

구강암 세포주에서 김 추출물에 의한 세포자멸사 유도

김상찬^{1#}, 이종록², 박숙자^{1*}

1 : 대구한의대학교 한의과대학 방제과학글로벌 연구센터
2 : 대구한의대학교 제약공학과

Porphyra tenera induces apoptosis of oral cancer cells

Sang Chan Kim^{1#}, Jong Rok Lee², Sook Jahr Park^{1*}

1 : MRC-GHF, College of Korean Medicine, Daegu Haany University
2 : Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Haany University

ABSTRACT

Objectives : Laver (*Porphyra tenera*), a red algae species, is one of the most widely consumed edible seaweed in Korea. Laver contains various substances such as essential amino acid, fiber, minerals and polyphenols that benefit human health. In the present study, we prepared ethanol extracts from commercially processed product of *Porphyra tenera*, and evaluated the growth inhibitory effect against human oral squamous carcinoma YD-10B cells.

Methods : Cell viability was measured by MTT assay. Apoptosis was confirmed by TUNEL assay and flow cytometry with the green fluorescent dye FITC annexin V entering apoptotic cells and the red fluorescent dye PI not entering. The expression of the relevant proteins was detected using Western blot.

Results : Ethanol extracts of *Porphyra tenera* (PTE, 50-200 $\mu\text{g/ml}$) caused a significant decrease of cell viability in a dose dependant manner. The cell death occurred as a result of apoptotic process as determined by TUNEL assay and flow cytometric analysis. In line with this observation, decrease in procaspase proteins and increase in cytosolic cytochrome *c* were observed in cells treated with PTE. In addition, exposure to PTE decreased the expression levels of Bcl-2, and induced PARP cleavage and AIF translocation from mitochondria to nucleus.

Conclusions : In conclusion, PTE exerts anti-cancer effects by inducing apoptosis via caspase activation and AIF nuclear translocation in YD-10B cells. These results provide evidence for the possible therapeutic effect of *Porphyra tenera* in oral cancer cells.

Key words : *Porphyra tenera*, apoptosis, oral cancer cells

서 론

식용으로 널리 사용되고 있는 김은 우리나라 연안에서 다량으로 서식하는 보라털과(Bangiaceae)의 홍조류로서 해태(海苔), 감태(甘苔)라고도 하며 한의학에서는 치질, 토사곽란(吐瀉霍亂)을 치료하는 약재로도 사용되어 왔다^{1,2)}. 다른 해조류와 달리 김은 트레오닌(threonine), 트립토판(tryptophan), 메티오닌(methionine) 등 필수 아미노산과 단백질이 많이 들

어 있으며, 칼슘, 요오드를 비롯한 무기질과 비타민도 풍부하게 함유되어 있어 양질의 영양소를 가진 건강식품으로 알려져 있다^{3,4)}. 또한 칼로리가 거의 없고 식이섬유소가 풍부하여 다이어트에 효과적이며, 당뇨병과 비만을 비롯한 만성질환의 발병을 낮춰주는 것으로 보고되었다^{5,6)}.

김에 대한 연구로는 아질산염 소거효과⁷⁾, N-Nitrosodimethylamine 생성억제효과⁸⁾, collagen 합성 및 pyridinoline의 생성을 증가시키는 효과⁹⁾, 항균효과¹⁰⁾ 등

*Corresponding author : Sook Jahr Park, MRC-GHF, College of Korean Medicine, Daegu Haany University
· Tel : +82-53-819-1298 · E-mail : haany@dhu.ac.kr

#First author : Sang Chan Kim, MRC-GHF, College of Korean Medicine, Daegu Haany University
· Tel : +82-53-819-1863 · E-mail : sckim@dhu.ac.kr
· Received : 24 February 2015 · Revised : 12 March 2015 · Accepted : 16 March 2015

이 수행되었으며, 동맥경화와 고혈압을 일으키는 원인으로 알려진 콜레스테롤을 감소시키는 효과도 보고되었다¹¹⁾. 그리고 김에는 polyphenols, carotenoids, tocopherols과 같은 성분이 다량 함유되어 있으며, 김의 항산화작용에 이러한 성분들이 기여하는 것으로 여겨지고 있다¹²⁾. 김에서 추출분리한 porphyrin은 고지혈증 쥐에서 무기질 조절효과가 보고되어졌다¹³⁾.

과학과 의학기술의 발전으로 암(癌)은 완치율이 점차 높아지고 있지만, 여전히 한국인의 대표적인 사망원인중 하나이다. 2014년 발표된 중앙암등록본부 자료에 따르면 2011년 우리나라에서 발생한 전체 암 중에서 구강암은 약 0.2%의 비율을 차지하고 있는 희귀 암으로, 그 예후가 좋지 못하며 5년 동안 생존율도 50%에 불과하다고 알려져 있다¹⁴⁾. 치료를 위해 외과수술, 방사선 치료, 화학요법 등이 사용되고 있으나 치료과정에서 나타날 수 있는 부작용과 낮은 완치율이 문제가 되고 있다. 기존 항암제가 암세포뿐만 아니라 정상세포의 기능도 억제하기 때문에 생길 수 있는 많은 부작용을 극복하기 위해 다양한 표적치료 항암제 개발이 시도되고 있다. 표적치료제 개발이란 암세포에서 특이적으로 확인되는 분자를 표적으로 하여 효과를 나타내는 물질들로부터 치료제를 개발하는 것으로 세포주기조절(cell cycle regulation), 혈관신생(angiogenesis), 세포자멸사(apoptosis) 등과 같은 암 발생과 관련된 신호전달 체계에 대해 이해가 우선되어야 한다.

외부로부터의 손상에 의해 세포가 사멸하는 괴사(necrosis)와 달리 세포자멸사(apoptosis)는 일반적인 예정된 자기파괴의 과정으로 조절에 이상이 생길 경우 양성종양에서 악성종양으로의 형질전환에 관여하는 것으로 알려져 있다¹⁵⁾. 암세포에서는 흔히 세포자멸사 과정이 비정상적으로 억제되어 있어, 세포가 계획대로 사멸되지 못하고 과도한 증식이 촉진되어 암의 진행을 가속화하게 된다^{15,16)}. 이에, 암 치료를 위한 전략으로 암세포의 세포자멸사를 일으킬 수 있는 물질들에 대한 연구가 많이 수행되어지고 있다. 하지만 구강암에 대한 연구 성과는 미비한 상황으로 구강암의 예방 및 치료에 효과를 나타낼 수 있는 물질들에 대한 더 많은 연구가 요구되고 있다.

본 연구에서는 식생활 속에서 쉽게 접할 수 있는 김을 활용하여 그 추출물이 인체 구강암 세포주의 세포자멸사와 관련 분자들에 대해 어떠한 영향을 미치는지 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시약

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoleum (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, DMEM, fetal bovine serum (FBS), antibiotics (penicillin-streptomycin)는 Gibco/BRL (Eggenstein, Germany)로부터 구입하였다. 1차 antibody인 actin, AIF, Bcl-2, procaspase-3는 Santa Cruz Biotechnology (Bergheimer, Germany)에서 구입하였고, cytochrome *c*, cleaved PARP, procaspase-9은 Cell Signalling Technology (Irvine, CA, USA)에서 구입하였다. 2차 antibody는 1차 antibody의 host에 따라 anti-rabbit IgG-HRP (Actin,

procaspase-3, procaspase-9, cleaved PARP)와 anti-mouse IgG-HRP (AIF, Bcl-2, cytochrome *c*)를 Cell Signalling Technology에서 구입하여 사용하였다.

2. 추출물의 제조

김(海苔; *Porphyra tenera*)은 대구시내 칠성시장에서 구입하여 관능평가 후, 수도수로 세척하여 이물질 제거한 다음 음건하여 사용하였다. 에탄올 추출물은 건조 중량(405 g)의 10배에 해당하는 에탄올에 침지하여 72시간 동안 추출한 후에 회전 감압농축기(EYELA, Tokyo, Japan)로 감압농축하고 freezer dryer(Labconco, MO, USA)로 동결 건조하여 최종 추출물 시료(0.933 g)를 획득하였으며, 실험에 사용할 때까지 -20°C 에서 보관하였다. 김 에탄올 추출물(*Porphyra tenera* extracts, PTE)에 대한 최종 수율은 0.23%였으며, DMEM 배지에 녹여 실험에 사용하였다.

3. 세포배양 및 시료처리

Human유래 oral squamous cell carcinoma cell line인 YD-10B cell은 한국세포주은행 (Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)으로 부터 구입하였으며, 10% fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin과 100 mg/ml streptomycin 이 포함된 DMEM 배지에서 37°C 의 온도와 5%의 CO_2 가 유지되는 환경에서 배양하였다. 실험과정의 모든 cells은 80~90%의 confluence에서 실험하였고, 20 passages를 넘지 않은 cell만 사용하였다. 세포생존을 실험을 수행하기 위해 PTE를 처리하지 않고 배지만 주입한 세포를 대조군으로 하였고, 실험군은 3개로 분류하여 각각 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 PTE를 처리하였다. 이후의 실험에서는 대조군(0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 한 농도의 PTE 실험군(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 지정하여 세포자멸사에 대한 효과를 살펴보고자 하였다.

4. MTT assay

YD-10B cell을 12 well plate에 1×10^5 cells/well로 분주한 다음, PTE를 농도별(50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리하여 세포의 생존율을 구하였다. 배양세포에 MTT 용액(1 mg/ml)를 500 μl 넣고 4시간 배양하여 생성된 formazan crystals을 DMSO에 녹여 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 시료를 처리하지 않은 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. [viability (%) = $100 \times (\text{absorbance of treated sample}) / (\text{absorbance of untreated control})$].

5. TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling) assay

4 well chamber slide의 well당 1×10^5 개의 농도가 되게 세포를 배양하고 PTE를 24시간 처리하였다. Cell은 PBS로 2회 washing한 후에 4% paraformaldehyde로 고정하여 In

Situ cell death detection kit-POD (Roche, Mannheim, Germany)를 사용하여 kit에 포함된 protocol에 맞춰 분석하였다. 즉, paraformaldehyde로 고정된 cell을 0.3% H₂O₂를 사용하여 blocking시키고 0.1% triton X-100/0.1% sodium citrate로 permeabilisation 상태로 만든 후에 TdT-enzyme 이 처리된 용액으로 labeling하였다. PBS로 2회 washing한 후에 Converter-peroxisase(POD)로 37°C에서 30분간 처리하고 DAB로 발색하여 light microscope로 관찰하였다.

6. Flow cytometric analysis

붉은색 형광염색약인 propidium iodide (PI)와 초록색 형광염색약인 FITC annexin V (Molecular Probes, Eugene, OR)를 사용하여 apoptotic cell을 분석하였다. 1×10^6 의 cells을 10cm² plastic plate에 깔고 70-80%의 confluency를 유지하였다. 먼저 cells에 24시간 배지고갈을 하고, 다음 24시간 동안 PTE를 처리하였다. 부착된 cells을 trypsin을 처리하여 회수하였고 부유 cells과 trypsin처리 cells은 모두 70% ethanol로 resuspension하여 -20°C에서 overnight하여 고정시켰다. 고정된 cell은 1×10^6 개/ml의 농도로 PBS에 suspension시킨 후, FITC annexin V와 PI를 처리하여 얼음위에서 20분간 반응시켜 flow cytometer (Particle Analysis System, Partec GmbH, Mnster, Germany)로 분석하였다.

7. Total cell lysates의 준비

배양 세포는 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후에 protease inhibitor cocktail이 포함된 RIPA 용액으로 lysis하였다. Lysis된 세포는 15,000×g에서 15분간 원심분리하여 찌꺼기를 제거하고 상등액을 취하여 total cell lysate로 사용하였다.

8. Cell fractionation

PARP cleavage 확인을 위한 세포 핵분획물은 시판되는 nuclear extraction kit (Thermo scientific, Rockford, IL, USA)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 배양 세포로부터 추출하였다. 미토콘드리아의 AIF protein과 세포질의 cytochrome c protein의 발현을 조사하기 위한 세포 분획은 Mitochondria Isolation Kit (Thermo scientific, Rockford, IL, USA)를 이용하여 준비하였다.

9. Immunoblot analysis

준비된 단백질 시료의 정량은 BCA protein assay kit (Thermo scientific, Rockford, IL, USA)를 이용하였다. 동일한 양의 단백질을 SDS-PAGE로 분리하여 nitrocellulose membrane으로 옮기고 1차 antibody로 2시간 반응시켰다. TBST로 3회 washing하고 2차 antibody로 1시간 더 반응시킨 후에 각각의 protein band는 ECL western blotting detection reagents (Amersham)를 사용하여 발색하였다. 발색 후 각 단백질의 발현량을 평가하기 위하여 image analyzing system (Ultra-Violet Products Ltd., Upland, CA, USA)을 이용하여 densitometric analysis를 실시하였다.

10. 통계 분석

모든 실험은 3회 이상 반복 실시하였으며 실험 결과는 mean ± S.D.로 나타내었다. 유의성 검정은 윈도우용 SPSS 17.0을 사용하여 one way analysis of variance (ANOVA), Turkey test (multiple comparison) 방식으로 분석하였으며, *p*값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. PTE가 YD-10B cell의 세포증식에 미치는 영향

PTE가 구강암 세포주인 YD-10B cell의 세포증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 다양한 농도(50, 100, 200 µg/ml)로 처리하고 24시간 혹은 48시간 동안 배양하여 MTT assay로 cell viability를 측정하였다. 24시간 배양 후, PTE를 처리하지 않은 대조군 세포의 생존율을 100%로 하였을 때 PTE 50, 100, 200 µg/ml은 각각 85.0%, 40.7%, 9.2%의 세포생존율을 나타내었으며, 48시간 배양에서 70.9%, 35.2%, 9.1%의 생존율을 나타내어 농도별, 시간별 세포사멸 및 세포증식 억제효과가 확인되었다(Fig. 1).

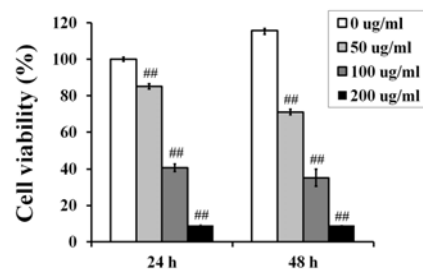


Fig. 1. Effects of PTE on the cell viability of YD-10B cells. YD-10B cells were exposed to PTE (50, 100, 200 µg/ml) for 24 or 48 h. Cell viability was assessed by MTT assay. Data represent the mean ± S.D. with three separate experiments (#; significant as compared to control; ##*p*<0.01).

2. YD-10B cell에서 PTE에 의한 세포자멸사 (apoptosis) 유도 효과

일반적으로 생존 세포수는 세포증식 및 세포사멸의 균형에 의해 조절되는 것으로, Fig. 1에서 본 바와 같이 PTE는 YD-10B cell의 세포사멸을 유의하게(*p*<0.01) 유도함으로써 세포증식을 억제하였다. PTE에 의한 세포사멸이 apoptosis에 기인하는지를 확인하기 위해 FITC annexin V/PI 이중 염색을 실시하여 flow cytometry로 분석하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 세포자멸사가 진행된 세포는 FITC annexin V에 염색된 상태이며(Q2와 Q4), 특히 PI 염색 여부에 따라 PI(+)는 late apoptosis(Q2), PI(-)는 early apoptosis(Q4)가 진행 중임을 의미한다. PTE(100 µg/ml)를 24시간 동안 반응시킨 결과, control 세포에 비해 증가된 세포자멸사 세포를 확인할 수 있었다(Fig. 2A). Control 세포는 24시간 배양 후에 두 가지 염색 시약에 모두 반응하지 않는 live cell(Q1)의 형

태로 대부분 존재하였고 apoptotic cell은 2.5%였으나, PTE로 처리된 세포는 29.5%의 apoptotic cell population을 나타내어 PTE에 의한 YD-10B 세포사멸에 apoptosis signaling이 유의하게($p < 0.01$) 관여함을 알 수 있었다(Fig. 2B).

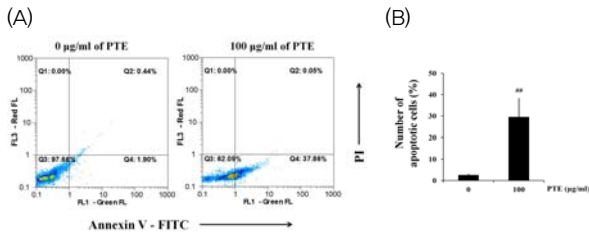


Fig. 2. Flow cytometric profile of YD-10B cells stained with FITC Annexin V and PI. YD-10B cells were treated with 100 µg/ml of PTE for 24 h and applied to flow cytometer after stain with FITC Annexin V (FL1-green) and PI (FL3-red). The population was separated into three groups: live cells (Q3, left low) showing only a low level of fluorescence, apoptotic cells (Q4, right low) showing green fluorescence and necrotic cells (Q2, right upper) showing both red and green fluorescence (A), and the % population of apoptotic cell was calculated (B). Data represent the mean ± S.D. of three separate experiments ([‡], significant as compared to control; ^{##} $p < 0.01$).

구강암 세포주 YD-10B에 대한 PTE의 apoptosis 유도효과는 TUNEL assay를 실시하여 좀 더 명확히 규명하고자 하였다. 24시간 동안의 PTE 처리 결과, control에 비하여 진한 갈색의 핵(화살표)을 가진 세포들이 뚜렷하게 관찰되었다 (Fig. 3A). 이것은 apoptosis에 의해 DNA 분절(fragmentation)이 일어난 세포의 핵이 TUNEL staining에 반응하여 나타난 것으로 PTE가 YD-10B 세포의 apoptosis를 유도하였음을 의미한다. TUNEL stain에 양성인 세포가 거의 확인되지 않은 control(6%)에 비하여 PTE는 TUNEL positive 세포의 수를 64%로 증가시켰다(Fig. 3B). 이러한 결과는 flow cytometry 결과(Fig. 2)와 더불어 PTE가 구강암세포주인 YD-10B 세포에서 apoptotic cell death에 관여함을 명확하게 보여준다.

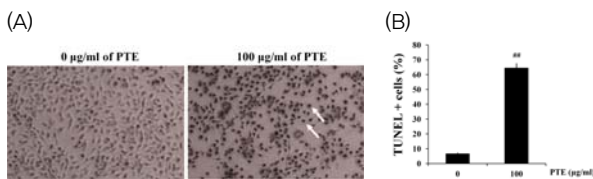


Fig. 3. Induction of apoptosis by PTE in YD-10B cells. Apoptotic cells were detected by TUNEL staining after the treatment with 100 µg/ml of PTE for 24 h. Arrows indicate TUNEL-positive nuclei stained dark brown (A). TUNEL-positive cells in random microscope fields were determined, and apoptotic cells were expressed as the percentage of TUNEL-positive cells over total cells (B). Data represent the mean ± S.D. of three separate experiments ([‡], significant as compared to control; ^{##} $p < 0.01$).

3. 세포사멸사 관련 단백질의 발현에 PTE가 미치는 영향

구강암 세포주에서 PTE에 의해 나타나는 apoptosis 유도

효과를 좀 더 상세히 이해하기 위하여 apoptosis 신호전달 과정에서 주요한 역할을 담당하고 있는 단백질들의 발현을 조사하였다. Proenzyme의 형태로 존재하며 proteolysis를 통해 활성화되는 caspase와 활성화된 caspase에 의해 절단되는 PARP(poly ADP ribose polymerase) 단백질은 손상된 세포를 인지하고 복구할 수 있는 능력을 소실하여 apoptosis를 유도하게 된다. Western blot 결과를 보면, PTE는 procaspase 3/9의 발현을 농도의존적으로 감소시켰으며 절단된(cleaved) PARP 단백질의 발현은 증가시켰다(Fig. 4). 이 결과는 caspase의 activation과 PARP 단백질의 파괴가 세포의 DNA 복제 및 유전자 발현과 관련된 신호전달에 영향을 주어 apoptosis를 통한 세포사멸에 기여했음을 의미한다. 또한 미토콘드리아에 의한 apoptosis 신호경로에 관여하는 Bcl-2, AIF (apoptosis-inducing factor), cytochrome c 단백질의 발현도 PTE의 처리에 의해 농도 의존적으로 변화하였다. PTE에 의해 anti-apoptotic regulation을 하는 Bcl-2와 미토콘드리아 분획 속의 AIF 단백질 발현은 감소되었으며, 세포질로 분비된 cytochrome c의 발현은 증가되었음을 확인하였다(Fig. 4).

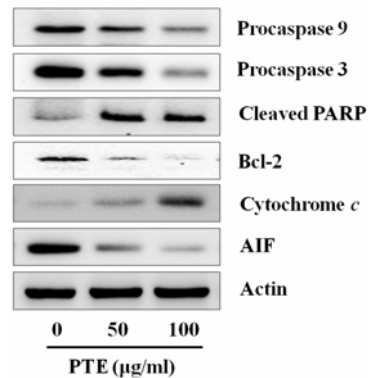


Fig. 4. Effect of PTE on the expression of apoptosis regulator proteins. Apoptosis-related proteins were assayed by Western blot with specific antibodies. Procaspase 3/9, cleaved PARP and Bcl-2 were analyzed in total cell lysates. The mitochondrial and cytosolic fractions were prepared by differential centrifugation and used to detect the protein levels of AIF and cytochrome c, respectively. Actin protein expression was measured as an internal control.

고찰

현대사회는 다양한 직업군의 발생으로 그에 따른 불규칙한 생활 패턴과 정신적 스트레스로 인하여 암과 같은 만성질환의 발생이 증가하고 있는 추세이다. 이에, 국민건강 증진을 위하여 다양한 치료제 개발 연구가 수행되고 있으며, 합성 화학물질에 비해 부작용이 적다고 인식되고 있는 천연물 소재가 관심을 받고 있다. 김은 우리나라에서 가장 많이 소비되는 해조류 중의 하나로 칼로리가 낮고 필수 아미노산이 풍부하며, 겨울철 비타민 공급원 역할을 하는 고급식품이다. 최근의 연구들에 따르면 김은 항균 효과¹⁰⁾와 항콜레스테롤 효과¹¹⁾를 비롯한 다양한 생리활성을 지닌 것으로 보고되어 식품 이상의 가치를 지닌 천연물로 대두되어 지고 있다. 본 연구에서는 김 에탄올 추출물을 준비하여 인체 구강암 세포주인 YD-10B 세포에 대한 세포사멸 효과를 조사한 결과 apoptosis를 통한

구강암 세포의 사멸이 진행됨을 확인하였다. 김 추출물은 caspase, PARP, Bcl-2와 같은 apoptosis 관련 단백질들의 발현을 조절함으로써 암세포 성장 억제 및 사멸을 유도하였다.

Apoptosis는 주변 조직에 상해를 주지 않으며 손상된 조직 및 세포들을 제거하는 정상적인 과정으로 체계적인 분자신호 전달에 의해 진행되는 programmed cell death (PCD)이다¹⁵⁾. 이러한 apoptosis 과정의 회피는 암세포의 무한 증식을 가능하게 하여 암의 발생 및 진행에 기여하므로, 특정 약물에 의한 apoptosis의 유도는 암을 치료할 수 있는 표적이 될 수 있다^{15,16)}. 실제로 항암제 후보 발굴을 위한 연구 결과들을 살펴보면, 세포 사멸의 방법으로 항암활성을 발휘하는 물질들은 target cell에서 apoptosis를 유도함으로써 그 활성을 나타내고 있다^{17,18)}. Apoptosis 작용에 의해 나타나는 대표적인 현상들은 plasma membrane의 변화에 의한 phosphatidylserine (PS)의 flip-flop과 DNA의 분절화(fragmentation) 등을 들 수 있으며^{15,16)}, 본 실험에서는 김 추출물 처치에 의해 YD-10B 세포에서 이 두 가지 현상이 일어남을 확인할 수 있었다. 인지질의 flip-flop은 PS와 결합하는 형광 염색약(annexin-V)을 활용하여 flow cytometry로 확인하였으며, 손상된 DNA는 TUNEL staining을 통해 관찰하였다.

Protease의 일종인 caspase는 apoptosis를 위한 도구 역할을 담당하는 단백질로서, apoptosis에 관한 많은 연구들이 caspase의 활성도에 의존하는 pathway에 초점을 두고 진행되어 왔다^{19,20)}. Caspase의 활성화는 세포의 에너지 공장인 미토콘드리아 의존적으로 진행될 수 있다. Apoptosis 신호가 미토콘드리아에 작용하게 되면 bcl-2와 같은 anti-apoptotic regulator들의 발현은 감소하고, 미토콘드리아 외막의 투과성은 증대되어 cytochrome c가 cytosol로 이동되게 된다²¹⁾. Cytochrome c의 방출은 caspase-9을 활성화시키고, 활성화된 caspase-9은 연속적으로 caspase-3의 활성을 증가시켜 apoptosis를 유도하게 된다. 이 과정에서 핵에서 손상된 DNA를 수선(repair)하여 세포의 생존에 기여하는 PARP는 caspase-3에 의해 절단되어 비활성화됨으로써, apoptosis를 진행시키는데 역할을 담당하게 된다²²⁾. 본 연구에서 김 추출물은 apoptosis 억제 단백질인 bcl-2와 procaspase-3/9의 발현을 저해하였고, cytosol 분획 속의 cytochrome c와 cleaved PARP의 발현을 증가시켰다. 이 결과는 김 추출물이 cytochrome c의 방출, caspase activation, PARP cleavage로 연결되는 미토콘드리아를 통한 caspase 활성화 경로에 관여하였음을 의미한다.

더불어 김 추출물은 미토콘드리아 분획의 AIF 단백질 발현도 저해하였다. 손상된 미토콘드리아로부터 유출된 AIF는 apoptosis 신호를 핵 내로 확산시키는 역할을 하게 된다. 즉, 정상 세포의 미토콘드리아에 존재하는 AIF는 apoptosis 과정에서 핵으로 이동하여 DNA fragmentation과 nuclear condensation을 유발시킨다²³⁾. 최근의 연구들에 의하면, AIF의 nuclear translocation(핵내 이동)은 PARP inhibitor에 의해 저해될 수 있으나 caspase inhibitor에 의해서는 저해되지 않음이 보고되었다^{24,25)}. 이는 AIF가 caspase 비의존적 apoptosis pathway에 관여함을 의미하는 것으로 김 추출물이 여기에 부분적으로 관여할 것으로 사료되나, 미토콘드리아의 AIF 단백질 발현 감소와 PARP 활성화를 연결하는 신호과정에서 김 추출물의 정확한 역할은 좀 더 연구를 진행하여야 설명될 수 있을 것이다.

이상의 결과를 종합하여, 인체 구강암 세포주인 YD-10B 세포에서 김 추출물이 미토콘드리아를 통한 apoptosis pathway를 통해 세포사멸을 유도한다는 것이 확인되었다. 시험관에서 자란 암세포에서 apoptosis를 일으킬 수 있다는 것은 생체 내에서도 그러한 효과를 발휘할 수 있음을 의미하는 것으로, 본 연구는 항암효능을 지닌 천연물의약품으로 발전할 수 있는 본초로서의 김에 대한 약리 효능을 잘 보여주는 결과라 할 수 있겠다.

결론

본 연구에서는 인체 구강암 세포주인 YD-10B cell에 대한 김 에탄올 추출물의 세포 성장 억제 및 사멸에 미치는 영향을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 김 에탄올 추출물은 구강암 세포주인 YD-10B cell에 대하여 시간별, 농도별 세포사멸 효과를 나타내었다.
2. Apoptotic cell을 염색할 수 있는 TUNEL assay와 Flow cytometry를 이용한 분석 결과, 김 에탄올 추출물에 의한 세포 사멸이 apoptosis에 기인함을 알 수 있었다.
3. 세포자멸사에서 주요한 역할을 담당하는 단백질들의 발현 조사를 통해, 김 추출물이 미토콘드리아의 장애(dysfunction)와 연관된 caspase 활성화 및 미토콘드리아 내의 AIF 발현 감소 등에 관여함으로써 apoptosis를 유도함을 알 수 있었다.

이러한 결과들은 구강암 세포의 apoptosis 신호 전달과정에서 김 추출물이 작용하는 기전을 이해하게 함으로써 암세포 치료제로서의 김에 대한 활용 가능성을 제시하고 있다.

감사의 글

이 논문은 2014년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구입니다 (No. 2012R1A5A2A42671316).

References

1. Jimenez-Escrig A, Goni Cambrodon I. Nutritional evaluation and physiological effects of edible seaweeds. Arch Latinoam Nutr. 1999 ; 49(2) : 114-20.
2. The korean association of university professors of herbology. Herbology. Seoul : Younglimsa. 1992 : 471-4, 511-4.
3. Park CK, Kang TJ. The nutritional and functional constituents of laver. Bull Fish Sci Inst Yosunat'l Univ. 2000 ; 9 : 133-7

4. Kim D, Park J, Lee TK. Analysis of biochemical compositions and nutritive values of six species of seaweeds. *J Life Sci.* 2013 ; 23(8) : 1004-9.
5. Lee HS, Choi MS, Lee YK, Park SH, Kim YJ. A Study on the development of high-fiber supplements for the diabetic patients - Effect of seaweed supplementation on the lipid and glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Nutr.* 1996 ; 29(3) : 296-306.
6. Han HS, Bae SJ, Kim MH. The effect of *porphyra tenera* extract on serum lipid content in ovariectomized rats. *J Life Sci.* 2004 ; 14(2) : 356-61.
7. Lee SJ, Chung MJ, Shin JH, Sung NJ. Effect of natural plant components on the nitrite-scavenging. *J Food Hyg Saf.* 2000 ; 15(2) : 88-94.
8. Lee SJ, Shin JH, Chung MJ, Sung NJ. Effect of natural foods on the inhibition of N-nitrosodimethylamine formation. *J Food Hyg Saf.* 2000 ; 15(2) : 95-100.
9. Han HS, Bae SJ, Kim MH. Effects of *porphyra tenera* extracts on formation of collagen cross-link in ovariectomized rats. *J Korean Soc Food Nutr.* 2004 ; 22(2) : 324-30.
10. Park SJ, Park CI, Kim SC. Antimicrobial activities of ethanolic extracts of marine resources against *Propionibacterium acnes*. *Kor J Herbology.* 2010 ; 25(2) : 65-70.
11. Hong YK, Park IS, Jung YH, Song SH, Hong SY. Effect of the seaweed *porphyra yezoensis* extract on triton WR-1339 induced hypercholesterolemia in mouse. *J Korean Fish Soc.* 1998 ; 31(4) : 508-15.
12. Kwak CS, Kim SA, Lee MS. The correlation of antioxidative effects of 5 korean common edible seaweeds and total polyphenol content. *J Korean Soc Food Nutr.* 2005 ; 34(8) : 1143-50.
13. Jung BM, Shin TS, Kim HR, Jung KJ, Kim SB. Effect of porphyran isolated from laver, *porphyra yezoensis* on calcium, magnesium and potassium contents in hyperlipidemic rats. *J Korean Fish Soc.* 2003 ; 36(3) : 220-4.
14. Choi SW. Clinical diagnosis of oral cancer. *J Korean Dent Assoc.* 2011 ; 49(3) : 136-45.
15. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer.* 1994 ; 73(8) : 2013-26.
16. Kang MC, Lee KS. Expression of apoptosis related genes from HaCaT cell after UVB irradiation. *Korean J Dermatol.* 2009 ; 47(7) : 790-7.
17. Safarzadeh E, Sandoghchian Shotorbani S, Baradaran B. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. *Adv Pharm Bull.* 2014 ; 4(Suppl 1) : 421-7.
18. Kim JU, Goo M, Park C, Lee JH, Ji HM. Studies on the anti-cancer effect and the mechanism of apoptosis by Baekduong-tang in human colon cancer cell line HCT-11. *Korean J Orient Int Med.* 2010 ; 31(2) : 273-89.
19. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 1997 ; 326(Pt1) : 1-16.
20. Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem.* 2011 ; 351(1-2) : 41-58.
21. Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome *c* by the mitochondrial channel VDAC. *Nature.* 1999 ; 399(6735) : 483-7.
22. Boulares AH, Yakovlev AG, Ivanova V, Stoica BA, Wang G, Iyer S, Smulson M. Role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *J Bio Chem.* 1999 ; 274(33) : 22932-40.
23. Joza N, SUsin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kremer G, Penninger JM. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature.* 2001 ; 410(6828) : 549-54.
24. Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J, Kroemer G. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ.* 1999 ; 6(6) : 516-24.
25. Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirer GG, Dawson TM, Dawson VL. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science.* 2002 ; 297(5579) : 259-63.