

복어(*Takifugu obscurus*) 균질액에 의한 MCF-7 인간 유방암세포 성장 억제 효과

김정훈 · 김정호*

서강대학교 생명과학과

Suppression of MCF-7 Human Breast Cancer Cell Proliferation by Globefish *Takifugu obscurus* Homogenate

Junghoon Kim and Jungho Kim*

Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Department of Life Science, Sogang University, Seoul 04107, Korea

Previously, we reported that globefish *Takifugu obscurus* homogenate suppresses the growth of human colorectal cancer cells. To extend the applications of globefish homogenate, we investigated its cytotoxic effects on human breast cancer cells. To assess the effects of globefish homogenate on growth of MCF (Michigan Cancer Foundation)-7 human breast cancer cells, cell proliferation and colony formation assays were performed using the cell counting and Crystal Violet staining methods. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of globefish homogenate on MCF-7 cell proliferation was calculated from the sigmoidal dose-response curve. The colony formation assay demonstrated that MCF-7 cells treated with globefish homogenate formed up to 80% fewer colonies than control MCF-7 cells. Treatment with globefish homogenate markedly suppressed the growth of MCF-7 cells in a dose-dependent manner. The sensitivity of the cells to globefish homogenate was determined by calculating the IC₅₀; in this case, the IC₅₀ was 210 µg/mL. Furthermore, significant downregulation of Cyclin D1 expression, along with phospho-Akt and total Akt levels, was observed in MCF-7 cells treated with globefish homogenate. This study demonstrates that treatment with globefish homogenate inhibits the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells by downregulating the expression of phospho-Akt, total Akt, and Cyclin D1 proteins.

Keywords: Breast cancer, Globefish homogenate, Growth inhibition, MCF-7, Akt

서론

유방암은 유방조직에 발생하는 악성종양으로 유방 조직이 비정상적으로 성장하거나 다른 조직으로 전이되는 치명적인 질병이다. 유방암 상태에 따라 외과적인 수술이나 방사선 치료, 화학요법, 항호르몬 요법 등을 시행하고는 있지만 세계적으로 사망률이 높은 치명적인 암 가운데 하나이다(Siegel et al., 2020). 최근 발표된 미국 암 통계에 의하면 유방암은 여성의 경우 신규 암 발생 건수 912,930건 가운데 276,480건으로 보고되었다. 이는 전체 건수의 30%에 해당하는 수치로 유방암 발생이 여성에게는 발생하는 암 가운데 1위에 해당된다(Siegel et al., 2020). 국내도 여성에게 신규로 발생하는 암 가운데 유방암이 차지하는

비중은 가장 높은 것으로 나타났다(Hong et al., 2020).

지난 수십 년 동안 치료용 항암제 발굴을 위한 연구들이 활발하게 진행되어 왔다. 이 가운데 천연물을 탐색해 lead compound를 발굴하기 위한 연구가 다양한 방법으로 보고되고 있다(Molinski et al., 2009; Demain and Vaishnav, 2011). 항암 성분이 있다고 알려진 식물로는 강황, 포도, 양파, 시금치, 파슬리, 콩, 토마토, 서양고추냉이, 무, 양파, 겨자류 등이 있다(Hosseini and Ghorbani, 2015; Choudhari et al., 2019). 커큐민(curcumin) (Ravindran et al., 2009), 레스베라트롤(resveratrol) (Carter et al., 2014; Singh et al., 2015), 아피게닌(apigenin) (Yan et al., 2017), 케르세틴(quercetin) (Gibellini et al., 2011), 제니스테인(genistein) (Spagnuolo et al., 2015), 리코펜(lycopene) (van

*Corresponding author: Tel: +82. 02. 705. 8461 Fax: +82. 02. 705. 8412

E-mail address: jkim@sogang.ac.kr



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0878>

Korean J Fish Aquat Sci 53(6), 878-885, December 2020

Received 23 June 2020; Revised 29 July 2020; Accepted 16 September 2020

저자 직위: 김정훈(대학원생), 김정호(교수)

Breemen and Pajkovic, 2008), 이소티오시아네이트(isothiocyanate) (Wu et al., 2009) 등이 식물체에 존재하는 항암 기능이 있다고 보고된 물질들이다. 이러한 피토케미칼(phytochemical)은 암의 개시(initiation), 발달(development), 그리고 진행(progression)을 억제하면서 항암 활성을 나타낸다고 알려졌다(Rajesh et al., 2015). 이들 가운데 실제 항암제로 사용되는 물질들로는 빈카 알칼로이드(Vinca Alkaloid)류, 택센(Taxane)류, 에피포도필로톡신(Epipodophyllotoxin), 캄토테신(Camptothecin)류 등이 존재하고, 이들은 유방암, 난소암, 폐암, 카포시육종 등 다양한 암 치료에 사용되고 있다(Choudhari et al., 2019).

복어는 전 세계에 100여 종이 존재하는 어류로, 아시아권에서는 주로 우리나라 중남부와 일본 중부 이남에 존재하고 있으며, 국내에도 30여 종이 있다고 알려졌다(Hwang and Oh, 2013; Han et al., 2017). 복어에는 테트로도톡신(tetrodotoxin, TTX)이라는 신경 독성물질이 존재하는데, 이것은 껍질, 내장, 근육, 간, 그리고 알에서 발견된다(Bane et al., 2014; Jal and Khora, 2015). 그렇지만 양식 복어에는 자연산 복어와 달리 독이 없거나 거의 존재하지 않는다고 알려졌다(Matsumura, 1996; Jang et al., 2003). 복어는 스스로는 독을 생산하지 못하고 서식지 조건에 따라 복어 독이 생긴다. 자연산 복어의 경우 먹이나 세균, 플랑크톤으로부터 테트로도톡신을 얻는다고 알려졌다. 양식 복어에 독성 물질이 발견되지 않는 이유는 이와 같은 환경에서 성장하지 않기 때문으로 추정하고 있다(Chau et al., 2011; Lago et al., 2015).

본 연구팀은 복어 균질액이 인간 직장결장암 세포주들의 성장과 콜로니 형성 능력을 억제함을 보고했다(Kim et al., 2017; Kim and Kim, 2018). 본 연구에서는 복어 균질액에 의한 암세포 성장억제 효과가 유방암 세포에서도 적용 가능할 지를 조사하였다. 이를 위해 대표적인 인간 유방암 세포주인 MCF (michigan cancer foundation)-7를 이용해 세포 독성 효과를 조사했고, 세포 성장곡선과 세포의 형태학적인 변화를 분석해 복어 균질액에 의한 MCF-7 인간 유방암 세포의 성장 억제효과를 평가하였다. 또한 복어 균질액에 의한 인간 유방암 세포 성장 억제 기전을 분자수준에서 규명하기 위해 세포생존과 관련된 신호전달체계도 함께 분석하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

Sodium chloride, sodium phosphate dibasic, sodium phosphate monobasic, formaldehyde, methanol, Crystal Violet은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입해 사용하였다. MCF-7 인간 유방암 세포주는 ATCC (Rockville, MD, USA)에서 구입했다.

복어 균질액

본 연구재료로 사용한 복어는 황복어(Yellow puffer *Takifugu*

obscurus)로 충청남도 예산군 대흥면에 위치한 예당수산에서 양식한 3년산 활어를 선별해 사용하였다. 실험에 사용한 복어 균질액은 이전에 발표한 동일한 방법을 이용해 제조하였다(Kim et al., 2017; Kim and Kim, 2018). 간단히 요약하면 황복어 균질액을 제조하기 위해 황복어 무게 1 g당 1 mL의 1X PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4)를 첨가한 후 Hand Held Homogenizer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MD, USA)를 사용해 균질액을 제작하였다. 제작한 균질액은 Syringe filter (0.45 μm , Sartorius, Germany)로 필터하여 멸균상태로 만든 후 후속 실험 때까지 -80°C 에 보관하였다.

MCF-7 인간 유방암 세포주 배양 및 성장곡선 작성

MCF-7 인간 결장직장암 세포주에 대한 배양배지는 10% FBS (fetal bovine serum, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1x 페니실린/스트렙토마이신(Gibco, Gaithersburg, MD, USA)을 첨가한 Eagle's minimum essential medium (EMEM; Hyclone, Logan, UT, USA)을 사용하였다. 세포는 5% CO_2 가 공급된 37°C humidified 배양기(ThermoFisher Scientific, Waltham, MD, USA)에서 배양하였다. 대조군은 동일 부피의 1X PBS를 첨가해 실험을 수행하였다.

Crystal Violet 콜로니 염색 및 정량 분석

1×10^4 MCF-7 세포를 6일 간 배양한 후 배지를 제거하고 실온에서 Crystal Violet Fixing/Staining 용액[0.05% (w/v) Crystal Violet, 1% Formaldehyde, 1% methanol, 1X PBS]으로 20분 동안 염색하였다(Kim et al., 2019). 염색한 콜로니 수에 대한 정량 분석은 ImageJ 프로그램을 사용해 수행하였다(<https://imagej.nih.gov/ij/>).

50% 성장억제 농도(IC_{50} , 50% inhibitory concentration, half maximum inhibitory concentration) 측정

2 mL의 세포 배양액을 첨가한 12-well 세포배양 플레이트에 1×10^4 MCF-7 세포를 넣고 복어 균질액을 0%, 0.001% (0.27 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 0.01% (2.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 0.1% (27 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 그리고 1% (270 $\mu\text{g}/\text{mL}$)가 되게 첨가하였다. MCF-7 유방암 세포를 37°C 5% CO_2 세포 배양기에서 6일 간 배양하고 세포수를 측정하였다. IC_{50} 값은 SoftMax Pro software (Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 사용해 계산하였다.

Western blot 분석

세포 추출물을 SDS-PAGE로 분리하고 PVDF [poly(vinylidene difluoride)] membrane에 transfer한 후 phospho-S473 항체(9271; Cell Signaling Technology, USA), Akt 항체(9272; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), Cyclin D1 항체(MA1-39546; ThermoFisher Scientific, Waltham,

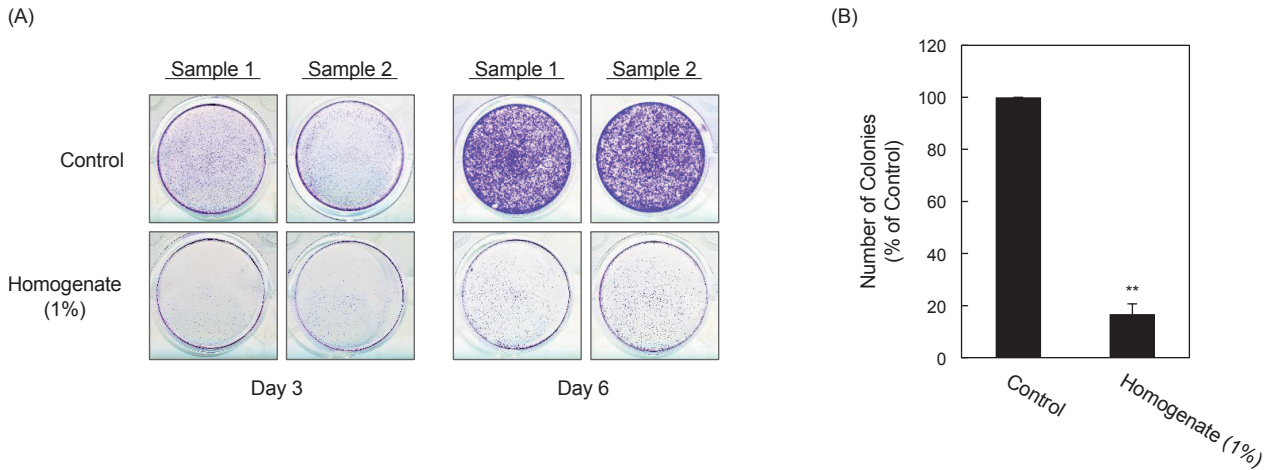


Fig. 1. Inhibitory effects of globefish *Takifugu obscurus* homogenate on colony formation by MCF-7 human breast cancer cells. (A) Suppression of MCF-7 cell colony formation by globefish homogenate. MCF-7 cells (1×10^4) were plated into 12-well plates and cultured in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) lacking (Control, top panels) or containing 1% (v/v) globefish homogenate (Homogenate, bottom panels). After 3 or 6 days of cultivation, MCF-7 cell colonies were visualized using Crystal Violet solution. Three independent experiments yielded similar results. Representative images from the colony formation assay are shown. (B) Quantification of the reduction in MCF-7 cell colony formation after Globefish homogenate treatment. Colonies were counted based on Crystal Violet staining after 6 days of cultivation and the number of colonies formed was compared with that in the untreated group. Three independent experiments yielded similar results. The value in the control group was normalized to 100. Values represent the mean \pm SD. Statistical significance was determined using the unpaired Student's t-test. ** $P < 0.01$ versus control cells. MCF, michigan cancer foundation.

MD, USA), 그리고 Actin 항체(AbC-2002; AbClon, Seoul, Korea)를 사용해 Western blot을 수행하였다. 밴드는 Western lightning reagent (Perkin Elmer Life Sciences, Waltham, MA, USA)를 사용해 검출하였다. Western blot 결과는 VersaDoc MP 4000 시스템(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 사용해 분석하였다.

통계학적 분석

모든 데이터 통계 분석은 Microsoft Excel spreadsheet 프로그램을 사용해 분석하였다. 통계적인 유의성은 unpaired Student's t-test를 사용하여 평균 간의 유의성($P < 0.05$)을 비교하였고 고 데이터는 평균값 \pm 표준편차(mean \pm SD)로 나타냈다.

결 과

복어 균질액에 의한 MCF-7 인간 유방암 세포 콜로니 형성 억제 효과

이전 연구에서 본 연구팀은 복어 균질액이 인간 결장직장암 세포주인 Caco-2, DLD-1, HCT116, SW480 세포의 성장을 억제함을 보고하였다(Kim et al., 2017; Kim and Kim, 2018). 이번 논문에서는 복어 균질액에 의한 결장직장암 세포 성장억제 효과가 인간 결장직장암 세포주에만 국한된 결과가 아니고 다른 종류의 암에도 적용 가능한지 여부를 조사하는 연구를 수행

하였다. 이를 위해 유방암 세포주인 MCF-7 세포를 가지고 복어 균질액의 항암 효과를 탐색하였다. 실험에 사용한 복어 균질액은 이전에 발표한 문헌의 조건과 동일하게 살아있는 3년산 황복어를 가지고 제작하였다(Kim et al., 2017).

MCF-7 세포 성장에 미치는지를 복어 균질액의 영향을 조사하기 위해 1×10^4 MCF-7 세포를 12-well 세포배양 플레이트에 깔고 2 mL의 배양액을 첨가한 후 콜로니 형성 실험(colony formation assay)을 수행하였다. MCF-7 세포 배양액에 1% (v/v)의 복어 균질액을 처리하고 5% CO₂가 공급된 37°C 세포 배양기에서 키웠다. MCF-7 세포 콜로니 형성은 세포 배양을 시작하고 3일과 6일 후에 각각 crystal violet으로 염색한 후 관찰하였다(Fig. 1A).

MCF-7 세포의 콜로니 형성은 복어 균질액을 처리하지 않은 대조군을 6일 간 배양한 후 명확히 관찰할 수 있었다(Fig. 1A Day 6 Control panels). 흥미롭게도 복어 균질액을 처리한 MCF-7 인간 유방암 세포는 배양을 시작한지 6일 후에 관찰한 결과 콜로니 형성 능력이 크게 억제됨을 알 수 있다[Fig. 1A Day 6 Homogenate (1%) panels]. 복어 균질액에 의한 MCF-7 세포 콜로니 형성 능력 억제효과의 정량적인 비교는 NIH (national institutes of health)의 image processing 및 analysis 프로그램인 ImageJ를 이용해 수행하였다(<https://imagej.nih.gov/ij/>). 대조군과 복어 균질액 처리군의 콜로니 형성 실험에 대한 결과를 정량적으로 비교한 결과 복어 균질액 처리 후 MCF-7 세

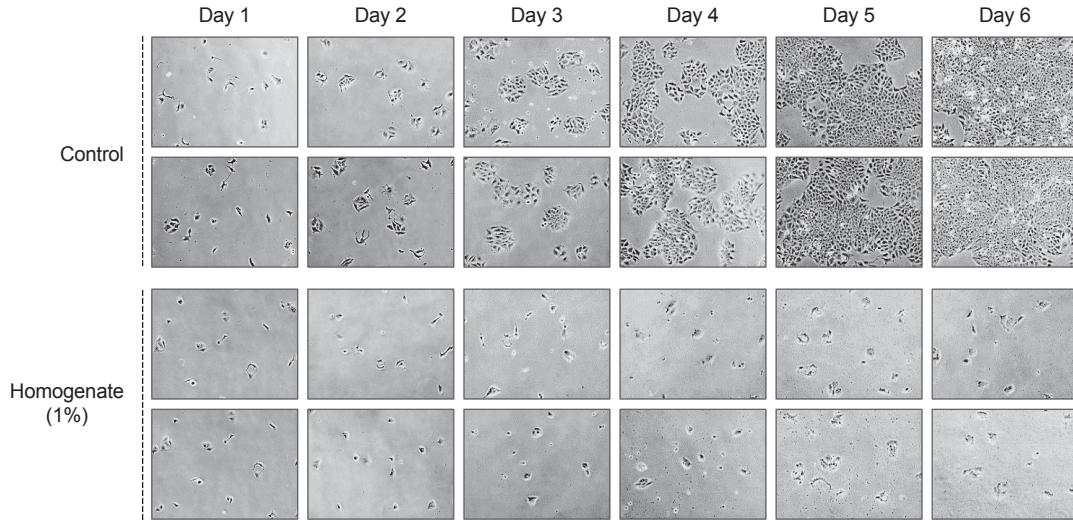


Fig. 2. Morphological characteristics of MCF-7 cells after addition of globefish *Takifugu obscurus* homogenate. MCF-7 cells (1×10^4) were plated into 12-well plates and cultured in EMEM lacking (Control, top panels) or containing 1% (v/v) Globefish homogenate (Homogenate, bottom panels). Morphological changes were monitored for 6 days. Three independent experiments showed similar results. MCF, michigan cancer foundation.

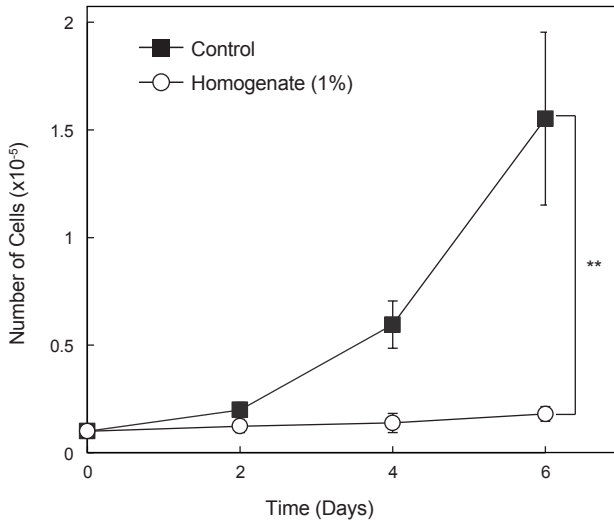


Fig. 3. Growth curve of globefish *Takifugu obscurus* homogenate-treated MCF-7 cells. MCF-7 cells (1×10^4) were cultured in 12-well plates with 1% (v/v) Globefish homogenate. Cell numbers were monitored every 2 days for 6 days. Experiments were performed in triplicate, and three independent experiments showed similar results. Statistical significance was determined using unpaired Student's *t*-tests. ** $P < 0.01$ versus control group. MCF, michigan cancer foundation.

포주의 콜로닝 형성은 80% 이상 억제됨을 알 수 있다(Fig. 1B). 이 결과는 MCF-7 인간 유방암 세포에 의한 콜로니 형성 능력

을 억제할 수 있는 성분이 복어 균질액에 존재함을 의미한다.

MCF-7 유방암 세포주 성장에 미치는 복어 균질액의 영향

MCF-7 유방암 세포주 콜로니 형성 억제 효과가 세포 성장을 억제함으로 인해 일어나는 현상인지를 조사하기 위해 MCF-7 세포에 복어 균질액을 처리한 후 세포 성장 형태를 관찰하였다. 12-well 세포배양 플레이트에 1×10^4 MCF-7 세포를 깔고 2 mL의 배양액을 첨가한 후 1% (vol/vol) 복어 균질액을 처리하였다. 세포 성장 변화를 관찰하기 위해 복어 균질액을 처리한 MCF-7 세포와 균질액을 처리하지 않은 대조군 세포를 위상차 현미경을 이용해 6일 간 매일 관찰하였다. 복어 균질액을 처리하지 않은 MCF-7 세포주는 10% FBS를 첨가한 배지에서 배양한 결과 패치 형태를 이루면서 빠른 속도로 성장하였다(Fig. 2A top panels; Control). 그러나 이와 대조적으로 1% 복어 균질액을 처리한 MCF-7 세포는 거의 성장하지 못함을 관찰하였다[Fig. 2A bottom panels; Homogenate (1%)].

이 결과를 정량적으로 측정하기 위해 MCF-7 유방암 세포주에 대한 성장곡선을 작성하였다. 세포수는 MCF-7 유방암 세포에 복어 균질액을 1% 농도로 처리하고 이를 간격으로 측정하였다. 그림에서 보는 바와 같이 대조군 MCF-7 인간 유방암 세포는 배양시간이 경과할수록 기하급수적으로 성장함을 알 수 있다(Fig. 3 Control). 그러나 1% 복어 균질액을 처리한 MCF-7 세포의 경우 대조군과 다르게 시간이 경과하여도 세포 성장이 거의 일어나지 못함을 알 수 있다[Fig. 3 Homogenate (1%)]. 이는 1%의 복어 균질액에 인간 유방암 세포주인 MCF-7의 성장

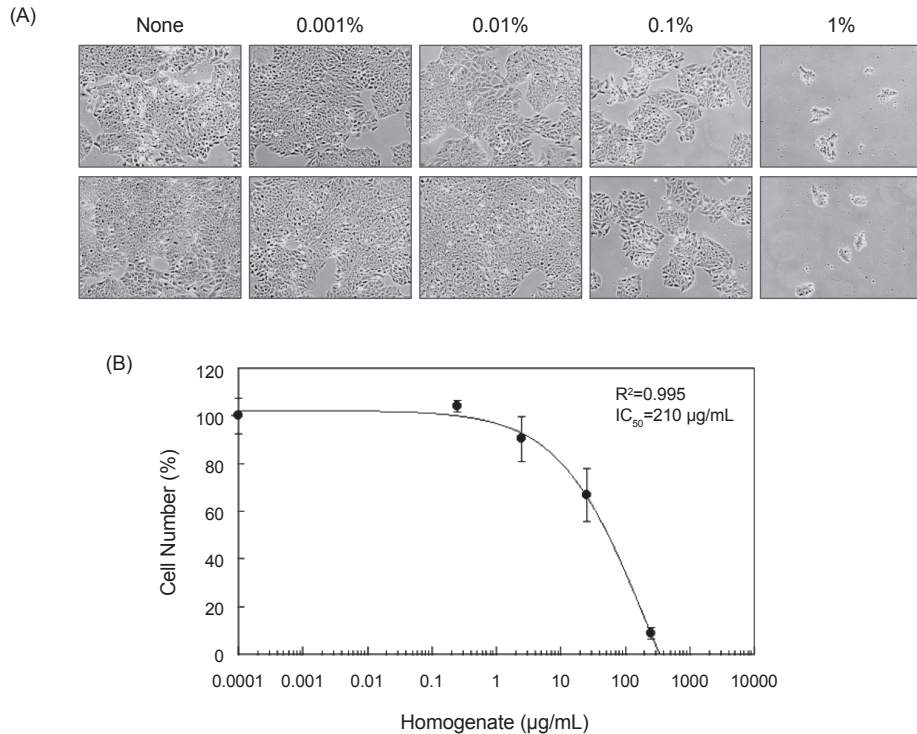


Fig. 4. Inhibitory concentration (IC_{50}) curve for globefish *Takifugu obscurus* homogenate against MCF-7 cells. (A) Phase-contrast microscopic images showing MCF-7 breast cancer cells cultured with various concentrations of globefish homogenate. MCF-7 cells were cultured with increasing concentrations of globefish homogenate and observed for 6 days. Three separate experiments were performed and yielded similar results. (B) The IC_{50} curve for globefish homogenate. MCF-7 cells were cultured with globefish homogenate (0-1%), and growth inhibitory effects were monitored by cell counting. Data are presented as the relative cell number (mean \pm SD of three independent experiments). SoftMax Pro software (Molecular Devices) was used to calculate the IC_{50} value from the sigmoidal dose-response curves. Three independent experiments were performed, all with similar data. MCF, michigan cancer foundation.

을 억제할 수 있는 물질이 존재함을 의미한다.

MCF-7 유방암 세포주에서의 복어 균질액에 대한 IC_{50} 측정

복어 균질액에 대한 MCF-7 유방암 세포주의 IC_{50} 를 측정하기 위해 MCF-7 세포주에 다양한 농도의 복어 균질액을 처리하고 농도별로 세포주 성장에 얼마나 영향을 미치는지를 조사하였다. 0.001%, 0.01%, 0.1%, 1% (v/v) 농도로 복어 균질액을 MCF-7 인간 유방암 세포주에 처리하고 6일 간 배양하였다. 그림에서 보는 바와 같이, 6일 후 세포를 현미경으로 관찰한 결과, MCF-7 인간 유방암 세포주의 성장이 복어 균질액 처리 농도가 증가할수록 더 크게 억제됨을 알 수 있다(Fig. 4A).

복어 균질액에 대한 IC_{50} 를 측정하기 위해 MCF-7 세포의 수를 측정 후 복어 균질액 농도에 대한 MCF-7 세포수 그래프를 작성하였다(Fig. 4B). 복어 균질액을 처리하지 않은 MCF-7 유방암 세포주의 세포수를 100%로 환산한 후 이를 기준으로 다양한 농도의 복어 균질액을 처리하고 배양한 MCF-7 세포주의 세포수를 환산해 표기하였다. 또한 복어 균질액의 질량을 측

정해 % 단위를 그래프로 환산해 X축에 표시하였다. MCF-7 세포에서의 복어 균질액에 대한 IC_{50} 은 도출된 수식을 활용해 계산하였다($R^2=0.995$). 그 결과 MCF-7 유방암 세포에서 복어 균질액에 대한 IC_{50} 은 210 $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었다(Fig. 4B).

복어 균질액에 의한 Akt 활성 억제 효과

복어 균질액 처리에 따른 MCF-7 유방암 세포 성장 억제효과를 분자수준에서 분석하기 위해 세포생존과 관련된 신호전달체계를 분석하였다. Fig. 5A에서 보는 바와 같이 복어 균질액을 처리한 경우 Akt 활성화를 의미하는 473번째 세린 잔기의 인산화 (Phospho-S473 Akt) 양이 급격히 감소함을 알 수 있다(Fig. 5A top panel). 복어 균질액이 세포 내에 존재하는 total Akt 단백질 양에도 변화를 주는 지를 알아보기 위해 total Akt 단백질을 인식하는 항체를 사용해 Western blot을 수행하였다. 그 결과 복어 균질액을 처리하면 total Akt 단백질의 양도 일부 감소함을 관찰할 수 있었다(Fig. 5A second panel).

이번에는 복어 균질액에 의한 Akt 단백질의 비활성화가 Cyclin D1 단백질 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 이에 대

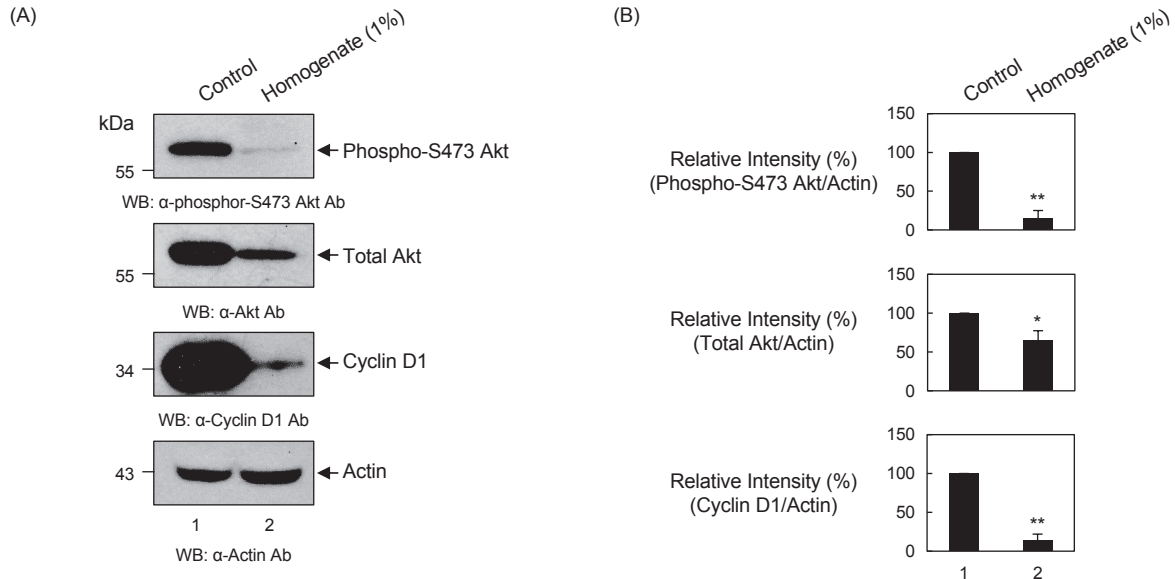


Fig. 5. Modulation of the phosphor-S473 Akt, total Akt, and Cyclin D1 protein levels after treatment with globefish *Takifugu obscurus* homogenate. (A) Western blot analysis of phosphor-S473 Akt, total Akt, and Cyclin D1 expression by globefish homogenate-treated MCF-7 cells. Total extracts (10 μ g) from control and globefish homogenate-treated MCF-7 cells were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with antibodies specific for phosphor-S473 Akt (Top panel), total Akt (second panel), Cyclin D1 (third pane), and Actin (bottom panel). Actin was used as a loading control. Three independent experiments were performed, all with similar results. (B) Quantification of the phosphor-S473 Akt, total Akt, and Cyclin D1 protein levels after treatment with globefish homogenate. The bar graphs represent the mean \pm SD of the relative intensities of the phosphor-S473 Akt, total Akt, and Cyclin D1 bands (phosphor-S473 Akt/Actin, total Akt/Actin, and Cyclin D1/Actin) from three independent experiments. Statistical significance was determined using the unpaired Student's *t*-test. * P <0.05 and ** P <0.01 versus the control group. MCF, michigan cancer foundation.

한 Western blot을 수행하였다. 흥미롭게도 복어 균질액 처리가 MCF-7 세포의 Cyclin D1 단백질 발현을 억제함을 알 수 있다(Fig. 5A third panel). Actin 단백질에 대한 Western blot은 loading한 cell lysate에 대한 대조군으로 사용하였다(Fig. 5A bottom panel).

Western blot 결과를 VersaDoc MP 4000 장비를 이용해 정량하였다. Phospho-S473 Akt 단백질과 total Akt 단백질의 양은 복어 균질액 처리 이후 각각 85% (정량값=15.3% \pm 9.7)와 35% (정량값=64.8% \pm 12.6) 가량 감소하였음을 알 수 있었다. 또한 Cyclin D1 단백질의 양도 복어 균질액 처리 이후 85% (정량값=13.9% \pm 8.3)가량 감소하였음을 알 수 있다(Fig. 5B).

고찰

복어 균질액이 인간 유방암 세포인 MCF-7 세포의 성장과 콜로니 형성 능력을 억제할 수 있다는 것은 흥미로운 일이다. 특히 처리한 복어 균질액이 정제한 단일 물질이 아니고 혼합물임에도 불구하고 1%의 복어 균질액을 처리했을 때 MCF-7 세포의 성장을 90% 이상 억제했다는 것은 놀라운 일이라 판단된다. 현재 본 연구팀은 MCF-7 세포의 성장과 콜로니 형성 능력을 억제하는 유효 물질을 분리하기 위해 정제 연구를 수행 중에 있다.

아직 이러한 효과가 단일 물질의 효과인지 두 종류 이상의 물질들이 복합 작용해 나타나는 현상인지에 대해서는 추가적인 후속 연구가 필요한 상황이지만 해당 분리에 성공한다면 매우 흥미로운 결과를 도출해 낼 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구팀이 이전에 문헌에 발표했던 연구결과에 의하면 복어 균질액의 인간 결장직장암 세포에 대한 IC_{50} 값은 Caco-2 세포주의 경우 37.5 μ g/mL, DLD-1 세포주의 경우 111 μ g/mL, HCT116 세포주의 경우 95 μ g/mL, 그리고 SW480 세포주의 경우 121 μ g/mL로 모두 인간 결장직장암 유래 세포주들이지만 종류에 따라 민감도에서 다소 차이를 나타냈다(Kim et al., 2017; Kim and Kim, 2018). MCF-7 인간 유방암 세포주의 복어 균질액에 대한 IC_{50} 은 210 μ g/mL로, 이전 실험에 사용했던 네 종류의 인간 결장직장암 세포주들보다 다소 민감도가 낮은 것으로 관찰되었다. 암 종류에 따라 다른 민감도가 나타나는 것은 기존 항암제 실험에서도 보고된 내용이라 놀라운 결과는 아니라고 생각되지만, 성장 억제 효과가 크게 나타나는 특정 암들이 있는지를 규명하는 후속 연구는 반드시 수행될 필요성이 있다고 판단된다.

Akt는 PKB (protein kinase B)로도 불리는 단백질로 주로 세포 생존과 관련된 신호를 전달하는데 관여한다(Franke, 2008;

Manning and Toker, 2017). 따라서 복어 균질액 처리가 MCF-7 세포에서 Akt 단백질 활성화를 억제한다는 결과는 매우 흥미로운 결과이다. Akt 단백질에 있는 473번 세린 잔기의 인산화는 Akt 단백질의 활성화를 의미한다. 특히 복어 균질액 처리는 활성화된 phosphor-Akt 단백질의 양을 줄였을 뿐만 아니라 total 단백질의 양도 감소했다. 이러한 감소가 단백질 수준에서 일어났는지 아니면 전사 수준에서 일어난 것인지는 명확하지 않다. 따라서 후속 실험에서 이에 대한 규명이 필요하다고 생각된다.

Akt 단백질 이외에도 Cyclin D1 단백질 레벨도 복어 균질액 처리 후 명확히 감소했음을 알 수 있다. Cyclin D1은 세포주기의 G1 phase의 세포를 S phase로 진행시키는데 관여하는 CDK4 (Cyclin dependent kinase 4)나 CDK6 (Cyclin dependent kinase 6)의 활성화에 필수적인 단백질로(Malumbres and Barbacid, 2009), 활성화된 Akt가 Cyclin D1의 발현을 유도한다는 선행연구결과가 있다(Song et al., 2019). 따라서 이러한 Cyclin D1의 down-regulation 현상은 Akt 단백질의 비활성화로 인해 일어난 결과로 추론된다. 하지만 이 경우 역시 복어 균질액이 Akt 활성화 여부와 독립적으로 Cyclin D1의 발현을 전사수준에서 조절할 수 있으므로 이에 대한 후속 연구가 진행될 필요성이 있다고 판단된다.

기대수명이 증가하면서 발생하는 인구 고령화로 인해 암에 의한 사망률은 매년 증가하고 있다. 여기에 더해 생활양식이 서구화되고 환경오염이 증가되면서 암 발생 요인들이 다양하게 늘어나고 있다. 천연물 유래의 항암 물질 개발 연구는 천연물로부터 항암에 활성을 갖는 성분을 분리해 항암제를 개발하는 방식으로 암치료제 개발을 위한 주요 연구분야이다. 파클리탁셀(Paclitaxel)이나 도세탁셀(Docetaxel)과 같은 택센(Taxane)류, 빈블라스틴(Vinblastine), 빈크리스틴(Vincristine), 비노렐빈(Vinorelbine)과 같은 빈카 알칼로이드(Vinca Alkaloid)류, 에토포사이드(Etoposide)와 같은 에피포도필로톡신(Epipodophyllotoxin), 토폠테칸(Topotecan), 이리노테칸(Irinotecan)과 같은 캄토테신(Camptothecin)류, 그리고 닥티노마이신(Dactinomycin), 독소루비신(Doxorubicin), 다우노루비신(Daunorubicin), 마이토마이신(Mitomycin), 블레오마이신(Bleomycin)과 같은 항암항생물질(Antitumor Antibiotics)류 등은 천연물에서 유래한 항암제들이고, 이것들 이외에도 다양한 종류의 피토케미칼(phytochemical)을 이용한 암 억제 연구가 여러 분야에서 진행되고 있다(Hosseini and Ghorbani, 2015; Choudhari et al., 2019; Ranjan et al., 2019). 해양자원(marine natural product) 역시 항암제 개발을 위한 좋은 소재로 그 중요성을 주목 받고 있다(Simmons et al., 2005; Sithranga Boopathy and Kathiresan, 2010; Alves et al., 2018; Khalifa et al., 2019). 이에 더해 복어 균질액에 암세포의 성장을 억제하는 물질이 존재한다는 것은 매우 흥미로운 일이다. 현재까지 본 연구팀이 수행한 연구결과에 의하면 복어 균질액은 유방암 세포뿐만 아니라 대장암 세포의 성장도 억제하는 것으로 나타났다(Kim et al.,

2017; Kim and Kim, 2018). 복어 균질액에 존재하는 활성성분이 무엇인지를 규명하는 연구는 현재 수행 중에 있으며, 소재가 개발되면 기존 항암제에 의해 발생한 내성 극복이 가능한지 여부를 분석해 그 중요성을 확대해 갈 필요성이 있다.

사 사

이 성과는 한국연구재단(NRF-2019R1F1A1058590)과 서강대학교(201919037.01)의 지원을 받아 수행된 연구임.

References

- Alves C, Silva J, Pinteus S, Gaspar H, Alpoim MC, Botana LM and Pedrosa R. 2018. From marine origin to therapeutics: The antitumor potential of marine algae-derived compounds. *Front Pharmacol* 9, 777. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00777>.
- Bane V, Lehane M, Dikshit M, O'Riordan A and Furey A. 2014. Tetrodotoxin: chemistry, toxicity, source, distribution and detection. *Toxins (Basel)* 6, 693-755. <https://doi.org/10.3390/toxins6020693>.
- Carter LG, D'Orazio JA and Pearson KJ. 2014. Resveratrol and cancer: focus on in vivo evidence. *Endocr Relat Cancer* 21, R209-225. <https://doi.org/10.1530/ERC-13-0171>.
- Chau R, Kalaitzis JA and Neilan BA. 2011. On the origins and biosynthesis of tetrodotoxin. *Aquat Toxicol* 104, 61-72. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.04.001>.
- Choudhari AS, Mandave PC, Deshpande M, Ranjekar P and Prakash O. 2019. Phytochemicals in cancer treatment: From preclinical studies to clinical practice. *Front Pharmacol* 10, 1614. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01614>.
- Demain AL and Vaishnav P. 2011. Natural products for cancer chemotherapy. *Microb Biotechnol* 4, 687-699. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00221.x>.
- Franke TF. 2008. PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* 27, 6473-6488.
- Gibellini L, Pinti M, Nasi M, Montagna JP, De Biasi S, Roat E, Bertonecelli L, Cooper EL and Cossarizza A. 2011. Quercetin and cancer chemoprevention. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011, 591356. <https://doi.org/10.1093/ecam/nea053>.
- Han KH, Baek JI, Shin LS, Kim HJ, Yoon BI, Hwang JH and Lee SH. 2017. Morphological description of three species of pufferfishes (Tetraodontidae) from India. *Korean J Fish Aquat Sci* 50, 77-84. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2017.0077>.
- Hong S, Won YJ, Park YR, Jung KW, Kong HJ, Lee ES and Community of Population-Based Regional Cancer R. 2020. Cancer statistics in Korea: Incidence, mortality, survival, and prevalence in 2017. *Cancer Res Treat* 52, 335-350. <https://doi.org/10.4143/crt.2020.206>.
- Hosseini A and Ghorbani A. 2015. Cancer therapy with phy-

- tochemicals: evidence from clinical studies. *Avicenna J Phytomed* 5, 84-97.
- Hwang SM and Oh KS. 2013. Comparisons of food component characteristics of wild and cultured edible pufferfishes in Korea. *Korean J Fish Aquat Sci* 46, 725-732. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2013.0725>.
- Jal S and Khora SS. 2015. An overview on the origin and production of tetrodotoxin, a potent neurotoxin. *J Appl Microbiol* 119, 907-916. <https://doi.org/10.1111/jam.12896>.
- Jang HC, Park JU and Kim JH. 2003. A study on the generative reason of the toxicity for the pufferfish. *J Fish Mar Sci Edu* 15, 67-80.
- Khalifa SAM, Elias N, Farag MA, Chen L, Saeed A, Hegazy MF, Moustafa MS, Abd El-Wahed A, Al-Mousawi SM, Musharraf SG, Chang FR, Iwasaki A, Suenaga K, Alajlani M, Goransson U and El-Seedi HR. 2019. Marine natural products: A source of novel anticancer drugs. *Mar Drugs* 17, 491. <https://doi.org/10.3390/md17090491>.
- Kim J, Chung G and Kim J. 2017. Inhibitory effect of globe-fish homogenate on the growth of Caco-2 human colorectal cancer cells. *Korean Soc Biotechnol Bioeng J* 32, 212-217. <https://doi.org/10.7841/ksbbj.2017.32.3.212>.
- Kim J, Kim HS, Shim JJ, Lee J, Kim AY and Kim J. 2019. Critical role of the fibroblast growth factor signalling pathway in Ewing's sarcoma octamer-binding transcription factor 4-mediated cell proliferation and tumorigenesis. *FEBS J* 286, 4443-4472. <https://doi.org/10.1111/febs.14946>.
- Kim J and Kim J. 2018. Inhibitory effect of globe-fish homogenate on the growth of human colorectal cancer cell lines. *KSBB J* 33, 183-191. <https://doi.org/10.7841/ksbbj.2018.33.3.183>.
- Lago J, Rodriguez LP, Blanco L, Vieites JM and Cabado AG. 2015. Tetrodotoxin, an extremely potent marine neurotoxin: Distribution, toxicity, origin and therapeutical uses. *Mar Drugs* 13, 6384-6406. <https://doi.org/10.3390/md13106384>.
- Malumbres M and Barbacid M. 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9, 153-166. <https://doi.org/10.1038/nrc2602>.
- Manning BD and Toker A. 2017. AKT/PKB Signaling: Navigating the network. *Cell* 169, 381-405. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.001>.
- Matsumura K. 1996. Tetrodotoxin concentrations in cultured puffer fish, *Fugu rubripes*. *J Agric Food Chem* 44, 1-2. <https://doi.org/10.1021/jf950576l>.
- Molinski TF, Dalisay DS, Lievens SL and Saludes JP. 2009. Drug development from marine natural products. *Nat Rev Drug Discov* 8, 69-85. <https://doi.org/10.1038/nrd2487>.
- Rajesh E, Sankari LS, Malathi L and Krupaa JR. 2015. Naturally occurring products in cancer therapy. *J Pharm Bioallied Sci* 7, S181-183. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.155895>.
- Ranjan A, Ramachandran S, Gupta N, Kaushik I, Wright S, Srivastava S, Das H, Srivastava S, Prasad S and Srivastava SK. 2019. Role of phytochemicals in cancer prevention. *Int J Mol Sci* 20, 4981. <https://doi.org/10.3390/ijms20204981>.
- Ravindran J, Prasad S and Aggarwal BB. 2009. Curcumin and cancer cells: how many can curry kill tumor cells selectively?. *AAPS J* 11, 495-510. <https://doi.org/10.1208/s12248-009-9128-x>.
- Siegel RL, Miller KD and Jemal A. 2020. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin* 70, 7-30. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>.
- Simmons TL, Andrianasolo E, McPhail K, Flatt P and Gerwick WH. 2005. Marine natural products as anticancer drugs. *Mol Cancer Ther* 4, 333-342.
- Singh CK, Ndiaye MA and Ahmad N. 2015. Resveratrol and cancer: Challenges for clinical translation. *Biochim Biophys Acta* 1852, 1178-1185. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.11.004>.
- Sithranga Boopathy N and Kathiresan K. 2010. Anticancer drugs from marine flora: an overview. *J Oncol* 2010, 214186. <https://doi.org/10.1155/2010/214186>.
- Song M, Bode AM, Dong Z and Lee MH. 2019. AKT as a therapeutic target for cancer. *Cancer Res* 79, 1019-1031. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2738>.
- Spagnuolo C, Russo GL, Orhan IE, Habtemariam S, Daglia M, Sureda A, Nabavi SF, Devi KP, Loizzo MR, Tundis R and Nabavi SM. 2015. Genistein and cancer: current status, challenges, and future directions. *Adv Nutr* 6, 408-419. <https://doi.org/10.3945/an.114.008052>.
- van Breemen RB and Pajkovic N. 2008. Multitargeted therapy of cancer by lycopene. *Cancer Lett* 269, 339-351. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.05.016>.
- Wu X, Zhou QH and Xu K. 2009. Are isothiocyanates potential anti-cancer drugs?. *Acta Pharmacol Sin* 30, 501-512. <https://doi.org/10.1038/aps.2009.50>.
- Yan X, Qi M, Li P, Zhan Y and Shao H. 2017. Apigenin in cancer therapy: anti-cancer effects and mechanisms of action. *Cell Biosci* 7, 50. <https://doi.org/10.1186/s13578-017-0179-x>.