

해산 극피동물 중의 당단백질의 특성과 이용 II. 해삼당단백질과 황산콘드로이친의 항돌연변이 및 항암효과

문정혜 · 류홍수[†] · 양훈석 · 서재수*

부경대학교 식품생명과학과

*고신대학교 식품영양학과

Antimutagenic and Anticancer Effects of Glycoprotein and Chondroitin Sulfates from Sea Cucumber(*Stichopus japonicus*)

Jeung-Hye Moon, Hong-Soo Ryu[†], Hoon-Suk Yang and Jae-Soo Suh*

Dept. of Food and Life Science, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

*Dept. of Food and Nutrition, Kosin University, Pusan 606-701, Korea

Abstract

The antimutagenic and anticancer activities of glycoprotein(GP) and chondroitin sulfate(CS) from sea cucumbers were studied using Ames mutagenicity test and human cancer cells culture test. The GP's inhibitory effect toward aflatoxin B₁(AFB₁) and 3, 2'-dimethyl-4-amino-biphenyl(DMAB) increased with the higher added concentrations up to 5% level(w/w) regardless fractionation methods. The GP from sea cucumbers through DEAE-cellulose column chromatography showed an inhibitory effect ranged from 84 to 98%, and the maximum antimutagenicities resulted in red sea cucumber with 98% (AFB₁) and 95%(DMAB). But 5% level of CS from various sea cucumbers had an inhibitory effect toward those both indirect mutagens ranged from 79% to 85%. However, in case of direct mutagens(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG and 4-nitroquinoline-1-oxide, 4-NQO), the GP's inhibitory effect was 55~78% and the CS had a low inhibitory effect(58~70%) at the added level of 5%. The GP from sea cucumbers exhibited the strong inhibitory effects with 89~95% and 82~92% on the growth of HT-29 human carcinoma cells and AZ-521 human gastric cancer cells(at 5% level).

Key words: sea cucumber, glycoproteins, chondroitin sulfates, antimutagenicity, anticancer effect

서 론

식품에 존재하는 발암물질 및 돌연변이 유발성 물질의 유형에는 천연식품 자체에 존재하는 물질, 식품의 저장, 가공 및 조리에서 생성되는 물질과 살충제, 농약, 또는 식품첨가물과 같은 화학물질의 세 범주가 있다(1). 현재 암치료에 이용되고 있는 요법들로는 화학요법, 방사선요법 및 외과적 수술요법들이 있으며, 이들은 부작용이 강하고 생체방어에 중요한 역할을 담당하고 있는 lymph세포, 골수세포 등을 암세포보다 훨씬 강하게 파괴시켜 체내의 암세포 뿐만 아니라 다른 감염증에 대한 저항력까지 약화시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 이러한 합성약품의 부작용과 독성이 밝혀짐에 따라 천연

물로부터의 의약품개발을 위한 연구가 진행되어 동식물에서 유래되는 생물학적 활성을 나타내는 천연물이 유용한 의약품으로서, 또는 약제를 합성할 수 있는 초기물질로서 찾으려는 노력이 계속되고 있다. 식품 중에는 이들 발암물질 및 돌연변이 유발물질 뿐만 아니라 항돌연변이물질과 항암효과의 물질도 상당량 존재하는데(2), 우리나라에서도 옛부터 한방 및 식용으로 이용되어온 균류(3-6) 및 각종 식물류로부터 분리한 단백질, 당체획분 등이 항암활성과 면역기능을 증가시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다(7-13). 또한, 해양동물, 해양미생물 및 해조류에서 추출한 당단백질도 항암활성 및 항돌연변이 효과를 나타낸다고 알려져 있는데(14-20) 헛감과 건제품으로 가공되어 식용되고 있는 해삼은 민

[†]To whom all correspondence should be addressed

간요법에서는 인체의 단핵세포와 거식세포의 탐식능력을 제고시켜 면역기능을 왕성하게하고 상처치료에 효과가 있는 것으로 권장되고 있다(21). 그러나 해삼에 대한 식품영양학적연구는 비교적 활발하게 이루어져 있으나(22-34), 두족류 및 극피동물 등 이용도가 낮은 해양식량자원 중에 존재하는 당단백질의 항돌연변이와 항암효과와 같은 생리활성에 관한 연구는 거의 찾아보기 힘들다. 따라서 본 연구에서는 전보(35)에 이어 해삼육의 주요성분인 당단백질과 황산콘드로이친의 항돌연변이 및 항암세포증식억제 효과를 확인하기 위해 간접돌연변이원으로 알려진 aflatoxin B₁(AFB₁) 및 3, 2'-dimethyl-4-aminobiphenyl(DMAB)과 직접돌연변이원인 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG) 및 4-nitroquinoline-1-oxide(4-NQO)에 대한 돌연변이 유발억제 효과와 사람의 위암세포인 AZ-521와 사람의 결장암세포인 HT-29의 성장억제 효과에 관하여 검토하였다.

재료 및 방법

시료

실험재료인 당단백질 및 황산콘드로이친은 전보(34)에서와 같이 Bayliss 등(36)의 방법과 矢部 등(37)의 방법으로 추출하여 사용하였다.

돌연변이 유발물질

간접돌연변이원으로는 aflatoxin B₁(AFB₁), 3, 2'-dimethyl-4-amino-biphenyl(DMAB)을 Sigma Chemical Co.(USA)에서 구입하여 spectrophotometric dimethylsulfoxide(DMSO, Aldrich Chemical Co., USA)에 녹여서 실험에 사용하였다. 직접돌연변이원으로는 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG), 4-nitroquinoline-1-oxide(4-NQO)를 사용하였는데, 이들은 Aldrich Chemical Co.(USA)에서 구입하여 MNNG는 증류수에, 4-NQO는 95% ethanol에 녹여서 실험에 사용하였다.

항돌연변이유발실험

Ames의 방법(38)에 따라 항돌연변이실험을 하였는데 실험균주는 *Salmonella typhimurium* TA100으로서 실험 전에 histidine 요구성 실험, Rfa 특성검정, UV 감수성 실험 및 R factor 존재 등의 유전형질을 확인한 후 사용하였다. 항돌연변이실험을 위한 S9 mixture, 배지 및 필요한 시약의 조제는 Maron과 Ames(39) 및

Kim (40)의 방법에 따랐으며, Matsushima 등(41)의 방법으로 돌연변이유발실험을 하였다. 한편, 실험에 사용된 당단백질과 황산콘드로이친, 그리고 AFB₁, DMAB, MNNG, 4-NQO와 같은 돌연변이유발물질의 농도는 Maron과 Ames(39)의 방법에 따라 toxicity test를 하여 실험계에서 독성을 나타내지 않는 범위의 농도에서 실험하였다.

세포배양실험

세포배양을 위해 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM), fetal calf serum(FCS), fetal bovine serum(FBS), 0.05% trypsin/0.02% EDTA, 그리고 100 units/ml penicillin-streptomycin을 GIBCO사(USA)로부터 구입하여 사용하였고, 세포배양은 CO₂ incubator를 사용하였다. 실험에 사용된 암세포는 사람의 대장암 세포인 HT-29(human colon carcinoma cell)는 고려대학교 의과대학 생화학교실에서, 사람의 위암세포인 AZ-521(human gastric cancer cell)은 Japanese cancer research resources bank(JCRB)-cell bank(일본, 동경)로부터 분양받아 배양하면서 사용하였다. HT-29(42, 43)와 AZ-521 암세포는 100units/ml의 penicillin streptomycin과 10%의 fetal calf serum(FCS : Gibco Lab., USA)이 함유된 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM : Gibco Lab., USA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양 중인 세포는 일주일에 3번 refeeding하고 일주일 후 phosphate buffered saline(PBS)에 0.05% trypsin/0.02% EDTA를 녹인 용액으로 부착된 세포를 떼어내고 일주일마다 계대배양하면서 실험에 사용하였다. 암세포를 24 well plate에 well당 15,000cells/ml의 농도로 분주하여 하룻밤 배양하였다. 세포가 plate에 부착되었을 때 배양액을 버리고 10% FCS가 함유된 배지에 시료를 첨가하여 2일 간격으로 배양액을 교체하면서 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양 6일 후에 증식된 세포를 PBS로 세척한 뒤 0.05% trypsin/0.02% EDTA효소로 분리하여 각 세포수를 hemocytometer로 측정하여 대조군과 비교하여 암세포 성장억제 효과를 관찰하였다(44,45).

결과 및 고찰

당단백질과 황산콘드로이친의 항돌연변이원성 효과

간접돌연변이원에서의 항돌연변이원성 효과

Aflatoxin B₁(AFB₁)은 *Aspergillus flavus*과 *Aspergillus parasiticus*에 의해 생성되는 2차 대사물질로서 잠

재적인 hepatotoxin이다. 이 AFB₁은 *in vitro* 돌연변이 실험에서 뿐만 아니라 동물실험에서도 강력한 발암원으로 검증되었으며 aflatoxin 화합물 중에서도 돌연변이 유발성이 가장 큰 것으로 알려져 있다. AFB₁의 경우 간접돌연변이원으로 쥐의 간 추출물의 microsomal fraction의 mixed function oxidase에 의해 AFB₁-2, 3-epoxide가 될 때 활성화되어 최종 돌연변이원으로 작용하여 DNA, 또는 RNA와 결합한다고 알려져 있다(46). 동결건조 해삼분말에서 DEAE-cellulose ion exchange chromatography로 분획한 당단백질 및 황산콘드로이친의 *Salmonella typhimurium* TA100균주에 대해 예비 실험한 결과 5% 농도까지 독성을 나타내지 않았으므로 AFB₁와 DMAB도 5%농도까지 항돌연변이효과를 조사하여 Table 1, 2에 나타내었다. 한편, Sephadex G-50 gel filtration으로 분획하여 280nm와 470nm(phenol-황산법)에서 활성이 있는 희분만 모아 동결건조시킨 당단백질에 대해서도 AFB₁과 DMAB에 대한 항돌연변이효과를 조사하여 DEAE-cellulose ion exchange chromatography로 분획한 당단백질과 비교하였다. 그 결과, 모든 시료에서 농도에 비례하여 항돌연변이효과가 컸으며, 특히 DEAE-cellulose ion exchange chromatography로 붉은색 해삼에서 분획한 당단백질이 AFB₁에 대하여 5% 농도에서 98%의 높은 항돌연변이효과가 관찰되었고, 검은색 해삼의 경우에도 95%, 푸른색 해삼은 85%의 항돌연변이효과를 나타내었으며, DMAB에 대해서도 붉은색 해삼에서 추출한 당단백질이 95%로 가장 효과가 컸고, 검은색 해삼은 91%, 푸른색 해삼은 88%의 항돌연변이효과를 나타내었다. 한편, Sephadex G-50 gel filtration으로 추출한 당단백질은 AFB₁의 경우에도 5% 농도에서 87%(푸른색 해삼), 88%(붉은색 해삼)과 86%(검은색 해삼)로 거의 비슷한 항돌연변이효과를 나타내었는데 DMAB에 대해서는 검은색 해삼에서 추출한 당단백질이 92%로 가장 컸으며, 붉은색 해삼은 87%, 푸른색 해삼은 84%로 DEAE-cellulose ion exchange chromatography로 추출한 당단백질보다 효과가 작았다. 또한, 해삼의 황산콘드로이친의 AFB₁과 DMAB에 대한 항돌연변이효과는 Table 3에 나타내었는데 시료의 종류에 관계없이 항돌연변이효과가 컸으며 특히, 5% 농도에서 붉은색 해삼과 검은색 해삼에서 추출한 황산콘드로이친이 AFB₁과 DMAB에 대해 82% 이상의 항돌연변이효과를 나타내었다. 한편, 해삼물에 대한 항돌연변이효과에 대한 연구는 해조류의 추출물에 대해 Ryu 등(47)이 미역, 다시마, 곰피, 청각, 파래, 김의 항돌연변이효과에 대해 보고하였는데, AFB₁, MeIQ, Trp-p-2에 대해 실험한 결과, 미역, 다시마, 곰피가 돌

Table 1. Effect of glycoproteins¹⁾ from sea cucumbers on the mutagenicity induced by aflatoxin B₁(AFB₁) in *Salmonella typhimurium* TA100²⁾

Treatment	Concentration (%)	Revertant/plate	Inhibition rate(%)
Control(AFB ₁)		950±18	
Spontaneous		117±04	
AFB ₁ +DG1	1	750±17	24
	2	400±13	66
	5	242±04	85
AFB ₁ +DG2*	1	825±12	18
	2	523±17	53
	5	134±03	98
AFB ₁ +DG3**	1	867±17	18
	2	551±08	55
	5	211±02	95
AFB ₁ +SG1	1	733±15	26
	2	425±12	63
	5	225±02	87
AFB ₁ +SG2*	1	782±14	23
	2	419±11	65
	5	221±07	88
AFB ₁ +SG3**	1	850±13	20
	2	577±11	52
	5	287±03	86

¹⁾DG1: Glycoproteins from blue sea cucumber fractionated by DEAE-cellulose column chromatography
 DG2: Glycoproteins from red sea cucumber fractionated by DEAE-cellulose column chromatography
 DG3: Glycoproteins from black sea cucumber fractionated by DEAE-cellulose column chromatography
 SG1: Glycoproteins from blue sea cucumber fractionated by Sephadex G-50 gel filtration
 SG2: Glycoproteins from red sea cucumber fractionated by Sephadex G-50 gel filtration
 SG3: Glycoproteins from black sea cucumber fractionated by Sephadex G-50 gel filtration

²⁾The values are 3 replicates±S.D.

*980±15, 117±11 **1020±31, 168±19

The first values are revertants/plate from the control of AFB₁ and the seconds are spontaneous revertants/plate, respectively.

연변이원의 활성은 크게 억제한다고 하였으며, Yasuji 등(48)과 Okai 등(49)도 미역, 툫, 다시마의 열수추출물이 돌연변이 활성을 억제한다고 하였다. 이와같이 해조류 중의 당단백질 및 다당류의 항돌연변이효과에 관한 연구들과 버섯류(3-6), 채소류(7-13, 50-54)의 추출물들이 항돌연변이에 큰 효과가 있다는 연구가 많이 있다. 그러나, 극피동물인 해삼에 관한 항돌연변이효과에 관한 연구는 찾아 볼 수 없는 실정으로 해삼 당단백질과 황산콘드로이친이 AFB₁와 DMAB와 같은 간접돌연변이원에 대해 강한 항돌연변이효과를 나타내는 것으로 보아 이들에 존재하는 활성성분은 AFB₁과 DMAB를 최종 발암원으로 활성화하는 효소를 억제함으로써 항

Table 2. Effect of glycoproteins¹⁾ from sea cucumbers on the mutagenicity induced by 3,2'-dimethyl-4-amino-biphenyl(DMAB) in *Salmonella typhimurium* TA100²⁾

Treatment	Concentration (%)	Revertant/plate	Inhibition rate(%)
Control(DMAB)		950±18	
Spontaneous		117±04	
DMAB + DG1	1	750±11	24
	2	484±05	56
	5	217±09	88
DMAB + DG2*	1	756±12	26
	2	531±20	52
	5	160±03	95
DMAB + DG3**	1	816±12	24
	2	475±03	64
	5	245±02	91
DMAB + SG1	1	717±22	28
	2	375±11	69
	5	250±18	84
DMAB + SG2*	1	807±17	20
	2	497±09	56
	5	229±11	87
DMAB + SG3**	1	867±11	18
	2	560±17	54
	5	236±03	92

¹⁾Same as Table 1.

²⁾The values are 3 replicates±S.D.

*980±15, 117±11 **1020±31, 168±19

The first values are revertants/plate from the control of DMAB and the seconds are spontaneous revertants/plate, respectively.

Table 3. Influence of chondroitin sulfate from sea cucumbers on the mutagenicity induced by AFB₁, DMAB as indirect mutagens in *Salmonella typhimurium* TA100¹⁾

Treatment	Concentration (%)	Revertant/plate	Inhibition rate(%)
Control		1012±31	
Spontaneous		123±17	
Blue + AFB ₁	1	665±15	39
	5	310±04	79
DMAB	1	630±03	43
	5	310±02	79
Red + AFB ₁	1	629±12	43
	5	274±03	83
DMAB	1	550±11	52
	5	283±09	82
Black + AFB ₁	1	576±12	49
	5	256±11	85
DMAB	1	568±08	50
	5	274±17	83

¹⁾The values are 3 replicates±S.D.

돌연변이효과를 나타낼 것으로 추정된다고 하였다.

직접돌연변이원에서의 항돌연변이원성 효과

N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)는 *Salmonella typhimurium* TA1535, TA100에 대한, 4-nitroquinoline-1-oxide(4-NQO)는 TA1535, TA-100, TA1538 및 TA98에 대한 대표적인 diagnostic mutagen으로서 이들의 활성화에 S9 mixture의 activation을 필요로 하지 않는 직접돌연변이원이다. MNNG는 강력한 돌연변이 유발물질로 MNNG, 혹은 그 동족체인 N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(ENNG)의 투여에 의해 쥐의 선위에서 암을 발생시킬 수 있기 때문에 위암연구에 많이 이용되고 있으며, 이것의 발암작용은 핵산의 알킬화와 같은 DNA염기배열에 이상을 일으키는 유전적인 작용과 단백질의 아미노산의 니트로아미노화 등의 DNA 유전정보 발현에 이상을 일으키는 것과 같은 기전에 관여된다고 한다(55,56). 해삼의 당단백질과 황산콘드로이친을 직접돌연변이원인 MNNG와 4-NQO에 대한 항돌연변이효과를 검토하였다. Table 4에서 보는 바와 같이 당단백질에서 직접돌연변이원인 MNNG의 항돌연변이효과가 관찰되었고, 특히 검은색

Table 4. Influence of glycoproteins¹⁾ from sea cucumbers on the mutagenicity induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG) in *Salmonella typhimurium* TA100²⁾

Treatment	Concentration (%)	Revertant/plate	Inhibition rate(%)
Control(MNNG)		950±18	
Spontaneous		117±04	
MNNG + DG1	1	758±15	23
	2	567±21	46
	5	350±11	72
MNNG + DG2*	1	825±14	18
	2	618±17	42
	5	445±11	62
MNNG + DG3**	1	875±31	17
	2	688±17	39
	5	381±11	75
MNNG + SG1	1	867±15	10
	2	617±17	40
	5	434±07	62
MNNG + SG2*	1	937±16	05
	2	574±13	47
	5	359±11	72
MNNG + SG3**	1	901±11	14
	2	730±13	34
	5	449±11	67

¹⁾Same as Table 1.

²⁾The values are 3 replicates±S.D.

*980±15, 117±11 **1020±31, 168±19

The first values are revertants/plate from the control of MNNG and the seconds are spontaneous revertants/plate, respectively.

해삼에서 DEAE-cellulose ion exchange chromatography로 추출한 당단백질이 5% 농도에서 푸른색 해삼이 72%, 붉은색 해삼이 62%, 흑삼이 75%로 나타났다. 한편, Sephadex G-50 gel filtration에 의해 추출한 당단백질에 대한 항돌연변이효과는 푸른색 해삼이 62%, 붉은색 해삼과 검은색 해삼이 72%와 67%로 나타나 DEAE-cellulose ion exchange chromatography로 추출한 경우보다 낮은 항돌연변이효과를 나타내었다. 4-NQO에 대한 항돌연변이효과는 Table 5에서와 같이 DEAE-cellulose ion exchange chromatography로 추출한 검은색 해삼이 5% 농도에서 78%로 가장 컸었고, 푸른색 해삼과 붉은색 해삼이 68%와 69%로 비슷하였으며, Sephadex G-50 gel filtration에 의해 추출한 당단백질은 검은색 해삼이 5% 농도에서 68%로 가장 컸으며 푸른색 해삼과 붉은색 해삼이 각각 55%와 68%로 간접돌연변이원에 대해서 보다는 효과가 낮았다. Table 6은 해삼에서 추출한 황산콘드로이친의 직접돌연변이원인 MNNG와 4-NQO에 대한 항돌연변이가 관찰되었는데 5% 농도에서 푸른색 해삼이 70%와 66%, 붉은색 해삼이 58%와 60%, 검은색 해삼이 69%와 70%의 항돌연변

Table 5. Effect of glycoproteins¹⁾ from sea cucumbers on the mutagenicity induced by 4-nitroquinoline-1-oxide(4-NQO) in *Salmonella typhimurium* TA100²⁾

Treatment	Concentration (%)	Revertant/plate	Inhibition rate(%)
Control(4-NQO)		950±18	
Spontaneous		117±04	
4-NQO+DG1	1	825±10	15
	2	583±17	44
	5	384±11	68
4-NQO+DG2*	1	894±14	10
	2	687±13	34
	5	385±07	69
4-NQO+DG3**	1	807±16	25
	2	705±13	37
	5	355±04	78
4-NQO+SG1	1	892±18	07
	2	692±13	31
	5	492±05	55
4-NQO+SG2*	1	902±13	09
	2	600±17	44
	5	420±13	65
4-NQO+SG3**	1	867±17	18
	2	722±18	35
	5	441±06	68

¹⁾Same as Table 1.

²⁾The values are 3 replicates±S.D.

*980±15, 117±11 **1020±31, 168±19

The first values are revertants/plate from the control of 4-NQO and the seconds are spontaneous revertants/plate, respectively.

Table 6. Effect of chondroitin sulfate from sea cucumbers on the mutagenicity induced by MNNG and 4-NQO as direct mutagens in *Salmonella typhimurium* TA100¹⁾

Treatment	Concentration (%)	Revertant/plate	Inhibition rate(%)
Control		1012±31	
Spontaneous		123±05	
Blue+MNNG	1	630±18	43
	5	390±17	70
4-NQO	1	648±20	41
	5	425±13	66
Red+MNNG	1	710±12	34
	5	496±17	58
4-NQO	1	736±18	31
	5	479±03	60
Black+MNNG	1	683±18	37
	5	399±12	69
4-NQO	1	710±25	34
	5	390±17	70

¹⁾The values are 3 replicates±S.D.

이성을 각각 나타내었으나 당단백질에서와 같이 간접돌연변이원에 대해서 보다는 효과가 다소 낮았다. 이와 같이 항돌연변이성이 MNNG와 4-NQO와 같은 직접돌연변이원에 대한 효과보다 AFB₁과 DMAB와 같은 간접돌연변이원에 대한 항돌연변이효과가 보다 큰 것은 이들 당단백질과 황산콘드로이친의 항돌연변이원이 간의 microsomal enzyme의 활성화에 관여하여 간접돌연변이원이 최종 돌연변이 물질로의 전환을 억제함으로써 항돌연변이효과를 나타낼 것으로 여겨진다(7-9,54).

해삼 당단백질의 암세포 성장저해효과

HT-29 대장암 세포에 대한 효과

동결건조해삼분말에서 DEAE-cellulose ion exchange chromatography로 분획하여 얻은 당단백질을 사람의 대장암세포인 HT-29에 1%, 2%, 5%의 농도로 첨가하여 암세포 성장저해효과를 검토한 결과 푸른색 해삼이 각각 69%, 79%와 95%, 붉은색 해삼이 87%, 88% 및 92%, 검은색 해삼이 77%, 90%와 94%의 성장억제 효과를 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 또한, Sephadex G-50 gel filtration으로 추출한 당단백질도 같은 농도로 첨가하였을 때 푸른색 해삼이 75%, 85%와 93%, 붉은색 해삼이 68%, 82%와 92%, 검은색 해삼이 62%, 78%와 89%의 성장억제효과를 나타내었다. 한편, 조(57)는 HT-29 인체 결장암 세포에 대해서 미역귀가 86%의 성장억제를, 다시마, 툫, 김, 미역도 70%이상의 성장억제효과를 보였는데 이것은 특히 해조류 속의 sulfated polysaccharide인 fucoidan(갈조류)과 carageenan(홍조)이

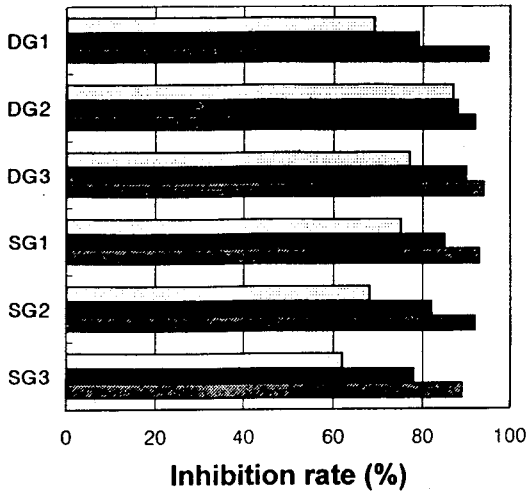


Fig. 1. The inhibitory effect of various concentrations of glycoproteins¹⁾ from sea cucumbers on the growth of HT-29 human colon carcinoma cells after 6 days of incubation at 37°C.

¹⁾ Same as Table 1.
 □ 1%, ■ 2%, ▨ 5%

colon carcinogenesis에 대한 저해효과가 있는 것으로 여겨지고 있으며 그 기작에 대해서는 아직 밝혀져 있지 않다고 하였다.

AZ-521 위암세포에 대한 효과

사람의 위암세포인 AZ-521에 동결건조해삼분말에서 추출한 당단백질을 HT-29에서와 같은 농도로 첨가

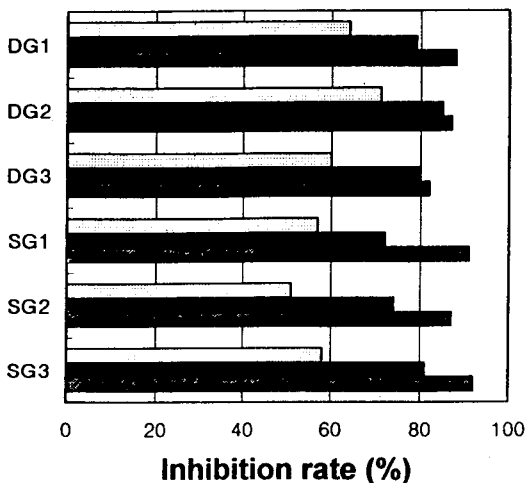


Fig. 2. The inhibitory effect of various concentrations of glycoproteins¹⁾ from sea cucumbers on the growth of AZ-521 human gastric cancer cells after 6 days of incubation at 37°C.

¹⁾ Same as Table 1.
 □ 1%, ■ 2%, ▨ 5%

하여 암세포 성장저해효과를 검토하여 Fig. 2와 같은 결과를 얻었다. 푸른색 해삼이 64~88%, 붉은색 해삼이 71~87%, 검은색 해삼이 60~82%의 성장저해를 각각 보였고, Sephadex G-50 gel filtration으로 추출한 당단백질은 푸른색 해삼이 57~91%, 붉은색 해삼이 51~87%, 검은색 해삼은 58~92%의 암세포 성장억제효과를 관찰할 수 있었다. 이러한 실험결과로부터 해삼에서 추출한 당단백질이 위암과 대장암 발생과 관련되어 사용된 발암원에 대한 저해효과가 컸으며 사람의 위암세포성장에도 관여하여 암세포의 성장을 크게 억제하는 것으로 나타났다. 특히, sulfate를 함유하는 polysaccharide(다당류의 함량이 매우 높아 다당류로 알려져 있으나, 단백질이 peptide 결합으로 연결되어 있음)로 알려져 있는 갈조류의 fucoidan, 홍조류의 carageenan이 colon carcinogenesis에 대한 저해효과가 있으며 또한, gram양성 유산균의 세포벽도 peptidoglycan으로 N-acetylglucosamine과 N-acetyl muramic acid분자로 구성되어 있는데 해삼 당단백질과 유사한 구조를 가지고 있는데 이들도 항돌연변이 또는 항암활성을 가질 것으로 추정되며, 이러한 사실로 미루어 해삼의 당단백질도 sulfate를 함유하고 있어 colon carcinogenesis에 대한 저해효과가 있었던 것으로 짐작되나 그 기작은 아직 밝혀지고 있지않은 실정이다(55,58-60). Bogdanov 등(61)은 *L. bulgaricus*의 세포벽의 peptidoglycan이 종양생성을 억제하는 것을 발견하였는데 이 peptidoglycan은 *Lactobacilli*의 세포벽을 구성하는 인자이며 이는 muramyl peptide로 구성되어 있기 때문에 젖산균이 사멸된 것이던, 생균이던 관계없이 종양을 억제하게 되는 것이라 하겠다. Muramyl dipeptide와 그 유도체는 세포성 중계 면역에 관여하는데 이를 처리한 대식세포는 *in vivo*와 *in vitro*에서 superoxide anion과 H₂O₂를 생성하여 암세포를 사멸한다고 알려져 있다. 그리고 *L. plantarum*의 세포벽성분 중 muramic acid에 phosphodiester결합으로 polysaccharide가 결합되어 있는 상태의 세포벽 성분이 복수암 및 고형암에 대해 항암효과가 있다고 하였다. 그리고 이 유산균 세포벽 물질 중에서는 glycopeptide 부분보다는 다당류 분획이 암억제효과에 중요한 역할을 하며 이 경우 복수암보다 고형암에 대한 억제효과가 크다고 하였다(62).

요 약

해삼에서 추출한 당단백질과 황산콘드로이친의 간접돌연변이원(AFB₁, DMAB)과 직접돌연변이원(MN-NG, 4-NQO)에 대한 돌연변이 유발성 및 human colon

carcinoma cell(HT-29)과 human gastric cell(AZ-521)의 성장에 미치는 저해효과를 검토하였다. 추출 황산콘드로이친과 당단백질의 항돌연변이효과는 해삼종류와 분획방법에 관계없이 1~5% 범위내에서 농도의 증가에 따라 강한 항돌연변이효과를 나타내었다. 5% 수준의 당단백질과 황산콘드로이친은 AFB₁과 DMAB에 대하여 84%~98% 및 79~85%의 저해효과를 보였고, 이 중 DEAE-cellulose ion exchange chromatography로 분획한 붉은색 해삼 중의 당단백질의 저해효과가 가장 높았다(98%). 이에 반해 직접돌연변이원인 MNNG와 4-NQO에 대하여서는 같은 5% 수준에서 각각 55~78%와 58~70%의 비교적 낮은 저해율을 보였다. 추출 당단백질의 암세포 성장저해효과에서도 해삼의 종류와 분획방법에 관계없이 5%까지 농도증가에 따라 결장암세포인 HT-29의 성장을 89~95%까지 저해시키는 항암효과를 나타내었고, AZ-521의 위암세포는 82~92%까지 성장을 억제시켰다.

감사의 글

이 연구는 1996년도 교육부 해양/수산과학분야 학술연구조성비의 연구비지원에 의한 결과의 일부이며 이를 감사드립니다.

문헌

- Sugimura, T. and Sato, S. : Mutagens-carcinogens in foods. *Cancer Res.(Suppl.)*, **43**, 2415(1983)
- Renner, H. W. : *In vivo* effect of single or combined dietary antimutagens on mutagens-induced chromosomal aberrations. *Mutat. Res.*, **244**, 185(1990)
- 강창울, 심미자, 최웅철, 이영남, 김병각 : 한국산 담자균류의 항암성분에 관한 연구. 만년버섯의 균사배양 및 항암성분. *한국생화학회지*, **14**, 101(1981)
- 정경수, 김병각 : 노랑치마아재비버섯의 항암성분에 관한 연구. *서울대학교 약학논문집*, **10**, 1(1985)
- 문창규, 이수환, 목명수, 김대욱 : 구름버섯의 항암성 다당류분획(Copolang)이 마우스의 면역기능에 미치는 영향에 관한 연구. *약학회지*, **31**, 126(1987)
- 김성환, 김을상, 김영식 : 영지버섯에서 분리한 항암성 다당체에 관한 연구. *한국영양식량학회지*, **24**, 147(1995)
- 박건영, 이경임, 이숙희 : 녹황색 채소류의 돌연변이 유발억제 및 AZ-521 위암세포의 성장저해효과. *한국영양식량학회지*, **21**, 149(1992)
- 김소희 : 씀바귀 추출물들의 돌연변이 유발억제 및 MG-63 암세포 성장저해효과. *한국영양식량학회지*, **24**, 305(1995)
- 최영현, 김은영, 박건영, 이숙희, 이원호 : 어성초즙 및 추출물의 항돌연변이효과. *한국영양식량학회지*, **23**, 916(1994)
- 박건영 : 김치의 영양학적 평가와 항돌연변이 및 항암효과. *한국영양식량학회지*, **24**, 169(1995)
- Kim, S. H., Park, K. Y., Suh, M. J. and Chung, H. Y. : Effect of garlic(*Allium sativum*) on glutathione S-transferase activity and the level of glutathione in the mouse liver. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **23**, 436(1994)
- Kweon, Y. M., Rhee, S. H. and Park, K. Y. : Antimutagenic effects of juices from the peppers in *Salmonella* assay system. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **24**, 440(1995)
- Yamaguchi, T. : Inhibitory activity of heat treated vegetables and indigestible polysaccharides on mutagenicity. *Mutation Research*, **284**, 205(1992)
- 奥谷康一 : イカ甲骨の抗腫瘍性物質について - I. 試料の調製と抗腫瘍活性. *日本水産學會誌*, **42**, 449(1976)
- Okutani, K. : Further investigation of the antitumor activity of the squid internal shell. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, **48**, 421(1982)
- Okutani, K. : Antitumor and immunostimulant activities of polysaccharide produced by a marine bacterium of the Genus *Vibrio*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, **50**, 1035(1984)
- Sasaki, T., Uchida, N. A., Takasuka, N., Tachibana, Y., Nakamichi, K., Endo, Y. and Kamiya, H. : Antitumor activity and immunomodulatory effect of glycoprotein fraction from scallop *Patinopecten yessoensis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**, 267(1987)
- Ryu, B. H., Chi, B. H., Kim, D. S. and Ha, M. S. : Desmutagenic effect of extracts obtained from seaweeds. *Bull. Korean Fish Soc.*, **19**, 502(1986)
- 류병호, 지봉호, 김동석, 장미경, 김혜성, 정수자 : *Vibrio arguillarm*로부터 추출한 당단백질의 항암활성. *한국식품위생학회지*, **3**, 111(1988)
- 이영숙, 김동석, 류병호, 이성호 : 파래와 곤피에서 추출한 당단백질의 sarcoma-180 cell에 대한 항암효과 및 면역활성. *한국영양식량학회지*, **21**, 544(1992)
- 안덕균 : 신 동의보감. 열린책들, p.456(1996)
- Tanikawa, E. : Studies on the nutritive value of the meat of sea cucumber(*Stichopus selenka*). *Bull. Trac. Fish Hokkaido Univ.*, **5**, 338(1954)
- Tanikawa, E. : Studies on the protein of the meat of sea cucumber(*Stichopus Japonicus[selenka]*). *Mem. Fac. Fish Hokkaido Univ.*, **3**, 1(1955)
- Tanikawa, E., Akiba, M., Ishiko, H. and Yoshitani, S. : Studies on the post-mortem changes in the chemical constitution of the meat of sea cucumber(*Stichopus japonicus[selenka]*). *Mem. Fac. Fish Hokkaido Univ.*, **5**, 28(1958)
- 元廣輝重 : 水産物の糖蛋白に關する研究 - I. ナマコおよびフシコより糖蛋白の分離抽出について. *日本水産學會誌*, **26**, 1171(1960)
- Albano, R. M. and Mourao, P. A. S. : Presence of sulfated glycans in ascidian tunic and in the body wall of a sea cucumber. *Biochimica et Biophysica Acta*, **760**, 192(1983)
- Mourao, P. A. S. and Bastos, I. G. : Highly acidic glycans from sea cucumbers. Isolation and fractionation of fucose-rich sulfated polysaccharides from the body wall of *Ludwigothurea grisea*. *Eur. J. Biochem.*, **166**, 639(1987)

28. Li, J. Z. and Lian, E. C. Y. : Aggregation of human platelets by acidic mucopolysaccharide extracted from *Stichopus japonicus Selenka*. *Thrombosis & Haemostasis*, **59**, 435(1988)
29. Vieira, R. P. and Mourao, P. A. S. : Occurrence of a unique fucose-branched chondroitin sulfate in the body wall of a sea cucumber. *The Journal of Biological Chemistry*, **263**, 18176(1988)
30. Vieira, R. P., Mulloy, B. and Mourao, P. A. S. : Structure of a fucose-branched chondroitin sulfate from sea cucumber. *The Journal of Biological Chemistry*, **266**, 13530(1991)
31. Vieira, R. P., Pedrosa, C. and Mourao, P. A. S. : Extensive heterogeneity of proteoglycans bearing fucose-branched chondroitin sulfate extracted from the connective tissue of sea cucumber. *Biochemistry*, **32**, 2254(1993)
32. Kariya, Y., Watabe, S., Hashimoto, K. and Yoshida, K. : Occurrence of chondroitin sulfate E in glycosaminoglycan isolated from the body wall of sea cucumber(*Stichopus japonicus*). *The Journal of Biological Chemistry*, **265**, 5081(1990)
33. Chang-Lee, M. V., Price, R. J. and Lampila, L. E. : Effect of processing on proximate composition and mineral content of sea cucumber(*Parastichopus* spp.). *Journal of Food Science*, **54**, 567(1989)
34. 문정혜, 류홍수, 유병진, 문수경 : 해삼당단백질의 물리화학적 특성과 식이효과. *한국영양식량학회지*, **25**, 240(1996)
35. 류홍수, 문정혜, 서재수 : 해산극피동물 중의 당단백질의 특성과 이용. 1. 해삼당단백질 및 황산콘드로이친의 화학조성과 특성. *한국영양식량학회지*, **26**, 72(1997)
36. Bayliss, M. T., Venn, M. M. and Ali, S. Y. : Structure of proteoglycan from different layers of human articular cartilage. *Biochemical J.*, **209**, 387(1983)
37. 矢部芳枝, 二宮降博, 栢場英明, 辰濃降, 岡田太郎 : 食品中に添加したコンドロイチン硫酸ナトリウロの分析法. *食衛誌*, **28**, 13(1987)
38. Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. : Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **31**, 347(1975)
39. Maron, D. M. and Ames, B. N. : Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **113**, 173(1983)
40. Kim, S. H., Park, K. Y. and Suh, M. J. : Mutagenicity of N-nitrosodimethylamine in *Salmonella*/microsome assay and the effect of vitamin C on the formation of N-nitrosodimethylamine. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **20**, 260(1991)
41. Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. : Factors modulating mutagenicity in microbial test. In "Short-term test systems for detecting carcinogens" Norphth, K. H. and Garner, R. C.(eds.), Springer, Berlin, p.273(1980)
42. Huang, M. T., Chang, R. L., Wood, A. W., Newmark, H. L., Saylor, J. M., Yagi, H., Jerina, D. M. and Conney, A. H. : Inhibition of mutagenicity of bay-region diol-epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by phenolic plant flavonoids. *Carcinogenesis*, **4**, 1631(1983)
43. Cecile, R. E., Keding, M. and Haffen, K. : Modulation of HT-29 human colonic cancer cell differentiation with calmidazolium and 12-0 tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res.*, **48**, 6173(1988)
44. Hayflick, L. and Moorhead, P. : The serial cultivation of human diploid strains. *Exp. Cell Res.*, **25**, 585(1961)
45. Isove, N. N., Senn, J. S., Ill, J. E. and McCulloch, E. A. : Colony formation by normal and leukemic human marrow cells in culture. *Blood*, **37**, 1(1971)
46. Hsieh, D. D. H., Wong, J. J. Z. A., Michas, C. and Ruebner, B. H. : In "Origins of human cancer" Haiatt, H. H., Watson, J. D. and Winstein, J. A.(eds.), Cold Spring Harbor Lab., Book B, p.697(1979)
47. Ryu, B. H., Cho, B. H., Kim, D. S. and Ha, M. S. : Desmutagenic effect of extracts obtained from seaweeds. *Bull. Korean Fish. Soc.*, **19**, 502(1986)
48. Yasuji, O. and Kiyoka, H. O. : Identification of antimutagenic activities in the extract of an edible brown alga, *Hijikia fusiforme*(Hijiki) by *umu* gene expression system in *Salmonella typhimurium*(TA 1535/pSK 1002). *J. Sci. Food Agric.*, **66**, 103(1994)
49. Okai, Y., Okai, K. H. and Nakamura, S. : Identification of heterogenous antimutagenic activities in the extract of edible brown seaweeds, *Laminaria japonica*(Mak-onbu) and *Undaria pinnatifida*(Wakame) by the *umu* gene expression system in *Salmonella typhimurium*(TA1535/pSK1002). *Mutation Research*, **303**, 63(1993)
50. Kim, Y. S., Kang, K. S. and Kim, S. I. : Study on anti-tumor and immunomodulating activities of polysaccharide fractions from Panax ginseng : Comparison of effects of neutral and acidic polysaccharide fraction. *Arch. Pharm. Res.*, **13**, 330(1990)
51. 김석중, 진재순, 김동만, 김길환 : 무릅의 돌연변이 억제 효과 및 그 특성. *한국식품과학회지*, **24**, 193(1992)
52. Yamaguchi, T. : Inhibitory activity of heat treated vegetables and indigestible polysaccharides on mutagenicity. *Mutation Research*, **284**, 205(1992)
53. Obaseiki-Ebor, E. E., Odukoya, K., Telikepalli, H., Mitscher, L. A. and Shankel, D. M. : Antimutagenic activity of extracts of leaves of four common edible vegetable plants in Nigeria(West Africa). *Mutation Research*, **302**, 109(1993)
54. 문숙희 : 감일의 항돌연변이 및 항암효과. 부산대학교 대학원 박사학위논문(1994)
55. Anderson, W. : The antipeptic activity of sulfated polysaccharides. *J. Pharm. Pharmacol.*, **13**, 139(1961)
56. 정자준 : 발암연구에 있어서 동물실험모델. *생화학뉴스*, **8**, 231(1989)
57. 조은주 : 미역(*Undaria pinnatifida*)(귀)의 *in vitro* 항돌연변이, 함발암 및 항암효과. 부산대학교 대학원 석사학위논문(1996)
58. Wilson, R. B., Hutcheson, D. P. and Wideman, L. : Dimethyl hydrazine induced colon tumors in rats fed diets containing beef fat or corn oil with and without wheat bran. *Am. J. Clin. Nutr.*, **30**, 176(1977)
59. Yamamoto, I., Takahashi, M., Tamura, E., Maruyama, H. and Mori, H. : Antitumor activity of edible marine algae : effect of crude fucoidan fractions prepared from

- edible brown seaweed against L-1210 leukemia. *Hydrobiologia*, **116**, 145(1984)
60. Suzuki, Y., Yamamoto, I. and Umezawa, I. : Antitumor effect of seaweed. Partial purification and the antitumor effect of polysaccharides from *Laminaria angustata* Kjellman var. *Longissima* Miyabe. *Chemotherapy*(Tokyo), **28**, 165(1986)
61. Bogdanov, I. G., Dalev, P. G., Gurevich, A. L., Kolosov, M. N., Mal'kova, V. P., Plemynnikova, L. A. and Sorokina, I. B. : Antitumor glycopeptides from *Lactobacillus bulgaricus* cell wall. *FEBS Lett*, **57**, 259(1975)
62. Penn, R. L., Maca, R. D. and Berg, R. D. : Increased translocation of bacteria from the gastrointestinal tracts of tumor bear mice. *Infect. Immunology*, **47**, 793(1985)

(1997년 12월 27일 접수)