

김치 분획물의 *In vitro* 항돌연변이 및 항암효과

부산대학교 식품영양학과 및 김치연구소

조은주·이숙희·이선미·박건영

In vitro Antimutagenic and Anticancer Effects of Kimchi Fractions

Eun-Ju Cho, Sook-Hee Rhee, Seon-Mi Lee and Kun-Young Park

Department of Food Science and Nutrition, and Kimchi Research Institute,
Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Antimutagenic and anticancer effects of kimchi fractions were studied by using *Salmonella typhimurium* TA100 and HL-60 human leukemia cells, respectively. The chinese cabbage kimchi(4 day fermented at 15°C) was fractionated into 7 groups, methanol extract, hexane fraction(fr.), methanol soluble fr., dichloromethane fr., ethylacetate fr., butanol fr. and aqueous fr. The dichloromethane fr. and hexane fr. of the kimchi exhibited strong antimutagenic activities compared to other fractionated samples, especially dichloromethane fr. inhibited the mutagenicity of aflatoxin B₁(AFB₁) by more than 90% in the Ames test. The kimchi fractions inhibited the survival or growth of HL-60 human leukemia cells in the sulforhodamine B(SRB) assay, 3-(4,5-dimethylthiazol)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay and growth inhibition test. All the kimchi fractions inhibited survival of HL-60 leukemia cells more than 50% in the addition concentration of 0.2 mg/assay, in particular dichloromethane fr. showed the strongest inhibitory effect (more than 90%) among them. Moreover dichloromethane fr. of the kimchi induced apoptosis in HL-60 human leukemia cells by the DNA fragmentation assay. These results suggested that the kimchi fractions, especially dichloromethane fr. exerted the survival or growth inhibitory effect on HL-60 human leukemia cells as well as antimutagenic activity, and the dichloromethane fr. also induced apoptosis in the leukemia cells.

Key Words: Kimchi, Antimutagenicity, SRB, MTT, Apoptosis, HL-60 cells

대한암예방학회지 : 제 2 권 제 2 호 1997

조은주 외 3인

대한암예방학회지 : 제 2 권 제 2 호 1997

조은주 외 3인

대한암예방학회지 : 제 2 권 제 2 호 1997

조은주 외 3인

대한암예방학회지 : 제 2 권 제 2 호 1997

조은주 외 3인

대한암예방학회지 : 제 2 권 제 2 호 1997

조은주 외 3인

-김치 분획물의 *In vitro* 항돌연변이 및 항암효과-

-김치 분획물의 *In vitro* 항돌연변이 및 항암효과-

-김치 분획물의 *In vitro* 항돌연변이 및 항암효과-

-김치 분획물의 *In vitro* 항돌연변이 및 항암효과-

-김치 분획물의 *In vitro* 항돌연변이 및 항암효과-

서 론

김치는 한국인의 전통발효식품의 하나로 비타민과 무기질의 중요한 공급원으로써 신선한 재료를 얻을 수 없는 겨울철을 대비하여 소금에 절이고 마늘, 생강, 고추, 파, 젓갈 등의 양념을 하여 발효시킨 식품이다. 이 때 발효과정 중 생성되는 젖산균과 유기산, 식이섬유에 의한 정장작용 및 대장암 예방효과 뿐만 아니라 고혈압, 동맥경화, 당뇨에도 효과적인 것으로 알려져 있다.¹⁻³⁾ 또한 김치는 주재료가 야채이므로 비타민과 무기질 그리고 β -카로틴, 후라보이드류, 클로로필 등의 생체 조절 영양소들에 의한 항산화, 면역증강, 항암효과가 보고되고 있어 한국인의 영양공급 및 건강유지를 위해 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.⁴⁻⁶⁾ 박⁷⁾의 연구에 의하면 김치의 주재료인 배추를 비롯하여 부재료인 마늘, 고추가루, 생강 및 파와 그 외 주재료 채소류들에 의한 암 예방효과 및 항암효과가 있다고 보고한 바 있다. 특히 발효과정중에서 생성되는 젖산균에 의해서도 종양세포의 증식이 억제되며, 면역계를 활성화시킴으로써 항암효과를 가지는 것으로도 보고되고 있다.^{8,9)} 그러나 김치의 저장성과 유산균 발효를 위한 소금의 첨가와 이의 과잉섭취는 고혈압 및 위암 발생과 관련해 여러가지 의심이 가는 면도 있었으나 다량의 소금을 첨가한 고염 김치를 섭취하지 않는 한 김치의 주재료가 거의 녹색 채소라는 점과 발효과정 중 생성되는 젖산균 및 여러 기능성 물질로 인해 오히려 암을 예방하는 효과와 항암효과를 가질 것으로 여겨진다.

인체 암의 발생원인은 90%가 환경요인에 의한 것으로 이중 식이와 담배가 가장 중요한 인자로 작용하는 것으로 알려져 있다.^{10,11)} 따라서 한국인의 식생활에서 빼놓을 수 없는 부식인 김치는 한국인의 건강과 밀접한 관계가 있다. 이에 본 연구에서는 김치 추출물 및 분획물의 Ames 실험계를 이용한 항돌연변이 효과와 HL-60 인체 혈액암 세포를 이용하여 *in vitro* 항암효과를 검토하였다.

재료 및 방법

1) 김치시료의 추출 및 분획

김치는 절인 배추 100에 대해 고추가루 3.5, 마늘 1.4, 생강 0.6, 젓갈 2.2, 파 2.0, 무 13.0, 설탕 1.0의 비율로 혼합하였고, 최종 염의 농도는 2.5%로 조절하여 담근 후 15°C에서 4일간 발효(pH 4.21)시켰으며¹²⁾ 동결 건조하여 분말로 만들었고, methanol로 3회 추출하여 methanol ext.로 하였다. 또 김치(7 kg)의 분획물은 먼저 hexane으로 3회 추출하여 hexane fr.(80 g)으로 하고, 그런 다음은 2배의 methanol로 3회 추출하여 methanol soluble fr.(1 kg)으로 하였으며, 다시 극성이 다른 용매로 dichloromethane(120 g), ethylacetate(20 g), butanol(180 g) 및 aqueous (680 g) fr.으로 순차적으로 분획한 후 회전식 진공농축기를 이용하여 농축하였다.

2) Ames 돌연변이 유발실험

(1) 실험균주 및 돌연변이 유발물질: *Salmonella typhimurium* TA100은 *Salmonella typhimurium* LT-2의 histidine auxotroph로서 미국 California대학의 B.N. Ames박사로부터 제공받아 정기적으로 histidine 요구성, deep rough(*rfa*) 돌연변이, *uvrB* 돌연변이, R factor 등의 유전형질을 확인하면서 실험에 사용하였다. 돌연변이 유발 물질인 aflatoxin B₁(AFB₁)은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하여 사용하였으며, dimethylsulfoxide(DMSO)에 녹여 실험에 사용하였다.

(2) 시료의 독성실험 및 돌연변이 유발물질의 농도 결정: 시료의 균주에 대한 독성유무를 살펴보기 위해서 실험에 사용하기 전에 독성실험을 행하여 독성이 나타나지 않는 범위에서 시료의 농도를 결정하였다. 먼저 멸균된 cap test tube에 top agar 2 ml를 분주한 후, 균주 100 μ l와 시료를 가하고 가볍게 vortex하고 nutrient agar plate에 분주, 고화시켜서 37°C에서 24시간 배양시킨 다음, 그 독성유무를 판정하였다.^{13,14)} 돌연변이 유발물질의 농도는 dose response를 통하여 0.5 μ g/plate로 결정하였다.

(3) 항돌연변이 효과실험: Indirect mutagen (AFB₁)을 활성화 시키기 위하여 Maron과 Ames의 방법^{13,14})에 따라 S9 mixture를 첨가하였다. S9 mixture는 쥐의 간으로부터 얻은 S9 fraction 10%에 MgCl-KCl salts (2%), 1M glucose-6-phosphate(0.5%), 1M NADP(4%), 0.2M phosphate buffer(pH 7.4) 및 멸균수를 혼합하여 S9 mixture를 조제하였다.

항돌연변이 실험은 preincubation mutagenicity test^{15,17})를 이용하였다. 미리 건열 멸균시킨 glass cap tube에 S9 mix 0.5 ml, 하룻밤 배양된 균주 0.1 ml($1 \sim 2 \times 10^9$ cells/ml)와 돌연변이 유발물질(50 μ l)을 가한후 시료를 0.625 mg/plate, 1.25 mg/plate, 2.5 mg/plate씩 가하여 37°C에서 20분간 예비배양한 다음 histidine/biotin이 첨가된 top agar(45°C) 2 ml씩을 가하고 3초간 vortex하여 minimal glucose agar plate에 도말하고 37°C에서 48시간 배양한 후 revertant 숫자를 계수하였다.

돌연변이 억제효과의 정도(inhibition rate)는 아래 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Inhibition rate(\%)} = 100 \times [(a-b)/(a-c)]$$

여기서 a는 돌연변이원에 의해 유도된 복귀돌연변이원수, b는 시료를 처리하였을 때의 복귀돌연변이의 수이며, c는 돌연변이원과 시료가 없을 경우의 자연복귀돌연변이원의 수이다.

3) HL-60 인체 혈액암 세포의 생존 저해효과와 apoptosis 유도 효과

(1) 세포배양: 인체 혈액암세포인 HL-60을 한국세포주 은행(KCLB, Seoul, Korea)으로부터 분양받아 100 units/ml의 penicillin-streptomycin과 15%의 fecal bovine serum(FBS)가 함유된 RPMI 1640을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 암세포는 일주일에 2~3회 refeeding하고 6~7일 만에 원심분리한 후 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

(2) SRB assay¹⁸): 배양된 암세포는 96 well plate에 2×10^4 cells/ml이 되도록 seeding하고 24시간 배양후 김치 추출물 및 분획물을 0.1 mg/assay(0.5 mg/ml)와 0.2 mg/assay(1.0 mg/ml)의 농도로 첨가하였으며, 대조군에는 PBS를

첨가하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 48시간 후에 80% Trichloroacetic acid (TCA)를 첨가하여 4°C에서 냉장 방치하였다. 1시간 후 TCA를 제거하고 증류수로 5번 씻은 후 실온에서 건조시키고 0.4% sulforhodamine B(SRB) 100 μ l를 첨가해서 30분동안 염색시켰다. 1% acetic acid로 5번 씻은 후 다시 실온에서 건조시키고 0.01M tris base 150 μ l를 첨가한 후 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) MTT assay^{19,20}): 배양된 암세포를 96 well plate에 well당 2×10^4 cells/ml가 되도록 seeding하고 24시간 배양 후 시료를 0.1 mg/assay(0.5 mg/ml)와 0.2 mg/assay(1.0 mg/ml) 농도로 첨가하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 48시간 후 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 20 μ l를 첨가하고 4시간동안 더 배양한 후 생성된 formazan 결정을 DMSO에 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(4) Growth inhibition test: 배양된 암세포를 원심분리한 후 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 24 well plate에 2×10^4 cells/ml의 농도로 seeding하여 24시간 배양한 후, 15% FBS가 있는 배지에 시료를 첨가하여 48시간동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 시료는 김치의 추출물과 분획물을 0.1 mg/assay (0.1 mg/ml)과 0.2 mg/assay(0.2 mg/ml)로 첨가하였으며, 대조군에는 PBS를 첨가하였다. 증식된 암세포 수를 hemocytometer로 측정하여 대조군과 비교하여 암세포 성장 저해효과를 관찰하였다.

(5) DNA fragmentation assay^{21,22}): 배양된 HL-60 인체 혈액암 세포를 1×10^6 cells/ml로 seeding하고 아무것도 처리하지 않은 대조군(control), 시료 대신 PBS를 처리한 것과 시료를 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml과 1.0 mg/ml의 농도로 처리한 후 1일간 배양하고 lysis buffer를 처리하였다. Ice에서 30분간 shaking하고 4°C에서 15분간 14000 g에서 원심분리하여 상등액을 모은 후, 50°C에서 4시간동안 proteinase K(Gibco, Co. BRL)를 처리하였다. Phenol extraction방법으로 DNA를 분리하고 5.0M NaCl과 100% isopropanol을 첨가하여 잘 섞은 다음 -20°C에서 1시간 방치하고 14000 g에서 10분간 원심분리한 후, 상등액을 제거하고 pellet을 증류수에 녹여 1.5% agarose gel에서

1×TAE buffer로 3~4시간(50V) 전기영동하여 ethidium bromide로 염색하고 UV transilluminator 하에서 DNA단편화 현상을 관찰하였다.

결 과

김치 분획물의 *Salmonella typhimurium* TA100 균주에서 AFB₁에 대한 항돌연변이 효과를 검토한 결과는 Table 1과 같다. 15°C에서 4일간 발효시킨 가장 잘 익은 배추 김치의 추출물과 분획물 중 hexane fr.과 dichloromethane fr.이 2.5 mg/plate의 농도에서 각각 67%, 96%의 돌연변이 유발 억제효과를 보였다. 특히 dichloromethane fr.의 경우 1.25 mg/plate의 농도에서도 70% 이상의 높은 항돌연변이 효과를 보임을 알 수 있었다. 2.5 mg/plate의 농도에서 methanol ext.는 35%의 AFB₁에 대한 돌연변이 유발억제 효과를 보인 반면, dichloromethane fr.은 이보다 훨씬 더 높은 96%의 항돌연변이 효과를 보였다. 즉 hexane으로 탈지시켜 얻은 methanol soluble fr.으로부터 분획한 dichloromethane fr.이 methanol ext.보다 훨씬 높은 AFB₁에 대한 돌연변이 유발 억제 효과를 나타내었다.

In vitro 항암검색법의 하나인 SRB assay를 이용하여 김치의 methanol ext. hexane fr., methanol soluble fr., dichloromethane fr., ethylacetate fr., butanol fr.과 aqueous fr.의 HL-60 혈액암 세포의 생존저해 효과의 결과를 Table 2에 나타내었다. 김치의 추출물 및 분획물은 0.1 mg/ assay의 농도에서 dichloromethane fr.과 hexane fr.만이 50% 이상의 HL-60 혈액암 세포의 생존을 저해하는 효과를 보였으나, 0.2 mg/assay의 농도에서는 김치의 추출물과 분획물 모두 50% 이상 HL-60 혈액암 세포의 생존을 저해하는 것으로 나타났으며, 특히 dichloromethane fr.의 경우 90% 이상의 생존저해 효과를 보였다. 김치의 methanol ext.에 비해 탈지시킨 methanol soluble fr.이 더 높은 암세포 생존저해 효과를 보였고, methanol soluble fr.으로부터 분획한 dichloromethane fr.이 가장 높은 *in vitro* 항암효과를 보였다.

항암제 검색법으로 널리 이용되는 또 다른 방법인 MTT assay에서의 김치 추출물 및 분획물의 *in vitro* 항암효과를 검토한 결과도 SRB assay와 유사

한 경향을 나타내었다(Table 3). 0.1 mg/assay의 농도에서 methanol soluble fr., dichloromethane fr.과 aqueous fr.이 50% 이상 HL-60 혈액암 세포의 생존을 저해하는 것으로 나타났고, 특히 methanol ext.보다도 methanol soluble fr.이 보다 높은 암세포 생존저해 효과를 나타내었다. 0.2 mg/assay의 농도에서 methanol ext.는 59%의 HL-60 혈액암 세포의 생존을 저해하는 것에 비해 methanol soluble fr.은 84%, dichloromethane fr.은 90%의 저해 효과를 보였다.

Fig. 1은 HL-60 혈액암세포를 seeding한 후 0.1 mg/ assay과 0.2 mg/assay의 김치 추출물과 분획물을 처리하여 생존 암세포 수를 계수하여 암세포 성장 억제효과를 살펴본 결과이다. 0.1 mg/assay의 농도에서 ethylacetate fr.과 butanol fr.을 제외하고 김치의 추출물과 분획물은 모두 암세포의 성장을 크게 억제하는 것으로 나타났으며, SRB, MTT assay에서와 유사하게 methanol ext.에 비해 methanol soluble fr.이 HL-60 혈액암 세포의 성장을 더 크게 억제하였고, 특히 dichloromethane fr.의 경우 0.1 mg/assay의 농도에서 90% 이상의 HL-60 혈액암 세포 성장 억제 효과를 관찰할 수 있었다.

이상의 SRB assay, MTT assay와 growth inhibition test에서 김치의 추출물 및 분획물은 HL-60 인체 혈액암 세포의 생존을 저해함을 알 수 있었으며, 특히 김치 분획물 중 dichloromethane fr.이 가장 두드러진 억제 효과를 나타내었다.

이러한 결과는 김치의 methanol ext.에 비해 탈지시킨 methanol soluble fr.이 보다 높은 항돌연변이 효과와 인체 암세포의 성장저해효과를 나타낸다는 연구보고²³⁾와 일치하나 methanol soluble fr.를 다시 분획하여 활성을 검토한 연구보고는 없으므로 김치의 활성물질의 동정을 위하여 분획물들의 활성비교와 이의 분리, 동정이 필요하다.

배추김치의 분획물 중 항돌연변이와 *in vitro* 항암활성이 가장 뛰어난 dichloromethane fr.의 항암활성에 대한 기초연구의 하나로 apoptosis 유발효과를 검토하였다. Apoptosis는 생체에서 생기는 불필요한 세포와 정상적이지 못한 세포를 제거하는 기구로서 중요하다. Apoptosis에서 일어나는 생화학적 변화는 chromatin의 고차구조가 바뀐 뒤 chromatin DNA가 몇 종류의 endonuclease에 의해

서 100 ~ 200 bp 정도로 절단되어 버리는 DNA 단편화 현상이 잘 알려져 있으며, 이는 전기 영동상에서 사다리 모양으로 쉽게 관찰된다.²⁴⁾ Fig. 2에서 처럼 김치의 dichloromethane fr.은 HL-60 혈액암 세포에서 DNA 단편화 현상이 관찰되므로 apoptosis를 유도할 것으로 여겨진다. Apoptosis 과정에는 세포외 인자들이 signal로서 전달되어 관련 유전자의 발현과 조절에 관여하는 것으로 알려져 있으므로 bcl-2, bax, p53와 같은 apoptosis 관련 유전자의 발현에 대한 보다 깊은 연구가 필요하다.

고 찰

김치는 한국을 대표하는 발효식품으로 최근에는 세계적으로 널리 알려지게 되었으며, 그 과학성에 대한 관심도 높아지고 있다. 가장 널리 섭취되고 대표적인 김치가 배추김치이므로 본 연구에서는 배추김치의 methanol ext.와 비교하여 배추김치 분획물의 항돌연변이 효과와 HL-60 인체 혈액암세포를 이용하여 *in vitro* 항암효과를 검토하였다. 이 연구에서 김치의 추출물 및 분획물은 항돌연변이 효과와 *in vitro* 항암효과를 보였고, methanol ext.보다는 methanol soluble fr.이 높은 활성을 보였으며 특히 dichloromethane fr.이 가장 뛰어난 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 김치의 재료가 되는 녹황색 채소, 마늘, 생강이 항돌연변이 및 항암효과를 나타낸다는 보고²⁵⁻²⁷⁾와 고추가루가 AFB₁에 대해 항돌연변이효과를 나타낸다는 보고²⁸⁾를 고려해 볼 때 김치 분획물의 AFB₁에 대한 돌연변이 유발 억제 효과는 이들 재료들에 의한 효과로 여겨진다. 또 가장 잘 익은 배추김치가 생배추김치와 과숙한 배추김치에 비해 더 높은 항돌연변이 효과를 나타낸다는 보고들^{23,29)}을 볼 때 김치의 발효산물도 돌연변이 유발 억제 효과에 관여하는 것으로 사료된다. Hayatsu등³⁰⁾은 β -carotene, vitamin C, mineral과 식이섬유소, chlorophyll과 chlorophylline이 풍부한 녹황색 채소류는 위암을 비롯한 많은 종류의 암 발생을 감소시켜 준다고 보고한 바 있다. 김치의 재료 중 고추가루의 capsaicin의 돌연변이성에 대한 보고도 있었으나 Ames system에서 고추가루의 추출물은 돌연변이 유발성 및 보돌연변이 유발성이 없었고 오히려 항돌연변이 활성을 나타내었다.^{28,31)} 일반적으로 매운 성분을 가진 고추가루는 위암 발

생의 원인 물질 중 하나로 생각되어 왔으나 고추가루는 항암활성이 있는 카로틴과 비타민 C가 다량 함유되어 있기 때문에 고추가루에 대한 새로운 인식이 필요하며 고추가루의 안전성과 항암성에 대한 더 많은 연구가 필요하다. 김치 재료 중 마늘의 추출물이 AFB₁, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)와 nitrosomethylamine(NDMA)에 대한 항돌연변이 활성이 있으며 마늘의 항돌연변이 기작은 간의 microsomal 효소계의 활성화에 관여하여 glutathione-S-transferase의 활성 및 SH 함유 화합물들을 증가시킴으로써 최종 돌연변이원을 비독성 물질로 전환하는데 기여한다고 추측된다.

잘 익은 배추김치가 생김치와 과숙한 김치에 비해 Ames system과 SOS chromotest에서 항돌연변이 효과가 크다.^{23,28)} 이것은 적당히 익은 김치의 경우 비타민 B 복합체, 비타민 C 등 여러 영양소의 합성이 가장 많고 발효과정 중 젖산균의 생성 그리고 비타민 C, β -카로틴, 후라보노이드류, 엽록소 등에 의한 효과로 여겨진다. 또 김치의 발효과정 중 생성되는 젖산균이 Ames system에서 4-nitroquinoline-1-oxide(4-NQO)에 대해 항돌연변이 활성을 나타내며, 유산균의 세포벽 획분이 항돌연변이 활성을 가지는 것으로 연구된 바 있다.³²⁾ 한편 Fernandes등³³⁾은 젖산균이 마우스의 대식세포를 크게 활성화시켜 식균작용을 증가시킨다고 하였다.

본 연구에서의 김치 추출물 및 분획물이 HL-60 인체 혈액암 세포의 생존과 성장을 저해한다는 연구결과는 김치의 추출물이 정상세포에서는 독성을 나타내지 않는 농도에서 HT-29 인체 결장암 세포, K-562 인체 혈액암 세포, MG-63 인체 골육암 세포의 성장을 억제한다는 다른 연구결과²³⁾와도 유사하다. 허²³⁾의 연구에 의하면 가장 잘 익은 김치의 추출물이 AGS 인체 위암세포와 HT-29 인체 결장암세포의 성장을 저해할 뿐만 아니라 DNA합성도 저해한다고 하였다. 특히 덜익은 김치와 과숙한 김치에 비해서 적당히 익은 김치의 추출물이 암세포의 성장을 가장 억제하는 것으로 미루어 김치의 발효과정에서 생성된 어떤 물질이 *in vitro* 항암활성에 큰 영향을 미치는 것으로 여겨진다. 김치의 항암효과에 대한 기작연구는 아직 미흡한 편이며, 이에 대한 연구의 하나로 생체에서 생기는 불필요한 세포와 정상적이지 못한 세포를 적극적으로 제거하는

기작인 apoptosis를 살펴 본 결과 김치의 dichloromethane fr.이 HL-60 인체 혈액암 세포의 apoptosis를 유발하여 암세포의 생존을 저해하는 것으로 나타났다. 또 김치의 dichloromethane fr.이 가장 뛰어난 활성을 나타낸 것은 dichloromethane fr.속의 flavonoid류, steroid류, 지방산, terpenoid류에 의한 효과로 여겨지며 이에 대한 보다 깊은 연구는 진행 중에 있다.

이 외에도 *in vitro* 항암실험으로 김치 추출물이 C3H/10T1/2 cell에서 3-methylcholanthrene (MCA)에 의한 세포 독성을 크게 저해하며, transformation 과정을 억제하여 type II와 III foci생성을 감소시켜 C3H mice에서 유발될 수 있는 암발생을 크게 억제하는 효과를 나타내었다는 연구결과³⁴⁾도 보고된 바 있다. 또 *in vivo*에서 김치 추출물의 항돌연변이성을 *Drosophila melanogaster*를 이용한 wing hair spot 검출계로 살펴본 결과 AFB₁에 의한 체세포 염색체 돌연변이 유발을 억제한다는 연구보고도 있다.³⁵⁾

한국인의 식생활에서 빼 놓을 수 없는 김치의 암 예방효과 및 항암효과가 여러 실험을 통해 확인되었으므로, 이러한 기능을 더욱 더 증진시켜 활성이 뛰어난 암예방김치의 개발이 필요하며 김치내의 활성물질의 동정과 항암기작에 대한 계속적인 연구가 필요하다.

감사의 글

이 논문은 농림부에서 시행한 농림수산 특정 연구사업의 연구 결과 및 1997년도 한국 학술진흥재단의 박사후 연수과정 연수비 지원에 의한 것으로 연구지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1) Hosono A, Wardojo R, Otani H. Inhibitory effects of lactic acid bacteria from fermented milk on the mutagenicities of volatile nitrosamines. *Agric Biol Chem* 1990; 54; 1639.
- 2) Kim HY, Bae HS, Baek YJ. *In vivo* antitumor effects of lactic acid bacteria on sarcoma 180 and mouse Lewis lung carcinoma. *J Korean Cancer Assoc* 1991; 23; 188.
- 3) 하정옥. 기능성 및 저염 김치 개발과 소금의 생리적 특성 연구. 부산대학교 대학원 박사학위논문, 1997.

- 4) 이서래. 한국의 전통발효식품. 이화여자대학교, 서울, 1986; pp 141.
- 5) 김상순. 한국 전통식품의 과학적 고찰. 숙명여자대학교 출판부, 서울, 1985; pp 114.
- 6) Park KY, Baek KA, Rhee SH, Cheigh HS. Antimutagenic effect of kimchi. *Foods Biotech* 1995; 4; 141.
- 7) 박건영. 김치의 영양학적 평가와 항돌연변이 및 항암효과. 한국영양과학회지 1995; 24; 169.
- 8) 최명원, 김광혁, 박건영. 김치 추출물이 Sarcoma-180 세포의 성장과 마우스 식균활성에 미치는 효과. 한국식품영양과학회지 1997; 26; 254.
- 9) 정호권. 김치유산균의 생리적 특성과 면역학적 특성. 김치 과학과 산업 1993; 2; 23.
- 10) Higginson J, Muir CS. Environmental carcinogenesis; Misconception and limitations to cancer control. *J Natl Cancer Inst* 1979; 63; 1291.
- 11) Wynder EL, Gori GB. Contribution of environment to cancer incidence; An epidemiologic exercise. *J Natl Cancer Inst* 1977; 58; 825.
- 12) 조은주, 박건영, 이숙희. 배추김치의 재료배합비 표준화. 한국식품과학회지 1997; 29; 1228.
- 13) Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 1983; 113; 173.
- 14) Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 1975; 31; 347.
- 15) Yahagi T, Nagao M, Sugimura T, Fuuya A, Matsushima T. Mutagenicity of purrolizidine alkaloids in *Salmonella*-microsome test. *Mutat Res* 1979; 68; 211.
- 16) Matsushima T, Sugimura T, Nagao M, Yahagi T, Shirai A, Sawamura M. Factors modulating mutagenicity in microbial test, In; Norphth KH and Gamer RC, eds. Short terms for detecting carcinogens. Berline, Springer, 1980; pp 273.
- 17) Yahagi T, Nagao M, Seinon Y, Matsushima T, Sugimura T, Okada M. Mutagenicities of N-nitrosamines on *Salmonella*. *Mutat Res* 1977; 48; 121.
- 18) Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langley J, Cronise P, Vaigro-Wolff A, Gray-Goodrich M, Campbell H, Mayo J, Boyd M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83; 757.
- 19) Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 1988; 48; 4827.
- 20) Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mago JG, Shoen-

- maker RH, Boyd MR. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a micro-culture tetrazolium assay. *Cancer Res* 1988; 48, 589.
- 21) Joshua JF, Mohammad WK, Kirk JW, Brian WL, Daryl WF., Kimm LO. Induction of apoptotic cell DNA fragmentation in human cells after treatment with hyperdermia. *Cancer Letters* 1995; 89; 183.
- 22) Olive PL, Garnet F, Judit PB. Radiation-induced apoptosis measured in Tk6 human B lymphocytes cells using the comet assay. *Radiat Res* 1993; 136; 130.
- 23) 허영미. 배추김치의 항돌연변이 및 항암효과. 부산대학교 대학원 석사학위논문, 1996.
- 24) 권오유, 김원식. 최근의 apoptosis 연구. *생명과학회지* 1997; 7; 66.
- 25) Nakata T. Effect of fresh garlic extract on tumor growth. *Jap J Hyg* 1973; 27; 538.
- 26) 박건영, 김소희, 서명자, 정해영. 마늘의 돌연변이 유발억제 및 HT-29 결장암 세포의 성장저해 효과. *한국식품과학회지* 1991; 23; 370.
- 27) Kim SH, Park KY, Suh MJ, Chung HY. Effect of garlic(*Allium sativum*) on glutathione S-transferase activity and the level of glutathione in the mouse liver. *J Korean Soc Food Nutr* 1994; 23; 436.
- 28) 김소희, 박건영, 서명자. *Salmonella* assay system에서 고추가루에 의한 aflatoxin B₁의 돌연변이 유발 저해효과. *한국영양식품과학회지* 1991; 20; 256.
- 29) 백경아. 김치 추출물의 항돌연변이 효과. 부산대학교 대학원 석사학위논문, 1994.
- 30) Hayatsu H, Arimoto S, Negishi T. Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 1988; 202; 429.
- 31) 김소희. 김치 성분의 보돌연변이 유발 및 항돌연변이 효과. 부산대학교 대학원 박사학위논문, 1991.
- 32) 손태진. 김치로부터 분리동정된 유산균의 항돌연변이 효과. 부산대학교 대학원 석사학위논문, 1992.
- 33) Fernandes CF, Shahani, K. M. Anticarcinogenic and immunological properties of dietary Lactobacilli. *J Food Prot* 1990; 53; 704.
- 34) Choi MW, Kim KH, Kim SH, Park KY. Inhibitory effects of kimchi extracts on carcinogen-induced cytotoxicity and transformation in C3H/10T1/2 cells. *J Food Sci Nutr* 1997; 2; 241.
- 35) 황승영, 허영미, 최명원, 이숙희, 박건영, 이원호. 김치 추출물에 의한 Aflatoxin B₁의 돌연변이 억제 효과. *한국환경성돌연변이 발암원학회지* 1997; 17; 133.

Table 2. Sulforhodamine B (SRB) assay of fractionated samples from chinese cabbage kimchi¹⁾ against HL-60 human leukemia cells

Treatment(mg/assay)	OD ₅₁₀	
	0.1	0.2
Control	0.469 ± 0.006 (100) ²⁾	
Methanol ext.	0.276 ± 0.038(41)	0.122 ± 0.026(74)
Hexane fr.	0.088 ± 0.053(81)	0.052 ± 0.021(89)
Methanol soluble fr.	0.317 ± 0.068(32)	0.100 ± 0.017(79)
Dichloromethane fr.	0.073 ± 0.073(84)	0.045 ± 0.047(90)
Ethylacetate fr.	0.344 ± 0.080(27)	0.167 ± 0.008(64)
Butanol fr.	0.360 ± 0.069(23)	0.153 ± 0.026(67)
Aqueous fr.	0.338 ± 0.038(28)	0.104 ± 0.031(78)

¹⁾4 day fermented kimchi at 15°C, See materials and methods

$$^2) \text{Inhibition rate (\%)} = \frac{\text{OD}_{510} \text{ of control} - \text{OD}_{510} \text{ of sample}}{\text{OD}_{510} \text{ of control}} \times 100$$

Table 3. 3-(4,5-dimethyl-thiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay of fractionated samples from chinese cabbage kimchi¹⁾ against HL-60 human leukemia cells

Treatment(mg/assay)	OD ₅₄₀	
	0.1	0.2
Control	0.889 ± 0.030(100) ²⁾	
Methanol ext.	0.675 ± 0.065(24)	0.368 ± 0.069(59)
Hexane fr.	0.653 ± 0.072(27)	0.119 ± 0.020(87)
Methanol soluble fr.	0.417 ± 0.019(53)	0.141 ± 0.067(84)
Dichloromethane fr.	0.036 ± 0.070(96)	0.092 ± 0.046(90)
Ethylacetate fr.	0.512 ± 0.010(42)	0.352 ± 0.067(60)
Butanol fr.	0.667 ± 0.013(25)	0.424 ± 0.023(52)
Aqueous fr.	0.424 ± 0.021(52)	0.299 ± 0.018(66)

¹⁾4 day fermented kimchi at 15°C, See materials and methods

$$^2) \text{Inhibition rate (\%)} = \frac{\text{OD}_{540} \text{ of control} - \text{OD}_{540} \text{ of sample}}{\text{OD}_{540} \text{ of control}} \times 100$$

Fig. 1. Inhibitory effect of fractionated samples from chinese cabbage kimchi¹⁾ on the growth of HL-60 human leukemia cells.

¹⁾4 day fermented kimchi at 15°C, See materials and methods (Con; control, MeOH E; methanol extract, Hex F; hexane fr., MSF; methanol soluble fr., DCM F; dichloromethane fr., EtoAC F; ethylacetate fr., BuOH F; Buthanol fr., Aqu F; aqueous fr.)

Fig. 2. DNA fragmentation assay in the HL-60 human leukemia cells after treating Dichloromethane fr. from chinese cabbage kimchi¹⁾.

¹⁾4 day fermented kimchi at 15°C, See materials and methods

Lane 1 : 1 Kb ladder size marker

" 2 : Control

" 3 : PBS treated

" 4 : 0.1 mg/ml treated

" 5 : 0.5 mg/ml treated

" 6 : 1.0 mg/ml treated

1 2 3 4 5 6

Table 1. Effect of fractionated samples from chinese cabbage kimchi¹⁾ on the mutagenicity induced by aflatoxin B₁(AFB₁, 0.5 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Fractionated sample	Concentration (mg/plate)	Revertants/plate		
		0.625	1.25	2.5
AFB ₁ (Control)			915±21	
Spontaneous			95±16	
AFB ₁ + Methanol ext.		692±26(27) ²	686±24(28)	630±12(35)
+ Hexane fr.		741±53(21)	620±39(36)	370±18(67)
+ Methanol soluble fr.		769±48(18)	824±44(11)	738±48(22)
+ Dichloromethane fr.		547±64(45)	315±20(73)	131±31(96)
+ Ethylacetate fr.		621±47(36)	670±18(30)	991±33(-9)
+ Butanol fr.		696±10(27)	662±26(31)	775±66(17)
+ Aqueous fr.		669±46(30)	604±34(38)	584±74(40)

¹⁾4 day fermented kimchi at 15°C, See materials and methods

²⁾The values in the parantheses are inhibition rate(%).