

오만둥이(*Styela plicata*)의 항유전독성 및 대장암 억제효과에 관한 연구

서보영¹ · 김정미¹ · 이승철² · 박은주^{1*}

¹경남대학교 식품영양학과

²경남대학교 식품생명공학부

Antigenotoxic and Anticarcinogenic Effects of *Styela plicata*

Bo-Young Seo¹, Jung-Mi Kim¹, Seung-Cheol Lee², and Eunju Park^{1*}

¹Dept. of Food and Nutrition, and ²Dept. of Food Science and Biotechnology,
Kyungnam University, Gyeongsan 631-701, Korea

Abstract

Colorectal cancer is the third most common malignant neoplasm in the world. Much attention has been focused on reducing colon cancer risk through medical properties of natural compound that could act as anticarcinogens. In this study, we evaluated the antioxidant and antigenotoxic effects of *Styela plicata* (*S. plicata*) from *in vitro* experiments. *S. plicata* extracts showed antioxidant activity measured by TRAP assay and antigenotoxic effect in 200 μ M H₂O₂ induced DNA damage in human leukocytes. Especially, freeze-dried *S. plicata* extracted with methanol showed the highest level of TRAP (0.225 mM) and inhibition of DNA damage (66.8%). Additionally we observed the effect of *S. plicata* on the formation of aberrant crypt foci (ACF) induced by dimethylhydrazine (DMH) and DMH induced DNA damage (by comet assay) in male SD rats. The animals were divided into three groups and fed high-fat and low fiber diet (100 g lard+20 g cellulose/kg diet) without (normal control and DMH control) or with a 3% (w/w) of lyophilized *S. plicata* powder (DMH+S. *plicata*). One week after beginning the diets, rats were treated with DMH (30 mg/kg, s.c.) for 6 weeks except for normal control group, which was treated saline instead; dietary treatments were continued for the entire experiment. Nine weeks after DMH injection, administration of *S. plicata* resulted in reduction of ACF numbers, to 82.7% of the carcinogen control value (7.67 \pm 2.04 vs. 1.33 \pm 0.53; p<0.01). *S. plicata* supplementation induced antigenotoxic effect on DMH-induced DNA damage in the blood cell (% tail intensity: 6.79 \pm 0.26 vs. 6.13 \pm 0.22). These data indicate that *S. plicata* extract has antigenotoxic and anticarcinogenic effects from *in vitro* experiments and *S. plicata* exerts a protective effect on the process of colon carcinogenesis, possibly by suppressing the DMH-induced DNA damage in blood cell and the development of preneoplastic lesions in colon.

Key words: *Styela plicata*, antioxidant, antigenotoxic, DMH, ACF, colon cancer

서 론

전 세계적으로 암은 사망요인 중 주된 원인으로 알려져 있고, 그 중 대장암의 비율이 높은 것으로 보고된 바 있다(1). 암의 발병원인은 유전적인 요인보다 환경적인 요인의 비율이 우위에 있으며 이는 생활수준이 향상되면서 고단백, 고지방 위주의 서구화된 식생활로의 변화가 가장 큰 요인으로 작용하였으리라 보고 있다(2,3). 정상세포에서 암으로의 진행과정은 크게 개시, 촉진, 진행의 세 단계를 거치면서 발생하는 것으로 알려져 있고, 개시단계는 생체 내에서 발암인자의 대사가 활성화 되어 유전자의 핵산에 비가역적으로 결합함으로써 정상세포의 DNA를 손상시킨다. 이는 신생물 전구 세포를 형성하는 돌연변이 현상으로 설명되어진다. 촉진인자는 발암인자와 독립적으로 세포막의 수용체를 매개로 유

전정보의 발현 및 분화에 가역적으로 관여하는 neoplastic cell로 전환시키며 그 세포가 증식하는 과정에서 양성과 악성이 결정되고, 종양이 암으로 변화하게 된다. 특히 개시단계에서 발생하는 DNA 손상은 암 발생과 83% 이상의 높은 상관성을 나타내므로 개시단계에서 손상된 DNA의 회복과정에 관여하는 물질의 발견은 항암기작을 유추할 수 있는 근거가 된다고 볼 수 있다(4,5). 최근 암의 진단과 치료에 대한 연구와 함께 식품을 비롯한 항암효과를 지니는 물질 검색을 통하여 새로운 암 치료제 개발이 활발히 진행되고 있다. 암은 외과적 수술, 화학요법 및 방사선 등을 이용한 집중적인 치료를 해야 하지만 치료 후의 후유증을 동반하는 경우가 많아 안정성이 높은 약물개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다(6,7). 그 중에서 최근 대두되고 있는 해양생물은 독특한 생태환경으로 인한 특유의 대사과정을 지니고 있고,

*Corresponding author. E-mail: pej@kyungnam.ac.kr
Phone: 82-55-249-2218, Fax: 82-55-244-6504

육상생물에 비해 제한적으로 연구가 진행되고 있어 다양한 신규 생리활성물질의 탐색 가능성을 가지고 있다(8,9).

*Styela plicata*는 Styelidae(미더덕과)의 척삭동물문의 미색동물아문, 해초강, 측성해초목에 속하는 해양생물로서 가늘고 긴 자루가 있고 그 끝이 바위에 붙어있으며, 전체 길이는 5~10 cm로 황갈색을 띄며 외피는 섬유질과 같은 물질로 되어있고 딱딱하다. 주름미더덕, 오만둥이, 흰 멩게라고 불리어지며, 미더덕과 비교하여 등그스름하며 꼬리가 없고, 껍질표면의 돌기가 굵고 다소 열은 빛깔을 띠고 있다(10,11). 독특한 향과 맛을 가지고 있어 주로 찜이나 된장찌개 등의 재료로 식품에 널리 이용되고 있다(12). 오만둥이에 관한 연구는 항균 펩타이드로서 plicatamid라는 octa-peptide가 함유되어 있다는 연구(13)가 선행되어졌고, 헤파린과 dermatan sulfate를 함유하고 있어 항응고에 관한 효능(14)의 연구가 보고된 바 있다. 항산화 및 항암효과에 대한 연구는 사람의 K-562 종양 세포주에 대한 세포독성 효과(15)와 본 연구팀에 의해 수행된 오만둥이 추출물이 가지는 항산화활성 및 *in vitro* 세포 독성효과를 분석한 연구가 보고된 바 있다(10,16,17).

이는 모두 *in vitro* 연구에 국한되어 있다는 제한점이 있으므로 본 연구에서는 *in vitro* 뿐만 아니라 대장암 유발 SD rat 모델을 대상으로 오만둥이의 항암활성 가능성을 탐색해 보고자 하였다.

재료 및 방법

시료의 추출

신선한 오만둥이를 믹서기(Mixer MC 811C, (주)노비타, 천안, 한국)로 분쇄한 후, -70°C 심온동결기(DFU-446E, (주)오폐론, 김포, 한국)에 하루 동안 방치하고, 동결건조기(Freeze Dryer FD 5512, (주)일신랩, 양주, 한국)로 4일 동안 건조시켰다. 건조된 시료는 다시 분쇄기를 이용하여 분말로 만들어 27 mesh 체에 통과시켜 분말의 크기를 일정하게 하였다. 각 시료 3.616 g을 100 mL의 메탄올, 에탄올, 아세톤, 물을 가하여 진탕배양기(HB-201s, (주)한백, 부천, 한국)에서 25°C , 100 rpm의 조건으로 24시간 동안 추출하였다. 추출물은 여과지(Whatman No. 1)로 여과한 후, 회전감압농축기(EYELA N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 37°C 에서 농축하였다. 각 농축물은 유리병에 담아 질소치환 후 4°C 에서 저장하였고, 최종농도 50 mg/mL로 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 실험에 사용하였다.

추출물의 총항산화능(TRAP) 측정

시료 중 총항산화능(TRAP)은 Rice-Evans and Miller의 inhibition assay 방법에 따라 분석하였다(18). 이 방법은 ABTS[2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate), 150 μM]와 metmyoglobin(2.5 μM)을 H_2O_2 (75 μM)로 활성

화시킴으로써 생성된 ferryl myoglobin radical species와의 상호작용에 의해 형성된 ABTS radical cation의 absorbance를 측정하는데 기초를 두고 있으며 그 absorbance의 억제 정도는 sample(0.84% extracts)에 들어 있는 antioxidant capacity에 비례하게 된다. 25 mg/mL의 sample을 6분 동안 30°C 에서 배양한 후 UV/VIS spectrophotometer로 740 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 혈장의 TRAP 농도는 trolox의 calibration curve를 이용하여 계산하였으며 TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity, mM)로 표현하였다.

DNA 손상(Comet assay) 측정

건강한 성인남성 2명으로부터 채혈한 신선한 전혈 5 mL를 Histopaque 1077을 이용해 백혈구를 분리한 후 본 실험에 사용하였다. 준비된 백혈구 세포에 다른 용매 4가지(메탄올, 에탄올, 아세톤, 물)로 추출된 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 신선한 오만둥이와 동결건조 오만둥이를 37°C 에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 백혈구를 PBS로 세척한 후 인위적으로 산화적 스트레스를 유발하기 위하여 200 μM 의 H_2O_2 를 4°C 에 5분간 반응시킨 후 PBS로 세척하였다. Positive control은 오만둥이 시료 대신 DMSO에 200 μM H_2O_2 를 처리한 것을 사용하였다.

Comet assay(19) 측정을 위해 반응을 끝낸 백혈구를 75 μL 의 0.7% low melting agarose gel(LMA)과 섞은 후, 1.0% normal melting agarose(NMA)가 pre-coating된 normal slide 위로 cell suspension과 LMA의 현탁액이 골고루 분산되게 한 후 cover glass로 덮어 4°C 냉장고에 보관하였다. Gel이 굳으면 cover glass를 벗기고 그 위에 다시 0.7% LMA 용액 75 μL 로 한 겹 더 덮었다. 미리 준비해 둔 차가운 alkali lysis buffer(2.5 M NaCl, 100 mM Na_2EDTA , 10 mM tris)에 사용 직전에 1% Triton X-100을 섞은 후 slide를 담가 저온, 암실에서 1시간 동안 침지시켜 DNA의 double strand를 풀어주었다. Lysis가 끝난 후, 슬라이드를 전기영동 탱크에 배열하고 4°C 의 차가운 electrophoresis buffer(300 mM NaOH, 10 mM Na_2EDTA , $\text{pH}>13$)를 채워 20분 동안 unwinding 시켜 DNA의 alkali labile sites가 드러나게 한 후 25 V/300 \pm 3 mA의 전압을 걸어 20분간 전기영동 하였다. 빛에 의해 DNA가 부가적으로 손상되는 것을 방지하기 위해 위의 과정은 어두운 암실 조건에서 처리하였다. 전기영동이 끝난 후 0.4 M Tris buffer(pH 7.4)에 5분씩 담가 세척하는 과정을 3회 반복하여 slide를 건조시키고 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 농도의 ethidium bromide로 핵을 염색하여 cover slip으로 덮은 뒤 형광현미경(Leica, Wetzlar, Germany) 상에서 관찰하였다. CCD camera(Nikon, Tokyo, Japan)를 통해 보내진 각각의 세포핵 image는 Komet 5.0 comet image analyzing system(Kinetic Imaging, Liverpool, UK)이 설치된 컴퓨터를 통해 분석하였다. 백혈구의 hydrogen peroxide에 의한 DNA 손상 및 미더덕 추출물에 의한 손상억제 정도는 핵으로부터

이동해서 꼬리 부분으로 떨어져 나간 꼬리 부분 내 DNA 함량을 측정하여 100%로 환산하여 계산하였다. 각각의 처리구에서 2개의 slide를 만들어 각각 100개 세포의 DNA 손상 정도를 측정하고 각 처리구는 2회 반복 실험하였다.

동물 사육 및 식이

5주령의 SD계 수컷 흰쥐 27마리를 ㈜코아텍사로부터 구입하여 1주일간 lab-chaw 식이(5057, ㈜에그리브랜드 퓨리나 코리아)를 제공하면서 적응시킨 후 체중에 따라 난괴법에 의하여 대조군, 대장암 유발군(DMH), 대장암 유발+오만둥이 투여군(DMH+S. *placata*)으로 나누었다. 세 그룹의 쥐들에게 각각 Table 1과 같이 AIN-93을 기본으로 한 고지방 저섬유소 식이를 9주간 섭취시켰고, 오만둥이 투여군(DMH+S. *placata*)에는 동결건조 시켜 분쇄한 오만둥이를 식이 3%로 섞어 투여하였다. 오만둥이의 영양소 분석결과 단백질 42.8%, 지방 11%, 탄수화물 및 회분이 각각 10.4%, 15.8%로 나타났고 이를 감안하여 실험동물 식이조성을 결정하였다. 대장암을 유발하기 위해 대장암 유발군에 1주일에 한번씩 총 6주간 dimethyl-hydrazine(DMH)을 대퇴부에 30 mg/kg(총 180 mg/kg BW) 농도로 주사하였다. 정상대조군은 DMH 대신 같은 양의 식염수를 대퇴부 주사하였다. 실험동물은 동물실험실에서 개개의 케이지에서 사육하였고 9주 동안 pair feeding 하였으며, 중류수는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 모든 사료는 4°C에 보관하면서 급여하였고, 사육기간 동안 사육실의 온도는 20°C, 습도는 55%를 유지하였으며 명암은 12시간(08:00~20:00)을 주기로 자동 조절하였다. 식이섭취량은 매일 기록하였고 매 7일마다 체중을 측정한 후, 사육일지의 자료를 분석하였다.

혈액 및 각종 장기의 채취

9주간의 사육기간 후에 실험동물들은 12시간 동안 절식시킨 다음 마취 후 복부하대정맥으로부터 혈액을 채취하였다. 혈액은 lithium-heparinic polystyrene tube에 담아 당일에 alkaline comet assay를 실시하도록 하였다. 대장, 간, 신장,

심장, 비장 등의 조직을 적출하여 생리식염수로 남아있는 혈액 및 기타 부착물질을 제거하고 수분을 제거한 후 무게를 측정하였다.

Aberrant crypt foci(ACF) 측정

대장을 맹장에서 직장까지 잘라내어 총 길이를 재고 PBS로 대장의 내용물을 제거한 후 직장부분에서 위쪽으로 전체 대장의 50%를 길이로 잘라 편다. 이를 10% buffered formalin으로 24시간 고정시킨 다음 petri dish에 0.2% methylene blue/saline solution과 함께 5~15분간 방치하였다. Microscope slide에 점막부위를 위로 향하게 놓은 후 광학현미경($\times 40$)으로 관찰하여 ACF 수를 기록하였다(20).

백혈구 DNA 손상의 측정을 위한 comet assay

전혈 10 μ L을 채취하여 75 μ L의 0.7% low melting agarose gel(LMA)과 섞은 후, 0.5% normal melting agarose(NMA)가 pre-coating된 fully frosted slide 위로 전혈과 LMA의 현탁액이 골고루 분산되게 한 후 cover glass로 덮어 4°C 냉장고에 보관하였다. Gel이 굳으면 cover glass를 벗기고 그 위에 다시 0.7% LMA 용액 75 μ L로 한 겹 더 덮었다. 각 샘플 당 슬라이드는 총 2개를 제작하였으며, 이후의 과정은 앞에 서술한 DNA 손상 측정 과정과 동일한 방법으로 수행되었다.

통계처리

모든 자료의 처리는 SPSS-PC+ 통계 package를 사용하여 처리하였다. 각 항목에 따라 백분율과 평균치 \pm 표준오차(SE)를 구하고 각 군 간의 평균차이에 대한 유의성 검정을 위해 one-way 분산분석(ANOVA)을 시행하여 Duncan's multiple range test를 이용하였으며 ACF의 결과 분석은 독립표본 t-test 분석기법을 이용하여 그룹 간의 유의성 차이를 검증하였다. 통계적 유의성은 5% 수준에서 평가하였다.

결과 및 고찰

오만둥이 추출물의 총항산화능(TRAP) 활성 및 DNA 손상 억제력에 미치는 영향

TRAP은 항산화제들의 복합된 활성을 측정하여 특정 물질의 총 유리기 포집 항산화능을 나타내므로 시간과 노력을 절약할 수 있는 매우 유용한 방법이다(18). 오만둥이의 부위별 추출물이 가지는 TRAP 활성에 관한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 건조의 유무에 따른 통계결과, 모든 추출물에서 대조구에 비해 총항산화능이 유의적으로 높은 활성을 나타내었다. 동결건조 한 오만둥이에서는 특히 에탄올 추출물(0.219 mM)과 메탄올 추출물(0.225 mM)이 높은 활성을 보였고, 신선한 오만둥이에서는 메탄올 추출물(0.215 mM)이 가장 높은 항산화력이 있는 것으로 나타났다. 따라서 오만둥이는 산화적 스트레스에 대한 방어능력을 가진 항산화물질

Table 1. Composition of the experimental diets (%)

Ingredients	Normal control	DMH	DMH+S. <i>placata</i>
Casein	20	20	18.716
Corn starch	40.95	40.95	39.56
Sucrose	10	10	10
Corn oil	10	10	9.67
Lard	12	12	12
Cellulose	2	2	2
Vitamin mixture ¹⁾	1	1	1
Mineral mixture ²⁾	3.5	3.5	3.5
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25
DL-Methionine	0.3	0.3	0.3
<i>Styela placata</i>	0	0	3
Total	100	100	100

¹⁾Vitamin mixture: AIN-76A.

²⁾Mineral mixture: AIN.

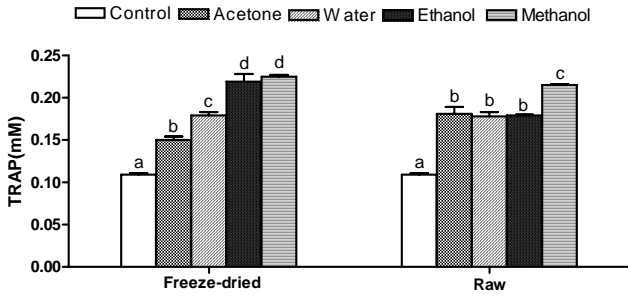


Fig. 1. Antioxidant activity effect of different solvent extracts of *S. placata* on total radical trapping antioxidant potential (TRAP). Values are mean with standard error of triplication experiments. Control: DMSO-treated normal control. Values not sharing the same letter are significantly different from one another ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

을 함유하는 것을 알 수 있다.

Comet assay는 Ostling과 Johanson(19)에 의해 각각의 세포수준에서 DNA 손상을 직접 확인하기 위하여 도입된 micro gel electrophoresis 방법으로 소량의 시료를 필요로 하고 실험과정이 간단할 뿐만 아니라 DNA 손상을 민감하게 감지해 낼 수 있는 장점을 가지고 있다. Comet assay를 이용한 오만둥이 추출물의 DNA 손상 억제 효과 실험 결과는 Fig. 2에 제시하였다. 모든 추출물이 H_2O_2 에 대한 DNA 손상억제력을 유의적으로 향상시키는 것으로 나타났다. 특히 동결건조 한 오만둥이에서 200 μM H_2O_2 만 처리한 positive control(PC)에 대한 DNA 손상정도가 메탄올 추출물이 33.1%(억제력 66.8%)로 가장 낮은 것으로 나타났고, 신선한 오만둥이의 각 용매 추출물 사이에서는 유의적 차이가 없었다. 이 결과는 위의 총항산화력을 측정된 TRAP의 결과와 같은 경향을 보이고 있어 오만둥이가 지닌 천연 항산화물질에 의한 항유전독성에 영향을 주는 것으로 보인다. 지금까지 밝혀진 오만둥이의 항산화물질로는 β -carotene을 비롯한 β -

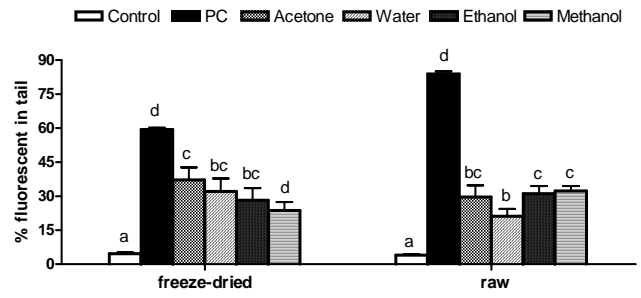


Fig. 2. Effect of supplementation *in vitro* with different solvent extracts of *S. placata* on H_2O_2 induced DNA damage in human leukocytes. Values are mean with standard error of duplicate experiments with leukocytes from each of two different donors. PC, 200 μM H_2O_2 -treated positive control. Values not sharing the same letter are significantly different from one another ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

-cryptoxanthin, zeaxanthin 등이 있고 총 carotenoid의 함량은 껍질에 1.15 mg%, 살 부분에 2.39 mg% 정도 함유되어 있다고 Ha 등(21)이 보고하였다. Human cell에서의 β -cryptoxanthin에 의한 DNA 손상 억제효과에서 H_2O_2 로 산화적 스트레스를 유도한 HeLa cell과 CaCo-2 cell의 DNA 손상억제력을 보면 4 μM 이상의 농도에서 유의적인 억제 효과를 나타내었고, 뿐만 아니라 일정 시간이 지난 후 정상 세포로 회복되는 효과를 보였다(22). 따라서 오만둥이가 가지는 항산화력은 복합적인 carotenoid 성분에 의한 것으로 사료된다.

체중증가량, 식이섭취 및 장기무게에 미치는 영향

식이급여에 따른 체중증가량, 식이섭취량 및 장기무게에 미치는 영향은 Table 2에 제시하였다. 대장암 유발을 위한 DMH 주사 및 동결건조 한 오만둥이 혼합식에 따른 식이섭취량은 각 그룹간의 유의적 차이는 없었다. 그러나 DMH 및 DMH+S. placata군의 식이효율은 대조군에서 비해 유의

Table 2. Effect of *Styela plicata* on the weight gain, food efficiency ratio and relative organ weight in DMH administered rats¹⁾

	Normal control	DMH control ²⁾	DMH+S. <i>plicata</i>
Weight gain (g)	254.4±6.9 ^{b4)}	241.1±7.7 ^b	205.7±7.5 ^a
Food intake (g/day)	15.2±0.5 ^{NS5)}	15.7±0.3	15.8±0.4
FER ³⁾ (%)	28.5±0.6 ^c	26.1±0.6 ^b	22.1±1.0 ^a
Liver (g)	9.52±0.26 ^{ab}	9.66±0.24 ^b	8.86±0.19 ^a
Heart (g)	1.11±0.13 ^{NS}	14.93±13.76	1.16±0.02
Kidney (g)	2.15±0.04 ^{NS}	2.25±0.08	2.26±0.05
Spleen (g)	0.74±0.02 ^{NS}	0.70±0.03	0.67±0.01
Relative organ weight (g/kg BW)			
Liver	2.347±0.040 ^{NS}	2.460±0.056	2.337±0.029
Heart	0.273±0.031 ^{NS}	0.299±0.005	0.306±0.004
Kidney	0.531±0.009 ^a	0.573±0.016 ^b	0.597±0.009 ^b
Spleen	0.183±0.006 ^{NS}	0.178±0.006	0.178±0.004

¹⁾Values are mean±SE for 9 animals in each group.

²⁾DMH control: One week after beginning the diets, rats were treated with dimethyl-hydrazine (DMH) 30 mg/kg for 6 weeks except for normal control group.

³⁾FER: food efficiency ratio.

⁴⁾Values in the same row that don't share a common superscript are significantly different at the $p < 0.05$ level.

⁵⁾NS: not significant.

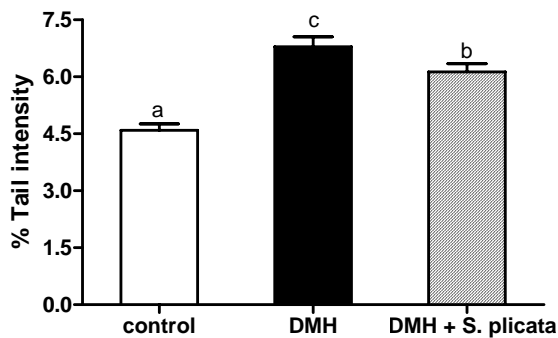


Fig. 3. Effect of *S. plicata* supplementation on DNA damage in leukocytes induced by DMH. Control: normal diets ad and saline, DMH: One week after beginning the diets, rats were treated with dimethyl-hydrazine (DMH) 30 mg/kg for 6 weeks except for normal control group. DMH+S. *plicata*: Rats were treated with 30 mg/kg dimethyl-hydrazine (DMH)+3% *S. plicata*. Bars represent mean±SE. Bars with different superscripts are significantly different at the $p<0.05$ level by ANOVA and Duncan's multiple range test.

적으로 낮았고, 체중증가량도 DMH+S. *plicata*군에서 유의적으로 낮게 나타났다. DMH 주입 및 오만둥이의 보충섭취는 간의 무게에 유의적인 영향을 미치는 것으로 나타났으며 체중 대비 중량으로 계산하였을 때 신장에서 유의적인 차이를 보였다.

오만둥이 식이섭취가 백혈구의 DNA 손상도에 미치는 영향

DMH에 의해 대장암이 유발된 쥐에게 9주간 오만둥이를 보충 섭취시킨 후 백혈구의 DNA 손상정도를 comet assay를 이용하여 분석하였다(Fig. 3). 그 결과, 대조군(4.59%)에 비해 DMH를 투여한 군(6.79%)에서 유의적인 손상정도 증가를 보였고, DMH+S. *plicata*군(6.13%)에서는 DMH를 주입한 군에 비하여 손상정도가 유의적으로 감소하는 효과가 있는 것으로 나타났다. DMH가 DNA의 손상을 유발한다는 결과는 Agner 등(23)에 의해 보고되었다. 오만둥이의 DNA 손상억제력은 앞서 본 *in vitro* 실험 결과에서 나타난 오만둥이가 지니고 있는 항산화물질이 백혈구의 DNA 손상을 억제하는 것으로 생각되어진다.

대장 조직 ACF에 미치는 영향

대장암화과정의 초기단계로 알려져 있는 대장 이상선와소(aberrant crypt foci of colonic mucosa, ACF)는 1987년 Bird에 의해서 화학적 발암물질을 투여한 쥐의 대장 점막에서 처음 이용되었다(24). ACF는 대장을 methylene blue로 염색한 후 현미경을 통해 대장점막 표면에서 관찰되어지는 병변으로 1개에서 수십 개의 crypt를 포함하는 다양한 크기로 나타나며 주위의 정상 점막보다 약간 융기되어 있고, 진하게 염색되는 등 형태학적으로 정상 대장 점막과 구별된다(24,25). 본 연구의 결과는 Fig. 4에 나타난 것과 같이 DMH군에 비하여 DMH+S. *plicata*군의 ACF 생성 수치가 82.7% 정도로 유의적인 감소를 나타내었다($p<0.01$). 오만둥이의 항암활성 효과는 Kim 등(10)에 의해 인간 유래 대장암 세포

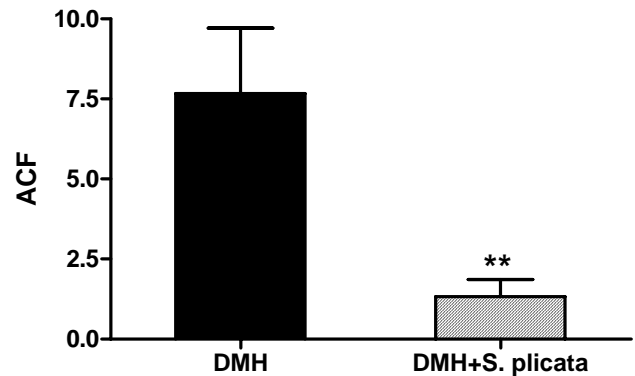


Fig. 4. Effect of *S. plicata* supplementation on total number of aberrant crypt foci (ACF) induced by DMH in distal colon. DMH: One week after beginning the diets, rats were treated with dimethyl-hydrazine (DMH) 30 mg/kg for 6 weeks except for normal control group. DMH+S. *plicata*: Rats were treated with 30 mg/kg dimethyl-hydrazine (DMH)+3% *S. plicata*. Bars represent mean±SE. Significantly different from the DMH group: ** $p<0.01$ (Student's t-test).

주인 HT-29에 대한 오만둥이 추출물의 암세포 증식억제 효과에 대한 선행 결과와 같이 오만둥이에 함유되어 있는 항산화력을 가진 물질에 의한 결과로 유추할 수 있으며, 뿐만 아니라 오만둥이 껍질에 많이 함유되어 있는 불용성 식이섬유소 또한 영향을 미치는 것으로 보인다. Styelidae에 속하는 해양생물의 경우 보통의 해양 동물과 달리 피부 각질에 치밀한 구조의 식물성 셀룰로오스와 유사하게 beta-1.4 구조로 되어 있다(26). 오만둥이에서 직접 식이섬유소 함량을 조사한 연구는 아직 보고된 바 없지만 오만둥이와 같은 Styelidae에 속하는 미더덕의 껍질에서 α -cellulose를 정제한 결과 94%의 수율을 나타내는 것으로 Jung(27)에 의해 밝혀진 바 있어 오만둥이에도 식이섬유소가 풍부할 것으로 사료된다. 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스 등의 불용성 식이섬유소는 변의 용적을 증가시키고, 변이 장 밖으로 운반되는 시간을 단축시켜 장 점막이 암의 촉진인자에 노출되는 시간을 줄여줌으로써 변에 함유되어 있는 암 유발 물질과 암 촉진인자를 빠른 시간 내에 체외로 배출시킴으로써 대장암 발병에 억제 효과가 있는 것으로 알려져 있다(28). 또한 셀룰로오스의 ACF 감소 효과에 관한 연구는 Coleman 등(29)에 의해 보고된 바 있다.

요 약

오만둥이는 우리나라의 전통적인 수산식품으로써 찜 또는 찌개류로 조리하여 널리 이용하여 왔다. 본 연구에서는 오만둥이의 기능성 소재로서의 기능적 특성을 파악하기 위하여 오만둥이 추출물의 항산화 활성 및 항유전독성 활성을 *in vitro* 방법으로 측정하였다. 또한 대장암에 대한 예방효과를 알아보기 위하여 DMH로 대장암을 유발한 SD 쥐를 이용하여 오만둥이를 경구투여한 후 DNA 손상 및 ACF 형성에 미치는 영향을 알아보았다. 그 결과 총항산화능은 모든 추출

물에서 대조구에 비해 유의적으로 높은 활성을 나타내었다. 동결건조 한 추출물에서는 메탄올, 에탄올(0.225, 0.219 mM) > 물(0.179 mM) > 아세톤(0.150 mM) 순으로 나타났으며, 신선한 오만둥이에서는 메탄올 추출물(0.215 mM)이 가장 높은 항산화력이 있는 것으로 나타났다. Comet assay에서는 모든 추출물이 H₂O₂에 의한 산화적 스트레스에 대한 DNA 손상억제력을 향상시키는 것으로 나타났으며 특히 동결건조 한 오만둥이에서 메탄올 추출물의 억제력이 가장 높은 것으로 나타났다. 백혈구의 DNA 손상정도는 대조군에 비해 DMH 투여군에서 유의적으로 손상정도가 증가한 반면, DMH+S. *placata*군에서는 DMH를 주입한 군에 비하여 손상정도가 유의적으로 감소하였다. 또한 ACF의 생성수치가 DMH군에 비하여 DMH+S. *placata*군에서 유의적으로 감소하는 결과를 나타내었다. 이상의 결과로 미루어 볼 때 오만둥이는 *in vitro* 뿐만 아니라 대장암을 유발한 쥐에서도 항산화 및 항암효과에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 나타나 오만둥이가 대장암을 예방하기 위한 기능성식품 소재로서 가능성을 보여 주었다.

감사의 글

본 연구는 2009년도 경남대학교 학술논문게재연구비 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Witz G. 1991. Active oxygen species as factors in multi-stage carcinogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 2: 675-682.
2. Armstrong B, Doll R. 1975. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *Int J Cancer* 15: 617-631.
3. Willet WC. 2001. Diet and cancer: one view at the start of the millennium. The 9th AACR American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. Vol 10, p 3-8.
4. Surh YJ. 1999. Molecular mechanism of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat Res* 428: 305-327.
5. Johnson IT, Williamson G, Musk SRR. 1994. Anticarcinogenic factors in plant food: a new class of nutrients? *Nutr Res Rev* 7: 175-204.
6. Kang TB, Liang NC. 1997. Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukemia cells. *Biochem Pharm* 54: 1013-1018.
7. Park KY, Moon SH, Rhee SH, Baek KY, Lim SY. 1995. Effect of tannin from persimmon leaves on the growth inhibition and the synthesis of mRNA of type IV collagen in AZ-521 human gastric cancer cells. *Environ Mut Carcino* 15: 32-37.
8. Park JC. 1996. Screening of marine natural products on inhibitory effect of the formation of lipid peroxidation. *Kor J Pharm* 27: 117-122.
9. Amador ML, Jimeno J, Paz-Ares L, Cortes-Funes H, Hidalgo M. 2003. Progress in the development and acquisition of anticancer agents from marine sources. *Ann Oncol* 14: 1607-1615.
10. Kim JJ, Kim SJ, Kim SH, Park HR, Lee SC. 2005. Antioxidant and anticancer activities of extracts from *Styela plicata*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 937-941.
11. Lee, EH. 1985. Lipid components of sea squirt, *Halocynthia roretzi*, and Mideuduck, *Styela clava*. *Korean J Food Sci Technol* 17: 289-294.
12. Park SM, Seo HK, Lee SC. 2006. Preparation and quality properties of fish paste containing *Styela placata*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 1256-1259.
13. Tincu JA, Menzel LP, Azimov R, Sands J, Hong T, Waring AJ, Taylor SW, Lehrer RI. 2003. Plicatamide an antimicrobial octapeptide from *Styela plicata* hemocytes. *J Biol Chem* 278: 13546-13553.
14. Cavalcante MCM, Allodi S, Valente AP, Strausi AH, Takahashi HK, Mourão PAS, Pavão MSG. 2000. Occurrence of heparin in the invertebrate *Styela plicata* (Tunicata) is restricted to cell layers facing the outside environment. *J Biol Chem* 275: 36189-36196.
15. Pavão MSG, Aiello KRM, Werneck CC, Silva LCF, Valente AP, Mulloy B, Colwelli NS, Tollefseni DM, Mourão PAS. 1998. Highly sulfated dermatan sulfates from ascidians. *J Biol Chem* 273: 27848-27857.
16. Seo BY, Jung ES, Park HR, Lee SC, Park E. 2006. Effect of acetone extract from *Styela clava* on oxidative DNA damage and anticancer activity. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 49: 227-232.
17. Jung ES, Kim JY, Park E, Park HR, Lee SC. 2006. Cytotoxic effect of extracts from *Styela clava* against human cancer cell lines. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 823-827.
18. Rice-Evan C, Miller N. 1994. Total antioxidant status in plasma and body fluid. *Methods Enzymol* 234: 279-293.
19. Ostling O, Johanson KJ. 1984. Microgel electrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123: 291-298.
20. Bird RP. 1995. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett* 93: 55-71.
21. Ha BS, Baek SH, Kim SY. 2000. Carotenoids components of tunicata, shellfishes and its inhibitory effects on mutagenicity and growth of tumor cell. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 922-934.
22. Lorenzo Y, Azqueta A, Luna L, Bonilla F, Domínguez G, Collins AR. 2009. The carotenoid beta-cryptoxanthin stimulates the repair of DNA oxidation damage in addition to acting as an antioxidant in human cells. *Carcinogenesis* 30: 308-314.
23. Agner AR, Bazo AP, Ribeiro LR, Salvadori DM. 2005. DNA damage and aberrant crypt foci as putative biomarkers to evaluate the chemopreventive effect of annatto (*Bixa orellana* L.) in rat colon carcinogenesis. *Mutat Res* 4: 146-154.
24. Bird RP. 1987. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: Preliminary findings. *Cancer Lett* 37: 147-151.
25. Kim DH. 1999. Aberrant crypt foci in the background colonic mucosa of colorectal adenocarcinoma and their histologic features. *MS Thesis*. Hanyang University.
26. Brett CT. 2000. Cellulose microfibrils in plants: biosynthesis, deposition, and integration into the cell wall. *Int Rev Cytol* 199: 161-199.
27. Jung YJ. 2008. Properties of regenerated cellulose films prepared from the tunicate *Styela clava*. *J Kor Fish Soc* 4: 237-242.
28. Freudenheim JL, Graham S, Horvath PJ, Marshall JR, Haughey BP, Wilkinson G. 1990. Risks associated with

- source of fiber and fiber components in cancer of the colon and rectum. *Cancer Res* 50: 3295-3300.
29. Coleman LJ, Landström EK, Royle PJ, Bird AR, McIntosh GH. 2002. A diet containing α -cellulose and fish oil reduces aberrant crypt foci formation and modulates other possible markers for colon cancer risk in azoxymethane-treated rats. *J Nutr* 132: 2312-2318.

(2009년 4월 16일 접수; 2009년 6월 1일 채택)