

미더덕 아세톤 추출물이 산화적 DNA 손상억제 및 암세포 독성에 미치는 영향

서보영¹ · 정은실² · 김주영² · 박해룡² · 이승철² · 박은주^{1,*}

¹경남대학교 식품영양학과, ²경남대학교 식품생명학과

Effect of Aceton Extract from *Styela Clava* on Oxidative DNA Damage and Anticancer Activity

Bo-Young Seo¹, Eun-Sil Jung², Ju-Young Kim², Hae-Ryong Park², Seung-Cheol Lee² and Eunju Park^{1,*}

¹Department of Food and Nutrition,

²Department of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea

Received June 9, 2006; Accepted July 25, 2006

Styela clava (also called as rough sea squirt or leathery tunicate) is regarded as native to the north-west Pacific region including Korea and widely distributed in parts of northwestern Europe, North America and Australia. To evaluate *Styela clava* as a potential bioactive agent, the antioxidant activity of aceton extracts from *Styela clava* (whole, substance and tunic) was tested by measuring inhibitory effect of H₂O₂ induced DNA damage using comet assay. Also, anticancer activity on human colon cancer cell (HT-29) was investigated by MTT reduction assay. The 200 μM H₂O₂ induced DNA damage was inhibited with *Styela clava* aceton extract in dose dependent manner in human leukocytes. The maximum inhibition was by 62.8, 62.1 and 78.3% at the concentration of 50 μg/ml of whole, substance and tunic extracts, respectively. The aceton extracts from *S. clava* were also found to inhibit the growth of human colon cancer cell. The cell proliferation rates decreased to 26.9, 30.6 and 12.0% at the concentration of 500 μg/ml of whole, substance and tunic extracts, respectively. These results support that aceton extracts from *S. clava* may be a potential candidate as a possible antimutagenic and chemotherapeutic agent.

Key words: *Styela clava*, cytotoxic effect, MTT reduction assay, DNA damage, comet assay

서 론

암은 유전적인 요인과 환경적인 요인이 복합적으로 작용하여 진행되는 다단계 과정이다. 정상세포에서 암 조직으로 발달 되는 데는 크게 개시(initiation), 촉진(promotion), 진행(progression)의 세 단계를 거쳐 발생하는 것으로 알려져 있으며, 발암의 initiation은 전자 친화성 발암인자(initiator)가 생체 내에서 대사적으로 활성화되어 유전자의 핵산에 비가역적으로 결합함으로써 정상세포의 DNA를 손상시켜 신생물 전구세포(preneoplastic cell)를 형성하는 돌연변이 현상으로 설명된다. 촉진인자(promoter)는 발암인자와 독립적으로 세포막의 receptor를 매개로 유전정보의 발현 및 분화에 가역적으로 관여하는 신생물 세포(neoplastic cell)로 전환시키며 그 세포가 증식하는 과정에서 양성과 악성이 결정되고, 종양이 암으로 변화된다. 암의

initiation 단계에서 발생하는 DNA 손상은 암 발생과 83% 이상의 높은 상관성을 나타내므로 initiation 단계에서 손상된 DNA의 회복과정에 관여하는 물질의 발견은 항암 기작을 유추할 수 있는 근거가 된다고 볼 수 있을 것이다.^{1,2)}

최근 암은 대부분의 선진국에서 사망률 수위를 차지하고 있는 질환이며, 전 세계 인구의 다섯 명 중 한명은 암으로 사망하는 것으로 알려져 있다.³⁾ 암치료제를 개발하기 위해 전 세계적으로 다양한 연구가 시도되고 있는데 흥미로운 것은 현재까지 승인된 암치료제의 60% 정도는 식물유래 화합물(예, vincristine, taxanes 등) 또는 미생물(예, dactinomycin, anthracyclines 등) 등의 자연산물(natural products)을 이용해 개발되었다는 것이다.⁴⁾

해양 생태계는 지구상에 존재하는 생물계의 95%를 차지하고 있으며 육상생물에 없는 특유의 대사과정과 독특한 환경으로 인하여 다양한 신규 생리활성물질의 탐색 가능성을 가지고 있다.⁵⁾ 또한 육상 생물은 이미 많은 연구가 진행된 반면 해양생물은 고대로부터 내려오는 해양생물을 이용한 민간요법의 부재라든가 해양생물수집의 어려움 등의 이유로 이제까지 제한된 연구만이 이루어져 앞으로 해양생물을 이용한 미지의 천연 물

*Corresponding author

Phone: 82-55-249-2218; Fax: 82-55-244-6504

E-mail: pej@kyungnam.ac.kr

질의 개발에 대한 기대가 높게 평가되고 있다.^{6,7)} 이와 관련하여 최근 조류(algae), 해면(sponges), 피낭동물(tunicates) 등의 해양생물로부터 유효성분을 분리하여 항암활성을 확인한 연구가 진행된 바 있다.^{3,7,8)}

미더덕과(styelidae)는 척추동물문의 미색동물아문, 해초강, 측성해목초에 속하는 해양생물을 총칭한다. 가늘고 긴 몸이 자루가 있고 그 끝이 바위에 부착해 서식하며 전체 길이는 5~10 cm로서 황갈색을 띤다. 외피는 섬유질과 같은 물질로 되어있고 딱딱하다. 바닷물이 들어오고 나가는 구멍이 몸에 있어 영어로는 멧게(우렁쉥이)와 같이 sea squirt로 불리 운다.⁹⁾ Styelidae의 대표적인 생물로는 미더덕(*Styela clava*)이 잘 알려져 있으며, 단단한 외피를 제거하고 근막체를 생으로 먹거나 염지하여 즐겨 먹는 독특한 향과 맛으로 인해 식품에 널리 이용되고 있다.¹⁰⁾ 하지만 미더덕에 대한 연구는 스테롤 함량¹¹⁾, 유리아미노산 추출¹²⁾, 계절에 따른 영양성분의 조성의 변화¹³⁾ 등 주로 성분 관련 보고가 있으며, 기능성 성분으로 껍질로부터 glycosaminoglycan을 추출¹⁴⁾한 예가 있다. 하지만 대부분이 성분 추출에 대한 연구가 이행되어졌고, 항산화와 관련된 연구는 김 등에 의해 연구된 주름 미더덕(오만둥이) 추출물의 항산화력 및 항암 활성⁹⁾이 보고되었다.

본 연구에서는 예비실험을 통해 다른 분획에 비해 비교적 항산화 활성이 높게 나타난 미더덕 아세톤 추출물을 시료로 하여 DNA 손상억제 및 암세포 증식억제에 관한 효과를 검색함으로써 미더덕의 암 예방적 특성을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료. 본 실험에서 사용된 미더덕은 경상남도 마산신진동면 고현마을에서 2005년 4월에 구입하였다. 구입한 미더덕의 이물질을 제거하고 물로 깨끗이 여러 번 씻어 물기를 제거한 후, 분쇄기(Mixer MC 811C, (주)노비타, 한국)를 이용하여 분쇄하여 사용하였다. 암세포 성장억제 효과 실험에 사용된 시약 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide)과 comet assay에 사용된 hydrogen peroxide, Histopaque 1077, low melting point agaroses, normal melting point agaroses Triton X-100, disodium salt ethylenediamine-tetraacetic acid, Tris-buffer, sodium chloride, sodium hydroxide, ethidium bromide, potassium chloride, potassium phosphate, sodium hydrogen phosphate, sodium 등의 시약은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)제품을 구입하였고, 그 외 연구에 사용된 용매 및 시약은 모두 일급 이상의 등급을 사용하였다.

시료의 추출. 신선한 미더덕을 부위별(전체, 살, 껍질부분)로 믹서기(Mixer MC 811C, (주) 노비타, 한국)로 분쇄한 후, 심은동결기(Upright Deep freezer VX 530, 한국)로 -70°C에서 하룻밤 저장하고, 동결건조기(Freeze Dryer FD 5512, (주)일신랩, 한국)로 4일 동안 완전히 건조시켰다. 건조된 시료는 다시 분쇄기를 이용하여 분말로 만들어 27 mesh의 체로 걸러 분말의 크기를 일정하게 하였다. 시료 3.616 g을 100 ml의 acetone 용매를 가하여 진탕배양기(HB-201s, (주)한백, 한국)에서 25°C,

100 rpm의 조건으로 24시간 추출하였다. 각각의 추출물은 여과지(Whatman No. 1)로 여과한 후, 회전감압농축기(EYELA N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 37°C에서 농축하였다. 각 농축물은 유리병에 담아 질소치환 후 4°C에서 저장하였고, 최종농도 5, 10, 50, 100, 500 µg/ml로 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 실험에 사용하였다.

혈액 내 백혈구 세포 분리. 건강한 성인남성 2명으로부터 채혈한 신선한 전혈 5 ml을 Histopaque 1077를 이용해 백혈구만을 분리해 낸 후 본 실험에 사용하였다.

시료의 처리 및 산화적 스트레스 유발. 준비된 백혈구 세포에 각 시료(*Styela clava*-전체, 살, 껍질 부분)를 5, 10, 50 µg/ml의 농도로 처리하여 37°C에서 30분간 반응시켰다¹⁵⁾. 반응이 끝난 후 백혈구를 PBS로 세척한 후 인위적으로 산화적 스트레스를 유발하기 위하여 200 µM의 H₂O₂를 백혈구에 처리하여 4°C에 5분간 반응시킨 다음 다시 PBS로 세척하였다. Positive control을 위해 미더덕 시료 대신 용매인 DMSO를 처리한 후 200 µM H₂O₂를 처리하였고, negative control인 용매(DMSO) 처리 세포에는 H₂O₂를 처리하지 않았다.

DNA손상 측정(Comet assay). Comet assay¹⁶⁾를 위해 반응을 끝낸 백혈구를 75 µl의 0.7% low melting agarose gel(LMA)과 섞은 후, 1.0% normal melting agarose(NMA)가 precoating된 normal slide 위로 cell suspension과 LMA의 현탁액이 골고루 분산되게 한 후 cover glass로 덮어 4°C 냉장고에 보관하였다. Gel 이 굳으면 cover glass를 벗기고 그 위에 다시 0.7% LMA 용액 75 µl로 한겹 더 덮었다. 미리 준비해 둔 차가운 alkali lysis buffer(2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 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, slide를 electrophoresis tank에 배열하고 4°C의 차가운 전기영동 buffer(300 mM NaOH, 10 mM Na₂EDTA, pH > 13)를 채워 40분 동안 unwinding시켜 DNA의 alkali labile sites가 드러나게 한 후 25 V/300±3 mA의 전압을 걸어 20분간 전기영동을 실시하였다. 빛에 의해 DNA가 부가적으로 손상되는 것을 방지하기 위해 위의 과정은 전기영동 tank를 어두운 천으로 덮은 채 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 0.4 M Tris buffer(pH 7.4)에 10분씩 담가 세척하는 과정을 3회 반복하여 slide를 건조시켰다. 20 µl/ml 농도의 ethidium bromide로 핵을 염색하여 cover glass로 덮은 뒤 형광현미경(Leica, Germany) 상에서 관찰하였다. CCD camera(Nikon, Japan)를 통해 보내진 각각의 세포핵 image는 Komet 5.0 comet image analyzing system(Kinetic Imaging, UK)이 설치된 컴퓨터 상에서 분석하였다. 백혈구의 hydrogen peroxide에 의한 DNA 손상 및 미더덕 추출물에 의한 손상억제 정도는 핵으로부터 이동해서 꼬리 부분으로 떨어져 나간 꼬리 부분 내 DNA %함량(% Tail DNA)을 측정하여 나타내었다. 각각의 처리구에서 2개의 slide를 만들어 각각 100개 세포의 DNA 손상 정도를 측정하고 각 처리구는 최소 3회 반복 실험하였다.

암세포 배양. 본 실험에 사용한 암 세포주는 인간 유래의 대장암 세포주인 HT-29(human colon carcinoma)로 한국세포주은행(KCLB, Seoul)으로부터 분양 받아 실험에 사용하였다. 세포

배양을 위한 배지는 RPMI1640 medium을 사용하였으며 10% Fetal bovine serum(FBS)와 항생제는 100 unit/ml의 penicillin, 100 µg/ml의 streptomycin을 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator (MCO-18AIC, SANYO, Osaka, Japan)에서 배양하였다.

암세포 성장 억제효과 측정. 부위별 미더덕 추출물의 암세포 성장 억제효과는 MTT assay¹⁷⁾로 행하였다. 세포주를 1×10⁵ cells/ml의 농도로 맞추고 96 well plate에 각각 100 µl씩 첨가하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후, DMSO에 녹인 미더덕 용매별 추출 분획물 시료를 각각 10, 50, 100, 500 µg/ml의 농도로 처리하였다¹⁸⁾. 24시간 동안 배양한 후 각 well에 PSB 완충액에 녹인 MTT(5 µg/ml) 용액을 10 µl씩 첨가하여 1시간 동안 다시 배양시킨 후, well 바닥에 형성된 formazan이 흡수되지 않게 상등액을 제거하고 DMSO 100 µl 첨가하여 녹인 후 ELISA reader(Model 680, BioRad, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 대조구 세포수를 100%로 하였을 때 상대적 세포성장 억제율을 구하였다.

통계처리. 모든 자료의 처리는 SPSS-PC+ 통계 package를 사용하여 처리하였다. 각 항목에 따라 백분율과 평균±표준오차(SE)를 구하고 각 물질의 DNA 손상 억제 정도를 비교하기 위해 one-way 분산분석(ANOVA)을 시행하여 F 값을 구하고 Duncan's multiple range test를 이용하여 각 구간의 유의성 차이를 검증하였다. 통계적 유의성은 5% 수준에서 평가하였다.

결과 및 고찰

미더덕 부위별 추출물이 DNA 손상에 미치는 영향. DNA 손상을 측정하기 위해 많은 연구 방법들이 개발되어 왔는데 Comet assay(single cell gel electrophoresis)는 처음 Ostling and Johanson¹⁹⁾에 의해 각각의 세포 수준에서의 DNA의 외가닥 절단(single-strand breaks) 및 alkali에 민감한 AP site를 직접 확인하기 위하여 도입된 micro gel electrophoresis 방법으로 Singh 등¹⁶⁾에 의해 보다 민감하게 DNA 손상을 감지해 낼 수 있는 방법으로 발전되었다. 이 방법은 핵을 가진 어떤 조직에서도 DNA 손상정도를 측정할 수 있으며 분석시 소량의 시료만을 필요로 하고 실험과정의 간단하고 시료 채취 후 몇 시간 내에 결과를 얻을 수 있다는 등 많은 장점을 가지고 있다. Comet assay를 이용하여 여러 종류의 발암물질에 의한 DNA 손상과 항발암물질과의 관계 등이 쉽게 관찰될 수 있었으며 우리 주변에서 가장 흔하게 발암물질에 노출되어 있는 흡연자의 경우 비흡연자보다 DNA 손상 정도가 유의하게 증가되어 있음이 보고되었다.²⁰⁾ Rao 등²¹⁾은 구강암 환자의 oral squamous cell 에서 유의적으로 높은 DNA 손상을 보고하였으며 그 밖에 백혈병, 유방암 등 여러 종류의 암환자에서 comet assay를 이용해 건강한 대조군에 비해 DNA가 유의적으로 높게 손상되어 있음을 관찰하였다.²²⁻²⁴⁾ Comet assay를 이용한 미더덕 추출물의 H₂O₂로 유발된 DNA 손상 억제 효과 실험의 결과는 Fig. 1 (A-C)에 제시하였으며, 형광현미경으로 관찰한 comet image는 Fig. 2에서 보는 바와 같다. 미더덕 아세톤 추출물을 5, 10, 50 µg/ml의 농도로 백혈구에 처리한 후 H₂O₂ 200 µM의 농도로 DNA 손상을 유도한 결과 손상된 DNA tail 부분의 DNA 함량

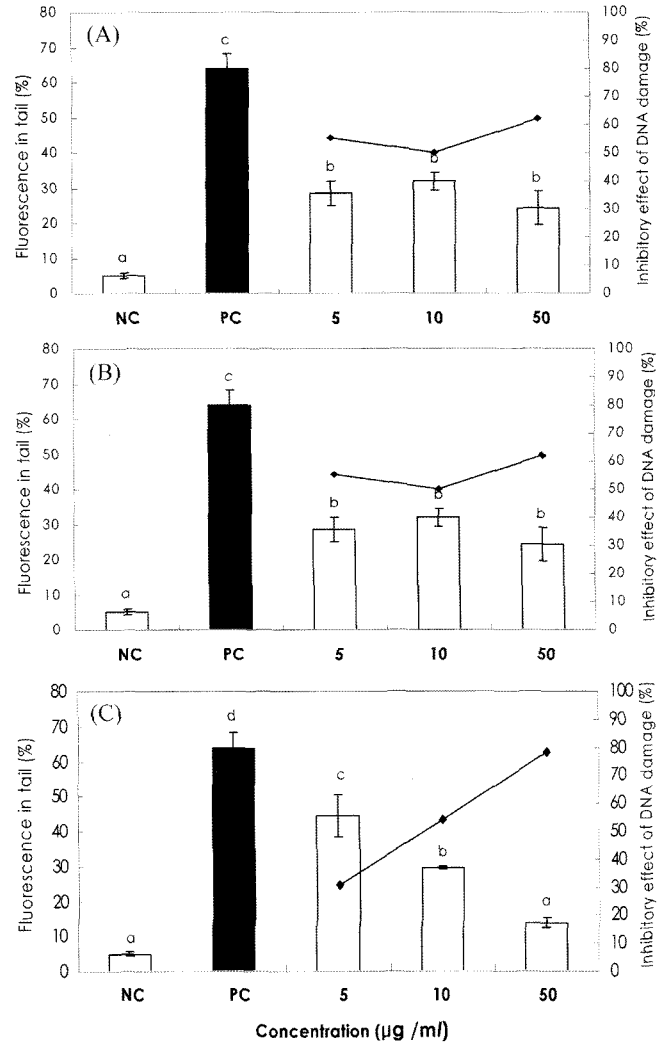


Fig. 1. Effect of supplementation *in vitro* with different concentration of *S. clava* acetone extract (A: whole, B: substrate, C: tunic) on H₂O₂-induced DNA damage in human leukocyte. Values are mean with standard error of duplicate experiments with lymphocytes from each of three different donors. NC, DMSO-treated normal control; PC, 200 µM H₂O₂-treated positive control. Values not sharing the same letter are significantly different from one another ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

을 측정할 때 % fluorescence in tail이 각각 26.9, 27.0, 23.8%로 63.9%인 H₂O₂ 처리 양성대조구에 비해 유의적으로 감소하였으며, 이를 DNA 손상 억제효과로 계산하여 살펴 본 결과 각각 57.8, 57.7, 62.8%로 나타났다(Fig. 1A). 미더덕 살 아세톤 추출물의 경우도 마찬가지로 각 농도처리구에서 50% 이상의 DNA 손상 억제효과를 보여주었다(Fig. 1B). 한편, 미더덕 껍질 아세톤 추출물의 경우, 같은 농도로 처리했을 때 DNA 손상 억제효과는 농도별로 각각 30.6, 54.0, 78.3%로 농도 의존적이며 유의적으로 증가하였다(Fig. 1C). 미더덕 아세톤 추출물의 DNA 손상억제 효과는 미더덕 껍질 분획 50 µg/ml 처리시에 가장 높은 것으로 나타났다. 이상의 결과에서 미더덕 각 부분의 아세톤 추출물은 산화적 스트레스 유발물질인 hydrogen peroxide에 의해 유도되는 DNA 손상을 효과적으로 억제시키고 있음을 알 수 있었다.

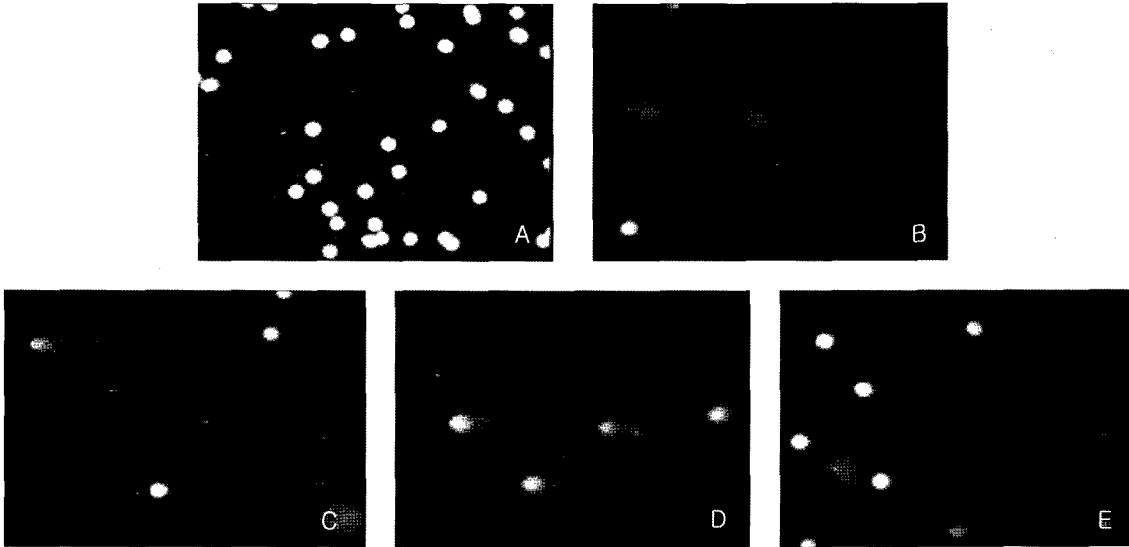


Fig. 2. Comet images of human leukocytes. A: DMSO-treated normal control, B: 200 μM H_2O_2 -treated positive control, C: lymphocytes treated with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of *S. clava* whole extract + 200 μM H_2O_2 , D: lymphocytes treated with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of *S. clava* substrate extract + 200 μM H_2O_2 , E: lymphocytes treated with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of *S. clava* tunic extract + 200 μM H_2O_2 .

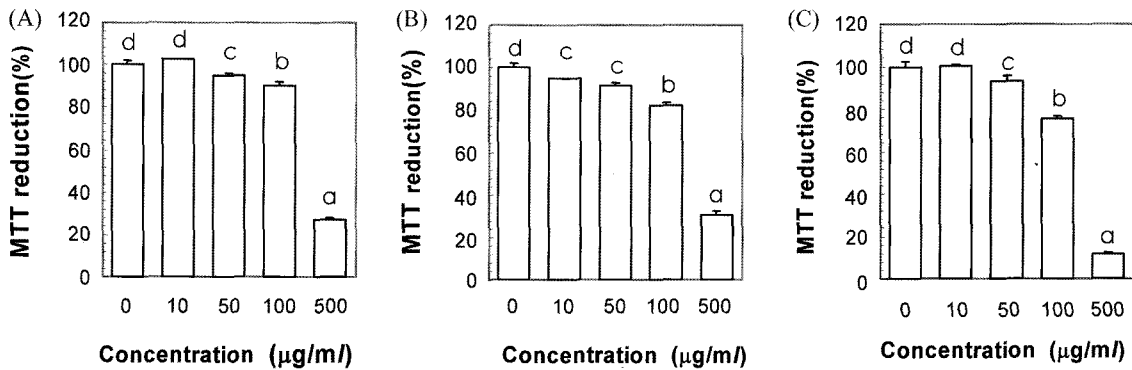


Fig. 3. Inhibitory effect on cell survival of acetone extracts from *S. clava* (A: whole, B: substrate, C: tunic) in HT-29 cells. After MTT assay, the survival factors (means SE of triplicate determination) were calculated by setting each of control survivals in the absence of *S. clava* extracts. Values not sharing the same letter are significantly different from one another ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

현재까지 미더덕에 대한 성분 분석 연구로는 스테롤, 유리아미노산, glycosaminoglycan¹¹⁻¹³⁾ 등이 보고되었으나 항산화 물질을 비롯해 DNA 손상억제 관련 가능성이 있는 성분에 대해서는 보고된 바 없어서 미더덕 아세트 추출물 내 어떤 성분이 DNA 손상 억제 활성에 기여하였는지는 현재로서는 알 수가 없다. 다만 미더덕과 같은 척추동물문의 미색동물아문에 속하면서 생물학적 활성이 비슷하다고 알려진 우렁쟁이(명게)류의 경우 carotenoids(astacene, cynthiaxanthin, astaxanthin, alloxanthin 등)를 함유하고 있으며 주로 껍질에 carotenoids의 농도가 높은 것으로 보고되었다.²⁵⁻²⁷⁾ 이 결과를 바탕으로 미더덕의 DNA 손상억제 효과는 미더덕 껍질에 함유되어 있을 것이라고 예상되며 또한 이미 많은 연구를 통해 DNA 손상을 효과적으로 억제한다고 알려진 carotenoid 류에 의한 것으로 사료된다. 이를 입증하기 위해 미더덕의 항산화 성분 분석에 관한 후속연구가 필요하다.

암세포 성장 억제에 미치는 미더덕 부위별 acetone 추출물의 영향. 인간 대장암 유래의 세포주 HT-29에 대한 미더덕 부

위별 acetone 추출물의 암세포 성장 억제 효과에 대한 결과는 Fig. 3과 같다. 부위별 추출물의 항암효과를 조사하기 위해 MTT reduction assay 방법을 이용하였으며, 추출물을 처리하지 않은 대조구와 비교하여 부위별 acetone 추출물의 암세포 성장 억제효과를 확인하였다. Fig. 3은 미더덕 부위별 acetone 추출물을 10, 50, 100, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 각각 처리하였을 때 암세포 성장 억제효과를 나타낸 결과이며, 각 추출물에 대해 전체적으로 농도에 의존하여 암세포 성장 억제효과가 증가되었다. 전체, 살, 껍질 부위별 추출물을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가하였을 때 각각 90.5%, 82.0%, 75.2%로 비교적 낮은 활성을 보였지만, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리했을 때 각각 26.9%, 30.6%, 12.0%로 급격히 활성이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 그리고 특히 껍질 부분의 acetone 추출물이 강한 암세포 성장 억제 효과를 보임을 알 수 있었다.

최근 들어 해양생물을 이용한 항암제 개발 연구가 활발히 진행되고 있으며, 미더덕이 속해있는 피낭동물(tunicates) 중 *Trididemnum solidum*, *Alpidium albicans*, *Ecteinascidia turbinata*

에서 각각 didemnin, aplidine, ET-743의 항종양물질을 분리하여, 인간유래 암세포를 이용한 *in vitro* 실험 및 동물 실험은 물론 초기 임상실험에서 그 효과를 입증한 연구 성과가 발표되었다.^{28,29)} 따라서 아직까지는 미더덕의 항암활성에 관한 연구는 거의 초기단계이지만 앞으로 더 많은 연구를 통해 미더덕에서도 항암활성 물질을 분리해 낼 수 있는 가능성은 매우 높은 것으로 사료된다.

이상의 결과로 미더덕 각 부분의 아세톤 추출물은 대장암세포 성장 억제 효과 및 산화적 스트레스 유발물질인 hydrogen peroxide에 의해 유도되는 백혈구의 DNA 손상 억제 효과가 있음을 확인하였으며, 그 효과는 특히 껍질부위에서 가장 높은 것으로 나타났다. 본 연구를 통해서 미더덕 아세톤 추출물의 영양적, 기능적 가치를 재고해 볼 수 있었으며, 향후 의학적 및 산업적으로 매우 중요한 자원으로 미더덕이 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

초 록

미더덕(*Styela clava*)은 척삭동물문 미색동물아문에 속하는 해양생물로서, 독특한 향과 맛으로 인해 식품에 널리 이용되고 있다. 본 연구에서는 미더덕의 생리활성물질로의 활용가능성을 탐색하고자 미더덕을 전체, 살 및 껍질 부분으로 나누어 아세톤으로 추출한 뒤 산화적 DNA 손상억제 및 항암 활성을 측정하였다. 미더덕 각 부위 추출물을 5, 10, 50 µg/ml의 농도로 백혈구에 처리한 후 200 µM의 H₂O₂로 산화적 스트레스를 유발하여 DNA 손상 억제 정도를 검증하기 위해 comet assay를 실시하였다. 미더덕 전체 추출물을 5, 10, 50 µg/ml의 농도로 백혈구에 처리했을 때 손상된 DNA tail 부분의 DNA 함량을 측정할 % fluorescence in tail이 26.9, 27.0, 23.8%로 63.9%인 H₂O₂ 처리 양성대조구에 비해 유의적으로 감소하였으며 미더덕 살 추출물의 경우, 5, 10, 50 µg/ml 처리시 농도에 의한 효과 차이는 볼 수 없었지만 양성대조구에 비해 유의적으로 DNA 손상정도가 감소하였다. 미더덕 껍질 추출물의 경우 같은 농도로 처리했을 때 각각 농도 의존적이며 유의적으로 DNA 손상정도가 감소하였다. 인간 대장암 유래의 세포주 HT-29의 성장 억제 효과에 조사하기 위해 미더덕 부위별 아세톤 추출물을 10, 50, 100, 500 µg/ml의 농도로 각각 처리한 뒤 MTT reduction assay 방법으로 측정된 결과, 각 추출물에 대해 전체적으로 농도 의존적으로 암세포 성장 억제효과가 증가되었다. 전체, 살, 껍질 부위별 추출물을 100 µg/ml의 농도로 첨가하였을 때 각각 90.5%, 82.0%, 75.2%로 비교적 낮은 활성을 보였지만, 500 µg/ml로 처리했을 때 각각 26.9%, 30.6%, 12.0%로 급격히 활성이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 특히 껍질 부분의 아세톤 추출물이 강한 DNA 손상억제 및 암세포 성장 억제 효과를 보임을 알 수 있었다.

Key words: *Styela clava*, cytotoxic effect, MTT reduction assay, DNA damage, comet assay

감사의 글

본 연구는 산업자원부 지방기술혁신사업(RTI04-03-07) 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Surh, Y. J. (1999) Molecular mechanical of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat. Res.* **428**, 305-327.
2. Johnson, I. T., Williamson, G. and Musk S. R. R. (1994) Anticarcinogenic factors in plant food: a new class of nutrients. *Nutr. Res. Rev.* **7**, 175-204.
3. Garcia-Fernandez, L. F., Fernando, R. and Sanchez-Puelles, J. M. (2002) The marine Pharmacy: New antitumoral compounds from the sea. *Pharmaceutical News* **9**, 495-501.
4. Grever, M. C. B. (2001) Cancer drug discovery and development. In *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, De Vita, V. H. S., and Rosenberg, S. A. (eds) pp. 328-339. Lippincott-Raven, Philadelphia.
5. Rosenthal J. (1996) Investing in biological diversity. Proceedings of The Cairns conference. Cairns. Australia: OECD.
6. Park, J. C. (1996) Screening of marine natural products on inhibitory effect of the formation of lipid peroxidation. *Korean J. pharmacogen.* **27**, 117-122.
7. Amador, M. L., Jimeno, J., Paz-Ares, L., Cortes-Funes, H. and Hidalgo, M. (2003) Progress in the development and acquisition of anticancer agents from marine sources. *Annals of Oncology* **14**, 1607-1615.
8. Mayer, A. M. S. and Gustafson, K. R. (2003) Marine pharmacology in 2000: antitumor and cytotoxic compounds. *Int. J. Cancer* **105**, 291-299.
9. Kim, J. J., Kim, S. J., Kim, S. H., Park, H. R. and Lee, S. C. (2005) Antioxidant and anticancer activities of extracts from *Styela plicata*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 937-941.
10. Lee, E. H. (1985) Lipid components of sea squirt, *Halcyntria roretzi*, and *Mideuduck, Styela clava*. *Korean. J. Food Sci. Tec.* **17**, 289-294.
11. Jo, Y. G. (1978) The sterol composition of *Styela clava*. *Kor. Fish. Soc.* **11**, 97-101.
12. Lee, E. H. (1975) Free amino acid content in the extract of *mideuduck, Styela clava*. *Bull. Korean Fish Soc.* **8**, 177-180
13. Lee, K. H.. (1995) Seasonal variations of nutrients in warty sea squirt (*Styela clava*). *Food Sci. Nutr.* **24**, 268-273.
14. Ahn, S. H. (2003) Extraction of glycosaminoglycans from *Styela clava* tunic. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* **18**, 180-185.
15. Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C. and Sasaki, Y. F. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* **35**, 206-221.
16. Singh, P. N. McCoy, M. T., Tice R. R. and Schneider, E. L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **175**, 184-191.

17. Fish, B. (1984) Clinical trials for the evaluation of cancer therapy. *Cancer Res.* **54**, 609-615.
18. Goodman, G. Y., Yen, Y. P., Cox, T.C. and Crowley, J. (1987) Effect of verapamil on *in vitro* cytotoxicity of adriamycin and vinblastine in human tumor cells. *Cancer Res.* **47**, 2295-2311.
19. Ostling, O. and Johanson, K. J. (1984) Microgel electrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**, 291-298.
20. Betti, C., Davini, T., Giannesi, L., Loprieno, N. and Barale, R. (1994) Microgel electrophoresis assay (comet assay) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat. Res.* **307**, 323-333.
21. Rao, G. V., Kumar, G. S. and Ahuja, Y. R. (1997) Single cell gel electrophoresis on peripheral blood leukocytes of patients with oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.* **26**, 377-380.
22. Alapetite, C., Thirion, P., de la Rochefordiere, A., Cosset, J. M. and Moustacchi E. (1999) Analysis by alkaline comet assay of cancer patients with severe reactions to radiotherapy: defective rejoining of radioinduced DNA strand breaks in lymphocytes of breast cancer patients. *Int. J. Cancer* **24**, 83-90.
23. Muller, M. R., Buschfort, C., Thomale, J., Lensing, C., Rajewsky, M. F. and Seeber S. (1997) DNA repair and cellular resistance to alkylating agents in chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Cancer Res.* **3**, 2055-2061.
24. Vaghef, H., Nygren, P., Edling, C., Bergh, J. and Hellman B. (1997) Alkaline single-cell gel electrophoresis and human biomonitoring for genotoxicity: a pilot study on breast cancer patients undergoing chemotherapy including cyclophosphamide. *Mutat. Res.* **395**, 127-138.
25. Matsuno, T., Ookubo, M. and Komori, T. (1985) Carotenoids of tunicates. III. The structural elucidation of two new marine carotenoids, amarouciaxanthin A and B. *J. Nat. Prod.* **48**, 606-613.
26. Cotelle, N., Moreau, S., Bernier, J. L., Catteau, J. P. and Henichart, J. P. (1991) Antioxidant properties of natural hydroquinones from the marine colonial tunicate *Aplidium californicum*. *Free Radic. Biol. Med.* **11**, 63-68.
27. Choi, B. D., Kang, S. J., Choi, Y. J., Youm, M. G. and Lee, K. H. (1994) Utilization of Ascidian (*Halocynthia roretzi*) Tunic. *Bull. Korean Fish Soc.* **27**, 344-350.
28. Rinehart, K. L. (2000) Antitumor compounds from tunicates. *Med. Res. Rev.* **20**, 1-27.
29. Schwartzmann, G., da Rocha, A. B., Berlinck, R. G. S. and Jimeno, J. (2001) Marine organisms as a source of new anticancer agents. *Lancet oncol.* **2**, 221-225.