Journal of Life Science **2009** Vol. 19. No. 5. 607~614 ©JLS / ISSN 1225-9918

말똥성게 분획물에 의한 항 발암 및 항산화 효과

신미옥 · 배송자*

신라대학교 식품영양학과, 마린-바이오 산업화지원센터

Received January 8, 2009 / Accepted April 24, 2009

The Anticarcinogenic and Antioxidative Activity of *Hemicentrotus pulacherrimus* Fractions in Various Cancer Cells. Mi-Ok Shin and Song-Ja Bae*. *Dept. of Food and Nutrition, Marine Biotechnology Center for Biofunctional Material Industries. Silla University, Busan 617-736, Korea* - This study was carried out to investigate the anticarcinogenic and antioxidative activities of Hemicentrotus pulacherrimus (HP). HP was extracted with methanol (HPM), which was then further fractionated into four sub-fractions by using the solvent partition method, affording methanol (HPMM), hexane (HPMH), butanol (HPMB) and aqueous (HPMA) soluble fractions. We determined the anticarcinogenic activities of these four fractions in four kinds of cancer cell lines, such as HepG2, HT29, MCF-7 and B16-F10, by MTT assay. Among various fractions from HPM, the HPMH showed the strongest growth inhibition effect. We also determined the inductive effect on quinone reductase (QR) of HP fractions. HPMB fraction exhibited strong inductive effects in HepG2 cells at a level of 90 μg/ml, showing inductive indexes of 2.26 compared to the control value of 1.0. The antioxidant activities of fractions from HP were also investigated by measuring the scavenging activities of HP against reactive oxygen speicies (ROS), peroxynitrite (ONOO-) and NO. Among the various solvent fractions, HPMH fractions displayed marked antioxidative activities.

Key words : Anticarcinogenic activity, quinone reductase, antioxidative activity, *Hemicentrotus pulacherrimus* (HP)

서 론

오늘날 국민소득 증대와 경제성장 그리고 현대과학과 의학의 발전에 힘입어 사람의 평균 수명의 고령화 현상이 급격히 증가되고 있으며, 건강에 대한 국민의 관심 또한 크게 증가하고 있다[19]. 그러나 이러한 현대의학의 발전에도 불구하고 암은 여전히 난치병의 하나로 남아있으며, 사람의 질병 중 가장 높은 사망률을 차지하고 있다. 지난 수십 년간 암을 정복하려는 인류의 노력으로 수많은 화학요법, 수술요법, 방사선 요법 등의 암치료법이 개발되었지만, 인구의 노령화와 산업화로 인한 환경파괴 및 오염물질의 증가와 잘못된 식이로 인해 최근 더욱더 암의 발생률과 사망률이 증가하고 있다[20]. 그리고 현재 임상에서 널리 사용되고 있는 항암제는 대부분 합성 물질들로 부작용이 심각한 문제로 대두되고 있으며 이로 인해 최근에는 부작용이 적으면서 유효한 천연 항암제의 개발을 위하여 천연물을 대상으로 암 예방 물질의 검색과 개발에 대한 노력이 활발히 전개되고 있다[2,9]. 암 예방제는 암 발생과정 중 개시기(initiation), 촉진기(promotion)와 진행기(progression)를 차단 혹은 억제하여 그 효과를 나타내는데, 촉진기와 진행기를 차단하는 데는 활성산소 종(reactive oxygen species, ROS)과 활성질소 종(reactive nitrogen species, RNS)을 제거하거나 polyamine류의 합성을 억제하거나 항염증과 관련된 효소들(cyclooxygenase-2, inducible nitric oxidesynthase)을 억제하거나 세포 자가 사멸(apoptosis)을 유발하는 생화학적 기전들이 있다[14,22]. 한편 활성산소에는 주로 superoxide ($\cdot O_2^-$), hydrogen peroxide (H_2O_2) 및 hydroxyl radical ($\cdot OH$) 등과 같은 활성산소(reactive oxygen species, ROS)와 peroxinitrite ($ONOO^-$), NO와 같은 활성질소(reactive nitrogen species, RNS)가 있으며 이들은 매우 불안정하고 반응성이 강한 활성산소로 세포의 구성 성분인 지질, 단백질, 당 및 DNA 등을 가역적으로 파괴하여 암을 비롯한 뇌질환과 심장질환, 동맥경화, 피부질환, 소화기질환, 염증, 류마티스 등의 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다[6,8,37]. 이러한 활성 산소종이 소거되지 않을 경우 자유 라디칼에 의해 다른 질병의 원인이 되기도 하고, 인간의 암 발생에도 중요한 역할을 하며 식품에서도 산패와 독성물질 생성 등으로 유해한 작용을 하는 것으로 알려져 있다[12,13]. 현재 합성 항산화제의 사용은 간 비대, 간장 중 microsomal 효소활성 증가, 체내 흡수물질의 독성화 및 발암 가능성 등[5]의 부작용의 문제가 제기 되고 있어 부작용이 적으면서 유효한 천연물을 대상으로 천연 항산화 물질의 탐색이 많이 시도되고 있다[23]. 오늘날 잘 알려져 있는 생리활성 항산화 성분들로는 flavonoid, steroid, terpenoid, tannin, coumanin 및 plant sterol 등이 있으며[3,28], 이러한 천연 항산화 물질의 탐색은 암 예방 뿐만 아니라 합성 항산화 물질의 유해성에서 벗어날 수 있는 수단이 될 것이다. 그리고 최근에

*Corresponding author
Tel : +82-51-999-5462, Fax : +82-51-999-5687
E-mail : sjbae@silla.ac.kr

는 해양생물이 독특한 대사과정과 특이성에 따라 다양한 생리활성 물질에 대한 연구와 더불어 새로운 신소재 개발의 보고가 되고 있으며 특히, 미지의 해양 천연 물질 개발에 관심이 집중되고 있다. 최근 흔히 접할 수 있는 미역, 다시마, 감태, 곰피 등의 해조류에 대한 연구들이 많이 보고되어 지고 있는 반면[26,31], 해양생물에 대한 기능성 활성 성분에 대한 연구로의 접근은 아직 미흡한 형편이다. 본 연구에서 사용된 말똥성게(*Hemicentrotus pulacherrimus*)는 해양극피동물의 하나로 공치목에 속하는 둥근 성게과로서 우리나라에 자생하며 조간대에서부터 수심 약 3 m 이전에 서식하고 거의 대부분의 개체는 큰 암반이나 소형의 바위틈에 끼여 무리를 지어 서식하며 몸통의 지름은 보통 2~5.5 cm, 높이는 1~3 cm로 유성 생식(난생)을 한다[35]. 말똥성게에 대한 연구로는 말똥성게로부터 분리한 β-galactosidase의 정제 및 특성, 말똥성게로부터 ribonuclease의 정제 및 특성 그리고 DNA polymerase α 의 정제 및 특성에 관한 연구 및 말똥성게의 생태학적특성에 관한 연구들만이 보고되어져 있어 생리활성에 대한 연구는 미비한 실정이다[15,18,21,30,32]. 본 연구는 말똥성게 분획물의 생리활성효과를 알아보기 위하여 항 발암효과로서 암세포 증식 억제 효과와 Quinone reductase (QR)유도 활성 효과를 측정하였고 또한 항산화 효과를 측정함으로서 식용으로 애용되고 있는 말똥성게의 기능성 식품 및 항산화제로서의 개발 가능성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용한 말똥성게(*Hemicentrotus pulacherrimus,* HP)는 2006년 3월 부산 기장시장에서 구입하였다. 세포실험에 사용 된 시약 중 nonidet p-40 (NP-40)과 menadione은 Sigma (St. Louis, USA)사 제품을 구입하였고 Dulbecco's Eagle modified medium (DMEM)과 fetal bovine serum (FBS), phosphate buffered saline (PBS) 등은 Gibco-BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며 그 외 연구에 사용 된 용매 및 시약은 특급을 사용하였다.

시료 및 분획물 제조

시료로 사용된 말똥성게는 동결건조 후 분쇄하여 시료의 2배량(W/V)에 해당하는 메탄올을 첨가한 후 상온에서 2회 추출하고, 극성과 비극성물질을 선별하기위하여 다시 메탄올과 다이메로로메탄을 1:1로 섞은 용액에 2회 추출한 후 회전식 진공농축기로 감압 농축시켜 동결건조 후 말똥성게의 메탄올 추출물(HPM)을 얻었다. 이 추출물을 다이클로로메탄(CH_2Cl_2)과 물로 다시 분획하여 다이클로로메탄(CH_2Cl_2)층과 물층을 얻었으며, 다이클로로메탄(CH_2Cl_2)층을 핵산과 메탄올(1:1)용액으로 분획하여 핵산(HPMH)과 메탄올(HPMM)분획층을 얻었고, 물층은 부탄올용매로 분획하여 다시 부탄올(HPMB)과 수층(HPMA)을 얻었다. 이들 각 분획층을 감압 농축하여 동결 건조한 후 분말을 만들어 시료로 사용하였다.

암세포 배양

본 실험에 사용한 암 세포주는 간암세포인 HepG2 (human hepatocellular carcinoma), 유방암세포인 MCF-7 (human breast adenocarcinoma pleural effusion), 대장암세포인 HT-29 (human colon adenocarcinoma)및 피부암세포인 B16-F10 (mouse melanoma)로서 2006년 5월 한국세포주은행 (Korean Cell Line Bank, KCLB)에서 구입하여 배양시킨 후 실험에 사용하였다. HT-29 세포주는 RPMI1640 medium, HepG2와 MCF-7, B16-F10 세포주는 DMEM medium을 사용하였고 medium은 10%의 fetal bovine serum (FBS)과 1% 100 units/mL의 penicillin streptomycin이 함유된 것으로 세포를 T-75 flask에 이식한 후, 37℃ 5% CO_2 incubator에서 monolayer로 배양하였다.

암세포 증식 억제 효과 측정

말똥성게 분획물의 암세포 증식 억제 효과는 3-[4,5-dimethyl thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay를 사용하여 실험하였다. 세포의 생육을 측정하는 방법으로서는 황색수용물질인 MTT가 미토콘드리아내의 탈수소효소 작용에 의하여 dark blue formazan을 생성하는 원리를 이용한 MTT assay [1,7]를 이용하였다. 이를 위해 각 세포주를 1×10^5 cells/well의 농도로 맞추고 48well에 각각 500 μL씩 첨가하여 24시간 동안 37℃, 5% CO_2 incubator에서 배양한 후 용매종류별 분획물을 각각 일정량의 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여서 50, 100, 150, 200 및 250 μg/ml의 농도로 첨가하였으며, 최종 DMSO의 농도는 0.2%로 조절 하였다. 48시간 동안 배양 후 각 well에 PBS 완충용액에 녹인 MTT 용액을 100 μL씩 첨가하여 4시간동안 다시 배양시켰다. well 바닥에 형성된 formazan이 흡어지지 않게 상등액을 제거하고 DMSO와 ethanol을 1:1로 혼합한 용액 1 ml를 첨가하여 천천히 녹인 후 multi-detection microplate를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군 세포수를 기준으로 하여 상대적인 세포 성장 억제율을 구하였다.

위상차현미경을 이용한 세포형태의 관찰

각각의 암세포주를 세포배양용 petri dish에 24시간동안 안정화시킨 다음 말똥성게 핵산(HPMH)분획물을 50, 100, 150, 200 및 250 μg/ml 씩 농도별로 처리하여 48시간 동안 배양한 후 현미경을 이용하여 200 배의 배율로 각 농도에 따른 암세포의 형태변화를 관찰한 다음 Olympus DP 70을 이용하여 촬영하였다.

Quinone reductase (QR) 유도 활성 효과 측정

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 만드는 역할을 한다[36].

본 실험에서는 Prochaska와 Santamaria의 방법[29]을 일부 변형하여 측정하였다. T-75 flask에 HepG2 세포가 80%이상 증식하게 되면 24 well plate의 각 well에 1×10^4 cells/ml 되도록 세포를 분주하여 37°C, 5% CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양한 후 말똥성게 분획물을 HepG2의 세포생존율이 50% 되는 양을 최종 농도로 잡아 각각 DMSO에 녹여 50, 60, 70, 80, 90 μg/ml의 농도로 첨가하고 다시 24시간 배양하였다. 배양액을 제거한 후 각 well에 250 μl의 lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 14 mM NaCl, 15 mM $MgCl_2$, 0.5% NP-40)를 첨가한 후 37°C, 5% CO_2 incubator에 10분간 두면서 cell을 lysis한 후 reaction mixture 즉, 10 mM Tris-HCl (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, 반응정지 용액인 0.3 mM dicumarol, 0.5% pyridine, 5 mM potassium phosphate (pH 7.4) 혼합액을 250 μl 씩 첨가하여 효소반응을 정지시키고 multi-detection microplate를 이용하여 610 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

단백질량은 동일한 set의 well plate에 대한 crystal violet 염색방법으로 정량하였다. 24 well plate에 2% ethanol에 녹인 0.2% crystal violet 용액을 150 μl 씩 첨가하고 37°C, 5% CO_2 incubator에서 배양한 후 증류수로 세척하였다. 각 well에 50% 에탄올에 녹인 0.5% SDS 용액을 1 ml씩 가하여 37°C, 5% CO_2 incubator에서 1시간 방치한 후 610 nm에서 흡광도를 측정하였다. Quinone reductase 활성측정(nmol/min/mg protein)은 다음과 같이 하였다.

* Specific quinone reductase (QR) activity

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

항산화 효과 측정

Reactive oxygen species (ROS) 제거활성 측정

ROS 제거활성을 측정하기 위해 dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) assay 측정방법[24]을 사용하여 측정하였다. 99.9%의 ethanol에 용해한 12.5 mM DCFDA와 3차 증류수에 용해한 600 U/ml esterase를 -20°C에 stock solution으로 저장하고, 실험 시 10μM DCFDA와 6 U/esterse를 혼합하여 조제된 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) 용액을 22°C에서 20분간 배양한 후 사용 전까지 암소에서 냉동보관 하였다. 지용성의 DCFDA는 esterase 또는 산화적 가수분해를 받아 비형광성인 DCFH로 탈아세틸화되며, DCFH는 활성산소에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)이 된다. 시료를 10 μl 넣은 후 H_2O_2를 190 μl씩 넣고 반응시키고, DCFDA에 esterase를 넣어 만든 DCFH를 50 μl 첨가하여 25분간 생성된 형광의 변화를 excitation wavelength 485 nm 및 emission wavelength 530 nm에서 multi-detection microplate reader로 측정하였다.

Peroxynitrite ($ONOO^-$) 제거활성 측정

Crow의 방법[10]에 의해 $ONOO^-$ 제거활성을 측정하였다. 96-well microplate에 sample을 농도별로 취하고, 90 mM NaCl, 5 mM KCl 및 100 μM diethylenetriaminepenta acetic acid와 10 μM DHR 123을 함유하는 sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 가한다. 그리고 10 μM $ONOO^-$첨가한 후 형광광도를 이용하여 excitation (500 nm)과 emission (536 nm)을 측정하였다.

아질산염 제거활성 측정

아질산염 제거활성은 Kato의 방법[4]에 의해 측정하였다. 1 mM의 $NaNO_2$ 용액 1 ml에 각각의 분획물을 1 ml 가하고 0.1 N HCl과 0.2 M citrate buffer를 사용하여 pH를 각각 1.2, 3.0 및 6.0 으로 조정한 후, 반응용액의 최종부피를 10 ml로 하였다. 이 용액을 37°C에서 1시간 반응시킨 뒤 각 1 ml 씩 취하여, 2% acetic acid용액 5 ml, Griess 시약(30% 초산으로 각각 조제한 1% sulfanilic acid와 1% naphtylamine을 1:1 비율로 혼합) 0.4 ml을 가하여 혼합한다. 이를 실온에서 15분간 방치한 후 520 nm에서 측정한다. 대조구는 Griess 시약 대신 증류수 0.4 ml를 가하여 상기와 동일한 방법으로 측정하였다. 아질산염 제거활성은 시료를 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우의 흡광도 값을 백분율로 나타내었다.

통계 처리

본 실험에 대한 실험결과는 3번 반복 실험하여 얻어진 평균치 및 표준편차를 나타내었다.

결과 및 고찰

말똥성게의 각 용매별 분획물 수율

말똥성게를 메탄올로 상온에서 2회 추출하고, 다시 디클로로메탄과 메탄올을 1:1로 섞은 용액에 2회 추출하여 19.23g의 말똥성게 추출물(HPM)을 얻고, 이 추출물을 으로 다시 극성과 비극성용매별로 분획하여 핵산(HPMH) 7.66 g, 메탄올(HPMM) 1.77 g, 부탄올(HPMB) 1.03 g 및 7.28 g의 수(HPMA)층 분획물을 얻었다. 이 분획물들을 각각 감압농축 후 동결건조하여 시료로 사용하였으며, 각 시료의 수득율은 Table 1과 같다.

Table 1. Yields (%) of various solvent fractions of *Hemicentrotus pulacherrimus*

Fraction	Yields (g)	Yields (%)
Methanol ex.	19.23	19.23
Methanol fr.	1.03	5.35
Hexane fr.	7.66	39.83
Butanol fr.	1.77	9.20
Aqueous fr.	7.28	37.85

*ex: extract, fr: fraction

암세포 증식 억제 효과

4종의 암세포주에 대한 말똥성게 분획물의 암세포 증식 억제 효과를 조사하기 위해 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay를 행하였다. 간암세포주인 HepG2, 유방암세포주인 MCF-7, 대장암세포주인 HT29, 및 피부암세포주인 B16-F10을 사용하였으며 실험결과는 Fig. 1, 2, 3 및 4에 나타내었다. Fig. 1은 인체 간암세포주인 HepG2에 시료 분획물을 각 층별로 50, 100, 150, 200 및 250 μg/ml씩 농도별로 분주한 후 37°C, 5% incubator에서 48시간 동안 배양했을 때의 암세포 증식 억제 효과를 나타낸 그림으로 여러 용매 분획층 중 HPMH층의 경우 가장 높은 암세포 증식 억제 효과를 나타내었다. 즉, 100 μg/ml의 농도에서 71.60%의 암세포 증식 억제 효과를 나타내었으며 농도 의존적으로 증가하여 최종 농도 250 μg/ml에서는 88.05%의 암세포 증식 억제 효과를 나타내었다. 다음으로 HPMM층에서는 최종 농도인 250 μg/ml에서 73.94%의 효과를 나타내었다. 그러나 HPMB층과 HPMA층에서는 최종 농도에서도 51.99%와 43.07%의 낮은 암세포 증식 억제 효과를 나타내었다. Fig. 2는 유방암 세포주인 MCF-7에 대한 결과이며 HepG2의 결과와 같이 HPMH층에서 가장 높은 암세포 증식 억제 효과를 나타내었다. 150 μg/ml 첨가했을 때 81.99%의 암세포 증식 억제효과를 나타내었으며, 최종농도 첨가 시 90%의 암세포 증식 억제 효과를 나타내었으며 다음으로 HPMM의 경우는 최종 농도인 250 μg/ml에서 77.59%의 암세포 증식 억제 효과를 보였다. HPMB층과 HPMA층에서는 HepG2의 결과와 마찬가지로 최종 농도에서도 62.94%와 41.55%의 낮은 암세포 증식 억제 효과를 나타내었다. Fig. 3은 대장암세포주인 HT-29에 대한 실험결과를 나타내었으며 역시 HPMH층에서 가장 높은 암세포 증식 억제 효과를 나타내었으며 최종 농도 첨가 시 86.77%의 암세포 증식 억제 효과를 나타내었으며 다음으로 효과적인 분획층은 HPMM층이었으며 최종농도 첨가 시 75.23%의 암세포 증식 억제 효과를 나타내었다. 피부암세포주인 B16F-10에 대한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 앞서 사용한 3가지 암세포주인 HepG2, MCF-7 및 HT29에서와 같이 HPMH층에서 가장 높은 암세포 증식 억제 효과를 나타내었으며, 최종 첨가 농도에서 90.08%의 효과를 나타내었다. 그리고 다음으로 HPMM

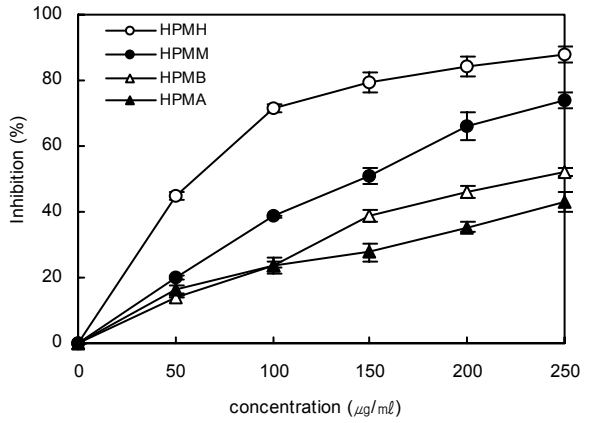

Fig. 1. Inhibitory effect on cell survival of various partition layers of *Hemicentrotus pulacherrimus* in HepG2 cells. HPMH: Hexane partition layer of methanol extracts of *Hemicentrotus pulacherrimus* (HPM). HPMM: Methanol partition layer of HPM. HPMB: Butanol partition layer of HPM. HPMA: Aqueous layer of HPM.

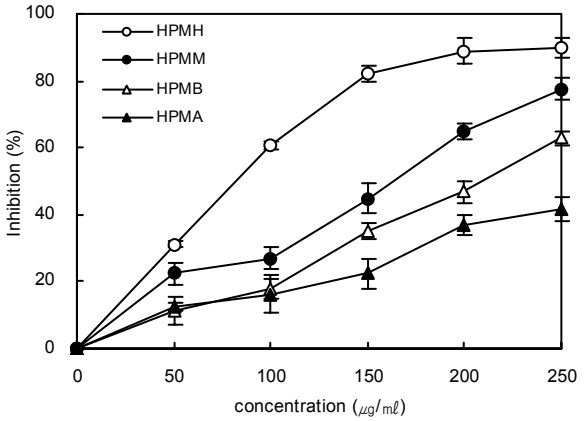

Fig. 2. Inhibitory effect on cell survival of various partition layers of *Celastrus orbiculatus* in MCF-7 cells.

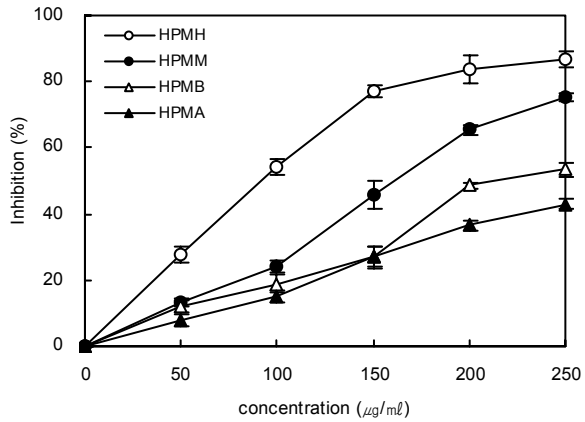

Fig. 3. Inhibitory effect on cell survival of various partition layers of *Celastrus orbiculatus* in HT29 cells.

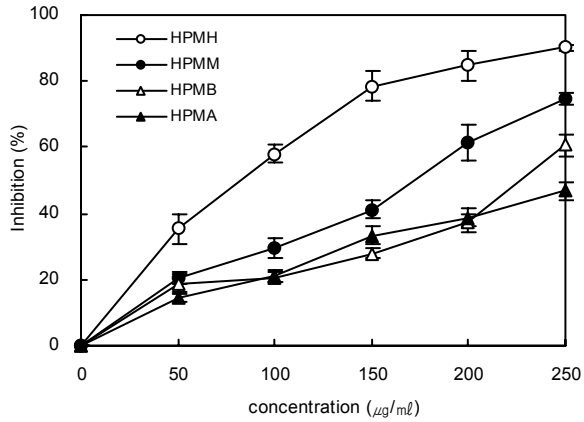

Fig. 4. Inhibitory effect on cell survival of various partition layers of *Celastrus orbiculatus* in B16-F10 cells.

층, HPMB층 및 HPMA층 순으로 암세포 증식 억제 효과를 나타내었으며 모든 층에서 농도 의존적으로 암세포 증식 억제 효과가 증가함을 알 수 있었다. 이상의 결과에서 용매별로 분획한 말똥성게 분획물이 각 암 세포주에 미치는 암세포 증식 억제 효과는 핵산 분획물인 HPMH층이 가장 높았으며, 그 다음으로 메탄올 분획물인 HPMM층이었다. 이와 같은 결과는 대부분의 해조류와 해양동물이 메탄올 분획물에서 가장 높은 암세포 증식 억제 효과를 나타낸 결과[16,25,27,33,34]와는 달리 핵산 분획물인 HPMH층에서 가장 높은 효과를 나타내어, 암세포 증식 억제 효과를 일으키는 말똥성게의 생리활성 물질이 비극성물질이 녹아있는 HPMH층에 주로 존재한다고 추측해 볼 수 있었으며 이 층에서의 암세포 증식 억제 물질의 존재가 주목되는 바이다. 앞으로 더욱 심도 있는 연구를 통해 이들 분획물의 생리 활성 물질을 규명하고 구조 동정과 그 기전을 알아보고자 한다.

핵산 분획물의 처리에 따른 암세포의 형태학적 변화

암세포 증식 억제 효과에서 가장 높은 활성을 보인 말똥성게의 핵산 분획물을 여러 농도로 첨가하여 48시간 배양한 후 위상차 현미경을 이용하여 형태학적 변화를 관찰한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 핵산 분획물의 농도 증가에 따라 암세포의 밀도 감소현상과 형태학적 변화가 나타났으며, 시료의 농도증가에 따라 세포막과 세포질의 손상과 세포의 부착력이 상실됨을 알 수 있었고 파괴된 잔여물과 더불어 뚜렷한 암세포의 형태학적 변화를 관찰할 수 있었다. HT29 세포주에서와 같이 다른 세포주에서도 거의 같은 경향을 보였다(Data not shown). 이것으로 보아 암세포의 심한 형태적 변형의 정도는 말똥성게 분획물의 처리에 따라 암세포 성장이 억제되었음을 보여준다고 할 수 있겠다.

Quinone reductase 유도 활성 효과

암세포 증식 억제 효과에 사용된 4종의 암세포주 중 유일하

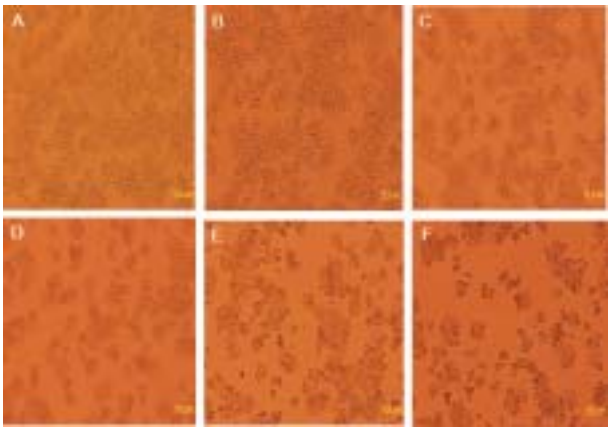

Fig. 5. Morphological changes of HT29 human colon adenocarcinoma cells. Cells were treated with HPMH for indicated concentrations for 48h and were photographed by microscope. (×200) (A) Control, (B) HPMH 50 μg/ml, (C) HPMH 100 μg/ml, (D) HPMH 150 μg/ml, (E) HPMH 200 μg/ml, (F) HPMH 250 μg/ml

게 quinone reductase 를 가지고 있는 간암세포 HepG2를 사용하여 QR 활성 증가 효과를 측정하였으며, 그 결과를 Fig. 6에 나타내었다. HepG2 세포주에 각 용매별 시료 분획물을 첨가했을 때 HPMB층에서 가장 높은 QR 유도 활성을 나타내었으며, 그 외의 분획층은 큰 영향을 미치지 않았다. HPMB층의 경우 대조군을 1.0로 하여 비교한 결과 50, 60, 70, 80 및 90 μg/ml의 시료첨가 농도에서 각각 1.46, 1.69, 2.03, 2.13 및 2.26배의 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 본 연구실에서 연구된 해양생물인 키조개[27], 참치지느러미[33] 등이 주로 메탄올 분획층에서 가장 높은 QR 활성 효과를 나타낸 것과는 다른 결과라 할 수 있고, 해조류 중 부탄올 분획층에서 가장 높은 QR 활성 효과를 나타낸 톳[34] 분획물의 결과와 일치하였으며 그 효과도 유사하였다. 따라서 암 예방 효과의 척도로

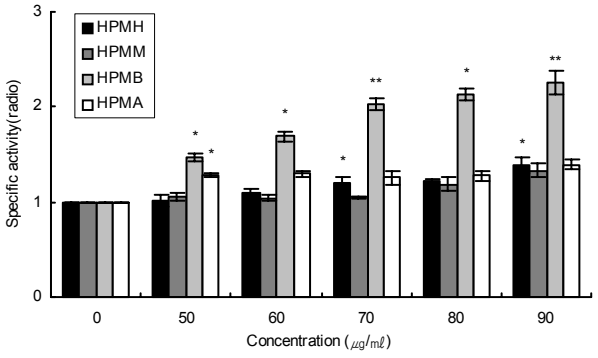

Fig. 6. Effect of the partition layers of *Hemicentrotus pulacherrimus* on the induction of quinone reductase on HepG2 cells. Cells were cultured at a starting density of 1×10^4 cells/mL in DMEM. values are represented mean±Sd of 3 repeats. Significantly different by t-test: *p<0.05, **p<0.01 vs. control.

Table 2. ROS scavenging activity of the partition layers of *Hemicentrotus pulacherrimus*.

Sample	IC_{50} (μg/ml)[1)]±SE[2)]
HPMM	39.52±3.29*
HPMH	13.00±0.48**
HPMB	>50
HPMA	>50
Trolox (control)	10.28±0.26

[1)]IC_{50}: half-maximal scavenging concentration
[2)]SE: standard error, statistical significance: *p<0.05, **p<0.01 versus control

Table 3. $ONOO^-$ scavenging activity of the partition layers of *Hemicentrotus pulacherrimus*.

Sample	IC_{50} (μg/ml)[1)]±SE[2)]
HPMM	>50
HPMH	15.14±0.39*
HPMB	24.51±0.72*
HPMA	>50
Penicillamine (control)	5.51±0.24

[1)]IC_{50}: half-maximal scavenging concentration
[2)]SE: standard error, statistical significance: *p<0.05 versus control

사용되는 QR 유도 활성 효과가 말똥성게의 여러 용매 분획물 중 부탄올 층에서 높은 활성을 보였으므로 이 분획층에서 QR 활성을 증가시키는 quinon reductase inducer가 존재함을 추정할 수 있었고 앞으로 더욱더 심도 있는 연구를 통해 말똥성게 분획물중의 생리활성 물질을 추적, 보완하여 그 구조를 동정함으로서 식품산업에 있어서의 암 예방 효과를 지닌 기능성 식품개발에 매우 중요한 자료가 될 수 있을 것으로 사료된다.

항산화 효과 측정

ROS 제거활성: 말똥성게 분획물의 ROS 제거활성 효과를 측정한 결과는 Table 2와 같다. Positive control인 trolox가 10.28 μg/ml에서 IC_{50} 값을 보였으며 이와 비교하였을 때 HPMH층은 13.00 μg/ml에서 ROS를 50% 저해하여 가장 높은 ROS 제거활성을 보였으며, 다음으로 HPMM층에서 39.52 μg/ml의 IC_{50} 값을 보였다. 그러나 HPMB층과 HPMA층에서는 유의성 있는 ROS 제거활성 효과를 확인할 수 없었다.

Peroxynitrite ($ONOO^-$) 제거활성 측정: 활성질소 중 가장 독성이 강한 것으로 알려진 ONOO-제거활성에 대한 말똥성게 분획물의 측정 결과는 Table 3과 같다. Positive control인 Penicillamine의 IC_{50} 값 5.51 μg/ml 과 비교하였을 때 HPMH층이 15.14 μg/ml로 비교적 높은 제거활성 효과를 나타내었으며 다음으로 HPMB층이 24.51 μg/ml의 IC_{50} 값을 나타내었다.

아질산염 제거활성: 활성산소 중 하나이며 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 질소산화물(NO)은 세포독성이 강하며 다량의 NO가 생성되면 nitrozation, nitration과 같은 간접적 효과 및 산화반응을 야기하여 유해한 효과를 나타내게 된다. 특히 대식세포가 활성화 되면서 생성되는 NO는 주위조직에 세포독성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 그러나 NO의 반감기가 매우 짧기 때문에 실질적 또는 직접적으로 검출하는데 많은 어려움이 따른다. 이 때문에 대부분의 NO의 측정을 위한 연구는 NOS 발현 유무나 NO의 안정화된 부산물인 nitrite, nitrate를 측정하는 간접적 방법으로 이루어진다. 본 연구에서는 0.04-1.0 mg/ml의 농도에서 pH 1.2, 3.0 및 6.0의 조건으로 하여 말똥성게 분획물의 아질산염 제거활성 효과를 측정하였으며 그 결과는 Table 4와 같다. 측정 결과 pH가 낮을수록, 시료농도가 증가할수록 아질산염 제거활성 효과가 증가함을 알 수 있었다. 그리고 분획별로 비교해보면 4가지 분획물중 HPMH층에서 가장 높은 제거활성 효과를 볼 수 있었다. 즉, pH 1.2조건의 경우 1.0 mg/ml의 농도에서 HPMH층이 68.52%의 가장 높은 제거활성 효과를 나타내었으며 다음으

Table 4. Nitrite scavenging ablility of various fractions from *Hemicentrotus pulacherrimus*

Concentration (mg/ml)		Extracts[1)]			
		HPMH	HPMM	HPMB	HPMA
pH 1.2	0.04	38.67±7.26[2)]	10.01±3.13	16.77±3.60	0.09±3.51*
	0.2	55.00±2.07	14.02±2.91	36.61±2.67*	1.03±2.73*
	1	68.52±1.35**	20.44±2.55*	54.92±1.37**	9.07±2.77*
pH 3.0	0.04	22.99±0.47	2.97±1.03	8.23±1.78	1.59±1.48
	0.2	27.95±0.69	9.61±0.79	11.06±2.43*	3.37±1.19*
	1	37.07±0.21*	14.27±4.30**	24.68±1.54*	8.03±1.23*
pH 6.0	0.04	9.63±4.82	1.93±4.40	2.67±3.58	0.59±7.34
	0.2	10.52±5.55*	2.22±6.03	5.33±6.05	1.78±8.91
	1	13.33±4.69*	3.26±6.42*	11.41±4.02*	4.00±6.51*

[1)]The abbreviations of introductory remarks are the same as in Fig. 1.
[2)]All value are mean±SD of triplicate determinations. Significantly different by t-test: *p<0.05, **p<0.01 vs. control.

로 HPMB층이 54.92%의 제거활성 효과를 나타내었고 HPMM층과 HPMA층은 20.44%와 9.07%의 낮은 제거활성 효과를 나타내었다. pH3과 pH6조건에서는 HPMH층에서도 37.07%와 13.33%의 낮은 제거활성을 나타내었다. 이와 유사한 결과로 Kang 등[17]은 각종 phenol성 화합물에 대한 아질산염 제거활성이 pH 1.2에서 가장 높았으며, pH 6.0 에서는 10%정도로 상실되었다고 보고하였다. 또한 질산염은 식품 중에 첨가되어 발색제와 보존제로 이용되고 있으나, 식품 중에 존재하는 amine류와 반응하여 발암물질인 nitrosamine을 생성하는데 이 과정은 pH가 낮은 조건에서 쉽게 일어나는 것으로 알려져 있다[11]. 따라서 말똥성게의 HPMH 분획층을 아질산염 및 아민이 함유된 식품과 함께 섭취하거나 가공한다면 nitrosamine의 생성을 예방함과 동시에 산화방지효과도 기대할 수 있을 것이라 생각된다.

요 약

본 연구는 말똥성게에 대한 항 발암 효과와 항산화 효과에 대하여 조사하였다. 먼저 말똥성게 분획물의 항 발암 효과를 알아보기 위하여 핵산, 메탄올, 부탄올 및 물로 순차적으로 분획하여 각 분획별로 암세포에 대한 증식 억제효과와 암 예방 지표인 QR 유도 활성 효과를 측정하였다. 그 결과 4종의 모든 암세포주 HepG2, MCF-7, HT29 및 B16-F10에서 농도의존적인 암세포 증식 억제 효과를 나타내었으며, 모두 HPMH층에서 가장 높은 암세포 성장 억제 효과를 나타내었다. 그러나 HepG2에서 측정한 QR 유도 활성 효과는 HPMB층에서 가장 높은 효과를 보였다. 또한 항산화 효과 중 ROS 제거활성 측정결과에서는 HPMH층이 가장 높게 나타났으며 13.00 μg/ml에서 50%의 ROS 제거활성 효과를 나타내어 positive control로 사용한 trolox와 비교하였을 때 거의 유사한 제거활성을 보였다. 그리고 $ONOO^-$ 제거활성 역시 HPMH층이 가장 높게 나타났으며, positive control과 비교하였을 때 penicillamine의 IC_{50}값인 5.51 μg/ml 보다는 낮았으나 15.14 μg/ml의 IC_{50}값을 나타내어 다른 분획층에 비해서는 높은 항산화 효과를 확인할 수 있었다. 아질산염 제거활성 측정 결과에서도 HPMH층이 가장 높은 제거활성 효과를 나타내었으며 특히 pH가 낮을수록, 시료농도가 증가할수록 아질산염 제거활성 효과가 증가함을 알 수 있었다. 이상으로 항 발암효과 중 암세포에 대한 증식 억제효과는 HPMH층이 가장 높았고 QR 유도 활성 효과는 HPMB층에서 가장 높았으며 항산화 효과는 ROS, $ONOO^-$ 및 아질산염 제거활성에서 모두 HPMH층이 가장 높음을 알 수 있었다. 따라서 앞으로 HPMH층과 HPMB층에 대한 집중적인 연구가 요구되어지며 말똥성게를 이용하여 항암 관련 기능성 식품과 식품 저장성과 안전성 향상을 위한 식품 첨가제나 보존제등의 개발가능성과 그 효과도 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

Reference

1. Alley, M. C., D. A. Scudiero, A. Monks, M. L. Hursey, M. J. Czerwinski, D. L. Fine, B. J. Abbrott, J. G. Mayo, R. H. Shoemaker, and M. R. Boyd. 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell line using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* **48**, 589-601.
2. Astrow, A. B. 1994. Rethinking cancer. *Lancet* **343**, 494-495.
3. Bauer, G. 2000. Reactive oxygen and nitrogen species: efficient, selective and interactive signals during intercellular induction of apoptosis. *Anticancer Res.* **20**, 4115-4139.
4. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
5. Branen, A. L. 1975. Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytolune. *Journal of the American Oil Chemists Society* **52**, 59-65.
6. Buttke, T. M. and P. A. Sandstrom. 1994. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol. Today* **15**, 7-10.
7. Carmichael, J., W. G. DeGraff, A. F. Gazder, J. D. Minna, and J. B. Mitchell. 1987. Evalution of a tetrazolium baxed semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**, 936-942.
8. Chandra, J., A. Samali, and S. Orrenius. 2000. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 323-333.
9. Chung, Y. T., S. T. Park, J. Y. Mun, J. M. Kim, M. K. Choi, D. S. Han, and B. Kim. 1987. Cytotoxic effects of actinomycin D, adramycin and puromycin in the development stage of early mouse embryos. *J. Wonkwang Medical Sci.* **3**, 13-34.
10. Crow, J. P. 1997. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide* **1**, 145-157.
11. Gray, J. I. and J. R. Dagan. 1975. Inhibition of N-nitrosamine formation in model food systems. *J. Food Sci.* **40**, 981-984.
12. Halliwell. B. 1996. Antioxidants in human health and disease. *Ann. Rev. Nutr.* **16**, 33-50.
13. Halliwell, B. and O. I. Aruoma. 1991. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBSLett.* **281**, 9-19.
14. Howard, A. and S. R. Pelc. 1953. Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity* **6**, 261.
15. Hur, S. B. and S. K. Yoo. 1985. Laboratory tagging experiment of sea urchin, *Hemicentrotus pulacherrimus.. Bull. Korean fish soc.* **18**, 363-368.
16. Jung, Y. H., B. M. Jung, M. O. Shin, and S. J. Bae. 2006. A study on the effects of anticarcinogenic activity of *gloiopeltis tenax*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **35**, 395-401.
17. Kang, Y. H., Y. K. Park, and G. D. Lee. 1996. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compound. *Korean J. Food Sci. Technol.* **28**, 232-239.
18. Kim, G. H., Y. T. Kim, and S. K Kim. 1998. Purification and characteristic properties of β-galactosidase from sea ur-

chin, *Hemicentrotus pulacherrimus*. *J. Korean Fish Soc.* **31**, 637-644.
19. Kim, H. K. 2004. Current Status and Prospect of Nutraceuticals. *Food Industry and Nutrition* **9**, 1-14.
20. Lee, J. Y. and M. S. Ahn. 2000. A study on the Mutagenicity of Thermally Oxidized Safflower *Oil. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **29**, 120-127.
21. Lee, S. M. and C. K. Park. 1984. Acute toxicity of oncheon stream water to the sea urchin, *Hemicentrotus pulacherrimus*. *Bull. Korean fish soc.* **17**, 414-422.
22. Leland, H., T. Hartwell, and A. Weinert. 1989. Checkpoint: Controls that Ensure the Order of Cell cycle Events. *Science* **246**, 629-634.
23. Ody, P. 1995. Herbal insights: A close look at active constituents of medicinalhers. *J. SOFW* **121**, 8-11.
24. Paraiathathu, T., H. D. Groot, and J. P. Kehrer. 1992. Production of reactive oxygen by mitochondria from normoxic and hypoxic rat heart tissue. *Free Radic. Biol. Med.* **13**, 289-297.
25. Park, S. Y., B. M. Jung, Y. H. Choi, and S. J. Bae. 2005. Growth inhibition effects of cancer cell lines by g*loiopeltis furcata* fractions *in vitro*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 771-775.
26. Park Y. B., I. S. Kim, S. J. Yoo, J. K. Ahn, T. G. Lee, D. C. Park, and S. B. Kim. 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.
27. Park, Y. J., M. O. Shin, S. H. Lee, and S. J. Bae. 2005. The growth inhibitory effects of *atrina pecitinata* fractions on cancer cell lines. *Korean J. Nutrition* **38**, 307-312.
28. Rice-Evans, C. A., N. J. Miller, and G. Paganga. 1996, Structure antioxidants activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol. Med.* **20**, 933-956.
29. Prochaska, H. J. and A. B. Santamaria. 1988. 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.
30. Ryu, B. H. and M. S. Ha. 1987. Purification and characteristic properties of DNA polymerase α from sea urchin, *Hemicentrotus pulacherrimus*. *Bull. Korean Fish Soc.* **20**, 136-145.
31. Ryu, B. H., D. S. Kim, K. J. Cho, and D. B. Sin. 1989. Antitumor activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Koran J. Food Sci. Technol.* **21**, 595-600.
32. Ryu, B. H., B. H. Lee, H. S. Park, M. S. Ha, and D. S. Kim. 1986. Purification and characteristic properties of ribonuclease H from sea urchin, *Hemicentrotus pulacherrimus*. *J. Korean Biochem.* **19**, 242-250.
33. Shin, M. O., M. J. Ku, and S. J. Bae. 2007. Cytotoxicity and quinone reductase activity stimulating effects of fin of *thunnus thynnus* extracts in various cancer cells. *Korean J. Nutrition* **40**, 147-153.
34. Shon, J. H, D. Y. Kang, H. C. OH, B. M. Jung, M. H. Kim, M. O. Shin, and S. J. Bae. 2006. The effects on antimicrobal and cytotoxicity of *hijikia fusiformis* fraction. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **39**, 444-450.
35. Sladen, W. P. 1878. On the Asteroidea and Echincodea of the Korean seas. *J. Linn. Soc. Zool.* **14**, 424-445.
36. Steinkellner, H. S., C. Rabot, E. Freywald, G. Nobis, M. Scharf, S. Chabicovsky, S. Knasmüller, and F. Kassie. 2001. Effects of crucifrous vegetable and their constituents on drug metabolizing enzymes involved in the bioactivation of DNA-reactive dietary carcinogens. *Mutation Res.* **48**, 285-297.
37. Terry, D, L. Janice, N. L. Schultz, L. Ning, and L. W. Oberley. 1995. Antioxidant enzyme levels as a function of growth state in cell culture. *Free Radical Biol. Med.* **19**, 53-55.