

김치추출물의 2-AAF로 유도된 쥐 간발암과정 억제효과

부산대학교 식품영양학과 및 김치연구소, ¹생명공학연구소
생물활성 평가연구실

박 건 영 · 김 형 진¹ · 정 근 옥

Anticarcinogenic Effect of Kimchi Extract on 2-AAF-induced Rat Hepatocarcinogenesis System

Kun-Young Park, Hyoung-Chin Kim¹ and Keun-Ok Jung

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

¹Biopotency Evaluation Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience
and Biotechnology, Taejon 305-600, Korea

Anticarcinogenic effect of the methanol extract from kimchi was determined in a new medium-term carcinogenicity bioassay using D-galactosamine (DGA) as a nonsurgical method to induce liver cell regeneration in place of partial hepatectomy (PH). Male F344 rats were initially given a single i.p. injection of diethylnitrosamine (DEN, 200 mg/kg) and received 2 i.p. injections of D-galactosamine (DGA, 300 mg/kg) at the end of week 2 and 5. They were treated with oral administration of 2-acetylaminofluorene (2-AAF, 7 mg/kg) and kimchi extract (920 mg/kg) for week 3~8 (5 days/week). Anticarcinogenic effect was assessed by comparing the numbers and areas per square centimeter of glutathione S-transferase placental form-positive (GST-P⁺) foci in the livers of kimchi extract-treated animals with those of the control animals given 2-AFF alone. No difference was noted in body weights between control and kimchi treated group. Liver weights and liver/body weight ratios were not changed in rats treated with kimchi sample. The mean numbers of GST-P⁺ foci in livers of control and kimchi-treated group were 13.8 and 8.8/cm², respectively. The areas of GST-P⁺ foci were decreased in kimchi extract-administrated group. These results suggest that kimchi has a inhibitory effect on 2-AAF-induced hepatocarcinogenesis.

Key Words: Kimchi, GST-P⁺ foci, 2-AAF, Hepatocarcinogenesis

서 론

김치는 주재료가 채소이므로 채소가 갖는 비타

민과 무기질의 조절영양소로서의 역할 및 식이섬
유소 공급원 그리고 발효과정에서 생성된 맛과,
젖산균 및 유기산에 의한 변비예방 및 정장작용
에도 중요하게 작용하여 일상생활에서 한국인을

위한 영양 공급 및 건강유지를 위해 중요하게 관련되어 있다.^{1,2)} 박등³⁾의 연구에 의하면 김치의 주재료인 배추를 비롯하여 부재료인 마늘, 고춧가루, 생강 및 파와 그 외 주재료 채소들은 암을 예방하는 효과 및 항암적인 효과가 있다고 하였다. 또한 가장 대표적이며 널리 섭취되는 배추김치는 이미 항돌연변이 및 항암효과가 있음이 보고된 바 있다.^{3,5-13)} 김치는 발효과정 중 유산균의 생성과 항암 영양소로 알려진 비타민 C, β -carotene, flavonoid, chlorophyll 등이 풍부하며 항돌연변이, 항암, 면역증강 효과 뿐 아니라 풍부한 식이섬유소에 의한 대장암 예방효과가 있다고 여겨지고 있다.¹⁴⁻¹⁶⁾

그러나 김치와 한국인에 발병률이 높은 암과의 관련성에 대한 동물실험 연구는 아직도 미흡한 실정이다. 생체내에서의 항발암효과를 검증하기 위해서는 인체 발암과정과 가장 유사한 발암모델을 이용하는 것이 필수적이다. 또한 발암과정 중에 전암병변 표지자를 이용하면 암이 발생되기 이전 단계에서 비교적 단기간에 항발암효과를 검증할 수 있는데,¹⁷⁾ 위암의 전암병변 표지자로는 pepsinogen I altered pyloric glands (PAPG)가 있고,¹⁸⁾ 간암의 표지자로는 glutathione S-transferase placental form (GST-P)가 잘 알려져 있다.^{19,20)} GST-P는 랫드의 태반에서 추출한 효소로 간의 전암 및 종양성병변에서 발현이 증가하여 흰쥐 간의 종양표지자로 널리 활용되고 있다.

본 연구에서는 DEN-DGA Model을 이용하여 유기배추김치의 추출물이, 발암물질인 2-acetylaminofluorene (2-AAF)이 랫드의 간에 일으키는 전암병변인 glutathione S-transferase placental form (GST-P) 양성병소의 발생에 미치는 영향을 조사하여 항암효과를 측정하고자 하였다.

재료 및 방법

1) 김치시료 및 추출물 준비

김치제조를 위한 재료로 배추는 강림자연농원(경남, 밀양)에서 유기농법으로 재배하여 10월에 분양받은 유기청방배추를 이용하였고, 젓갈은 청정멸치액젓((주)대상), 소금은 구운소금((주)산내들)을 사용하였으며, 이외의 무, 고춧가루, 파, 마

늘, 생강은 부산시 부전시장에서 구입하였다. 김치는 절인 유기배추 100에 대해 고춧가루 2.5, 마늘 1.4, 생강 0.6, 젓갈 2.2, 파 2.0, 무 13.0, 설탕 1.0의 비율로 혼합하고, 최종 염도를 2.5%로 조절하여 담근 후 15°C에서 발효하였다. 6일간 발효시킨 적숙기 김치(pH 4.31)를 동결건조하고 분말화한 다음 20배(w/v)의 메탄올을 첨가하여 12시간 교반을 3회 반복하여 여과한 후 회전식 진공 농축기로 농축하여 메탄올 추출물(methanol extract)을 얻었다.

2) 실험동물

미국의 Harlan Sprague Dawley, Inc. (Indianapolis, USA)로부터 5~6주령의 F344/NHSD 수컷 랫드를 입수하여 약 1주간의 순화기간을 거친 뒤 6~7주에 실험에 사용하였다.

3) 실험설계 및 투여물질

실험동물은 5마리씩 2군으로 나누었다. 이들 2개군에 간암 유발물질인 diethylnitrosamine (DEN, Sigma Chemical Co., USA)을 생리식염수에 용해시켜 (200 mg/10 ml) 체중 kg당 200 mg/kg씩 복강내로 투여하였으며, 실험개시 후 2주 및 5주에 D-galactosamine (DGA, Sigma Chemical Co., USA)을 생리식염수에 용해시켜(300 mg/10 ml) 체중 kg당 300 mg/kg씩 복강내에 각각 1회 투여하였다.

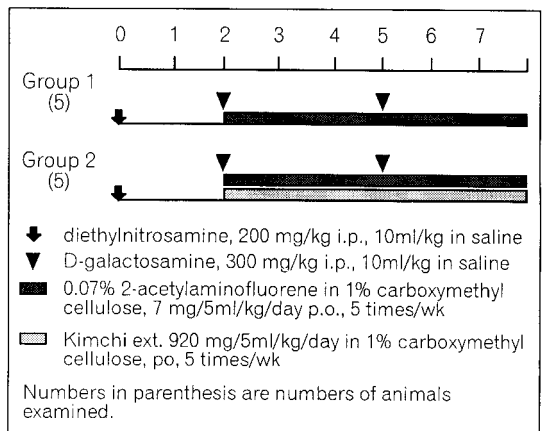


Fig. 1. Experimental protocol used in the present experiment.

Table 1. Changes in body weights of F344/NHSD male rats during the treatment of 2-AAF (control) and 2-AAF+Kimchi extract for 8 weeks

(Unit: g)

Group	Treatment	No. of rats	Week			
			0	2	5	8
1	2-AAF	5	95.6±4.9	148.8±10.7	225.9±21.1	265.5±29.1
2	2-AAF+Kimchi	5	96.3±3.2	149.2±7.7	215.7±18.0	259.6±18.4

Data are presented as mean±SD.

그리고 3주차부터 8주까지 6주간, 1군(대조군) 및 2군(김치첨가군)에 발암촉진물질인 2-AAF를 1% carboxymethyl cellulose에 0.07% (7 mg/5 ml)가 되도록 현탁하여 체중 kg당 7 mg씩 주 5회 경구 투여하였으며, 2군의 경우에는 동기간동안 2-AAF 투여 후 약 30분 뒤에 유기배추김치의 methanol 추출물을 증류수에 희석하여(920 mg/5 ml) 체중 kg당 920 mg씩 주 5회 강제 경구 투여하였다(Fig. 1).

4) 체중과 간의 중량 및 GST-P⁺ foci 측정

시험기간 중 경시적으로 체중을 측정하였으며, 투여종료 후에 부검하여 간의 중량을 측정하였고, 간조직을 적출하여 10% phosphate buffered formalin solution에 고정하였다. 고정된 간조직의 left lobe에서 2~3 mm 두께의 조직편을 채취하여 일반적인 조직제작과정을 행하고 avidin biotin complex (ABC)법을 이용하여 GST-P에 대한 면역조직 화학적 염색을 행하였다. GST-P 양성병소의 간조직 단위면적(cm²)당 수와 면적은 칼라 화상분석기(LA-555, PIAS Co., Japan)를 이용하여 직경 0.1 mm 이상의 병소에 대하여 측정하였다.

Table 2. The liver weight and liver/body weight ratio of F344/NHSD male rats after the treatment of 2-AAF (control) and 2-AAF+Kimchi extract for 8 weeks

Group	Treatment	No. of rats	Absolute liver weight (g)	Liver/body weight ratio (%)
1	2-AAF	5	9.97±1.19	3.76±0.18
2	2-AAF+Kimchi	5	9.81±1.07	3.77±0.20

Data are presented as mean±SD.

사이의 유의성은 관찰되지 않았다(Table 2).

한편 GST-P 양성병소의 수에 있어서 발암촉진 물질로서 2-AAF를 투여한 대조군은 13.8±5.4개/cm²를 나타내었고, 2-AAF와 함께 유기배추김치의 메탄올추출물(15°C에서 6일 발효)을 투여한 유기배추김치 투여군은 8.8±3.3개/cm²로 관찰되었다. GST-P 양성병소의 면적에 있어서도 대조군은 0.86±0.47 mm²/cm²인데 반해, 김치추출물 투여군은 0.30±0.12 mm²/cm²로 관찰되어 큰 감소효과를 보였다(Fig. 2). 즉 김치추출물의 투여로 2-AAF에 의해 간에서 생성되는 GST-P 양성병소의 수 및 면적이 감소하는 효과를 나타내었다.

결 과

고 찰

Table 1에서는 F344/NHSD 수컷 랫드의 8주까지의 성장에 따른 체중의 무게를 보여주고 있다. 대조군(1군)에 비해 유기배추 김치투여군(2군)은 다소 성장률이 감소되는 것 같이 보이나 통계적인 유의성은 없었다. 또한 8주 후 랫드의 치사 후 간중량 그리고 간/체중 무게비에서도 1군 및 2군

이 연구에서 사용한 김치의 항암성 실험방법은 Kim등²²⁾이 개발한 비수술적 중기발암성 검색법으로서 그 검색능력이 여러 가지 화학물질에 대하여 밝혀진 바 있다. 또한 이방법의 모체가 된 DEN-PH Model은 250여 가지의 화학물질에 대한 결과가 우수한 것으로 알려져 있다.^{22,23)}

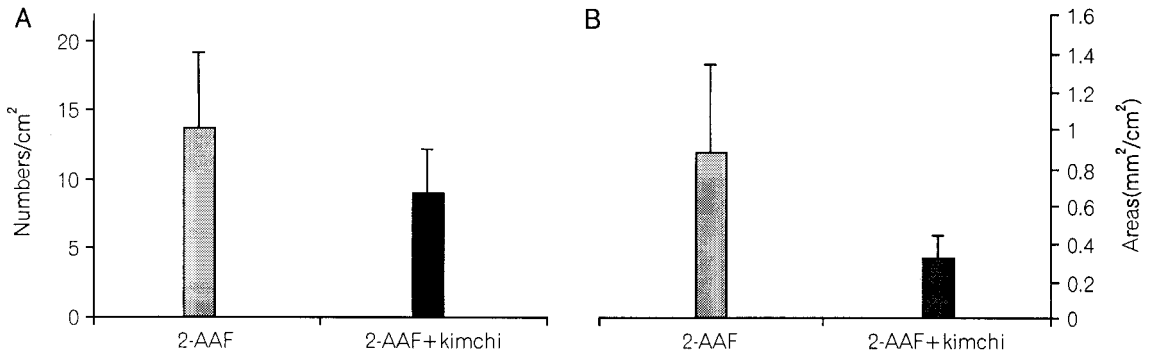


Fig. 2. Numbers (A) and areas (B) of GST-P positive liver cell foci in the liver of F344/NHSD male rats treated with 2-AAF (control) and 2-AAF+Kimchi extract after 8 weeks.

간 전암병변의 지표효소로서 널리 사용되어 왔던 γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP)와 GST-P의 간 전암병변에 대한 지표능을 비교한 결과, GST-P는 γ -GTP로 검색할 수 없는 작은 전암병소의 구분이 가능하며,²⁴⁾ 전암병소에 대한 염색성이 더 확실하다고 하였다.²⁵⁾ 또한 GST-P는 발암물질을 포함한 여러 약물에 의하여, 전암병소의 출현전에 비특이적으로 유도되는 경우가 드물다고 하였다.²⁶⁾ GST-P는 간 전암병변의 지표효소로서 제안된 후 특성이 많이 밝혀졌으며, 발암과 관련하여 이 효소의 유전자는 5'-upstream region에 TRE-like sequence를 가지며 oncogene인 c-jun 단백질인 AP-1이 이 TRE sequence에 결합하여 이 유전자의 발현을 자극한다고 알려져 있다.²⁷⁾

본 연구 결과, 발암촉진 물질인 2-AAF와 김치 추출물을 함께 투여한 군이 2-AAF만을 투여한 군에 비하여 GST-P 양성병소의 수 및 면적의 평균치가 크게 감소하였다는 것은 2-AAF에 의하여 야기되는 전암병변을 김치가 억제하였다고 하겠다. 통계학적인 유의성이 관찰되지 않은 것은 사용한 동물수가 적은 것과 동물별 개체차가 심하였던 것이 원인이었다고 사료되나 경향은 확실하다 하겠다. 장과 이¹⁷⁾는 김치에 사용되는 재료 중에서 마늘과 배추의 추출물 및 주성분인 allyl sulfide와 indole-3-carbinol이 위발암지표인 펩시노겐 I 변이 유문선(PAPG)의 발생빈도를 감소시키고, DEN에 의해 유발된 GST-P 변이소의 숫자와 면적을 감소시켜 위와 간의 발암모델에서 암발생 억제효과가 있음을 보고하였다. 이 결과를 고려해 볼 때 김치

의 GST-P 양성병소 감소효과는 이들 재료에 의한 효과로도 여겨진다. 정²⁸⁾은 sarcoma-180 종양세포를 투여한 Balb/c마우스에서 배추김치 투여군은 sarcoma-180 종양세포만 투여한 대조군보다 간에서 해독작용에 관여하는 phase II enzyme인 glutathione S-transferase의 활성이 높았고, 간조직의 Kupffer 세포변화, 지방변성, 국소적 괴사가 감소하였으며, glycogen 분포가 정상군수준으로 회복되었다고 하였다.

배추김치의 암예방효과는 여러 실험계를 통해 확인되었는데⁴⁻¹²⁾ 배추김치의 추출물은 Ames 실험계와 SOS chromotest, *Drosophila melanogaster*를 이용한 wing hair spot 실험계에서 항돌연변이 효과를 보였으며,⁴⁻⁸⁾ 진핵세포를 이용한 발암실험계에서 항발암효과를 나타내었다.⁹⁾ *In vitro* 항암 실험계에서 김치의 추출물은 암세포의 증식 및 성장을 억제하는 효과가 있었으며, 김치의 디클로로메탄 분획물은 HT-60 인체 혈액암세포의 apoptosis를 유발하여 암세포의 생존을 저해하는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾ 또한 김치추출물은 sarcoma-180 세포에 의한 고형암의 성장을 억제하여 *in vivo* 항암효과를 보였으며, 면역활성증강효과도 보고된 바 있다.^{7,11)}

결국 이 실험 결과와 다른 여러 실험 system에 의한 연구 결과로 비추어 김치는 암예방효과가 있다고 하겠다. 그러나 이 실험계에서 시험군 당 동물수의 증가 및 시료의 투여용량 변화 등 그리고 김치의 활성물질을 이용한 더 깊은 연구가 필요하다 하겠다.

감사의 글

이 논문은 농림부에서 시행한 농림수산 특정연구사업의 연구결과에 의한 것으로 연구지원에 감사드립니다.

참고 문헌

- 1) 손경희. 김치의 종류와 이용. 한국식문화학회지 1991; 6: 503-520.
- 2) 박건영. 김치의 영양학적 평가와 항돌연변이 및 항암효과. 한국영양식품학회지 1995; 24: 169-182.
- 3) 박건영, 이경임, 이숙희. 녹황색 채소류의 돌연변이 유발억제 및 AZ-521 위암세포 성장저해효과. 한국영양식품학회지 1992; 21: 149-153.
- 4) 박건영, 최홍식. 김치의 항돌연변이성 및 항암성. 제1회 김치의 과학 심포지움 발표논문집. pp. 205-225 한국식품과학회, 1994.
- 5) Park KY, Baek KA, Rhee SH, Cheigh HS. Antimutagenic effect of kimchi. *Foods Biotech* 1995; 4: 141-145.
- 6) Park KY. Antimutagenic and anticancer functions of kimchi. In Proceedings of IUFOST '96 Regional Symposium on Non-nutritive Health Factors for Future Foods. International Union of Food Science and Technology, Seoul, Korea, 1996; pp 139-166.
- 7) 최명원, 김광혁, 박건영. 김치추출물이 sarcoma-180세포의 성장과 마우스 식균활성에 미치는 효과. 한국식품영양과학회지 1997; 26: 254-260.
- 8) 황승영, 허영미, 최영현, 이숙희, 박건영, 이원호. 김치추출물에 의한 Aflatoxin B₁의 돌연변이 억제 효과. 한국환경성돌연변이 발암원학회지 1997; 17: 133-137.
- 9) 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: 241-245.
- 10) 조은주, 이숙희, 이선미, 박건영. 김치 분획물의 *in vitro* 항돌연변이 및 항암효과. 대한암예방학회지 1997; 2: 113-121.
- 11) Kim KH, Kim SH, Rhee SH, Park KY. Effects of kimchi extracts on interleukin-2 production and natural killer cell activity in mice. *J Food Sci Nutr* 1998; 3: 282-286.
- 12) Choi WY, Park KY. Brining property and antimutagenic effects of organic chinese cabbage kimchi. *J Food Sci Nutr* 1998; 3: 287-291.
- 13) 손태진, 김초희, 박건영. 김치에서 분리한 유산균의 항돌연변이 효과. 대한암예방학회지 1998; 3: 65-74.
- 14) Kato I, Kobayashi S, Yokokura T, Mutai M. Antitumor activity of *Lactobacillus casei* in mice. *Gann* 1981; 72: 517-523.
- 15) Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agric Food Chem* 1992; 40: 2379-2383.
- 16) 이경임, 박건영. 녹황색 채소류의 항(발)암효과. 생명과학회지 1993; 3: 143-152.
- 17) 장자준, 이민재. 각종 동물 발암모델에서 한국인 상용식품 성분의 발암수식효과. 대한암예방학회지 1997; 2: 1-9.
- 18) Tatematsu M, Furihata C, Katsuyama T, Mera Y, Inoue T, Matsushima T, Ito N. Immunohistochemical demonstration of pyloric gland type cells with low-pepsinogen isozyme I in pre-neoplastic and neoplastic tissue of rat stomachs treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *J Natl Cancer Inst* 1987; 78: 771-777.
- 19) Jang J-J, Henneman JR, Kurata Y, Uno H, Ward JM. Alterations in populations of GST-P-immunoreactive single hepatocytes and hepatocellular foci after a single injection of N-nitrosodiethylamine with or without phenobarbital promotion in male F344/NCr rats. *Cancer Letters* 1993; 71: 89-95.
- 20) 장자준, 이운실, 이미숙, 김태환. 3주령 흰쥐에서 디에틸 니트로사민 투여에 의한 GST-P⁺ foci의 유도: GST-P⁺ foci를 이용한 새로운 중기 간 발암 실험법의 시도. 대한암학회지 1994; 26: 231-235.
- 21) Ito N, Tsuda H, Tatematsu M, Inoue T, Tagawa Y, Aoki T, Uwagawa S, Kagawa M, Ogiso T, Masui T, Imaida K, Fukushima S, Asamoto M. Enhancing effect of various hepatocarcinogens on induction of preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive foci in rats: an approach for a new medium-term bioassay system. *Carcinogenesis* 1988; 9: 387-394.
- 22) Kim HC, Lee YS, Nishikawa A. Enhancing effects of phenobarbital and 3-methylcholanthrene on GST-P positive liver cell foci development in a medium-term rat liver bioassay using D-galactosamine. *J Toxicol Environ Health* 1997; 50: 101-110.
- 23) Nam KH, Park HJ, Lee WK, Itagaki S, Doi K, Lee YS. Studies on establishment of non-surgical medium-term carcinogenicity bioassay. *Korean J Lab Anim Sci* 1997; 13: 9-24.
- 24) Sato K. Tumor markers with special reference to marker enzymes for chemical hepatocarcinogenesis. *Toxicology Forum* 1987; 10: 55-64.
- 25) Moore MA, Nakamura T, Ito N. Immunohistochemically demonstrated glucose-6-phosphate dehydrogenase, γ -glutamyl transpeptidase, ornithine decarboxylase and glutathione S-transferase enzymes: absence of direct correlation with cell proliferation in rat liver putative preneoplastic lesions. *Carcinogenesis* 1986;

- 7: 1419-1424.
- 26) Sato K. Glutathione S-transferase and chemical carcinogenesis. In: Proceedings of the international symposium safety assessment of biotechnology products, Seoul, Korean Society of Toxicology 1988; pp 73-88.
- 37) Sakai M, Okuda A, Hatayama I, Sato K, Nishi S, Muramatsu, M. Structure and expression of the rat c-jun messenger RNA: tissue distribution and increase during chemical carcinogenesis. *Cancer Res* 1989; 49: 5633-5637.
- 28) 정근옥. 김치의 암예방(항암) 증진효과와 소금 및 젓갈의 안전성 연구. 부산대학교 대학원 박사학위논문 2000.
-