

## 된장 분획물의 항돌연변이 및 암세포 증식 억제효과와 interleukin-2 생성에 미치는 영향

임선영\* · 김광혁<sup>1</sup> · 박건영<sup>2</sup> · 이숙희<sup>2</sup>

한국해양대학교 해양환경생명과학부, <sup>1</sup>고신대학교 의학부 미생물학교실, <sup>2</sup>부산대학교 식품영양학과

Received March 16, 2007 / Accepted March 29, 2007

**Effect of Solvent Fractions from Doenjang on Antimutagenicity, Growth of Tumor Cells and Production of Interleukin-2.** Sun Young Lim\*, Kwang Hyuk Kim<sup>1</sup>, Kun Young Park<sup>2</sup> and Sook Hee Lee<sup>2</sup>. *Division of Marine Environment & Bioscience, Korea Maritime University, <sup>1</sup>Dept. Microbiology, Kosin Medical College. <sup>2</sup>Dept. of Food Science and Nutrition, Busan National University* – We studied the inhibitory effect of solvent fractions from doenjang on mutagenicity using *Salmonella typhimurium* TA 100 in Ames test. We also investigated the effect of solvent fractions from doenjang on the growth of tumor cells and the production of interleukin-2 (IL-2). The treatment of dichloromethane and ethylacetate fractions (2.5 mg/assay) from doenjang to Ames test system inhibited aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) induced mutagenicity by 96% and 97%, respectively, and showed a higher antimutagenic effect than other solvent fractions. In case of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) induced mutagenicity, the ethylacetate fraction showed the highest inhibitory effect (by 75%) among the other solvent fractions, although the inhibitory effect was not stronger compared to AFB<sub>1</sub> induced mutagenicity. The treatment of dichloromethane and ethylacetate fractions markedly inhibited the growth of Yac-1 (by 80% and 94%, respectively) and sacroma-180 cancer cells (by 60% and 96%, respectively) after 4 days of incubation at 37°C. To elucidate the immunological mechanism of antitumor activity of doenjang, spleen cells of Balb/c mouse were exposed to the dichloromethane and ethylacetate fractions for 24 hours at 37°C. The culture supernatants following the treatment of dichloromethane and ethylacetate fractions to spleen cells increased the production of IL-2. These results indicated that the anticarcinogenic effect of doenjang was mediated by the production of IL-2.

**Key words** – Doenjang, Ames test, antimutagenicity, anticarcinogenicity, interleukin-2

### 서 론

된장은 한국의 대표적인 대두 발효 식품 중의 하나로 아미노산 조성이 우수한 질 좋은 단백질과 지방 성분으로는 불포화지방산 형태로 구성되어 있고 콜레스테롤 함유량이 낮아 동물성 지방질에 의한 동맥경화나 심장질환 등을 유발할 염려가 없으므로 현대인들을 위한 웰빙 식품이라고 할 수가 있다. 대두 속에 함유된 linolenic acid 등과 같은 불포화지방산들은 콜레스테롤이 체내에 쌓이는 것을 방지하고 혈액의 흐름을 원활히 하는 역할을 한다고 알려져 있다[9,27]. 된장은 원료인 대두에서부터 장기간 숙성 과정을 거치므로 대두가 가지고 있는 여러 활성 물질들 이외에도 발효과정동안 원재료인 대두에서는 존재하지 않았던 혹은 함량이 적은 활성 성분들이 생성되거나 증가되는 것으로 여겨진다. Park 등[26]의 연구에 따르면 청국장, 고추장 및 미소와 같은 된장 이외의 대두 발효식품들과 항돌연변이 효과를 비교한 결과 된장 메탄을 추출물에 의한 돌연변이 억제효과가 가장 우수하였고 발표하였다. Yoon 등[32]의 SOS chromotest 연구에서도 원재료인 대두와 대두 발효식품들의 항돌연변이성을 비교했

을 때 원재료인 대두보다 된장과 청국장의 돌연변이 억제 효과가 높았다고 보고하였다. 암세포 증식 억제효과 및 DNA 합성 저해효과 실험들에서도 된장 메탄을 추출물이 기타 대두 발효식품들의 메탄을 추출물들에 비해 인체 위암 및 결장암 세포의 증식을 크게 억제시켰음이 보고되었다[17]. 된장의 항산화효과에서 Choi 등[5]도 된장, 메주 및 대두 메탄을 추출물의 항산화효과를 비교 검토한 결과 된장 메탄을 추출물에 의한 아질산염 소거능이 가장 높았다고 보고하였다. 따라서 된장은 별짚과 자연히 메주에 붙은 미생물에 의해 발효과정동안 대두의 고분자 영양소가 분해되고 맛과 소화력 및 생리활성이 증가된 발효식품으로 전환되어 발암물질에 의한 돌연변이를 억제하여 암을 예방하는 식품이라고 여겨진다.

면역능력은 영양상태에 의해 영향을 받아 영양불량 상태에서는 숙주의 면역능력이 감소되고 적절한 영양 섭취의 경우 면역능력이 증가되는 것으로 알려져 있다. 외부 항원에 대한 면역반응은 여러 면역세포의 상호작용에 달려있으며 이러한 세포간의 협력은 cytokine이라는 단백질이 중재하므로 중재자의 생성과 분비가 면역반응 조절에 중요한 의미를 갖게 된다. Cytokine은 lymphocyte 이외의 endothelial cell, fibroblast, keratinocyte에서 분비되며 열, 염증, 통증, 대사이상, 조직분해, 식욕부진, 쇼크, 사망원인 등과 관련이 있다 [21]. 현재 12가지 이상의 cytokine들이 규명되었으나 대부분

\*Corresponding author

Tel : +82-51-410-4757, Fax : +82-51-404-3988

E-mail : sylim@hhu.ac.kr

최근에 밝혀진 것으로 기능이 많이 알려져 있지 않으나 그 중에서 interleukin-1, interleukin-2, interleukin-6 및 tumor necrosis factor 등을 중심으로 그 기능들이 알려져 있다[21]. 최근에는 독성이 없는 식품소재 또는 천연물로부터 추출한 유효성분이나 기존의 한방제의 효능검증을 통해 면역조절물질 개발 연구가 활발히 진행 중이다[3,4,33]. 면역조절물질은 비특이적으로 면역세포들을 자극하여 생체의 면역기능을 증진시킴으로써 질병 요인으로부터 생체의 방어력을 증강시키는 것이다[12]. 그 한 예로 lentinan, schisofilan, polysaccharide K, ginsan 등과 같은 식물체의 고분자 물질인 다당류는 면역 반응을 향상시키기 위하여 면역조절계의 하나 또는 그 이상의 구성요소를 간접적인 방법을 통해 조절시킨다고 보고되었다[1,14,19,30,33]. 따라서 본 연구에서는 된장을 극성이 다른 유기용매로 분획하여 Ames test에서 돌연변이원들에 대한 돌연변이 억제 효과를 알아보고자 하였고 마우스 림프종 세포주인 Yac-1과 복수암 세포인 sarcoma-180의 증식에 대한 된장 분획물의 효과를 측정함으로써 암세포의 증식에 대한 된장 분획물의 직접적인 효과를 검토하였다. 또한 된장에 의한 면역 기능 개선 효과에 대해서는 잘 알려져 있지 않으므로 면역과정의 생물학적 작용과 대사적 변화를 유도하는 interleukin-2 (IL-2)의 생성에 대한 영향도 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 된장의 용매 추출 및 분획

된장은 화염식품(주)으로부터 구입하여 동결 건조한 후 분말(4080 g)로 만들었고 hexan으로 3회 추출하고 잔사물(3975 g)을 2배의 메탄올로 95°C에서 환류냉각기를 사용하여 3회 추출(836 g)하였다. 회전식 진공 농축기(Buchi, Switzerland)를 이용하여 농축한 후, 다시 디클로로메탄(dichloromethane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), 에틸아세테이트(ethylacetate, EtOAc) 및 부탄올(Butanol, BuOH) 순서로 분획할때기를 이용하여 분획한 후 회전식 진공 농축기로 용매를 제거하고 각각 디클로로메탄 분획물(104 g), 에틸아세테이트 분획물(27 g), 부탄올 분획물(91 g) 및 물 분획물(614 g)을 얻었다. 각각의 분획물은 회전식 진공 농축기로 완전히 용매를 제거 한 후 dimethylsulfoxide (DMSO)에 녹여 실험에 사용하였다.

### Ames 돌연변이 유발실험

*Salmonella typhimurium* TA100은 *S. typhimurium* LT-2의 histidine auxotroph로서 미국 California 대학의 B.N. Ames 박사로부터 제공받아 정기적으로 histidine 요구성, deep rough (*rfa*) 돌연변이, *uvrB* 돌연변이, R factor 등의 유전형질을 확인하면서 실험에 사용하였다. 간접 돌연변이 유발물질인 aflatoxin (AFB<sub>1</sub>)은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 DMSO에 녹여 실험에 사용하였고

직접 돌연변이원인 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)는 Sigma Chemical Co.에서 구입하여 증류수에 녹여 실험에 사용하였다. 간접돌연변이원인 AFB<sub>1</sub>의 경우 활성화화를 위하여 Maron과 Ames의 방법[20]에 따라 S9 mixture를 첨가하였다. 항돌연변이 실험은 미리 건열 멸균시킨 glass cap tube에 S9 mix 혹은 phosphate buffered saline (PBS) 0.5 ml, 하룻밤 배양된 균주 0.1 ml (1~2×10<sup>9</sup> cells/ml)와 돌연변이 유발물질 (50 μl)을 가한 후, 시료를 1.25 mg/plate 가하여 37°C에서 20분간 예비 배양한 다음 histidine/biotin이 첨가된 top agar (45°C) 2 ml씩을 가하고 vortex하여 minimal glucose agar plate에 도말하고 37°C에서 48시간 배양한 후 revertant 숫자를 계수하였다. 돌연변이 억제효과의 정도(inhibition rate)는 아래식에 의해 계산하였다[2].

$$\text{Inhibition rate (\%)} = 100 \times [(a-b)/(a-c)]$$

여기서 a는 돌연변이원에 의해 유도된 복귀돌연변이원수, b는 시료를 처리하였을 때의 복귀돌연변이의 수이며, c는 돌연변이원과 시료가 없을 경우의 자연복귀돌연변이원의 수이다.

### 암세포 배양 및 증식 억제효과

복수암 세포인 sarcoma-180 세포는 실험동물의 복강 내에서 1주일 간격으로 계대 배양하여 보존하면서 실험에 사용하였다. 즉 실험동물의 복강 내에서 1주일간 배양된 sarcoma-180 세포를 복수와 함께 취하고 PBS로 헹구고 후 원심분리하여 분리하였다. 분리된 세포를 PBS에 다시 부유시켜 원심분리하고 상등액을 제거한 후 1×10<sup>6</sup> cells/ml의 sarcoma-180 세포 부유액을 만들어 1 ml씩 복강 주사하여 이식 보존하였다. 암세포에 대한 증식 억제 효과를 알아보기 위하여 1×10<sup>6</sup> cells/ml의 농도로 실험동물에 복강 주사하여 10일 후 그들의 복강으로부터 채취한 sarcoma-180 세포를 각각 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM glutamine 및 penicillin-streptomycin이 함유된 RPMI 1640 배지에서 1×10<sup>4</sup> cells/ml이 되도록 세포수를 조정된 후 96 well plate에 seeding하고 24시간 배양한 후 시료 추출물을 첨가한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 배양 4일 후에 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 10 μl를 첨가하고 4시간 동안 발색시켰다. 다시 0.02 N의 HCl 용액에 10%의 농도로 녹인 sodium dodecyl sulfate (SDS) 용액 250 μl를 첨가하여 실온에서 하룻밤 방치한 후 microplate reader (Model 550 microplate reader, Bio-Rad, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도값(OD)을 대조군과 비교하였다[24].

### 마우스 비장세포의 분리

마우스로부터 비장세포는 Mishell과 Shiigi의 방법[23]에 의해 분리하였다. 즉, 실험동물로부터 무균적으로 비장을 적출하여 Hank's balanced salt solution (HBSS) 용액으로 2번

세척하여 조직 배양용 접시에 옮긴 후 다시 신선한 HBSS 용액을 가하여 핀셋으로 가볍게 문질러 비장세포를 유리시켰다. 세포 부유액을 15분 동안 방치한 후 그 상층액을 HBSS 용액으로 다시 세척한 다음 증류수와 PBS를 이용하여 적혈구를 제거하고 10% FCS가 함유된 RPMI 1640 배지로 부유시켜 사용하였다.

**세포생존을 실험**

표적세포로 사용된 림프종 세포는 Yac-1 세포주로서 A/Sn 계통 생쥐에서 moloney leukemia virus에 의해 유발된 T 세포 림프종으로부터 유래된 세포주이다. 마우스 비장세포(4×10<sup>6</sup> cells/ml)를 96 well에 부유시킨 다음 표적세포인 Yac-1 (1×10<sup>4</sup> cells/ml)을 첨가하고 시료 추출물(1 µg/ml)을 처리하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 배지는 RPMI 1640이었으며 FCS 10% 추가하여 사용하였다. 4일 배양시킨 후 MTT assay로 세포생존율을 결정하여 아래의 식에 따라 dead cell (%)로 표시하였다.

$$\text{Dead cell (\%)} = \{1 - (\text{OD}_{\text{S+T}} - \text{OD}_\text{S}) / (\text{OD}_\text{T} - \text{OD}_\text{M})\} \times 100$$

여기서 OD<sub>T</sub>는 표적세포의 OD, OD<sub>M</sub>은 표적세포와 시료가 없을 경우의 OD, OD<sub>S</sub>는 비장세포의 OD이며 OD<sub>S+T</sub>는 표적세포와 비장세포의 OD이다.

**Interleukin-2 (IL-2) assay법**

비장세포 배양 상층액은 Weir 등[31]의 방법에 의해 준비하였다. 준비된 비장세포를 10% FCS를 포함한 RPMI 1640 배지로 4×10<sup>6</sup> cells/ml의 농도로 조절하고 시료추출물을 가하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 이들을 300 g에서 10분간, 10,000 g에서 30분간 원심분리시킨 후 그 상층액을 취하여 -70℃ 냉동기에 보관하면서 IL-2 assay에 사용하였다. IL-2 의존성 세포주인 CTLL-2 세포를 이용한 방법[11]을 변형하여 IL-2 활성을 측정하였다. 한국 세포주 은행으로부터 분양받은 CTLL-2 세포는 10% FCS와 20 IU/ml의 IL-2가 함유된 RPMI 1640 배지에서 3일간 배양한 후 trypan blue 염색액으로 세포의 생존율을 확인하고 1×10<sup>4</sup> cells/ml 세포의 농도로 계대배양하면서 실험에 사용하였다. 10% FCS가 함유된 RPMI 1640 배지에서 CTLL-2 세포(1×10<sup>5</sup> cells/ml)가 부유된 세포액 50 µl를 96 well plate에 가한 후 다시 비장세포 배양 상층액 50 µl를 첨가하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 18시간 배양시킨 다음 MTT assay로 IL-2를 측정하였다.

**통계분석**

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 자료로부터 ANOVA를 구한 후 Duncan's multiple range test를 이용하여 통계 분석하였다.

**결과 및 고찰**

**Ames test에 의한 항돌연변이 효과**

된장 메탄올 추출물(MeOH)과 각 분획물들을 실험에 사용한 농도(2.5 mg/plate)에 대한 독성실험을 한 결과 독성이 나타나지 않았다. 된장을 먼저 헥산(Hex)으로 지방을 제거한 후 메탄올로 추출한 추출물에서 항돌연변이성 물질을 분리하기 위해 극성이 다른 용매인 디클로로메탄(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), 에틸아세테이트(EtOAc), 부탄올(BuOH)로 분획하여 각 분획물의 항돌연변이 효과를 검토해 보았다. Table 1에서 나타나는 것과 같이 간접돌연변이원인 AFB<sub>1</sub>에 대한 돌연변이 억제효과는 된장의 메탄올 추출물(MeOH)을 2.5 mg/plate 농도로 첨가했을 때 84%의 돌연변이 저해효과를 나타내었고 같은 첨가농도에서 메탄올 분획물들 중 디클로로메탄 분획물(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)과 에틸아세테이트 분획물(EtOAc)은 각각 96%, 97%로 상당히 높은 항돌연변이 효과를 나타내었다. 헥산(Hex) 추출물과 부탄올(BuOH) 분획물의 경우도 각각 87%, 82%로 항돌연변이 효과를 나타내었다. 한편, 직접돌연변이원인 MNNG의 경우(Table 2), AFB<sub>1</sub>에 비해 돌연변이 저해효과가 다소 떨어지지만 그 중에서도 에틸아세테이트 분획물(EtOAc)이 75%로 가장 높은 항돌연변이 효과를 나타내었으며

Table 1. Effect of the fractionated samples (2.5 mg/plate) from methanol extracts of defatted doenjang on the mutagenicity induced by aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>, 0.5 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100<sup>1</sup>

Sample (2.5 mg/plate)	Revertants/plate	Inhibition rate(%) <sup>2</sup>
Spontaneous	119±23 <sup>3</sup>	
Control (AFB <sub>1</sub> )	982±38 <sup>a</sup>	
Doenjang Hex ext. <sup>4</sup>	227±45 <sup>b</sup>	87
MeOH ext.	254±18 <sup>b</sup>	84
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> Fr.	166±15 <sup>c</sup>	96
EtOAc Fr.	146±7 <sup>c</sup>	97
BuOH Fr.	273±24 <sup>b</sup>	82
Water Fr.	321±36 <sup>b</sup>	77

<sup>1</sup>0.5 ml of the S9 mix, 0.1 ml of the test bacterial suspension from an overnight culture and 0.1 ml of the test compound were added. Then the plates were incubated at 37℃ for 48 hr. and the revertant bacterial colonies on each plate were counted.

<sup>2</sup>Inhibition rate (%) = (Control-Sample)/(Control-Spontaneous) \*100

<sup>3</sup>Values are mean±SD. <sup>a-c</sup>Means with the different letters are significantly different at the 0.05 level of significances as determined by Duncan's multiple range test.

<sup>4</sup>Hex, hexane ext.; MeOH, methanol ext. of defatted doenjang; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, dichloromethane fr. of the methanol ext.; EtOAc, ethylacetate fr. of the methanol ext.; BuOH, Butanol fr. of the methanol ext.; Water, Water fr. of the methanol ext.

Table 2. Effect of the fractionated samples (2.5 mg/plate) from methanol extracts of defatted doenjang on the mutagenicity induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG, 0.36 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Sample (2.5 mg/plate)	Revertants/plate	Inhibition rate (%) <sup>1</sup>
Spontaneous	107±26 <sup>2</sup>	
Control (MNNG)	1555±57 <sup>a</sup>	
Doenjang Hex ext. <sup>3</sup>	835±154 <sup>c</sup>	50
MeOH ext.	810±203 <sup>c</sup>	51
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> Fr.	757±127 <sup>c</sup>	55
EtOAc Fr.	474±119 <sup>d</sup>	75
BuOH Fr.	1119±57 <sup>b</sup>	30
Water Fr.	1099±66 <sup>b</sup>	31

<sup>1</sup>Inhibition rate (%) = (Control-Sample)/(Control-Spontaneous) \*100

<sup>2</sup>Values are mean±SD. <sup>a-d</sup>Means with the different letters are significantly different at the 0.05 level of significances as determined by Duncan's multiple range test.

<sup>3</sup>Hex, hexane ext.; MeOH, methanol ext. of defatted doenjang; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, dichloromethane fr. of the methanol ext.; EtOAc, ethylacetate fr. of the methanol ext.; BuOH, Butanol fr. of the methanol ext.; Water, Water fr. of the methanol ext.

메탄올 추출물(MeOH)과 디클로로메탄 분획물(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)은 각각 51%, 55%의 돌연변이 저해효과를 나타내었다. Lim 등 [16]은 SOS chromotest에서 된장의 분획물들 중에서 디클로로메탄 분획물과 에틸아세테이트 분획물에 의한 항돌연변이 효과가 가장 컸었다고 보고하였고 Ames test에서 밝혀진 돌연변이 물질과 SOS 유발 물질 사이에는 매우 밀접한 정량적인 관계가 있다고 알려져 있다[25,28]. 또한 이러한 된장의 생리활성 효과는 *in vivo* 초파리 실험에서도 증명되어 된장 메탄올 추출물을 첨가했을 때는 항돌연변이 효과가 검출되지 않았으나 메탄올 추출물을 극성 용매별로 더욱 분획하여 얻어진 에틸아세테이트 분획물의 경우 낮은 농도에서부터 체세포 염색체 재조합이나 *mwh+* 좌위에 유전자 돌연변이를 크게 억제하였음이 보고되었다[16].

**Sarcoma 180 복수암 및 Yac-1 림프종 세포 증식 억제 효과**

세포 독성은 비특이적 방어가전으로서 암세포에 직접적으로 손상을 줄 뿐만 아니라 동물 생체 내 림프구나 대식세포와 같이 표적세포에 대하여 세포 독성 효과를 나타내는 작동세포를 자극함으로써 그 세포 독성효과를 항진시키는 것으로 보고 있다[10]. 된장 유기용매 추출물에서 종양세포에 대한 직접적인 세포 살해효과를 알아보기 위하여 sarcoma 180 복수암 세포와 Yac-1 림프종 세포를 이용하였다. 저자들은

sulforhodamine assay에 의한 저해 실험[15] 및 DNA 합성 저해 실험[18]에서 된장 메탄올 추출물들로부터 얻어진 분획물들에 의한 인체 위암, 간암 및 결장암 세포들의 증식 억제 효과를 살펴 본 결과, 디클로로메탄 분획물(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)과 에틸아세테이트 분획물(EtOAc)에 의한 증식 억제효과가 가장 컸음을 보고하였다. 따라서 분획물들 중 특히 항돌연변이 및 인체 암세포 증식 억제 효과가 높았던 디클로로메탄 분획물(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)과 에틸아세테이트 분획물(EtOAc)을 중심으로 이들 분획물들에 의한 암세포 증식 억제효과를 검토하였다. 디클로로메탄 분획물(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)의 경우, 첨가농도 15.6 µg/ml에서 60%로 sarcoma-180 세포의 증식을 억제시키면서 농도 의존적으로 그 증식 억제효과가 컸으며 250 µg/ml 농도에서는 80%의 암세포 증식 억제효과를 관찰 할 수가 있었다. 에틸아세테이트 분획물(EtOAc)의 경우, 디클로로메탄 분획물(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)에 비해 다소 낮은 암세포 증식 억제효과를 나타내었지만 250 µg/ml 농도에서 약 60%의 암세포 증식 억제효과를 나타내었다(Fig. 1). Choi 등[6]도 재래식 된장 메탄올 추출물을 더욱 분획하여 이 중 에틸아세테이트 분획물이 가장 높은 암세포 증식 억제 효과를 나타내었다고 보고하였다. Cui 등[7]은 다시마를 첨가한 된장 에탄올 추출의 경우에도 인체 암세포의 증식을 56-90%로 저해하였다고 보고하였다. 한편, Yac-1 림프종 세포의 경우, 디클로로메탄 분획물(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)은 첨가농도 1 µg/ml에서 94%로 Yac-1 표적세포를 사멸시켰으며 에틸아세테이트 분획물(EtOAc)도 동일 농도에서 96%의 억제 효과를 나타내었으며 이때 대조군의 경우 83%의 저해 효과를 나타내었다(Fig. 2). Song 등[29]은 된장으로부터 추출한 지질 분획물이 인체 K562 백혈암 세포, 마우스 Yak-1 암세포 및 sarcoma 180 고형암 세포에 독성을 나타내었다고 보고하였다. 최근 Hwang 등[13]은 녹차 첨가 된장 메탄올 추출물이 인체 전립선암 세포의 증식을 또한 크게 억제하였다고 보고하였다.

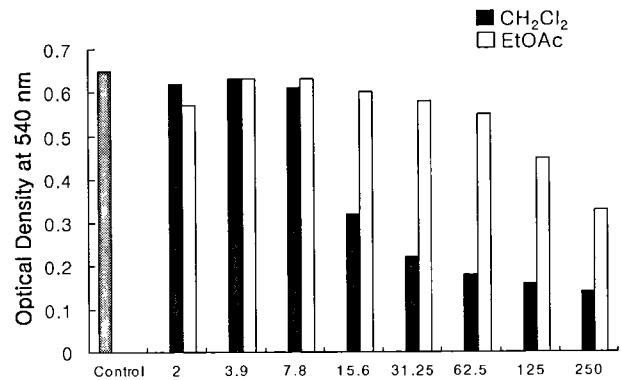


Fig. 1. Effect of dichloromethane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) and ethylacetate (EtOAc) fractions(µg/ml) from methanol extracts of defatted doenjang on the growth of sarcoma-180 cancer cells in MTT assay that determined after 4 days of incubation at 37°C.

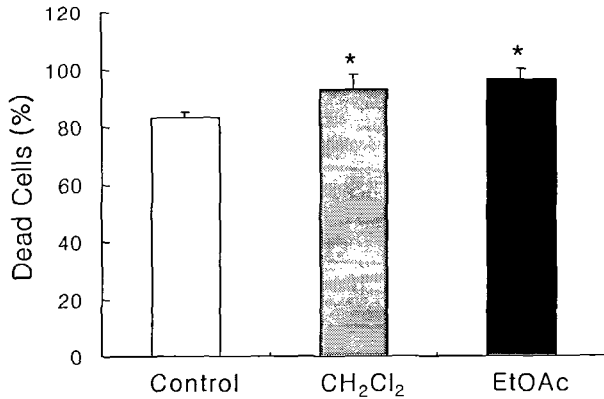


Fig. 2. Effect of dichloromethane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) and ethylacetate (EtOAc) fractions from methanol extracts of defatted doenjang on the growth of Yac-1 lymphoma cells supplemented with mouse splenocyte after 4 days of incubation at 37°C.

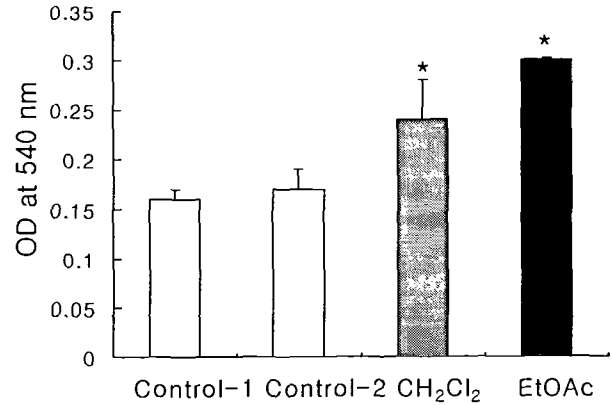


Fig. 3. Effect of dichloromethane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) and ethylacetate (EtOAc) fractions from methanol extracts of defatted doenjang on the level of interleukin-2 in CTLL cells supplemented with mouse splenocyte conditioned medium after 18 hours of incubation at 37°C.

Control-1: no agent culture, Control-2: media culture  
\*Significantly different from the control at the p<0.05 level

**Interleukin-2 (IL-2) 생성에 미치는 영향**

인체에 무해하고 효과적으로 암을 퇴치할 수 있는 새로운 항암제의 개발은 현대 의학에 있어 매우 중요한 과제로 여겨지며 이러한 관점에서 볼 때 면역 활성을 이용하여 암세포에 대한 생체의 비특이성 혹은 세포성 면역을 자극함으로 항암 효과를 기대하는 면역화학 요법이 시도되고 있다. 따라서 본 연구에서는 된장 메탄올 추출물로부터 얻어진 분획물들 중 앞서 항돌연변이 효과 실험에서 특히 활성이 높았던 디클로로메탄 분획물(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)과 에틸아세테이트 분획물(EtOAc)에 의한 면역 활성 증진 효과를 검토하였다. CTLL-2 세포를 이용하여 이들 분획물들에 의한 IL-2의 생성에 대한 영향을 살펴보았을 때 대조군의 OD가 0.16인데 비해 디클로로메탄 분획물(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)과 에틸아세테이트 분획물(EtOAc)은 첨가농도 1 µg/ml에서 각각 0.30과 0.24를 나타내어 IL-2 생성을 증가시키면서 면역 활성 증진 효과를 나타내었다(Fig. 3). IL-2는 T 세포에서 분비되는 당단백질로 보조 T 세포의 합성에 결정적인 역할을 하는데 활성화된 T 세포는 IL-2를 분비하며 표면에 IL-2 수용체와 transferrin receptor가 나타나고 이것이 T 세포의 지속적인 증식을 일으킨다[21]. 따라서 IL-2의 분비가 적으면 림프구 증식이 억제되는데 연령 증가와 더불어 T 세포 기능 감소와 IL-2 생산 감소간에는 상호연관성이 있는 것으로 여겨진다[22]. 이 밖에도 natural killer 세포증식 및 B 세포의 항체 합성을 증가시키며 동물에서 암의 전이과정을 예방한다고 알려져 있다[8]. 이상의 결과들로부터 된장 분획물들 중 특히 디클로로메탄 분획물과 에틸아세테이트 분획물은 림프종 세포와 복수암 세포의 증식 억제나 생존력을 감소시키는데 작용할 뿐만 아니라 면역세포에서 IL-2 cytokine의 생성을 증가시켜 면역 활성 증진 효과를 나타내었고 돌연변이원에 대해서도 강한 저해 효과를 나타내어 암을 예방하는 것으로 사료된다.

**요 약**

된장을 극성이 다른 유기용매로 분획하여 Ames test를 이용한 항돌연변이성 효과를 알아보려고 하였고 Yac-1과 sarcoma-180 암세포들의 증식에 대한 된장 분획물의 효과를 측정함과 동시에 면역과정의 생물학적 작용과 대사적 변화를 유도하는 interleukin-2 (IL-2)의 생성에 대한 효과도 검토하였다. AFB<sub>1</sub>에 대한 돌연변이 억제효과는 된장의 메탄올 추출물을 2.5 mg/plate 농도로 첨가했을 때 84%의 돌연변이 저해효과를 나타내었고 같은 첨가농도에서 메탄올 분획물들 중 디클로로메탄 분획물과 에틸아세테이트 분획물은 각각 96%, 97%로 상당한 항돌연변이 효과를 나타내었다. 직접돌연변이원인 MNNG의 경우, AFB<sub>1</sub>에 비해 돌연변이 저해효과가 다소 떨어지지만 그 중에서도 에틸아세테이트 분획물이 75%로 가장 높은 항돌연변이 효과를 나타내었다. Sarcoma 180 cell 암세포 증식 억제효과 실험에서 디클로로메탄 분획물(첨가농도 15.6 µg/ml)은 60%의 저해효과를 나타내면서 농도 의존적으로 그 저해효과가 컸으며 250 µg/ml 농도에서는 80%의 저해효과를 관찰 할 수가 있었다. 에틸아세테이트 분획물의 경우 디클로로메탄 분획물에 비해 다소 낮은 저해효과를 나타내었지만 250 µg/ml 농도에서 약 60%의 세포독성 효과를 나타내었다. 디클로로메탄 분획물과 에틸아세테이트 분획물에 의한 면역 활성 증진 효과를 검토한 결과, 디클로로메탄 분획물은 첨가농도 1 µg/ml에서 94%로 Yac-1 표적세포를 사멸시켰으며 에틸아세테이트 분획물도 동일 농도에서 96%의 억제효과를 나타내었다. CTLL 세포를 이용하여 이들 분획물들에 의한 interleukin-2 (IL-2)의 활성 증진 효

과를 살펴보았을 때 대조군의 OD가 0.16인데 비해 디클로로메탄 분획물과 에틸아세테이트 분획물은 첨가농도 1 µg/ml에서 각각 0.30과 0.24를 나타내어 면역 활성 증진효과를 나타내었다. 따라서 된장에 의한 암세포 증식 억제효과는 IL-2 같은 cytokine 생성 증진에 따른 면역 담당 세포 활성화 작용과 관련을 가질 가능성이 있을 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- Akiyama, J., T. Kawamura, E. Gotohda, Y. Yamada, M. Hosokawa, T. Kodama and H. Kobayashi. 1977. Immunotherapy of transplanted KMT-17 tumor in rats by combination of cyclo-phosphamide and immunostimulatory protein-bound polysaccharide isolated from basidiomycetes. *Cancer Res.* **37**, 3042-3045.
- Ames, B. N., J. McGann and E. Yamasaki. 1975. Method for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* /mammalian-microsome mutagenicity test. *Muta. Res.* **31**, 347-364.
- Amirghofran, Z., M. Azadbarkht and M. H. Karimi. 2002. Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants. *J. Ethnopharmacol.* **72**, 167-172.
- Chihara G., T. Suga, J. Hamuro, N. Takasuka, Y. Y. Maeda, T. Sasaki and T. Shiio. 1987. Antitumor and metastasis inhibitory activities of lentinan as an immunomodulator. *Cancer Detection and Prevention (Suppl.)* **21**, 423-443.
- Choi, G. S., S. Y. Lim and J. S. Choi. 1998. Antioxidant and nitrile scavenging effect of soybean, meju and doenjang. *Kor. J. Life Sci.* **8**, 473-478.
- Choi, S. Y., M. J. Cheigh, J. J. Lee, H. J. Kim, S. S. Hong, K. S. Chung and B. K. Lee. 1999. Growth suppression effect of traditional fermented soybean paste on various tumor cells. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 458-463.
- Cui, C. B., E. Y. Lee, D. S. Lee and S. S. Ham. 2002. Antimutagenic and anticancer effects of ethanol extract from Korean traditional doenjang added sea tangle. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **31**, 322-328.
- Devi, M. A. and N. P. Das. 1994. Antiproliferative effect polyunsaturated fatty acids and interleukin-2 on normal and abnormal human lymphocytes. *Experientia.* **50**, 489-492.
- Endres, S., R. De Caterina, E. B. Schmidt and S. D. Kristensen. 1995. N-3 polyunsaturated fatty acids: update 1995. *Eur. J. Clin. Invest.* **25**, 629-638.
- Fischer, S. M., J. Leyton, M. L. Lee, M. Loeniskar, M. A. Belury and R. E. Maldve. 1992. Differential effects of dietary linoleic acid on mouse skin-tumor promotion and mammary carcinogenesis. *Cancer Res. (Suupl)* **52**, 2049s-2054s.
- Gilis, S., M. M. Ferm, W. Ou and K. A. Smith. 1978. T cell growth factor: Parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J. Immunol.* **120**, 2027-2032.
- Hadden, J. W. 1993. Immunostimulants. *Immunol. Today* **14**, 275-280.
- Hwang, K. M., S. H. Oh and K. Y. Park. 2007. Increased antimutagenic and *in vitro* anticancer effects by adding green tea extract and bamboo salt during doenjang fermentation. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **36**, 1-7.
- Kim, K. H., Y. S. Lee, I. S. Jung, S. Y. Park, H. Y. Chung, I. R. Lee and Y. S. Yun. 1998. Acidic polysaccharide from Panax ginseng, ginsan, induces Th1 cell and macrophage cytokines and generates LAK cells in synergy with rIL-2. *Planta Med.* **64**, 110-115.
- Lim, S. Y., K. Y. Park and S. H. Rhee. 1999. Anticancer effects of doenjang in *in vitro* sulforhodamine B (SRB) assay. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 240-245.
- Lim, S. Y., K. Y. Park and S. H. Rhee. 2004. Inhibitory effect of methanol extracts and solvent fractions from doenjang on mutagenicity using *in vitro* SOS chromotest and *in vivo* *Drosophila* mutagenic system. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **33**, 1432-1438.
- Lim, S. Y., S. H. Rhee. and K. Y. Park. 2004. Inhibitory effect of methanol extract of doenjang on growth and DNA synthesis of human cancer cells. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **33**, 936-940.
- Lim, S. Y., S. H. Rhee and K. Y. Park. 2005. Effect of solvent fractions from methanol extract of doenjang on inhibition of growth and DNA synthesis of human cancer cells. *Kor. J. Life Sci.* **15**, 685-691.
- Maeda, Y. Y., S. T. Watanabe, G. Chihara and M. Rokutanda. 1984. T-cell mediated vascular dilatation and hemorrhage induced by antitumor polysaccharide. *Intl. J. Immunopharmacol.* **6**, 493-501.
- Maron, D. M. and B. N. Ames. 1983. Reversed methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Muta. Res.* **113**, 173-215.
- Meydani, S. N. 1990. Dietary modulation of cytokine production and biologic functions. *Nutr. Rev.* **48**, 361-369.
- Meydani, S. N. 1992. Modulation of cytokine production by dietary polyunsaturated fatty acids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **200**, 189-193.
- Mishell, B. B. and S. M. Shiigi. 1980. *Selected methods in cellular immunology*. 1st ed. Wh Freeman Co. San Francisco, p 4.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
- Ohta, T., N. Nakamura, M. Moriya, T. Shirai and T. Kada 1984. The SOS function-inducing activity of chemical mutagens in *Escherichia coli*. *Muta. Res.* **131**, 101-109.
- Park, K. Y., S. H. Moon, H. S. Baik and H. S. Cheigh. 1990. Antimutagenic effect of doenjang (Korean fermented soy paste) toward aflatoxin B<sub>1</sub>. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **19**, 156-162.
- Phinney, S. D., R. S. Odin, S. B. Johnson and R. T. Holman. 1990. Reduced arachidonate in serum phospholipids and cholesteryl esters associated with vegetarian diets in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **51**, 385-392.
- Rueff, J. A., L. H. Borba, T. Chaveca, M. I. Gomes and M. Halpern. 1986. Genetic toxicology of flavonoids: The role of metabolic conditions in the induction of reverse mutation. SOS function and sister-chromatid exchanges.

*Mutagenesis* **1**, 179-183

29. Song, S. K., K. H. Kim and H. S. Kim. 2001. Cytotoxic effects and compounds of lipid fractions from soybean products on cancer cells. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **30**, 1266-1271.
30. Tsuru, S. and K. Nomoto. 1983. Effect of PSK on specific tumor immunity to syngeneic tumor cells. *J. Clin. Lab. Immunol.* **4**, 215-219.
31. Weir, D. W., L. A. Herzenberg and C. Blackwell. 1986. Handbook of experimental immunology. 4th ed. Blackwell Scientific Publications, Boston, p 60.
32. Yoon, K. D., D. J. Kwon, S. S. Hong, S. I. Kim and K. S. Chung. 1996. Inhibition of soybean and fermented soybean products on the chemically induced mutagenesis. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 525-528.
33. Yun Y. S., Y. S. Lee, S. K. Jo and I. S. Jung. 1993. Inhibition of autochthonous tumor by ethanol insoluble fraction from *Panax ginseng* as an immunomodulator. *Planta Med.* **59**, 521-524.