

모자반 분획물의 *in vitro*에서의 항발암효과

배 송 자

신라대학교 식품영양학과/마린-바이오 산업화지원센터

Anticarcinogenic Effects of *Sargassum fulvellum* Fractions on Several Human Cancer Cell Lines *in vitro*

Song-Ja Bae

Dept. of Food and Nutrition and Marine Biotechnology Center for Bio-Functional Material Industries,
Silla University, Busan 617-736, Korea

Abstract

Despite many therapeutic advances in the understanding of the processes in carcinogenesis, overall mortality statistics are unlikely to change until there is reorientation of the concepts for the use of natural products as new anticarcinogenic agents. In this study, we investigated the anticarcinogenic activity, antioxidant and DPPH scavenging activity of *Sargassum fulvellum* (SF). SF was extracted with methanol, which was further fractionated into five different types: hexane (SFMH), ethylether (SFME), ethylacetate (SFMEA), butanol (SFMB) and aqueous (SFMA) partition layers. We determined the cytotoxic effect of these layers on human cancer cells by MTT assay. Among various partition layers of SF, at starting concentration of 100 µg/mL, SFME showed very high cytotoxicity which were 92, 90 and 84% and kept high throughout 5 concentration levels sparsed by 100 µg/mL against all three human cancer cell lines: HepG2, HT-29 and HeLa. SFMEA showed a low cytotoxicity at the beginning concentration level, but as the concentration became denser, growth inhibition effect of cancer cell lines started to increase and at 500 µg/mL, it hit the highest, which were 91, 96 and 98% against the same three cell lines as above. We observed QR induced effect in all fraction layers of SF. SFME showed similar tendency of QR induced effect as did against cytotoxicity. The QR induced effect of SFME on HepG2 cells at 25 µg/mL concentration indicated 3 times higher than the control value of 1.0 and SFMH tended to be concentration-dependent on HepG2 cells. At 100 µg/mL, the QR induced effects resulted a ratio, which was 2.5 times higher than the control value. In search for antioxidation effects of SF extract and partition layer, the reducing activity on the 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) radical scavenging potential was sequentially screened. The SFM has similar antioxidant activity as to BHT and vitamin C groups.

Key words: anticarcinogenic effect, *Sargassum fulvellum* QR induced effect, human cancer cells lines

서 론

최근 천연물 유래의 새로운 암예방 물질의 개발로 그 예방과 치료의 방향이 전환되어 가고있는 실정이며(1) 이들 중간 화합물은 주로 공격적인 암세포들의 증식을 막거나 약화시켜 예방하는 데 사용되고 있으며, 천연물질의 동정과 활성여부의 판단 및 그 대체요법의 성공 등은 천연물을 이용한 생물학적 기초를 형성하는데 크게 기여하고 있는 실정이다(2-4).

또 최근 항발암 효과에 대한 천연물 검색이 육상 생물에서 뿐 아니라 해양 생물에서 활발히 연구되고 있으며(5) 특히, 식용으로 쓰이는 해양식물인 해조류는 일반적으로 영양가는 풍부하지 않지만 다양한 생리활성 물질들을 가지고 있음이

보고되고 있다. 일반적으로 해조류에는 carotinoids가 풍부하고(6) 높은 항산화 효과를 나타내는 mycosporine-glycine 이 많이 들어있으며(7), 항발암 물질, 항산화 물질 등을 함유하고 있다. 즉, Ryu 등(8)은 미역과 다시마의 단백질 다당체의 항발암 효과를 보았고, Park 등(9)은 해조류 추출물을 이용하여 식품 유래의 항돌연변이원성 소재를 찾았으며 연구 결과 갈조류인 감태, 곰피, 다시마 및 모자반의 항발암 효과가 우수하다고 하였으며, 특히 곰피 추출물에서 발암 억제 물질인 phenol과 chlorophyll 및 carotenoid 화합물을 발견하였다.

대표적인 암예방 기전의 연구에 사용하는 생화학적 분석 방법은 체내 독성물질이나 발암물질을 무독화시키는 phase II 효소인 quinone reductase(QR)와 glutathione S-trans-ferase(GST) 활성유도와 phase I 효소인 cytochrome P450

효소 활성 억제, glutathione 생성, transformed cell에서 그 함량이 증가되는 polyamine 생성억제 등의 측정이 있다(10). QR은 간세포에서 주로 생성되는 phase II enzyme의 한 종류로 quinone을 환원시켜 무독하게 만들고 세포내에 유도되어 여러 돌연변이 물질에 의해 일어나는 돌연변이와 종양화를 막아주고 발암물질을 무독하게 하는 역할을 한다(11). 이러한 QR 유도 활성을 통한 암예방 효과를 검색한 연구로서는 Steinkellner 등(12)은 십자화과 식물에서 QR 유도 활성을 보았고, Shon과 Nam 등(13)은 *Phellinus linteus*, *Phellinus igniarius* and *Agrocybe cylindracea*의 추출물에서 QR 활성을 보았으며, Ryu 등(8)은 잘 알려진 암예방 물질들을 대상으로 하여 암예방 물질 검색을 위한 실험 방법으로 QR을 사용하여 연구하였다. 또한 Shim 등(14)과 Bae(15)는 당근 잎, 감자껍질 등의 폐기되는 농산 부산물의 높은 암예방 QR 유도 활성 효과를 확인하였다. Lee 등(16)은 톱과의 홀과래에서 높은 수용성 항산화제를 추출하였다.

일반적으로 해조류는 우리나라 전통식용 식품으로서 알려져 있으며 한천(agar)을 비롯하여 푸코오스(fucose), 포르피란(porphyrin) 등의 당 관련 연구가 진행되어 왔다(17-19).

그러나 해조류의 생리활성물질의 일종인 polyphenol 성분에 관련된 연구는 초기단계에 있으며 특히 식품의 기능성 활성 성분의 연구는 잠재적 수요를 야기시키는 계기가 되리라 본다.

본 연구에 사용된 모자반(*Sargassum fulvellum*)은 모자반 속에 속하는 난해성 다년생 갈조식물류로서 모자반의 서식처는 연안동물들이 먹이를 얻거나 산란하기 적합한 곳으로서 한국의 연안에서 그 해중림을 이루는 대표적인 식용해조류이다. 이 해조류는 항 혈액응고 활성을 가진 fucoidan을 함유하고 있으며 혈액응고를 저지하는 thrombin의 활성을 억제하는 것으로도 알려져 있다. 지금까지 식용으로만 사용되어 온 해조류의 성분 분석, 항산화력에 대한 연구는 일반적으로 되어있으나 해조류의 암세포에 대한 독성효과나 암 예방 효과 등의 항 발암효과 연구는 아직 연구가 미비한 상태이므로 본 연구를 시도하게 되었다. 본 연구는 바다의 우수 식용 자원인 모자반의 *in vitro*에서의 암세포주에 대한 암세포 독성효과, QR유도 암예방효과 및 DPPH 소거기능 등을 측정해보았다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용된 모자반(*Sargassum fulvellum*, SF)은 2003년 10월 완도산을 구입하여 음건하였다. 이 시료를 추출, 분획하여 3종의 암세포주에 대한 암세포 증식억제 효과(cytotoxicity)와 quinone reductase(QR) 유도 활성 물질을 검색함으로써 *in vitro* 항암활성 연구를 하였다.

암세포 증식억제 실험에 사용된 시약 중 NP-40과 mena-

dione은 Sigma사(St. Louis, USA) 제품을 사용하였고 flavin adenine dinucleotide(FAD), dicumarol 및 glucose-6-phosphate dehydrogenase는 Amresco사(USA)에서, minimum essential medium(MEM), dulbecco's Eagle modified medium(DMEM)과 phosphate buffered saline(PBS) 등은 Gibco-BRL(Grand Island Biologic Co., USA)에서 구입하였으며, 그 외 연구에 사용된 용매 및 시약은 특급을 사용하였다.

시료의 추출 및 분획물 제조: 시료로 사용된 모자반은 건조 후 분말화하고 메탄올과 1:5(w/v)이 되게 하여 37°C에서 진탕한 후 4시간 동안 3회 반복 추출하고 회전식 진공 농축기로 감압 농축시킨 후 동결 건조하여 모자반의 methanol 추출물(SFM)을 얻었으며 이 추출물을 각 용매별로 분획하여 hexane층(SFMH), ethylether층(SFMEE), ethylacetate층(SFMEA), butanol층(SFMB) 및 수층분획물(SFMA)로 각각 분획하고 각 층을 감압 농축 후 동결 건조하여 분말로 만들어 시료로 사용하였다.

시약: 세포실험에 사용된 시약 중 NP-40과 menadione은 Sigma사 제품을 구입하였고 flavin adenine dinucleotide(FAD), dicumarol 및 glucose-6 phosphate dehydrogenase는 Amresco사 제품을 구입하였으며, minimum essential medium(MEM), Dulbecco's Eagle modified medium(DMEM)과 phosphate buffered saline(PBS) 등은 Gibco-BRL(USA)에서 구입하였으며, 그 외 연구에 사용된 용매 및 시약은 특급 또는 일급을 사용하였다.

실험기기: 암세포 배양을 위해 사용한 실험기기는 CO₂ incubator(Forma scientific 3546, USA), Clean bench(Vision Scientific Co., LTD., VS-1400LS), Rotary evaporator(Tokyo rikakikai Co., LTD., NN10522423, Japan), Microscopy(Leica Mikroskopie & systeme Gembhy Wetzlas 520802, Germany), Deep freezer(Ilsin Engineering Co., DF 9071) 및 Multi-detection microplate(BIO-TEK, synergy HT) 등이었다.

세포 배양

본 실험에 사용한 암세포주는 인체 간암 세포인 HepG2 (human hepatocellular carcinoma), 자궁경부암 세포인 HeLa (human cervix adenocarcinoma) 및 대장암 세포인 HT-29(human colon adenocarcinoma)로서 2003년 3월 한국 세포주 은행(Korean cell bank, KCLB)에서 구입하였으며, 정상 세포는 liver normal cell을 배양하여 사용하였다. HT-29, HepG2 HeLa와 정상 세포주는 DMEM medium에 10%의 fetal bovine serum(FBS)와 1% 100 units/mL의 penicillin streptomycin이 함유된 것으로 T-75 flask에 이식한 후, 37°C 5% CO₂ incubator에서 monolayer로 배양하였다.

위 4종의 세포주는 일주일에 2~3회 정도 새로운 배지로 교환하고 flask에 암세포가 5×10^4 cells/mL 정도 증식되면 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.0)으로 2번 세척한 후 trypsin-EDTA를 처리하여 바닥에서 세포를 분리한 후, 배양액으로 암세포가 골고루 분산되도록 희석하여 T-75 flask

에 10 mL씩 분할하여 주입하고 4~5일마다 계대배양하면서 실험에 사용하였다. 계대 배양시 각각의 passage number가 10회 이상일 때는 액체질소탱크로부터 새로운 세포를 꺼내어 다시 배양하여 실험하였다.

암세포 독성 효과(cytotoxicity) 측정

모자반 추출 분획물의 암세포 독성 효과는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT assay)를 사용하여 행하였다(20). MTT assay는 세포의 생육을 측정하는 방법으로서 살아있는 세포의 미토콘드리아 내의 dehydrogenase가 황색 수용성 물질인 MTT에 의해 dark blue formazan을 생성하는 원리를 이용한다.

이를 위해 각 세포주를 1×10^5 cells/well의 농도로 맞추고 24 well에 각각 1 mL씩 첨가하여 24시간동안 37°C, 5% CO₂ incubator에 배양한 후 용매종류별 분획물을 각각 일정량의 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여서 100, 200, 300, 400 및 500 µg/mL의 농도로 첨가하였다. 48시간 배양 후 각 well에 PBS 완충액에 녹인 MTT 용액을 100 µL씩 첨가하여 4시간 동안 다시 배양시킨 후, well 바닥에 형성된 formazan이 흡수되지 않게 상등액을 제거하고 DMSO와 ethanol을 1:1로 혼합한 용액 1 mL를 첨가하여 천천히 녹인 후 Multi-detection microplate를 이용하여 570 nm, 690 nm에서 측정하였다. 대조군 세포수를 100%로 정하고 상대적인 암세포독성 효과를 구하였다.

Quinone reductase(QR) 유도 활성 측정

Quinone reductase(QR)는 phase II 무독화 효소 중의 하나로 돌연변이 또는 발암물질 등에 의한 DNA와의 상호 작용을 차단하는 효소이며, NAD(P)H를 이용하여 quinone류의 환원을 촉매하는 flavoprotein이다.

QR생성 유도 효과는 Prochaska와 Santamaria(21)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. T-75 flask의 세포가 80% 이상 증식하게 되면 24 well plate의 각 well에 1×10^4 cells/mL되도록 HepG2세포주를 분주하여, incubator에 24시간 동안 배양한 후 모자반 분획물을 각각 DMSO에 녹여 25, 50, 75 및 100 µg/mL의 농도로 첨가하고 다시 24시간 동안 배양한 다음 배양액을 제거하였다. 배지가 제거된 각 well에 250 µL의 lysis buffer(10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 14 mM NaCl, 15 mM MgCl₂, 0.5% NP-40)를 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에 10분간 두면서 cell을 lysis한 후 reaction mixture 즉, 10 mM Tris-Cl(pH 7.4), 0.5 mg/mL BSA, 0.008% tween-20, 40 µM FAD, 0.8 mM glucose-6-phosphate, 2 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase, 25 µM NADP, 40 µg/mL MTT 및 1 mM menadione을 혼합하여 각 well에 1 mL씩 첨가하여 5분 동안 반응시킨 후, 반응 정지용액인 10.3 mM dicumarol, 0.5% pyridine, 5 mM potassium phosphate (pH 7.4) 혼합액을 250 µL씩 첨가하여 효소반응을 정지시키고 Multi-detection microplate를 이용하여 610 nm에서 흡광

도를 측정하여 계산하였다. 그리고 단백질량은 동일한 set의 well plate에 대한 crystal violet 염색방법으로 정량하였다. 24 well plate에 1×10^4 cells/well 농도로 분주하고, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 2시간 배양한 후 증류수로 2분간 세척하였다. 각 well에 0.5% SDS(in 50% EtOH) 용액을 1 mL씩 가하여 37°C incubator에 1시간 방치한 후 610 nm에서 흡광도를 측정하였다(22).

Quinone reductase 활성측정(nmol/min/mg protein)은 다음과 같이 하였다.

Specific quinone reductase (QR) activity

$$= \frac{\text{absorbance change of MTT/min}}{\text{absorbance of crystal violet}} \times 3345 \text{ nmol/mg}$$

DPPH radical 소거활성 측정 :

DPPH(1,1-diphenyl-picryl hydrazyl) radical 소거활성 효과는 Blois의 방법을 변형하여 사용하였다(23). 100 ppm 농도의 모자반의 추출물 및 분획물과 널리 알려져 있는 항산화제인 Vit. C와 butyl hydroxytoluene(BHT)를 대조군으로 사용하여 96 well plate에 160 µL를 넣고 0.2 mM DPPH 40 µL를 첨가하여 vortex로 균일하게 혼합한 다음 실온의 암실에서 30분간 방치한 후, Multi-detection microplate로 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거율 측정은 다음과 같이 electron donating activity(EDA, %)로 구하여 계산 하였다.

$$\text{EDA}(\%) = \frac{(\text{Blank} - \text{Sample})}{\text{Blank}} \times 100$$

통계분석

대조군과 각 시료들로부터 얻은 실험 결과들은 Student's t-test를 이용하여 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

모자반의 methanol 추출물 및 분획물

해조류로서 식용으로 애용되고 있는 모자반(SF)에 메탄올 1:5로 3회 추출하여 분획물(SFM)을 얻고, 이 추출물을 hexane(SFMH), ethylether(SFEE), ethylacetate(SFEA), butanol(SFMB) 및 수층(SFMA)의 용매별로 분획하였으며, 각 시료의 용매별 추출물 및 분획물의 수율은 Table 1과 같다.

Table 1. Yields (%) of various solvent fractions of *Sargassum fulvellum*

Fraction	Yields (g)	Yields (%)
Extracts	16.79	16.79
Hexane fr.	1.48	8.81
Ethylether fr.	0.13	0.77
Ethylacetate fr.	0.61	3.63
n-Butanol fr.	3.21	19.12
Aqueous fr.	10.51	62.26

암세포 독성 효과(cytotoxicity)

본 실험에서는 암세포 3종과 정상세포를 이용하여 각 시료를 첨가시켰을 때의 MTT assay를 이용하여 암세포 독성 효과를 보았으며, 사용한 암세포는 자궁경부암세포인 HeLa, 결장암 세포인 HT29 및 간암세포주인 HepG2를 사용하였고, 정상세포는 간세포를 사용하여 그 효과를 비교 검토하였다.

Fig. 1은 인체 간암세포주인 HepG2에 용매별 각 시료 분획물을 100, 200, 300, 400 및 500 µg/mL씩 농도를 증가시키며 첨가하였을 때의 암세포 독성 효과를 나타낸 것이며, 다른 용매 분획층에 비해 ethylether층인 SFMEE와 ethylacetate층인 SFMEA에서 그 효과가 아주 뛰어났다. SFMEE층의 경우 시료 농도가 100 µg/mL을 첨가했을 때 이미 92%의 높은 암세포 독성 효과를 보였으며 농도가 증가할수록 증식 억제 효과는 그대로 유지되다가 400 µg/mL에서는 다소 감소하는 경향을 보였다. SFMEA층의 경우는 300 µg/mL를 첨가하였을 때 암세포 독성 효과가 갑자기 증가되어 78%의 효과를 보였고 계속 농도 의존적으로 증가하여 500 µg/mL를 첨가하였을 때는 91%의 높은 효과가 나타났다.

결장암세포주인 HT29에 대한 암세포 독성 실험 결과는 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2는 Fig. 1의 HepG2 세포주에 대한 암세포 효과의 결과에서와 같이 SFMEE층과 SFMEA층에서 높은 증식억제 효과를 보였으며 그 증가 경향은 HepG2에서와 유사하였다. 즉 SFMEE층의 경우 200 µg/mL 첨가시 이미 97%의 암세포의 성장이 저지되었다가 농도를 증가시

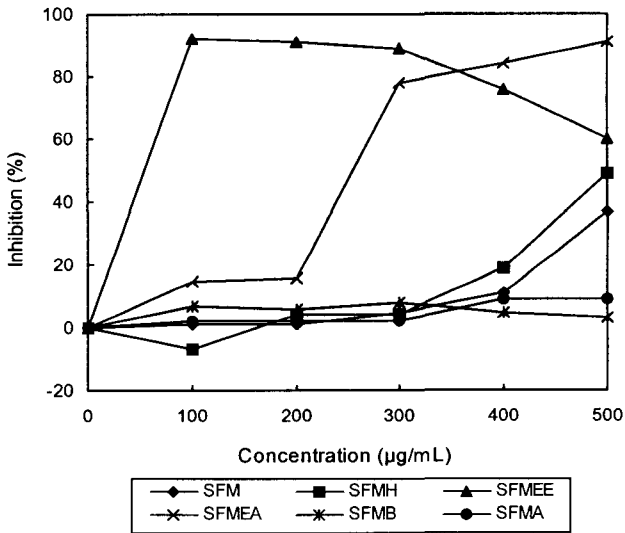


Fig. 1. Inhibitory effect of various partition layers from methanol extract of *Sargassum fulvellum* on the survival of HepG2 cells.
 SFM: methanol extracts of *Sargassum fulvellum*, SFMH: hexane fractions of SF, SFMEE: ethylether fractions of SF, SFMEA: ethylacetate fractions of SF, SFMB: butanol fractions of SF, SFMA: aqueous fractions of SF. Cells were cultured at a starting density of 1×10^5 cells/mL in DMEM. The effects of SFM on the cytotoxicity determined by MTT assay. Values are means \pm SD of three-independent experiments. $p < 0.05$ for all conditions with SFM as compared to control conditions.

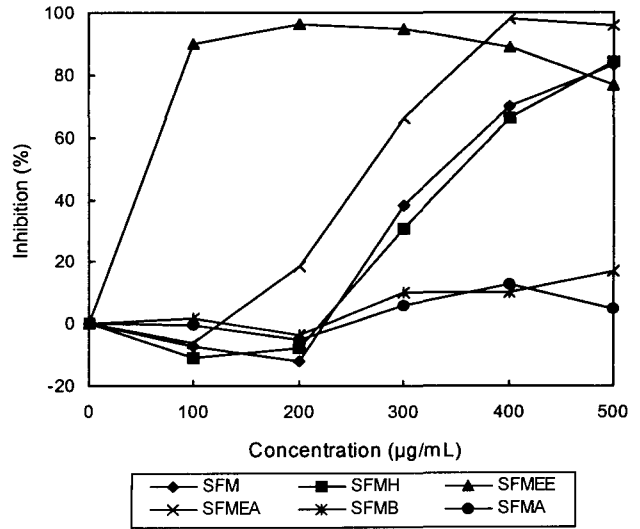


Fig. 2. Inhibitory effect of various partition layers from methanol extract of *Sargassum fulvellum* on the survival of HT29 cells.
 Values are means \pm SD of three-independent experiments. $p < 0.05$ for all conditions with SFM as compared to control conditions.

에도 그 경향을 그대로 유지하였다. SFMEA층의 경우 300 µg/mL 첨가시 약 66%의 독성 효과가 나타났으며 400 µg/mL 첨가농도에서는 98%의 아주 높은 효과를 나타내었으며 최고 농도 첨가시에도 그 상태를 유지하였다. 이 세포주에서는 methanol 추출물인 SFM층과 hexane 분획층인 SFMH에서도 300 µg/mL의 농도에서부터 농도 의존적으로 암세포 독성 효과가 서서히 나타나기 시작하여 500 µg/mL에서는 각각 83%, 84%의 효과를 보였다.

Fig. 3은 자궁경부암 세포주인 HeLa에 대한 모자반 추출

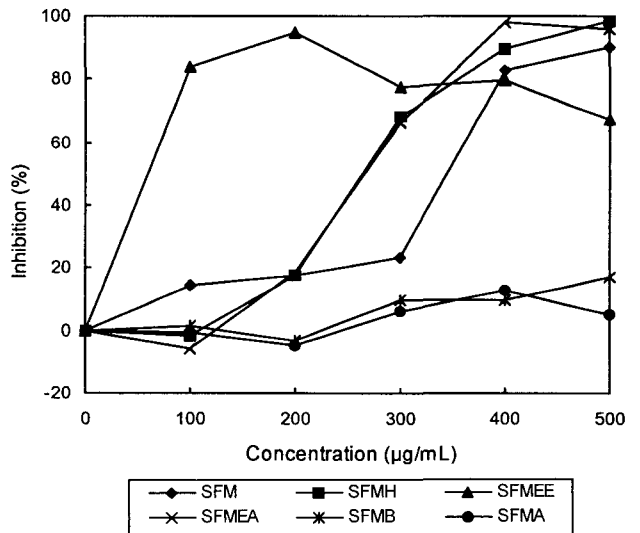


Fig. 3. Inhibitory effect of various partition layers from methanol extract of *Sargassum fulvellum* on the survival of HeLa cells.
 Values are means \pm SD of three-independent experiments. $p < 0.05$ for all conditions with SFM as compared to control conditions.

물과 각 분획물을 첨가한 결과이며 역시 Fig. 1 및 Fig. 2의 결과와 비슷한 양상을 보여주었다. 즉, SFMEE층의 경우 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 98%의 높은 암세포 독성 효과를 나타내었고 SF-MEA층과 SFMH층은 농도 의존적으로 그 효과가 유의성있게 증가하여 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 각각 66%, 68%의 독성 효과를 보였고 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 각각 98.27, 96%의 아주 높은 암세포 독성 효과를 나타내었다. 또한 SFM의 경우도 농도 의존적으로 암세포 독성 효과가 나타나 400과 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가에서 각각 82.94% 및 90%의 독성효과가 나타났다.

정상 간세포에서 본 세포독성 효과는 암세포주에 비하여 낮은 세포 독성을 보였으며 5가지의 시료 분획물을 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가 농도에서 대체적으로 약 40%의 저해율을 보였다.

이상의 결과에서 사용한, 3종의 암세포주는 모두 초기 농도에서는 SFMEE에서 제일 암세포 독성효과가 컸고, SF-MEA층의 경우는 가한 시료의 양을 증가시키에 따라 농도 의존적으로 그 효과가 커져 3종의 암세포주에서 모두 매우 높은 암세포 독성효과가 나타났다. 또 HT29와 HeLa 세포주에서는 methanol층 SFM과 hexane층인 SFMH에서도 유의적인 효과를 나타내었다.

이와 같은 실험 결과에서 모자반의 암세포 독성 효과를 보이는 생리활성 물질은 ethylether층과 ethylacetate층에 용해되는 물질에 주로 존재한다는 결론을 얻을 수 있었으며 이와같은 세포독성효과는 천연 항산화제의 보다 매우 큰 항산화력을 가지고 있는 polyphenol종류의 phenolic 수산기를 포함한 물질도 추정되고 있으며 연구가 계속 진행중에 있다.

Quinone reductase(QR) 유도 활성효과

본 연구에 사용된 quinone reductase(QR)는 phase II 무독화 효소중의 하나로 돌연변이 또는 발암물질 등에 의한 DNA와의 상호작용을 차단하는 효소이며 NAD(P)H를 이용하여 quinone류의 환원을 촉매하는 flavoprotein일종이다. 특히 QR은 phase II 효소계의 지표효소로서 다양한 종류의 항암 물질에 의해 그 활성이 유도되어 암예방을 선도하는 특성을 가지고 있으므로 암예방 물질의 탐색에 많이 사용되어 왔다.

암세포 독성 효과에 사용한 3종의 암세포 중 유일하게 quinone reductase를 가지고 있는 간암세포주인 HepG2 세포주를 사용하여 모자반 추출물의 5가지 분획층을 이용한 QR유도활성을 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. HepG2 암세포주에 대한 용매별 모자반 분획물을 각각 25, 50, 75 및 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 씩 첨가했을 때의 결과는 앞의 cytotoxicity결과에서와 마찬가지로 SFMEE층에서 높은 QR 유도활성이 나타났고 다음으로는 SFMH층에서 높게 나타났다. 그러나 암세포 독성 효과가 높았던 SFMEA층은 그 효과가 아주 미약하였다. 이 결과는 Shim 등(24)의 연구결과와 비슷한 경향으로서 암세포 독성 효과와 암예방 QR 유도효과의 상관관계는 반드시 그 유의성은 없는 것으로 추정된다. 대조군을 1.0으로 했을 경우 SFMEE층은 아주 낮은 초기 시료 첨가농도인 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 대조군에 비해 이미 2.90배의 높은 QR 유도효과를

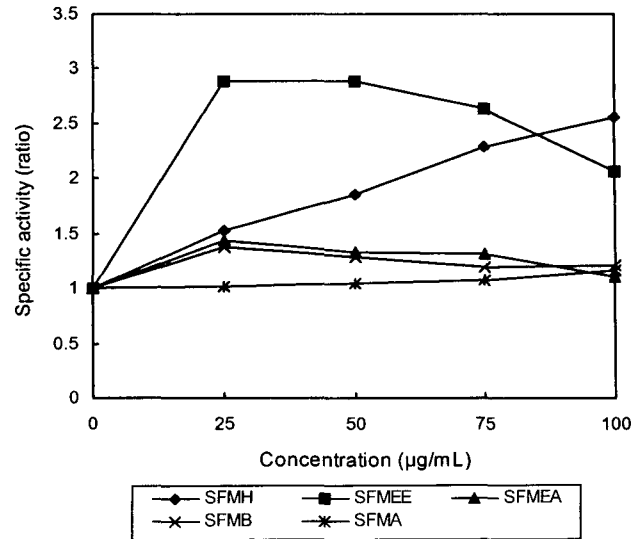


Fig. 4. Effects of various partition layer from methanol extract of *Sargassum fulvellum* on the induction of quinone reductase in HepG2 cells.

나타내어 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도첨가까지 거의 동일한 수준의 효과를 나타냈으나 그 이후는 조금씩 감소하는 경향을 보였다. SFMH층은 농도 의존적으로 QR 유도 효과가 유의성 있게 증가하여 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 QR 유도 활성이 약 2배가량 되었으며, 최종첨가농도인 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 대조군 1.0에 비해 2.56 배로 다른 용매분획물 첨가시보다 낮은 농도에서 높은 QR 유도활성을 나타내었다. 이상의 결과에서 모자반의 여러 용매 분획물 중 SFMEE층과 SFMH층에서 암예방 지표인 높은 QR 유도활성을 보였으므로 이 분획층에서의 암예방 효소계 quinone reductase의 inducer가 존재함을 추정할 수 있었다.

DPPH 소거능 측정

모자반 추출물의 항암효과와 관련한 여러 인자의 상관성을 살펴보기 위하여 DPPH radical을 이용한 DPPH소거능을 측정하였다(Table 2). 모자반의 methanol추출물과 일반적으로 잘 알려진 항산화제인 BHT와 Vit. C를 대조군으로 하여 DPPH radical 소거능 즉, 수소 공여능을 측정하여 보았다.

Table 2는 첨가 시료들의 농도가 100 ppm일 때의 electron donating activity(EDA, %) 결과로서, 모자반의 methanol 추출물의 EDA는 69.61%였으며 일반적으로 널리 알려진 항산화제인 BHT와 Vit. C는 각각 68.21% 및 70.36%로 나타나

Table 2. Antioxidative activity of *Sargassum fulvellum* at 100 ppm by electron donation activity (EDA)

Sample	EDA (%)
SFM	69.61
BHT	68.21
Vit C	70.36

Free radical scavenging activity of the partition layer of SFM measured using the DPPH assay.

SFM: Methanol extract of SF.

BHT: Butylated hydroxytoluene.

모자반의 methanol 추출물의 결과와 매우 유사한 EDA를 보였다. 이와 같은 결과는 Park 등(25)이 식용해조류를 이용하여 항산화력을 측정된 연구에서와 같이 methanol 분획층에서 강한 항산화 활성을 나타내었다는 결과와 유사하다. 즉 이와 같은 결과는 methanol과 같은 극성 용매(SFMM)에서 분리된 시료에서 항산화 활성이 높게 나타난 Ramos 등(26)의 실험 결과에서도 일치하며 DPPH소거능 측정은 DNA 손상을 억제하는 활성물질이 *in vitro*에서의 항발암 효과와의 연계를 있음을 다시 확인하는 계기가 되었으며 계속 상관관계를 규명하고자 한다.

요 약

식용 해조류의 일종인 모자반을 추출, 분획하여 *in vitro*에서의 항발암효과를 실험하였다. 모자반을 추출, 분획하여 3종의 암세포주(HepG2, HT-29, HeLa)를 이용하여 암세포 독성 효과를 본 결과, 모자반의 ethylether 분획층(SFMEE)과 ethylacetate 분획층(SFMEA)에서 3종의 사용 암세포주인 HepG2, HT29 및 HeLa 모두 아주 높은 cytotoxicity를 보였으며, HT29와 HeLa에서는 methanol 추출물(SFM)과 hexane 분획층(SFMH)에서도 유의적인 암세포 독성 효과를 나타내었다. 정상세포인 liver세포는 모자반의 모든 용매 분획층에서 암세포 독성효과가 낮게 나타났다. 이상과 같이 3종의 암세포에 대한 독성 실험에서 전반적으로 SFMEE층과 SFMEA층에 월등히 높은 암세포 독성 물질이 존재함을 알 수 있었다. 한편 인체 간암세포주인 HepG2를 이용하여 QR 유도 활성 여부를 측정할 결과 SFMEE층은 아주 낮은 초기 첨가 농도인 25 µg/mL에서, 대조군에 비해 이미 2.89배의 높은 QR 유도 활성 효과를 보였고, SFMH층은 농도의존적으로 그 효과가 증가하여 최종 농도인 100 µg/mL에서 2.56배의 QR 유도 활성효과를 나타내었다. 모자반의 DPPH radical 소거능을 실험하였으며 모자반의 메탄올 추출물의 DPPH 소거능 결과는 대조군인 항산화제인 BHT와 Vit C의 결과와 유사하였다. 본 실험의 결과로 모자반은 메탄올 추출물속에 DPPH 소거능을 가진 물질이 존재하고 있으며 이 결과는 모자반의 *in vitro* 항발암활성을 설명하는데 그 기초배경이 될 수 있다. 본 실험 결과를 종합 검토해 보면 모자반 추출물과 용매별 각 분획층에서의 암세포 독성 효과는 주로 비극성분획층에서 높게 나타났으며, QR 유도 활성 효과도 비극성분획층인 SFMEE층과 SFMH층에서 나타났다. 특히 SFMEE층은 적은 농도에서 암세포 독성 효과, QR 유도 활성 효과를 나타내었으며 이 연구결과에 대한 단계적인 물질의 분리 동정이 이루어져 SFMEE층에서의 유용한 생리활성물질 개발이 기대되는 바이다.

문 헌

1. Stavric B. 1994. Role of chemopreventers in human diet.

- Clin Biochem* 27: 319-325.
- Reddy L, Odhav B, Bhoola KD. 2003. Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacology & Therapeutics* 99: 1-13.
 - Doll R, Peto R. 1981. The cause of cancer. Quantitative estimates of available risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 66: 1192-1308.
 - Sharma S, Stutzman JD, Kelloff GJ, Steele VE. 1994. Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Res* 54: 5848-5855.
 - Schwartzmann G, Rocha AB, Berlinck GS, Jimeno J. 2001. Marine organisms as a source of new anticancer agents. *Oncology* 2: 221-225.
 - Krinsky NI. 1991. Effects of carotenoids in cellular and animal systems. *Am J Clin Nutr* 53: 238S-246S.
 - Dunlap WC, Yamamoto Y. 1995. Small-molecule antioxidants in marine organism: antioxidant activity of mycosporine-glycine. *Comp Biochem Physiol* 112B: 105-114.
 - Ryu BH, Kim DS, Cho KJ, Sin DB. 1989. Antitumor activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Korean J Food Sci Technol* 21: 595-600.
 - Park YB, Kim IS, Yoo SJ, Ahn JK, Lee TG, Park DC, Kim SB. 1998. Elucidation of anti-tumor initiator and promoter derived from seaweed-2: investigation of seaweed extracts suppressing mutagenic activity of PhIP and MeIQx. *J Korean Fish Soc* 31: 581-586.
 - Talalay P, Benson AM. 1982. Elvation of quinone reductase activity by anticarcinogenic antioxidants. *Advances in Enzyme Regulation* 20: 287-300.
 - Wefers H, Komai T, Talalay P, Sies H. 1984. Protection against reactive oxygen species by NAD(P)H: quinone reductase induced by the dietary antioxidant butylated hydroxyanisole (BHA). *Federation of European Biochemical Societies* 169: 63-66.
 - Steinkellner HS, Rabot C, Freywald E, Nobis G, Scharf M, Chabicovsky S, Knasmüller, F. Kassie. 2001. Effects of cruciferous vegetable and their constituents on drug metabolizing enzymes involved in the bioactivation of DNA-reactive dietary carcinogens. *Mutation Research* 481: 285-297.
 - Shon H YH, Nam K. 2001. Antimutagenicity and induction of anticarcinogenic phase II enzymes by basidiomycetes. *J Ethnopharmacology* 77: 103-109.
 - Shim SM, Kim MH, Bae SJ. 2001. Cytotoxicity and quinone reductase induced effects of *Daucus carota* L. leaf extracts on human cancer cell. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 86-91.
 - Bae SJ. 2002. The effects of anticarcinogenic activity of *Solanum uberosum* peel fractions. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 905-909.
 - Lee BH, Choi BW, Chun JH, Yu BS. 1996. Extraction of water soluble antioxidants from seaweeds. *J Korean Ind Eng Chemistry* 7: 1069-1077.
 - Ryu BH, Kim DS, Cho KJ, Sin DB. 1989. Antitumor activity of seaweeds toward sarcoma-18. *Korean J Food Sci Technol* 21: 595-600.
 - Koo JG, Jo KS, Do JR, Park JH, Yang CB. 1995. Chemical properties of fucoidans from *hizikia fusiformis* and *Sargassum fulvellum*. *J Korean Fish Soc* 28: 659-666.
 - Nishino T, Yokoyama G, Dobashi K, Fujihara M, Nagumo T. 1989. Isolation, purification, and characterization of fucose-containing sulfated polysaccharides from the brown sea, *Ecklonia kurome* and their blood-anticoagulant activities. *Carbohydr Res* 186: 119-129.
 - Carmichael J, De Graff WG, Gazder AF, Minna JD, Mitchell JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated

- colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47: 936-942.
21. Prochaska HJ, Santamaria AB. 1988. Direct measurement of NAD(P)H: Quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: A screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Anal Biochem* 169: 328-336.
 22. Park HJ. 1998. Induction of quinone reductase and its regulatory mechanism at the transcriptional level by *Scutellaria baicalensis*. *PhD Dissertation*. Yonsei University, Seoul.
 23. Jung MJ, Chung HY, Kang SS, Choi JH, Bae KS, Choi JS. 2003. Antioxidant activity from the stem bark of *Albizia julibrissin*. *Arch Pharm Res* 26: 458-462.
 24. Shim SM, Choi SW, Bae SJ. 2001. Effects of *Punica granatum* L. Fraction on quinone reductase induction and growth inhibition on several cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 80-85.
 25. Park JH, Kang KC, Baek SB, Lee YH, Rhee KS. 1991. Separation of antioxidant compounds from edible marine algae. *Korean J Food Sci Technol* 23: 256-261.
 26. Ramos A, Visozo A, Piloto J, Garcia A, Rodriguez CA, Rivero R. 2003. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. *J Ethnopharmacology* 87: 241-246.

(2003년 11월 10일 접수; 2004년 1월 30일 채택)