

## 수산물 및 수산 발효식품의 암세포 억제효과

임현수 · 김수현 · 유은정 · 강동수<sup>1</sup> · 최명락 · 송상호\*

여수대학교 생물공학과  
<sup>1</sup>여수대학교 식품영양학과

### Anticancer Effect of Extracts from the Marine and Salted Fish Products.

Hyun-Soo Lim, Su-Hyun Kim, Eun-Jeong Yoo, Dong-Soo Kang<sup>1</sup>, Myeong-Rak Choi and Sang-Ho Song\*

Dept. of Biotechnology, Yosu National University, Yosu 550-749, Korea

<sup>1</sup>Dept. of Food science and nutrition, Yosu National University, Yosu 550-749, Korea

#### Abstract

This study was performed to observe the cytotoxic effect of the various salted fish extracts against cancer cell line, human hepatocellular carcinoma (HepG2) using MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) method. *Urechis unicinctus* was the strongest cytotoxic effects among any other traditional salted fish products. The growth inhibition ratio of *Urechis unicinctus* hot-water extracts was 94.5% at the concentration of 1000 $\mu$ g/ml. On the other hand, in case of salted fish methanol extracts, salt-fermented shad gizzard was showed the strongest cytotoxic effects. The growth inhibition ratio of salt-fermented shad gizzard methanol extracts was investigated 90% at the concentration of 1000 $\mu$ g/ml.

**Key words** – Anticancer effect, HepG2, *Urechis unicinctus*, salt-fermented shad gizzard, MTT assay

#### 서 론

암은 주로 산업이 발달한 나라들의 주요 사망 원인의 하나로 현대 의학의 발달에도 불구하고 여전히 치료가 어려운 질병의 하나로 여겨지고 있고, 90% 이상이 물리적 환경 혹은 화학물질에 노출됨으로서 발생되며 이러한 요인 중 40~60%는 식이와 관련된다고 보고 있다[4]. 이와 관련하여 최근 식이와 관련된 암의 원인 물질을 검색하는 연구가 활발히 진행되고 있을 뿐 아니라 일상에서 섭취하는 식품 중에서 항암제로 이용하기 위한 물질이 탐구되고 있다[13]. 현

재 임상에서 널리 사용되고 있는 항암제의 대부분은 합성 물질들로 부작용이 심하여 문제가 되고 있다. 이로 인해 최근 세계적으로 부작용이 적으면서 유효한 항암제를 개발하기 위해 천연 산물을 대상으로 항암성 테스트를 시도하고 있다[5,7]. 최근에는 육상생물에 비해 연구가 많이 이루어지지 않던 해양생물에 대한 관심이 높아지면서 해양동물, 해조류, 해양미생물등에서의 생리활성에 관한 연구가 당단백질과 다당류를 중심으로 활발히 진행되고 있다. 해양생물을 이용한 전통 발효식품인 젓갈은 어패류의 근육, 내장 또는 생식소 등을 원료로 하여 다량의 식염을 첨가한 후 장기간 발효, 숙성시킨 발효식품으로서 제품마다 각기의 독특한 맛과 향이 있어 예로부터 우리의 식생활에서 빼놓을 수 없는 주요한 자리를 차지해 오고 있다. 이러한 것

\*To whom all correspondence should be addressed  
Tel. 061-659-3301, Fax · 061-659-3306  
Email : shSong@info.yosu.ac.kr

같은 생선에 소금을 넣어 일정기간 동안 숙성시킨 것으로 단백질이 풍부할 뿐만 아니라 분해되어 생긴 글루타민산, 핵산, 등으로 인해 젓갈 특유의 감칠맛을 내어 특히 소화 가 잘되고 식욕을 돋구어 주며 갈습과 지방질 공급원이기도 한 우리 고유의 전통 발효식품이다. 또한 식해는 생선에 밥과 소금을 섞어 숙성시킴으로써 자연 발효로 생긴 유산에 의해 생선의 부패를 억제한 식품으로 지역에 따라 고춧가루, 엿기름 또는 누룩을 곁들이기도 한다[3,11,16]. 이러한 다양한 맛 및 영양성분을 함유하여서 여러 가지 생리 활성이 예상되지만 아직도 연구는 미진한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 항암효과와 같은 생리활성이 거의 이루어지고 있지 않은 해양생물 및 이를 이용한 젓갈 및 식해의 항암활성에 대해 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료

본 실험에 사용한 재료 중 아가미젓(Salt-fermented gill), 창란젓(Salt-fermented pollack tripe), 갈치속젓(Salt-fermented hair-tail viscera), 조개젓(Salt-fermented clam), 전어밤젓(Salt-fermented shad gizzard), 꼴뚜기젓(Salt-fermented sea-arrow), 오징어젓(Salt-fermented squid), 새우젓(Salt-fermented small shrimp)은 1999년 4월 전남 여수 시내에 위치한 쇼핑센터에서 4℃에서 보관되어 있는 제품을 구입하였고, 개불(*Urechis unicinctus*)은 여수시 소재 잠수기조합에서 구입하였다. 토하젓(Salt-fermented Toha shrimp)은 대인물산에서 구입했으며, 가자미식해(Flounder Sikhae), 멸치식해(Anchovy Sikhae), 명태식해(Alaska pollack Sikhae), 오징어식해(Squid Sikhae)는 강릉에서 구입하였고, 헤시코(Hesico)는 1999년 6월 일본 후쿠이현 오바마시의 수산시장에서 구입하여 실험에 사용하였다.

### 시료 추출

시료의 추출은 1차 추출로서 수용성분을 대부분 용출할 수 있는 열수 추출과 지용성 성분을 포함하는 methanol 추출법을 사용하였다. 열수 추출은 시료 20g에 200ml의 증류수를 첨가하여 100℃에서 30분간 가열 후 Whatman No.4 여과지로 여과한 뒤 추출물은 12,000rpm에서 15분 간 원심분리 후 상등액을 제 여과하여 투석하였다. 각 추출물들은

동결건조 시킨 후 냉동고에서 보관하면서 사용하였다. methanol 추출은 시료 20g에 methanol 100ml를 가하여 실온에서 추출한 뒤 이 조작을 3회 반복하고 추출액은 vacuum evaporator로 농축한 후 투석하고 동결건조하여 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

### 사용 암세포주 및 배양

동물세포 배양에 사용한 동물세포주는 인체 간암세포인 HepG2(cells derived from Hepatocellular carcinoma, ATCC HB-8065)를 분양 받아 실험에 사용하였다. 세포는 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco Co., U.S.A)가 함유된 RPMI 1640배지에 20mM HEPES buffer를 첨가하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> Incubator(Vision Scientific Co., LTD, Model VS-9011C)에서 배양 하였다. 배양세포는 일주일에 2~3번 refreezing하고 7~8일만에 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 부착한 세포를 떼어내고 분할하여 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

### MTT assay를 사용한 암세포 성장 억제 효과 실험

동물세포에 대한 시료의 세포독성을 측정하기 위하여 MTT assay[2,12]를 실시하였다. MTT assay는 생존 암세포의 효소활성을 측정하는 것으로 세포들을 96 well plate에  $1 \times 10^4$  cells/well 이 되게 200 $\mu$ l씩 분주하여 부착시킨 후 시료를 일정 농도로 제조하여 20 $\mu$ l씩 첨가한 뒤 37℃, 5% CO<sub>2</sub> Incubator에서 72시간 배양하였다. 여기에 FBS가 첨가되지 않은 RPMI 1640 medium으로 5mg/ml의 농도로 제조한 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 용액을 20 $\mu$ l씩 첨가하고, 동일한 배양조건에서 4시간 더 배양하였다. 4시간 후에 상정액을 제거하고, 각 well당 0.1% isopropanol을 150 $\mu$ l첨가하여 30분간 배양한 후 570nm에서 Microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였고, 성장억제효과(Growth inhibitory effect(%)) = [(대조구의 흡광도 - 시료처리구의 흡광도) / 대조구의 흡광도]  $\times$  100를 구하여 death ratio(%)로 나타내었다[1].

## 결과 및 고찰

수산물 및 수산 발효식품의 열수 추출물 첨가에 의한 항암효과

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium

bromide(MTT) 분석법은 살아있는 세포 내 미토콘드리아의 dehydrogenase에 의해서 생성되는 formazan을 spectrophotometer를 이용하여 측정함으로써 세포에 대한 독성을 조사하는 방법으로서, 각종 항암제에 대한 *in vitro* 세포독성에 관한 연구에서 사용되어온 dye exclusion test나 [<sup>3</sup>H]-thymidine uptake assay와 비교 시 실험 조작이 매우 간편하고 재현성이 우수하여 세포독성여부 대량검색이나 초기 검색단계에 적당한 방법으로 많이 이용되고 있다. 세포독성은 비특이적 방어기전으로서 암세포에 직접적으로 손상을 줄 뿐만 아니라 동물 생체내 림프구나 대식세포와 같이 표적세포에 대하여 세포독성효과를 나타내는 작동세포를 자극함으로써 그 세포독성효과를 항진시키는 것으로 보고되어 있다[6]. 그러므로, 본 연구에서는 MTT assay로 것갈 종류별 시료를 최종농도(0 $\mu$ g, 63 $\mu$ g, 125 $\mu$ g, 250 $\mu$ g, 500 $\mu$ g, 1000 $\mu$ g/ml)별로 각각 조제하여 HepG2 인체 간암세포의 생존저해 효과를 알아 보았는데, 이중 암세포에 대한 독성효과가 더 이상 크게 증가하지 않는 농도인 500 $\mu$ g/ml을 선택하여 여러 종류의 것갈에 대한 세포독성효과를 Fig. 1에 나타내었다. 개불은 79.3%로 가장 높은 세포독성효과를 나타

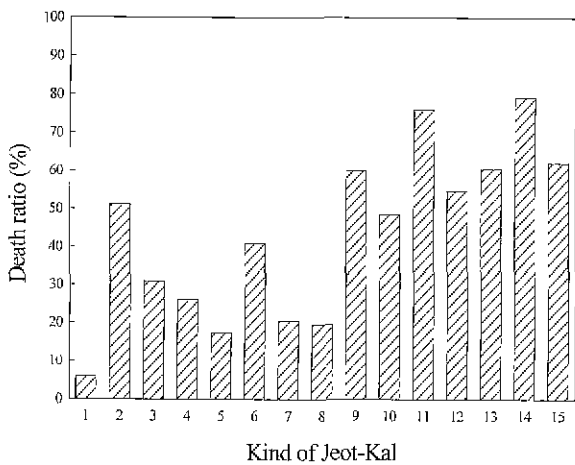


Fig. 1. The death ratio(%) of HepG2 cell by adding of 500 $\mu$ g/ml of hot-water extracts from the marine and salted fish products.

1. Salt-fermented shad gizzard, 2. Salt-fermented shad squid, 3. Salt-fermented Toha Shump, 4 Salt-fermented clam, 5. Salt-fermented gill, 6. Salt-fermented pollack tripe, 7. Salt-fermented hair-tail viscera, 8. Salt-fermented sea-arrow, 9. Salt-fermented small shrimp, 10. Anchovy Sikhae, 11. Alaska pollack Sikhae, 12 Squid Sikhae, 13 Flounder Sikhae, 14. *Urechis unicinctus*, 15. Hesico).

내었으며, 명태식해 76%, 헤시코 62.1%, 가자미식해 60.5%, 오징어식해 54.8% 이었다. 개불의 세포독성 효과는 당단백질의 면역자극에 의해 항암효과를 나타냈다는 보고[9,10]가 있었는데, 본 연구에서도 가장 강한 세포독성을 나타내었으나, 그 원인 물질에 대한 규명은 계속적인 연구를 통해 규명되어야 할 것으로 기대된다. 반면 전어발젖에서의 저해율은 6.2%로 가장 낮은 저해율을 보여 암세포 성장 저해효과를 관찰할 수 없었다.

#### 개불 열수 추출물의 농도별 첨가에 따른 항암효과

저해효과가 가장 높게 나타났던 개불의 농도별 저해율을 알아보기 위해 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 각각의 농도(0 $\mu$ g, 63 $\mu$ g, 125 $\mu$ g, 250 $\mu$ g, 500 $\mu$ g, 1000 $\mu$ g/ml)에서 46.4%, 68.8%, 73.5%, 79.3%, 94.5%로 나타났다. 즉, 시료의 양을 점차 증가시키면서 HepG2 세포주에 첨가할수록 높은 효과를 얻을 수 있음을 확인하였다. 결과적으로 개불의 농도가 1000 $\mu$ g/ml일때 94.5%로 아주 높은 암세포 저해효과를 나타내었다.

#### 수산물 및 수산 발효식품의 methanol 추출물 첨가에 의한 항암효과

전통 수산 발효식품 및 해조류의 methanol 추출물로 다양한 농도에서 항암활성을 실험하고 더 이상의 항암활성의 큰 증가를 나타내지 않는 농도인 500 $\mu$ g/ml의 농도를 선택

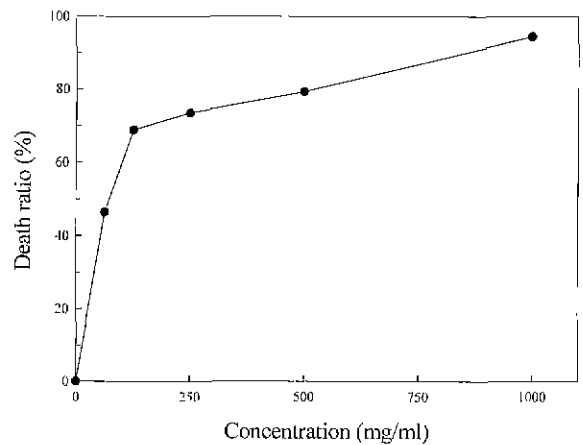


Fig. 2. The death ratio(%) of HepG2 cell according to various concentration of *Urechis unicinctus* hot-water extracts.

하여 다양한 종류의 젓갈에 대한 세포독성효과를 Fig. 3에 나타내었다. 전어밤젓에서의 항암효과가 77.6%로 가장 높은 세포독성효과를 나타내었으며, 이 외에 가자미식해 65.6%, 오징어식해 57.6%, 꼴뚜기젓은 57.5%의 비교적 높은 저해율을 보였고, 토하젓의 경우, 저해율이 41.4%로 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서도 50% 미만의 항암활성을 나타내었다.

전어밤젓 methanol 추출물의 농도별 첨가에 따른 항암효과

높은 저해율을 보였던 전어밤젓의 농도별 저해율을 알아보기 위해 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 전어밤젓의 각각의 농도(0 $\mu\text{g}$ , 63 $\mu\text{g}$ , 125 $\mu\text{g}$ , 250 $\mu\text{g}$ , 500 $\mu\text{g}$ , 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )에서의 저해율은 35.7%, 48.4%, 58.4%, 77.6%, 90% 로 나타났다. 전어밤젓 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 90%이상의 높은 저해율을 보여 다른 종류에 비해 가장 효과가 높게 나타났음을 알 수 있다. 이 또한 시료의 농도가 점차 증가함에 따라 저해 효과도 높아진다는 것을 알 수 있다. 이는 전어밤젓의 지방산 함량에 기인하는 것으로 사료된다. 전어밤젓의 전체 지방산중에서 불포화지방산의 함량이 높다는 보고에 의하면,

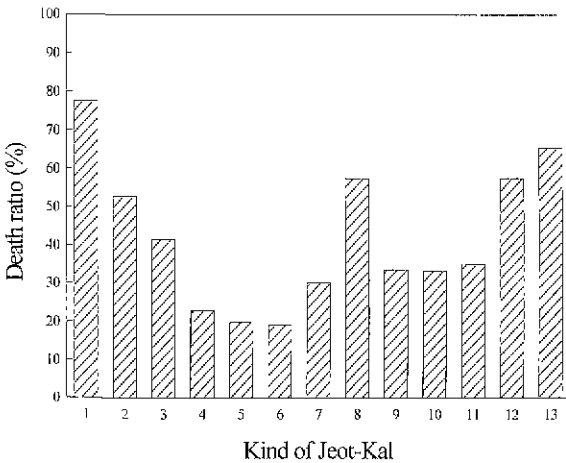


Fig. 3. The death ratio(%) of HepG2 cells by adding of 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$  of methanol extracts from the marine and salted fish products.

1. Salt-fermented shad gizzard, 2. Salt-fermented shad squid, 3. Salt-fermented Toha Shrimp, 4 Salt-fermented clam, 5. Salt-fermented gill, 6. Salt-fermented pollack tripe, 7. Salt-fermented hair-tail viscera, 8. Salt-fermented sea-arrow, 9. Salt-fermented small shrimp, 10. Anchovy Sikhae, 11. Alaska pollack Sikhae, 12. Squid Sikhae, 13. Flounder Sikhae).

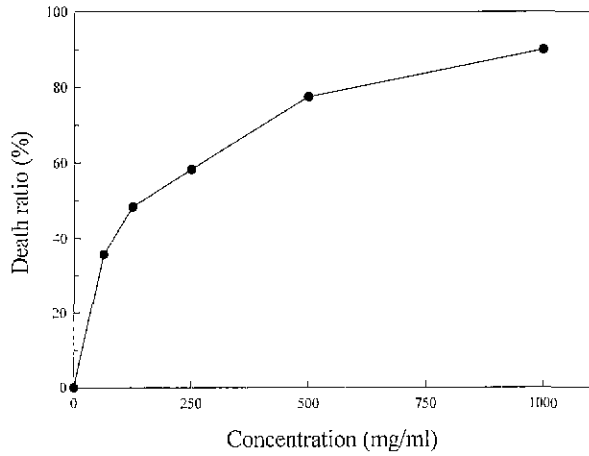


Fig. 4. The death ratio(%) of HepG2 cells according to various concentration of Salt-fermented shad gizzard methanol extracts.

전어밤젓은 고도의 불포화지방산인 DHA와 EPA를 다량 함유하고 있으며 그중 DHA는 인체의 심장 및 뇌신경에 존재하며 항암효과와 기억력 및 학습력 증진 성인병 예방에 탁월한 효과가 인정되어 있고, EPA는 혈전증, 동맥경화, 순환계질환 및 대장암에 효과가 있다[8]고 보고된 바 있다.

암세포를 50%이상 저해시킨 수산물 및 수산 발효식품 대조구에 비해 암세포를 50%이상 저해시키는 전통 수산 발효식품 및 해조류의 열수 및 methanol 추출물의 시료종류를 Table 1에 나타내었다. 다른 종류의 젓갈류보다는 식

Table 1. Anticancer effect(%) of extracts from marine and salted fish products

Sample name	Anticancer effect (%)	
	hot-water extracts	methanol extracts
Salt-fermented shad gizzard	ND	77.6
Salt-fermented squid	51.2	52.8
Salt-fermented sea-arrow	ND	57.5
Salt-fermented small shrimp	60.1	ND
Alaska pollack Sikhae	76	ND
Squid Sikhae	54.8	57.6
Flounder Sikhae	60.5	65.6
<i>Urechis unicinctus</i>	79.3	ND
Hesico1	62.1	ND

ND: Not determined.

해류 쪽이 대부분 50%이상의 저해율을 나타내어 비교적 높은 세포독성효과를 나타내었다. 이는 소금과 어패류만을 침장원으로 하는 것갈류와는 달리 식해는 곡류와 여러 부 재료를 혼합해 숙성 발효시킨다는 점에서 부재료로 첨가되어지는 마늘, 고춧가루등에 함유 되어 있는 성분들 즉, 마늘은 항암작용을 하는 물질인 allicin을 비롯한 함황 물질과 linoleic acid에 의해 인체 암세포의 성장을 억제할 뿐만 아니라 생명을 연장하는 효과도 관찰[15,18,19]된 바 있으며, 고추의 매운맛 성분인 capsaicine은 위암발생의 원인물질로 여겨져 돌연변이 유발성에 대한 상반된 보고[14]도 있었으나, 고추 속에는 비타민 C와 carotenoids등이 함유되어 있어 오히려 돌연변이 유발을 억제하는 것으로 보고[17]되고 있어서 이들 부재료의 성분들이 식해 추출물에서 항암 작용을 돕는 것으로 사료된다.

## 요 약

수산물 및 수산 발효식품에서의 생리활성을 연구하기 위하여 여러 가지 종류의 것갈류와 식해류를 가지고 열수 추출, methanol 추출을 행하여 항암성 효과를 알아보기 위해 MTT assay를 통해 각각의 시료를 농도별로 첨가하여 HepG2 인체간암세포의 생존저해 효과를 측정하였다. 그 결과 시료의 농도가 점차적으로 증가함에 따라 사용한 암세포주 HepG2에 대한 세포독성효과가 비례적으로 증가하였다. 특히, 열수추출한 시료에서는 개불에서의 항암효과가 1000 $\mu$ g/ml에서 HepG2 성장을 94.5% 억제시키는 것으로 가장 높은 효과를 나타냈으며, methanol 추출한 시료에서는 전어 밤 것에서의 항암효과가 1000 $\mu$ g/ml 첨가시 90%이상으로 높게 나타났다. 그 밖에 식해류에서의 항암효과가 다른 시료에 비해 비교적 높다는 사실을 알 수 있었다. 이상의 결과를 종합하여 항암효과를 증진시키기 위해서는 시료를 1000 $\mu$ g/ml이상 첨가시에 간암세포의 성장억제효과를 높일 수 있음을 확인하였다.

## 감사의 글

본 연구는 여수대학교 1999년도 학술연구지원비에 의하여 연구되었으며, 이에 깊이 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. Alley, M. C., D. A. Scudiero, A. Monks, M. L. Hursey, M. J. Czerwinski, D. L. Fine, B. J. Abbot, J. G. Mayo, R. H. Shoemaker and M. R. Boyd. 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* **48**, 596-601.
2. Carmichael, J., W. G. De Graff, A. F. Gazder, J. D. Minna and J. B. Mitchell. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay : assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**, 936-942.
3. Cho, S. Y., B. J. You, M. H. Chang, S. J. Lee, N. J. Sung and E. H. Lee. 1994. Screening for the antioxidants in unused marine resources by the polarographic method. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* **26**, 417-421.
4. Doll, R. and R. Peto. 1981. The causes of cancer-Quantitative estimate of avoidable risks of cancer in the united states today. *J. Natl. Cancer Inst.* **66**, 1191-1196.
5. Ha, Y. L. and W. P. Michael. 1991. Naturally-occurring novel anticarcinogens: conjugated dienoic derivatives of linoleic acid (CLA) (in Korean). *J. Korean Soc. Food Nutr.* **20**, 401-408.
6. Kim, J. H., B. S. Kim, J. J. Choi, K. M. Kim, N. C. Yoo, J. H. Choi, H. Y. Lim, J. K. Roh and B. S. Kim. 1993. Effects of verapamil, tamoxifen and cyclosporin A for the modulation of multidrug resistance in human lung cancer cell lines. *J. Kor. Cancer Assoc.* **25**, 225-230.
7. King, M. L. 1990. Screening study on Taiwan plants for antitumor activity. *Cancer chromatography reports part 2.* 1074-1076.
8. Lee, E. H., K. S. Oh, T. H. Lee, C. B. An and Y. J. Cha. 1986. Fatty acid composition of salted and fermented sea foods on the market. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* **18**, 42-47.
9. Lee, J. Y., H. S. Ryu, J. H. Moon and J. S. Suh. 1999. Antitumor effect and immunological activity of glycoprotein from *Urechis unicinctus*. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **28**, 917-923.
10. Lee, J. Y., H. S. Ryu, J. H. Moon and J. S. Suh. 1999. Chemical composition of glycoprotein from *Urechis unicinctus*. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **28**, 285-291.

11. Lee, N. H., S. W. Oh and Y. M. Kim. 1996. Biochemical changes in muscle protein of squid sikhae during fermentation-effect of temperature and moisture content. 1996. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* **28**, 292-297.
12. Michael, C. A., A. S. Dominic and M. Anue. 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* **48**, 589-595.
13. Miyazaki, T. and M. Nishijima. 1981. Structural examination of a water soluble antitumor polysaccharide of *Ganoderma Incidum*. *Chem. Pharm. Bull.* **29**, 3611-3616.
14. Nagabhusan, M. and S. V. Bhide. 1985. Mutagenicity of chili extract and capsaicin in short term test. *Environ. Mutagen.* **7**, 881-886.
15. Nakata, T. 1973. Effect of fresh garlic extract on tumor growth. *Jap. J. Hyg.* **27**, 538-541.
16. Oh, S. W., Y. M. Kim, E. J. Nam and J. H. Jo. 1997. Proteolytic properties of saewoojeot (salted and fermented shrimp) on meat proteins. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* **29**, 1191-1195.
17. Park, K. Y., M. H. Kweon, H. S. Baik and H. S. Cheigh. 1988. Effect of L-ascorbic acid on the mutagenicity of aflatoxin B<sub>1</sub> in the *Salmonella* assay system. *Environ. Mutagens Calcicogens.* **8**, 13-16.
18. Park K. Y., S. H. Kim, M. J. Suh and H. Y. Chung. 1991. Inhibitory effects of galic on the mutagenicity in samonella assay system and on the growth of HT-29 human colon carcinoma cells. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* **23**, 370-374.
19. Shoji, F., T. Nobuyasu, H. Takaki and W. Hideki. 1997. Cancer prevention by organosulfur compounds from garlic and onion. *J. Cellular Biochem.* **27**, 100-107.

(Received December 13, 2000; Accepted January 19, 2001)