

투스분획물의 항균 및 암세포 증식 억제효과

손재학²⁾ · 강대연⁴⁾ · 오현철²⁾ · 정복미³⁾ · 김미향¹⁾ · 신미옥¹⁾ · 배송자¹⁾⁴⁾⁸⁾

신라대학교 식품영양학과,¹⁾ 바이오식품소재학과,²⁾ 여수대학교 식품영양학과,³⁾
마린-바이오 산업화지원센터⁴⁾

The Effects on Antimicrobial and Cytotoxicity of *Hizikia Fusiformis* Fraction

Shon, Jae-Hak²⁾ · Kang, Dae-Yeon⁴⁾ · Oh, Hyun-Cheol²⁾ · Jung, Bok-Mi³⁾
Kim, Mi-Hyang¹⁾ · Shin, Mi-Ok¹⁾ · Bae, Song-Ja¹⁾⁴⁾⁸⁾

Department of Food and Nutrition,¹⁾ Bio-food Material,²⁾ Marine Biotechnology Center for
Biofunctional Material Industries,⁴⁾ Silla University, Busan 617-736, Korea
Department of Food Science and Nutrition,³⁾ Yosu National University, Yosu 550-749, Korea

ABSTRACT

In this study, we investigated antimicrobial and cytotoxicity effects to each fraction extracted from *Hizikia fusiformis* (HF), which were extracted methanol (HFM) and then the extract was fractionated into four different types: hexane (HFMH), methanol (HFMM), butanol (HFMB) and aqueous (HFMA) partition layers. We determined the cytotoxic effect of these layers on human cancer cells by MTT assay. Among various partition layers of HF, the HFMB and HFMM were showed the strong cytotoxic effects on cancer cell lines we used. The quinone reductase (QR) induced activity of the HFMB on HepG2 cells at 150 µg/mL concentration was 2.63 times more effective compared to the control value of 1.0. Although further studies are needed, the present work suggests that HF maybe a chemopreventive agent for the treatment of human cancer cells. (*Korean J Nutrition* 39(5): 444~450, 2006)

KEY WORDS : cytotoxicity, quinone reductase, *Hizikia fusiformis* (HF), cancer cell lines.

서 론

현대 과학의 발달에도 불구하고 암은 사람의 질병 중 가장 우위를 차지하고 있다. 그러나 아직 암의 기작과 확실한 치료방법이 밝혀져 있지 않고 있으며, 암 발생 원인 중 40~60%가 잘못된 식이와 관련 있는 것으로 보고되고 있다.^{1,2)}

암 발병률은 식이요인에 의해 다르게 나타나는 것이 여러 연구에서 보고되어 식이 요인의 중요성이 지적되고 있다. 최근 식이와 관련된 암의 원인물질을 검색하는 연구가 활발히 진행되고 있으며 천연물 대체요법 등 새로운 암 예방 물질의 개발로 예방과 치료의 방향이 전환되고 있는 실정이다.³⁾ 천연물이나 천연물 유래의 중간화합물은 주로 공격적인 암세포들의 증식을 막거나 약화시켜 예방하는데 사용되고 있으며, 이들 물질의 동정과 활성 여부의 판단 및 그 대

처요법의 성공 등은 천연물을 이용한 생물학적 기초를 형성하는데 크게 기여하고 있는 실정이다.⁴⁾

최근에는 천연물의 생리활성 검색이 육상 생물에서 뿐만 아니라 해양 생물에서 활발히 이루어지고 있으며 특히 해조류의 생리활성 성분들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 해조류는 육상의 일반 야채류와 마찬가지로 단백질, 지질, 탄수화물 등 일반 영양성분을 함유하고 있는데, 특히 칼슘, 마그네슘, 요오드, 철, 아연 등 필수 미량원소의 함유량이 높은 것이 특징이다.^{5,6)} 해조류에 함유된 탄수화물이 혈관 내 콜레스테롤 침착 방지 및 장관운동을 원활히 하고 중금속 배출을 촉진시키며 고지혈증의 개선에 유효하다는 등 생리활성 물질의 보고로 알려지면서 새로운 기능성 물질의 장으로 인식되고 있다.^{7,8)} 특히 해조류로부터의 추출물은 식물학적, 약물학적인 관심의 대상이다. 이들 추출물들은 세계의 많은 지역에서 전통적인 치료제로 사용되었으며, 항 미생물학적 작용 외의 항균성을 가지는 것으로 알려져 있다.⁹⁾

본 연구에 사용된 툯 (*Hizikia fusiformis* HF)은 갈조식물 (*Phaeophyta*) 모자반과의 바닷말로 우리나라의 서해안, 남해안 및 제주도에 서식하는 천연자원 식물이다.^{10,11)} 툯은 우

접수일 : 2006년 6월 15일

채택일 : 2006년 7월 12일

⁸⁾To whom correspondence should be addressed.

E-mail : sjbae@silla.ac.kr

수한 식이섬유소의 공급원일 뿐만 아니라 혈액응고작용, 면역증강작용 등의 기능성이 있는 것으로 알려진 중성다당류인 jaminaran과 함황산성 다당류인 fucoidin이 다량 함유되어있다. 그 외 항산화작용, 항균작용 등이 있으며 칼슘 등의 무기질 함량도 높아 각종 성인병 및 만성질환의 예방 및 치료에 우수한 기능성 건강식품 소재로의 이용이 기대된다.^{12,13)} 톳의 생리활성에 대한 연구는 주로 일본에서 많이 이루어졌으며, 한국에서의 톳에 대한 연구는 양식을 위한 배양조건, 화학적 특성, 식이 섬유소 함량조사 등의 실험이 행해져 왔다.¹⁴⁻¹⁶⁾ 본 실험에서는 식용으로 애용되는 해조류 중 톳의 생리활성을 규명하기 위하여 항균활성, 암세포성장저지 및 암 예방 효과를 측정함으로써 식품이 가지는 식의약 생리활성기능이 암 예방 차원에서의 역할과 나아가 현대인의 식생활에서 질병치유와 건강한 삶의 기능성 소재로서의 효능을 연구·보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험 재료 및 시약

본 실험에 사용한 톳 (*Hijikia fusiformis* HF)은 2005년 3월 가장 재래시장에서 구입하였다. 이 시료를 추출·분획하여 인체암 세포주에 대한 암세포 증식억제 효과 (cytotoxicity) 및 quinone reductase (QR) 유도활성 효과 (QR induced effect), 항균활성 (antimicrobial) 효과 검색에 사용하였다.

세포실험에 사용된 시약 중 NP-40과 menadione은 Sigma사, 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.

2. 시료의 추출

시료로 사용된 톳 (*Hijikia fusiformis* HF)은 동결건조 후 시료와 methanol을 1 : 5 (W/V)로 첨가한 후 상온에서 2회 추출하고, 극성과 비극성 다시 선별 물질을 추출하기 위하여 ethanol과 dichloromethane (CH₂Cl₂)을 1 : 1로 섞은 용액에 2회 추출한 후 회전식 진공농축기로 감압 농축시켜 동결건조 후 톳의 추출물 (HFMM)로 본 실험에 사용하였다.

3. 시료의 분획물 제조

톳 추출물 (HFMM)을 비극성용인 hexane 층 (HFMMH), 극

성용인 methanol 층 (HFMM), 약한 극성용인 butanol층 (HFMB), 강한 극성용인 aqueous 층 (HFMA)으로 나누어 비극성에서 극성쪽으로 계통 분획하고 각 분획층을 감압 농축 후 동결 건조하여 분말로 만들어 시료로 사용하였다.

4. 추출물의 용매 분획별 항균활성 측정

계통분획 추출물의 항균성 검색은 paper disc method¹⁷⁾를 이용하였으며, 사용균주는 단백질 식품과 식중독 원인균인 *Proteus mirabilis*, 식중독 원인균인 *Staphyrococcus aureus*, 단백질 식품 부패 원인균인 *Serratia marcescens* 균과 *Bacillus subtilis* 및 *Proteus vulgaris* 이었으며, 각 균의 생육 및 보존을 위해 사용한 배지는 Nutrient agar (Difco) Yeast extract을 사용하였다. 항균성 시험용 평판배지는 멸균 후 petri dish에 20 mL씩 분주하여 응고시키고 전배양한 각종 시험균을 무균적으로 첨가하여 기층용 배지 위에 다시 10 mL씩 분주하여 2중의 평판배지를 만들었다. 각 용매 분획별 추출물의 농도를 500에서 2000 µg/mL로 증량시키면서 멸균된 disc (직경 8 mm, Toyo Roshi Kaisha, Ltd.)에 흡수, 건조시켜 균주가 도말된 plate 표면에 올려놓은 후 37°C incubator에서 24시간 배양하여 disc 주위에 생성된 clear zone의 직경 (mm)으로부터 각 분획물의 항균활성을 측정하였으며 이 실험을 5회 반복하여 평균치를 나타내었다.

5. 암세포 배양

본 실험에 사용한 암세포주는 인체 유방암 세포인 MCF-7 (human breast adenocarcinoma pleural effusion), 간암 세포인 HepG2 (human hepatocellular carcinoma), 및 대장암 세포인 HT-29 (human colon adenocarcinoma)로서 2005년 1월 부산대학 병원으로부터 분양 받아 사용하였다. HepG2, MCF-7세포주는 DMEM medium, HT-29 세포주는 RPMI1640 medium에 10%의 fetal bovine serum (FBS)와 1% 100 units/mL의 penicillin streptomycin 10 mL가 함유된 것으로 T-75 flask에 이식한 후, 37°C 5% CO₂ incubator에서 monolayer로 배양하였다.

위 3종의 세포주는 일주일에 2~3회 정도 새로운 배지로 교환하고 flask에 암세포가 5 × 10⁴ cells/mL 정도 증식되면 phosphate buffered saline (PBS, pH7.0)으로 2번 세척한 후 trypsin-EDTA를 처리하여 바닥에서 세포를 분리한 후, 배양액으로 암세포가 골고루 분산되도록 희석하여 T-75 flask에 10 mL씩 분할하여 주입하고 4~5일마다 계대배양하면서 실험에 사용하였다. 계대 배양 시 각각의 passage number가 10회 이상일 때는 액체질소탱크로부터 새로운 세포를 꺼내어 다시 배양하여 실험하였다.

6. 암세포 증식 억제 효과 (Cytotoxicity) 측정

톨 추출 분획물의 암세포 증식 억제 효과는 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT assay))를 사용하여 행하였다.^{18,19)} 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 60, 120, 180, 240 및 300 µg/mL의 농도로 첨가하였다. 일정시간 동안 배양한 후 각 well에 PBS 완충액에 녹인 MTT 용액을 100 µL씩 첨가하여 4시간동안 다시 배양시킨 후, well 바닥에 형성된 formazan이 흩어지지 않게 상등액을 제거하고 DMSO와 ethanol을 1 : 1로 혼합한 용액 1 mL를 첨가하여 천천히 녹인 후 Multi-detection microplate를 이용하여 570 nm에서 측정하였다. 대조군 세포수를 100%로 정하고 상대적인 세포성장 억제율을 구하였다.

7. Quinone reductase (QR) 유도 활성 측정

Quinone reductase는 phase II 무독화 효소 중의 하나로 돌연변이 또는 발암물질 등에 의한 DNA와의 상호 작용을 차단하는 효소이며, NAD (P)H를 이용하여 quinone류의 환원을 촉매하는 flavoprotein이다.²⁰⁾

QR생성 유도 효과는 Prochaska와 Santamaria²¹⁾의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. T-75 flask의 세포가 80% 이상 증식하게 되면 24 well plate의 각 well에 1×10^4 cells/mL되도록 HepG2 세포주를 분주하여, incubator에 24시간동안 배양한 후 톨 분획물을 HepG2의 세포생존율이 50%되는 양을 final 농도로 잡아 각각 DMSO에 녹여 30, 60, 90, 120 및 150 µg/mL의 농도로 첨가하고 다시 24시간동안 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 well에 1 mL씩 첨가하여 5분 동안 반응시킨 후, 반응 정지 용액인 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 흡광도를 측정하여 계산하였다.

단백질량은 동일한 set의 well plate에 대한 crystal violet 염색 방법으로 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% ethanol) 용액을 1 mL씩 가하여 37°C incubator에 1시간 방치한 후 610 nm에서 흡광도를 측정하였다.

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

*Specific quinone reductase (QR) activity

$$= \frac{\text{absorbance change of MTT/min}}{\text{absorbance of crystal violet}} \times 3,345 \text{ nmol/mg}$$

결과 및 고찰

1. 톨 추출물의 각 용매별 분획물 수율

식용으로 애용되고 있는 해조류인 톨 (HF)을 메탄올로 2회, 다이클로로메탄과 에탄올을 1 : 1로 섞은 용매에 2회 추출하여 분획물 (HF_M)을 얻고, 이 추출물을 분획하여 hexane (HF_{MH}) methanol (HF_{MM}) butanol (HF_{MB}) 및 aqueous (HF_{MA})의 용매별로 분획하였으며, 각 시료의 용매별 수득율은 Table 1과 같다.

2. 항균활성 측정

톨 분획물을 단백질 식품 부패 원인균인 *Proteus mirabilis* 식중독 원인균인 *Staphylococcus aureus*, 단백질 식품 부패 원인균인 *Serratia marcescens*, 부패균인 *Bacillus subtilis*, *Proteus bulgaris* 등 5가지 균종에 처리하여 항균력을 조사한 결과 Table 2와 같다. 각 균주별로 살펴보면 단백질 식품 부패 원인균인 *Proteus mirabilis*의 경우 HF_{MH}층에서 가장 높은 항균효과를 나타내었고, 다음으로 HF_{MM}층에서도 높은 항균활성을 나타내었다. 즉 HF_{MH}의 경우 시료첨가 농도 500 µg/mL에서 16.08 mm의 clear zone을 형성

Table 1. Yields (%) of various solvent fractions of *Hisikia fusiformis*

Fraction	Yields (g)	Yields (%)
Extract	44.55	44.55
Hexane fr.	0.63	1.41
Methanol fr.	0.54	1.21
n-Butanol fr.	0.32	0.71
Aqueous fr.	1.03	2.31

하여 아주 높은 항균력을 나타내었으며 HFMM의 경우 시료 첨가농도 1000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 11.02 mm의 높은 항균력을 보였으나 다른 분획층에서는 전혀 항균효과를 관찰할 수 없었다. 그리고 식중독 원인균인 *Staphylococcus aureus*에서는 HFMA층에서만 유의성 있는 항균력을 볼 수 있었을 뿐 다른 층에서는 거의 항균활성을 볼 수 없었다. 그리고 그의 *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis*, *Proteus bulgaris* 균주에서도 항균활성이 거의 없었다.

이상의 결과로 단백질 식품부패균인 *Proteus mirabilis*와 식중독 원인균인 *Staphylococcus aureus*에서 높은 항균활성을 나타냈으므로, 앞으로 항균활성을 나타내는 각각의 분획층에서의 항균활성 물질을 규명하여 이들 활성 성분을 이용한 천연 항균 식품 보존제 등의 기능성소재로서의 개발이 기대되어 진다.

3. 암세포 증식억제 효과 (Cytotoxicity)

본 실험에서는 암세포 3종을 이용하여 각 시료를 첨가시켰을 때의 MTT assay를 이용하여 암세포 증식억제 효과를

Table 2. Antimicrobial activities of various partition layers of the *Hisikia fusiformis*

Stains	Fractions ¹⁾ (mg/mL)	Clear zone on plate (mm) ²⁾			
		HFMM	HFMA	HFMB	HFMH
<i>Proteus mirabilis</i>	0.5	+	-	-	+++
	1.0	++	-	-	++
	1.5	+	-	-	+++
	2.0	+++	-	-	++
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.5	-	++	-	-
	1.0	-	+	-	-
	1.5	-	+	-	-
	2.0	+	+++	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	0.5	-	-	-	-
	1.0	-	-	-	-
	1.5	-	-	-	-
	2.0	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	0.5	-	-	-	-
	1.0	-	-	-	-
	1.5	-	-	-	-
	2.0	-	-	-	-
<i>Proteus bulgaris</i>	0.5	-	-	-	-
	1.0	-	-	-	-
	1.5	-	-	-	-
	2.0	-	-	-	-

¹⁾HFMM: methanol Partition layer of methanol extracts of *Hisikia fusiformis* (HF), HFMA: aqueous layer of HF, HFMB: butanol Partition layer of HF, HFMH: hexane Partition layer of methanol extracts of HF.

²⁾Treated sample was adsorbed into paper disk (8 mm, diameter) and the diameter (mm) of clear zone was confirmed around the colony. Growth inhibition size of clear zone; +++: larger than 12 mm, ++: 10-12 mm, +: smaller than 10 mm, -: not detected

보았으며, 사용한 암세포는 유방암 세포인 MCF-7, 간암 세포인 HepG2, 대장암 세포인 HT-29를 사용하여 암세포 증식억제 효과를 비교 검토하였다.

Fig. 1은 MCF-7 세포주에 각층별 시료 분획물을 60, 120, 180, 240 및 300 $\mu\text{g/mL}$ 씩 농도별로 가하여 48시간 동안 처리했을 때의 암세포 증식 억제 효과를 나타낸 그림으로 모든 층에서 농도 의존적으로 암세포 증식 억제 효과를 보였다. 여러 분획층 중에서 HFMB층에서 가장 높은 암세포 증식 억제 효과를 보였으며 다음으로 HFMM층에서도 암세포 증식 억제 효과를 보였다. 즉 HFMB층의 경우 낮은 농도인 30 $\mu\text{g/mL}$ 첨가에서부터 농도 비례적으로 그 억제효과가 증가하여 240 및 300 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 65.5, 79.48%의 가장 높은 암세포 증식억제 효과를 나타내었다. Fig. 2는 HepG2에 대한 결과로 이 세포주에서는 각 분획별 시료를 60~300 $\mu\text{g/mL}$ 첨가 시 다른 세포주에 비해서 가장 높은 저해 효과를 나타내었다. HFMB층의 효과가 가장 높았

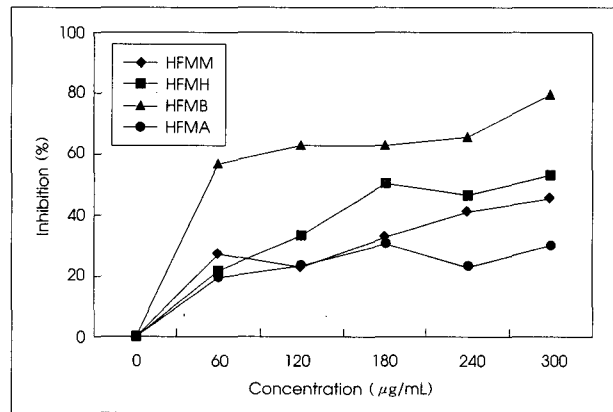


Fig. 1. Inhibitory effect on cell survival of the each fractions from the methanol extract of *Hisikia fusiformis* (HF) on MCF-7 cells.
¹⁾HFMM: methanol Partition layer of methanol extracts of *Hisikia fusiformis* (HF), HFMA: aqueous layer of HF, HFMB: butanol Partition layer of HF, HFMA: aqueous layer of HF.

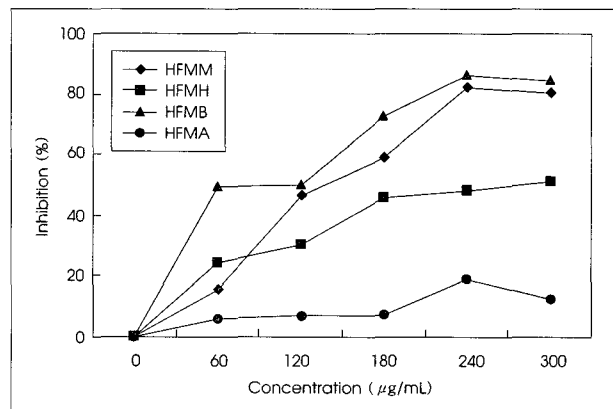


Fig. 2. Inhibitory effect on cell survival of the each fractions from the methanol extract of *Hisikia fusiformis* (HF) on HepG2 cells.

고 그 다음으로 HFMM층으로, 최종농도 300 $\mu\text{g/mL}$ 에서 HFMB와 HFMM은 각각 84.74%, 80.23%의 거의 비슷한 높은 효과를 보였다.

HT-29에 대한 실험 결과는 Fig. 3에 나타내었으며 앞의 두 세포주 MCF-7, HepG2에 비해서 다소 낮은 암세포 증식억제를 보였으나 HFMB에서 역시 가장 높은 활성효과를 나타내었다.

상의 결과를 종합하여 볼 때 용매별로 분획한 4가지의 톳 분획물이 각 암세포주에 미치는 증식 억제 효과는 톳의 methanol 분획층인 HFMM층과 butanol층인 HFMB층의 효과가 높았으며, 전반적으로 HFMB층이 HFMM층보다 암세포 증식억제효과는 조금 더 높게 나타났다. 이와 같은 결과로 미루어 볼 때 톳의 암세포 성장 저지를 일으키는 생리활성 물질은 톳의 약한 극성 물질이 녹아있는 methanol

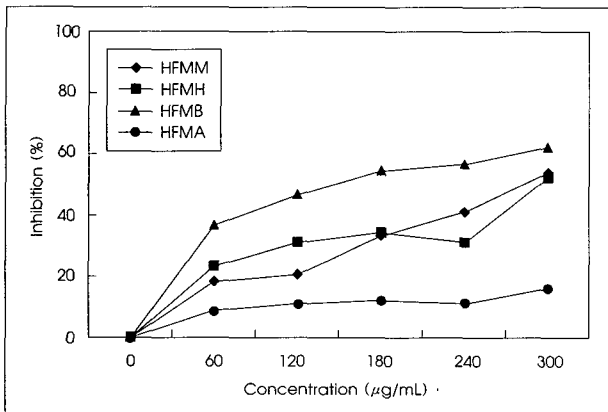


Fig. 3. Inhibitory effect on cell survival of the each fractions from the methanol extract of *Hisikia fusiformis* (HF) on HT-29 cells.

층과 극성 물질이 녹아 있는 butanol층에 주로 존재한다고 추측해 볼 수 있었다. 그리고 세포의 종류를 비교해 볼 때 간암세포주인 HepG2에서 가장 높은 효과를 나타내어 특히 간암에 대한 예방효과도 생각해 볼 수 있었다. 앞으로 더욱 심도 있는 연구를 통해 이들 분획층의 생리활성 물질을 규명하고 구조 동정과 그 기전을 알아보려고 한다.

4. Quinone reductase 유도활성 효과

Quinone reductase (QR) 유도 활성 측정을 보다 신속하고 정확하게 측정하기 위해 본 실험에서는 유일하게 QR 유도활성을 가진 인체간암세포주인 HepG2를 사용하여 실험을 행하였으며, 그 결과는 Fig. 5에 나타내었다.

HepG2 세포주에 톳시료의 각 분획물을 60, 90, 120, 150 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 첨가했을 때 각 첨가물의 농도에 따라서 농도 의존적으로 QR 활성이 증가하는 경향을 보였으며, 특히 butanol 분획층인 HFMB에서 아주 좋은 QR 유도 활성효과를 나타내었고, 그 다음으로는 HFMM에서 QR 유도 활성효과가 서서히 증가하였다. 특히 butanol 분획층 HFMB의 경우 용매 대조군을 1.0으로 하여 비교한 결과, 90, 120 및 150 $\mu\text{g/mL}$ 의 시료첨가 농도에서 각각 1.76, 2.57 및 2.63으로 농도 의존적인 QR 유도활성효과를 나타내었으며, HFMM의 경우는 120, 150 $\mu\text{g/mL}$ 의 시료 첨가 시 각각 1.51, 1.94를 나타내었다.

이와 같은 결과는 Bae²²⁾에 의해 연구된 여주 분획성분의 항 발암 효과에 대한 결과와 비슷하였으며 본 연구에서 사용한 톳 분획물 중 극성 butanol 용매층인 HFMB에서 QR 유도효과가 제일 높았으므로 이 분획층에서의 quinone re-

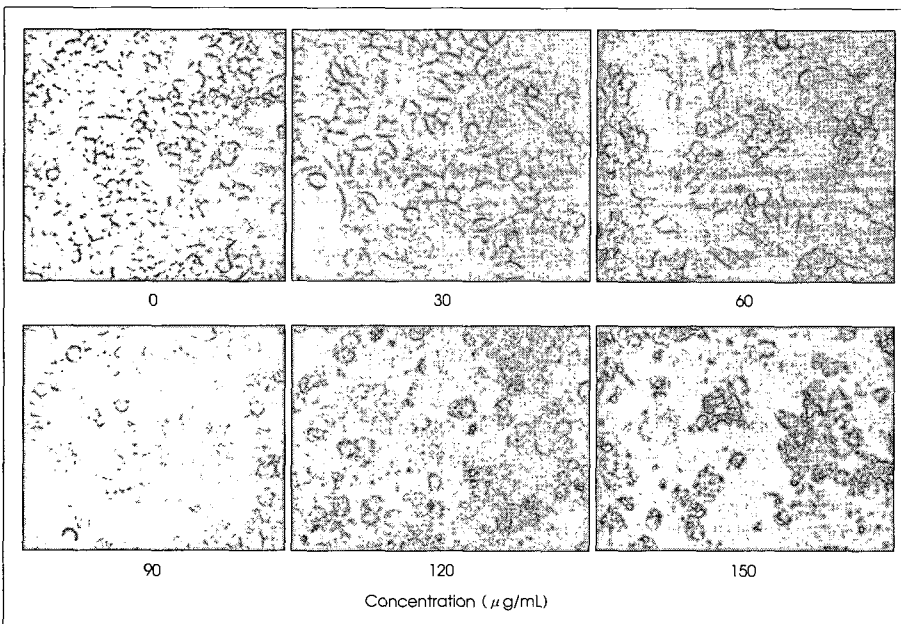


Fig. 4. Morphological changes of HepG2 human hepatocellular carcinoma cells following incubation with HFMM. Exponentially growing cells were incubated with HFMM for 48h. Cell morphology was visualized by light microscopy ($\times 200$).

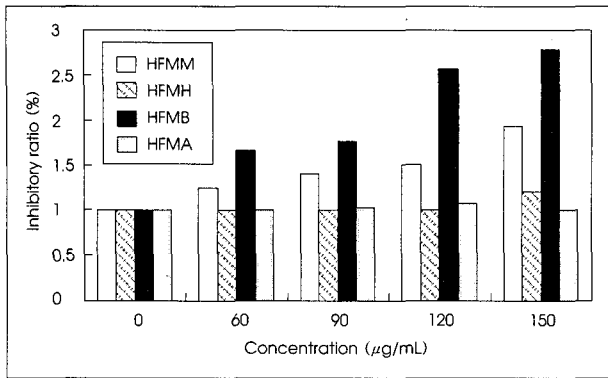


Fig. 5. Effect of various partition layers of HF on the induction of quinone reductase in HepG2 cells.

ductase inducer가 존재함을 추정할 수 있었고 앞으로 더욱 더 심도 있는 연구를 통해 톳 분획물 중의 생리활성 물질을 추적, 보완하여 그 구조를 동정함으로써 식품산업에 있어서의 암예방 효과를 지닌 기능성 식품개발에 매우 중요한 자료가 될 수 있을 것으로 사료된다.

5. 세포의 형태학적 관찰

Fig. 4는 톳의 HFMM층을 일정량 HepG2 세포주에 첨가했을 때, 각 세포주의 형태가 어떻게 변화하는지 알아보기 위하여 여러 농도별 시료를 가하여 48시간동안 처리 후 위상차 현미경을 이용하여 암세포주의 괴사 형태를 관찰한 결과이다. 이 사진에서 관찰할 수 있듯이 톳 분획물의 농도 증가에 따른 암세포의 심한 형태적 변형과도 연관성이 있었는데, 저농도 처리군에서는 전체적으로 세포질이 응축되면서 짧고 많은 가지를 친 듯한 모양으로 바뀌었으며, 이러한 dendrite-like한 형태가 더욱 신장되면서 고농도 처리군에서는 암세포들의 부착력이 상실됨을 알 수 있었고 파괴된 세포 잔여물들이 뚜렷이 관찰되었다. HepG2 세포주에서와 같이 MCF-7과 HT-29 세포주에서도 같은 경향을 보였는데 (Data not shown), 이것으로 보아 암세포의 심한 형태적 변형의 정도는 톳 분획물의 처리에 따라 암세포 성장억제가 진행되었음을 보여준다고 할 수 있겠다.

요약 및 결론

본 실험은 해조류의 하나인 톳을 추출 후 각 용매별로 분획하여 항균효과, 암세포 성장억제 효과 및 QR 유도활성 효과 등 생리활성을 연구하였다. 톳 분획물의 항균효과를 조사한 결과, 단백질 식품 부패균인 *Proteus mirabilis*에서는 hexan 분획층과 methanol 분획층인 HFMH, HFMM에서 높은 항균 활성을 나타내었고 식중독 원인균인 *Staphy-*

*lococcus aureus*에서는 수용액층인 HFMA에서 항균활성을 나타내었으며, 톳 분획물을 이용하여 3종의 인체 암세포주 MCF-7, HepG2, 및 HT-29에 대한 암세포 증식억제 실험을 한 결과 사용한 3종의 암세포주에서 모두 시료첨가 농도에 의존적으로 증식저지 효과가 나타났고, 특히 톳의 butanol 분획층과 methanol 분획층인 HFMB, HFMM에서는 낮은 농도의 시료 첨가에도 불구하고 높은 암세포 성장 억제효과를 나타내었다. 또한 본 시료는 3종의 인체 암세포 중 간암세포인 HepG2에서 암세포 성장저지효과가 탁월하였다. 한편 사용한 3가지 암세포 중 유일하게 quinone reductase를 가지고 있는 HepG2를 이용한 암예방 지표인 quinone reductase 효소 유도 활성 여부를 측정할 결과 분획물 첨가농도를 30, 60, 90, 120 및 150 µg/mL로 첨가하였을 때 HFMB의 첨가농도 60 µg/mL에서 대조군에 비해 약 1.7배 이상의 높은 QR유도효과를 나타내었고, 최종농도 150 µg/mL에서는 2.6의 암예방 QR 유도효과를 나타내었다.

본 실험의 결과, 톳분획물의 천연 항균 식품 보존제로서의 개발 가능성이 기대되어지며, 암세포 성장 억제효과는 butanol 분획층과 methanol 분획층인 HFMB, HFMM에서 높았고, butanol 분획층인 HFMB에는 quinone reductase inducer가 있는 것으로 사료되며, 나아가 단계적인 생리활성 물질의 분리 동정이 계속 이루어져야 할 것으로 사료된다.

Literature cited

- 1) Ong TM, Whong WZ, Stewart S, Brockman HE. Chlorophyllin; a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixture. *Mutat Res* 173: 111-115, 1986
- 2) Park BJ, Suk HS, Chung GS, Sohn JK. Studies on protoplast culture and fusion in cruciferae. *Korean J Breed* 19: 23-234, 1987
- 3) Cho SG. Food chemoprevention and immunoactivity. *J Food Industry and Nutrition* 2(1): 56-101, 1997
- 4) Reddy L, Odhav B, Bhoola KD. Natural products for cancer prevention a global perspective. *Pharmacology and Therapeutics* 99: 1-13, 2003
- 5) Nishizawa K, Murasugi S. Kaisounohon. Kenseisa, Tokyo, p.215, 1988
- 6) Cho DM, Kim DS, Lee DS, Kim HR, Pyeun JH. Trace components and functional saccharides in seaweed-1. Changes in proximate composition and trace element according to the harvest season and places. *Bull Korean Fisheries Soc* 28: 49-59, 1995
- 7) Ebihara K, Kiriya S. Physiochemical property and physiological function of dietary fiber. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 37: 916-925, 1990
- 8) Kim HS, Kim GJ. Effects of the feeding *Hijikia fusiforme* (Har-

- vey) Okamura on lipid composition of serum in dietary hyperlipidemic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 718-723, 1998
- 9) Abdussalam S. Drugs from seaweeds. *Med Hypotheses* 32: 33-35, 1990
 - 10) 조재선. 식품재료학. 기전연구사, 서울, p.336, 1998.
 - 11) 동아원색세계대백과사전. 동아출판사, 서울, 28권, p.202. 1983
 - 12) Hurch FC, Meade JB, Treanor RE, Whinna HC. Antithrombotic activity of fucoidin with heparin cofactor II, antithrombin III and thrombin. *J Biol Chem* 6: 361-375, 1989
 - 13) Kim KI, Seo HD, Lee HS, Jo HY, Yang HC. Studies on the blood anticoagulant polysaccharide isolated from hot water extracts of *Hizikia fusiforme*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 1204-1210, 1998
 - 14) Hwang EK, Park CS, Shon CH. Concentrations on the early growth of *Hizikia furmis* (Phaeophyta). *Bull Korean Fisheries Soc* 10: 199-211, 1997
 - 15) Koo JG, Jo JS, Do JR, Park JH, Yang CB. Chemical properties of fucoidans from *Hizikia fusiformis* and *Sargassum fulvellum*. *Bull Korean Fisheries Soc* 28: 659-666, 1995
 - 16) Do JR, Kim EM, Koo JG, Jo KS. Dietary fiber contents of marine algae and extraction condition of the fiber. *Bull Korean Fisheries Soc* 30: 291-296, 1997
 - 17) Davidson PM, Parish ME. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technol January*, pp.148-155, 1989
 - 18) Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbrott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell line using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* 48: 589-601, 1988
 - 19) Carmichael J, De Graff WG, Gazder AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47: 936-942, 1987
 - 20) Steinkellner H, Rabot S, Freywald C, Nobis E, Scharf G, Chabicovsky M, Knasmuller S, Kassie F. Effect of cruciferous vegetable and their constituents on drug metabolizing enzymes involved in the bioactivation of DNA-reactive dietary carcinogens. *Mutat Res*, pp.480-481, 2001
 - 21) Prochaska HJ, Santamaria AB. Direct measurement NAD (P)H. Quinone reductase from cells cultured in microtiter wells. A screening assay for anticarcinogenic enzyme inducer. *Anal Biochem* 169: 328-336, 1988
 - 22) Bae SJ. The Effects on Antimicrobial and Anticarcinogenic activity of *Momordica Charantia L.* *Korean J Nutrition* 35 (8): 880-885, 2002