from extracts are indicated by #p<0.05, ##p<0.01 and ###p<0.001.

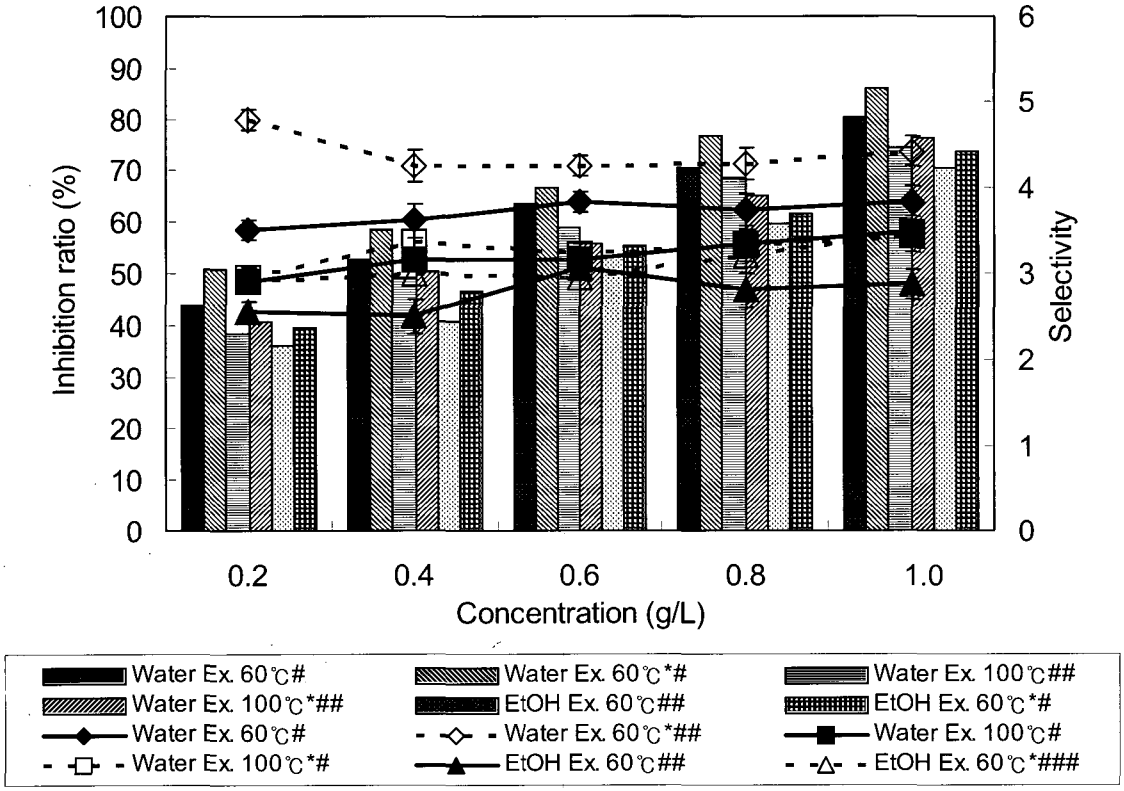

Fig. 3. Inhibition ratio of growth of AGS (bar chart, %) and selectivity (scatter line) in adding the extracts with ultrasonification (*) from seawater of *Spirulina platensis*. Significant differences from extract are indicated by #p<0.05, ##p<0.01 and ###p<0.001.

암세포 억제 효과를 나타낸 것은 60℃ 물 초음파 병행 추출물로서 1.0 mg/mL의 농도에서 90.4%의 높은 암세포 억제 활성을 나타내었다. 그리고 모든 가장 낮은 억제효과를 나타낸 60℃ 에탄올 추출물의 1.0 mg/mL의 농도에서 71.8%를 나타내어 모든 추출물에서 높은 항암활성효과를 나타내었다 (Fig. 2).

인간 위암세포에 대한 암세포 생육억제 활성을 측정한 결과 대부분의 추출물에서 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었고, 농도가 1.0 mg/mL일 때 가장 높은 암세포 억제 활성을 나타내었다. 이 세포주에 대해서도 초음파 병행 추출물이 높은 암세포 생육 억제 활성을 나타내었으며, 60℃ 물 초음파 병행 추출물의 1.0 mg/mL의 농도에서 85.9%로 가장 높은 암세포 억제 활성을 나타내었다 (Fig. 3).

인간 유방암 세포인 MCF-7을 이용하여 생육억제 활성을 측정한 결과 모든 시료에 대해 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었고, 초음파 병행 추출물 모두 1.0 mg/mL의 농도에서 78% 이상의 높은 암세포 억제 활성을 나타내었다. 여기서도 알 수 있듯이 초음파 병행 추출물과 일반 추출물을 비교했을 때 초음파를 병행하여 얻은 추출물이 더 높은 암세포 억제 활성을 나타낸 것을 확인 할 수 있었다. 그 중 가장 높은 억제 활성을 나타낸 것은 60℃ 물 초음파 병행 추출물로서 농도 1.0 mg/mL에서 82.6%의 높은 암세포 억제 활성을 나타내었다.

인간 간암 세포에 대한 암세포 억제 활성을 측정한 결과는 앞의 세 가지 암세포 주와 마찬가지로 모든 시료에 대해 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 그리고 이 암세포주에 대해서도 60℃ 초음파 병행 추출물이 높은 암세포 억제 활성을 나타내었다. 초음파 병행 60℃ 물 추출물과 100℃ 물 추출물의 암세포 억제 활성은 1.0 mg/mL의 농도에서 각각 90.6%, 85.4%로 높은 억제 활성을 나타내었고, 이와 비교하여 초음파를 병행하지 않은 60℃ 물 추출물과 100℃ 물 추출물도 각각 84.4%, 82.6%로 높은 억제활성을 보였다.

이 결과 추출물이 4가지 암세포 주에 대해 생육 억제 활성이 높은 것을 확인할 수 있었고, 그 중 초음파 병행한 추출물에서 가장 높은 항암 효과를 나타내었다 (Table. 2).

세포의 분화도 측정 결과

사람 백혈병으로부터 유래된 암세포주인 HL-60은 macrophage나 granulocyte로 분화가 되어 사멸하는 기작을 가지고

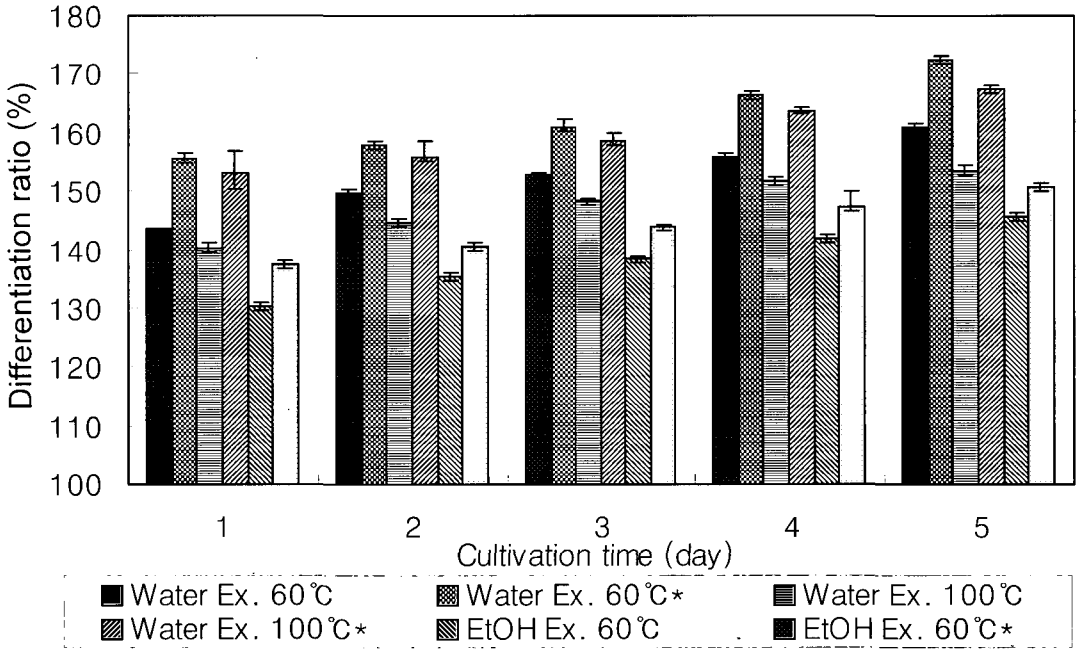

Fig. 4. Differentiation of HL-60 cells in adding the extracts with ultrasonification (*) from and seawater of *Spirulina platensis*. The values represent the mean±standard deviation.

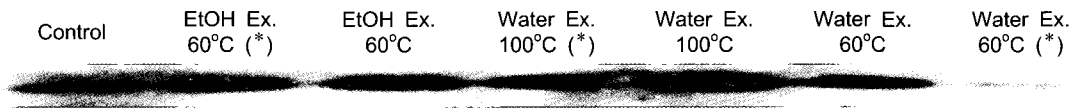

Fig. 5. Representative immunoblotting of Bcl-2, adding the extracts with ultasonification (*) from seawater of *Spirulina platensis*.

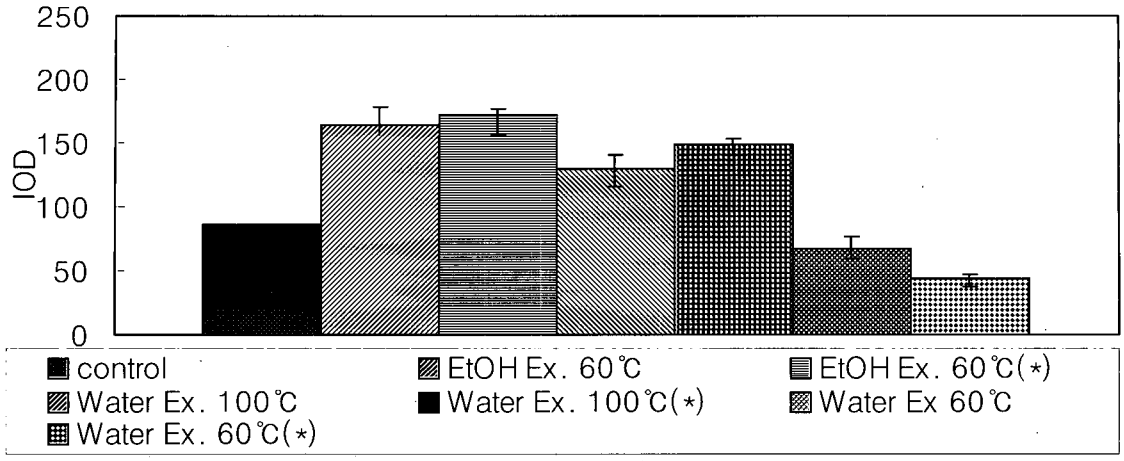

Fig. 6. Densitometric analysis of Bcl-2, seawater *Spirulina platensis* immunoblottings. The values represent the mean±standard deviation.

있어 암세포인 HL-60의 세포의 분화도 즉, 사멸기작의 증가 경향을 보임으로서 항암 효과를 가지고 있다고 할 수 있다 (Yen et al., 1986).

HL-60세포 분화도를 살펴본 결과는 Fig. 4에서 나타내었다. HL-60세포에 각 시료를 1.0 mg/mL의 농도로 투여한 후, 5일 동안 세포의 분화도를 관찰한 결과이다. 모든 시료에서 시간 의존적으로 분화도가 증가하는 경향을 나타내었고, 일반추출물보다 초음파 병행 추출물이 더 높은 세포 분화 활성을 나타냈다. 그 중 60℃, 증류수 초음파 병행 추출물에서 5일째 172.4%로 가장 높게 나타났고, 이와 비교해 초음파를 제외한 동일 조건의 *S. platensis* 추출물이 158.4%를 나타내어 모두 비교적 높은 세포 분화도를 나타내었다. 이는 앞선 연구결과에서 암세포 생육 억제 활성이 가장 높게 나타낸 것과 같은 이유라고 사료되어진다.

Bcl-2 발현변화

각종 암 조직에서는 Bcl-2의 이상 혹은 과잉 발현이 나타나고 있으며 정상세포는 외부 유해요인에 의해 손상될 경우 유전자 복구시스템을 가동, 암을 억제하지만 Bcl-2의 발현이 많은 세포는 이러한 작용을 하지 못하여 암의 발병률이 높아진다. 세포의 Bcl-2발현량을 측정함으로써 암의 발생에 대해 예측 할 수 있다 (Youn et al., 2004).

이로서 인간 정상 신장 세포인 HEK293을 이용하여 각 시료에 대한 Bcl-2의 발현에 미치는 영향을 검토하였으며 Bcl-2의 발현 양을 나타나게 하기 위해 Densitometer를 이용하여 IOD 값을 측정하여 발현양을 비교하였다.

초음파병행 추출물과 일반 추출물의 Bcl-2 발현량을 살펴본 결과는 Fig. 5에서 나타내었다. 일반추출물과 초음파 병행 추출물을 비교한 결과 초음파 추출물에서 더 낮은 IOD값을 나타내었다. 그 중 60℃ 물 초음파 병행 추출물에서 67.4로 가장 낮게 나타났고, 이와 비교해 *S. platensis*의 초음파를 제외한 동일조건 추출물은 80.5를 나타냈고 (Fig. 6), 각종 암 조직에서는 Bcl-2의 이상 혹은 과잉 발현이 나타나고 있다는 점 (Lee et al., 2002)에서 *S. platensis*의 60℃ 초음파 병행 추출물의 낮은 IOD값은 암 발생 확률이 낮다는 것으로 추정할 수 있다.

사 사

본 연구는 산업자원부 지방기술혁신산업(RT105-01-02) 지원으로 수행되었음.

참 고 문 헌

Bang, O.S., Y.S. Lee and S.S. Kang. 1993. A possible role of fibronectin on the differentiation of monocyte to macrophage. Kor. J. Zool., 36, 514-521.

Casey, R.P., R.J. Lubitz and B.J. Weissman. 1963. Mass culture of *Chlorella*. Food Technol., 17, 1039-1072

Diego, J.M., C. Gomez, E. Ibanez, F.J. Ruperez and C. Barbas. 2004. Tocopherol measurement in edible products of vegetable origin. J. Chromatogr. A., 1054, 227-233.

Frooq, S.M., A.S. Ebrahim, D. Asokan, R. Sakthivel, S. Savitha, N.G. Rajesh and P. Varalakshmi. 2005. Credentials of *Spirulina* diet on stability and flux related properties on the biominerralization process during oxalate mediated renal calcification in rats. Clin. Nutr., 24, 932-942.

Grinstead, G.S., S.S. Tokach, R.D. Goodband and J.L. Nelssen. 2000. Effects of *Spirulina platensis* on growth performance of weanling pigs. Anim. Feed Sci. Technol., 83, 237-247.

Hernandez, A.C., I. Nieves, M. Meckes, G. Chamorro and B.L. Barron. 2002. Antiviral activity of Spirulina Maxima against Herpes simplex virus type 2. Antivir.

Res., 56, 297-285.

Herrero, M., E. Ibanez, J. Senorans and A. Cifuentes. 2004. Pressurized liquid extracts from *Spirulina platensis* microalga. Determination of their anti-oxidant activity and preliminary analysis by micellar electrokinetic chromatography. J. Chromatogr., 1047, 195-203.

Kaji, T., Y. Fujiwara, Y. Inomata, C. Hamada, C. Yamamoto, S. Shimada, J.B. Lee and T. Hayashi. 2002. Repair of wounded monolayers of cultured bovine aortic endothelial cells is inhibited by calcium spirulan, a novel sulfated polysaccharide isolated form *Spirulina platensis*. Life Sci., 70, 1841-1848.

Kay, R.A. 1991. Microalgae as food and supplement. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 30, 555-573.

Kim, J.H., D.H. Kim, J.H. You, C.H. Kim, M.C. Kim, N.S. Seong, S.E. Lee and H.Y. Lee. 2005. Immuno-rejulatory activities of various fractions from *Ehpedrae Sinica* STAPF, *Rubus Coreanus* Miq. and *Angelica gigas* nakai extracts with ultrasonification., Kor. J. Med. Grop Sci., 13, 161-170.

Kim, W.Y. and J.Y. Park. 2004. The effect of *Spirulina* on lipid metabolism, antioxidant capacity and immune function in Korean elderlies, Kor. Soc. Med. Grop Sci., 36, 287-297.

Lee, T.J., J.S Lee, J.E. Choi, J.J. Bea and T.Y. Lee. 2002. The effect of mycolactone on the expression of Bcl-2 family genes in Hep3B hepatoma cells. J. Bacteriol. Virol., 32, 55-61

Lee, H.S., S.H. Lee, H.C. Mun and H.Y. Lee. 2003. Screening of the immuno-stimulatory activity of the marine alga *Chlorella* capsulate. Kor. J. Biotechnol. Bioeng., 18, 19-24.

Nandeesha, M.C., B. Gangadhara, K.K. Manissery and L.V. Venkataraman. 2001. Growth performance of two Indian major carps, catla (*Catla catla*) fed diets containing different levels of *Spirulina platensis*. Bioresour. Technol.. 80. 117-120.

Pairat, K. and Y. Qiming. 2001. Cadmium (II) removal from aqueous solutions by pre-treated biomass of marine alga *Padina* sp., Environ. Pollut., 112, 209-213.

Pak, S.G., J.H. Lee, G. Moon, S.J. Moon, J.H. Won and L.G. Pak. 2000. Study on transscriptional factors activiation change of HL-60 cell apoptosis by hedyotis diffusa's methanol extract. J. Kor. Orent. Oncol., 6, 67-79.

Rubinstein, L.V., R.H. Shoemaker and M.R. Boyd. 1990. Comparison of in vitro anticancer drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. J. Natl. Cancer Inst., 82, 1113-1118.

Saiki, I. 1999. *Spirulina*. Hangarm Press, pp. 62.

Singh, A., S.P. Singh and R. Bamezai. 1998. Perinatal influence of *Chlorella vulgris* (E-25) on hepatic drug metabolizing enzymes and lipid peroxidation, Anti-can. Res., 18, 1509-1514.

Susumu, O., K. Atsusuhito, H. Taisuke, K. Takato, K. Tatsuhiko and N. Maki. 2002. Total synthesis of sporochnols, fish deterents from a marine alga, *Tetrahedron*. Lett., 43, 4641-4644.

Yang, H.N., E.H. Lee and H.M. Kim. 1997. *Spirulina platensis* inhibits anaphylactic reaction. Life Sci., 61, 1237-1244.

Yen, Y. and D.L. Guernsey. 1986. Increased c-myc RNA levels associated with the precommitment state during HL-60 myeloid differentiation. Cancer Res., 46, 4156-4161.

Youn, C.K., H.J. Cho, S.H. Kim, H.B. Kim, M.H. Kim, I.Y. Chang, J.S. Lee, M.H. Chung, K.S.H. and H.J. You. 2004. Bcl-2 expression suppresses mismatch repair activity through inhibition of E2F transcriptional activity. Nat. Cell Biol., 7, 137-147

2006년 5월 29일 접수
2006년 8월 23일 수리