



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

Fucoidan의 마우스 비장세포에서
세포사 유도 및 사람 백혈병 세포(HL-60)
에서의 항암 효과 연구

濟州大學校 大學院

獸醫學科

梁惠烈

2016年 2月

Fucoidan의 마우스 비장세포에서
세포사 유도 및 사람 백혈병 세포(HL-60)
에서의 항암 효과 연구




指導教授 朱 洪 球

梁 惠 烈

이 論文을 獸醫學 碩士學位 論文으로 提出함

2016年 12月

洪仁哲의 獸醫學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長	손 원 근	
委 員	주 홍 구	
委 員	지 영 혼	

濟州大學校 大學院

2016 年 12月

초 록

Cytotoxicity of Fucoidan on mouse splenocytes and HL-60, human leukemia cells

(지도교수: 주홍구)

양혜열

제주대학교 수의학과 대학원

Fucoidan은 갈조류에서 추출한 황화다당체이다. 항암효과와 소염효과등 여러 효과들이 알려져 있다. Fucoidan은 비장세포를 자극시켜 면역증진에 영향을 미치고, 고분자량을 가진 fucoidan이 보다 강력한 면역 자극 활성을 가진다고 알려져 있다. 그러나 예비 실험 결과 fucoidan이 세포 독성 효과가 나타날 수 있다고 생각되었다. 그리하여 4종류의 fucoidan을 가지고 실험을 실시하였다. MTT assay를 사용하여 실험했을 때, fucoidan B가 fucoidan A에 비해 비장 세포의 활성도를 유의적으로 감소시키는 결과를 보였다. 유세포 분석으로 비장 세포의 크기 감소를 알았고, 현미경 관찰로 비장 세포의 형태를 분석함으로써 fucoidan B를 처리한 세포에서 세포사를 확인 할 수 있었다. 또한 세포사 중 초기 세포사를 유도하는 것을 확인하였고, 미토콘드리아 막전위도 감소하였다. 따라서 면역세포에 독성을 미치는 fucoidan B가 암세포에서도 대사활성을 감소시켜 항암효과를 나타낼 수 있을지에 대해서 검증해보기로 했다. HL-60 세포는 human leukemia 세포주이고, 마찬가지로 fucoidan B를

처리했다. Fucoidan B 처리로 인해 HL-60의 대사 활성이 감소되었고, 세포의 형태도 차이가 있었다. Fucoidan 처리로 인해 일어난 세포사인지 검증하기 위해 Annexin V/propidium iodide 염색을 하여 flow cytometry로 확인해보았다. Fucoidan B는 지속적으로 HL-60 세포의 세포 사멸사를 포함한 세포사를 유도했다. 또한, 미토콘드리아의 막을 불안정하게 만들고 reactive oxygen species (ROS)의 생산을 변화시켰다.

기존 보고와는 다르게 fucoidan은 비장세포와 HL-60세포에서 세포독성을 보였다. 따라서 fucoidan이 HL-60 세포에 항암 활성을 가지고 있다고 판단된다. 본 연구로 fucoidan이 면역 세포에 세포독성 효과를 가지며 나아가 백혈병의 항암제로 사용될 수 있음을 기대한다.

Keywords: 후코이단, 비장세포, 세포사, HL-60 세포, 항암제

Abstract

Cytotoxicity of Fucoidan on mouse spleen cells and HL-60, human leukemia cells

Supervised by professor hong-gu Joo

Hye-Yeoul Yang

College of Veterinary Medicine,
Graduate school,
Jeju National University

Fucoidan is a sulfated polysaccharide, purified from brown algae. It has been known to have multiple biological activities including anti-cancer and anti-inflammatory effects. Previous our reports demonstrated that fucoidan can stimulate splenocytes and especially high molecular weight fucoidan is responsible for the immunostimulatory activity. However, we recently found that the activity of fucoidan can be dependent on its individual batch or sources. 4 different fucoidans (fucoidan A, fucoidan B, high molecular weight fucoidan, low molecular weight fucoidan) were used for this

study. MTT assay showed that fucoidan B significantly decreased the cellular activity of splenocytes compared to fucoidan A. Furthermore, fucoidan B consistently killed splenocytes based on the cell size by flow cytometry analysis and the morphology by an inverted microscope. fucoidan B decreased the MMP and induced the early apoptosis of splenocytes. So, we tried to examine whether fucoidan B, which is toxic to immune cells, could reduce the metabolic activity of cancer cells and show anticancer effects. We cultured HL-60 cells, a human leukemia cell line and treated with the same fucoidan. Fucoidan B. The metabolic activity of HL-60 cells was decreased by fucoidan. And also, the morphology of HL-60 treated by fucoidan was changed. To clarify whether the fucoidan's effect was attributed to cell death, namely cytotoxicity, we analyzed the size and the level of Annexin V/propidium iodide staining of HL-60 cells by a flow cytometer. Fucoidan consistently induced the cell death including apoptosis of HL-60 cells. As potential mechanisms, fucoidan destabilized the mitochondrial membrane potential and altered the production of reactive oxygen species in HL-60 cells. Taken together, we suggest that different batches or origin of fucoidan may have differential activities on splenocytes, immunostimulatory and cytotoxic activity. Also, we suggest that fucoidan has anti-tumor activity on HL-60 cells *via* the destabilization of mitochondrial membrane potential. The present study demonstrates that fucoidan can be used as an anti-cancer agent for leukemia based on its mechanism.

Keywords: Fucoidan, splenocytes, apoptosis, HL-60 cells , anti-tumor activity

목 차

I. 서	론	-----	1
II. 재료	및 방법	-----	2
III. 결	과	-----	5
IV. 고	찰	-----	17
V. 참	고 문 헌	-----	20

I. 서론

Fucoidan은 갈조류와 해양 무척추 동물에서 추출된 고분자 황화 다당체이다[9]. Fucoidan의 구조는 복잡하고, 종별로 구조와 화학식이 다를 수 있다. 또한 지역이나 추출방식에 따라 많은 차이를 보일 수 있다. 본 연구에서는 *Fucus vesiculosus*에서 추출된 fucoidan을 사용하였다. Fucoidan은 항암 능력이 있어 암세포의 성장과 분화를 억제한다고 하지만 그 작용 기전은 아직 명확하게 밝혀지지 않았다[5]. Fucoidan은 항응고, 항염증, 항바이러스 효과, 면역 증진 효과 등 다양한 능력을 가진 천연물로 연구가 활발히 이루어지고 있다[9, 11].

Fucoidan은 림프구를 증식시키고 활성화시켜 면역증진에 영향을 미친다고 한다[15]. 또한 고분자(high molecular weight, HMF)와 저분자(low molecular weight, LMF) fucoidan의 비교 실험에서 HMF가 보다 강력한 면역자극효과를 나타냈다[12]. 이전의 예비 실험에서, fucoidan이 같은 회사에서 판매된 것이라도 연도별, batch별로 면역자극의 정도와 양상이 달랐다. 심지어 면역세포에 대한 독성효과가 나타날 수 있다고 여겨졌다.

세포독성 능력은 표적세포의 세포사(cell death)를 의미한다. 세포사는 보통 세포자멸사(apoptosis)와 세포괴사(necrosis)로 분류된다. 세포자멸사는 프로그램된 세포의 죽음으로써, 다세포 생물에서 생존을 위한 중요 기전이다. 세포자멸사는 유해 물질에 공격을 받은 세포를 사멸시켜 생명체를 보호하는 역할을 하기 때문에 생존을 위한 중요한 기전으로 여겨진다[8]. 어떤 물질이 세포 독성 능력을 가져 면역 세포에 발현하게 되면, 과도한 면역 세포의 활성을 억제시키게 된다. 그리하여 그 물질은 면역 억제제로서 개발 가능성을 가진다. 따라서 fucoidan의 면역세포에 대한 독성 검증과 그 정도를 측정하고, 더 나아가 myeloid성 백혈병 세포주인 HL-60 세포에 대해서도 fucoidan의 세포 독성, 즉 항암효과를 확인해 보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

PART 1. Fucoidan의 비장 세포에서 세포사 유도

실험동물 및 시약

실험에는 7-12 주령의 Balb/c와 C57BL/6 마우스를 사용하였다. 실험은 제주대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 시행되었고, 제주대학교 동물실험윤리지침을 준수하였다. Fucoidan은 4종류를 사용하였다. 2008년 구입한 fucoidan (이하 fucoidan A)와 2014년 구입한 fucoidan (이하 fucoidan B), (주)해림후코이단에서 제공받은 High molecular weight (이하 HMF), Low molecular weight (이하 LMF)를 사용하였다. HMF의 크기는 130 kDa이고, LMF의 크기는 30 kDa이었다. Sigma사의 fucoidan의 크기는 20~200 kDa 의 범위로 알려져 있다[12]. 모든 fucoidan은 phosphate buffered saline (PBS, Life Technologies, USA)에 10 mg/mL의 농도(stock solution)로 만들어 사용하였다.

비장세포의 준비 및 배양

비장세포는 이미 확립된 방법에 따라 준비하였다[14]. 마우스의 비장을 채취하고 분쇄하여 비장세포를 얻었다. 비장세포 내 적혈구는 ammonium chloride-potassium (ACK) lysis buffer로 용혈시킨 후 제거하였다. RPMI 1640 배지(Invitrogen, CA, USA)를 완전배지(L-glutamine, penicillin/streptomycin, sodium pyruvate, non-essential amino acid, 2-mercaptoethanol, HEPES buffer, fetal bovine serum을 60℃에서 15분 불활성화시킨 후 사용)로 만들어서 사용하였다. 세포는 2×10^6 cells/mL의 농도로 96-well이나 24-well culture plate에 배양하였다.

비장세포 활성화 측정

비장세포를 96-well culture plate에 2×10^6 cells/mL의 농도로 넣고, fucoidan 4종류를 각각 처리하였다. Fucoidan의 농도는 0, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ 로 3일간 배양한 후, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) assay를 실시하여 활성도를 측정하였다[14]. Microplate reader (Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

유세포 분석을 이용하여 미토콘드리아 막전위 및 세포사 측정

비장세포를 24-well culture plate에 2×10^6 cells/mL의 농도로 넣고, fucoidan B를 처리하였다. Fucoidan의 농도는 0, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 로 24시간 배양하였다. 미토콘드리아 막전위 (Mitochondria membrane potential, 이하 MMP)를 측정하기 위해 Rhodamine 123 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 염색하였다[3]. 세포사의 정도를 측정하기 위해 Annexin V-FITC (BD PharMingen, USA)와 propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 함께 염색하였다[15]. Fucoidan B를 처리하여 24시간 배양 후, Rhodamine 123은 10 $\mu\text{g/mL}$ 로 염색하였다. Annexin V-FITC는 $2\mu\text{l}$, PI는 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 로 세포에 처리하였다. 염색된 세포는 FACSCalibur™ (BD, USA)를 이용하여 유세포분석을 실시하였다.

통계분석

유의성 차이는 ANOVA 분석 후 Tukey 검정으로 확인하였다. 0.05미만의 p value를 유의성이 있다고 판정하였으며 *, **, ***는 각각 control그룹과 비교하였을 때 $p < 0.05$, 0.01, 0.001을 의미하고, #, ##, ###는 각각 fucoidan A와 B를 비교하였을 때 $p < 0.05$, 0.01, 0.001을 의미한다.

PART 2. Fucoidan의 사람 백혈병 세포(HL-60)에서의 항암효과 연구

HL-60 세포주 배양과 fucoidan

HL-60 세포는 human leukemia cell이다. 10% LCM 용액에 37 °C 5% CO²에서 48-72시간 배양하였다[20]. Fucoidan은 part 1.에서 사용된 fucoidan B가 사용되었다.

HL-60 세포 대사활성도 측정

HL-60 세포를 96-well에 2×10^5 cells/mL의 농도로 넣고, fucoidan을 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리하여 3일간 배양하여 MTT assay를 실시하였다[14].

유세포분석

HL-60 세포를 24-well에 2×10^5 cells/mL의 농도로 넣은 후, fucoidan을 0, 10, 20, 50 $\mu\text{g/mL}$ 로 각각 처리하여 72시간 배양하였다. Rhodamine 123과 Annexin V-FITC/PI를 각각 세포에 처리 후 FACSCaliburTM (BD, USA)로 유세포분석을 실시하였다.

세포내 ROS 측정

HL-60 세포를 24-well에 2×10^5 cells/mL의 농도로 넣은 후, fucoidan을 0, 6.25, 25, 100 $\mu\text{g/mL}$ 로 각각 처리하였다. 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFDA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 10 μM 농도로 처리한 후 45분 배양하였다. 염색된 세포는 FACSCaliburTM (BD, USA)로 유세포분석을 실시하였다.

유의성분석

유의성 차이는 ANOVA 분석 후 Tukey검정으로 확인하였다.

III. 결과

PART 1. Fucoidan의 비장 세포에서 세포사 유도

Fucoidan이 처리된 비장세포의 활성화도 변화

비장세포에 4종류의 fucoidan을 처리하여 3일간 배양하였다. 세포의 활성도를 MTT assay로 측정하였다(Fig. 1). HMF는 LMF보다 높은 활성도를 보였고, HMF와 fucoidan A는 각각의 대조군(0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에 비해 유의하게 증가된 세포활성도를 보였다. 하지만 fucoidan A와 B는 같은 회사에서 구매했음에도 불구하고 전혀 다른 세포활성도를 보였다. 특히 fucoidan B의 경우 fucoidan A와 비교했을 때 유의하게 세포활성을 감소시켰다. 이는 fucoidan B가 세포독성이 있을 가능성을 의미한다. 선행연구에서 fucoidan이 면역세포에 자극 효과가 있는 것으로 알려졌지만, 독성 효과도 또한 나타날 수 있음을 고려해 볼 수 있다. 이에 본 연구에서는 fucoidan의 면역세포 중 비장세포에 대한 세포독성 효과를 분석하려고 하였다.

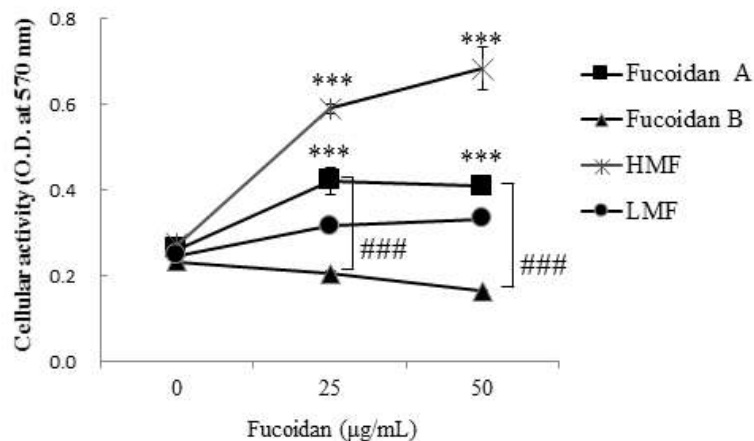


Fig. 1. Splenocytes cellular activity by fucoidan. Splenocytes were setup at 2×10^6 cells/mL in 96-well culture plates and cultured with each

fucoidan (0 – 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Three days later, MTT assay was performed. All values are represented as mean \pm SD. *** indicates $p < 0.001$ compared to control; ### indicates $p < 0.001$, between fucoidan A and fucoidan B treated cells.

Fucoidan에 의한 비장세포의 크기 변화

Fucoidan 처리에 의한 세포독성을 분석하기 위해 유세포분석을 통해 비장세포의 크기 변화를 관찰하였다. Forward Scatter (FSC)는 수치가 커질수록 세포의 크기가 커짐을 의미하고 Side Scatter (SSC)는 수치가 커질수록 세포의 granularity가 커짐을 의미한다. 죽은 세포의 경우 세포의 크기가 작아져 FSC값이 작게 나타나는 경향을 보인다. 대조군($0 \mu\text{g/mL}$)에서 판단한 죽은 세포의 비율은 10% 정도인데, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ fucoidan 처리군들의 죽은 세포의 비율은 농도에 따라 큰 차이는 없지만 대조군보다는 모두 증가하였다(Fig. 2). 독립현미경(inverted microscope)로 세포모양을 관찰한 결과 대조군보다 fucoidan 처리군에서 검정색의 작고, 죽은 세포(화살표)가 더 많이 관찰되었다. Fucoidan B 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리군에서는 면역자극에 의해 나타나는 cluster도 관찰되었다(Fig. 3).

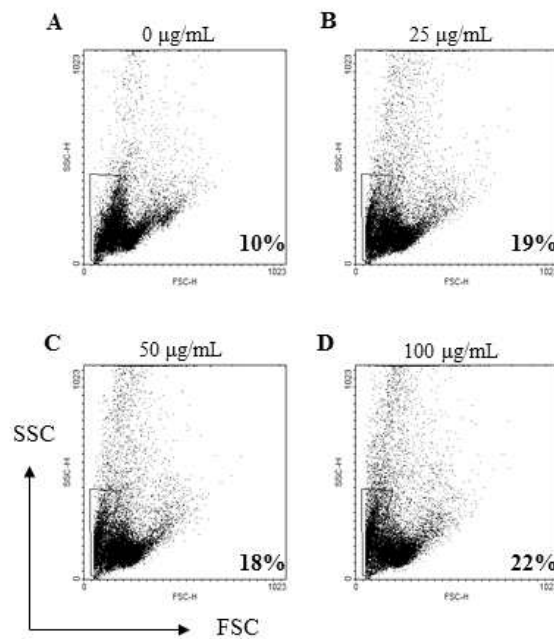


Fig. 2. Exposure of fucoidan causes the change of cell size of splenocyte. Splenocytes were setup at 2×10^6 cells/mL in 24-well culture plates and cultured with 0 – 100 $\mu\text{g/mL}$ fucoidan B for 24hr. The cells were subjected to FACS analysis. The region of dot plots means dead cells and the number is the cell percentage of the region.

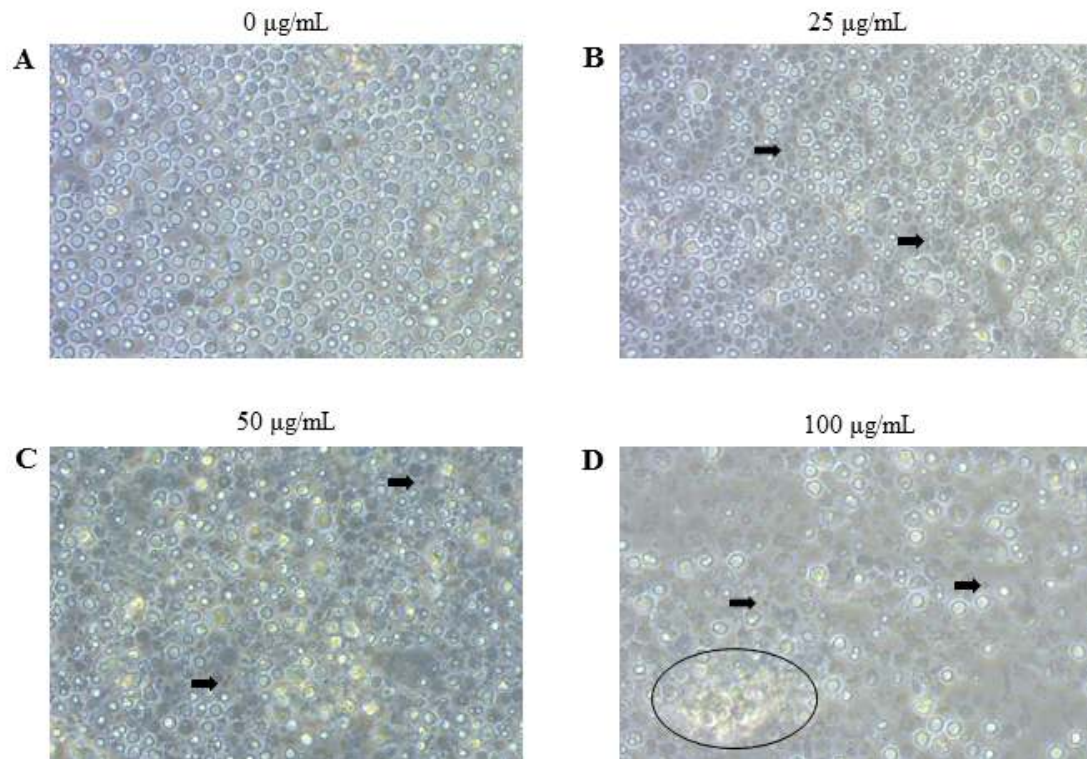


Fig. 3. Effects of fucoidan on cell morphology. Splenocytes were setup and treated as Fig. 2. The arrows indicate dead cells and the circle indicates the cluster of splenocyte.

Fucoidan에 의한 비장세포의 mitochondrial membrane potential(MMP) 측정
 세포의 미토콘드리아의 막전위를 Rhodamine 123 용액으로 염색하여 측정 할
 수 있다. Fucoidan 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군에서는 대조군(0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)보다 MMP가 증가
 하였다. 그러나 fucoidan 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군에서는 감소하는 경향을 보였다
 (Fig. 4).

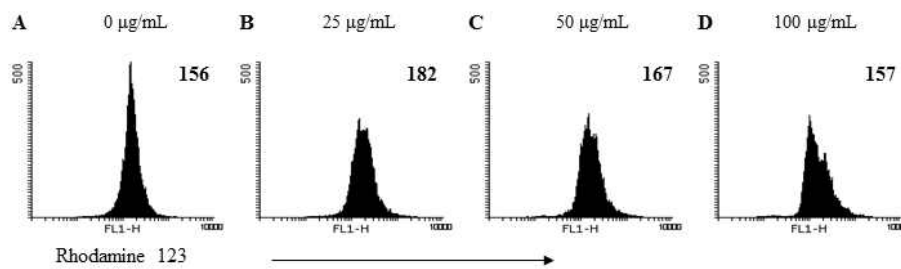


Fig. 4. Mitochondrial membrane potential (MMP) of fucoidan treated splenocytes (Rhodamine 123 staining). Splenocytes were setup and treated as Fig. 2. The number of histograms indicates geometric mean fluorescence intensity.

Fucoidan에 의한 비장세포의 세포사 측정

세포독성이 일어나는 이유 중 세포사가 어느 정도의 영향을 미치는 것인지 확인 해보기 위해 Annexin V-FITC/PI 염색을 하였다. 비장세포를 분리한 후 *in vitro* 실험에서 배양하면 관련 cytokine 부족으로 세포사가 일어날 수 있다. 이를 cytokine withdrawal cell death라고 하는데[8], fucoidan이 비장세포의 자연적인 사멸에 대해 어떤 영향을 미치는지 알아보았다. Annexin V-FITC/PI 염색법으로 초기 세포사(early apoptosis), 후기 세포사(late apoptosis), 세포괴사(necrosis) 된 세포를 측정하였다(Fig. 5). Fucoidan B의 농도가 증가할수록 초기 세포사(Annexin V⁺/PI⁻)된 세포의 수가 증가했다. 대조군(0 $\mu\text{g/mL}$)에 비해 살아있는 세포(Annexin V⁻/PI⁻)의 수는 전반적으로 낮았다.

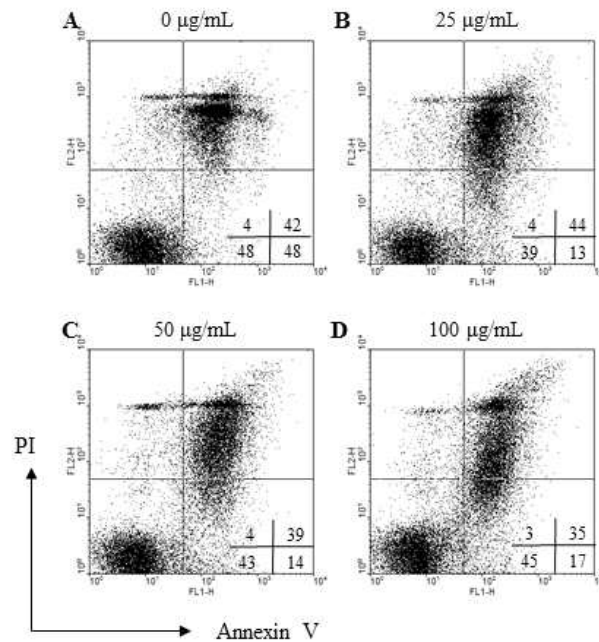


Fig. 5. Fucoidan induces early apoptosis of splenocyte (Annexin V/PI staining). Splenocytes were setup and treated as Fig. 2. The quadrant of the dot plots indicates viable (lower left, Annexin V⁻/PI⁻), early apoptosis (lower right, Annexin V⁺/PI⁻), late apoptosis (upper right, Annexin V⁺/PI⁺), necrosis (upper left, Annexin V⁻/PI⁺) cells, respectively.

PART 2. Fucoidan의 사람 백혈병 세포(HL-60)에서의 항암효과 연구

Fucoidan에 의한 HL-60 세포의 대사활성도 감소

Fucoidan을 HL-60 세포에 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였다. 삼 일간 배양한 후, MTT assay로 세포의 대사활성도를 측정하였다. Fucoidan의 농도가 증가할수록 세포의 대사활성이 감소되었다(Fig. 6).

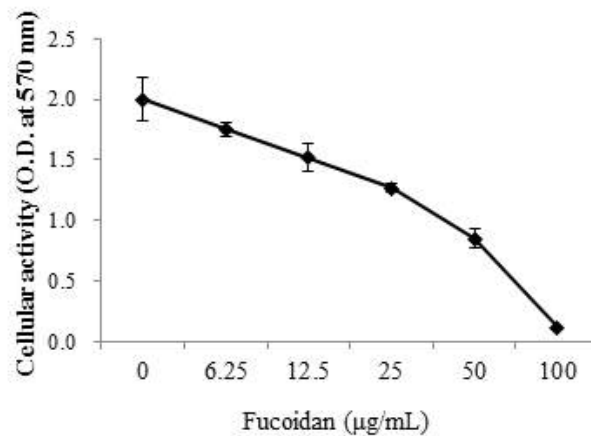


Fig. 6. Fucoidan down-regulates the metabolic activity of HL-60 cells. HL-60 cells were setup at 2×10^5 cells/mL in 96-well culture plates and cultured with each fucoidan (0 - 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Three days later, MTT assay was performed.

Fucoidan 농도에 의한 HL-60 세포의 형태 변화

HL-60에 대한 세포독성을 분석하기 위해 세포의 변화를 관찰하였다. Fucoidan 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리한 HL-60세포를 200배 배율에서 관찰하였다 (Fig. 7). Fucoidan 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 처리된 세포는 전체적으로 균일하고 표면이 매끄러운 모습이다(Fig. 7A). 비교적 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 처리된 세포는 표면이 거칠고, 과립들을 확인할 수 있다(Fig. 7B). 두 농도는 세포의 수에도 확연한 차이를 보이고 있다. Fucoidan은 HL-60에 대해 세포독성을 보인다고 판단된다.

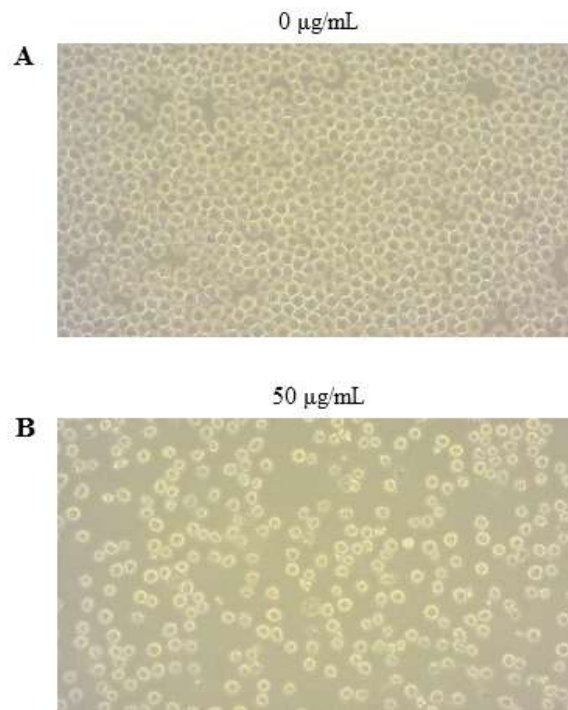


Fig. 7. Effects of fucoidan on HL-60 cell morphology. HL-60 cells were setup at 2×10^5 cells/mL in 24-well culture plates and cultured with each fucoidan (0 - 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 3 days. Images of HL-60 cells (A, 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; B, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fucoidan) were captured using an inverted microscopy with a magnification, X200.

Fucoidan 처리에 의한 HL-60 세포의 세포사 및 세포자멸사 증가

세포사 측정을 위해 Annexin V-FITC/PI 염색을 하였다. 유세포분석에서 FSC/SSC로 세포크기를 관찰하였다. Fucoidan 0, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 죽은 세포의 비율이 유사하게 나타났다. 그러나 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 확연한 차이로 죽은 세포의 비율증가가 관찰되었다(Fig. 8). 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 후기 세포사(Annexin V⁺/PI⁺)된 세포의 비율이 가장 높게 나타났고, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 세포괴사(Annexin V⁻/PI⁺)된 세포의 비율이 가장 높았다. 살아있는 세포(Annexin V⁻/PI⁻)는 대조군(0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에 비해 fucoidan 처리군들이 다 낮게 나타났다. Fucoidan 20, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군의 경우 살아있는 세포의 비율이 비슷했고, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군에서의 살아있는 세포의 비율보다는 낮았다(Fig. 9).

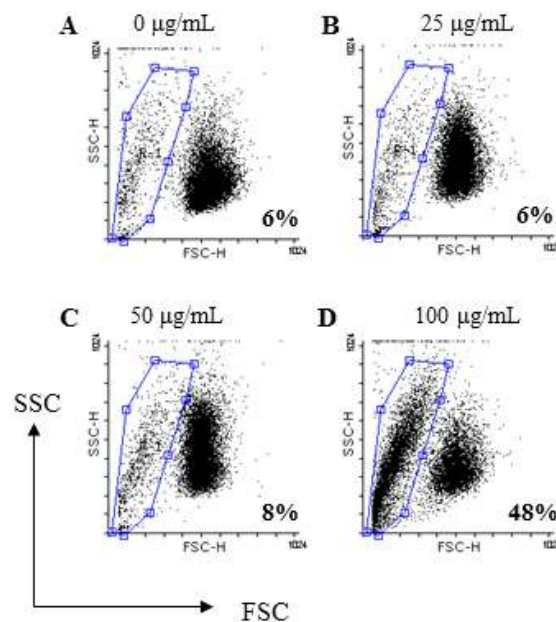


Fig. 8. Fucoidan induces the cell death of HL-60. HL-60 cells were setup as setup at 2×10^5 cells/mL in 24-well culture plates and cultured with 0, 10, 20, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fucoidan. The region of dot plot indicates dead cells and the number is the cell percentaged of the region.

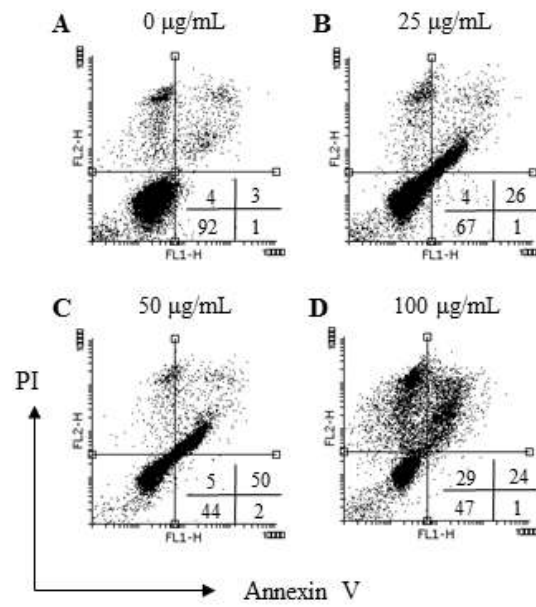


Fig. 9. Fucoidan induces the cell death of HL-60. HL-60 cells were setup as Fig. 8 and treated with 0 – 50 µg/mL fucoidan. The dots in the quadrant indicates Annexin V/PI stained cells.

Fucoidan에 의한 HL-60 세포의 mitochondrial membrane potential 감소

미토콘드리아 막전위를 측정하기 위해 HL-60세포에 Rhodamine 123 용액으로 염색하였다. 대조군(0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)과 비교했을 때 fucoidan 10, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군에서는 미토콘드리아 막전위가 약간 감소했다. 그러나 fucoidan 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군에서는 미토콘드리아 막전위의 현저한 감소를 관찰하였다(Fig. 10). Fucoidan 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군에서 미토콘드리아 이중막 구조가 매우 불안정해진다는 사실을 확인할 수 있다.

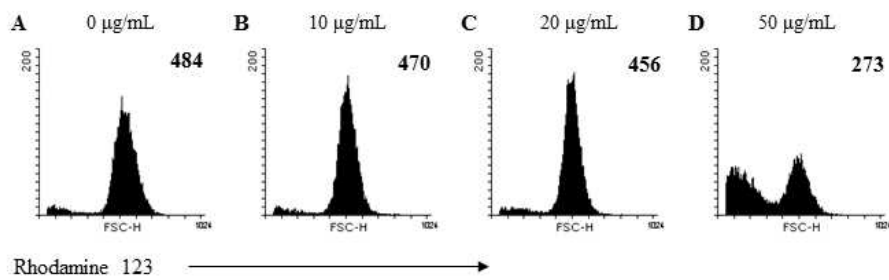


Fig. 10. Fucoidan effects the mitochondrial membrane potential (MMP) of HL-60 cells (Rhodamine 123 staining). HL-60 cells were setup as Fig. 8 and treated with 0 - 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fucoidan. The number of histograms indicates geometric mean fluorescence intensity.

Fucoidan 처리에 의한 HL-60 세포 내 ROS 생산량 변화

대조군(0 $\mu\text{g/mL}$)에 비해 fucoidan 6.25, 25 $\mu\text{g/mL}$ 처리군에서 ROS 생산이 증가하였다. Fucoidan 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 처리군은 25 $\mu\text{g/mL}$ 처리군보다 ROS 생산이 약간 높게 나타났다. Fucoidan 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리군은 대조군(0 $\mu\text{g/mL}$)에 비해 매우 작은 ROS 생산을 보였다(Fig. 11). 이는 생산되는 ROS가 거의 없음을 의미한다.

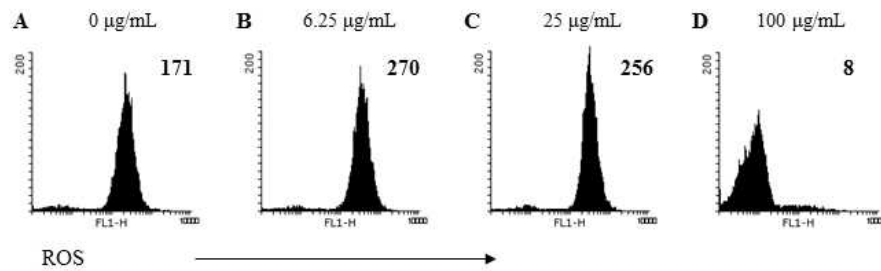


Fig. 11. Fucoidan changes the ROS levels in HL-60 cells. HL-60 cells were setup as Fig. 6 and treated with 0, 6.25, 25, 100 $\mu\text{g/mL}$ fucoidan. The treated HL-60 cells were stained with DCFDA solution. The number of histograms indicates geometric mean fluorescence intensity.

IV. 고찰

본 연구에서는 fucoidan의 세포 독성효과에 대해 확인하였다. Fucoidan은 면역 증진에 효과가 있다고 알려져 있다. 그러나 예비 실험에서 fucoidan은 면역 세포에 독성효과가 있음을 확인하였고 암세포에서도 대사활성을 감소시켜 항암효과를 나타낼 수 있는 지에 관련해 실험을 진행하였다.

면역 세포인 비장세포에 미치는 독성 효과와 그 정도에 대해 분석하였다. 세포활성도를 MTT assay로 측정하였고, Annexin V/PI와 Rhodamine 123 염색법으로 세포사와 관련 있는지에 관해 실험하였다. 암세포의 일종인 HL-60에서도 fucoidan을 처리해 항암효과가 나타나는지 확인하였다. 이러한 항암효과가 세포자멸사와 관련된 세포사에 의한 것인지에 대한 작용기전을 연구하였다. 항암 효과는 다양한 작용기전을 통해 나타나지만 본 연구에서는 HL-60 세포의 미토콘드리아 막전위를 측정하고 ROS 변화를 알아보았다.

선행 연구에서 fucoidan은 농도 증가에 따라 면역 세포에서 면역 자극을 나타냈으며, fucoidan 고분자량에서 저분자량보다 면역 자극의 정도가 크게 나타났다 [12, 15]. 그러나 최근 실시한 실험 시료인 fucoidan B (2014)는 다른 결과를 보였다. Fucoidan B (이하 fucoidan)는 농도가 증가할수록 세포활성도가 감소되는 결과가 나타났다. Fucoidan의 농도가 증가할수록 같은 수의 세포 활성도가 낮아지거나 세포수가 감소하기 때문이라고 생각해 볼 수 있다. 따라서 fucoidan이 세포사를 유도시키는지 혹은 세포의 기능을 저하시키는 지 검증하고자 하였다. Annexin V/PI 염색을 하고 그 결과를 관찰하였을 때, fucoidan가 비장세포에서 초기 세포사(early apoptosis, Annexin V⁺/PI⁻)를 증가시켰다. 대조군에 비해 fucoidan 처리군의 모든 농도에서 죽은 세포의 비율이 증가하였고, 현미경으로도 죽은 세포를 확연히 관찰할 수 있었다. 따라서 fucoidan은 세포사를 유도한다고 볼 수 있다. 그러나 농도가 높아져도 급격한 세포사가 일어나지는 않

았다. 그 이유로는 비장세포는 여러 종류의 세포들이 섞여 있기 때문일 것이라고 추측해 볼 수 있다. Rhodamine 123은 미토콘드리아 이중막에 축적된다[16]. 미토콘드리아 막 전위차 측정(이하 MMP)은 세포의 생존율을 간접적으로 측정할 수 있는 지표로 비장세포가 활성화되는 구간에서는 MMP가 증가하다 fucoidan 값이 증가할수록 세포사가 일어나 MMP가 감소하는 경향을 갖는 것으로 보인다. Fucoidan 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 intensity peak이 분리되는 것을 관찰할 수 있는데 죽은 세포로 인해 보이는 것으로 추정된다. Fucoidan은 비장세포에서 세포사를 야기시켰다. 그러나 농도 구배에 크게 연관된 세포사는 아니며 오히려, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 cluster를 발생시키며 약간의 면역자극 효과도 나타나는 사실을 알 수 있었다.

HL-60 세포에 fucoidan B(이하 fucoidan)를 처리하여 대사활성도를 측정하였다. Fucoidan의 농도가 높아질수록 HL-60의 대사활성도는 농도 의존적으로 감소하였다. 이 결과가 세포사에 의한 것인지, 대사활성의 감소에 의한 것인지 알아보기 위해 Annexin V-FITC/PI 염색을 하여 관찰하였다. Fucoidan의 농도가 높아질수록 죽은 세포의 비율도 함께 높아졌다는 사실을 확인할 수 있었다. 그리고 염색의 결과 late apoptosis된 세포의 비율은 fucoidan 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 가장 높았고, necrosis된 세포의 비율은 fucoidan 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 가장 높았다. 농도가 높아질수록 세포사의 시기도 빨라짐을 알 수 있었다. 대사활성 감소와 세포사 증가의 작용기전을 좀더 명확하게 알아보기 위해 미토콘드리아 막전위와 세포 내 ROS를 측정하였다. 미토콘드리아 이중막의 전위차를 측정하는 것이 세포의 생존율 혹은 안정성을 간접적으로 측정할 수 있는 기준이 되는데, 이는 세포사 이전에 이중막의 전위차가 감소하기 때문이다[17]. Rhodamine 123은 살아있는 세포에 많은 양이 축적이 되어 MMP의 intensity가 높아지는데, fucoidan 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 다른 농도와 달리 매우 낮은 값을 보였다. 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 전위차가 많이 감소된 것을 보고 세포사가 일어날 것임을 짐작할 수 있었다. ROS는 세포사를 나타나게 하는데[6], fucoidan의 농도가 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 인 경우 많은 ROS가 방출되었다. MMP와 함께 생각하면 fucoidan 20 ~ 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 HL-60 세포는 살아있으나 대조군에

비해 많은 ROS를 방출한다고 볼 수 있다. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 낮은 intensity를 보이는데, 이는 세포사가 나타나서 이미 많은 세포들이 사멸한 결과로 생각된다.

결론적으로 fucoidan은 HL-60 암세포의 대사활성을 감소시키고 세포사를 증가시켜 항암효과를 일으켰다.

Fucoidan은 면역 자극물질로 다루어져왔다. 그러나 본 연구에서는 fucoidan이 면역세포에 독성을 보일 수 있고 그 효과가 연도별이나 batch별로 다를 수 있음을 밝혔다. 또한 암세포에 대해 세포독성을 가져 항암효과를 나타냈다. 두 세포 모두에게 독성을 보이지만, HL-60 세포에서는 농도에 따라 세포독성이 나타났다. 그러나 비장 세포에서는 세포 독성이 나타나지만 농도에 따라 큰 차이를 보이지 않았다. 이는 fucoidan이 비장세포에 HL-60만큼의 독성 효과가 나타나지 않는다고 생각할 수 있다. 세포 독성이 있지만, 같은 농도에서 HL-60 세포보다 그 독성에 저항 가능할 것으로 추측된다. 그리고 fucoidan이 세포 독성을 가지지만, fucoidan 고농도에서 면역자극도 일어나는 사실을 볼 때 fucoidan을 임상적으로 사용 시 암세포에는 항암효과를 주고, 면역 세포에는 암세포만큼의 세포독성이 일어나지 않을 확률이 높다고 생각된다. 따라서 fucoidan이 항암제로 사용될 가능성이 충분하다. Fucoidan을 임상적으로 사용할 때 본 연구를 통해 얻은 결과가 유용하게 사용될 것으로 생각되지만, 임상분야에서의 적용하기 위해서는 자세한 작용 기전에 대한 규명이 필요하며 심도 있는 후속 연구가 더 필요할 것으로 판단된다.

V. 참고문헌

1. Anisimova NY, Ustyuzhanina NE, Donenko FV, Bilan MI, Ushakova NA, Usov AI, Nifantiev NE, Kiselevskiy MV. Influence of fucoidans and their derivatives on antitumor and phagocytic activity of human blood leucocytes. *Biochemistry (Mosc)*. 2015, 80, 925–933.
2. Atashrazm F, Lowenthal RM, Woods GM, Holloway AF, Karpiniec SS, Dickinson JL. Fucoidan Suppresses the Growth of Human Acute Promyelocytic Leukemia Cells In Vitro and In Vivo. *J Cell Physiol*. 2016, 231, 688–697.
3. Baracca A, Sgarbi G, Solaini G, Lenaz G. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential, evaluation of proton flux through F(0) during ATP synthesis. *Biochim Biophys Acta*. 2003, 1606, 137–146.
4. Bedner E, Li X, Gorczyca W, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. *Cytometry*. 1999, 35, 181–195.
5. Boo HJ, Hyun JH, Kim SC, Kang JI, Kim MK, Kim SY, Cho H, Yoo ES, Kang HK. Fucoidan from *Undaria pinnatifida* induces apoptosis in A549 human lung carcinoma cells. *Phytother Res*. 2011, 25, 1082–1086.
6. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2010, 48, 749–762.

7. Deitch AD, Law H, deVere White R. A stable propidium iodide staining procedure for flow cytometry. *J Histochem Cytochem.* 1982, 30, 967–972.
8. Feig C, Peter ME. How apoptosis got the immune system in shape. *Eur J Immunol.* 2007, 37, S61–70.
9. Fitton JH, Stringer DN, Karpiniec SS. Therapies from Fucoidan: An Update. *Mar Drugs.* 2015, 13, 5920–5946.
10. Hyun JH, Kim SC, Kang JI, Kim MK, Boo HJ, Kwon JM, Koh YS, Hyun JW, Park DB, Yoo ES, Kang HK. Apoptosis inducing activity of fucoidan in HCT-15 colon carcinoma cells. *Biol Pharm Bull.* 2009, 32, 1760–1764.
11. Irhimeh MR, Fitton JH, Lowenthal RM. Pilot clinical study to evaluate the anticoagulant activity of fucoidan. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2009, 20, 607–610.
12. Jang JY, Moon SY, Joo HG. Differential effects of fucoidans with low and high molecular weight on the viability and function of spleen cells. *Food Chem Toxicol.* 2014, 68, 234–238.
13. Jin JO, Song MG, Kim YN, Park JI, Kwak JY. The mechanism of fucoidan-induced apoptosis in leukemic cells: involvement of ERK1/2, JNK, glutathione, and nitric oxide. *Mol Carcinog.* 2010 49, 771–82.

14. Joo HG, Goedegebuure PS, Sadanaga N, Nagoshi M, von Bernstorff W, Eberlein TJ. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. *J Leukoc Biol.* 2001, 69(4), 555-564.
15. Ko EJ, Joo HG. Immunostimulatory effects of fucoidan on mouse splenocytes. *Lab Anim Res.* 2009, 25, 195-200.
16. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.* 1994, 84, 1415-1420.
17. Kusaykin M, Bakunina I, Sova V, Ermakova S, Kuznetsova T, Besednova N, Zaporozhets T, Zvyagintseva T. Structure, biological activity, and enzymatic transformation of fucoidans from the brown seaweeds. *Biotechnol J.* 2008, 3, 904-915.
18. Maruyama H, Tamauchi H, Iizuka M, Nakano T. The role of NK cells in antitumor activity of dietary fucoidan from *Undaria pinnatifida* sporophylls. *Planta Med.* 2006, 72, 1415-1417.
19. Maruyama H, Tamauchi H, Hashimoto M, Nakano T. Antitumor activity and immune response of Mekabu fucoidan extracted from Sporophyll of *Undaria pinnatifida*. *In Vivo*, 2003, 17, 245-249.
20. Park HS, Hwang HJ, Kim GY, Cha HJ, Kim WJ, Kim ND, Yoo YH, Choi YH. Induction of apoptosis by fucoidan in human leukemia U937 cells through activation of p38 MAPK and modulation of Bcl-2 family.

Mar Drugs. 2013 11, 2347–64.

21. **Scaduto RC Jr, Grotyohann LW.** Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J.* 1999, 76, 469–477.

22. **Tsujimoto Y, Shimizu S.** Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis.* 2007, 12, 835–840.

23. **Han Y, Joo HG.** Protective effects of fucoidan on the cell death of spleen cells induced by taxol. *J Prev Vet Med.* 2015, 39, 185–188.