

매생이 추출분획의 암 예방 및 면역증진 효과

김남영 · 장민경 · 이동근 · 이재화 · 하종명 · 하배진 · 장정수¹ · 이상현*

신라대학교 의생명과학대학 제약공학과, 1: (주)바이넥스 기업부설연구소

Effects of Cancer Prevention and Immune Stimulation of Fractions from *Capsosiphon fulvescens*

Nam Young Kim, Min Kyung Jang, Dong Geun Lee, Jae Hwa Lee, Jong Myung Ha, Bea Jin Ha, Jeong Su Jang¹, Sang Hyeon Lee*

Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical Life Science, Silla University, 1: Central Research Institute, Binex Co., Ltd.

The fractions of *Capsosiphon fulvescens* were studied to verify the anticancer and immunostimulating activity. The fractions from the ethanol extract of *C. fulvescens* were prepared by the systematic extraction procedure with the solvents such as hexane, ethyl ether, methanol, butanol and H₂O. The cytotoxic effects of *C. fulvescens* fractions against human leukemia cell line U937, mouse neuroblastoma cell line (NB41A3), human hepatoma cell line (HepG2) and rat glioma cell line (C6) were investigated. Ethyl ether fraction of *C. fulvescens* showed the highest cytotoxicity against all four cell lines tested. In addition, H₂O fraction also showed relatively high cytotoxicity. Dose dependent patterns were observed on all four cell lines. The immuno-stimulating effects of *C. fulvescens* fractions on rat macrophage cell line (RAW 264.7) were also investigated. All five fractions of *C. fulvescens* extract stimulated NO production with concentration dependant manner. These results suggest that *C. fulvescens* may be a useful candidate for a natural antitumor and immuno-stimulating agent.

Key words : *Capsosiphon fulvescens*, fractions, MTT assay, NO assay

서 론

국민의 전반적인 삶의 질이 향상되고, 식생활이 서구화되면서 질병의 양상도 크게 바뀌어 영양부족으로 인한 질환은 감소한 반면, 비만, 관상동맥질환, 암과 같은 만성퇴행성질환은 크게 증가하고 있다. 특히 이들 만성퇴행성질환 중에서도 암은 서구 선진국은 물론 국내에서도 꾸준히 증가하고 있지만 발암 기전은 아직 명확히 밝혀지지 않고 있으며, 각종 암은 조기에 발견되어 치료하지 않으면 완치율이 매우 낮은 질병으로 아직 현대 의학은 이에 대한 확실한 치료방법을 제시하지 못하고 있다^{1,2)}. 암의 원인을 규명하고 치료방법을 찾고자 하는 노력이 계속되고 있으며, 특히 천연과 전통 식품 및 한약재를 대상으로 새로운 항암 성분을 찾으려는 노력이 계속되고 있다^{3,7)}.

세포독성을 나타내는 항암 화학요법제는 일반적으로 극심한

부작용을 나타내어 환자의 림프 혹은 골수세포가 파괴됨으로써 암과 감염에 대한 저항력의 저하를 보여주게 된다. 결과적으로 많은 암 환자들이 암 그 자체보다는 2차질환인 폐렴, 패혈증, 요독증 등의 질환으로 사망한다. 대부분의 항암 화학요법제는 암 환자의 생명연장에 크게 기여하지 못하고 많은 부작용들을 유발시키고 있다. 따라서 비 독성의 새로운 항암제의 발전이 필요하다. 현재 이러한 부작용을 줄일 수 있는 항암제를 개발하기 위해 천연물에 포함되어 있는 항암성분에 대한 연구가 활발히 진행 중에 있다. 그 결과, 최근에는 해양생물에 포함된 성분이 탁월한 생리활성을 나타낸다는 연구결과에 대한 보고가 증가하고 있다. 특히 전통식품 중 하나인 해조류의 경우는 다양한 질병을 치료할 수 있을 뿐만 아니라 건강 유지에 도움이 되며, 최근에는 면역조절 및 항암활성을 나타내는 성분이 포함되어 있다는 보고가 계속되고 있다.

매생이(*Capsosiphon fulvescens*)는 녹조식물문(Chlorophyta) 갈파래과(Ulvaceae)에 속하고 전 세계에 분포하며 한국에서는 남해안 청정해역의 조간대 상부 바위에서 서식한다. 크기는 15cm,

* 교신저자 : 이상현, 부산시 사상구 괴법동 산1-1 신라대학교 제약공학과

· E-mail : slee@silla.ac.kr, · Tel : 052-999-5624

· 접수 : 2006/07/26 · 수정 : 2006/08/29 · 채택 : 2006/09/30

굵기는 2~5 mm로 묽은 녹색을 띠고 관상이다. 생활사는 11월 중순에 어린개체가 나타나고 2월에 가장 번식하여 암석표면에 밀생하다가 4~5월에 소실된다⁸⁾. 매년 12~2월까지만 생산되는 식품으로서 특유한 향기와 맛을 지니고 있어 오래전부터 식용으로 애용되어 왔다. 또한 무기질과 비타민이 풍부하고 어린이의 성장발육에 좋을 뿐만 아니라 콜레스테롤을 저하시키고 고혈압도 효과적으로 예방하는 해조류로 알려져 있어 그 수요량이 늘고 있다⁹⁾. 그러나 환경오염에 예민하여 육지로부터 오염물질이 유입되면 생육이 저해되며, 특히 유기산 함량이 조금만 있어도 녹아버려 생산량이 저하되고 보관 및 운반과정도 쉽지 않아 그 지역에서 대부분 생산되어 소비되어지는 해조류이다. 매생이에 대한 연구로는 Park 등¹⁰⁾이 간 독성을 유발하는 흰쥐의 *in vitro* 및 *in vivo* 연구에서 매생이 추출물이 지질과산화의 생성을 감소시키는 것을 확인하였으며 Yu⁹⁾는 매생이 에탄올 추출물의 멜라닌 생성억제효과에 관한 연구를 수행하였다. 또한, Han¹¹⁾은 매생이의 향기성분을 보고하였다. 이외에는 매생이 종의 분류학적 기재 및 번식, 생태 및 생활사 등에 관한 기초적인 연구가 있을 뿐 *in vitro* 및 *in vivo*에서의 생리활성 효능에 관한 연구는 미진한 편이다. 본 연구는 매생이의 에탄올 추출물에 대한 용매별 분획을 행하여 얻은 각각의 분획물들의 생리활성을 연구하기위해 몇몇 암세포들에 대한 세포독성 및 면역활성을 검증하였다.

재료 및 방법

1. 세포주, 배지 및 배양

인체 혈구암세포주 U937과 생쥐 대식세포주 RAW 264.7은 10% fetal bovine serum (Bio Whittaker, Walkersville, MD, USA) 과 penicillin-streptomycin (100 units/ml, Bio Whittaker)을 포함하는 RPMI 1640 (Bio Whittaker)배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 생쥐 신경아종세포주 NB41A3, 인체 간암세포주 HepG2, 큰쥐 신경교세포주 C6는 10% fetal bovine serum (Bio Whittaker)과 penicillin-streptomycin (100 units/ml, Bio Whittaker)을 포함하는 Delbecco's modified eagle medium (DMEM)배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다.

2. 분획물의 제조

매생이(*Capsosiphon fulvescens*)는 전라남도 장흥에서 채취한 것을 구입하여 종류수로 수세, 정선 및 탈수과정을 거쳐서 건조시킨 후 분쇄한 시료 무게의 10배량 (w/v)의 80% ethanol로 약 60°C에서 8시간 동안 추출을 행하였으며, 추출액은 Whatman NO.3 여과지(Whatman International Ltd., Maidstone, England)로 2회 여과하였다. 이를 butanol, ethyl ether, hexane, methanol, H₂O 등을 이용하여 Fig. 1에 나타난 방법으로 분획을 행한 후, 농축하여 분획물을 제조하였다.

3. MTT 분석법을 통한 암세포에 대한 세포독성 측정

MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MI, USA) 제품을 이

용하였다. 인체 혈구암세포주 U937, 생쥐 신경아종세포주 NB41A3, 인체 간암세포주 HepG2, 큰쥐 신경교세포주 C6를 24시간 배양한 후 96-well plate (Roche Inc., Indianapolis, IN, USA)에 세포현탁액 180 μ l씩 분주하고, 매생이 분획물들을 phosphate-buffered saline (PBS, Bio Whittaker)에 희석하여 20 μ l씩 첨가하였다 (최종농도: 0.5, 0.1, 0.01 mg/ml). 대조군은 매생이 분획물 대신 동량의 PBS (Bio Whittaker)를 가하였다. 37°C, 5% CO₂에서 48시간 추가 배양한 후 배양액을 제거하고 MTT (5 mg/mL in PBS)용액을 100 μ l씩 가하고 37°C, 5% CO₂에서 4시간 동안 배양하였다. 이후 DMSO 100 μ l를 넣고 37°C, 5% CO₂에서 10~15분 동안 반응시킨 후 발색정도를 Synergy HT Multi-detection microplate reader (Biotek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 540 nm의 파장에서 측정하였다.

4. Nitric Oxide(NO) 분석법을 통한 면역활성 측정

하루 동안 배양한 생쥐 대식세포 RAW 264.7을 96-well plate (Roche)에 분주하고 24시간 배양하였다. 배지를 제거한 후 배양세포를 PBS로 세정한 후 매생이 분획물들을 PBS (Bio Whittaker)에 희석하여 20 μ l씩 첨가하였다 (최종농도: 0.5, 0.1, 0.01 mg/ml). 대조군은 매생이 분획물 대신 동량의 PBS를 가하였다. 37°C, 5% CO₂에서 24시간 추가 배양한 후 배양액 100 μ l에 reaction diluent 400 μ l를 첨가하여 희석을 행하였다. Total NO assay는 Total NO/Nitrite/Nitrate Assay kit (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) 제조사의 manual을 토대로 행하였으며, Synergy HT Multi-detection microplate reader (Biotek Instruments, Inc.)를 이용하여 540 nm의 파장에서 OD값을 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 매생이의 에탄올 추출 및 각 용매별 분획의 제조

매생이 시료 800 g에 대한 에탄올 추출을 행하고 이를 Rotary evaporator (Eylar Inc., Tokyo, Japan)로 농축을 행하여 최종적으로 3 L의 에탄올 추출시료를 얻었다. 이를 butanol, ethyl ether, hexane, methanol, H₂O 등을 이용하여 분획을 행하고 (Fig. 1), 얻어진 분획물을 Centrifugal evaporator (Sovall RC 5C+, Asheville, NC, USA)를 이용하여 용매 제거 및 농축을 행한 결과 각각의 매생이 분획물 시료들을 약 10 mg씩 얻었다.

2. 매생이 분획물의 암세포에 대한 세포독성

MTT^{12,13)}분석법은 살아있는 세포내 미토콘드리아의 dehydrogenase에 의해서 MTT가 formazan으로 변화하는 것을 이용하며 생성된 formazan을 spectrophotometer로 측정함으로써 cell viability를 추정하며 측정세포에 대한 독성을 조사하는 방법으로서, 각종 항암제에 대한 *in vivo* 세포독성에 관한 연구에 사용되어 온 dye exclusion test나 [³H]-thymidine uptake assay 보다 실험 조작이 매우 간편하고 재현성이 우수하여 세포독성 여부 대량검색이나 초기 검색단계에 적당한 방법으로 많이 이용되

고 있다¹⁴⁾. 이 방법은 방사선 동위원소를 사용하지 않고 세포의 증식 및 생존율을 정확히 측정할 수 있는 방법으로서, 육안으로도 발색정도를 관찰 할 수 있다.

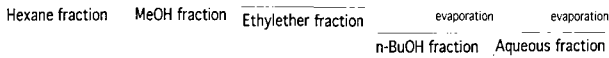


Fig. 1. Schematic diagram of sample extraction and fractionation of *Capsosiphon fulvescens*.

인체 혈구암세포주(U937)에 대한 매생이의 각 용매 분획물의 생육저해 활성을 측정한 결과를 Fig. 2에 나타냈다. Ethyl ether층 분획물의 경우 0.5 mg/ml의 농도에서 미처리 대조군에 비해 92%의 탁월한 생육저해 활성을 보였고 수층 분획물의 경우 0.5 mg/ml의 농도에서 72%의 생육저해 활성을 나타냈다(Fig. 2). 이는 다른 분획물 Hexane층, BuOH층, MeOH층에 비해 높은 활성을 나타내는 것이었다. 가장 높은 생육저해 활성을 보이는 Ethyl ether층 분획물을 0.1 mg/ml의 농도로 처리한 경우 미처리 대조군에 비해 75%의 생육저해 활성을 보였고 수층 분획물의 경우 0.1 mg/ml의 농도에서 63%의 생육저해 활성을 나타냈다. Ethyl ether층 분획물을 0.01 mg/ml의 농도로 처리한 경우 미처리 대조군에 비해 48%의 생육저해 활성을 보였고 수층 분획물의 경우 0.01 mg/ml의 농도에서 45%의 생육저해 활성을 나타냈다. 즉, 매생이 추출물은 농도의존적으로 혈구암 세포에 대한 생육저해 효과를 보이는 것으로 나타났다(Fig. 2).

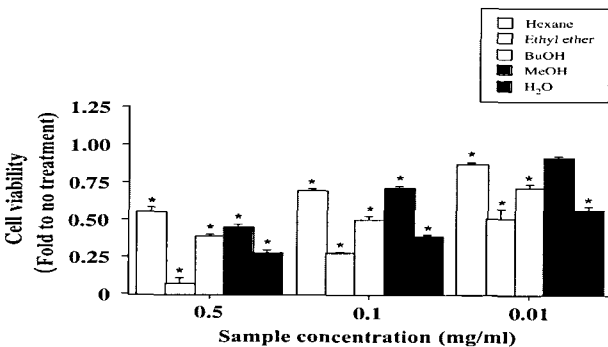


Fig. 2. Cell viability of human leukemia cell line U937 to the fractions of *Capsosiphon fulvescens* extract. Means \pm SEM for three wells are shown as fold compared with no treatment. *ANOVA $p < 0.0001$ compared with no treatment. This experiment was repeated at least twice yielding reproducible results.

생쥐 신경아중세포주(NB41A3)에 대한 매생이의 각 용매 분획물의 생육저해 활성을 측정한 결과를 Fig. 3에 나타냈다. Ethyl

ether층 분획물의 경우 0.5 mg/ml의 농도에서 미처리 대조군에 비해 82%의 탁월한 생육저해 활성을 보였고 수층 분획물의 경우 0.5 mg/ml의 농도에서 75%의 생육저해 활성을 나타냈다(Fig. 3). 이는 다른 분획물 Hexane층, BuOH층, MeOH층에 비해 높은 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 가장 높은 생육저해 활성을 보이는 Ethyl ether층 분획물을 0.1 mg/ml의 농도로 처리한 경우 미처리 대조군에 비해 73%의 생육저해 활성을 보였고 수층 분획물의 경우 0.1 mg/ml의 농도에서 70%의 생육저해 활성을 나타냈다. Ethyl ether층 분획물을 0.01 mg/ml의 농도로 처리한 경우 미처리 대조군에 비해 73%의 생육저해 활성을 보였고 수층 분획물의 경우 0.01 mg/ml의 농도에서 23%의 생육저해 활성을 나타냈다. 즉, 매생이 추출물은 농도의존적으로 혈구암 세포에 대한 생육저해 효과를 보이는 것으로 나타났다(Fig. 3). 매생이 분획물은 혈구암 세포의 경우와 비슷하게 신경아중 세포에서도 전반적으로 생육저해 효과를 보였고 그 중에서도 Ethyl ether층과 수층에서 높은 활성을 나타냈다. 또한 신경아중 세포의 생육을 농도 의존적으로 억제하였다.

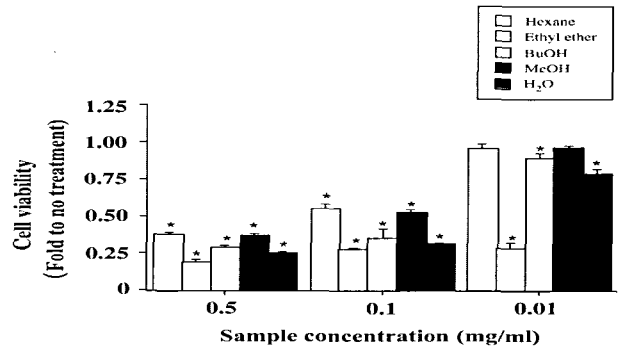


Fig. 3. Cell viability of mouse neuroblastoma cell line NB41A3 to the fractions of *Capsosiphon fulvescens* extract. Means \pm SEM for three wells are shown as fold compared with no treatment. *ANOVA $p < 0.0001$ compared with no treatment. This experiment was repeated at least twice yielding reproducible results.

인체 간암세포주(HepG2)에 대한 매생이의 각 용매 분획물의 생육저해 활성을 측정한 결과를 Fig. 4에 나타냈다. 전반적으로 높은 생육저해 활성을 나타내었고 특히 Ethyl ether층 분획물의 경우 0.5 mg/ml의 농도에서 미처리 대조군에 비해 75%의 생육저해 활성으로 다른 분획물에 비해 월등히 높은 활성을 나타냈다(Fig. 4). 각 시료의 농도를 0.1, 0.01 mg/ml로 달리하여 각각의 세포에 처리하였을 때 0.1 mg/ml의 농도의 경우는 Ethyl ether층과 수층 분획물이 다른 분획물에 비해 높은 활성을 보였다(Fig. 4). 분획물 0.01 mg/ml의 농도의 경우는 전반적으로 0.5, 0.1 mg/ml의 농도의 경우 보다 약간 낮은 정도의 활성을 보여 매생이 추출물의 농도가 증가함에 따라 간암세포 생육저해 효과도 증가한 것으로 나타났다(Fig. 4).

큰쥐 신경교세포주(C6)에 대한 매생이의 각 용매 분획물의 생육저해 활성을 측정한 결과를 Fig. 5에 나타냈다. 전반적으로 높은 생육저해 활성을 나타내었고 특히 Ethyl ether층 분획물의 경우 0.5 mg/ml의 농도에서 미처리 대조군에 비해 97%의 생육저해 활성을 나타냈다(Fig. 5). 매생이 분획물의 0.5 mg/ml의 농

도에서는 Ethyl ether층의 분획물의 암세포에 대한 생육저해 활성이 월등히 뛰어났고 다음으로 수층의 생육저해 활성이 높은 것으로 나타났다. 매생이의 Ethyl ether층 및 수층의 분획물들은 신경교세포의 증식을 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 5).

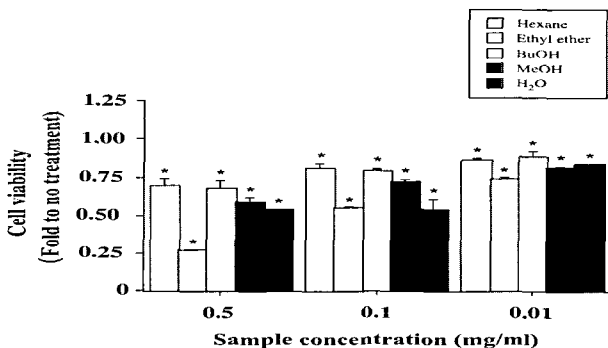


Fig. 4. Cell viability of human hepatoma cell line HepG2 to the fractions of *Capsosiphon fulvescens* extract. Means \pm SEM for three wells are shown as fold compared with no treatment. *ANOVA $p < 0.0001$ compared with no treatment. This experiment was repeated at least twice yielding reproducible results.

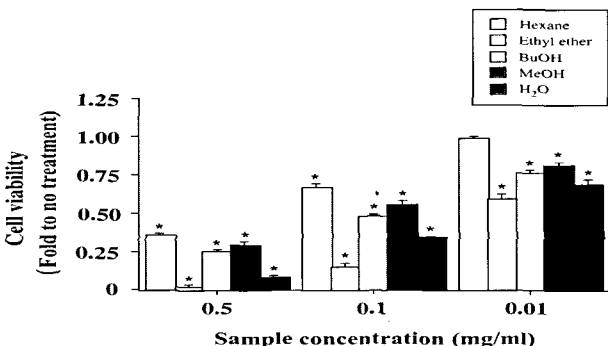


Fig. 5. Cell viability of rat glioma cell line C6 to the fractions of *Capsosiphon fulvescens* extract. Means \pm SEM for three wells are shown as fold compared with no treatment. *ANOVA $p < 0.0001$ compared with no treatment. This experiment was repeated at least twice yielding reproducible results.

우리나라의 암에 의한 사망자수 1위가 간암이며 평균발병연령은 약 55세이다. 대부분 40-60세 사이에 이 질환에 걸리게 되는데 가장 활발히 일하는 한 가정의 대들보를 업수하는 질환으로서 사회적, 가정적으로도 절실한 문제가 되고 있다. 또한 신경교종은 뇌종양의 50%를 차지하는 가장 흔한 종양이다. 일반적으로 이 종양은 주변의 뇌로 퍼져나가기 때문에 정상적인 뇌와의 경계가 명확하지 않아 수술로 전부 적출하는 것은 어렵기 때문에 약물치료제의 연구가 시급한 실정이다. 본 연구 결과로 매생이로부터 추출한 생리활성 물질을 이용하여 간암 뿐 만 아니라 뇌종양, 골수성 백혈병 및 다발성 골수종 등과 같은 혈액암에 효과를 나타내는 신약 소재의 개발이 가능할 것으로 사료된다.

3. 매생이 분획물의 면역활성

생쥐 대식세포주(RAW 264.7)에 대한 매생이의 각 용매 분획물의 면역활성 측정결과를 Fig. 6에 나타냈다. 매생이의 Ethyl ether층 추출분획의 0.5 mg/ml의 농도의 시료에서 가장 높은 활성이 나타났지만 암세포의 생육저해 활성과는 달리 분획 전반에 걸쳐 대체로 유사한 활성을 보였다(Fig. 6). 분획물 0.1 mg/ml의

농도의 시료의 경우는 분획 전반에 걸쳐 같은 정도의 활성을 보였으나 Ethyl ether층에서 약간 낮은 활성을 보였으며 0.5 mg/ml의 농도의 시료보다 약간 낮은 정도의 활성을 보였다. 분획물 0.01 mg/ml의 농도의 시료의 경우도 0.1 mg/ml의 농도의 시료와 비교하였을 때 그다지 큰 활성차이를 보이지 않았고 역시 분획 전반에 걸쳐 유사한 정도의 활성을 보이는 것을 알 수 있었다(Fig. 6). 하지만 미처리 대조군에 비하여 시료 전반에 걸쳐 탁월한 면역활성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

본 연구의 결과로 현재 청정식품으로 제품화되어 있는 해조류인 매생이를 이용하여 암 예방 및 면역활성 강화를 위한 기능성 소재의 개발이 가능할 것으로 사료된다.

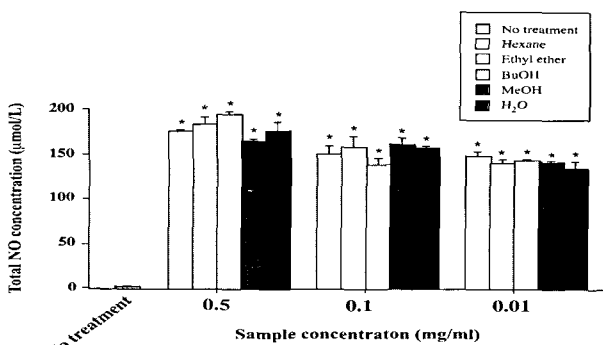


Fig. 6. NO concentration of rat macrophage cell line RAW 264.7 to the fractions of *Capsosiphon fulvescens* extract. Means \pm SEM for three wells are shown as fold compared with no treatment. *ANOVA $p < 0.0001$ compared with no treatment. This experiment was repeated at least twice yielding reproducible results.

결론

이 연구의 목표는 매생이(*Capsosiphon fulvescens*) 추출분획의 암세포주에 대한 세포독성 및 면역활성 효과를 조사하여 항암 및 면역활성을 나타내는 천연 소재의 개발에 있다. 인간 백혈암 세포주(U937), 생쥐 신경아종세포주(NB41A3), 인체 간암세포주(HepG2), 큰쥐 신경교세포주(C6) 등에 대한 매생이 분획물의 세포독성을 측정 한 결과, 매생이의 Ethyl ether 층의 경우 사용된 4 종류의 암세포주 모두에서 가장 높은 세포독성을 나타냈다. 또한 수층 역시 비교적 높은 세포독성을 나타냈으며, 4종류의 세포 모두에서 농도의존적 경향을 나타냈다. 매생이 분획물의 대식세포주(RAW 264.7)에 대한 면역활성 효과를 조사한 결과, 매생이 추출물의 5가지 분획물 모두가 미처리구에 비해 100배 이상의 높은 활성을 보였으며 농도의존적으로 NO 생산을 활성화 시켰다. 이러한 결과들로 매생이가 항암 및 면역활성을 나타내는 천연 소재개발에 있어 유용한 후보가 될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Shin, H.K. The development of functional food and research trend. Food Sci. and Industry, 30:2-13, 1997.
2. Choe, M. Dietary fats and cancer. J. Korean Soc. Food Nutr., 20:513-518, 1991.

3. Murakami, A., Ohigashi, H. and Koshimizu, K. Anti-tumor promotion with food phytochemicals: a strategy for cancer chemoprevention. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60:1-81, 1996.
4. Steinmetz, K.A. and Potter, J.D. Vegetabl, fruit and cancer II mechanism. *Cancer Causes Aontril.*, 2:427-442, 1991.
5. Newmark, H.L. Plant phenolics as potential cancer prevention agents. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 401:25-34, 1996.
6. Drageted, L.O., Strube, M. and Larsen, J.C. Cancer-protective factor in fruit and vegetable: biochemical and biological background. *Pharmacol. Toxicol.*, 72:116-135, 1993.
7. Azuine, M.A., Goswami, U.C. and Katal, J.J. Antimutagenic and anticarcinogenic effects of carotenoids and dietary palm oil. *Nutr. Cancer*, 17:287-295, 1992.
8. Yu, H.J. Inhibitory effect on the melanogenesis of ethanol extract of *Capsosiphon fulvescens*. PhD Dissertation, Wonkwang University, 2004.
9. Kang, Y.S. A comprehensive bibliography on the fishery special commodity in Korea. Suhyepmunhwasa, Seoul, p 418-421, 2000.
10. Park, J.C., Choi, J.S., Song, S.H., Choi, M.R. and Choi, J.W. Hepatoprotective effect of extracts and phenolic compound from marine algae in bromobenzene-treated rats. *Korean J. Pharmacogn.*, 28:239-246, 1997.
11. Han, H.A. A study of flavor on *Capsosiphon fulvescens*. Yosu University, 2002.
12. Michael, C.A., Dominic, A.S. and Anue, M. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.*, 48:589-595, 1988.
13. Carmichael, J., De, W., Graff, G., Gazder, A.F., Minna, J.D. and Mitchell, J.B. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay : assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.*, 47:936-942, 1987.
14. Kim, J.H., Kim, B.S., Choi, J.J., Kim, K.M., Yoo, N.C., Choi, J.H., Lim, H.Y., Roh, J.K., Lee, K.S. and Kim, B.S. Effects of verapamil, tamoxifen and cyclosporin A for the modulation of multidrug resistance in human lung cancer cell lines. *J. Kor. Cancer Assoc.*, 25:225-230, 1993.