

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/299507987>

# Anticancer and Antiviral Activity of Chlorine Dioxide by Its Induction of the Reactive Oxygen Species

Article in *Journal of Applied Biological Chemistry* · March 2016

DOI: 10.3839/jabc.2016.007

CITATION

1

READS

433

8 authors, including:



Jin Boo Jeong

Andong National University

85 PUBLICATIONS 1,296 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Yonggyun Kim

Andong National University

307 PUBLICATIONS 4,331 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Sunil Kumar

Andong National University

44 PUBLICATIONS 85 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Hyun Ji Eo

Andong National University

23 PUBLICATIONS 212 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Development of the functional agents for chemoprevention and chemotherapy against human diseases such as cancer, obesity, diabetes, inflammation and so on [View project](#)



Epigenetic control of DC development, DC immunotherapy [View project](#)



## Anticancer and Antiviral Activity of Chlorine Dioxide by Its Induction of the Reactive Oxygen Species

Yonggyun Kim\* · Sunil Kumar · Wonsu Cheon · Hyunji Eo · Hyeok Kwon · Yongho Jeon · Jinbo Jung · Wook Kim

### 이산화염소의 활성산소 생성 유도에 의한 항암 및 항바이러스 활성

김용균\* · 수닐쿠마르 · 천원수 · 어현지 · 권혁 · 전용호 · 정진부 · 김욱

Received: 14 June 2015 / Accepted: 4 November 2015 / Published Online: 31 March 2016  
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2016

**Abstract** Chlorine dioxide has been used for a disinfectant by exhibiting antimicrobial activity and is also potent to kill insect pests infesting stored grains. This study aimed to extend the usefulness of chlorine dioxide with respect to anticancer and antiviral activities. Cytotoxicity of chlorine dioxide was assessed against five different human cancer cell lines. Chlorine dioxide exhibited significant cytotoxicity against two breast cancer cell lines (MCF-7, MDA-MB-231) and three colorectal cancer cell lines (LoVo, HCT-116, SW-480). This cytotoxicity appeared to be associated with the capacity of chlorine dioxide to induce the production of reactive oxygen species (ROS). Compared to control insect cell lines, the cancer cell lines possessed much higher levels of ROS. On the other hand, a treatment of an antioxidant, vitamin E, significantly reduced the cytotoxicity, suggesting that the cytotoxicity was induced by high levels of ROS production. Chlorine dioxide exhibited antiviral activity against different viruses. A baculovirus, *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV), is a dsDNA insect virus and

lost its viral activity to form polyhedral viral particles in response to chlorine dioxide. The antiviral activity against AcNPV was dependent on the incubation time with chlorine dioxide. Tobacco mosaic virus is a ssRNA plant virus and was reduced in its population after exposure to chlorine dioxide along with significant decrease of viral symptoms. These results indicate that chlorine dioxide possesses anticancer and antiviral activities probably due to its inducing activity of ROS production.

**Keywords** anticancer · antiviral · chlorine dioxide · reactive oxygen species

### 서론

이산화염소( $\text{ClO}_2$ )는 염소 산화물의 일종으로 음용수의 소독 처리 및 표백제로 널리 사용되고 있다(Volk 등, 2002). 특별히 이산화염소는 일반 소독제로 사용되는 염소와 달리 암을 유발하는 trihalomethane을 생성하지 않아 비교적 안전하며(Don, 1998), 물에 대한 용해도가 높고, 액상 및 기체 상태의 제제화가 가능하여 여러 용도의 소독제로 사용 가능성을 넓히고 있다. 이산화염소는 병원성 세균 및 바이러스에 대해 넓은 항생능력을 보이고 있다. 즉, 이산화염소는 식품 오염 병원세균류(Bang 등, 2014; Sun 등, 2014), 구강 오염세균류(Taneja 등, 2014; Aung 등, 2015), 음용수 오염세균류(Vlad 등, 2014) 및 일반 식기 오염세균류(Nam 등, 2014)에 대해서 우수한 항생능력을 보였다. 특별히 여러 항생제에 대해서 내성을 보이는 세균류에 대해서 이산화염소는 기존의 차아염소산나트륨( $\text{NaClO}$ )에 비해 탁월한 항생능력을 나타냈다(Hinenoya 등, 2015). 또한 이산화염소는 수족구병을 유발하는 엔테로바이러스 71 (EV71)를 비

Y. Kim · S. Kumar · W. Cheon · H. Eo · Y. Jeon · J. Jung  
Department of Bioresource Sciences, Andong National University, Andong 760-749, Republic of Korea

H. Kwon · W. Kim  
Department of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Republic of Korea

\*Corresponding author (Y. Kim: hosanna@andong.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.

롯한 다양한 인체 병원바이러스에 대해서 항바이러스 활성을 나타냈다(Sanekata 등, 2010; Jin 등, 2013).

이산화염소를 훈증 처리가 가능한 기체 상태로 제형화하면서 사람의 주거 환경에 피해를 주는 위생해충 및 저장물에 피해를 주는 저곡해충에 대한 해충 방제 능력을 나타내고 있다. 병원 시설에 발생하는 빈대류(*Cimex lectularius*, *Cimex hemipterus*)에 대해서 비교적 높은 농도(약 1,000 ppm)의 이산화염소 노출에 대해서 속효성의 방제 효과를 나타냈으며(Gibbs 등, 2012), 저곡류를 가해하는 화랑곡나방(*Plodia interpunctella*)에 대해서는 비교적 낮은 농도(200 ppm)의 노출에서 완전방제 효과를 나타냈다(Kumar 등, 2015).

다양한 병과 해충에 대해서 항생 효과를 보이는 이산화염소의 작용기작은 아직 정확히 규명되고 있지 않다. 그러나 이 화합물이 갖는 높은 산화력은 이러한 항생능력에 대한 중심적 작용기작을 내포하고 있다. 이산화염소 노출은 방향성 아미노산류를 산화시켜 단백질의 변성을 유도하고 이를 통해 단백질의 기능을 상실하게 한다(Ogata, 2007). 예를 들어, 감기 바이러스인 influenza virus에 대해서 이산화염소는 이 바이러스가 기주의 수용체에 결합하는 데 중요한 아미노산인 153번째 트립토판을 N-formylkynurenine으로 산화시켜 기능을 잃게 한다(Ogata, 2012). 또한 이산화염소는 직접 DNA 또는 RNA의 핵산을 변화시키는 작용을 갖는 것으로 보고되고 있다(Jin 등, 2013). 최근 이산화염소가 처리된 곤충에서 활성산소(reactive oxygen species: ROS)를 다량 유발시켜 처리된 곤충의 높은 치사율을 초래한다고 발표하였다(Kumar 등, 2015). ROS는 비교적 다양한 생체분자에 영향을 줄 수 있다. 따라서 이산화염소의 ROS 발생 기능은 보다 다양한 영역의 병원체에 줄 수 있을 것으로 기대되고 있다.

본 연구는 이산화염소의 산화력을 바탕으로 유용한 응용범위를 넓혀가는 차원에서 설계되었다. 저곡해충을 방제하는 농업적 차원에서 본 연구는 비교적 정상 세포에 대해서는 안전하다(Nishikiori 등, 2008)고 알려진 이산화염소 처리를 상대적으로 암세포에 대해 항암효과를 검증함으로 의학용으로 응용범위를 기획하였다. 이를 위해 본 연구에 분석된 암세포는 유방암 2종, 대장암 3종으로 모두 5 종류의 암 세포주를 대상으로 이산화염소의 처리 효과를 검증하였다. 아울러 양잠 및 양봉 농가에서 피해를 주는 곤충바이러스와 농작물에 해를 주는 식물바이러스를 대상으로 이산화염소가 항바이러스 효과를 줄 수 있는지를 검증하여 농업적 응용범위도 확장시키려 하였다. 백콜로바이러스는 곤충에 특이적으로 바이러스병을 일으키는 이중나선형 DNA 바이러스이다(Clem과 Passarell, 2013). Tabaco mosaic virus (TMV)는 단일가닥의 RNA 바이러스로서 담배에 가장 큰 피해를 주는 바이러스이다(Scholthof, 2004). 본 연구는 이들 상이한 바이러스들에 대해서 이산화염소가 뚜렷한 항바이러스 기능 보유하고 있는지를 추적하였다.

## 재료 및 방법

**세포배양.** 대조군 세포로서 두 종류의 곤충 세포를 이용하였다. Sf9 세포주(IPLB-Sf21-AE)는 *Spodoptera frugiperda*의 번데기 난소 조직에서 유래되었으며, 5% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, Logan, UT, USA) 및 antibiotic-antimycotic 복합체 (Cat. No. 15240-062, Gibco, Grand Island, NY, USA)를 첨

가한 TC100 곤충세포배양액(Cat. No. LM505-01, Hyclone, USA)에서 배양되었다. High Five 세포주(BTI-TN-5B1-4)는 *Trichoplusia ni*에서 기원하였으며 Express Five<sup>®</sup> SFM (Cat. No. 10486-025, Gibco) 배양액으로 증식시켰다. 두 세포는 모두 25 cm<sup>2</sup> tissue culture flask (Cat. No. 156340, Nunc, Roskilde, Denmark)를 이용하여 28°C 조건에서 증식되었다.

암 세포주로서 MCF-7 (Korean Cell Line Bank (KCLB) No. 30022)과 MDA-MB-231 (KCLB No. 30026)은 인체 유방암 유래이다. 반면에 LoVo (KCLB No. 10229), HCT-116 (KCLB No. 10247), SW-480 (KCLB No. 10228)은 모두 대장암 유래이다. 이들 세포들은 모두 10% FBS와 항생제(100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin)가 포함된 Dulbecco's modified Eagle medium/F-12 (1:1, v/v)를 이용하여 배양하였다. 세포배양은 75 cm<sup>2</sup> tissue culture flask (Cat. No. 156499, Nunc)를 이용하여 37°C 및 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 이뤄졌다.

**이산화염소.** 본 연구에 이용된 이산화염소는 800 ppm의 저장용액이었다. 이 시약은 프루고팜(Suwon, Korea)에서 제공되었다.

**세포활성분석.** 세포활성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Cat. No. M-2128, Sigma-Aldrich Korea, Korea) 염색약을 이용하여 분석되었다. 처리될 세포 10,000 개/50 µL를 96 well plate 각각에 분주하였다. 이산화염소는 각 세포 배양액으로 10<sup>-9</sup>-10<sup>-3</sup> M로 희석하였으며, 각각 100 µL의 용량으로 세포 현탁액에 첨가 후 28°C에서 48 h 처리하였다. 이후 20 µL의 MTT (5 mg/mL)를 첨가하여 28°C에서 5 h 처리하였다. 이후 다시 70 µL의 25% sodium dodecyl sulfate (pH 2.0)를 첨가한 후 상온에서 16-18 h 방치하여 형성된 formagen을 용해시켰다. 이후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**활성산소(reactive oxygen species: ROS) 분석법.** ROS 정량 분석은 OxiSelect Intracellular ROS Assay Kit (Cat. No. STA-342, Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, USA)를 이용하였다. 서로 다른 배양 세포를 인산완충용액(phosphate buffered saline: PBS)으로 2회(1,000 rpm, 10분) 세척한 후 각 세포배양액으로 희석한 1× 2',7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) (20× DCFH-DA stock, Part No. 234201)를 1 mL 첨가하여 28°C에서 60분 동안 반응시켰다. 이후 세포를 상기의 방법으로 2회 PBS로 세척한 후 동일한 세포밀도(10,000개 세포)를 각 튜브에 분주하였다. 이후 상등액을 제거하고 각 세포 배양액으로 희석된 이산화염소(0-200 ppm) 용액(250 µL/well)을 첨가하고 28°C에서 90분간 반응시켰다. 반응된 세포들을 PBS로 2회 세척하고 250 µL의 세포 배양액으로 현탁시켰다. 동일한 부피(250 µL)의 2× Cell Lysis Buffer (Part No. 234203)를 첨가하고 상온에서 5분간 반응시켰다. 각 150 µL의 세포 분해물을 96 well plate (Cat. No. 167008, Nunc) 로 옮기고 480 nm 입사광과 530 nm 출력광 조건에서 형광을 측정하였다. 이 형광 수치가 형성된 ROS와 상관관계를 나타내는 지를 확인하기 위해 2',7-dichlorofluorescein (DCF) 표준액(1 mM, Cat. No. 234202)을 세포 배양액으로 희석하여 0-10 µM의 농도로 만들고, 각 75 µL의 DCF 표준용액을 동일한 세포밀도(10,000 개 세포)를 갖는 각 96 well에 처리하고 28°C에서 20분간 반응시키고 상기의 방법으로 나타나는 형광 수치를 측정하였다.

**이산화염소 세포독성에 대한 항산화제 비타민 E 효과 분석.** 비타민 E (α-tocopherol, Cat. No. 258024, Sigma-Aldrich Korea)를 dimethyl sulfoxide로 저장용액을 만들고, 이를 다시 각 세포

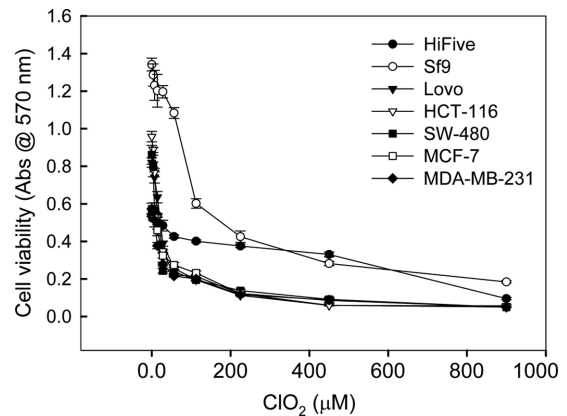
배양액으로 희석하였다. 각 반응 용액은 50 µL의 세포현탁액 (10,000개 세포), 50 µL의 이산화염소(최종농도:  $3.9 \times 10^{-6}$  M), 그리고 50 µL의 비타민 E 용액으로 구성되었고 28°C에서 48시간 처리하였다. 이후 MTT 분석법을 이용하여 세포 활성을 분석하였다.

**이산화염소의 벡칼로바이러스에 대한 항바이러스 생물검정.** 벡칼로바이러스는 *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV)를 이용하였다(Jung 등, 2006). 이 바이러스는 Sf9 세포주를 이용하여 증식하였다. AcNPV의 농도는  $5 \times 10^7$  pfu/mL이었으며, 이 바이러스 용액에 이산화염소를 200 ppm이 되도록 처리하였다. 처리된 용액을 상온에서 0-24시간 동안 반응시켰다. 처리된 바이러스 용액을 Sf9 세포에 접종하여 28°C에서 3일 동안 형성되는 핵다각체를 확인하였다. 핵다각체 수는 임의로 선택된 100개의 세포에 존재하는 핵다각체 밀도로 표현하였다. 각 처리는 3회 세포 반응으로 반복하였다.

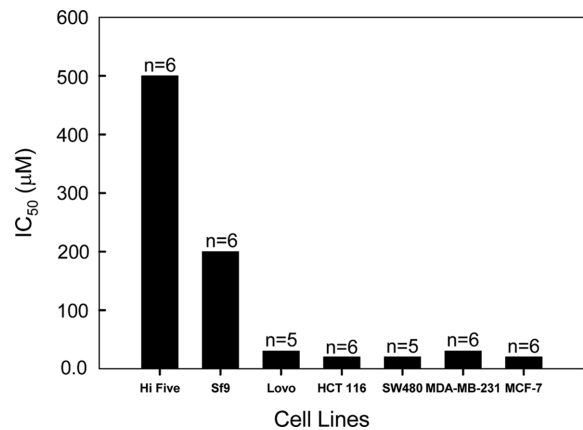
**이산화염소의 TMV에 대한 항바이러스 생물검정.** 이산화염소의 TMV에 대한 항바이러스 효과를 확인하였다. 실험에 사용한 담배는 6-8엽 정도 자란 *Nicotiana tabacum* cv. NC 82와 국부 병반을 형성하는 *N. tabacum* cv. Xanthi-NC 품종으로 6-8엽의 담배를 사용하였다. TMV는 실험실에 보관중인 균주를 동일한 품종에 접종한 뒤 병징이 발현된 잎을 이용하였다. TMV 병징이 나타나는 잎 2g을 살균수 5 mL에 마쇄하여 접종원으로 사용하였다. 이 바이러스 용액 500 µL와 이산화염소 용액 500 µL를 혼합한 후 실온( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ )에서 일정시간(0, 12, 24, 48 h) 배양하고 담배 잎에 접종하였다. TMV 감염시 전신 모자이크 병징을 나타내는 *N. tabacum* cv. NC82 품종의 하위 2번째 엽에 carborundum을 뿌려 준 뒤, 각 농도별로 희석된 TMV 즙액을 멸균된 면봉을 이용하여 접종하였다. 접종한 담배 잎의 표면의 carborundum은 흐르는 물로 씻어 낸 뒤, 25°C 식물생장상에 두어 병징을 관찰하였다. 바이러스 농도의 변화를 알아보기 위해 접종 10일 후, Cork borer (직경 6 mm)를 이용하여 각 처리구별로 동일한 양의 잎을 회수하여 DAS-ELISA 방법(Jeon 등, 2008)으로 TMV에 대한 방제효과를 확인하였다. ELISA reader (Gen5, BioTek, USA)를 이용하여 흡광도 405 nm로 측정하였다. 각 처리는 3회 반복하였다. 국부병반을 형성하는 *N. tabacum* cv. Xanthi-NC 품종은 상위 2, 3, 4번째 엽에 TMV즙액을 접종하였다. 동일한 엽내에 반은 농도별로 희석된 TMV즙액을 접종하고, 반은 살균수에 희석된 TMV즙액을 접종하는 반엽법(half leaf method)을 통해 접종을 하였다. 접종 3일 후, 잎을 3×3 cm 크기로 잘라 엽내에 형성된 병반 수를 육안 조사하여 무처리구의 병반수와 비교하여 방제가를 산출하였다.

**결 과**

**이산화염소의 암세포에 대한 세포독성.** 인체 유방암 세포주 2종과 대장암 3종에 대한 이산화염소의 세포독성이 분석되었다(Fig. 1). 이산화염소의 노출 농도가 증가함에 따라 이들 암세포의 활성이 낮아졌다. 대조군으로 곤충 세포의 경우도 이산화염소에 대한 감수성을 나타냈다. 그러나 대조군에 비해 암세포들은 현격하게 높은 감수성을 보였다. 이산화염소에 대한 중앙 억제농도(IC<sub>50</sub>)를 산출하였다(Fig. 2). 암세포주들은 약 10 ppm 이하의 IC<sub>50</sub>를 보인 반면, 대조 세포군들은 모두 100 ppm 이상을 나타냈다. 즉, 암세포주들은 일반 세포에 비해 이산화염소에



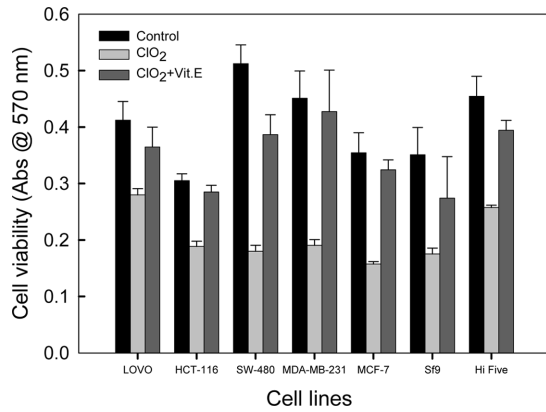
**Fig. 1** Susceptibility of cancer cell lines to chlorine dioxide (ClO<sub>2</sub>). Controls are two insect cell lines: Sf9 and High Five (HiFive). Treatments include MCF-7 and MDA-MB-231 for breast cancer cell lines and Lovo, HCT-116, SW-480 for colorectal cancer lines. Cell survival was measured by MTT assay. Each treatment was measured 8 times (8 wells) per replication and replicated two times.



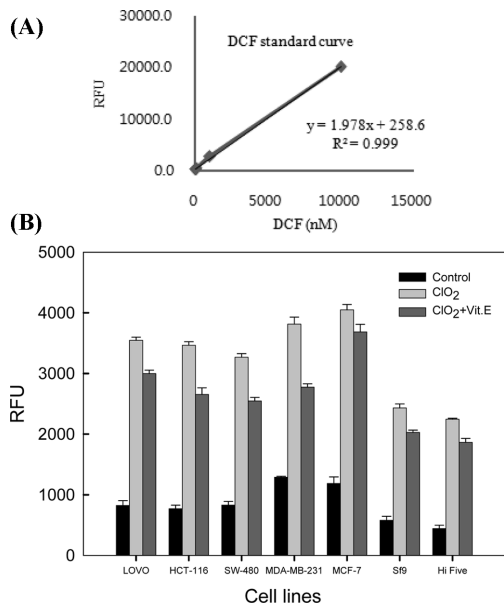
**Fig. 2** Median inhibition concentrations (IC<sub>50</sub>s) of chlorine dioxide (ClO<sub>2</sub>) against cancer cell lines. Controls are two insect cell lines: Sf9 and High Five (HiFive). Treatments include MCF-7 and MDA-MB-231 for breast cancer cell lines and Lovo, HCT-116, SW-480 for colorectal cancer lines. Cell survival was measured by MTT assay. IC<sub>50</sub>s were calculated based on the absorbance values obtained from the MTT assays using Graphpad Prism 5.00.288 program (<http://whatpulse.org/app/graphpad-prism-5-00-288>).

대해 10배 이상의 감수성을 나타내는 것으로 판명되었다.

암세포주들의 이산화염소에 대한 감수성 원인을 규명하기 위해 세포내 활성산소의 세포독성 효과를 분석하였다. 우선 항산화제인 비타민 E를 이들 세포들에 처리한 결과 이산화염소에 기인된 세포독성이 둔화되었다(Fig. 3). 이는 이산화염소에 기인된 암세포주에 대한 세포독성이 활성산소에 기인되었다는 것을 의미하였고, 이를 증명하기 위해 이산화염소 처리에 따른 세포내 활성산소 함량을 변화를 분석하였다(Fig. 4). 이산화염소에 노출되기 전에 이들 세포들 사이에는 세포내 활성산소량에 차이를 나타냈다. 암세포주들은 모두 대조세포군에 비해 높은 활성산소를 지니고 있었다. 여기에 이산화염소를 노출시킨 결과 활성산소의 발생량은 크게 증가하였고, 대조군에 비해 암세포주들은 모두 현격하게 높은 활성산소량을 발생시켰다.

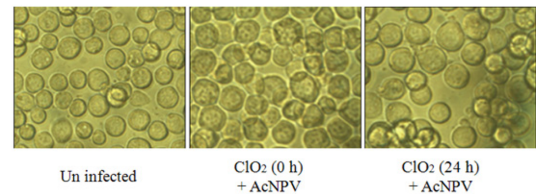
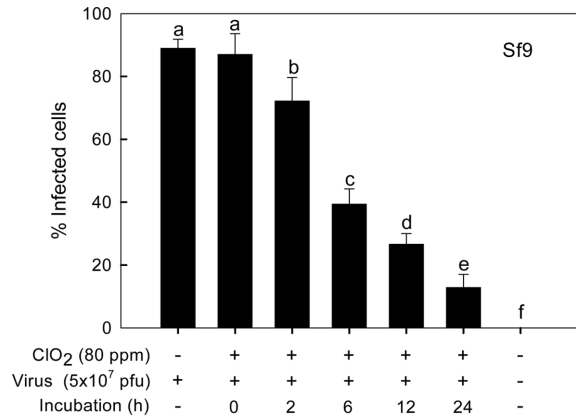


**Fig. 3** Rescue effect of vitamin E on cancer cells in response to  $3.9 \times 10^{-6}$  M of chlorine dioxide (ClO<sub>2</sub>). Controls are two insect cell lines: Sf9 and High Five ('HiFive'). Treatments include MCF-7 and MDA-MB-231 for breast cancer cell lines and Lovo, HCT-116, SW-480 for colorectal cancer lines. Cell survival was measured by MTT assay. Each treatment was measured 8 times (8 wells) per replication and replicated two times.



**Fig. 4** Up-regulation of reactive oxygen species (ROS) production in response to chlorine dioxide (ClO<sub>2</sub>) in cancer cell lines. Controls are two insect cell lines: Sf9 and High Five ('HiFive'). Treatments include MCF-7 and MDA-MB-231 for breast cancer cell lines and Lovo, HCT-116, SW-480 for colorectal cancer lines. ROS in the cells oxidized DCFH-DA into a fluorescent DCF. (A) A linear relationship between DCF amount and relative fluorescence unit (RFU) (B) Change in ROS amount in response to ClO<sub>2</sub> with or without vitamin E. Each treatment was replicated three times.

**이산화염소의 AcNPV에 대한 항바이러스 효과.** 곤충에 바이러스 병을 유발하는 백포로바이러스의 일종인 AcNPV에 대한 이산화염소의 항바이러스 효과를 분석하였다(Fig. 5). 예비 노출 실험에서 이산화염소 농도(0-800 ppm)를 증가시킬수록 Sf9 세포에서 AcNPV의 핵다각체 형성율이 감소하였다. 항바이러스 효과를 줄 수 있는 일정 AcNPV 농도(80 ppm)에서 반응 시간을 증가시킬수록 Sf9 세포에서 핵다각체 형성율이 감소하였다.



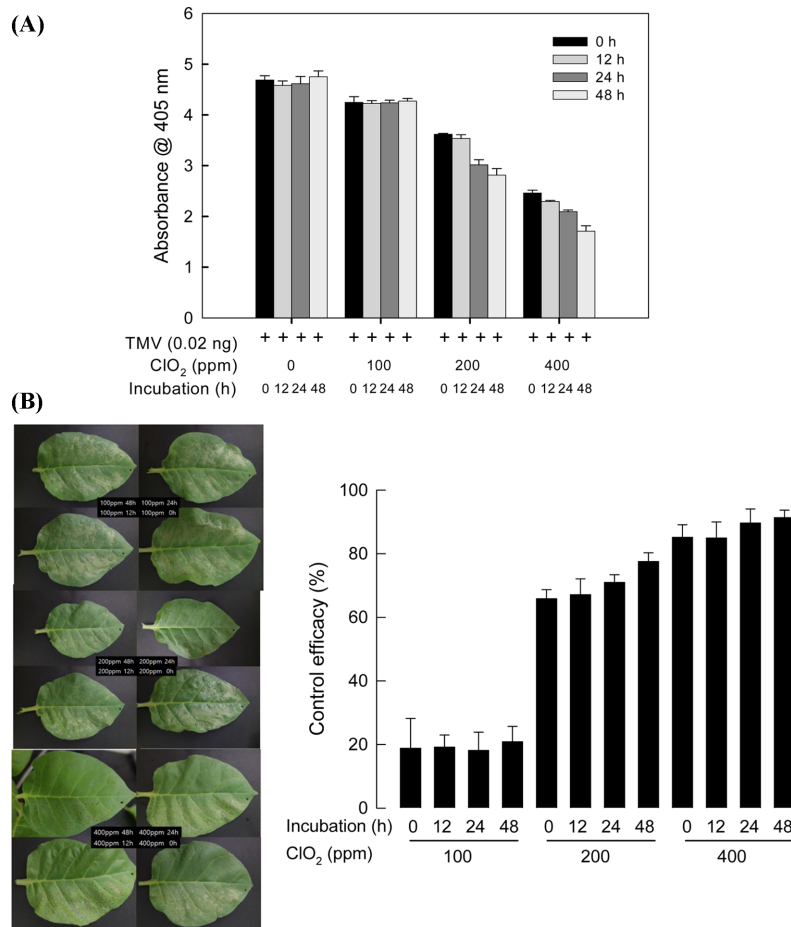
**Fig. 5** Antiviral effect of chlorine dioxide (ClO<sub>2</sub>) on polyhedrin formation of AcNPV. After incubation of AcNPV ( $5 \times 10^7$  pfu/mL) with a final concentration of 20 ppm ClO<sub>2</sub>, the virus sample was overlaid on Sf9 cells and incubated for 3 days at 28°C. Virus activity was assessed by counting polyhedra formed in the cells. Each treatment was replicated three times.

**이산화염소의 TMV에 대한 항바이러스 효과.** 식물바이러스에 대한 이산화염소의 항바이러스 효과를 확인하였다(Fig. 6). TMV에 대한 이산화염소의 항바이러스 효과는 400 ppm에서 가장 높은 억제력을 보였다. 이산화염소 400 ppm에서 TMV를 48시간 동안 처리한 후 담배에 접종한 결과 84.9%의 바이러스 밀도 감소 효과를 보였으며, 200 ppm에서 48시간 처리구에서 54.1%의 바이러스 억제 효과를 보였었다(Fig. 6A). 국부병반을 형성하는 *N. tabacum* cv. Xanthi-NC 품종에 대한 방제효과를 확인하였다(Fig. 6B). 이산화염소 처리 농도 증가에 따라 TMV 병징이 크게 줄어들었으나( $F=591.69$ ;  $df=2, 39$ ;  $p<0.0001$ ), 바이러스를 담배잎에 접종하기 전에 이산화염소와 반응하는 시간은 큰 영향을 주지 않았다( $F=1.96$ ;  $df=9, 39$ ;  $P=0.0733$ ) (Fig. 6B).

**고찰**

이산화염소는 높은 산화력으로 생체막을 구성하는 지질과 단백질 구조를 변경시켜 다양한 미생물에 대해서 높은 독성을 발휘하는 것으로 알려지고 있다(Huang 등, 1997; Gordon과 Rosenblatt, 2005). 특별히 생체 내에서 이산화염소는 활성산소의 생성을 유발하여 살충효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다(Kumar 등, 2015). 본 연구는 이러한 이산화염소의 독성을 항암효과와 항바이러스 효과를 규명하는 데 초점을 두었다.

여러 암 세포주에 대해서 이산화염소 처리는 높은 세포독성을 발휘하였다. 두 종류의 지방암 세포주와 3종의 대장암 세포주에 대해서 이산화염소는 일반 대조 세포에 비해 10배 이상 높은 세포독성을 주었다. 이러한 세포독성은 이산화염소가 생성하는 활성산소에 기인한 것으로 보인다. 왜냐하면 항산화제인



**Fig. 6** Antiviral effect of chlorine dioxide (ClO<sub>2</sub>) on TMV. (A) ELISA test using a method described by Jeon et al. (2008). Each treatment was replicated three times. (B) TMV symptom on tobacco leaves. Each leaf was halved into control (virus+PBS, lower half) and treatment (virus+ClO<sub>2</sub>, upper half).

비타민 E를 처리하면, 이러한 세포독성 효과가 감소하는 데에서 뒷받침된다. 또한 세포 내 활성산소를 측정 한 결과 암 세포 주들은 모두 높은 활성산소를 유지하였고, 이산화염소 처리에 따라 이러한 활성산소 생산이 증가되어 대조구에 비해 현격하게 높은 활성산소 함량을 보였다. 이렇게 높게 상승된 활성산소는 암 세포에 대해서 높은 세포독성을 유발하는 주요 원인으로 제공되었을 것으로 사료된다. 다양한 비수술 암 치료법은 암 세포의 활성산소 수준을 높여서 세포괴사 또는 세포자연치사를 유발하는 전략을 포함하고 있다(Yang 등, 2014). 암세포는 비교적 높은 활성산소 수준을 유지한다(Sullivan과 Chandel, 2014). 이 높은 활성산소에 대해서 암세포 자신을 방어하기 위해 NF-E2-related factor 2 (Nrf2) 전사인자를 이용하여 항산화효소 발현을 유도하게 된다(Thimmulappa 등, 2002; Hayes 등, 2010). 따라서 이 전사인자의 무력화는 암세포로 하여금 활성산소에 대해서 보다 감수성으로 전환시키게 된다(Choi 등, 2014). 이산화염소 처리가 활성산소의 생성은 물론이고 자신의 높은 산화력으로 Nrf2 신호과정에 관여하는 단백질을 변형시킬 가능성이 있다. 이산화염소에 대한 높은 감수성을 보이는 암 세포들의 반응을 이해하려면 Nrf2에서 비롯된 활성산소의 방어체계에 대한 이산화염소의 효과 분석이 뒤따라야 한다. 본 연구는 이산화염

소의 암세포에 대한 세포독성이 활성산소의 증가에 기인되었다는 것을 최초로 보고하고 있다.

높은 산화력을 보유하는 이산화염소는 상이한 두 종류의 바이러스에 대해서 항바이러스 효과를 나타냈다. 백콜로바이러스는 dsDNA 계통을 지닌 곤충병원성 바이러스로서 핵다각체를 발현하여 다수의 비리온을 포함한 봉입체 구조를 이뤄 광학현미경으로도 검경이 가능하다. 이 바이러스의 활성이 이산화염소 처리 시간 증가에 따라 억제되는 것을 본 연구는 밝히고 있다. 또한 ssRNA 바이러스로서 식물병원성인 TMV도 이산화염소에 대해서 활성 억제를 보였다. 앞에서 언급하였듯이 다양한 인체 병원바이러스에 대해서 이산화염소는 항바이러스 기작을 발휘하였다. 이러한 이산화염소의 항바이러스 기작은 바이러스 외피 단백질을 변형시키거나 핵산에 대해서 직접 영향을 주는 것으로 밝혀지고 있다(Ogata, 2012; Jin 등, 2013). TMV 단일 식물바이러스 병에 의해서만 전세계적으로 매년 10억 달러의 경제적 피해를 주고 있다(Wu 등, 1995). 따라서 본 연구는 농업에 주요 피해를 끼치는 두 종의 바이러스에 대해서 이산화염소는 항바이러스 효과를 발휘하는 방제 인자로서의 응용성을 보여주고 있다.



## 초 록

이산화염소는 높은 항생효과로 살균제로 사용되고 있고, 저극해충을 대상으로 살충 효과도 보이고 있다. 본 연구는 이 이산화염소의 유용 효과를 넓히기 위해 이 물질이 항암 및 항바이러스 활성을 나타낼 수 있는지를 검증하였다. 인체에 나타나는 5종의 암 세포주에 대해서 이산화염소의 세포독성을 분석하였다. 유방암 2종 세포주(MCF-7, MDA-MB-231)와 대장암 3종 세포주(LoVo, HCT-116, SW-480) 모두에 대해서 이산화염소는 높은 세포 독성을 나타냈다. 이러한 세포독성은 이산화염소의 활성산소 유발 효과에 기인된다. 이산화염소가 처리된 암세포주는 모두 세포내 높은 활성산소를 형성하였다. 이는 대조군으로서 일반 곤충 세포주와 비교하여 훨씬 높은 활성산소를 지녔다. 반면에 항산화제인 비타민 E를 처리하면 이러한 세포독성이 크게 줄어 암 세포에 대해 높은 세포독성은 활성산소에 의해 기인되었다는 것을 입증하였다. 또한 이산화염소는 서로 다른 바이러스에 대해서 항바이러스 활성을 나타냈다. 곤충병원성 바이러스이고 이중 가닥의 DNA 게놈을 지닌 백칼로바이러스의 일종인 *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV)는 이산화염소 노출에 따라 활성을 잃어 핵다각체 형성 능력이 크게 둔화되었다. AcNPV에 대한 이산화염소의 항바이러스 효과는 반응 시간에 비례하여 증가했다. 식물병원성 바이러스이고 단일가닥의 RNA 게놈을 지닌 담배모자이크바이러스는 이산화염소 노출에 따라 바이러스 함량이 줄었고, 담배에 대한 병원력도 낮아졌다. 따라서 본 연구는 이산화염소가 항암 및 항바이러스 활성을 지니며, 이는 이 물질에 의한 높은 활성산소 유발에 기인된 것으로 판명되었다.

**Keywords** 이산화염소 · 항바이러스 · 항암 · 활성산소

**감사의 글** 본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술평가원의 농생명산업기술개발사업(114063-03)으로부터 지원을 받아 연구되었다.

## References

- Aung EE, Ueno M, Zaitu T, Furukawa S, and Kawaguchi Y (2015) Effectiveness of three oral hygiene regimes on oral malodor reduction: a randomized clinical trial. *Trials* **16**, 31.
- Bang J, Hing A, Kim H, Beuchat LR, Rhee MS, Kim Y et al. (2014) Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in biofilm on food-contact surfaces by sequential treatments of aqueous chlorine dioxide and drying. *Int J Food Microbiol* **191**, 129–34.
- Choi B, Ryoo I, Kang HC, and Kwak M (2014) The sensitivity of cancer cells to pheophorbide a-based photodynamic therapy is enhanced by NRF2 silencing. *PLoS One* **9**, e107158.
- Clem RJ and Passarell AL (2013) Baculoviruses: sophisticated pathogens of insects. *PLoS Pathog* **9**, e1003729.
- Don G (1998) The chlorine dioxide handbook. *Am Water Works Assoc*, 3–4.
- Gibbs SG, Lowe JJ, Smith PA, and Hewlett AL (2012) Gaseous chlorine dioxide as an alternative for bedbug control. *Infect Control Hosp Epidemiol* **33**, 495–9.
- Gordon G and Rosenblatt AA (2005) Chlorine dioxide: the current state of the art. *Ozone Sci Eng* **27**, 203–7.
- Hayes JD, McMahon M, Chowdhry S, and Dinkova-Kostova AT (2010) Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the Keap1-Nrf2 pathway. *Antioxid Redox Signal* **13**, 1713–48.
- Hinenoya A, Awasthi SP, Yasuda N, Shima A, Morino H, Koizumi T et al. (2015) Chlorine dioxide is a superior disinfectant against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Jpn J Infect Dis*, in press.
- Huang J, Wang L, Nanqi R, and Junli H (1997) Disinfection effect of chlorine dioxide on bacteria in water. *Wat Res* **31**, 607–13.
- Jeon YH, Kim JH, and Kim YH (2008) Involvement of heat-stable and proteinaceous materials in the culture of *Pseudomonas putida* JB-1 for the inhibition of tobacco mosaic virus infection. *Plant Pathol. J* **24**, 328–36.
- Jin M, Shan J, Chen Z, Guo X, Shen Z, Qiu Z et al. (2013) Chlorine dioxide inactivation of enterovirus 71 in water and its impact on genomic targets. *Environ Sci Technol* **47**, 4590–7.
- Jung S, Kwoen M, Choi JY, Je YH, and Kim Y (2006) Parasitism of *Cotesia* spp. enhances susceptibility of *Plutella xylostella* to other pathogens. *J Asia Pac Entomol* **9**, 255–63.
- Kumar S, Park J, Kim E, Na J, Chun YS, Kwon H et al. (2015) Oxidative stress induced by chlorine dioxide as an insecticidal factor to the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* *Pesti Biochem Physiol*, in press.
- Nam H, Seo HS, Bang J, Kim H, Beuchat LR, and Ryu JH (2014) Efficacy of gaseous chlorine dioxide in inactivating *Bacillus cereus* attached to and in a biofilm on stainless steel. *Int J Food Microbiol* **188**, 122–7.
- Nishikiori R, Nomura Y, Sawajiri M, Masuki K, Hirata I, and Okazaki M (2008) Influence of chlorine dioxide on cell death and cell cycle of human gingival fibroblasts. *J Dent* **36**, 993–8.
- Ogata N (2007) Denaturation of protein by chlorine dioxide: oxidative modification of tryptophan and tyrosine residues. *Biochemistry* **46**, 4898–911.
- Ogata N (2012) Inactivation of influenza virus haemagglutinin by chlorine dioxide: oxidation of the conserved tryptophan 153 residue in the receptor-binding site. *J Gen Virol* **93**, 2558–68.
- Sanekata T, Fukuda T, Miura T, Morino H, Lee C, Maeda K et al. (2010) Evaluation of the antiviral activity of chlorine dioxide and sodium hypochlorite against feline calicivirus, human influenza virus, measles virus, canine distemper virus, human herpesvirus, human adenovirus, canine adenovirus and canine parvovirus. *Biocontrol Sci* **15**, 45–9.
- Scholthof KB (2004) Tobacco mosaic virus: a model system for plant biology. *Annu Rev Phytopathol* **42**, 13–34.
- Sullivan LB and Chandel NS (2014) Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer Metab* **2**, 17.
- Sun X, Bai J, Ference C, Wang Z, Zhang Y, Narciso J et al. (2014) Antimicrobial activity of controlled-release chlorine dioxide gas on fresh blueberries. *J Food Prot* **77**, 1127–32.
- Taneja S, Mishra N, and Malik S (2014) Comparative evaluation of human pulp tissue dissolution by different concentrations of chlorine dioxide, calcium hypochlorite and sodium hypochlorite: an *in vitro* study. *J Conserv Dent* **17**, 541–5.
- Thimmulappa RK, Mai KH, Srisuma S, Kensler TW, and Yamamoto M (2002) Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res* **62**, 5196–203.
- Vlad S, Anderson WB, Peldszus S, and Huck PM (2014) Removal of the cyanotoxin-a by drinking water treatment processes: a review. *J Water Health* **12**, 601–17.
- Volk CJ, Hofmann R, Chauret C, Gagnom GA, Ranger G, and Andrews RC (2002) Implementation of chlorine dioxide disinfection: effects of the treatment change on drinking water quality in a full-scale distribution system. *J Environ Eng Sci* **1**, 323–30.
- Wu YF, Cao R, Wei NS, and Zhou GH (1995) Screening and application of biological pesticides virus. *World Agr* **5**, 35–6.
- Yang W, Zou L, Huang C, and Lei Y (2014) Redox regulation of cancer metastasis: molecular signaling and therapeutic opportunities. *Drug Dev Res* **75**, 331–41.