

Growth Inhibitory and Quinone Reductase Activity Stimulating Effects of Internal Organs of *Aplysia kurodai* Fractions on Cancer Cell Lines *In vitro*

Mi-Ok Shin*

Dept. of Food and Nutrition, Silla University, Busan 617-736, Korea

Received February 17, 2010 / Accepted March 30, 2010

We investigated the growth inhibitory effect of internal organs of *Aplysia kurodai* (AK) on proliferation in cancer cell lines *in vitro*. The internal organs of AK were extracted with methanol (AKM), which were then further fractionated into four subfractions by using solvent partition method, resulting in hexane (AKMH), methanol (AKMM), butanol (AKMB), and aqueous (AKMA) soluble fractions. We determined the cytotoxic effect of these four fractions in four kinds of cancer cell lines - HepG2, MCF-7, HT29 and B16-F10 - by MTT assay. Among the four subfractions of AKM, AKMM showed the strongest cytotoxic effects on all cancer cell lines which were used. Morphological changes such as membrane shrinking and blebbing of cells were also observed in AKMM treatment in HepG2 cells. In addition, we also observed quinone reductase (QR) induced effect in the methanol layer (AKMM) of HepG2 cells. AKMM showed the highest induction activity of quinone reductase on HepG2 cells among the partition layers. The QR induced effect of AKMM was determined to be 2.4 at 100 µg/ml level with a control value of 1.0. Although further studies are needed, the present work suggests that internal organs of *Aplysia kurodai* (AK) may be a chemopreventive agent for the treatment of human cells.

Key words : Growth inhibitory effect, quinone reductase, internal organs of *Aplysia kurodai* (AK)

서 론

암은 식습관, 자극물, 화학물질, 방사성 물질 및 바이러스 인자와 같은 환경적요인과 유전적 요소, 노화 및 호르몬의 부조화 등의 내인성 요인이 관여하여 인체가 가지는 적절한 세포 사멸과 분화, 성장의 조절 메커니즘을 방해함으로써 세포의 비정상적이고 무절제한 증식을 이끌면서 세포수의 균형을 무너뜨려 마침내 다른 조직에 침투되는 질병이라고 알려져 있다[3,16]. 최근 암의 발생 원인과 발생기전을 해명하고 치료, 예방하려는 연구가 많이 진행되고 있으며 암 백신[2], 면역요법[8], 생물학적 제제[4] 등이 제시되고 있으나 좀 더 적극적인 예방법 즉, 암 화학예방(chemoprevention)에 대해 많은 관심이 재고되고 널리 연구 중에 있다. 대표적인 암 예방 기전의 연구에 사용하는 생화학적 분석 방법은 체내 독성물질이나 발암물질을 무독화 시키는 phase II 효소인 quinone reductase (QR)와 glutathione S-transferase (GST) 활성유도와 phase I 효소인 cytochrome P450 효소 활성 억제, glutathione 생성, transformed cell에서 그 함량이 증가되는 polyamine 생성억제 등의 측정이 있다[6]. 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[34]. 암 화학예방은 암의 발생을 예방하거나 암화 과정을 천천히 진행시키는 제제나 천연 화합물을 섭취함으로써 심각한 암이나 질병을 발생하는 위험부담을 줄이는 것이다[14]. 따라서, 많은 연구자들은 독성을 가지지 않고 안전하게 암을 치료할 수 있는 새로운 천연소재의 치료제와 기능성 식품을 개발하기 위해 천연물질에 관심을 갖고 있다.

이와 같이 천연 소재의 원천으로 바다를 들 수 있는데, 지구상에 남아 있는 마지막 자원의 보고인 해수 중에는 50만종 이상의 풍부한 해양생물이 폐쇄계의 독특한 환경에 적응하면서 살아가고 있다. 또한 최근 들어 항 발암 효과에 대한 연구가 육상 생물에서뿐만 아니라 해양 생물에서 활발한 연구가 진행되고 있으며[27] 특히, 해양생물은 육상생물에 없는 특유의 대사과정으로 인하여 다양한 신규생리활성물질의 탐색 가능성을 가지고 있어 미지의 천연물질 개발에 기대가 높고 평가되고 있다[21]. 또한 이러한 해양생물 중 해조류와 같은 해양식물 종들의 다양한 생리활성들이 밝혀지고 있는 가운데, 해양 동물 종들에 대한 연구 또한 관심의 대상이 되고 있다. 그러나 이러한 다양한 종의 해양 동물이 있음에도 불구하고 생리활성의 연구가 진행되고 있거나 연구가 수행되어진 것은 드문 실정이다. 현재까지 발표된 해양 동물의 생리활성으로는 불가사리, 성게껍질과 우렁쉥이껍질, 해삼 등으로부터 분리된 해삼 당단백질과 황산 콘드로이친, 락틴 등의 생리활성 물질이 항 돌연변이 및 항암효과, 항산화, 항균 효과를 가진다는 보고

*Corresponding author

Tel : +82-51-999-6272, Fax : +82-51-999-5457

E-mail : shinmo@silla.ac.kr

등이 있다[32].

본 연구에 사용되어진 군소(*Aplysia kurodai*)는 무순목 군소과에 속하는 연체동물로, 우리나라와 일본, 대만 등지의 조간대 얕은 바다에서 주로 서식하고 있으며, 먹이가 되는 홍조류, 갈조류 및 녹조류 등의 해조류가 무성한 바위근처에서 주로 볼 수 있다[7]. 흑갈색에 회백색 얼룩무늬가 많으며 몸을 보호하는 패각 대신 균청색 색소를 뽑아 자신을 보호하는 특징을 가지며, 일반적으로 조리 시 내장과 보라색 색소를 빼내고 삶아 군소몸통을 먹으며, 경상도 해안지방에서는 제사상에도 올려진다. 그리고 군소 체중의 약 50%나 되는 생식기관을 포함한 내장부분은 거의 대부분 폐기되어진다. 한편, 군소는 단순한 신경계와 동정이 쉬운 거대 뉴런을 지니고 있어 신경생물학 연구에 중요한 실험동물로 이용되고 있고, 미국에서는 군소의 신경계를 이용하여 학습과 기억에 대한 연구가 꾸준히 진행되고 있다[11]. 국내에서도 세계적 추세에 따라 군소의 신경 생물학적 연구가 절실히 요구되고 있으나 현재까지의 군소에 대한 연구는 아주 미비하며 단순히 분류나 분포 등에 관한 생태학적 보고가 되고 있을 뿐이다[7,13,15]. 특히, 우리나라 연근해에 서식하는 군소는 식용 이외에는 거의 이용이 없는 실정이며, 군소에 대한 생물학적 기초 연구는 표지(Tagging)를 이용한 조건대 군소의 성장에 대한 연구[19], 개체크기와 난의 크기와의 관계에 대한 연구[33]등과 군소의 중추신경계를 이용한 SCPs, Buccalin, myomodulin 등의 신경성 펩타이드에 대한 연구[12,17,18] 등에 불과하다. 그리고 군소가 가지는 생리 활성 성분에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 폐기 되어지는 군소 부산물인 군소 내장을 이용하여, 암세포 성장 억제 효과를 MTT assay를 이용하여 알아보았고, 암 예방 물질 탐색에 사용되어지는 quinone reductase (QR) 유도 활성 증가 효과를 측정하여 암 예방 효과를 검토하여 발암 억제 효과를 가진 기능성 식품으로서의 개발 가능성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 군소내장(internal organs of *Aplysia kurodai*, AK)은 2008년 3월 부산 해운대 연안에서 구입하였다. 세포실험에 사용된 시약 중 NP-40과 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)와 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 구입하였다. 그 외 연구에 사용된 용매 및 시약은 특급을 사용하였다.

시료의 추출 및 분획물 제조

시료로 사용된 군소내장은 수세, 건조하여 분쇄한후 메탄올을 1:5 (W/V)의 비율로 첨가하여 상온에서 2회 추출하고, 극성과 비극성으로 선별물질을 추출하기 위하여 다시 메탄올과 다이클로로메탄(CH_2Cl_2)을 1:1로 섞은 용액에 2회 추출한 후 회전식 진공농축기로 일정시간 감압 농축시켜 동결건조한 후 군소내장 methanol추출물(AKM)을 얻었다. 이 추출물을 hexane층(AKMH), methanol층(AKMM), butanol층(AKMB) 및 aqueous층(AKMA)으로 나누어 비극성에서 극성으로 계통 분획하고 각 분획층을 감압 농축 후 동결 건조하여 분말로 만들어 시료로 사용하였다.

세포배양

본 실험에 사용한 암세포주는 인체 간암 세포인 HepG2 (Human hepatocellular carcinoma), 유방암 세포인 MCF-7 (Human breast adenocarcinoma pleural effusion), 대장암 세포인 HT-29 (Human colon adenocarcinoma) 및 마우스 유래의 피부암세포주인 B16-F10 (mouse melanoma)로서 2005년 6월 한국세포주은행으로부터 분양받아 사용하였다.

HepG2, MCF-7, B16-F10 세포주는 DMEM medium을 사용하였고 HT-29 세포주는 RPMI1640을 사용하였으며 medium에 10%의 fetal bovine serum (FBS)와 1% 100 units/ml의 penicillin streptomycin이 함유된 것으로 T-75 flask에 이식한 후 37°C, 5% CO_2 incubator에서 monolayer로 배양하였다. 위의 3종의 세포주는 일주일에 2~3회 정도 새로운 배지로 교환하고 flask에 암세포주가 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 flask에 10 ml 씩 분할하여 주입하고 4~5일마다 계대배양하면서 실험에 사용하였다. 계대 배양시 각각의 passage number가 10회 이상일 때는 액체질소탱크로부터 새로운 세포를 꺼내어 다시 배양하여 실험하였다.

암세포 성장 억제 효과(Cytotoxicity) 측정

군소내장 분획물의 암세포 증식억제효과는 MTT assay를 사용하여 행하였다. MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) [1,5] assay는 세포의 생육을 측정하는 방법으로서 살아있는 세포의 미토콘드리아 내의 dehydrogenase가 황색 수용성 물질인 MTT에 의해 dark blue formazan을 생성하는 원리를 이용하였다.

이를 위해 각 세포주는 1×10^5 cells/well의 농도로 맞추고 24 well에 각각 1 ml씩 첨가하여 24시간동안 37°C, 5% CO_2 incubator에 배양한 후 용매종류별 분획물을 각각 일정량의 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여서 50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가하였다. 일정시간 동안 배양한 후 각

well에 PBS 완충액에 녹인 MTT 용액을 100 μ l씩 첨가하여 4시간동안 다시 배양시킨 후, well 바닥에 형성된 formazan이 흐트러지지 않게 상등액을 제거하고 DMSO와 ethanol을 1:1로 혼합한 용액을 1 ml를 첨가하여 천천히 녹인 후 Multi-detection microplate를 이용하여 570 nm, 690 nm에서 측정하였다. 대조군 세포수를 100%로 정하고 상대적인 세포성장 억제율을 구하였다.

위상차 현미경을 이용한 세포형태학적 관찰

세포배양용 petridish에 각각의 암세포주를 24시간 동안 안정화시킨 다음 군소내장 분획물을 농도별로 처리하여 48시간 동안 배양한 후, 위상차 현미경을 이용하여 200배의 배율로 각 농도에 따른 형태의 변화를 관찰한 후에 Olympus DP70을 이용하여 촬영하였다.

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[9,25,26].

QR생성 유도 효과는 Prochaska와 Santamaria [20,24]의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. T-75 flask의 세포가 80% 이상 증식하게 되면 24 well plate의 각 well에 1×10^4 cells/ml 되도록 HepG2 세포주를 분주하여, incubator에 24시간동안 배양한 후 오징어내장 분획물을 HepG2의 세포생존율이 50% 되는 양을 final 농도로 잡아 각각 DMSO에 녹여 20, 40, 60, 80 및 100 μ g/ml의 농도로 첨가하고 다시 24시간동안 배양한 다음 배양액을 제거하였다. 배지가 제거된 각 well에 250 μ l의 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 μ M FAD, 0.8 mM glucose-6-phosphate, 2 Unit/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase, 25 μ M NADP, 40 μ g/ml MTT 및 1 mM menadione을 혼합하여 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 μ l 씩 첨가하여 효소반응을 정지시키고 Multi-detection microplate를 이용하여 610 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다. 그리고 단백질량은 동일한 set의 well plate에 대한 crystal violet 염색방법으로 정량하였다.

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% EtOH) 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

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

통계처리

본 실험에 대한 실험결과는 세 번 실험하여 얻어진 평균치 및 표준편차를 나타내었고, 그룹간의 통계적 차이는 student's t-test를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

군소내장의 각 용매별 분획물 수율

군소내장은 동결 건조 후 메탄올을 1:5 (W/V)의 비율로 첨가한 후 상온에서 2회 추출하고, 극성과 비극성으로 선별물질을 추출하기 위하여 다시 메탄올과 다이클로로메탄(CH₂Cl₂)을 1:1로 섞은 용매에 2회 추출하여 군소내장 추출물(AKM) 23.62 g을 얻고, 이 추출물을 분획하여 hexane층(AKMH) 1.44%, methanol층(AKMM) 4.36%, butanol층(AKMB) 2.88% 및 aqueous층(AKMA) 46.87%를 수득하였으며, 각 시료의 용매별 수득율은 Table 1과 같다.

군소내장 분획물의 암세포 성장 억제 효과 측정

본 실험에서는 간암 세포인 HepG2, 유방암 세포인 MCF-7, 대장암 세포인 HT-29 및 피부암세포주인 B16-F10 를 이용하여 군소내장 분획물에 대한 각 암세포주의 성장 억제 효과를 MTT assay를 이용하여 알아보았다. Fig. 1은 HepG2 세포주에 대한 실험 결과이며 군소내장 분획물의 암세포 성장 억제 효과는 AKMM층에서 가장 높은 억제 효과를 나타내었다. 150 μ g/ml의 농도에서 77.26%의 억제 효과를 나타내었고, 250 μ g/ml 농도에서는 84.57%의 가장 높은 암세포 성장 억제 효과를 나타내었다. 다음으로 AKMB층에서 암세포 성장 억제 효과를 나타내었으며 250 μ g/ml 농도에서 56.55%의 다소 낮은 억제

Table 1. Yields(%) of various solvent fractions of internal organs of *Aplysia kurodai* (AK)

Fractions	Yields (g)	Yields (%)
Methanol ex.	23.62	23.62
Hexane fr.	0.34	1.44
Methanol fr.	1.03	4.36
n-Butanol fr.	0.68	2.88
Aqueous fr.	11.07	46.87

ex: extract, fr: fraction

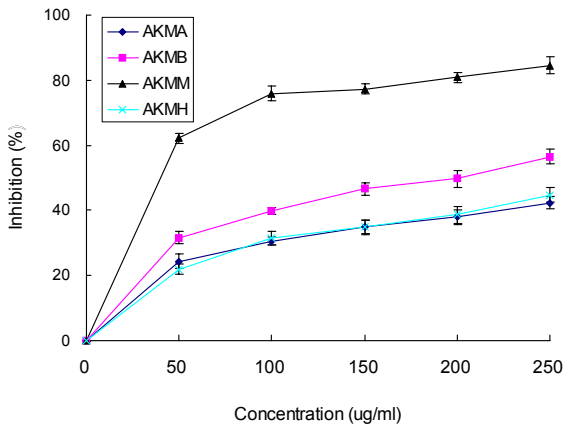


Fig. 1. Inhibitory effects on cell survival of various partition layers of internal organs of *Aplysia kurodai* (AK) on HepG2 cells. AKMM: Methanol partition layer of methanol extracts of internal organs of *Aplysia kurodai* (AKM), TIMH: Hexane partition layer of AKM, AKMB: Butanol partition layer of AKM, AKMA: Aqueous layer of AKM.

효과를 나타내었다. 그리고 AKMH층과 AKMA층의 암세포 성장 억제 효과는 거의 비슷한 효과를 보였으며 최종농도인 250 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서도 각각 44.80%와 42.38%의 수치를 나타내어 매우 낮은 효과를 나타내었다. Fig. 2는 MCF-7 세포주에 대한 결과로서 HepG2 에서와 마찬가지로 AKMM층에서 가장 높은 억제 효과를 나타내어 250 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 79.65%의 효과를 나타내었으며, 다음으로 AKMB층에서는 250 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 55.85%의 억제효과를 나타내었다. 그리고 AKMH층에서는 조금 더 낮은 47.16%의 암세포 성장 억제 효과를 나타내었으며, AKMA층에서는 최종 농도인 250 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서도 가장 낮은 41.95%의 암세포 성장 억제 효과를 나타내었다. Fig. 3은 HT-29 세포주에 대한 결과로서 앞의 결과에서와 같이 AKMM층에서 가장 높은 억제 효과를 보였다. 즉, 250 $\mu\text{g/ml}$

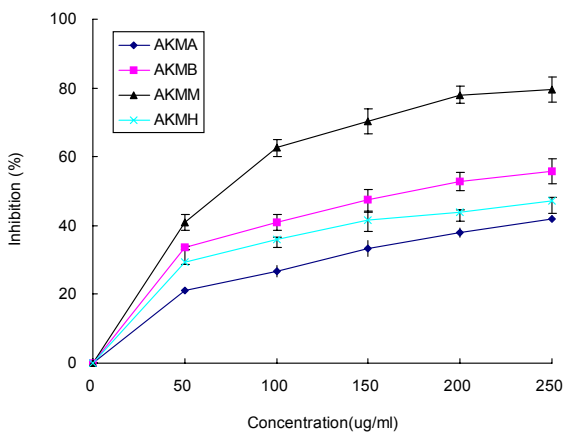


Fig. 2. Inhibitory effects on cell survival of various partition layers of internal organs of *Aplysia kurodai* on MCF-7 cells.

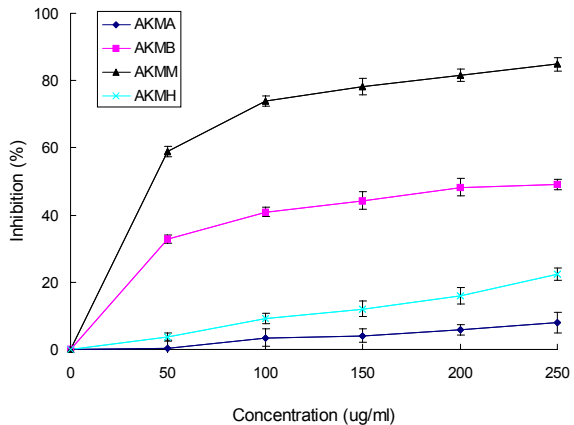


Fig. 3. Inhibitory effects on cell survival of various partition layers of internal organs of *Aplysia kurodai* on HT-29 cells.

의 최종농도에서 AKMM층이 84.86%의 가장 높은 암세포 억제 효과를 나타내었으며, 다음으로 AKMB층에서 49.97%의 억제효과를 나타내었고, AKMH층과 AKMA층에서는 22.47%와 8.05%의 아주 낮은 암세포 성장 억제 효과를 나타내었다. Fig. 4는 B16-F10 세포주에 대한 결과로서 앞의 HepG2, MCF-7 및 HT-29 세포주에서와 마찬가지로 AKMM층에서 가장 높은 억제 효과를 보였다. 특히 B16-F10 세포주에서는 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 이미 85.99%의 억제효과를 나타내었고 150 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 92.89%, 250 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 94.12%의 억제효과를 보여 앞의 HepG2, MCF-7 및 HT-29 세포주에 비해 가장 높은 암세포 성장 억제 효과를 나타내었다. 4가지 암세포주에 미치는 군소내장 분획물의 암세포 성장 억제에 대한 실험 결과에서 methanol 분획층인 AKMM층에서 그 효과가 가장 높게 나타났으며 다음으로 butanol 분획층인 AKMB층에서 암세포 성장 억제 효과를 나타내었고 hexane과 aqueous 분획층에서는 유의성 있는 효과를 거의 볼 수 없었다. 이와 같은 결과는

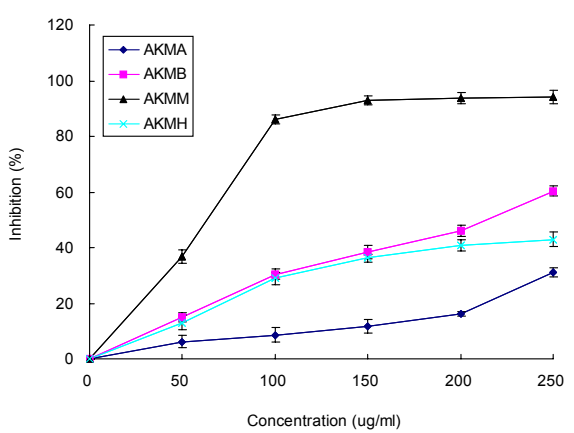


Fig. 4. Inhibitory effects on cell survival of various partition layers of internal organs of *Aplysia kurodai* on B16-F10 cells.

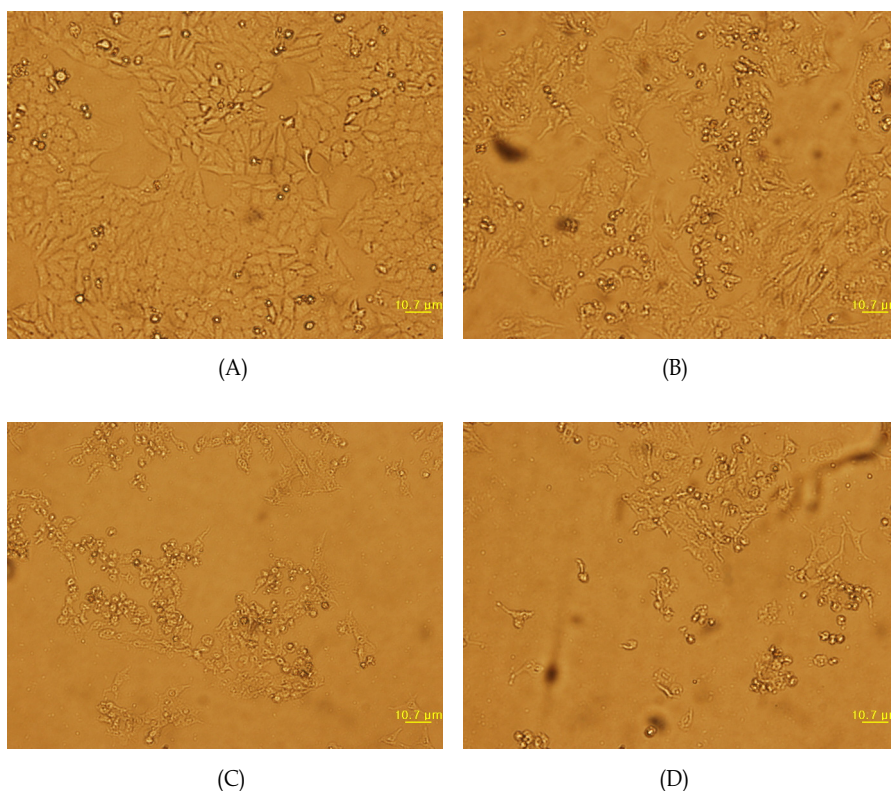


Fig. 5. Photomicrographs (×200) of HepG2 cells on methanol partition layers of internal organs of *Aplysia kurodai*. (A) Control. (B) AKMM 50 µg/ml (C) AKMM 150 µg/ml (D) AKMM 250 µg/ml

본 실험실에서 연구되어진 키조개, 참치지느러미 등의 해양 동물과 대부분의 해조류가 모두 methanol 분획층에서 가장 높은 암세포 성장 억제 효과를 나타낸 결과[17,22,28,31]와 일치하였으나 오징어내장과 말뚝성게 분획물이 hexane 분획층에서 가장 높은 암세포 성장 억제 효과를 나타낸 결과와 [29,30]는 다른 결과에 해당된다. 그리고 시료의 농도를 비교해 볼 때, 키조개와 말뚝성게의 암세포 성장 억제효과와 비슷하였고 특히, 폐기되어지는 부산물인 오징어내장의 결과와 비교해볼 때 오징어내장 시료농도의 약 1/2에 해당되는 농도에서 유사한 효과를 나타내어 오징어내장에 비해서는 높은 암세포 성장 억제 효과를 확인할 수 있었다[23,29,30]. 이상으로 암세포 성장 억제 효과를 일으키는 군소내장의 생리활성 물질은 methanol 분획층에 주로 존재한다고 추측해 볼 수 있었으며 앞으로 이들 분획층에서의 암세포 성장을 억제하기 위한 기능성 물질의 존재가 기대되어진다. 그리고 실험에 사용한 세포주들을 비교해 볼 때, AKMM층이 피부암 세포주에서 가장 높은 억제효과를 나타내었으며 다음으로 대장암, 간암 및 유방암 순으로 억제효과를 나타내었다. 앞으로 더욱 심도 있는 연구를 통해 이들 분획층의 생리 활성물질들을 규명하고 구조와 그 기전들을 알아보는 연구가 진행되어야 한다고 생각된다.

AKMM층의 처리에 따른 암세포의 형태학적 변화

암세포 성장 억제 효과에서 가장 높은 효과를 나타낸 methanol 분획층인 AKMM층의 처리가 암세포의 형태에 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위해 각 세포주에 여러 농도의 AKMM층을 48시간 동안 처리한 후 위상차현미경으로 형태학적인 관찰을 하였다. Fig. 5는 HepG2 세포주에 농도별로 시료를 첨가한 후의 세포형태의 변화를 관찰한 결과이다. 시료 농도의 증가에 따라 의존적으로 현저한 세포 밀도의 감소현상과 세포막의 shrinking 및 blebbing 현상 등의 형태학적 변화가 나타났으며 암세포들의 부착력 상실과 파괴된 세포 잔여물들이 뚜렷하게 관찰되었다.

Quinone reductase 유도 활성 증가 효과

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 flavoprotein의 일종이다. 특히 QR은 phase II 효소계의 지표효소로서 다양한 종류의 항암물질에 의해 그 활성이 유도되어 암예방을 선도하는 특성을 가지고 있어서 암 예방 물질의 탐색에 많이 사용되어 왔다 [9,25,26]. 암세포 성장 억제 효과에 사용된 4종의 암세포 중

유일하게 quinone reductase를 가지고 있는 간암 세포인 HepG2 세포주를 사용하여 군소내장의 QR 유도 활성 증가 효과를 측정하였으며 그 결과는 Fig. 6과 같다. HepG2 암세포주에 대한 용매별 군소내장 분획물을 각각 20, 40, 60, 80 및 100 µg/ml씩 첨가했을 때, AKMM층이 가장 높은 효과를 보인 암세포 성장 억제 효과의 결과와 같이 AKMM층에서 가장 높은 QR유도 활성 증가 효과를 나타내었다. 대조군을 1로 했을 경우 AKMM층에서 그 효과가 농도 의존적으로 유의성 있게 증가하였으며 40 µg/ml 첨가 했을 때 이미 2.0배의 QR유도 활성 증가 효과를 보였고 80 µg/ml 첨가 했을 때 2.2배 그리고 최종농도인 100 µg/ml 첨가 했을 때에는 대조군에 비해 AKMM층이 2.4배의 높은 QR 유도 활성을 나타내었다. 그러나 다른 모든 분획층에서는 대부분 1에 가까운 수치를 나타내어 QR 유도 활성 증가 효과를 거의 볼 수 없었다. 이상의 결과에서 군소내장 분획물 중 AKMM층에서 가장 높은 유의성 있는 QR 유도 활성을 보였으므로 methanol 분획층인 AKMM층에서 암 예방 효소계인 quinone reductase의 inducer가 주로 존재함을 추정할 수 있었다. 이러한 결과는 본 연구실에서 연구된 다른 시료들과 비교해 볼 때, 키조개[23], 참치지느러미[28], 오징어내장[29] 등의 해양생물이 주로 메탄올 분획층에서 가장 높은 QR 활성 효과를 나타낸 결과와 일치하였고, 시료의 농도를 비교하여 볼 때 최저농도인 20 µg/ml에서 이미 1.7 배의 QR 유도 활성을 나타내어 위의 해양 동물 중 가장 높은 QR 유도 활성 효과에 해당되었다. 특히, 폐기되어지는 부산물인 오징어내장[29]의 실험결과와 비교해볼 때 오징어내장은 시료 최종농도인 270 µg/ml에서 2배의 효과를 보여 군소내장

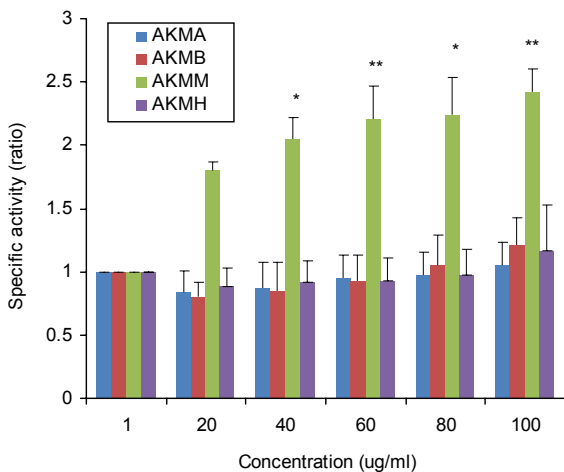


Fig. 6. Effects of various partition layers of internal organs of *Aplysia kurodai* on the induction of quinone reductase in HepG2 cells. Cells were cultured at a starting density of 1×10^4 cells/ml in DMEM. values are represented mean±SD of 3 repeats. Significantly different by t-test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control.

의 QR 유도 활성효과는 매우 높다고 할 수 있다. 앞으로 더욱 더 심도 있는 연구를 통해 군소내장 분획물중 methanol 분획층인 AKMM층에서의 생리활성 물질을 추적, 보완하여 그 구조를 동정함으로써 식품산업에 있어서의 암 예방 효과를 지닌 기능성 식품개발에 매우 중요한 자료가 될 수 있을 것으로 사료된다.

References

- Alley, M. C., D. A. Scudiero, A. Monks, M. L. Hursey, M. J. Czerwinski, D. L. Fine, B. J. Abbott, 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.
- Bae, M. J., S. T. Yee, S. Y. Chae, S. H. Shin, S. H. Kweon, M. H. Park, M. K. Song, and S. J. Hwang. 2004. The effect of arabinosylane and the polysaccharide peptide (PSP) on the antiallergy, anticancer. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **33**, 469-474.
- Banner, S. E., U. Pastorino, S. M. Lippman, and W. K. Hong. 1994. Second international chemoprevention conference. *Cancer Res.* **54**, 854-860.
- Budd, G. T., B. Osgood, B. Barna, I. M. Boyett, J. Finke, S. V. Mdentrop, S. Murth, and R. M. Bukoski. 1989. Phase I clinical trial Toxicity and immunologic effects, *Cancer Res.* **49**, 6432-6439.
- Carmichael, J., W. G. De Graff, A. F. Gazder, J. D. Minna, and J. B. Mitchell. 1987. Evaluation of the tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**, 936-942.
- Cha, B. C., H. W. Lee, and M. Y. Cho. 1998. Antioxidative and antimicrobial effects of nut species. *Kor. J. Pharmacogn.* **29**, 28-34.
- Choe, B. L. and J. R. Lee. 1994. Opisthobranchs (mollusca: gastropoda) from ullung and dog-do islands, korea. *Korean J. Zool.* **37**, 352-376.
- Giampietri, A. 1981. Drug-mediated increase of tumor immunogenicity *in vivo* for a new approach to experimental cancer immunotherapy. *Cancer Res.* **41**, 681-685.
- Giampietri, A. 1981. Drug-mediated increase of tumor immunogenicity *in vivo* for a new approach to experimental cancer immunotherapy. *Cancer Res.* **41**, 681-685.
- Hong, E. Y., H. J. Kang, C. S. Kwan, Y. J. Na, M. J. Suh, and J. S. Kim. 1997. Modulation of cellular quinone reductase inducibility by roasting treatment and acid hydrolysis of perilla. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**, 186-192.
- 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.
- Kandel, E. R., J. H. Schwartz, and T. M. Jessell. 2000. Principles of neural science, 4th eds. McGraw-Hill, New York, 180.
- Kim, C. H., H. J. Seo, E. Y. Hwang, E. J. Kim, H. J. Go, I. H. Kim, J. K. Seo, J. H. Moon, M. D. Huh, and N. G.

- Park. 2001. Purification of myomoduline A and myomodulin E from the central nervous system of the sea hare, *Aplysia kurodai*. *J. Korean Fish Soc.* **34**, 279-284.
13. Kim, H. S. and B. L. Choe. 1981. The fauna of marine invertebrate in ulreung is. and dog-do is. special report. *The Conservation of Nature and Natural Resources* **19**, 193-200.
 14. Kim, J. S. 2005. Cancer chemoprevention and NSAID-activated gene (NAG-1). *Biochemistry and Molecular Biology News* **12**, 286-291.
 15. Lee, J. S. and D. K. Min. 2002. A catalogue of molluscan fauna in Korea. *Opisthobranchs* **18**, 93-97.
 16. Lee, Y. S., D. S. Kim, B. H. Ryu, and S. H. Lee. 1992. Antitumor and Immunodulating effect of seaweeds toward sarcoma-180 cell. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **21**, 544-550.
 17. Lloyd, P. E., I. Kuufermann, and K. R. Weiss. 1987. Sequence of small cardioactive peptide A: A second member of a class of neuropeptides in *Aplysia*. *Peptides* **8**, 179-184.
 18. Morris, H. R., M. Panico, A. Karplus, P. E. Lloyd, and B. Riniker. 1982. Elucidation by FAB-MS of the structure of a new cardioactive peptide from *Aplysia*. *Nature* **300**, 643-645.
 19. Nishiwaki, S., H. Ueda, and T. Makioka. 1975. Tagging studies on the growth of the sea hare *Aplysia kurodai* on an intertidal rocky shore. *Marine Biology* **32**, 389-395.
 20. Park, H. J. 1998. Induction of quinone reductase and its regulatory mechanism at the transcriptional level by *Scutellaria baicalensis*, Ph. D. *Dissertation*, Yonsei University, Seoul.
 21. Park, J. C. and J. W. Choi. 1996. Screening of marine natural products on inhibitory effect of the formation of lipid peroxidation. *Kor. J. Pharmacogn.* **27**, 117-122.
 22. Park, S. Y., B. M. Jung, Y. H. Choi, and S. J. Bae. 2005. Growth inhibition effects of cancer cell lines by *gloiopeltis furcata* fractions *in vitro*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 771-775.
 23. Park, Y. J., M. O. Shin, S. H. Lee, and S. J. Bae. 2005. The growth inhibitory effects of *atrina pectinata* fractions on cancer cell lines. *Korean J. Nutrition* **38**, 307-312.
 24. Prochaska, H. J. 1994. Screening strategies for the detection of anticarcinogenic enzyme inducers. *J. Nutr. Biochem.* **5**, 360-370.
 25. Prochaska, H. J., A. B. Santamaria, and P. Talalay. 1992. Rapid detection of inducers of enzyme that protect against carcinogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2394-2399.
 26. Prochaska, H. J. and A. B. Santamaria. 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.
 27. Schwartsmann, G., A. B. Roch, R. G. Berlinck, and J. Jimeno. 2001. Marine organisms as a source of new anticancer agents. *Oncology* **2**, 221-225.
 28. 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.
 29. Shin, M. O. and S. J. Bae. 2009. Growth inhibitory and quinone reductase activity stimulating effects of internal organs of *todarodes pacificus* fractions on human cancer cell lines *in vitro*. *J. Life Science* **19**, 1251-1257.
 30. Shin, M. O. and S. J. Bae. 2009. The anticarcinogenic and antioxidative activity of *Hemicentrotus pulcherrimus* fractions in various cancer cells. *J. Life Science* **19**, 607-614.
 31. 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 antimicrobial and cytotoxicity of *hijikia fusiformis* fraction. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **39**, 444-450.
 32. Shon, Y. H., K. H. Jeune, and S. J. Choi. 1998. Chung S. R. Life Science; Antitumor effect of asterina pecinifera lectin on ascitic tumor. *Yakhak Hoeji* **42**, 99-105.
 33. Tusa, Y. 1994. Size-related egg production in a simultaneous hermaphrodite, the sea hare *Aplysia kurodai* baba (mollusca: opisthobranchia). *Publ. Seto Mar. Biol.* **36**, 249-254.
 34. Wefers, H., T. Komai, P. Talalay, and H. Sies. 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.

초록 : 군소내장 분획물의 *in vitro*에서의 암세포 성장억제 및 quinone reductase 유도 활성 증가 효과

신 미 옥*

(신라대학교 식품영양학과)

본 연구에서는 군소내장을 각 용매별로 분획하여 암세포 성장 억제 효과와 quinone reductase (QR) 유도 활성 증가 효과를 알아보았다. 간암 세포인 HepG2, 유방암 세포주인 MCF-7, 대장암 세포주인 HT-29 그리고 피부암 세포주인 B16-F10 를 이용하여 암세포 성장 억제 효과를 실험한 결과 모든 세포주에서 AKMM층에서 농도 의존적으로 가장 높은 암세포 성장 억제 효과를 나타내었다. 그리고 다음으로 AKMB층, AKMH층 및 AKMA층의 순이었다. 그리고 4종의 암세포주 중에서 B16-F10 세포주가 가장 높은 암세포 성장 억제 효과를 나타내어 특히 피부암에 대한 예방효과가 기대되어진다. 또한 암 예방 효과를 알아보기 위하여 4종의 암세포 중 유일하게 quinone reductase를 가지고 있는 인체 간암세포주인 HepG2를 이용하여 QR 유도 활성 증가 효과를 측정된 결과, 암세포 성장 억제 효과에 있어서 가장 높은 효과를 나타낸 AKMM층에서 가장 높은 QR 유도 활성 증가 효과를 나타내었다. 그러나 다른 분획층에서는 QR 유도 활성 증가 효과를 거의 볼 수 없었다. 이상으로 암세포 성장 억제 효과와 QR 유도 활성 효과에서 모두 methanol 분획층인 AKMM층에서 가장 높게 나타났으므로 이 분획층에 유효한 생리활성 물질이 함유되어 있을 가능성이 추정되어진다. 따라서 폐기되어지는 군소부산물인 내장을 이용한 암 예방 관련 기능성 식품의 개발 가능성이 기대되어지며, 이를 위한 AKMM분획층에 대한 더욱더 심도 높은 집중적인 연구가 요구되어진다.