

## 갈파래(*Ulva lactuca*) 추출분획의 암 세포주에 대한 세포독성 및 면역활성 효과

장민경 · 김남영 · 이동근 · 이재화 · 하종명 · 하배진 · 김미향<sup>1</sup> · 배송자<sup>1</sup> · 장정수<sup>2</sup> · 이상현\*

신라대학교 의생명과학대학 제약공학과, <sup>1</sup>신라대학교 의생명과학대학 식품영양학과, <sup>2</sup>(주)바이넥스 기업부설연구소

Received August 3, 2006 / Accepted October 11, 2006

### Effects of *Ulva lactuca* Extracts on Cytotoxicity of Cancer Cell Lines and Immune Stimulation.

Min-Kyung Jang, Nam-Young Kim, Dong-Geun Lee, Jae-Hwa Lee, Jong-Myung Ha, Bea-Jin Ha, Mihyang Kim<sup>1</sup>, Song-Ja Bae<sup>1</sup>, Jeong Su Jang<sup>2</sup> and Sang-Hyeon Lee\*. Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical Life Science, Silla University, San 1-1, Gwaebop-dong, Sasang-gu, Busan 617-736, Korea, <sup>1</sup>Department of Food and Nutrition, College of Medical Life Science, Silla University, San 1-1, Gwaebop-dong, Sasang-gu, Busan 617-736, Korea, <sup>2</sup>Central Research Institute, Binex Co., Ltd. 480-2, Janggrim-dong, Saha-gu, Busan, 604-846, Korea – Extracted fractions of the green seaweed *Ulva lactuca* were studied to verify the cytotoxicity and immunostimulating activity. The fractions from the ethanol extract of *U. lactuca* were prepared by the systematic extraction procedure with solvents such as hexane, ethyl ether, methanol, butanol and H<sub>2</sub>O. The cytotoxic effects of *U. lactuca* fractions against human leukemia cell line U937, mouse neuroblastoma cell line (NB41A3), human hepatoma cell line (HepG2) and rat glioma cell line (C6) were investigated. Ethyl ether fraction showed the highest cytotoxicity against all four cell lines tested. In addition, H<sub>2</sub>O fraction also showed relatively high cytotoxicity. Dose dependent patterns were observed on all four cell lines. The immuno-stimulating effects of *U. lactuca* fractions on rat macrophage cell line (RAW 264.7) were also investigated. All five fractions of *U. lactuca* extract stimulated NO production with concentration dependant manner. These results suggest that *U. lactuca* may be a useful candidate for a natural cancer preventing and immuno-stimulating agents.

**Key words** – C6, HepG2, MTT assay, NB41A3, NO assay, RAW 264.7, U937, *Ulva lactuca*.

## 서 론

최근 의학의 지속적인 발전에 의해 질병에 대한 많은 치료제가 개발되었지만, 그 예방법과 치료법이 분명치 않고 결정적인 결과를 가진 약제를 발견하지 못하고 있는 실정이다[4,9]. 질병 치료에 개발되어 사용되고 있는 화학요법제는 그 치료적 체계성 및 구성약의 부작용과 독성으로 이용이 제한적이므로 인체에 무해하면서도 질병을 효과적으로 치료할 수 있는 새로운 치료제를 천연물로부터 탐색하려는 연구가 필요하다. 특히, 항암 및 면역 활성을 나타내는 물질을 찾아내어 이용함으로써 식품의 단순한 영양적, 기호적인 기능 외에 생체방어 또는 질병에 대한 치료효과를 찾아내어 암의 극복에도 획기적인 계기를 제시해 주고 있다[8]. 뿐만 아니라, 암의 원인을 규명하고 치료방법을 찾고자 하는 노력이 계속되고 있으며, 특히 천연과 전통식품 및 한약재를 대상으로 새로운 항암성분을 찾으려는 노력이 계속되고 있다[1,5,9,11].

바다에 생육하고 있는 해조류에는 지구상에 알려진 많은 원소들이 축적되어 있다고 알려져 있다. 특히, 해조류는 이들

원소를 표면 전체로부터 흡수하여 수체에 비해 최대 수만 배까지 농축된 미네랄의 보고라 할 수 있다[12]. 또한 비타민, 무기질 등의 미량성분들이 균형있게 분포되어 있어 대사작용의 개선, 저칼로리 다당류인 식이성 섬유에 의한 정장 작용과 유독물질의 제거효과, 저분자 생리활성 물질은 혈압과 콜레스테롤의 정상화 및 암 예방에 효과가 있는 것으로 알려져 있다[1,6,12,13]. 해조류의 항암성에 관한 연구로는 녹조류, 갈조류, 홍조류에서의 항암 효과, 해조류 추출물의 항돌연변이 효과 등이 보고되어 있다[2,6,12,13].

갈파래(*Ulva lactuca*)는 파래과에 속하는 녹조식물로서 전세계의 외해의 간조선 부근의 바위에 부착하여 서식한다. 상추잎처럼 생긴 엽상체는 길이 30 cm에 달하며, 2층으로 배열된 세포들이 질기고 끈적끈적한 젤라틴에 의해 둘러싸여 있다. 생활사는 포자를 만드는 이배체 세대와 배우자를 만드는 반수체 세대가 번갈아 가면서 나타나며, 몸의 일부가 떨어지거나, 배우자가 포자처럼 자라 무성생식이 일어난다. 갈파래에는 비타민 A, B, C가 풍부하게 들어 있지만, 현재 우리나라에서는 갈파래를 식용으로 사용하지 않고 가축의 사료로 활용하고 있는 실정이다. 한편 유럽에서는 갈파래를 식용으로 이용하고 있지만 식품학적 및 생리활성에 관한 기초적인 연구가 있을 뿐 *in vitro* 및 *in vivo*에서의 생리활성 효능에 관한 연구는 미진한 편이다. 국내에서는 홑파래에서 추출한 당

### \*Corresponding author

Tel : +82-52-999-5624, Fax : +82-51-999-5636  
E-mail : slee@silla.ac.kr

단백질의 항암효과 및 면역 활성이 보고된바 있다[10].

본 연구는 갈파래의 에탄올 추출물에 대한 용매별 분획을 행하여 얻은 각각의 분획물들의 생리활성을 연구하기 위해 다양한 암세포주들에 대한 세포독성 및 면역활성을 검증하였다.

### 재료 및 방법

#### 세포주, 배지 및 배양

인체 혈구암세포주 U937과 생쥐 대식세포주 RAW 264.7은 10% feal bovine serum (Bio Whittaker, Walkersville, MD, USA)과 penicillin-streptomycin (100 units/ml, Bio Whittaker)을 포함하는 RPMI 1640 (Bio Whittaker)배지를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. 생쥐 신경아종세포주 NB41A3, 인체 간암세포주 HepG2, 큰쥐 신경교세포주 C6는 10% feal bovine serum (Bio Whittaker)과 penicillin-streptomycin (100 units/ml)을 포함하는 Delbecco's modified eagle medium (DMEM)배지를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다.

#### 분획물의 제조

갈파래(*Ulva lactuca*)는 부산 광안동 수변공원에서 채취하여 증류수로 수세, 정선 및 탈수과정을 거쳐서 건조시킨 후 분쇄한 시료 무게의 10배량 (w/v)의 80% ethanol로 약 60°C에서 8시간 동안 추출을 행하였으며, 추출액은 Whatman NO.3 여과지(Whatman International Ltd., Maidstone, England)로 2회 여과하였다. 이를 butanol, ethyl ether, hexane, methanol, H<sub>2</sub>O 등을 이용하여 Fig. 1에 나타난 방법으로 분획을 행한 후, 농축하여 분획물을 제조하였다.

#### MTT 분석법을 통한 암세포에 대한 세포독성 측정

MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MI, USA) 제품을 이용하였다. 배양된 인체 혈구암세포주 U937, 생쥐 신경아종세포주 NB41A3, 인체 간암세포주 HepG2, 큰쥐 신경교세포주 C6를 96-well plate (Roche Inc., Indianapolis, IN, USA)에 180µl씩 분주하고, 갈파래 분획물들을 phosphate-buffered saline (PBS, Bio Whittaker)에 희석하여 20 µl씩 첨가하였다 (최종농도: 0.5, 0.1, 0.01 mg/ml). 대조군은 갈파래 분획물 대신 동량의 PBS를 가하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 48시간 추가 배양한 후 배양액을 제거하고 MTT (5 mg/ml in PBS)용액을 100 µl씩 가하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 4시간 동안 배양하였다. 이후 DMSO 100 µl를 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 10~15분 동안 반응시킨 후 발색정도를 Synergy HT Multi-detection microplate reader (Biotek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 540 nm의 파장에서 OD값으로 측정하였다.

#### Nitric oxide (NO) 분석법을 통한 면역활성 측정

생쥐 대식세포주 RAW 264.7을 96-well plate (Roche Inc.)에 분주하고 24시간 배양하였다. 배지를 제거한 후 배양세포를 PBS로 세정한 후 갈파래 분획물들을 PBS에 희석하여 20 µl씩 첨가하였다 (최종농도: 0.5, 0.1, 0.01 mg/ml). 대조군은 갈파래 분획물 대신 동량의 PBS를 가하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 24시간 배양한 후 배양액 100 µl에 reaction diluent 400 µl를 첨가하여 희석을 행하였다. Total NO assay는 Total NO/Nitrite/Nitrate Assay Kit (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 제조사의 manual을 토대로 행하였으며, Synergy HT Multi-detection microplate reader (Biotek Instruments, Inc.)

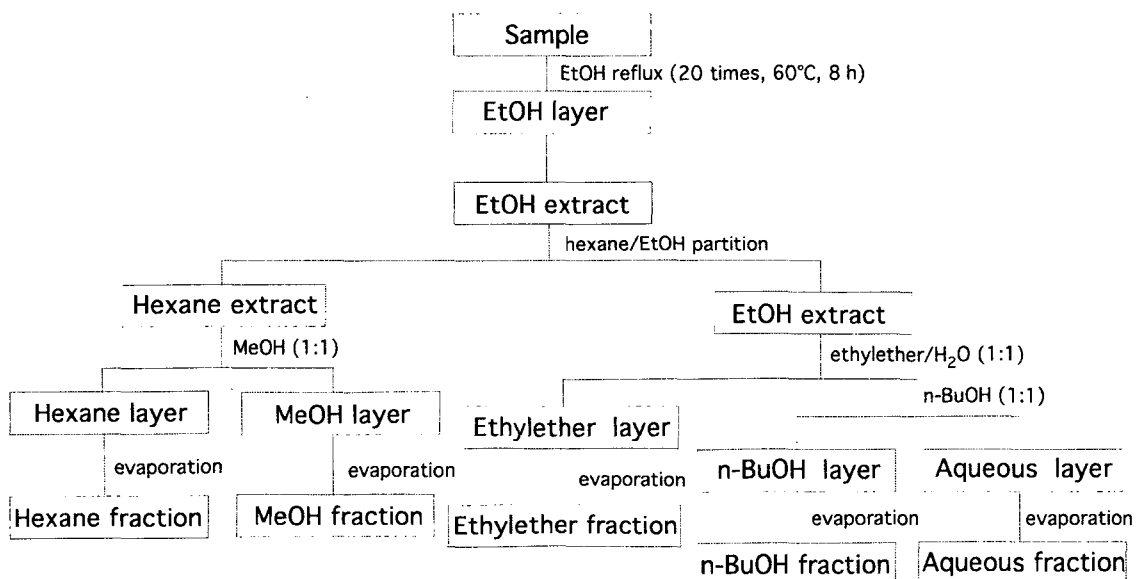


Fig. 1. Schematic diagram of sample extraction and fractionation from *Ulva lactuca* powder.

를 이용하여 540 nm의 파장에서 OD값을 측정하였다.

### 결과 및 고찰

#### 갈파래의 에탄올 추출 및 각 용매별 분획물의 제조

갈파래 시료 800 g에 대한 에탄올 추출을 행하고 이를 Rotary evaporator (EYELA Inc., Tokyo, Japan)로 농축을 행하여 최종적으로 3 L의 에탄올 추출시료를 얻었다. 이를 butanol, ethyl ether, hexane, methanol, H<sub>2</sub>O 등을 이용하여 분획을 행하고(Fig. 1), 얻어진 분획물을 Centrifugal evaporator (Sovall RC 5C+, Asheville, NC, USA)를 이용하여 용매 제거 및 농축을 행한 결과 각각의 갈파래 분획물 시료들을 10 mg 전후의 비슷한 양으로 얻을 수 있었다.

#### 갈파래분획물의 암세포에 대한 세포독성

MTT 분석법[3,9]은 살아있는 세포내 미토콘드리아의 dehydrogenase에 의해서 MTT가 formazan으로 변화하는 것을 이용하며, 생성된 formazan의 농도를 spectrophotometer로 측정함으로써 세포에 대한 독성을 조사하는 방법으로서, 각종 항암제에 대한 *in vivo* 세포독성에 관한 연구에 사용되어 온 dye exclusion test나 [<sup>3</sup>H]-thymidine uptake assay와 비교 시 실험 조작이 매우 간편하고 재현성이 우수하여 세포 독성여부 대량검색이나 초기 검색단계에 적당한 방법으로 많이 이용되고 있다[7]. 이 방법은 방사선 동위원소를 사용하지 않고 세포의 증식 및 생존율을 정확히 측정할 수 있는 방법으로서, 육안으로도 발색정도를 관찰할 수 있다.

인체 혈구암세포주(U937)에 대한 갈파래의 각 용매 분획물의 생육저해 활성을 측정한 결과를 Fig. 2에 나타냈다. Ethyl ether층 분획물의 경우 0.5 mg/ml의 농도에서 미처리 대조군에 비해 92%의 탁월한 생육저해 활성을 보였고 수층 분획물의 경우 0.5 mg/ml의 농도에서 80%의 생육저해 활성을 나타냈다(Fig. 2). 이는 다른 분획물인 Hexane층, BuOH층, MeOH층에 비해 높은 활성을 나타내는 것이었다. 가장 높은 생육저해 활성을 보이는 Ethyl ether층 분획물을 각각 0.1, 0.01 mg/ml로 처리했을 때 대조군에 비해 70%와 50%의 생육저해 활성을 보였고, 수층분획물은 0.1, 0.01 mg/ml 농도에서 각각 50%와 28%의 생육저해 활성을 보였다. 즉, 갈파래 추출물은 농도의존적으로 혈구암 세포에 대한 생육저해 효과를 보이는 것으로 나타났다(Fig. 2).

생쥐 신경아종세포주(NB41A3)에 대한 갈파래의 각 용매 분획물의 생육저해 활성을 측정한 결과를 Fig. 3에 나타냈다. Ethyl ether층 분획물의 경우 0.5 mg/ml의 농도에서 미처리 대조군에 비해 70%의 탁월한 생육저해 활성을 보였고 수층 분획물의 경우 0.5 mg/ml의 농도에서 45%의 생육저해 활성을 나타냈다(Fig. 3). 이는 다른 분획물인 Hexane층, BuOH층, MeOH층에 비해 높은 활성을 나타내는 것이었다. 가장 높

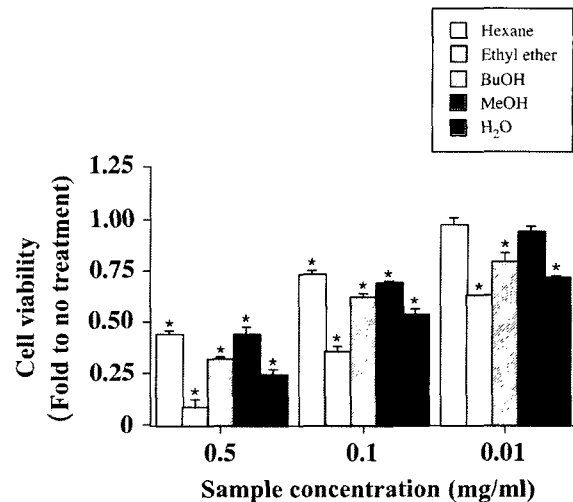


Fig. 2. Cell viability of human leukemia cell line U937 to the fractions of *Ulva lactuca* extract. Means  $\pm$  SEM for three wells are shown as fold compared with no treatment. \*ANOVA  $p < 0.0001$  compared with no treatment. This experiment was repeated at least twice.

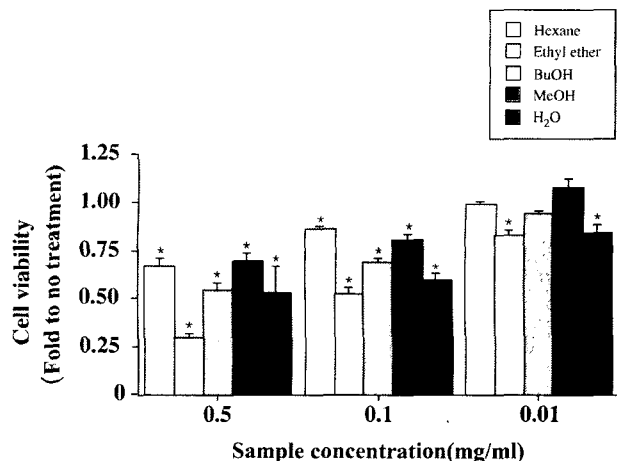


Fig. 3. Cell viability of mouse neuroblastoma cell line NB41A3 to the fractions of *Ulva lactuca* extract. Means  $\pm$  SEM for three wells are shown as fold compared with no treatment. \*ANOVA  $p < 0.0001$  compared with no treatment. This experiment was repeated at least twice.

은 생육저해 활성을 보이는 Ethyl ether층 분획물을 각각 0.1, 0.01 mg/ml로 처리했을 때 대조군에 비해 50%와 20%의 생육저해 활성이 나타났으며, 수층분획물은 0.1, 0.01 mg/ml 농도에서 각각 40%와 17%의 생육저해 활성을 보였다. 갈파래 분획물은 혈구암 세포의 경우와 비슷하게 신경아종 세포에서도 전반적으로 농도에 의존하는 생육저해 효과를 보였고 그 중에서도 Ethyl ether층과 수층에서 높은 활성을 나타냈다(Fig. 3).

인체 간암세포주(HepG2)에 대한 갈파래의 각 용매 분획물의 생육저해 활성을 측정한 결과를 Fig. 4에 나타냈다. 간암세포주에 갈파래의 각 분획물을 첨가하여 생육저해 활성

을 측정된 결과 전반적으로 높은 활성을 나타냈고 특히 Ethyl ether층 분획물의 경우 0.5 mg/ml의 농도에서 미처리 대조군에 비해 75%의 생육저해 활성으로 다른 분획물에 비해 월등히 높은 활성을 나타냈다(Fig. 4). 분획물의 농도를 0.1 mg/ml로 처리하였을 때, Ethyl ether층과 수층에서 약간 높은 활성을 나타냈다(Fig. 4). 분획물의 농도를 0.01 mg/ml 의로 처리하였을 때는 0.5, 0.1 mg/ml의 농도보다 낮은 활성을 보여, 갈파래 추출물의 농도가 증가함에 따라 암세포 생육저해 효과도 증가한 것으로 나타났다 (Fig. 4).

큰쥐 신경교세포주(C6)에 대한 갈파래의 각 용매 분획물의 생육저해 활성을 측정된 결과를 Fig. 5에 나타냈다. 분획

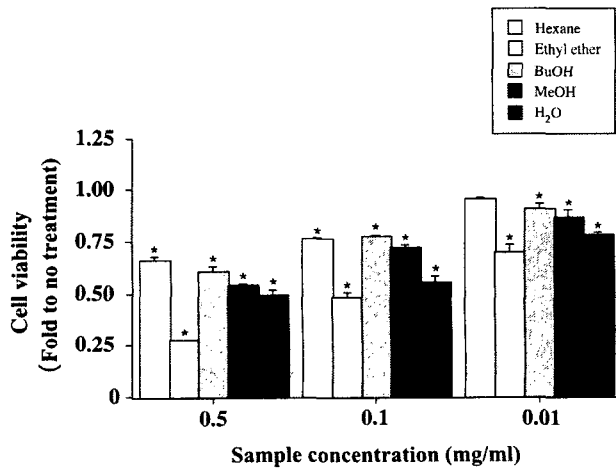


Fig. 4. Cell viability of human hepatoma cell line HepG2 to the fractions of *Ulva lactuca* extract. Means  $\pm$  SEM for three wells are shown as fold compared with no treatment. \*ANOVA  $p < 0.0001$  compared with no treatment. This experiment was repeated at least twice.

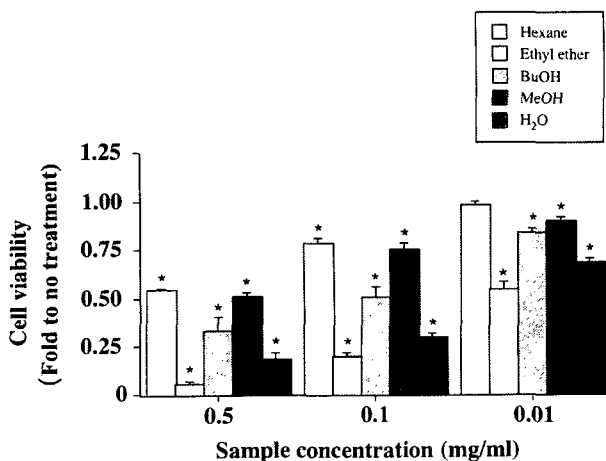


Fig. 5. Cell viability of rat glioma cell line C6 to the fractions of *Ulva lactuca* extract. Means  $\pm$  SEM for three wells are shown as fold compared with no treatment. \*ANOVA  $p < 0.0001$  compared with no treatment. This experiment was repeated at least twice.

물들은 전반적으로 높은 생육저해 활성을 보였으며 특히 Ethyl ether층 분획물의 경우 0.5 mg/ml의 농도에서 미처리 대조군에 비해 95%의 생육저해 활성을 나타냈고 다음으로 수층 분획물의 생육저해 활성이 높았다(Fig. 5). 갈파래의 Ethyl ether층 및 수층의 분획물들은 신경교 세포의 증식을 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 5).

우리나라의 암에 의한 사망자수 1위가 간암이며 평균발병 연령은 약 55세이다. 대부분 40-60세 사이에 이 질환에 걸리게 되는데 가장 활발히 일하는 한 가정의 대들보를 엄습하는 질환으로서 사회적, 가정적으로도 절실한 문제가 되고 있다. 또한 신경교종은 뇌종양의 50%를 차지하는 가장 흔한 종양이다. 일반적으로 이 종양은 주변의 뇌로 퍼져나가기 때문에 정상적인 뇌와의 경계가 명확하지 않아 수술로 전부 적출하는 것은 어렵기 때문에 약물치료제의 연구가 시급한 실정이다. 본 연구 결과로 갈파래로부터 추출한 생리활성 물질을 이용하여 암세포들에 대해 세포독성을 나타내는 성분을 밝혀내고 연구를 계속해 나간다면 새로운 항암활성 소재의 개발에 도움이 될 것으로 기대된다.

#### 갈파래 분획물의 면역활성

생쥐 대식세포주(RAW 264.7)에 대한 갈파래의 각 용매 분획물의 면역활성 측정결과를 Fig. 6에 나타냈다. 갈파래의 Ethyl ether층 추출분획의 0.5 mg/ml의 농도의 시료에서 가장 높은 활성이 나타났지만 분획 전반에 걸쳐 대체로 유사한 활성을 보였다 (Fig. 6). 분획물 0.1 mg/ml의 농도의 경우는 분획 전반에 걸쳐 유사한 정도의 활성을 보였으나 Ethyl ether층에서 약간 낮은 활성을 보였다. 분획물 0.01 mg/ml의

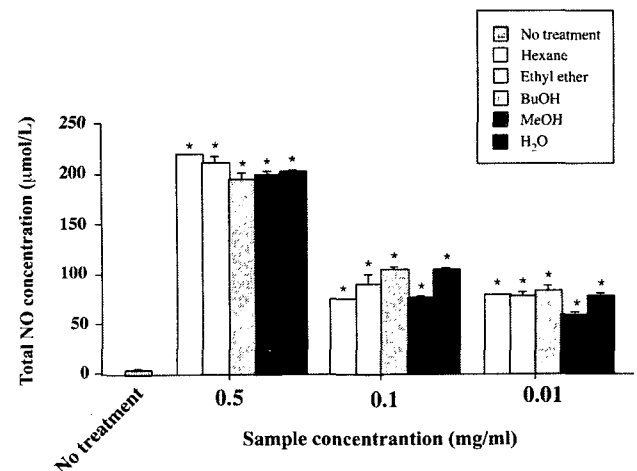


Fig. 6. NO concentration of rat macrophage cell line RAW 264.7 to the fractions of *Ulva lactuca* extract. Means  $\pm$  SEM for three wells are shown as fold compared with no treatment. \*ANOVA  $p < 0.0001$  compared with no treatment. This experiment was repeated at least twice.

농도의 경우는 0.1 mg/ml의 농도의 시료와 비교하였을 때 그다지 큰 활성차이를 보이지 않았다 (Fig. 6). 하지만 미처리 대조군에 비하여 시료 전반에 걸쳐 탁월한 면역활성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

본 연구의 결과로 현재 식용으로 사용되고 있지 않아 버려져 있는 해조류인 갈파래(*Ulva lactuca*)를 이용하여 암 예방 및 면역활성 강화를 위한 기능성 소재의 개발이 가능할 것으로 사료된다.

## 요 약

본 연구는 갈파래(*Ulva lactuca*) 추출분획의 암세포주에 대한 세포독성 및 면역활성 효과를 조사하였다. 갈파래의 에탄올 추출물로부터 분획물의 제조는 hexane, ethyl ether, methanol, butanol, H<sub>2</sub>O의 용매를 이용하여 행하였다. 인간 백혈암세포주(U937), 생쥐 신경아종세포주(NB41A3), 인체 간암세포주(HepG2), 큰쥐 신경교세포주(C6) 등에 대한 갈파래 분획물의 세포독성을 측정하였다. 갈파래의 Ethyl ether 층은 4종류의 세포 모두에서 가장 높은 세포독성을 나타냈다. 또한 수층 역시 비교적 높은 세포독성을 나타냈다. 4종류의 세포 모두에서 농도의존적 경향을 나타냈다. 갈파래 분획물의 큰쥐 대식세포주(RAW 264.7)에 대한 면역활성 효과도 조사하였다. 갈파래 추출물의 5가지 분획물 모두에서 농도의존적으로 NO 생산을 활성화시켰다. 이러한 결과들로 갈파래가 항암 및 면역활성을 나타내는 천연 소재개발에 있어 유용한 후보가 될 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 한국산업기술재단 지역혁신 인력양성 사업의 지원을 받아 수행하였으며 이에 감사를 드립니다.

## 참 고 문 헌

1. Azuine, M. A., U. C. Goswami and J. J. Katal. 1992. Antimutagenic and anticarcinogenic effects of carotenoids and dietary palm oil. *Nutr. Cancer* **17**, 287-295.
2. Bin, J.-H., H. -D. Kim and B.-H. Ryu. 1996. Anticomplementary activities of rhamman sulfate extracted from *Monastraomsa nitidum*. *Kor. J. food & Nutr.* **4**, 490-495.
3. Carmichael, J., W. G. De Graff, A. F. Gazder, J. D. Minna and J. B. Mitchell. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay : assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**, 936-942 .
4. Choe, M. 1991. Dietary fats and cancer. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **20**, 513-518.
5. Drageted, L. O., M. Strube and J. C. Larsen. 1993. Cancer-protective factor in fruit and vegetable: biochemical and biological background, *Pharmacol. Toxicol.* **72**, 116-135.
6. Hiqashi-Okaj, K., S. Otani and Y. Okai. 1999. Potent suppressive effect of a Japanese edible seaweed, *Enteromorpha prolifera* (Sujiao-nori) on initiation and promotion phases of chemically induced mouse skin tumorigenesis. *Cancer Lett.* **140**, 21-25.
7. Ito, H. and M. Sugimura. 1976. Antitumor polysaccharide fraction from *Sargassume thunbergii*. *Chem. Pharm. Bull.* **24**, 114-115.
8. Kim, J. H., B. S. Choi, Kim, J. J. Kim, K. M. Kim, N. C. Yoo, J. H. Choi, H. Y. Lim, J. K. Roh, K. S. Lee and B. S. Kim. 1993. Effects of verapamil, tamoxifen and cyclosporin A for the modulation of multidrug resistance in human lung cancer cell lines. *J. Kor. Cancer Assoc.* **25**, 225-230.
9. Michael, C. A., A. S. Dominic and M. Anue. 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* **48**, 589-595.
10. Newmark, H. L. 1996. Plant phenolics as potential cancer prevention agents, *Adv. Exp. Med. Biol.* **401**, 25-34.
11. Ryu, B. H., B. H. Choi, D. S. Kim and M. S. Ha. 1986. Desmutagenic effects of extract obtained from seaweeds. *Bull. Kor. Fish. Soc.* **19**, 502-508.
12. Steinmetz, K. A. and J. D. Potter. 1991. Vegetable, fruit and cancer II mechanism. *Cancer Causes Aontril.* **2**, 427-442.
13. Yoo, J. S., B. S. Cheun and N.-G. Kim. 2001. Determination of Na<sup>+</sup> channel blocker in seaweeds. *Kor. J. Environ. Biol.* **19**, 107-112.

1. Azuine, M. A., U. C. Goswami and J. J. Katal. 1992.