

된장에서 분리한 리놀레산의 *In vitro* 항돌연변이 및 항발암효과

부산대학교 식품영양학과, ¹경남정보대학 식품영양과

이정민 · 문숙희¹ · 박건영

In vitro Antimutagenic and Anticarcinogenic Effect of Linoleic Acid Identified from Doenjang

Jeong-Min Lee, Suk-Hee Moon¹ and Kun-Young Park

Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University,
Pusan 609-735, Korea, ¹Department of Food and Nutrition,
Kyungnam College of Information & Technology, Pusan 616-701, Korea

Antimutagenic and anticarcinogenic effects of linoleic acid were studied by using spore *rec* assay and SOS chromotest, and C3H/10T1/2 cells, respectively. Strong antimutagenic activities toward N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) and 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO) were observed when linoleic acid, one of active compounds identified from traditional doenjang, was added in the test systems. In spore *rec* assay using *Bacillus subtilis* H17 (*rec*⁺) and M45 (*rec*⁻), linoleic acid considerably inhibited the mutagenesis induced by MNNG. In SOS chromotest using *Escherichia coli* PQ37, linoleic acid also exhibited strong antimutagenic activity toward 4-NQO. Linoleic acid decreased the cytotoxicity induced by carcinogen, MNNG in C3H/10T1/2 cells. Type III foci formation rate from the aflatoxin B₁ (AFB₁) treatment also decreased when linoleic acid was added to the C3H/10T1/2 cells, suggesting that linoleic acid might prevent the carcinogenesis mediated by AFB₁.

Key Words: Linoleic acid, Antimutagenicity, Anticarcinogenicity, C3H/10T1/2 cells

서 론

된장은 한국의 대표적인 전통 발효식품 중의 하나로 오랫동안 식용되어 왔으나 발효과정중 *Asp. flavus*가 생산하는 aflatoxin(AF)의 오염으로 인한 발암성에 관한 논의도 있었다.¹⁾ 그러나 여

러 연구결과 발효기간 동안 생성된 AF은 숙성 과정중 대부분이 파괴되거나 제거되었으며,^{2,3)} 우리나라 된장의 경우 주 재료인 콩에는 항발암 성 물질들인 trypsin inhibitor,^{4~7)} isoflavone,⁸⁾ Vt. E를 비롯한 항산화물질,⁹⁾ 식이섬유소¹⁰⁾ 그리고 불포화지방산^{11~14)} 등이 다량 존재하기 때문에 오히려 암을 예방할 가능성이 높다 하겠다. 원

래 콩에는 genistein, daidzein, glycitein 등이 당과 결합한 genistin, daidzin 형태로 들어있으나 발효과정중 여러 미생물들에 의해 가수분해되어 된장, 미소, tempeh 등과 같은 콩 발효식품에는 genistein, daidzein 등의 isoflavone 함량이 상대적으로 높게 존재하므로 이들이 암을 예방하는데 중요한 역할을 담당한다고 한다.^{8,15)}

필수지방산은 linoleic acid가 주가 되는 n-6계 지방산과 linolenic acid가 대표적인 n-3계 지방산으로 구분한다.¹⁶⁾ n-6계인 linolenic acid는 주로 종자유와 종자에 존재하며 그외 잇꽃유(75%), 해바라기유(65%), 대두유(56%), 옥수수유(54%), 참깨유(45%), 땅콩유(29%), 아몬드유(17%) 및 올리브유(8%)에 존재한다.¹⁷⁾ Linoleic acid는 체내에서 arachidonic acid로 전환되고 다시 cyclooxygenase와 lipoxygenase에 의해 prostaglandin 2 series로 전환된다. 이들 prostaglandin 2 series (PG 2)중 PGI₂ 등은 종양세포 성장을 저해시키는 반면 PGA₂와 PGE₂ 등은 발암을 촉진한다고 알려져 있다.¹⁶⁾ 따라서 지금까지 알려진 linoleic acid와 암과의 관계는 매우 상반되는 보고가 많았다. Arachidonic acid의 전구체인 linoleic acid를 마우스에 섭취시키면 arachidonate의 방출이 증가하며 prostaglandin E₂의 증가, ornithine decarboxylase(ODC)의 활성증가로 인해 면역계를 약화시켜 종양세포 증식을 촉진한다는 보고가 있다.¹⁸⁾ 또한 linoleic acid 등의 불포화지방산은 산소에 의해 자동 산화되어 발암이나 세포 노화작용의 주요원인으로도 생각되고 있지만 산화적 반응이 유도되지 않는 환경에서는 필수지방산으로서의 역할이나 항암적 기능을 수행하리라 추측된다.^{19~21)} 최근들어 linoleic acid와 free fatty acid의 항암효과에 대한 연구들이 보고되고 있는데 Hayatsu등^{11,20)}은 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole(Trp-P-1), benzo[a]pyrene과 aflatoxin B₁ 등의 mutagens에 대해 oleic acid와 linoleic acid가 돌연변이 유발 억제효과가 있음을 보고하였고, Siegel등²²⁾도 free fatty acid와 linoleic acid가 ascites tumor cells에 대해 cyto-

toxic 효과가 있음을 시사하였다. 생리활성 물질의 역할에 있어서도 linoleic acid 존재하에서 type I transforming growth factor β_1 (TGF- β_1)는 carcinoma와 melanoma cell의 성장을 저해하고,²³⁾ linoleic acid가 prostaglandin의 합성을 변화시킴으로써 종양세포 증식을 억제한다^{24~26)}는 연구결과와 함께 linoleic acid(18:2)와 linolenic acid(18:3) 혼합액이 암을 가진 쥐의 생명연장에 현저한 효과가 있었고,²¹⁾ 불포화지방산이 포화지방산들 보다 종양세포를 사멸시키는데 더 효과적이었으며 이들중에는 linoleic acid가 가장 효과가 크다고 하였다.²⁶⁾ 뿐만 아니라 Ha등²⁷⁾도 linoleic acid의 유도체인 conjugated linoleic acid (CLA)가 세균계에서 mutagenesis를 저해하고 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene(DMBA)에 의한 mice에서의 epidermal carcinogens의 initiation을 저해한다고 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 Ames 실험계에서 항돌연변이 활성이 확인된 된장에서 분리 동정한 linoleic acid의 항돌연변이 활성을 spore rec assay 및 SOS chromotest를 이용하여 연구하였고, C3H mouse embryo 세포인 C3H/10T1/2 세포를 사용하여 진핵세포에서 발암원에 의한 암화과정에서의 linoleic acid의 역할을 검토하였다.

재료 및 방법

1) 재료

(1) 된장시료 및 추출: 실험에 이용된 된장은 화영식품으로부터 제공받았는데 재래식 된장과 비슷한 방법으로 제조된 것으로 *Aspergillus oryzae* 와 *Bacillus subtilis*로 발효되었다. 된장시료를 잘 마쇄한 후 methanol을 10배(g/v)로 첨가하여 7시간씩 3번 추출한 후 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 추출액을 모았다(methanol extract). 잔사를 hexane으로 다시 추출하고(hexane fraction) 그 잔사를 다시 chloroform, ethylacetate 및 butanol로 순차적으로 추출한 후 남은 된장 추출액을 수층(aqueous fraction)으로 하였

으며 각각을 vacuum evaporator로 건조시킨 후 vial에 옮겨 적당한 농도로 조절하여 DMSO (dimethylsulfoxide)에 녹여 실험에 사용하였다.

(2) **Linoleic acid:** 된장에서 활성물질로 분리 동정된 linoleic acid는 미국의 Sigma사로부터 구입하였으며, DMSO에 일정농도로 희석하여 사용하였다.

(3) **Mutagens/ carcinogens:** Direct mutagen인 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)과 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO)는 미국의 Aldrich사에서 구입하여 각각 증류수와 95% 에탄올에 녹여 사용하였으며, indirect mutagen인 aflatoxin B₁ (AFB₁)은 미국의 Sigma사로부터 구입하여 DMSO에 녹여 사용하였다.

2) 항돌연변이 실험

(1) **Spore rec assay:** Hirano등²⁸⁾ 및 Kada등²⁹⁾의 방법에 따라 *B. Subtilis* H17(rec⁺)과 M45(rec⁻) 포자를 조제하였다. Spore agar plate를 조제하기 위해 nutrient broth 8g, Bacto agar 15 g을 각각 2 개씩 증류수에 용해한 후 가압멸균(121°C, 20 min.)하여 45°C로 식힌 후 여기에 M45 및 H17 포자 현탁액을 각 배지에 넣어 혼합하였다(포자 현탁액 1 ml/배지 10 ml). 이것을 멸균된 petri dish에 분주하여 고화시킨 후 이 위에 paper disc (Toyo Co., Japan)를 고정시키고 미리 배양(37°C, 30 min.)하여 반응시킨 MNNG와 시료를 paper disc에 주입한 후 4°C에서 8시간 동안 냉온 배양하고 다시 37°C에서 24시간 배양시켜 각 paper disc 주위에 생성된 생육 저지대의 직경을 측정하여 항돌연변이성의 유무를 측정하였다.³⁰⁾

(2) **SOS chromotest:** Quillardet의 방법을 변형시킨 백과 함³¹⁾의 방법을 사용하였다. 냉동 보관된 균주 50 µl를 5 ml의 L medium에 접종하고 37°C에서 흡광도가 0.3~0.4에 이를때까지 2시간동안 진탕배양시킨 후, 여기서 얻은 균주를 L medium에 1/10로 희석하였다. 각 농도별로 준비된 시료와 돌연변이 유발물질(4-NQO)이 혼합된 것 20 µl를 미리 분주해 둔 96 well plate의 각

well에 위의 희석된 균주 100 µl씩을 분주하고 90분간 37°C에서 진탕하고 SOS 반응을 유도한 후 한쪽에는 β-galactosidase의 활성측정을 위해 ONPG(o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside) 100 µl, 다른 쪽에는 alkaline phosphatase의 활성측정을 위해 PNPP(p-nitrophenyl phosphate disodium) 100 µl를 첨가하였다. 발색시간은 10분으로 하였으며 β-galactosidase는 1.5 M Na₂CO₃ 100 µl, alkaline phosphatase는 1 M HCl 50 µl로 효소에 의한 발색반응을 정지시키고 5분후 alkaline phosphatase쪽에 50 µl의 2 M Tris buffer를 첨가하여 HCl을 중화하고 spectrophotometer로 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 O.D. 420 nm 값은 Miller³²⁾의 공식에 의해 enzyme unit(Eu)값을 구하였다.

$$Eu = \frac{(1000 \times A_{420})}{t(\text{min})}$$

3) C3H/10T1/2 cell에서 암화억제 실험

(1) **C3H/10T1/2 cell 및 배양:** 실험에 사용된 C3H mouse embryo cell인 C3H/10T1/2 세포는 고신대의 미생물학 교실로부터 제공받았다. 세포는 100 unit/ml의 penicillin-streptomycin과 10%의 fetal calf serum(FCS)이 함유된 basal medium eagle(BME)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양중인 C3H/10T1/2 세포는 일주일에 2, 3번 refeeding 하고 7~8일 배양한 후 phosphate buffered saline(PBS)로 세척한 뒤 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 분리 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

(2) **세포독성실험³³⁾:** C3H/10T1/2 세포를 2,000 cells/5 ml의 농도로 60 mm dish에 seeding한 다음 24시간 동안 배양한 후 배양액을 버리고 free serum medium에 발암물질인 MNNG(0.34 µg/ml)와 시료를 첨가한 후 5 ml씩 60 mm dish에 feeding하였다. 한편, 대조군에는 MNNG와 DMSO를 첨가하여 24시간 배양하였다. 실험군과 대조군

을 10% FCS가 함유된 신선한 배지로 refeeding 하면서 일주일 배양한 후 메탄올로 고정하여 Giemsa stain으로 염색한 뒤 20 또는 그 이상으로 군집을 이룬 cell colony를 계수하여 아래 공식에 따라 C3H/10T1/2 세포에 대한 발암물질로 인한 cytotoxicity의 억제효과를 측정하여 survival fraction으로 나타내었다.

$$\text{Cytotoxicity} = \frac{\text{Number of surviving colonies on treated dishes}}{\text{Number of surviving colonies on control dishes}}$$

(3) Transformation test^{34,35}: 간접 돌연변이원인 AFB₁을 활성화시키기 위하여 S9 mixture를 제조한 후 serum free medium으로 최종 protein의 농도가 4 mg/ml이 되도록 희석하였다.³⁵ C3H/10T1/2 세포를 2,000 cells/5 ml로 계수하여 60 mm dish에 seeding한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간동안 배양하였다. 그후 배양액을 버리고 serum free medium에 S9 mixture로 활성화

시킨 AFB₁(aflatoxin B₁, 0.2 µg/ml)과 시료 10 µl를 넣고 대조군에는 AFB₁과 DMSO를 첨가하고 48시간 배양하였다. 새로운 배지로 refeeding한 후 7일 간격으로 계속 refeeding하면서 6주간 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 그 후 메탄올로 고정화하고 Giemsa stain으로 염색하여 transformed foci가 형성되는 집약도에 따라 3가지 type(type I, II, III)으로 구분하여 계수하였다.

결 과

Bacillus subtilis spore H17과 M45에 대한 MNNG의 유전적 손상을 억제하는 linoleic acid의 효과를 측정하기 위해 spore *rec* assay 방법을 도입하여 검토하였다. H17은 외부의 손상으로 부터 회복능을 지니나 M45는 회복불능의 상태로 되므로 생성되는 생육저지대의 크기를 측정함에 따라 유전적 손상정도를 판단할 수 있는 방법이다. 이 실험에서는 MNNG를 carcinogen으로 하였으며 linoleic acid를 MNNG와 농도별로 혼합하여 대조군과 비교 검토하였다. Table 1에

Table 1. Antimutagenic effect of linoleic acid(LA) at different concentrations toward MNNG (0.1 µg/10 µl/disc) in the *Bacillus subtilis* spore *rec* assay

LA Dose(µg/100 µl/disc)	Inhibition zone(mm)		Difference(mm)	Conclusion*
	M45(<i>rec</i> ⁻)	H17(<i>rec</i> ⁺)		
1	8	3	5 ± 1.1	+++++
5	7	3	4 ± 0.5	++++
10	8	6	2 ± 1.5	++
50	7	6	1 ± 0.5	+
100	7	6	1 ± 1.5	+
500	9	8	1 ± 0.5	+
1000	8	7	1 ± 1.1	+
MED ¹ 500	8	5	3 ± 1.5	+++
HFD ² 500	4	3	1 ± 0.5	+
AFD ³ 500	8	2	6 ± 1.1	++++++
Control (MNNG)	12	5	7 ± 0.5	+++++++

*The more "+" signs, the stronger mutagenicity shown. ¹Methanol Extract of Doenjang, ²Hexane Fraction of Doenjang, ³Aqueous Fraction of Doenjang

Table 2. SOS response of 4-NQO(30ng/assay) treated with linoleic acid

Sample(%)	β-unit*	a-unit	R**	Inhibition rate
Control	21.0	9.5	2.211	—
0.001	20.6	9.5	2.168	10%
0.01	20.1	8.8	2.284	24%
0.1	18.2	8.6	2.116	74%
1.0 14.7	9.6	1.531		164%
Spontaneous	17.2	9.3	1.849	

* Enzyme unit = $\frac{1000 \times A420}{t}$

** R = $\frac{\beta\text{-galactosidase units}}{\text{Alkaline phosphatase units}} = \frac{A420B \times tP}{A420P \times tB}$

서 보듯이 대조군인 MNNG(0.1 μg/10 μl/disc)에 의한 생육저지대의 크기의 차이는 7 mm인데 반해 linoleic acid의 경우 1, 5 및 10 μg/disc 첨가시 각각 5, 4 및 2 mm로 농도에 의존해서 MNNG의 돌연변이성을 억제하였다. 특히 50 μg/disc 이상(50, 100, 500 및 1000 μg/disc)의 농도에서는 생육저지대의 차이가 1 mm정도로 강한 항돌연변이 활성을 나타내었다(Table 1). 한편 본 연구실에서는 된장의 항돌연변이 효과를 여러 실험계에서 확인한 바 있으며 주요 활성물질 중 하나가 linoleic acid로 밝혀졌는데 본 실험에서도 비교 실험한 된장의 메탄올, 헥산 및 물획분 중 헥산획분이 linoleic acid(50 μg/disc 이상) 첨가시와 비슷한 수준으로 MNNG의 돌연변이성을 크게 억제하여 문³⁶⁾의 연구와 일치하였다.

SOS chromotest system은 lacZ gene을 이용하여 유전자의 항돌연변이성을 측정하도록 고안된 방법³⁷⁻³⁹⁾으로 본 실험에서는 돌연변이물질인 4-NQO를 이용하여 dose response를 통해 실험에 필요한 농도를 먼저 구하였다. PNPP/ONPG의 발색시간은 10분으로 하였으며, dose에 따른 SOS response의 결과로부터 최적 실험농도인 30 ng/assay를 구하여 차후 실험에 사용하였다. SOS chromotest에 의한 linoleic acid의 항돌연변이 효과는 β-galactosidase units와 alkaline

Table 3. The effect of linoleic acid(LA) on C3H/10T1/2 cell transformation test with aflatoxin B₁(AFB₁)

Treatment	Total number		
	Type I foci	Type II foci	Type III foci
DMSO 0.5%	0	0	0
AFB ₁ + S9	7	9	13
AFB ₁ + S9 + LA 0.5%	9	10	8
AFB ₁ + S9 + LA 0.1%	9	11	8
AFB ₁ + S9 + LA 0.05%	7	11	10
AFB ₁ + S9 + LA 0.01%	6	12	11

phosphatase unit의 비율(R)로 나타내어 판독하였다. Table 2에서 보듯이 linoleic acid는 농도에 비례해서 4-NQO에 대해 SOS response를 억제하여 linoleic acid 0.001, 0.01 및 0.1% 첨가시 4-NQO의 돌연변이성이 각각 10, 24 및 74%로 억제되었다. 그러나 linoleic acid 1%의 농도에서는 R값이 급격히 감소하여 강한 toxicity가 나타남을 볼 수 있었다. 이러한 결과는 Ames 실험계에서 linoleic acid가 AFB₁에 대해 0.001%의 농도에서부터 활성을 나타내어 0.5%에서는 항돌연변이 활성이 이미 saturation(91.3% inhibition)되는 효과가 나타난다는 연구⁴⁰⁾와 일치한다.

C3H/10T1/2 세포는 mouse embryo 세포로서 한 세포계에서 cytotoxicity, mutation, transformation을 연구할 수 있으므로 화학물질에 의한 발암기전을 *in vitro*에서 연구하는데 널리 사용되고 있다. Linoleic acid가 발암물질에 의한 세포독성을 저해하는 효과가 있는지 또한 linoleic acid가 암발생 과정에서 저해 작용기전이 있는지를 알아보기 위해서 cytotoxicity test와 transformation assay를 실시하였다. Cytotoxicity test는 colony 형성의 저해 정도를 측정하여 결정되는 것으로, 본 실험에서는 linoleic acid가 C3H/10T1/2 세포에서 MNNG에 대한 cytotoxicity 효과를 어느 정도 저해하는지를 측정하여 survival fraction으로 나타내었다(Fig. 1). Linoleic acid 첨가농도 0.001%에서는 약 15%의 cytotoxicity 저

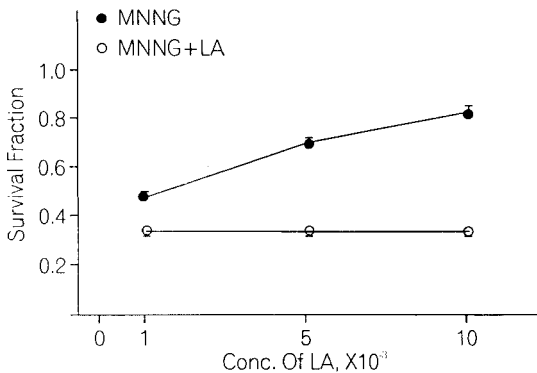


Fig. 1. Survival curves of C3H/10T1/2 cells treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG) and MNNG+linoleic acid(LA, %).

해효과를 나타냈으며, 0.005%에서는 약 42%, 0.01%에서는 61%의 저해효과를 나타내었다. 이러한 결과로부터 linoleic acid는 MNNG의 C3H/10T1/2 세포에 대한 cytotoxicity 효과를 일정한 비율로 억제한다고 생각된다. Linoleic acid가 원핵세포를 이용한 여러 항돌연변이 실험계에서 큰 활성을 나타냈을 뿐만 아니라 진핵세포인 mouse embryo 세포인 C3H/10T1/2 세포를 이용한 cytotoxicity test에서도 억제효과가 나타났으므로 linoleic acid에 의한 발암과정의 저해기전을 검토하기 위하여 transformation test를 실시하였다. C3H/10T1/2 세포의 transformation 효과는 사용되는 mutagen에 따라 다소 차이가 나타나는데 현재 MNNG가 transformation 효과가 있다는 보고와 효과가 없다는 보고^{35,41,42}가 논란의 대상이 되어있는 만큼 본 연구에서는 이러한 점을 고려하여 mutagen으로 AFB₁(0.2 µg/ml)을 사용하였다. 한편 AFB₁의 대사 활성화를 위해 쥐 간의 S9 mixture를 사용하였고, 대사 활성화에 의해 AFB₁의 세포독성은 10배정도 증가한다고 알려져 있다.³⁵ AFB₁의 세포 독성의 정도는 활성 반응시간과도 관련이 있어 활성 반응시간이 길수록 AFB₁의 cytotoxicity 및 transformation을 증가시킨다고 한다.³⁵ 따라서 본 실험에서는 활성 반응시간을 48시간으로 하였다. Carcinogen을 투

여한 결과 형성된 transformation foci는 Type I, Type II 및 Type III로 구분하게 되는데, Type I은 C3H mice에 접종된 후에 tumor를 형성하지 않는 것인 반면 Type II는 50% 정도로 tumor를 형성하고, Type III은 85% 이상의 비율로 tumor를 생성하는 것으로 알려져 있다.³⁴ Table 3에서 보듯이 AFB₁과 S9를 혼합한 경우 Type II 및 Type III의 foci 형성비율은 유사하나 Type III의 foci 형성이 plate당 13개로 높게 나타났고 linoleic acid의 첨가농도가 증가할수록 Type III의 foci 형성이 감소되었다. Linoleic acid 0.1% 첨가시 Type III foci는 8개로 감소되어 linoleic acid는 발암물질로 인한 암발생을 감소시키는 것으로 판단된다. 아직까지 C3H/10T1/2 세포에서 불포화지방산의 효과에 대한 연구가 미비한 상태로 공통된 연구 결과를 찾아보기는 힘들지만 본 실험의 연구결과에 따르면 linoleic acid는 진핵세포에서 암화과정을 다소 억제한다고 할 수 있겠다.

고 찰

된장의 주요 활성물질의 하나인 linoleic acid에 대해 spore rec assay 및 SOS chromotest를 이용하여 항돌연변이 효과를 검토하고, linoleic acid가 발암물질에 의한 세포독성을 저해하는 효과가 있는지 또한 이와함께 발암물질로 인한 암발생을 억제하는 효과가 있는지를 측정하기 위해 C3H/10T1/2 세포를 이용하여 cytotoxicity test와 transformation assay를 실시하였다. *Bacillus subtilis* H17(*rec*⁺)과 M45(*rec*⁻)를 사용한 spore rec assay에서 linoleic acid는 농도에 비례해서 MNNG에 대해 강한 항돌연변이 효과를 나타내었고, *Escherichia coli* PQ37을 사용한 SOS chromotest에서도 4-NQO의 돌연변이성이 linoleic acid의 농도에 비례해서 크게 저해되었으나 linoleic acid 1%의 농도에서는 toxicity가 나타났다. 임⁴⁰의 연구에 의하면 Ames test에서 linoleic acid가 AFB₁, MNNG 및 4-NQO의 돌연변이성을

억제하였고, AFB₁과 같은 간접 돌연변이원에 대한 억제작용이 직접돌연변이원인 MNNG 및 4-NQO에 비해 강한 항돌연변이 효과를 나타내었다.⁴⁰⁾ 또 Hayatsu등¹¹⁾도 linoleic acid와 oleic acid는 *Salmonella typhimurium* 균주를 이용한 Ames 실험계에서 항돌연변이 효과가 있다고 하였다. 이와 같이 linoleic acid가 Ames test, spore *rec* assay 및 SOS chromotest 등의 bacteria계의 실험에서 항돌연변이 효과가 크게 나타났으므로 진핵세포계에서도 항발암효과가 나타나는지를 C3H/10T1/2 세포를 통해 확인해 보았다. Linoleic acid의 첨가농도에 따라 MNNG의 C3H/10T1/2 세포에 대한 cytotoxicity 효과를 일정한 비율로 억제하였으며, linoleic acid 0.1% 이상 첨가시 85%의 발암성을 갖는 type III foci 형성이 40%정도 낮아져서 C3H 마우스에서 생성될 수 있는 발암성을 억제하였다. 한편 linoleic acid는 불안정해 악조건에서는 산화를 일으켜 free radical을 형성하는 등 세포건강에 나쁜쪽으로 작용할 수도 있으며, linoleic acid가 많은 n-6계 식물유지의 과잉섭취가 유방암 등의 발암을 촉진한다는 몇몇 연구도 있다.^{42,44,45)} 그러나 된장은 어느 식품보다 항산화효과가 큰 것으로 확인되었고,⁴⁵⁾ 특히 linoleic acid는 된장내에 있는 한 안전하게 보호되어 암예방효과를 나타내는 것으로 생각된다. 또한 linoleic acid가 nitrite를 감소시켜 nitrosamine형성을 억제한다는 보고와 함께, Ehrlich ascites carcinoma를 이식시킨 ICR mice에 linoleic acid 처리시 항암효과가 컸으며 이때 linoleic acid는 암세포의 유리지방산 조성에 영향을 끼쳐 세포독성 효과를 일으키며 linoleic acid 처리시 수명연장 효과와 종양의 크기도 현저하게 감소되었다고 한다.¹³⁾ 본 연구실의 실험결과에서도 linoleic acid는 여러 돌연변이 실험계에서 간접돌연변이원인 AFB₁에서 뿐만 아니라 직접돌연변이원인 MNNG 및 4-NQO에 대한 항돌연변이 활성을 나타내어 linoleic acid는 여러 발암물질에 대해 항돌연변이 활성이 확인되었으며 linoleic acid는 다른 여러 인체

암세포의 성장도 억제시키는 것으로 나타났다.^{46,47)} 또한 면역계와 관련하여 linoleic acid는 natural killer세포 및 대식세포의 활성을 크게 증가시키고^{48,49)} *in vivo*에서도 tumor의 생성억제 및 생명연장 효과가 있다는 긍정적인 연구결과가 많다.^{50,51)} 앞으로 linoleic acid의 항암효과에 대한 보다 많은 연구와 함께 C3H/10T1/2 cell을 이용한 Ames mutation assay, AHH(arylhydrocarbon hydrolase) assay, DNA binding assay 등을 통해 linoleic acid의 항암기작에 대한 연구도 계속 수행되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

된장의 주요 활성물질의 하나로 동정된 linoleic acid는 spore *rec* assay 및 SOS chromotest에서 강한 항돌연변이 효과를 나타내었다. 특히 spore *rec* assay에서는 50 μ g/disc 이상의 농도에서 MNNG에 대한 강한 항돌연변이 활성을 나타내었고, SOS chromotest에서는 linoleic acid 0.1% 농도에서 4-NQO의 돌연변이성이 74%나 억제되었다. 또한 진핵세포 실험계인 C3H/10T1/2 cell에 대한 cytotoxicity test에서 MNNG의 작용을 억제하여 세포의 생존도를 높였는데 linoleic acid 0.01% 농도에서 61%의 저해효과를 보였다. Linoleic acid의 발암과정의 저해기전을 검토하기 위해 실시한 transformation test에서도 linoleic acid의 농도에 비례하여 Type III foci의 형성이 저해되어 linoleic acid 0.1% 이상의 농도에서는 Type III foci의 형성이 40%정도 낮아져서 linoleic acid는 발암물질로 인한 돌연변이 및 암 발생을 억제하는 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

- 1) Crane PS, Rhee SU, Seel DJ. Experience with 1079 cases of cancer of the stomach seen in Korean from 1962 to 1968. *Am J Surg* 1970; 120: 74.
- 2) Park KY, Lee KB, Bullerman LB. Aflatoxin production by *Aspergillus paraciticus* and its stability

- during the manufacture of Korean soy paste(Doenjang) and soy sauce(Kanjang) by traditional method. *J Food Prot* 1988; 51(12): 938.
- 3) 박건영, 이규복. 재래식 된장, 간장 제조중 Aflatoxin의 파괴에 관한 연구. 부산대학교 가정대학 연구보고지 1987; 13: 49.
 - 4) 青木. みそ汁三十不健康法, こま書房, 日本 1981.
 - 5) Yavelow J, Finlay TH, Kennedy AR, Troll, W. Bowman-Birk soybean protease inhibitor as an anticarcinogen. *Cancer Res(Suppl)* 1983; 43: 2454.
 - 6) Weed HG, McGandy RB, Kennedy AR. Protection against dimethylhydrazine-induced adenomatous tumors of the mouse colon by the dietary addition of an extract of soybeans containing the Bowman-Birk protease inhibitor. *Carcinogenesis* 1985; 6(8): 1239.
 - 7) Messadi DV, Billing P, Shklar G, Kennedy AR. Inhibition of oral carcinogenesis by a protease inhibitor. *J Natl Cancer Inst* 1986; 76(3): 447.
 - 8) Coward L, Barnes NC, Setchell KDR, Barnes S. Genistein, diadzein and their β -glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *J Agric Food Chem* 1993; 41(11): 1961.
 - 9) Mergen WJ, Bhagavan HN. α -Tocopherols(Vitamin E). In Nutrition and cancer prevention, Moon TE, Micozzi MS(ed), Marcel Dekker, Inc., New York 1989; pp 305.
 - 10) Lee SM, Rhee SH, Park KY. Antimutagenic effect of soluble dietary fiber from kale and soybean. *Environ Mut Carcinogens* 1993; 13(1): 26.
 - 11) Hayatsu H, Arimoto S, Togawa K, Makita M. Inhibitory effect of the ether extract of human feces on activities of mutagens: Inhibition by oleic and linoleic acids. *Mutat Res* 1981; 81: 287.
 - 12) Begin ME, Das UN, Eells G. Selective killing of human cancer cells by polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot Med* 1985; 19: 177.
 - 13) Zhu YP, Su ZW, Li CH. Growth-inhibition effects of oleic acid, linoleic acid and their methyl ester on transplanted tumors in mice. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81: 1302.
 - 14) Nicholson ML, Neoptolemos JP, Clayton HA, Talbot IC, Bell PRF. Inhibition of experimental colorectal carcinogenesis by dietary N-6 polyunsaturatedfats. *Carcinogenesis* 1990; 11(12): 2191.
 - 15) Esaki H, Onozaki H, Osawa T. Antioxidative activity of fermented soybean products. In: Food phytochemical for cancer prevention I, ACS symposium series 1994; 546: 353.
 - 16) Takamitsu H, Atsuko M, Harumi O, Takeshi S, Keiki T, Kiyohide K. Effect of dietary essential fatty acids on pulmonary metastasis of ascites tumor cells in rats. *Chem Pharm Bull* 1987; 35: 3925.
 - 17) Erasmus U. Fats and oil, Alive Books, Canada 1986.
 - 18) Minoura T, Takata T. Effect of dietary eicosapentanoic acid on A20 zymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Cancer Res* 1998; 48: 4970.
 - 19) Gilman AS, Goodman GS, Gilman A. The pharmacological basis of therapeutics. 6th ed., Macmillan Co., Inc., New York, 1975.
 - 20) Hikoya H, Keiko I. Inhibition of the mutagenicity of cooked-beef basic fraction by its acidic fraction. *Mutat Res* 1981; 91: 437.
 - 21) Park KY, Moon SH, Cheigh HS, Baik HS. Antimutagenic effects of doenjang(Korean soy paste). *J Food Sci Nutr* 1996; 1: 151.
 - 22) Israel S, Tian LL, Edmond Y, Tom SK, Nobert G. Cytotoxic effects of free fatty acids on ascites tumor cells. *JNCT* 1987; 78(2): 271.
 - 23) Newman MJ. Inhibition of carcinoma and melanoma cell growth by type I transforming growth factor β is dependent on the presence of polyunsaturated fatty acids. *Pro Natl Acad Sci* 1990; 87: 5543.
 - 24) Booyens J, Engelbrecht P, Le Roux S. Some effect of essential fatty acids linoleic acid and α -linolenic acid and of their metabolites γ -linolenic acid, arachidonic acid, eicosapentanoic acid, docohexaenoic acid, and of PGA₁ and E₂ on the proliferation of human osteogenic sarcoma cells in culture. *Prostaglandins Leukot Med* 1984; 15: 15.
 - 25) Elattar TMA, Lin HS. Comparison of the inhibitory effect of polyunsaturated fatty acids on prostaglandin synthesis I oral squamous carcinoma cells. *Pros Leuk Ess FA* 1989; 38: 119.
 - 26) Begin ME. Effects of polyunsaturated fatty acids and of their oxidation products on cell survival. *Chem Phys Lipids* 1987; 45: 269.
 - 27) Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 1987; 8: 1881.
 - 28) Hirano K, Hagiwara T, Ohta Y, Matsumoto H, Kada, T. Rec-assay with spores of *Bacillus subtilis* with and without metabolic activation. *Mutat Res* 1982; 97: 339.
 - 29) Kada T, Tutikawa K, Sadaie, Y. *In vitro* and host-mediated "Rec-assay" procedures for screening chemical mutagens and phloxine, a mutagenic red dye detected. *Mutat Res* 1972; 16: 165.

- 30) Ham SS, Park BK, Lee SY, Lee JH, Kang CK, Lee DS, Omura H. Rec-assay and DNA-breaking action on the enzymatic browning reaction products. *J Korean Agric Chem Soc* 1984; 27: 264.
- 31) 백창원, 함승시. SOS chromotest에 의한 사과와 효소 갈변반응 생성물의 항돌연변이 효과. *한국식품과학회지* 1990; 22: 618.
- 32) Miller J. Experiments in molecular genetics. Cold spring harbor laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1972.
- 33) Billings PC, Uwaifo AO, Heidelberger, C. Influence of benzoflavone on aflatoxin B₁-induced cytotoxicity, mutation and transformation of C3H/10T1/2 cells. *Cancer Res* 1983; 43: 2659.
- 34) Reznikoff CA, Bertram JS, Brankow DW, Heidelberger C. Quantitative and qualitative studies of chemical transformation of cloned C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of cell division. *Cancer Res* 1973; 33: 3239.
- 35) Billings PC, Heidelberger C, Landolph JR. S-9 metabolic activation enhances aflatoxin-mediated transformation of C3H/10T1/2 cells. *Toxi Appl Pharm* 1985; 77: 58.
- 36) 문숙희. 된장의 항돌연변이 효과에 관한 연구. 부산대학교 대학원, 석사학위논문 1990.
- 37) Quillardet P, Huisman O, D'Ari R, Hofnung, M. SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K12 to measure genotoxicity. *Proc Natl Acad Sci* 1982; 79: 5971.
- 38) Quillardet P, Hofnung M. The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins. *Mutat Res* 1985; 147: 65.
- 39) Quillardet P, Bellecombe C, Hofnung M. The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: Validation study with 83 compounds. *Mutat Res* 1985; 147: 79.
- 40) 임선영. Linoleic acid의 항돌연변이 및 항암효과. 부산대학교 대학원, 석사학위논문 1994.
- 41) Boreiko CJ, Abernethy DJ, Stedman, DB. Alteration of intercellular communication associated with the transformation of C3H/10T1/2 cells. *Carcinogenesis* 1987; 8(2): 321.
- 42) 磯田好弘, 平野二郎. 衛生化 1988; 34: 395.
- 43) Lim SY, Rhee SH, Park KY. Antimutagenic effect of linoleic acid. *J Food Sci Nutr* 1997; 2(1): 29.
- 44) 磯田好弘, 眞鍋重夫. 食の化學, 1989; 8月号.
- 45) 박경숙. 지방질의 산화에 대한 된장 및 그 추출물의 항산화효과. 부산대학교 대학원, 석사학위논문 1991.
- 46) 이정민. 된장 추출물과 linoleic acid의 항돌연변이 및 항암효과. 부산대학교 대학원, 석사학위논문 1993.
- 47) 임선영. 된장의 항돌연변이 및 항암효과. 부산대학교 대학원, 박사학위논문 1997.
- 48) 김광혁, 장명웅, 선우양일. Linoleic acid와 ursolic acid가 마우스 natural killer 세포활성에 미치는 효과. *고신대학교 의학부 논문집* 1992; 8: 36.
- 49) 김광혁, 장명웅, 박건영, 류태형, 선우양일. Linoleic acid, ursolic acid, phytol, 들미나리 추출물이 마우스 phagocyte에 미치는 효과. *한국환경성독연변이 발암원학회지* 1993; 13: 135.
- 50) 하재청, 최은상, 류태형, 양한석, 박건영. Sarcoma 180에 대한 약용식물의 항암효과. *대한암학회지* 1991; 23: 197.
- 51) 류태형, 박성미, 정해영, 박건영, 하재청. 생쥐에 이식된 암세포에 있어서의 linoleic acid의 암억제효과. *대한암학회지* 1992; 24: 493.