



### 저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

건조 고등어의 화학성분 및 생리활성

Chemical Components and Biological Activities of  
Dried Mackerel



2010년 2월

한 국 해 양 대 학 교 대 학 원

해양생명환경학과

장 주 리

본 논문을 장주리의 이학석사 학위논문으로 인준함.

2009년 11월

위원장 이학박사 서영완



위원 이학박사 조성환



위원 이학박사 임선영



한국해양대학교 대학원

# 목 차

	Page
목 차	i
List of Tables	iv
List of Figures	vi
Abstract	1
1. 서 론	3
2. 재료 및 방법	7
2-1. 재료	7
2-2. 시약	8
2-3. 기기	8
2-4. 일반성분 및 무기질 측정	9
2-5. 지질 및 지방산 추출	9
2-6. Gas chromatography를 이용한 지방산 분석	12
2-7. 추출, 분획 및 분리	12
(1) 추출 및 분획	12
(2) 고등어의 활성 성분 분리	15
2-8. 생리활성 측정	17
(1) 항암효과	17
① 세포 배양	17

② MTT assay	17
(2) 항산화 효과	20
① DPPH 라디칼 소거 활성	20
(3) 세포수준의 항산화 효과	22
① 세포 배양	22
② 세포 내 활성산소종(Reactive oxygen species) 측정	22
③ 세포 내 GSH (Glutathione) 함량 측정	25
④ 세포 내 NO (Nitric oxide) 생성 측정	25
2-9. 통계 처리	26
3. 결과 및 고찰	27
3-1. 일반성분 및 무기질 함량	27
3-2. Gas chromatography를 이용한 지방산 분석	28
3-3. 추출물 및 분획물의 생리활성	30
(1) 항암효과	30
① MTT assay	30
(2) 항산화 효과	46
① DPPH 라디칼 소거 활성	46
(3) 세포수준의 항산화 효과	48
① 세포 내 활성산소종 (Reactive oxygen species) 측정	48
② 세포 내 GSH (Glutathione) 함량 측정	57

③ 세포 내 NO (Nitric oxide) 생성 측정	60
3-4. 화합물의 생리활성	63
(1) 항암효과	63
① MTT assay	63
(2) 화합물의 지방산 조성	66
4. 요약 및 결론	68
5. 참고 문헌	70
6. 맺 음 말	78



# List of Tables

	Page
Table 1. Chemical composition of dried mackerel .....	27
Table 2. Comparison of fatty acid compositions between raw and dried mackerel .....	29
Table 3. IC <sub>50</sub> values of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from dried mackerel on AGS human gastric adenocarcinoma cells .....	33
Table 4. IC <sub>50</sub> values of solvent fractions from dried mackerel on AGS human gastric adenocarcinoma cells .....	34
Table 5. IC <sub>50</sub> values of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from dried mackerel on HT-29 human colon cancer cells .....	38
Table 6. IC <sub>50</sub> values of solvent fractions from dried mackerel on HT-29 human colon cancer cells .....	39
Table 7. IC <sub>50</sub> values of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from dried mackerel on HT-1080 human fibrosarcoma cells .....	44
Table 8. IC <sub>50</sub> values of solvent fractions from dried mackerel on HT-1080 human fibrosarcoma cells .....	45

Table 9. DPPH radical scavenging effect of crude extracts and solvent fractions from dried mackerel (EDA(%)) .....	47
Table 10. Fatty acid composition of component separated from dried mackerel .....	67





# List of Figures

	Page
Figure 1. Photograph of <i>Scomber japonicus</i> .....	7
Figure 2. Procedure of extracts of lipids and fatty acids .....	11
Figure 3. Preparation of crude extraction and solvent fractions from dried mackerel .....	14
Figure 4. Separation scheme of dried mackerel .....	16
Figure 5. Metabolization of MTT to a MTT formazan by viable cells -	19
Figure 6. Scavenging of the DPPH radical by phenol .....	21
Figure 7. Degradation pathway of DCFH-DA in an oxidation-induced cellular system .....	24
Figure 8. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from dried mackerel on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells .....	31
Figure 9. Inhibitory effect of solvent fractions from dried mackerel on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells .....	32
Figure 10. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from dried mackerel on the growth of HT-29 human colon cancer cells .....	36

- Figure 11. Inhibitory effect of solvent fractions from dried mackerel on the growth of HT-29 human colon cancer cells ..... 37
- Figure 12. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from dried mackerel on the growth of HT-1080 human fibrosarcoma cells .....42
- Figure 13. Inhibitory effect of solvent fractions from dried mackerel on the growth of HT-1080 human fibrosarcoma cells ..... 43
- Figure 14. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M, 0.05 mg/mL) and methanol (MeOH, 0.05 mg/mL) extracts from dried mackerel on levels of reactive oxygen species in HT-1080 cells .....50
- Figure 15. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M, 0.1 mg/mL) and methanol (MeOH, 0.1 mg/mL) extracts from dried mackerel on levels of reactive oxygen species in HT-1080 cells .....50
- Figure 16. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M, 0.5 mg/mL) and methanol (MeOH, 0.5 mg/mL) extracts from dried mackerel on levels of reactive oxygen species in HT-1080 cells .....51

- Figure 17. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M, 1 mg/mL) and methanol (MeOH, 1 mg/mL) extracts from dried mackerel on levels of reactive oxygen species in HT-1080 cells .....51
- Figure 18. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M, 5 mg/mL) and methanol (MeOH, 5 mg/mL) extracts from dried mackerel on levels of reactive oxygen species in HT-1080 cells .....52
- Figure 19. Inhibitory effect of solvent fractions (0.05 mg/mL) from dried mackerel on levels of reactive oxygen species in HT-1080 cells .....53
- Figure 20. Inhibitory effect of solvent fractions (0.1 mg/mL) from dried mackerel on levels of reactive oxygen species in HT-1080 cells .....53
- Figure 21. Inhibitory effect of solvent fractions (0.5 mg/mL) from dried mackerel on levels of reactive oxygen species in HT-1080 cells .....54
- Figure 22. Inhibitory effect of solvent fractions (1 mg/mL) from dried mackerel on levels of reactive oxygen species in HT-1080 cells .....54

Figure 23. Inhibitory effect of solvent fractions (5 mg/mL) from dried mackerel on levels of reactive oxygen species in HT-1080 cells	55
Figure 24. Inhibitory effect of 85% aq. MeOH from dried mackerel on levels of reactive oxygen species in HT-1080 cells	56
Figure 25. Effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from dried mackerel on GSH level in HT-1080 cells	58
Figure 26. Effect of solvent fractions from dried mackerel on GSH level in HT-1080 cells	59
Figure 27. Effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts and solvent fractions from dried mackerel on production of nitric oxide (NO)	62
Figure 28. Inhibitory effect of rfc 1 - 7 from dried mackerel on the growth of HT-29 human colon cancer cells	64
Figure 29. Inhibitory effect of rfc 2 - 6 from dried mackerel on the growth of HT-29 human colon cancer cells	65

# Chemical Components and Biological Activities of Dried Mackerel

Joo Ri Jang

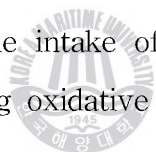
*Department of Marine Bioscience and Environment, Graduate School  
of Korea Maritime University, Busan, 606-791, Korea*

(Advisor : Prof. Sun-Young Lim)

## Abstract

This study investigated chemical components and biological activities (anticancer and antioxidant effects) of mackerel dried by low temperature vacuum method. In order to determine the inhibitory effects of solvent extracts from dried mackerel on growth of cancer cell lines (AGS human gastric adenocarcinoma, HT-29 human colon cancer and HT-1080 human fibrosarcoma cells), MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay was conducted. Inhibitory effects of acetone with methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts on the growth of AGS, HT-29 and HT-1080 cancer cells increased in a dose dependent manner ( $p < 0.05$ ). The treatments of *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-butanol and water fractions significantly inhibited the growth of cancer cells ( $p < 0.05$ ). Among the fractions, 85% aq. MeOH fraction showed a higher inhibitory effect on growth of cancer cell

lines. DCHF-DA (dichlorodihydrofluorescein diacetate) assay was conducted to determine the protective effect of dried mackerel on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress. Levels of intracellular reactive oxygen species (ROS) were measured in a cellular system using HT-1080 cell line. All fractions including crude extracts of dried mackerel significantly reduced the production of ROS in a dose-dependent manner ( $p < 0.05$ ). Among the fractions, 85% aq. MeOH fractions showed the highest protective effect on production of lipid peroxides. In addition, *n*-Hexane and 85% aq. MeOH fractions from dried mackerel increased levels of intracellular glutathione (GSH) in a dose dependent manner. In case of nitric oxide (NO) reduction assay, A+M extract, *n*-hexane and 85% aq. MeOH fractions reduced NO production by 38%. In conclusion, these results suggest that 85% aq. MeOH fractions may be developed as a candidate for potential antioxidant related to oxidative stress, and that the intake of mackerel may be recommended as a valuable food for preventing oxidative stress and reducing cancer risk.



# 1. 서론

고등어(*Scomber japonicus*)는 농어목 고등어과에 속하는 해산어류로 n-3계열 지방산인 DHA (docosahexaenoic acid, 22:6n-3)와 EPA (eicosapentaenoic acid, 20:5n-3)같은 다가불포화지방산(polyunsaturated fatty acid, PUFA)을 많이 함유하고 있을 뿐만 아니라 단백질, 지방, 칼슘, 인, 나트륨, 칼륨 등의 영양소들도 함유하고 있다. 특히, 어류의 근육은 EPA와 DHA같은 n-3계열 다가불포화지방산을 많이 함유하고 있으며[1], 고등어와 같은 회유어종의 근육에서는 비회유어종보다 DHA 함량이 높게 나타난다[2,3]. 육상동물의 유지에 비해 많이 함유된 n-3계열 지방산은 혈청 지질개선 효과가 있는 것으로 보고되어 있으며 [4], 이 외에도 혈소판 응집억제[5,6], 혈압감소[7,8], 동맥경화 감소[5], 혈액 중 콜레스테롤 농도의 저하[9,10,11] 및 중성지방 저하작용[9,12,13] 등의 생리효과가 있다고 보고되어 인간의 건강과 질병에 중요한 역할을 하고 있다. 따라서 현재 EPA 및 DHA를 비롯한 n-3계열 다가불포화지방산을 함유한 건강기능식품이 개발, 시판되고 있다. EPA는 DHA와 같이 안구 뒤쪽에 위치한 망막세포와 기억력을 관장하는 대뇌 해마세포의 주성분으로서, 인체기능에 꼭 필요한 영양소일 뿐 아니라 혈전 형성을 막아 동맥경화, 뇌졸중 등을 예방해주어 순환계를 건강하게 유지시키는데 중요한 역할을 하는 지방산으로써, 심장보호 및 기능 활성화와 중성지질과 LDL-콜레스테롤 수치를 낮추는데 효과가 있다[6,9]. DHA는 분자구조상 세포막을 유동적으로 만들어 혈액을 흐르기 좋은 형태로 만들어주고, 동시에 LDL-콜레스테롤을 제거해 동맥경화를 예방함으로써 혈압을 낮추는 효과가 있으며, 특히 학습과 기억 등의 지능과 사고력을 담당하는 뇌세포와 망막 등의 신경조직에 높은 농도로 존재하는 것을 미루어 보아(20~25%), 이들 장기에서 n-3계열의 다가불포화지방산은 신경세포막을 구성하는 중요한 물질로써 신경세포들 간의 신경 전달에 필수적인 역할을 담당하는 것으로 보고되었다[14,15,16]. 게다가 영장류와 신생아에게는 DHA가 망막과 뇌의

정상적인 기능 발달에 필수적이다[17]. 또한 DHA는 실험동물의 기억 학습능력을 비롯한 뇌 기능 향상에 기여하며[18,19,20], 뇌신경을 활성화해 머리를 좋게 하고 치매 예방에 효과가 있으며 시력도 좋게 한다고 알려져 있다[21,22,23]. 뇌 조직은 다른 조직들에 비해 지방의 함량이 높으며 특히 DHA와 같은 다가불포화지방산의 함량이 높다. 따라서 뇌 내의 DHA 함량 감소는 뇌 기능 유지 및 항상성에 영향을 끼치므로 적절한 DHA 함량의 유지가 매우 중요하다. 최근까지 선행된 많은 연구에서 뇌 내의 DHA 함량 감소는 뇌 내의 DPA<sub>n</sub>-6 (docosapentaenoic acid, 22:5<sub>n</sub>-6)의 함량을 증가시키고 이러한 뇌의 지방산 조성의 변화는 기억학습능력 저하[24,25,26] 및 우울증 발병 빈도의 증가[27]와 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되었다.

암 발생과 가장 밀접한 관련을 갖는 식이 인자는 지방이며[28] 지방은 섭취량뿐만 아니라 지방에 함유된 지방산의 종류에 따라서 암의 발생에 미치는 영향이 다르다는 사실이 밝혀지고 있다[29,30]. 일반적으로 n-3계열 지방산은 3계열의 프로스타글란딘(PG)을 합성하고, n-6계열 지방산에 의한 PGE<sub>2</sub>의 생성을 감소시켜 항암작용과 항병원성에 좋은 효과가 있다고 보고된다[31]. 또한, 세포막의 지질 성분을 변화시켜 생체막의 유동성을 변화시키고, 막부착 protein kinase C (PKC)의 활성도에 영향을 미쳐 세포의 비정상적인 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다[31]. 이밖에도 n-3계열 불포화지방산은 n-6계열 불포화지방산에 비하여 대장암세포 증식을 억제하는 효과가 우수하며[32], 간암세포 증식도 억제하였음이 보고되었다[33].

유해산소로 알려져 있는 활성산소종(reactive oxygen species)은 산소 라디칼 및 이것으로부터 파생된 여러 가지 산소화합물을 통칭하는 것으로서 생체 내에서 산소는 그 화학적 성질로 인하여 환원되어 유리 라디칼(free radical)인 superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydroxyl radical (·OH)과 같은 oxygen radical 뿐만 아니라 hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)과 같은 몇 종류의 non-radical, 그리고 그 외에 피부에 이차적으로 생성된 것(ROO·, RO·, NO·, HOCl 등)을 말한다. 하지만 생체에는 계속해서 생기는 이러한 활



성산소종들을 제거하는 항산화 효소(superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase)와 비효소적 항산화제(tocopherol, ascorbic acid, carotenoid, flavonoid, glutathione)들로 구성된 항산화 방어망을 통해 활성산소종의 생성과 제거 사이에서 세포 기능을 유지하고 있다. 활성산소종이 너무 많이 생성되거나 항산화 시스템의 기능이 저하되는 상황에서 세포는 활성산소종에 의해 유해 작용을 받는데 이를 산화적 스트레스(oxidative stress)라고 한다. 결과적으로 계속된 산화적 스트레스는 생체 내에 가해져 노화나 암 등의 여러 가지 성인병의 원인이 되고 있다[34]. 항산화 물질은 지방 및 지방을 함유한 식품의 산화를 억제해 줄 뿐만 아니라 생체 내에서 생성되는 활성산소 및 활성산소에 의해 유도되는 지질 과산화 반응을 억제하는 생리활성 물질로써 크게 각광을 받고 있다[35,36]. N-3계열 다가불포화지방산은 구조상 이중결합이 많아 체내 외에서 쉽게 산화된다는 단점이 있기 때문에 지질 산화의 중요한 요인인 광선, 중금속, 수분 차단과 항산화제 첨가 등의 방법으로 산화를 방지한다. 하지만 고등어는 이런 산화를 막는 천연 항산화제인 비타민 E를 함유하고 있어 자동산화의 용이성을 감소시킬 수가 있다[37]. 지질의 산화는 식품에 있어서 색, 향미 및 품질저하의 요인일 뿐 아니라 산화에 의하여 생성되는 과산화물은 그 자체가 발암성과 관련된 돌연변이원성을 나타낸다고 알려져 있다[38]. 또한 지질산화에 의하여 저분자의 carbonyl 화합물뿐만 아니라 각종 활성 라디칼이 생성되는 것으로 알려져 있는데[39], 이들 활성 라디칼은 생체 내에서도 생성되어 단백질이나 DNA 등의 생체성분에 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 이처럼 식품 및 생체 내에서의 지질산화는 식품의 안전성을 비롯하여 노화나 성인병의 측면에서 중요한 의미를 지니기 때문에 지질의 산화기구는 물론 이러한 지질의 산화를 억제하기 위한 항산화 물질의 검색 및 그 항산화 기구에 많은 관심이 모아지고 있다.

고등어는 현재 냉장 형태로 많이 소비되고 있으며, 가공 식품의 발달을 위해 새로운 가공 형태 개발이 필요하다. 건조는 식품을 보존하는 수단으로 오랫동안 사용되어져 왔으며, 열풍건조, 진공건조, 동결건조방법 등이 이용되고 있다.

동결건조는 지금까지 개발된 건조방법 중 첨단 건조방법의 하나로 물질을 동결시키고 수증기의 부분압을 낮춤으로서 얼음을 직접 증기로 만드는 승화에 의해 건조시키는 방법을 말한다. 동결건조는 열에 민감한 물질의 손상을 최소화하고 비활성화 하지만 다른 건조방법에 비해 장비의 가격이 비싸고 에너지의 비용이 높다. 또한 보통 24시간 이상 건조 주기를 거치면서 건조되기 때문에 다른 건조방법보다 공정시간이 길다. 열풍건조는 열풍이 순환되므로 송풍이 필요하게 되고 순환되면서 증발된 수분에 의해 습도가 높아져 열풍을 배기해야 하므로 다량의 습한 열에너지가 밖으로 버려지게 되어 건조 장치에서 좋은 열효율을 기대할 수 없는 단점이 있다. 본 실험에 이용된 저온진공건조기술은 건조과정 중 산소가 거의 차단되어 건조과정 중에 일어날 수 있는 부패와 변질을 방지할 수 있을 뿐만 아니라 열풍건조기에 비하여 건조시간도 비교적 짧은 장점이 있다. 또한 재료의 수분함유량의 조절이 간편하고, 재료의 건조온도가 비교적 낮아 재료의 열에 의한 변성이 적으며 에너지 비용 절약이라는 측면에서도 동결 건조 및 열풍건조와 비교했을 때 결과적으로 생산단가를 1/3 ~ 1/4 정도로 낮출 수 있다. 따라서 건조 품질의 향상과 다양한 응용식품의 개발이 가능하다 [40,41].

이에 따라 본 연구에서는 고등어를 실험 재료로 선택하여 기존의 열풍건조기계의 단점인 높은 온도에 의한 영양소 손실을 막기 위하여 저온진공건조기를 도입하여 고등어를 건조하여 실험에 사용하였다. 건조된 고등어는 화학성분 분석 후, 용매의 극성에 따라 추출하여 이들 고등어 추출물과 분획물들에 의한 암세포 증식 억제 및 항산화 효과에 대해 검토하고, 이들 효과를 나타내는 유용성분을 분리하여 알아보고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2-1. 재료

실험에 사용된 고등어(*Scomber japonicus*)(Fig. 1)는 2006년 12월 남해안에서 잡힌 것을 구입하였다. 어체의 중량(540 g)이 비슷한 고등어를 신선한 상태에서 머리와 꼬리, 내장을 제거한 후 뼈를 중심으로 반으로 나누어 5mm 두께로 3등분으로 포를 떼으며 저온진공건조기(STVD-50, Sanya, Korea)를 이용하여 40℃에서 40 torr의 압력으로 30시간 건조하였다. 건조된 고등어는 분말화하여 실험 사용 전까지 -75℃ deep freezer (NF-400SF, NIHON FREEZER, Japan)에 냉동 보관하였다.



Fig. 1. Photograph of *Scomber japonicus*.

## 2-2. 시약

일반성분 및 무기질 분석, 추출 및 분획, column chromatography에 사용한 모든 용매는 1급 시약을 구입하여 사용하였다. 총 콜레스테롤 함량에 사용한 kit 시약은 신양화학약품주식회사(Korea)에서 구입하였고, TLC plate 분석에 사용한 spray reagent는 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NMR 측정에는 CD<sub>3</sub>OD (deuterium degree 99.95%, Merck, Germany)를 사용하였다. 세포 배양에 사용된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), RPMI 1640 (Rosewell Park Memorial Institute 1640), FBS (fetal bovine serum)은 Hyclone사(USA), MEM (Modified Eagle Medium, 2X), 0.05% Trypsin-0.02% EDTA, 100 units/ml Penicillin-Streptomycin은 GIBCO사(USA)로부터 구입하였다. MTT assay를 위한 kit (MTT cell proliferation Assay)는 R&D systems (USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 항산화 활성 실험에 사용된 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH)은 Sigma사(USA), ROS 측정에 사용된 DCFH-DA는 Molecular Probes사(USA), GSH 측정에 사용된 mBBr (monobromobimane), NO 측정에 사용된 LPS (Lipopolysaccharide)와 Griess 시약인 sulfanilamide, HCl, NED는 Sigma사(USA)에서 구입하였다. 지방산 분석에 사용한 표준용액은 NU-CHEK-PREP사(USA)의 462 standard를 사용하였다.

## 2-3. 기기

일반성분 및 무기질 분석을 위해 high performance liquid chromatography (HPLC)(P580, Dionex, USA), 추출 및 분획을 위해 rotary evaporator (N-1000, EYELA, JAPAN)를 사용하였고, 화합물의 분리를 위해 사용한 TLC plate는 silica gel 60 F<sub>254</sub>, 0.5mm (Merck, Germany), column packing materials은 RP 18 (YMC-GEL ODS-A, 12 nm, S-75 $\mu$ m), <sup>1</sup>H-NMR 실험은 VARIAN NMR

300 spectrometer를 사용하였다. 지방산 분석은 gas chromatography (GC)(CP-3380, VARIAN, USA)를 사용하였으며, column은 silica capillary column (60 m × 0.32 mm inner diameter × 0.10 µm film thickness)(CP-7856, VARIAN, USA)이다. 흡광도는 UV-visible spectrophotometer (helios beta, thermo electron corporation, USA), microplate reader (VICTOR3, Perkin Elmer, USA)를 사용하여 측정하였다.

#### 2-4. 일반성분 및 무기질 측정

건조 고등어의 일반성분인 수분, 조단백질, 조지방, 조회분 및 무기질은 AOAC 방법[42]에 따라 분석하였다. 즉, 수분은 상압가열건조법(105°C 건조법), 조단백은 Kjeldahl 질소정량법, 조지방은 Soxhlet 추출법, 조회분은 550°C 회화로에서 회화시키는 직접회화법으로 정량하였으며, 비타민 D 및 콜린은 HPLC, 갈슘은 과망간산칼륨 적정법, 콜레스테롤은 표준 효소법에 의한 kit 시약을 사용하여 분석하였다.

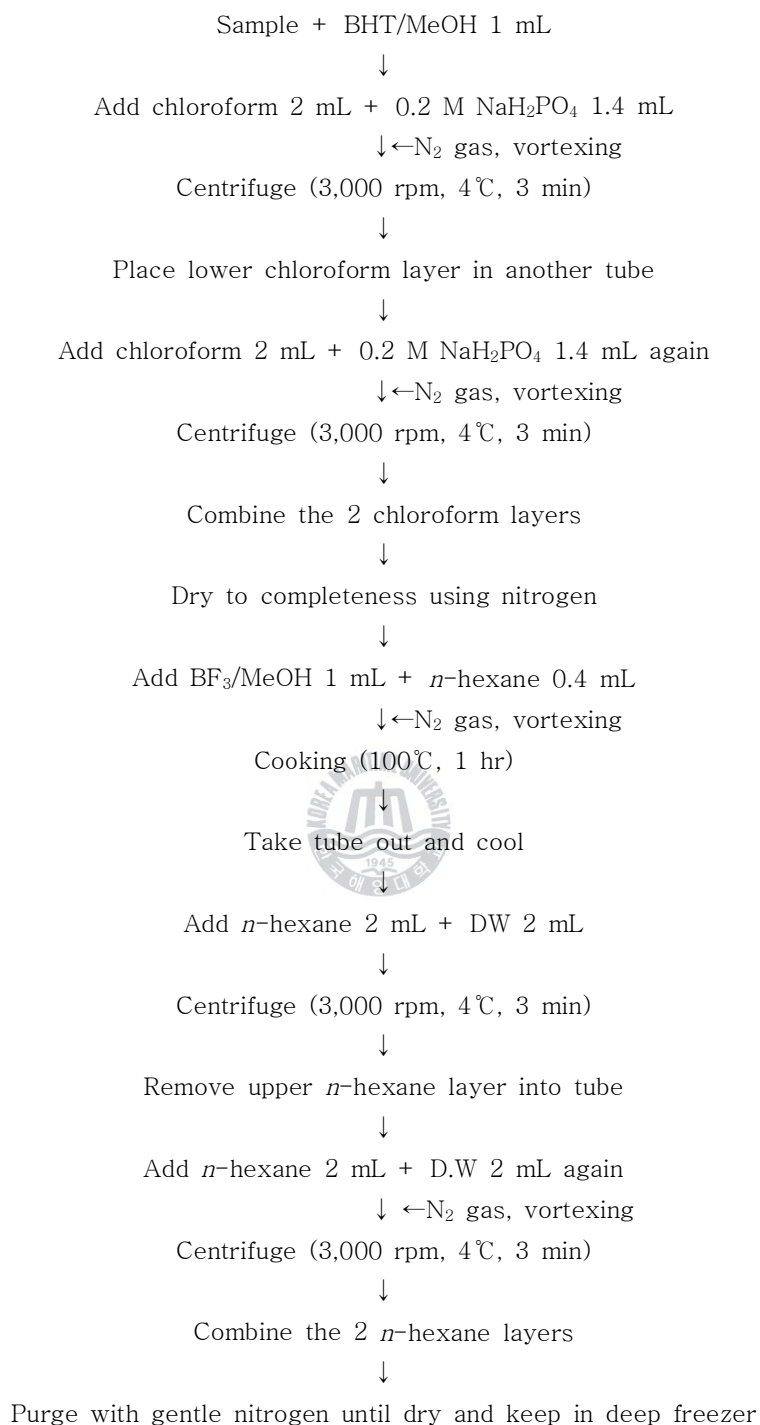


#### 2-5. 지질 및 지방산 추출

지방산 추출은 Folch 등의 방법[43]을 변형하여 실시하였으며 간단히 요약하면 다음과 같다. 조직을 butyl hydroxy toluene (BHT)을 함께 함유한 methanol로 교반하여 균질화하였다. 균질물을 1 mL 취한 후 chloroform 2 mL와 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.4 mL를 넣고 교반하여 4°C, 3,000 rpm에서 3분간 원심분리 후 지질층을 얻었다. 이와 같은 방법을 한 번 더 진행한 뒤 질소가스를 이용하여 지질층의 유기용매를 완전히 날린 다음 지질을 얻었다. Morrison과 Smith의 방법[44]에 따라 추출된 지질에 methylation용 시약인 boron trifluoride (BF<sub>3</sub>) methanol 1 mL와 *n*-hexane 0.4 mL를 가한 후 1시간 동안

100℃에서 가열하였다. 1시간 후 실온까지 충분히 냉각시킨 다음 *n*-hexane 2 mL와 증류수 2 mL를 가한 후 다시 4℃, 3,000 rpm에서 3분간 원심분리 후 상등액을 얻었다(Fig. 4). 이 상등액에서 질소가스를 이용하여 유기용매를 날린 후 얻은 지방산은 지방산 분석 전 까지 -75℃ deep freezer (NF-400SF, NIHON FREEZER, Japan)에 보관하였다(Fig. 2).





**Fig. 2. Procedure of extracts of lipids and fatty acids.**

## 2-6. Gas chromatography를 이용한 지방산 분석

생 고등어와 건조 고등어에서 분리된 지방산을 1  $\mu$ L 취하여 지방산 분석용 gas chromatography에 주입하여 지방산을 분석하였다[45]. 지방산 분석에 사용한 표준용액은 미국 NU-CHEK-PREP사의 462 standard였으며, 이용된 column은 silica capillary column (CP-7856, 60 m  $\times$  0.32 mm inner diameter  $\times$  0.10  $\mu$ m film thickness)이다. 기기의 분석조건은 injector 250 $^{\circ}$ C, detector (FID) 250 $^{\circ}$ C, oven (initial 130 $^{\circ}$ C, 분당 증가율은 175 $^{\circ}$ C까지 4 $^{\circ}$ C/min, 210 $^{\circ}$ C까지 1 $^{\circ}$ C/min, 245 $^{\circ}$ C까지 30 $^{\circ}$ C/min), carrier gas는 헬륨을 사용하였다. 지방산 분석은 표준용액의 retention time시간과 비교하여 정성하였고, 내부 표준물질 (22:3n-3 methyl ester)을 이용하여 총 지방산을 정량하였으며 개개의 지방산들은 전체 peak area의 퍼센트로 산출하였다.

## 2-7. 추출, 분획 및 분리



### (1) 추출 및 분획

건조 고등어는 유기용매 추출을 위하여 acetone과 methylene chloride를 1:1 비율로 혼합하여 시료가 충분히 잠기도록 하여 24시간 방치한 후 추출하였다. 이 과정을 2회 반복하여 얻은 추출액은 40 $^{\circ}$ C 수욕 상에서 rotary evaporator (N-1000, EYELA, Japan)로 농축하여 acetone/methylene chloride 추출물(A+M)을 얻었다. 남은 잔사에 동량의 methanol을 부어 위와 동일한 방법으로 2회 반복한 후 농축하여 methanol 추출물(MeOH)을 얻었다. 두 추출물을 합한 조추출물은 용매 극성에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-butanol (*n*-BuOH), water 분획물을 얻었다(Fig. 3). 세포 실험에는 각각의 추출물들을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 배지로 필요한 농도로 희석하



여 사용하였다. 세포배양에 사용된 DMSO의 최종농도는 0.1%이하가 되도록 하였다.



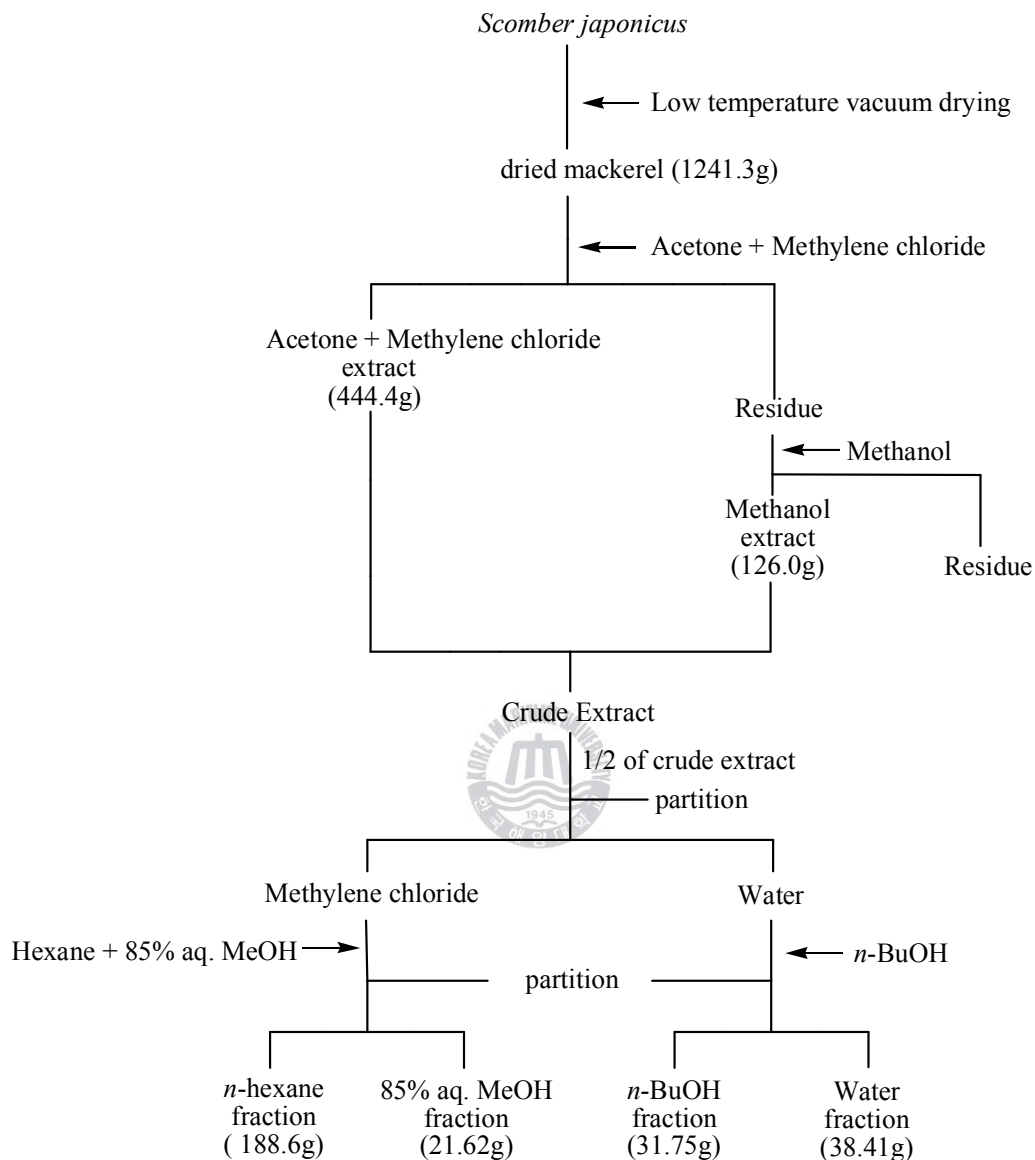


Fig. 3. Preparation of crude extraction and solvent fractions from dried mackerel.

## (2) 고등어의 활성 성분 분리

건조 고등어의 85% aq. MeOH 분획에 대해 MeOH와 water의 혼합용매를 사용하여 RP flash column chromatography를 실시하였으며(Fig. 4), 50% (rfc 1), 60% (rfc 2), 70% (rfc 3), 80% (rfc 4), 90% aq. MeOH (rfc 5), 100% MeOH (rfc 6), 100% EtOAc (rfc 7) 용매 분획을 얻었다. 얻어진 각각의 분획을  $^1\text{H}$  NMR 분광분석 자료와 MTT assay, 시료의 양을 고려하여 rfc 6 분획물에 대해 silica gel column chromatography를 실시하여 100%  $\text{CHCl}_3$  (nfc 1), 5% MeOH:95%  $\text{CHCl}_3$  (nfc 2), 10% MeOH:90%  $\text{CHCl}_3$  (nfc 3), 20% MeOH:80%  $\text{CHCl}_3$  (nfc 4), 30% MeOH:70%  $\text{CHCl}_3$  (nfc 5), 40% MeOH:60%  $\text{CHCl}_3$  (nfc 6), 50% MeOH:50%  $\text{CHCl}_3$  (nfc 7), 70% MeOH:30%  $\text{CHCl}_3$  (nfc 8), 100% MeOH (nfc 9), 90% aq. MeOH (nfc 10) 용매 분획을 얻었으며, 얻어진 각각의 분획물을  $^1\text{H}$  NMR 분광분석 자료와 시료의 양을 고려하여 nfc 2 분획물에 대해 지방산을 추출하여 gas chromatography를 실시하였다.



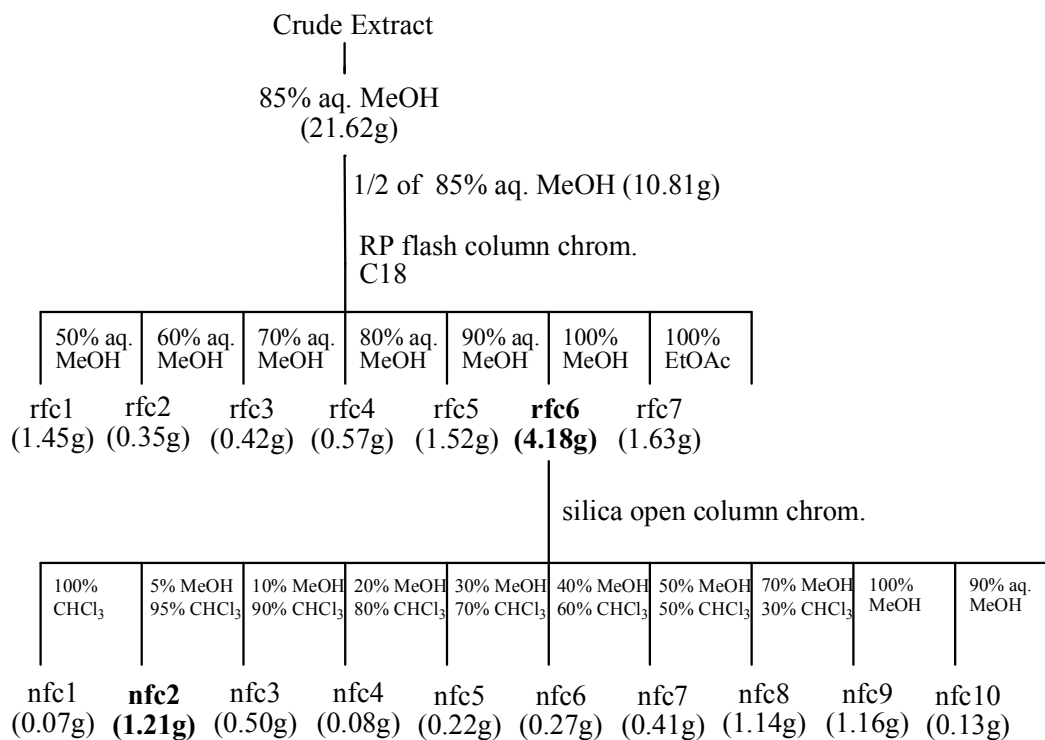


Fig. 4. Separation scheme of dried mackerel.

## 2-8. 생리활성 측정

### (1) 항암 효과

#### ① 세포 배양

한국 세포주 은행(서울의대)으로부터 인체 위암세포(AGS), 인체 결장암세포 HT-29)와 인체 섬유육종세포(HT-1080)를 분양받아 본 실험실에서 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. AGS와 HT-29 세포는 10% FBS와 100 units/mL의 penicillin-streptomycin이 함유된 RPMI 1640 배지, HT-1080 세포는 10% FBS와 100 units/mL의 penicillin-streptomycin이 함유된 DMEM 배지로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였으며 배양 중인 세포를 일주일마다 2-3번 새로운 배지로 바꿔주었다. 일주일 후 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척한 뒤 0.05% trypsin-0.02% EDTA (GIBCO, USA)로 부착된 세포를 분리하여 원심분리 한 후 집적된 암세포에 배지를 넣고 피펫으로 암세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 75 mm<sup>3</sup> cell culture flask에 10 mL씩 일정한 수로 분할하여 주입하고 계속 6~7일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

#### ② MTT assay

MTT assay를 이용하여 건조고등어가 암세포 억제에 미치는 영향을 살펴보았다. MTT assay는 세포의 증식과 세포의 살아있는 정도를 간접적으로 측정하는 것으로서 항암제의 감수성에 대한 1차 선별검사의 목적으로 많이 사용된다. 대사과정이 온전한 암세포의 경우 미토콘드리아의 탈수소 효소 작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium

bromide] 결정으로 환원시킨다(Fig. 5). 생성된 MTT formazan의 흡광도는 540 nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아 있고 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영한다. 따라서 각 well에 존재하는 세포 생존 수와 비례한다. 배양된 암세포는 96 well cell culture plate에  $5 \times 10^4$  cells/mL이 되도록 100  $\mu$ L씩 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양한 후 배지를 제거한 뒤 각 시료를 배지로 희석하여 각 well당 시료를 100  $\mu$ L씩 첨가하고, 대조군에는 시료 대신 PBS를 100  $\mu$ L씩 첨가하였다. 이 plate를 다시 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 배양 후 MTT assay를 위하여 MTT 시약 5 mg을 1 mL PBS로 녹인 후, 10% FBS가 함유된 배지 9 mL와 희석하여 각 well에 100  $\mu$ L를 첨가하고 3~4시간 동안 더 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 배양종료 후 생성된 formazan 결정을 가라앉힌 후 각 well에 형성된 결정이 흐트러지지 않도록 주의하면서 반응 후 남은 MTT 처리 배지를 제거하였다. 배지가 제거된 각 well에 formazan 결정을 용해시키기 위하여 DMSO를 100  $\mu$ L씩 분주하여 5~10분간 반응시켜 microplate reader (VICTOR3, Perkin Elmer, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다[46].

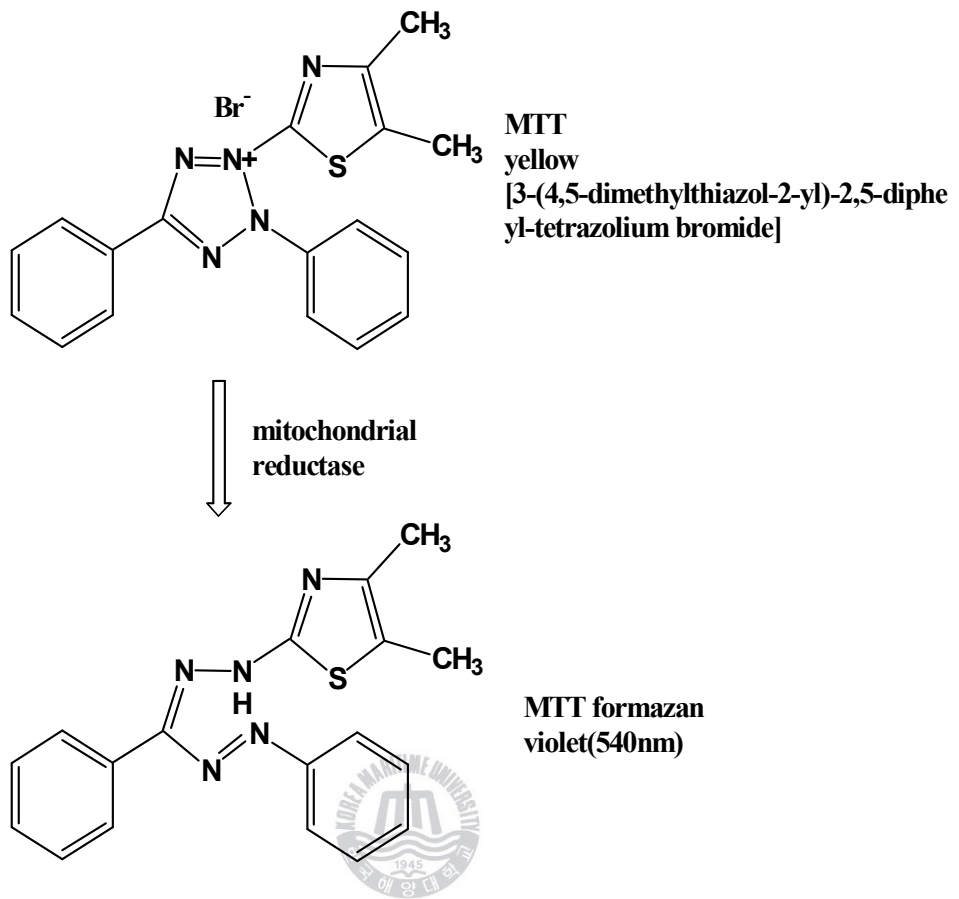


Fig. 5. Metabolization of MTT to a MTT formazan by viable cells.

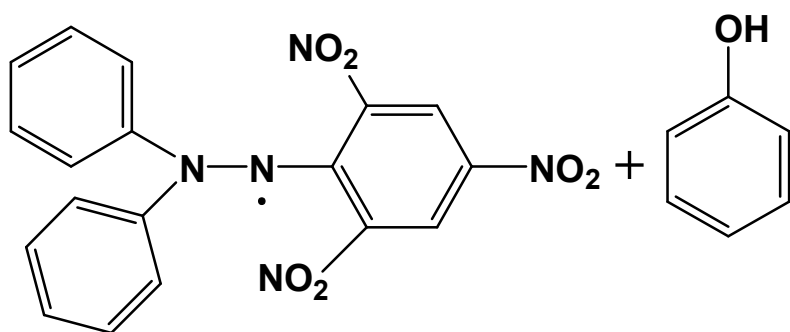
## (2) 항산화 효과

### ① DPPH 라디칼 소거 활성

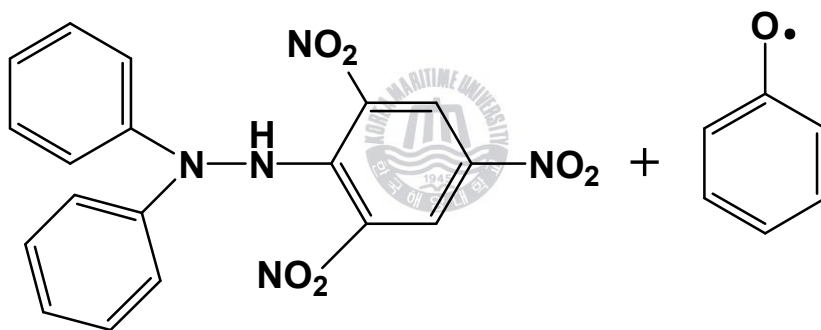
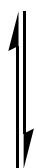
DPPH 라디칼 소거 활성은 광범위하게 쓰이는 간단한 항산화 검색법으로 페놀(phenol)과 방향족 아민화합물(aromatic amines)의 항산화 활성 측정에 많이 사용된다[47]. 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH)는 화학적으로 안정한 유리 라디칼을 가지는 수용성 물질로써 진한 보라색을 띠며, 518 nm에서 특이적인 흡수 띠를 가진다. DPPH에 있는 라디칼이 페놀과 같은 수소나 전자를 제공해주는 전자 공여체와 반응하여 안정한 분자 diphenylpicrylhydrazine이 되면 본연의 보라색을 잃고 노란색을 띠게 되면서, 518 nm에서 강하게 보이는 흡수 띠가 사라지게 된다(Fig. 6). 반응에 비례하여 색이 변화하고 흡광도도 감소하게 되므로, 흡광도의 감소를 측정함으로써 라디칼 소거 활성을 알 수 있다. 먼저 각 농도별 시료를 MeOH에 녹여 준비한다. DPPH 시약 2 mg을 정확히 칭량하여 ethanol (EtOH) 15 mL에 녹여 DPPH 원액을 만든다. 원액 1200  $\mu$ L에 DMSO 500  $\mu$ L와 EtOH를 3000  $\mu$ L를 혼합하여 DPPH 희석액을 준비한다. 준비된 DPPH 희석액은 cuvette에 넣고 흡광도를 측정하여 흡광도가 0.94~0.97이 되도록 맞춘다. 준비한 시료 100  $\mu$ L와 DPPH 희석액 900  $\mu$ L를 섞은 후 10분 후 UV-visible spectrophotometer (helios beta, thermo electron corporation, USA)로 518 nm에서 측정한다. 시료를 첨가하지 않은 blank군과 비교하여 유리 라디칼 소거 활성을 백분율로 나타내었다.

$$\text{EDA (electron donating ability) (\%)} = \frac{\text{대조군 흡광도} - \text{실험군 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$





**DPPH • (Violet, 518 nm)**



**Diphenylpicrylhydrazine  
(yellow)**

**Phenoxy  
radical**

Fig. 6. Scavenging of the DPPH radical by phenol.

### (3) 세포수준의 항산화 효과

#### ① 세포 배양

한국 세포주 은행(서울의대)으로부터 인체 섬유육종세포(HT-1080)와 마우스 대식세포(Raw 264.7)를 분양받아 본 실험실에서 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. HT-1080 세포와 Raw 264.7 세포는 10% FBS와 100 units/mL의 penicillin-streptomycin이 함유된 DMEM 배지로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였으며 배양 중인 세포를 일주일에 2-3번 새로운 배지로 바꿔주었다. 일주일 후 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척한 뒤 0.05% trypsin-0.02% EDTA (GIBCO, USA)로 부착된 세포를 분리하여 원심분리 한 후 집적된 암세포에 배지를 넣고 피펫으로 암세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 75 mm<sup>3</sup> cell culture flask에 10 mL씩 일정한 수로 분할하여 주입하고 계속 6~7일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.



#### ② 세포 내 활성산소종(Reactive oxygen species) 측정

세포 내 활성산소종은 DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) assay로 측정하였다[48, 49]. DCFH-DA (Sigma, USA)는 세포 내 활성산소종과 반응하여 형광물질(dichlorofluorescein, DCF)을 만들어 내는 것으로 이 시약을 세포 속에 넣어 발생하는 형광을 측정함으로써 세포 내의 활성산소종을 측정할 수 있다(Fig. 7). 세포를 96 well cell culture plate에 분주한 후 24시간 배양하고, PBS로 씻은 후 20 μM DCFH-DA를 각 well에 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 20분간 pre-incubation하였다. 각 well에 시료를 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 1시간 배양한 후, DCFH-DA를 없애고 세포는 다시 PBS로 씻은 후 500 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 시간별로 DCF fluorescence를 excitation 488 nm, emission 530 nm에서 microplate reader (VICTOR3, Perkin

Elmer, USA)로 측정하였다. 대조군들(blank군과 control군)은 시료 대신 PBS를 처리하며, control군은 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 처리를 하고, blank군은 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  대신 PBS를 처리하여 측정하였다.



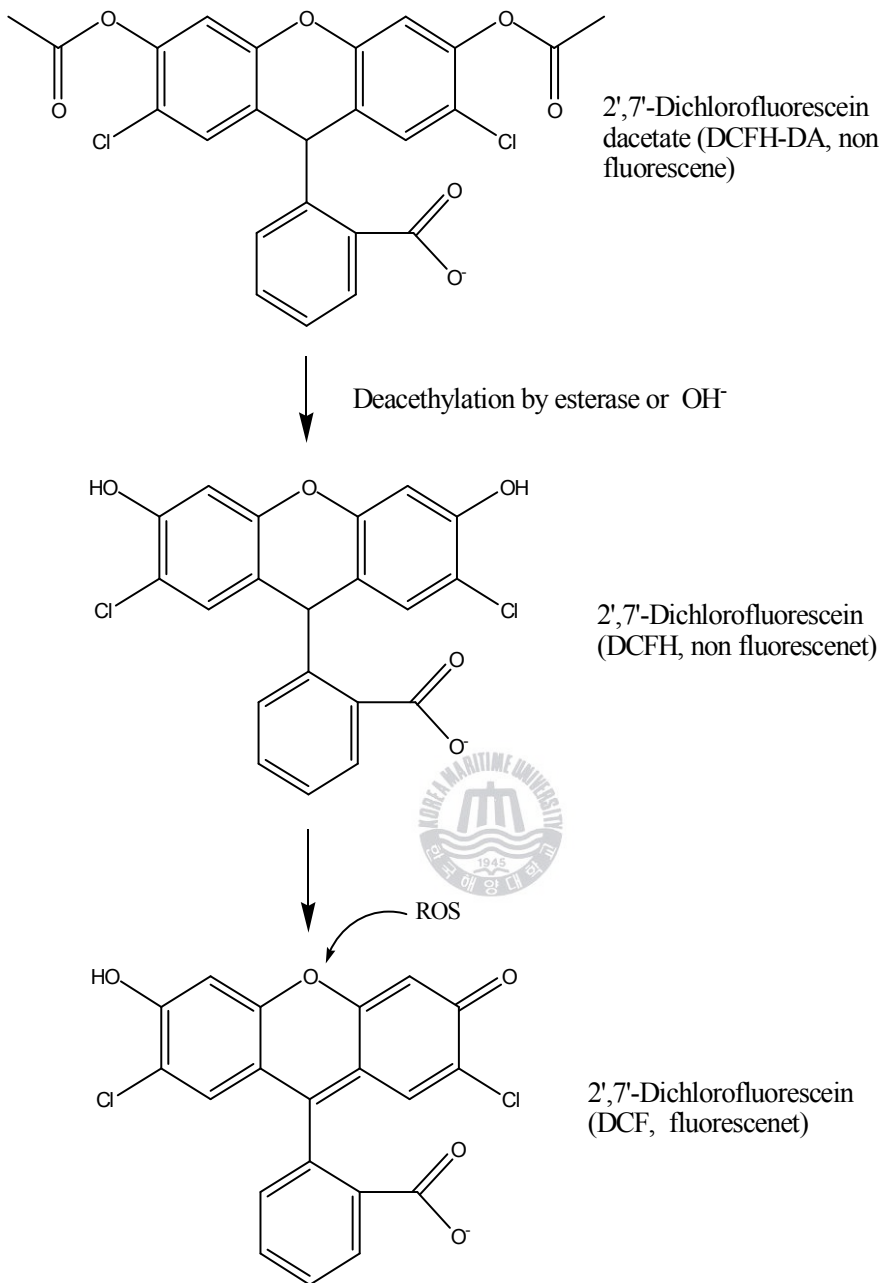


Fig. 7. Degradation pathway of DCFH-DA in an oxidation-induced cellular system.

### ③ 세포 내 GSH (Glutathione) 함량 측정

세포내에 축적된 GSH 함량은 thiol-staining reagent인 mBBr (monobromobimane)을 이용하여 측정하였다[50]. 세포는 96 well cell culture plate에 well 당  $5 \times 10^4$  cells/mL가 되도록 분주하여 24시간 배양한 후, 각 well에 농도별로 시료를 처리하여 다시 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 30분간 배양하였다. 다시 각 well은 PBS 완충액으로 씻은 후 40 µM mBBr을 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 30분간 반응시킨 후 시료처리에 의한 GSH 함량의 변화를 시간별로 excitation 360 nm, emission 465 nm에서 microplate reader (VICTOR3, Perkin Elmer, USA)로 측정하였다.

### ④ 세포 내 NO (Nitric oxide) 생성 측정

NO reduction assay는 대식세포의 중요한 기능 중의 하나인 phagocytosis와 관련된 간접적인 활성측정의 한 방법으로 대식세포가 그 활동을 얼마나 활발하게 하고 있는지를 알아보는 방법이다[51]. 반응원리는 1-Naphthylenediamine, sulfanilamide 그리고 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>가 반응하여 Azo coupling을 이루는데 이 두 개의 고리 행태가 570nm의 파장에서 최대의 흡광도 값을 나타내며 이 값을 측정하여 간접적으로 NO의 생성량을 정량하는 것이다. Raw 264.7 세포를 96 well cell culture plate에 well 당  $5 \times 10^4$  cells/mL가 되도록 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 10% FBS가 함유된 MEM 배지로 교체한 후 준비된 시료를 1시간 동안 전처리하고, NO 생성을 유도하기 위해 LPS (1µg/mL = 1ppm)를 처리한 후, 48시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 이 후 생성된 NO의 양은 Griess 시약(0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine : 1% sulfanilamide = 1:1)을 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다. sodium nitrate를 사용하여 측정된 흡광도로 표준곡선을 작성하여 NO의 농도별 흡광도를 얻었으며, 표준곡선을 실험결과에 적용하여

생성된 NO의 함량을 정량하였다.

## 2-9. 통계 처리

실험결과는 각 항목에 따라 Mean  $\pm$  SEM (Standard Error of Mean)으로 나타내었고, 분석된 실험 결과는 대조군과 비교를 위하여 statistica program을 이용하여  $P < 0.05$  수준에서  $t$ -test로 유의성을 검증하였다.



### 3. 결과 및 고찰

#### 3-1. 일반성분 및 무기질 함량

건조 고등어의 일반성분을 생것과 비교했을 때 저온진공건조된 고등어 분말의 수분함량은 2.7%로 생 고등어의 수분함량과 비교했을 때 95% 정도 감소되었다(Table 1). 수분함량의 감소에 따라 건조 고등어의 조단백질, 조지방 및 조회분의 경우 각각 32.5, 64.2, 2.1%로 생 고등어보다 높게 나타났다. 비타민 D 함량의 경우, 생 고등어는 발견되지 않았으며, 건조 고등어의 경우 0.02 mg/100 g을 나타내었다. 칼슘, 콜린, 콜레스테롤, 총 칼로리에서는 건조 고등어가 0.05%, 0.88%, 128 mg/100g, 7927.38 cal/g을 나타내었으며, 함량 비율이 상대적으로 건조 고등어에서 증가하였음을 알 수 있었다.

**Table 1. Chemical composition of dried mackerel.**

	Raw mackerel	Dried mackerel
Moisture (%)	58.2 ± 0.03 <sup>1)</sup>	2.7 ± 0.19
Crude protein (%)	17.4 ± 0.13	32.5 ± 0.10
Crude fat (%)	22.9 ± 0.36	64.2 ± 0.25
Crude ash (%)	1.2 ± 0.05	2.1 ± 0.14
Vitamin D (mg/100 g)	-	0.02 ± 0.001
Calcium (%)	0.03 ± 0.00	0.05 ± 0.00
Choline (%)	0.03 ± 0.001	0.88 ± 0.03
Cholesterol (mg/100 g)	54	128
Total calorie (cal/g)	3303.88	7927.38

<sup>1)</sup>Values are Mean ± S.E.

### 3-2. Gas chromatography를 이용한 지방산 분석

고등어 지방산 분석 결과, 총 포화지방산은 건조 고등어에서 약 8% 낮게 나타났으며, 총 단일불포화지방산의 경우 건조 고등어에서 약 24% 낮게 나타났다(Table 2). 총 n-6계열 지방산은 건조 고등어의 경우 약 7% 높았고, 총 n-3계열 지방산은 건조 고등어에서 약 30% 높게 나타났다. n-6 계열 지방산 중에서 18:2n6, 22:2n-6 및 22:4n-6의 함량은 건조 고등어에서 각각 33%, 75%, 15% 낮게 나타났고, 18:3n-6, 20:2n-6, 20:3n-6 및 20:4n-6은 건조 고등어에서 각각 12%, 30%, 18%, 77% 높게 나타났다. EPA의 함량은 건조 고등어에서 약간 높았고, DHA의 함량은 건조 고등어에서 47% 더 높게 나타났다. 이상의 결과에서 저온진공건조방법으로 건조된 고등어의 경우 n-3계열 지방산들이 농축되어 있음을 알 수 있었다.





**Table 2. Comparison of fatty acid compositions between raw and dried mackerel.**

Fatty acids	Raw mackerel	Dried Mackerel
	Concentration (µg/mg)	
<b>Total Sat.<sup>1</sup></b>	<b>38.4</b>	<b>34.5</b>
<b>Total Mono.<sup>2</sup></b>	<b>30.2</b>	<b>22.4</b>
18:2n-6 (LA)	2.2	1.4
18:3n-6 (GLA)	0.1	0.1
20:2n-6	0.3	0.4
20:3n-6	0.1	0.1
20:4n-6 (AA)	1.6	2.8
22:2n-6	0.3	0.1
22:4n-6	0.3	0.4
<b>Total n-6</b>	<b>4.9</b>	<b>5.3</b>
18:3n-3 (LNA)	1.7	1.3
20:3n-3	0.3	0.2
20:5n-3 (EPA)	8.4	9.0
22:5n-3 (DPA)	2.0	1.7
22:6n-3 (DHA)	15.8	22.9
<b>Total n-3</b>	<b>28.2</b>	<b>35.1</b>

<sup>1</sup>Sat. means saturated fatty acids

<sup>2</sup>Mono. means monounsaturated fatty acids

### 3-3. 추출물 및 분획물의 생리활성

#### (1) 항암 효과

##### ① MTT assay

건조 고등어 추출물과 그 분획물들의 인체 암세포 증식 억제효과를 조사하기 위해 MTT assay를 행하였다. 실험에는 인체 위암세포(AGS), 인체 결장암세포(HT-29) 및 인체 섬유육종세포(HT-1080)가 사용되었으며, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 mg/mL의 농도로 실험하여 결과를 나타내었다. Fig. 8은 건조 고등어의 acetone/methylene chloride 추출물(A+M)과 methanol 추출물(MeOH)을 AGS 세포에 처리했을 때 인체 암세포 증식 억제효과를 나타낸 것이다. A+M 추출물과 MeOH 추출물은 둘 다 가장 낮은 농도인 0.01 mg/mL에서부터 농도 의존적으로 AGS 세포의 성장을 억제시켰다( $p < 0.05$ ). A+M 추출물의 경우, 1 mg/mL의 첨가농도에서 68%, 5 mg/mL 첨가농도에서 87%의 증식 억제효과를 보였으며, A+M 추출물의  $IC_{50}$  값은 0.69 mg/mL이었다(Table 3). MeOH 추출물을 처리한 경우에도 A+M 추출물과 유사하게 1 및 5 mg/mL 첨가농도에서 각각 55%, 93%의 암세포 증식 억제효과를 보였으며( $p < 0.05$ ), MeOH 추출물의  $IC_{50}$  값은 0.88 mg/mL이었다(Table 3). 건조 고등어 추출물을 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, water로 다시 추출하여 얻어진 각 분획물을 각 농도 별로 AGS 세포에 처리한 결과는 Fig. 9에 나타내었다. 각 분획물들은 5 mg/mL의 농도에서 가장 높은 암세포 증식 억제효과를 나타내었으며, 각각 93%, 94%, 90%, 84%의 높은 암세포 증식 억제효과( $p < 0.05$ )가 나타나 A+M 추출물 및 MeOH 추출물과 유사한 억제효과를 보였다. 이들 분획물들의  $IC_{50}$  값은 0.23, 0.21, 2.11 및 2.06 mg/mL이었다(Table 4). 특히, *n*-hexane과 85% aq. MeOH 분획물이 높은 암세포 증식 억제효과를 나타내었다.

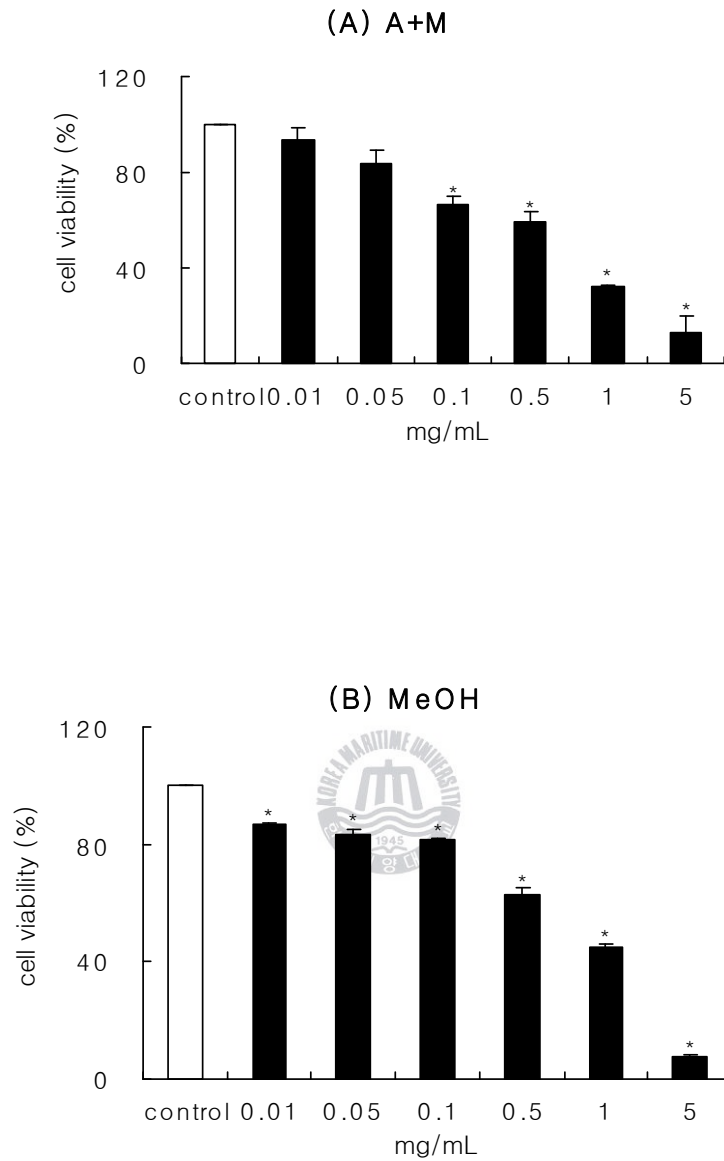


Fig. 8. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from dried mackerel on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells.

\* $p < 0.05$ , significant effect between the control and each extract

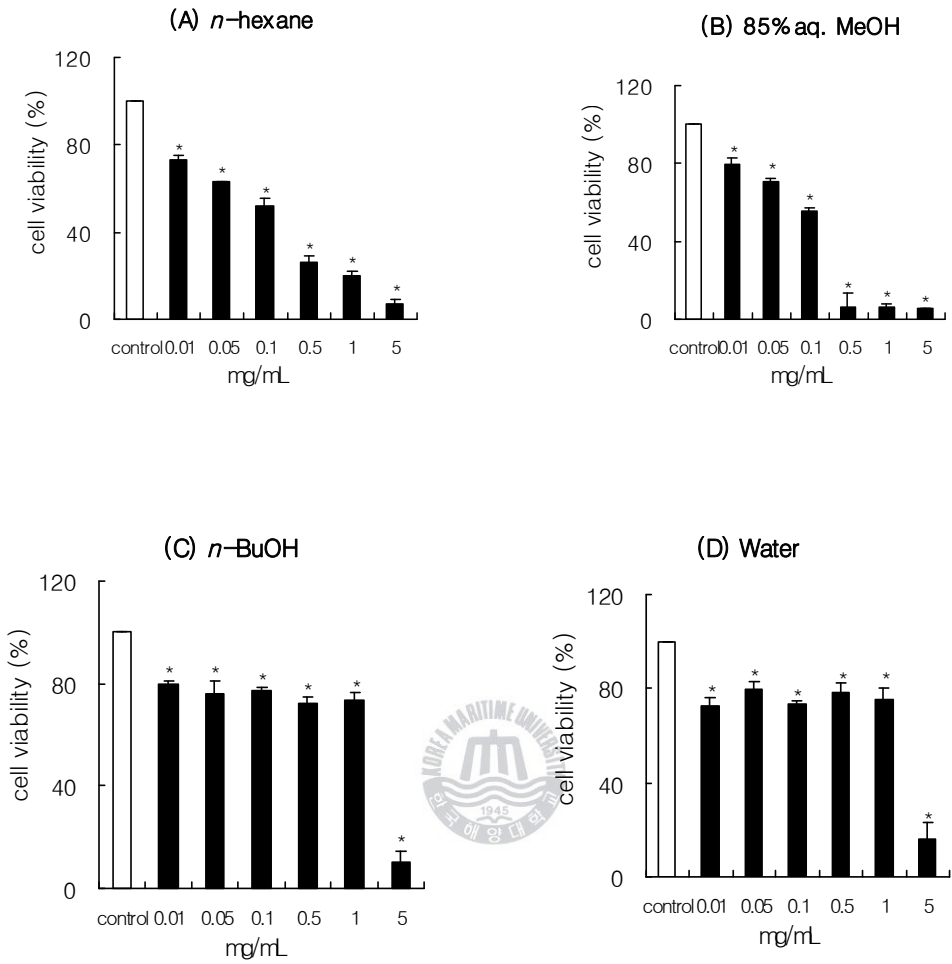


Fig. 9. Inhibitory effect of solvent fractions from dried mackerel on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells.

\* $p < 0.05$ , significant effect between the control and each fraction

Table 3. IC<sub>50</sub> values of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from dried mackerel on AGS human gastric adenocarcinoma cells.

Treatments	Concentration (mg/mL)	Inhibition (%)	IC <sub>50</sub> (mg/mL)
A+M extracts	0.01	6	0.69
	0.05	16	
	0.10	33*	
	0.50	41*	
	1.00	68*	
	5.00	87*	
MeOH extracts	0.01	13*	0.88
	0.05	17*	
	0.10	18*	
	0.50	37*	
	1.00	55*	
	5.00	93*	

\* $p < 0.05$ , significant effect between the control and each extract

**Table 4. IC<sub>50</sub> values of solvent fractions from dried mackerel on AGS human gastric adenocarcinoma cells.**

Treatments	Concentration (mg/mL)	Inhibition (%)	IC <sub>50</sub> (mg/mL)
<i>n</i> -hexane fraction	0.01	27*	0.23
	0.05	37*	
	0.10	48*	
	0.50	74*	
	1.00	80*	
	5.00	93*	
85% aq. MeOH fraction	0.01	21*	0.21
	0.05	30*	
	0.10	45*	
	0.50	91*	
	1.00	93*	
	5.00	94*	
<i>n</i> -BuOH fraction	0.01	20*	2.11
	0.05	24*	
	0.10	23*	
	0.50	28*	
	1.00	26*	
	5.00	90*	
Water fraction	0.01	27*	2.06
	0.05	20*	
	0.10	27*	
	0.50	22*	
	1.00	25*	
	5.00	84*	

\* $p < 0.05$ , significant effect between the control and each fraction

Fig. 10은 인체 결장암세포(HT-29)에 대한 결과를 나타낸 것으로, A+M 추출물 및 MeOH 추출물은 앞서 실험한 AGS 세포의 결과와 비교했을 때 암세포 증식 억제효과가 다소 낮았으나 A+M 추출물의 경우, 0.01 mg/mL의 첨가 농도에서부터 농도 의존적으로 암세포 증식 억제효과를 나타내었다. 각 추출물의 5 mg/mL 첨가농도에서 90%, 89%의 암세포 증식 억제효과 보였으며 ( $p < 0.05$ ), 각 추출물의  $IC_{50}$  값은 1.05 및 1.81 mg/mL로 나타났다(Table 5). Fig. 11은 건조 고등어 추출물을 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, water로 다시 추출하여 얻어진 각 분획물을 각 농도 별로 HT-29 세포에 처리한 결과로 각 분획물들은 5 mg/mL의 첨가 농도에서 가장 높은 암세포 증식 억제효과를 나타내었으며, 각각 86%, 96%, 57%, 51%의 암세포 증식 억제효과( $p < 0.05$ )가 나타났다. 이들 분획물들의  $IC_{50}$  값은 각각 0.73, 0.29, 4.12 및 4.88 mg/mL이었다(Table 6). 특히, 85% aq. MeOH 분획물이 가장 높은 암세포 증식 억제효과를 나타내었다.



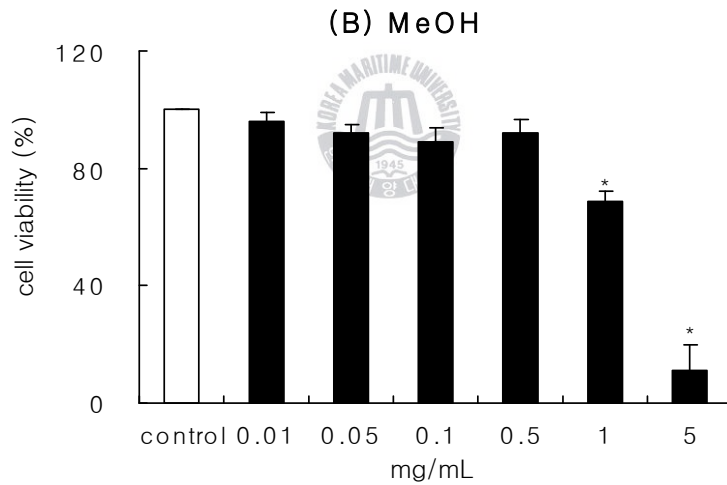
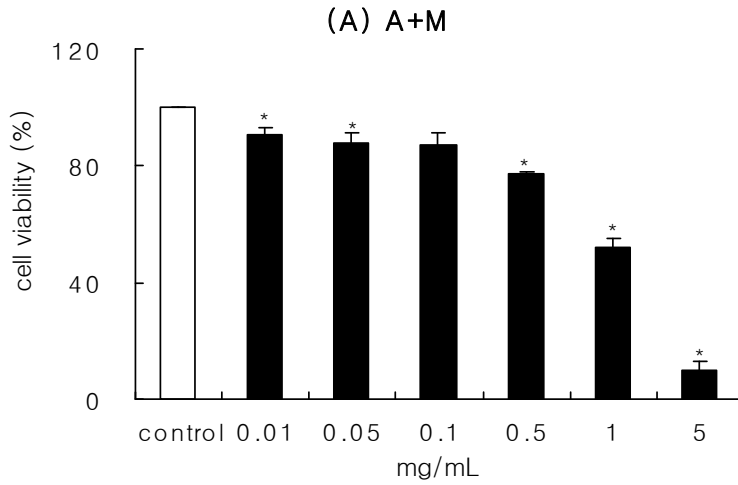


Fig. 10. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from dried mackerel on the growth of HT-29 human colon cancer cells.

\* $p < 0.05$ , significant effect between the control and each extract



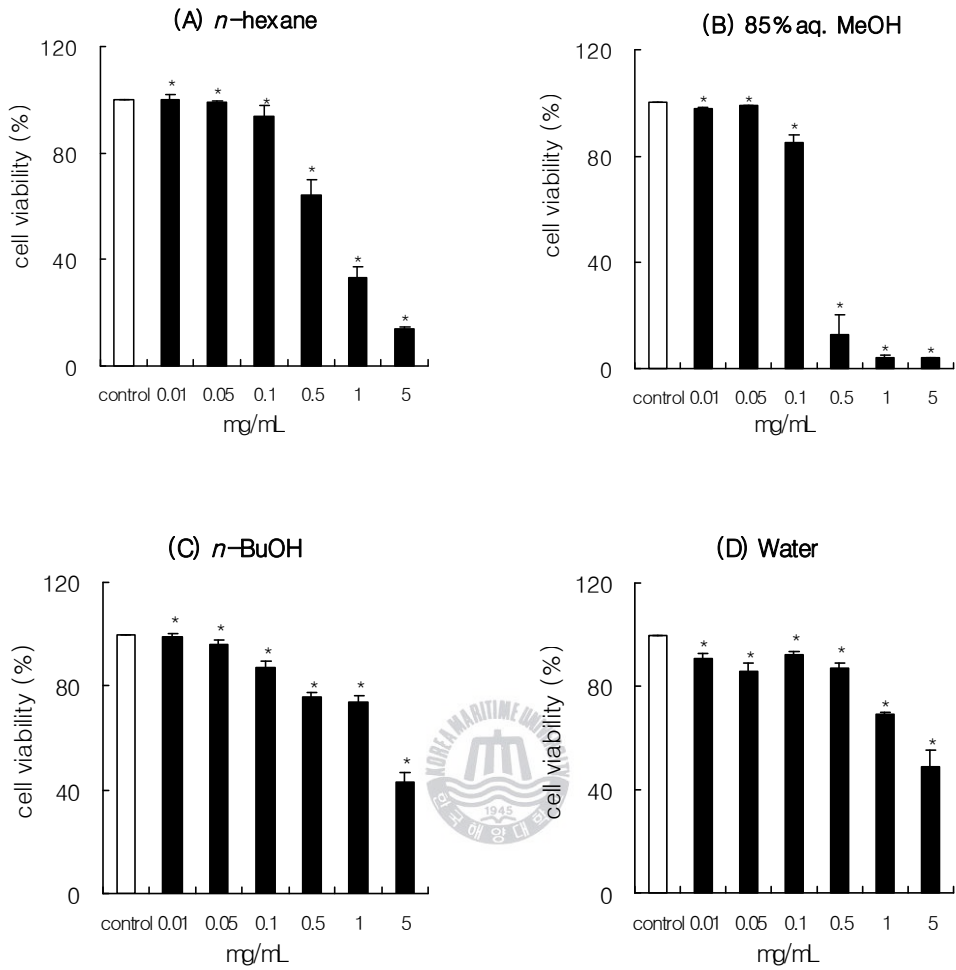


Fig. 11. Inhibitory effect of solvent fractions from dried mackerel on the growth of HT-29 human colon cancer cells.

\* $p < 0.05$ , significant effect between the control and each fraction

Table 5. IC<sub>50</sub> values of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from dried mackerel on the growth of HT-29 human colon cancer cells.

Treatments	Concentration (mg/mL)	Inhibition (%)	IC <sub>50</sub> (mg/mL)
A+M extracts	0.01	9*	1.05
	0.05	12*	
	0.10	13	
	0.50	23*	
	1.00	48*	
	5.00	90*	
MeOH extracts	0.01	4	0.81
	0.05	8	
	0.10	11	
	0.50	8	
	1.00	31*	
	5.00	89*	

\* $p < 0.05$ , significant effect between the control and each extract

Table 6. IC<sub>50</sub> values of solvent fractions from dried mackerel on the growth of HT-29 human colon cancer cells.

Treatments	Concentration (mg/mL)	Inhibition (%)	IC <sub>50</sub> (mg/mL)
<i>n</i> -hexane fraction	0.01	0	0.73
	0.05	1	
	0.10	6	
	0.50	36*	
	1.00	67*	
	5.00	86*	
85% aq. MeOH fraction	0.01	2	0.29
	0.05	1	
	0.10	15*	
	0.50	87*	
	1.00	96*	
	5.00	96*	
<i>n</i> -BuOH fraction	0.01	1	4.12
	0.05	4	
	0.10	13*	
	0.50	24*	
	1.00	26*	
	5.00	57*	
Water fraction	0.01	9*	4.88
	0.05	14*	
	0.10	8*	
	0.50	13*	
	1.00	31*	
	5.00	51*	

\* $p < 0.05$ , significant effect between the control and each fraction

Fig. 12는 HT-1080 세포에 대한 결과를 나타낸 것으로, 앞서 살펴본 세포에 서와 마찬가지로 A+M 추출물과 MeOH 추출물은 둘 다 가장 낮은 농도인 0.01 mg/mL에서부터 농도 의존적으로 HT-1080 세포의 성장을 억제시켰다( $p < 0.05$ ). A+M 추출물의 경우 1 및 5 mg/mL의 첨가농도에서 각각 58% 및 94%로 암세포 증식 억제효과를 보였다( $p < 0.05$ ). MeOH 추출물의 경우, A+M 추출물에 비해 다소 낮은 억제효과를 나타내었으나 첨가농도 5 mg/mL의 농도에서는 76%의 암세포 증식 억제효과를 나타내었다. A+M 추출물과 MeOH 추출물의  $IC_{50}$  값은 각각 0.80 및 0.95mg/mL로 나타났다(Table 7). Fig. 13은 건조 고등어 추출물을 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, water로 다시 추출하여 얻어진 각 분획물을 각 농도별로 처리한 결과로 *n*-hexane과 85% aq. MeOH 분획물이 *n*-BuOH과 water 분획물보다 암세포 증식 억제효과가 더 높은 것을 알 수 있으며, 이들 분획물의  $IC_{50}$  값은 각각 0.18, 0.20, 1.56 및 2.09 mg/mL이었다(Table 8). *n*-hexane 분획물의 경우 5 mg/mL의 농도로 처리했을 때, 시료가 가지고 있는 고유의 색으로 인해서 1 mg/mL 농도로 처리한 결과보다 암세포 증식 억제율이 낮게 나타났다. Kong 등[52]은 고등어 메탄올 추출물은 농도 의존적으로 인체 위암세포(AGS) 생존율을 감소시켰고, 이러한 증식 억제는 위암세포의 형태적 변이도 함께 유발하였다고 보고하여 본 연구 결과와 유사하였다. Han 등[53]은 *n*-3계열 불포화 지방산의 암세포주에 대한 성장 억제효과를 살펴본 결과, 인체 피부흑색종 세포의 경우 50  $\mu$ M LNA, 100  $\mu$ M DHA, 25  $\mu$ M EPA 이상의 농도에서 유의적으로 세포 생존율과 세포 부착증이 감소되었으며, 인체 구강유상피암종의 경우 25  $\mu$ M LNA, 25  $\mu$ M DHA, 25  $\mu$ M EPA 이상의 농도에서 유의성을 나타내었다고 보고하였다. 비슷한 예로 *n*-3계열 지방산이 풍부한 참치에 대한 암세포 증식 억제효과에 대한 보고로 Hwang 등[54]은 DHA가 함유된 참치유를 처리한 실험에서 직장암세포(HRT-18), 결장암세포(HT-29), 임파모세포(L1210)에 대해 DHA가 35% 함유된 참치유를 100  $\mu$ g/mL 이상 처리 했을 때 암세포 증식 억제효과를 나타내었다 보고하였으며, Shin 등[55]은 결장암세포(HT-29)를 비롯하여 간암세포(HepG2), 피부암세포

(B16F-10), 유방암세포(MCF-7)에 대해 참치 지느러미 추출물에 의한 암세포 독성 효과를 검토한 결과 *n*-hexane, MeOH, *n*-butanol (*n*-BuOH), water 분획물 중 MeOH 분획물에서 암세포 성장 억제효과가 높았으며, 네 가지 암세포주 중 간암세포에서 가장 높은 효과를 나타내었다고 보고했다. 또한 형태학적 변화 관찰 결과 분획물 농도 증가에 따라 암세포의 부착력이 상실되고 심한 형태적 변형이 나타났다고 보고했다. 이와 같은 결과는 본 연구 결과와 유사하였으며 건조 고등어는 인체 위암세포(AGS), 인체 결장암세포(HT-29) 및 인체 섬유육종세포(HT-1080)의 증식을 크게 억제하였다. 또한 고등어 뿐만 아니라 *n*-3 계열 지방산이 풍부한 어류를 통한 항암 활성 물질과 같은 유용한 기능성 물질의 활용을 기대해 본다.



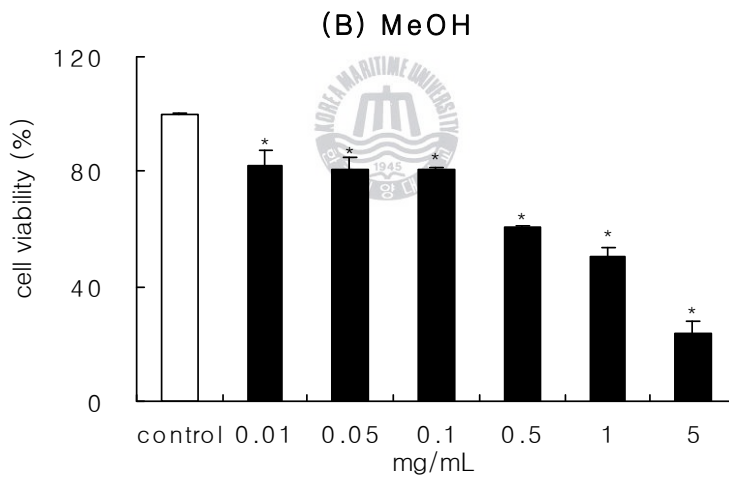
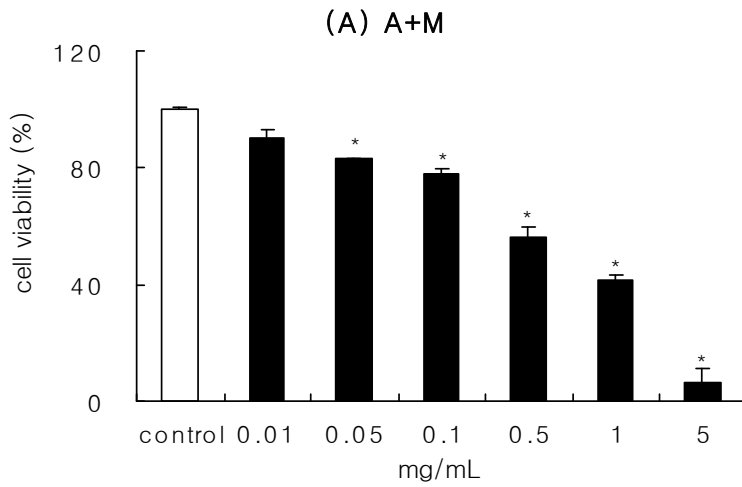


Fig 12. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from dried mackerel on the growth of HT-1080 human fibrosarcoma cells.

\* $p < 0.05$ , significant effect between the control and each extract

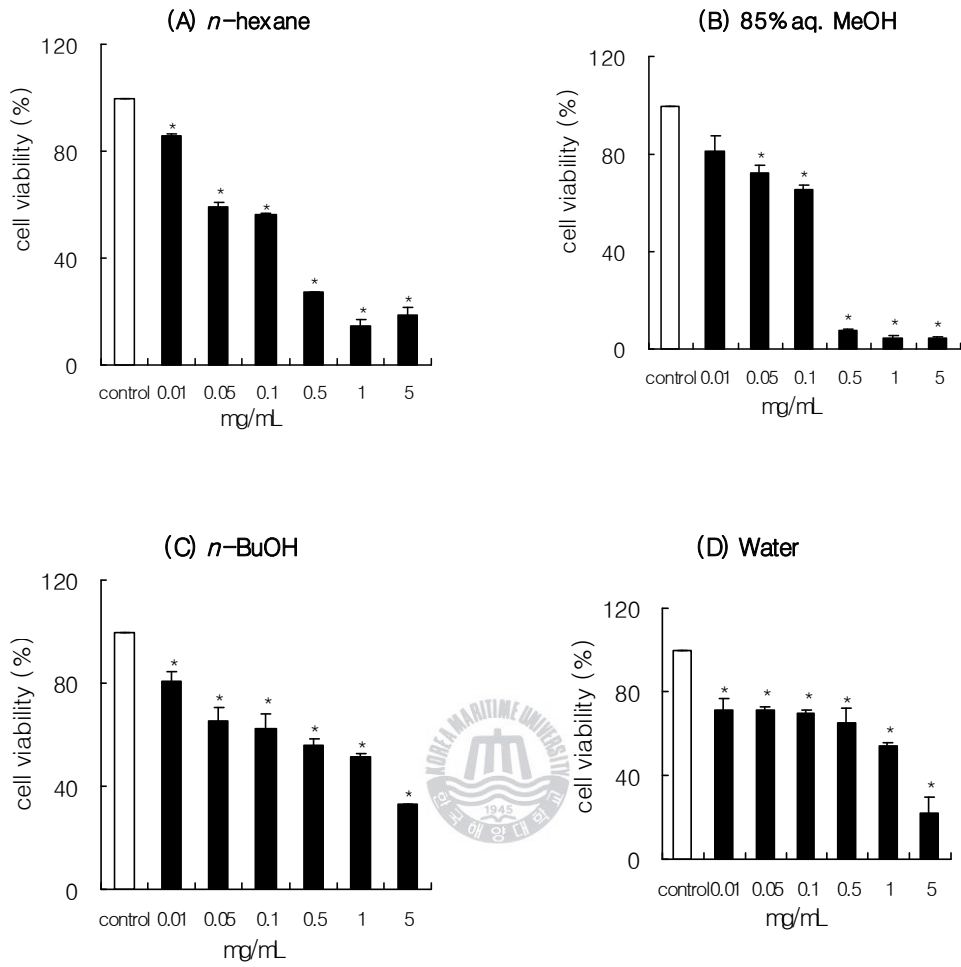


Fig 13. Inhibitory effect of solvent fractions from dried mackerel on the growth of HT-1080 human fibrosarcoma cells.

\* $p < 0.05$ , significant effect between the control and each fraction

Table 7. IC<sub>50</sub> values of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from dried mackerel on HT-1080 human fibrosarcoma cells.

Treatments	Concentration (mg/mL)	Inhibition (%)	IC <sub>50</sub> (mg/mL)
A+M extracts	0.01	10	0.80
	0.05	28*	
	0.10	41*	
	0.50	44*	
	1.00	58*	
	5.00	94*	
MeOH extracts	0.01	18*	0.95
	0.05	19*	
	0.10	19*	
	0.50	39*	
	1.00	50*	
	5.00	76*	

\* $p < 0.05$ , significant effect between the control and each extract



Table 8. IC<sub>50</sub> values of solvent fractions from dried mackerel on HT-1080 human fibrosarcoma cells.

Treatments	Concentration (mg/mL)	Inhibition (%)	IC <sub>50</sub> (mg/mL)
<i>n</i> -hexane fraction	0.01	35*	0.18
	0.05	41*	
	0.10	44*	
	0.50	73*	
	1.00	85*	
	5.00	81*	
85% aq. MeOH fraction	0.01	19	0.20
	0.05	28*	
	0.10	35*	
	0.50	93*	
	1.00	96*	
	5.00	96*	
<i>n</i> -BuOH fraction	0.01	19*	1.56
	0.05	35*	
	0.10	38*	
	0.50	44*	
	1.00	48*	
	5.00	67*	
Water fraction	0.01	29*	2.09
	0.05	30*	
	0.10	30*	
	0.50	35*	
	1.00	46*	
	5.00	78*	

\* $p < 0.05$ , significant effect between the control and each fraction

## (2) 항산화 효과

### ① DPPH 라디칼 소거 활성

건조 고등어의 acetone/methylene chloride 추출물(A+M) 및 methanol 추출물(MeOH)과 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, water로 다시 추출하여 얻어진 각 분획물 각각 0.01, 0.05, 0.10, 0.50 mg/mL 농도에서 DPPH 라디칼 소거 활성을 검색하였다. 대조군으로 합성 항산화제인 BHT와 천연 항산화제인 L-ascorbic acid를 사용하였으며, 검색결과, 0.50 mg/mL에서 대조군 BHT는 83%, L-ascorbic acid는 97%의 소거 효과를 보였다. 시료와 비교 할 때 추출물인 A+M 추출물(19%)와 MeOH 추출물(26%)은 높은 효과를 나타내지 않았지만, 추출물을 극성에 따라 다시 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, water로 분획한 분획물들 중 85% aq. MeOH 분획물이 28%로 시료 중에서는 가장 높은 라디칼 소거 활성 효과를 나타내었으며, 전체적으로 낮은 라디칼 소거 활성 효과를 나타내었다(Table 9).



**Table 9. DPPH radical scavenging effect of crude extracts and solvent fractions from dried mackerel (EDA(%))**

Sample	Concentration (mg/mL)			
	0.01	0.05	0.10	0.50
A+M extracts	12.08	14.17	14.39	19.46
MeOH extracts	12.29	13.33	16.56	26.19
<i>n</i> -hexane fraction	11.67	14.38	17.81	26.29
85% aq. MeOH fraction	11.35	15.21	18.63	28.26
<i>n</i> -BuOH fraction	10.42	12.50	13.98	17.08
Water fraction	10.52	13.23	15.01	18.01
BHT	66.44	80.85	82.82	83.44
L-ascorbic acid	91.35	96.46	96.79	97.10

### (3) 세포수준에서 항산화 효과

#### ① 세포 내 활성산소종(Reactive oxygen species) 측정

생체 내에서 산화적 스트레스는 반응성이 큰 활성산소종들의 생성과 이들을 중화하려는 항산화 방어 시스템 사이의 불균형에 의해 야기된다. 과도한 활성산소종들은 세포 내의 지질, 핵산 및 단백질을 공격하여 세포 및 조직의 산화적 손상을 유발하고 이러한 산화적 스트레스의 축적이 암과 심혈관 질환 및 비만과 같은 만성 질환의 병리학적 진행과 노화 과정에서는 중요한 요인들로 주목된다[56,57,58]. 산화 억제 방법으로는 산소, 광선, 열에너지의 차단, singlet oxygen ( $^1O_2$ )의 불활성화 그리고 유리 라디칼(free radical)의 안정화 등 여러 가지가 제시되고 있으나 가장 간단하면서 적당한 방법은 항산화제를 첨가하는 것이다. 지금까지는 합성 항산화제인 butylated hydroxy toluene (BHT)와 butylated hydroxy anisole (BHA) 등이 주로 사용되어 왔으나 최근 발암성 등의 문제로 사용이 규제되고 있어 천연 항산화제로 관심이 기울어지고 있다. 천연물 유래 항산화 물질 검색과 수산식품의 효과적인 이용이라는 측면에서 건조 고등어를 이용하여 세포 내 활성산소종 억제효과를 검색하였다. 세포 내 활성산소와 반응하여 형광물질을 만들어 내는 DCFH-DA를 사용하여 세포 내 존재하는 활성산소종을 DCF fluorescence로 측정하였으며, 500  $\mu$ M  $H_2O_2$ 를 처리한 후, 0분부터 30분 간격으로 120분 동안 흡광도를 측정하였다. 건조 고등어의 acetone/methylene chloride 추출물(A+M) 및 methanol 추출물(MeOH)과 각 분획물들을 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 mg/mL의 농도로 측정하였으며, 대조군으로는 시료를 넣지 않고 500  $\mu$ M  $H_2O_2$ 를 처리한 control군과 500  $\mu$ M  $H_2O_2$ 를 처리하지 않은 blank군을 사용하였다. 500  $\mu$ M  $H_2O_2$ 를 처리한 control군은 시간에 따라 DCF fluorescence 값이 급격히 증가하였으며, 500  $\mu$ M  $H_2O_2$ 를 처리하지 않은 blank군은 시간에 따른 DCF fluorescence 값이 높게 증가하지 않았다.

건조 고등어 추출물 및 분획물을 각 농도로 인체 섬유육종세포(HT-1080)에

처리하였을 때, 세포 내 활성산소종 농도 의존적으로 크게 감소시켰다(Fig. 14 - Fig. 23). A+M 및 MeOH 추출물의 경우, 0.05 mg/mL의 농도에서는 control군에 가까운 과산화수소 농도를 나타내었지만(Fig. 14), 0.1 mg/mL 이상의 처리군에서는 각 농도에서 측정 시간 120동안 계속적으로 세포 내 활성산소종을 감소시키는데 우수한 능력을 나타내었다(Fig. 15-18). 건조 고등어 추출물을 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, water로 다시 추출하여 얻어진 각 분획물을 농도별로 처리했을 때, *n*-BuOH와 water 분획물을 제외한 분획물들은 control군과 blank군에 비해 측정 시간 120분 동안 계속적으로 세포 내 활성산소종을 감소시키는데 우수한 능력을 나타내었으며(Fig.19 - Fig. 23), 처리농도에 따른 세포 내 활성산소종 억제효과가 뚜렷이 나타났다. 85% aq. MeOH 분획물의 경우 가장 높은 세포 내 활성산소종 억제효과를 나타내었으나, 0.05 mg/mL 처리 농도에서는 85% aq. MeOH 추출물 뿐 아니라 모든 분획물들에게서 세포 내 활성산소종 억제효과가 거의 나타나지 않았다(Fig. 19). Fig. 24는 가장 높은 세포 내 활성산소종 억제효과를 나타낸 85% aq. MeOH 분획물의 세포 내 활성산소종 농도를 control군에 대해 백분율로 나타낸 것으로, 측정 시간 120분을 기준으로 1 및 5 mg/mL의 처리 농도에서 control군에 비해 94%의 억제효과가 나타났으며, 0.1 mg/mL의 농도까지 유의적 차이가 있음을 알 수 있다( $p < 0.05$ ).

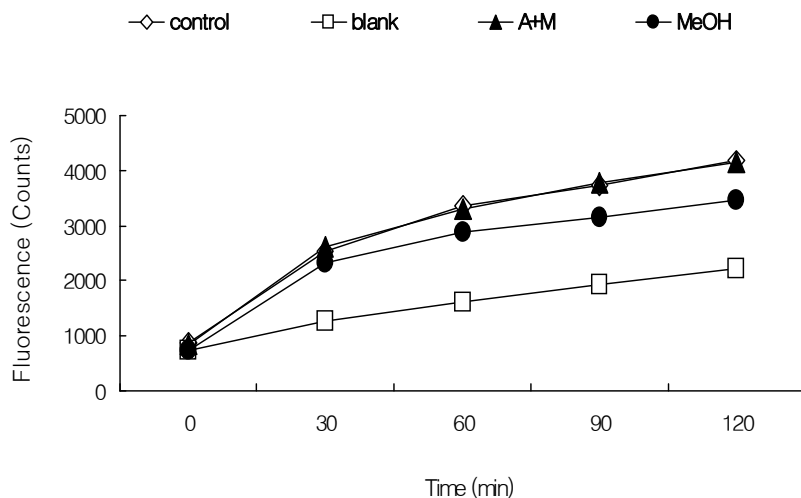


Fig. 14. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M, 0.05 mg/mL) and methanol (MeOH, 0.05 mg/mL) extracts from dried mackerel on levels of reactive oxygen species in HT-1080 cells.

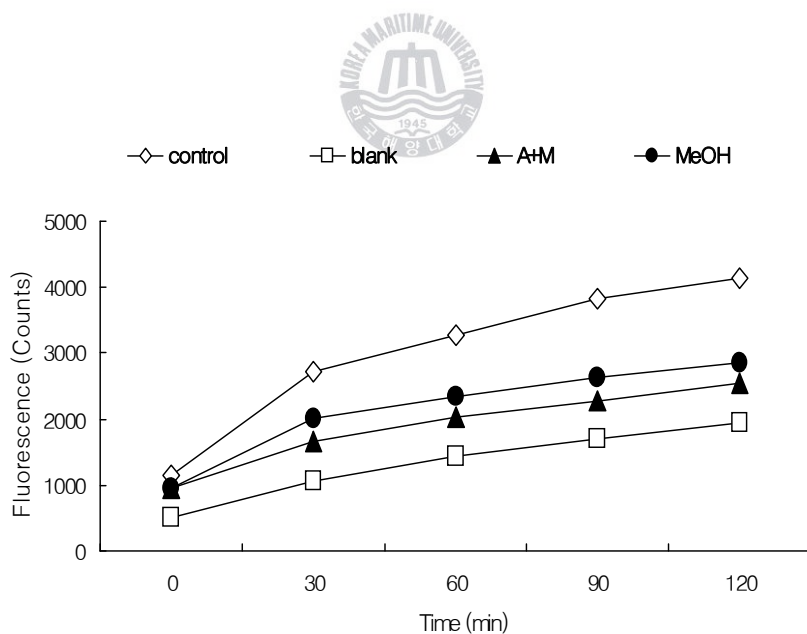


Fig. 15. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M, 0.1 mg/mL) and methanol (MeOH, 0.1 mg/mL) extracts from dried mackerel on levels of reactive oxygen species in HT-1080 cells.

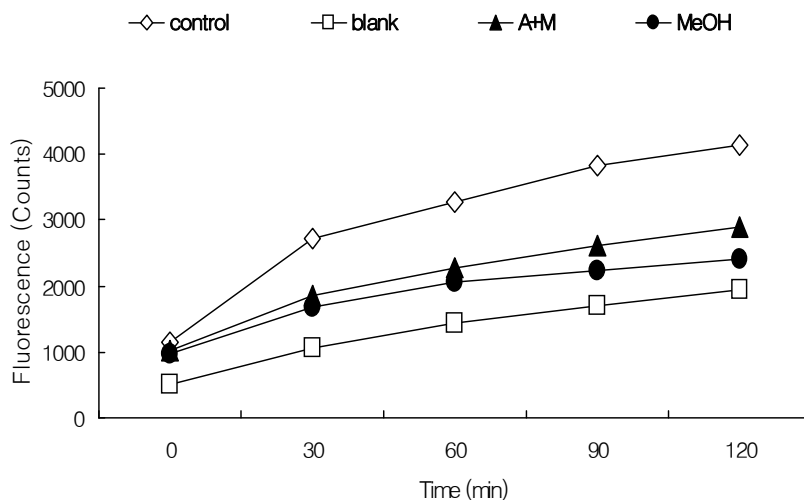


Fig. 16. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M, 0.5 mg/mL) and methanol (MeOH, 0.5 mg/mL) extracts from dried mackerel on levels of reactive oxygen species in HT-1080 cells.

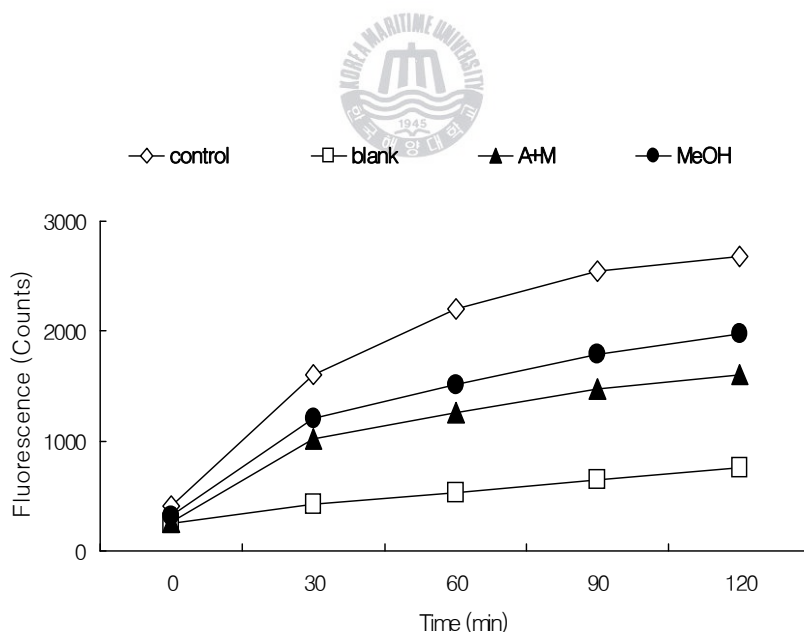


Fig. 17. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M, 1 mg/mL) and methanol (MeOH, 1 mg/mL) extracts from dried mackerel on levels of reactive oxygen species in HT-1080 cells.

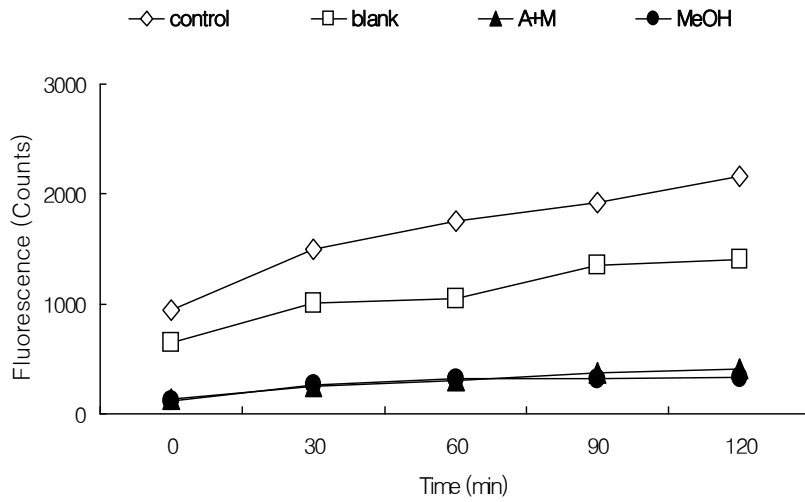


Fig. 18. Inhibitory effect of acetone/methylene chloride (A+M, 5 mg/mL) and methanol (MeOH, 5 mg/mL) extracts from dried mackerel on levels of reactive oxygen species in HT-1080 cells.





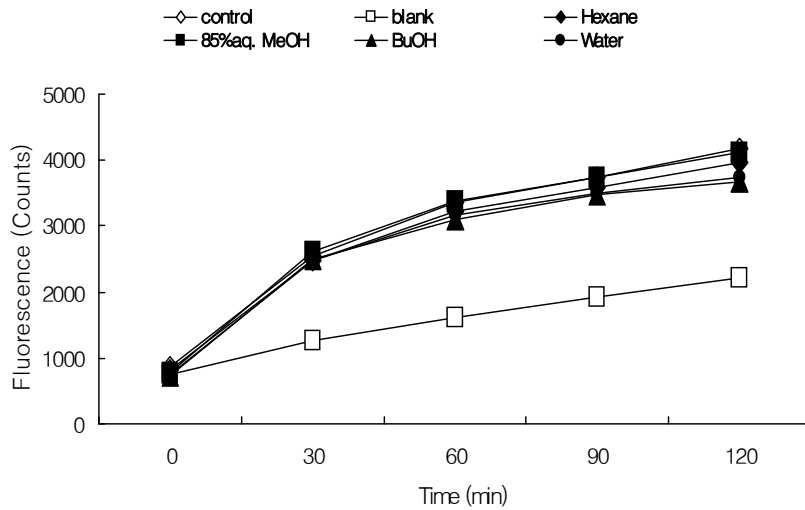


Fig. 19. Inhibitory effect of solvent fractions (0.05 mg/mL) from dried mackerel on levels of reactive oxygen species in HT-1080 cells.

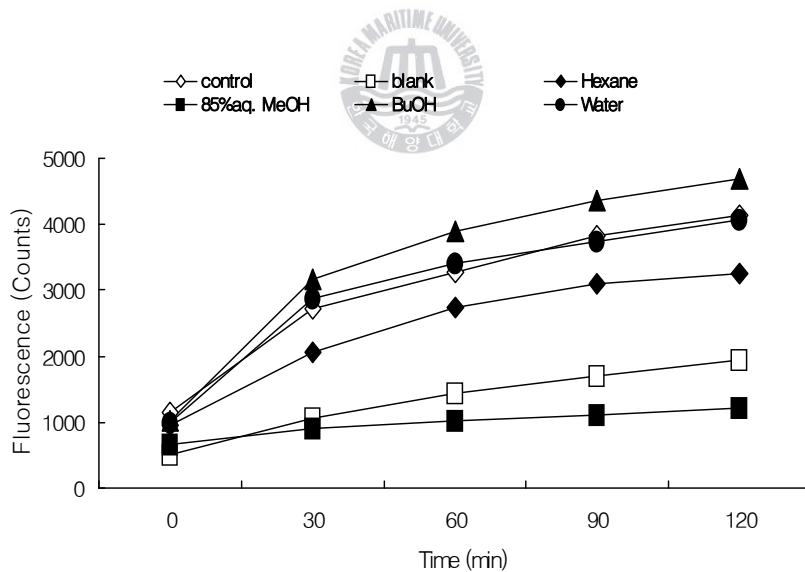


Fig. 20. Inhibitory effect of solvent fractions (0.1 mg/mL) from dried mackerel on levels of reactive oxygen species in HT-1080 cells.

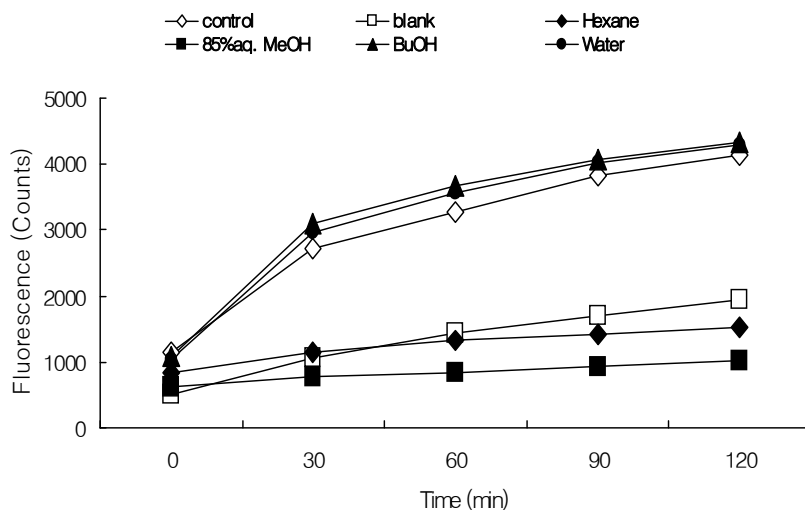


Fig. 21. Inhibitory effect of solvent fractions (0.5 mg/mL) from dried mackerel on levels of reactive oxygen species in HT-1080 cells.

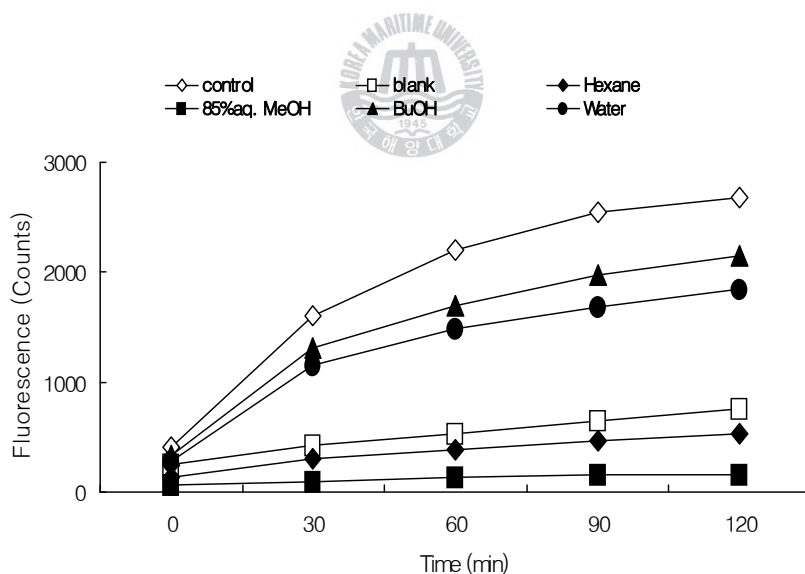


Fig. 22. Inhibitory effect of solvent fractions (1 mg/mL) from dried mackerel on levels of reactive oxygen species in HT-1080 cells.

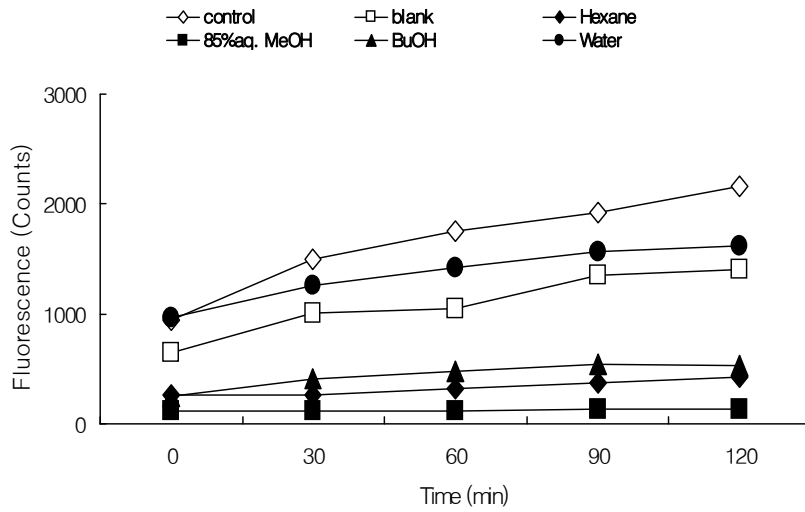


Fig. 23. Inhibitory effect of solvent fractions (5 mg/mL) from dried mackerel on levels of reactive oxygen species in HT-1080 cells.



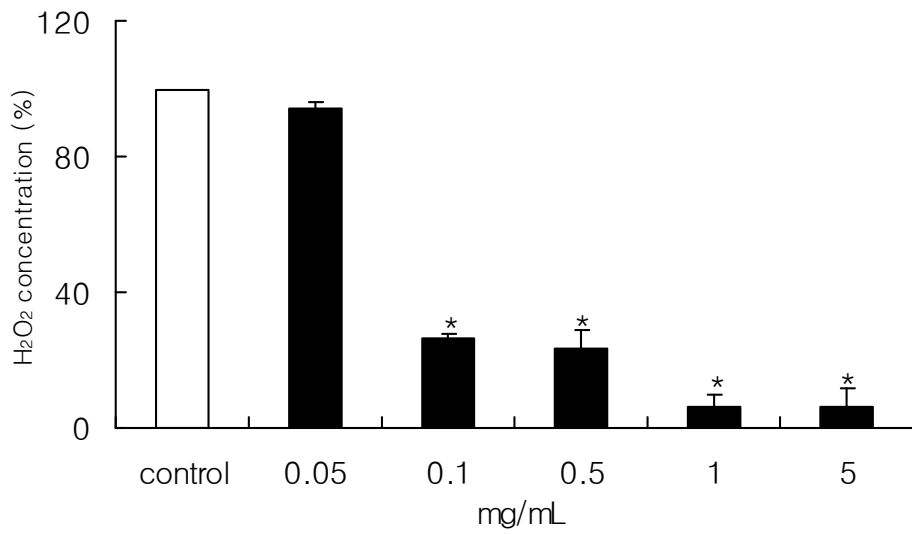


Fig. 24. Inhibitory effect of 85% aq. MeOH from dried mackerel on levels of reactive oxygen species in HT-1080 cells.



## ② 세포 내 GSH (Glutathione) 함량 측정

건조 고등어 추출물 및 분획물이 세포 내의 GSH 함량에 미치는 영향을 측정하기 위하여 thiol-staining reagent인 mBBR을 이용하여 측정하였다. A+M 및 MeOH 추출물과 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, water 분획물을 0.05, 0.1, 1, 5 mg/mL의 농도로 처리하여 120분 동안 30분 간격으로 흡광도를 측정하였다. Fig. 25는 측정시간 90분 일 때, 추출물의 GSH 함량을 나타낸 것으로 1 및 5 mg/mL의 농도에서 시료를 처리하지 않은 control군 보다 GSH 함량이 증가하는 것으로 나타났다. A+M 및 MeOH 추출물을 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, water로 다시 분획하여 얻어진 각 분획물들도 동일한 농도로 처리하였으며, Fig. 26에 나타내었다. 추출물에서와 마찬가지로 5 mg/mL와 1 mg/mL의 농도에서 GSH 함량이 높게 나타났으며, *n*-hexane과 85% aq. MeOH 분획물의 효과가 눈에 띄게 관찰되었다.



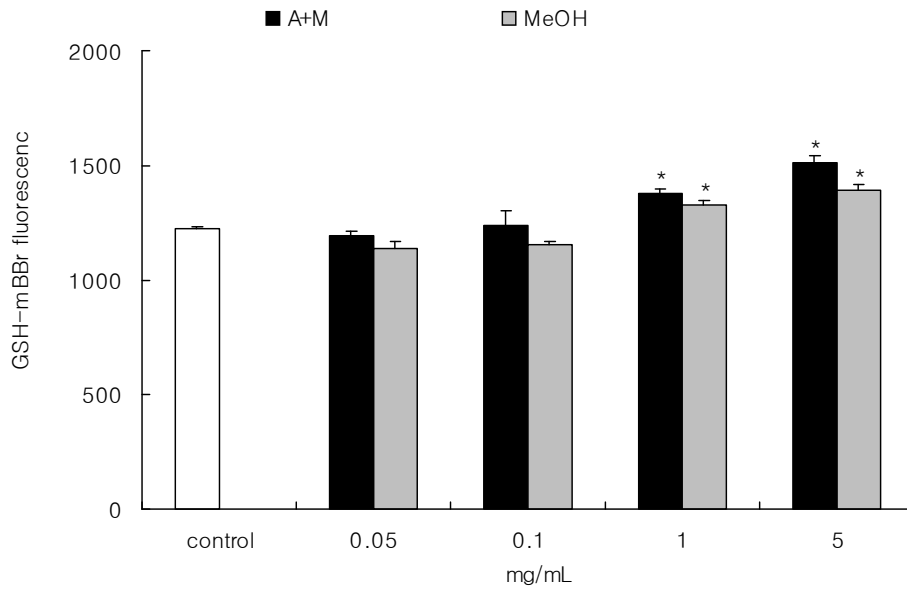


Fig. 25. Effect of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts from dried mackerel on GSH level in HT-1080 cells.



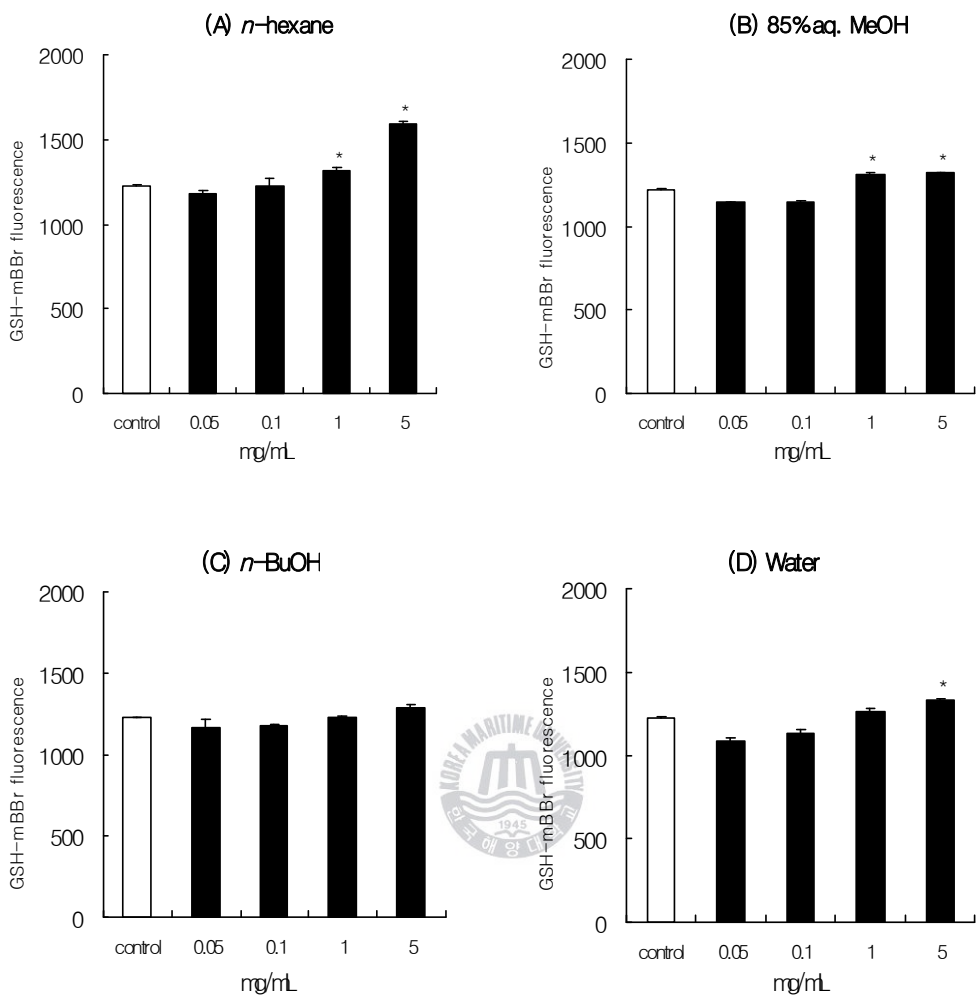


Fig. 26. Effect of solvent fractions from dried mackerel on GSH level in HT-1080 cells.

### ③ 세포 내 NO (Nitric oxide) 생성 측정

일반적인 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만, 병리적인 원인에 의한 과도한 NO의 형성은 정상세포의 손상을 초래하여 염증을 유발시키며 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상 등을 유발한다[59, 60, 61]. NO의 생성량은 Raw 264.7 세포의 배양액 중에 LPS 자극으로 유도된 NO의 함량을 측정하는 것으로 세포의 생존율에 영향을 미치지 않는 농도에서 건조 고등어 추출물과 분획물을 처리하여 배양한 후, LPS로 세포를 자극하여 세포 배양액에 Griess 시약을 반응시켜 확인하였다. 시료는 0.05 mg/mL의 농도로 처리하였으며, 대조군으로는 시료 대신 PBS를 처리한 control군과 아무것도 처리하지 않은 blank군을 사용하였다. LPS를 처리한 control군은 NO의 생성량이 높게 나타났으며, LPS를 처리하지 않은 blank군은 NO의 생성량이 상대적으로 매우 낮게 나타났다(Fig. 27). 0.05 mg/mL의 농도에서 NO 생성 억제효과를 확인한 결과, A+M 추출물과 *n*-hexane 및 85% aq. MeOH 분획물이 NO 생성 억제효과가 뛰어났으며, control군에 대해 모두 약 38% 이상의 NO 생성 억제효과가 있는 것으로 나타났다. Jeong 등[62]은 고등어 내장으로부터 총 지질을 추출하여 헥산추출물, 사염화탄소-메탄올 추출물, 인지질, 포스파티딜콜린(PC), PC를 제외한 나머지 인지질획분으로 추출하여 항산화성을 비교한 결과 극성지질인 인지질과 인지질을 구성하고 있는 PC 및 그 나머지 획분에서 모두 현저한 산화 억제효과를 나타내었으며 그 중에서도 PC에 의한 산화 억제효과가 가장 높았다고 보고하였고, Yeum 등[63]은 고등어 단백질 가수분해물을 조제하여 그 항산화 작용을 검토한 결과, 8가지 효소에 의한 고등어 근육단백질 가수분해물의 항산화능은 우수한 것으로 나타났으며, 특히 복합효소, bromelain 및 alcalase에 의한 항산화 능이 다른 효소에 비하여 다소 우수하였다고 보고하였다. 최근 수산식품에 대해서도 항산화와 관련된 다양한 연구[64,65]들이 활발히 이루어지고 있으며, Lee 등[66]은 수산 가공 폐기물 중 하나인 참치 자숙액으로부터 얻어진 에탄올 추출물을 감마선을 조사한



후 항산화 활성을 연구한 결과 전자공여능 및 hydroxyl 라디칼 소거능이 증가하였고 항산화지수도 증가하는 경향을 보였다고 보고하였다. 본 연구결과로부터 건조 고등어 추출물 및 분획물들 중 특히 85% aq. MeOH 분획물에 의한 항산화 효과가 우수하였으므로 극성 물질로 추정되어지며 분획물 분리 및 정제와 같은 연구가 향후 필요하다고 사료된다.



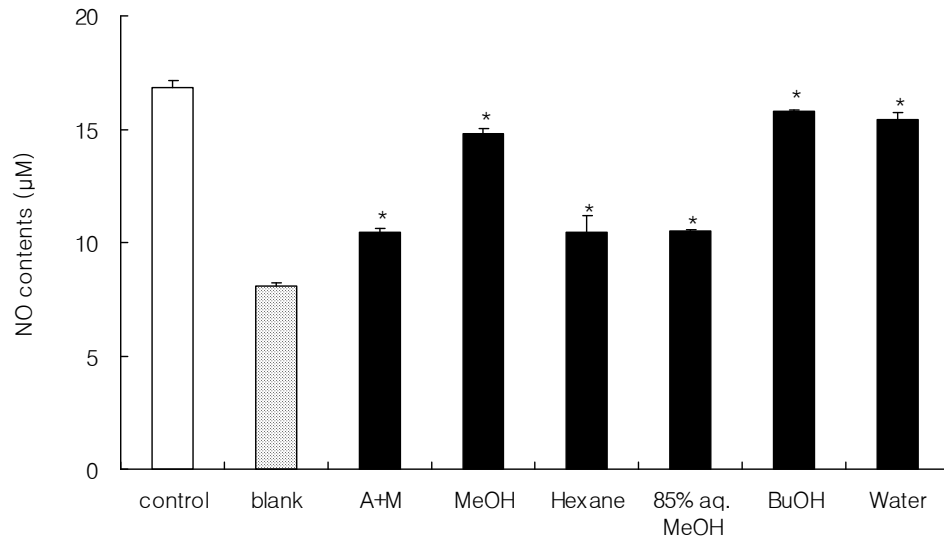
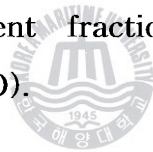


Fig. 27. Effects of acetone/methylene chloride (A+M) and methanol (MeOH) extracts and solvent fractions from dried mackerel on production of nitric oxide (NO).



### 3-4. 화합물의 생리활성

#### (1) 항암 효과

##### ① MTT assay

암세포 증식 억제효과가 높은 생리활성 물질을 검색하여 분리하기 위해 MTT assay를 행하였다. Fig. 28은 건조 고등어의 분획물을 RP flash column chromatography로 분획하여 얻은 분획물을 HT-29 세포에 처리했을 때 인체 암세포 증식 억제효과를 나타낸 것이다. 0.5에서 5 mg/mL의 농도에서 rfc2 - rfc 6은 rfc 1과 rfc 7에 비하여 높은 암세포 증식 억제효과를 나타내었으며, 90%가 넘는 억제율을 나타내었다. 더 자세한 암세포 증식 억제효과를 확인하기 위해 rfc 2에서 rfc 6을 처리농도를 낮추어 다시 실험 하였다. 그 결과는 Fig. 29에 나타내었으며, rfc 2에서 rfc 6으로 갈 수록 암세포 증식 억제효과가 높은 것을 알 수 있었다. 각 분획물들은 0.1 mg/mL 농도에서부터 결과 값이 차이가 났으며, 각각 24%, 34%, 28%, 45%, 70%의 높은 암세포 증식 억제효과를 나타내었다. 이러한 결과를 통해 rfc 6 분획물을 선정하여 실험을 진행하였다.

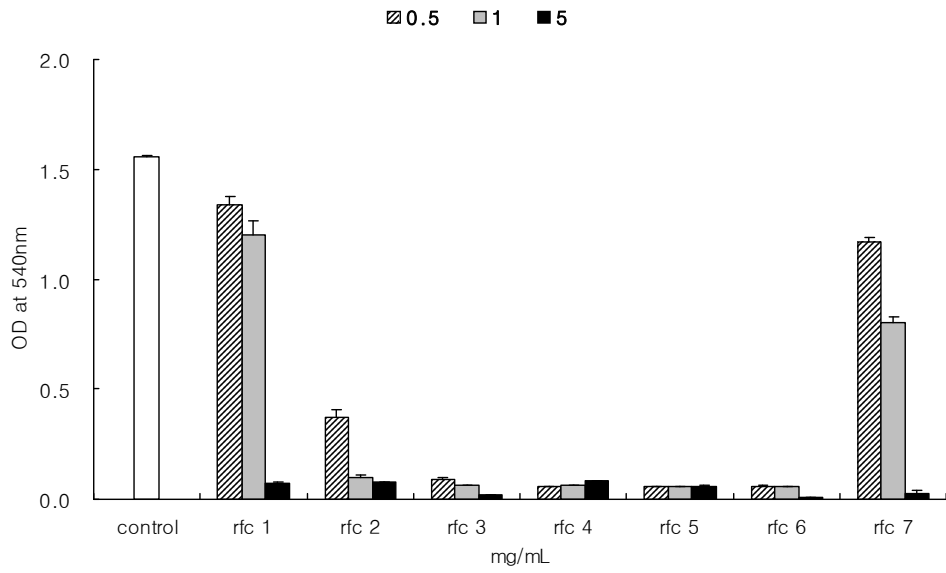


Fig. 28. Inhibitory effect of rfc 1 - 7 from dried mackerel on the growth of HT-29 human colon cancer cells.



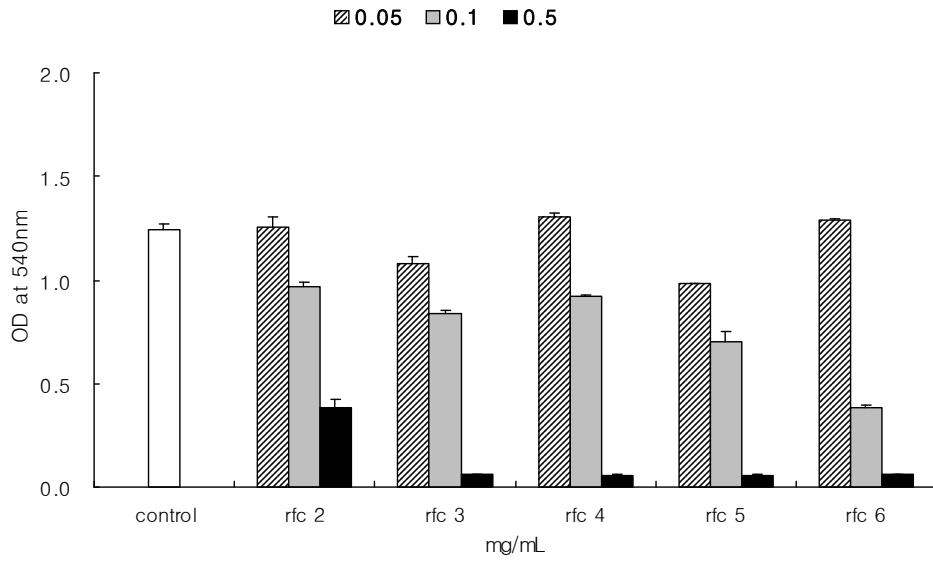


Fig. 29. Inhibitory effect of rfc 2 - 6 from dried mackerel on the growth of HT-29 human colon cancer cells.



## (2) 화합물의 지방산 조성

건조 고등어 화합물의 지방산 분석 결과, 총 포화지방산은 36.6%, 총 단일 불포화지방산의 경우 19.5%로 나타났다. 총 n-6계 지방산은 3.9%, 총 n-3계열 지방산은 22.5%로 나타났다(Table 10). N-3계열 지방산 중에서 EPA와 DHA의 함량이 높았으며, 화합물의 지방산 추출 전 시료의 무게가 0.058g에서 지방산 추출 후 0.045g으로 지방산 추출 전후의 무게 변화 차이가 작은 것으로 보아 그 화합물은 대부분 지방산으로 예상되며, 지방산의 주요 성분은 n-3계열 지방산인 것을 알 수 있었다.



**Table 10. Fatty acid composition of component separated from dried mackerel.**

Fatty acids	Mac-85% aq. MeOH-rfc 6-nfc 2
	Wt %
<b>Total Sat.<sup>1</sup></b>	<b>36.6</b>
<b>Total Mono.<sup>2</sup></b>	<b>19.5</b>
18:2n-6 (LA)	1.6
18:3n-6 (GLA)	0.1
20:2n-6	0.2
20:3n-6	0.1
20:4n-6 (AA)	1.7
22:2n-6	0.1
22:4n-6	0.2
<b>Total n-6</b>	<b>3.9</b>
18:3n-3 (LNA)	0.2
20:3n-3	0.1
20:5n-3 (EPA)	5.1
22:5n-3 (DPA)	1.0
22:6n-3 (DHA)	16.0
<b>Total n-3</b>	<b>22.5</b>



<sup>1</sup>Sat. means saturated fatty acids

<sup>2</sup>Mono. means monounsaturated fatty acids

## 4. 요약 및 결론

본 연구에서는 천연물 유래 항암 및 항산화 물질 검색과 수산식품의 효과적인 이용이라는 측면에서 건조 고등어를 용매별로 추출하여 인체 위암(AGS), 인체 결장암(HT-29) 및 섬유육종세포(HT-1080)에 대한 증식 억제 및 항산화 효과에 대해 검토하고자 하였다. 건조 고등어의 A+M 추출물과 MeOH 추출물을 AGS 세포에 처리했을 때 A+M 추출물의 경우, 1 mg/mL의 첨가농도에서 68%, 5 mg/mL 첨가농도에서 87%의 증식 억제효과를 보였으며, A+M 추출물의 IC<sub>50</sub> 값은 0.69 mg/mL이었다. MeOH 추출물을 처리한 경우에도 A+M 추출물과 유사하게 암세포 증식 억제효과를 보였으며(p<0.05), MeOH 추출물의 IC<sub>50</sub> 값은 0.88 mg/mL이었다. 건조 고등어 추출물을 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, water로 다시 추출하여 얻어진 각 분획물을 각 농도 별로 AGS 세포에 처리했을 때 5 mg/mL의 농도에서 가장 높은 암세포 증식 억제효과를 나타냈다(p<0.05). 이들 분획물들의 IC<sub>50</sub> 값은 0.23, 0.21, 2.11 및 2.06 mg/mL이었다. 인체 결장암세포(HT-29)의 경우, A+M 및 MeOH 추출물들은 5 mg/mL 첨가농도에서 약 90%의 암세포 증식 억제효과 보였으며(p<0.05), 각 추출물의 IC<sub>50</sub> 값은 1.05 및 1.81 mg/mL로 나타났다. 분획물들의 경우, 5 mg/mL의 첨가 농도에서 가장 높은 암세포 증식 억제효과를 나타내었으며 (p<0.05), 이들 분획물들의 IC<sub>50</sub> 값은 0.73, 0.29, 4.12 및 4.88 mg/mL이었다. HT-1080 세포 실험에서 A+M 추출물의 경우 1 및 5 mg/mL의 첨가농도에서 각각 58% 및 94%로 암세포 증식 억제효과를 보였다(p<0.05). MeOH 추출물의 경우, A+M 추출물에 비해 다소 낮은 억제효과를 나타내었으나 첨가농도 5 mg/mL의 농도에서는 76%의 암세포 증식 억제효과를 나타내었다. A+M 추출물과 MeOH 추출물의 IC<sub>50</sub> 값은 각각 0.80 및 0.95mg/mL로 나타났다. 분획물들의 IC<sub>50</sub> 값은 각각 0.18, 0.20, 1.56 및 2.09 mg/mL이었다. 세포 내 항산화 효과를 알아보하고자 A+M 추출물 및 MeOH 추출물과 각 분획물들을 0.05, 0.1,



0.5, 1, 5 mg/mL의 농도로 HT-1080 세포에 처리하였을 때, 농도 의존적으로 측정 시간 120분 동안 계속적으로 세포 내 활성산소종 크게 감소시켰다. 특히, 85% aq. MeOH 분획물의 경우 가장 높은 세포 내 활성 산소종 억제효과를 나타내었다. GSH 활성 측정 실험의 경우, 측정시간 90분 일 때, 추출물과 각 분획물의 GSH 함량이 1 및 5 mg/mL의 농도에서 시료를 처리하지 않은 control 군 보다 증가하는 것으로 나타났다. 특히 *n*-hexane과 85% aq. MeOH 분획물에 의한 효과가 눈에 띄게 관찰되었다. NO 생성 억제효과를 확인한 결과, A+M 추출물과 *n*-hexane 및 85% aq. MeOH 분획물이 NO 생성을 억제하는 것으로 나타났으며, control군에 대해 모두 약 38% 이상의 NO 생성 억제효과가 있는 것으로 나타났다. 건조 고등어 추출물 및 분획물의 활성 성분을 알아보기 위하여 85% aq. MeOH 분획물을 선정하여 분리한 결과 그 성분은 대부분 *n*-3계열 지방산으로 여겨지며, 이 성분을 통해 세포 및 조직의 손상을 예방할 것으로 기대된다.



## 5. 참고문헌

1. Ruxton, C. H., S. C. Reed, M. J. A. Simpson and K. J. Millington. 2004. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J. Hum. Nutr. Diet.* 17, 449-459.
2. Medina, I., S. P. Auboug and R. P. Martin. 1995. Composition of phospholipids of white muscle of six tuna species. *Lipids.* 30, 1127 - 1135.
3. Murase, T. and H. Saito. 1996. The docosahexaenoic acid content in the lipid of albacore *Thunnus alalunga* caught in the two separate localities. *Fish. Sci.* 62, 634 - 638.
4. Bromsgeest-Schoute, H. C., C. M. Van Gent, J. B. Luten and A. Ruiter. 1981. The effect of various intakes of  $\omega$ -3 fatty acids on the blood lipid composition in healthy human subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 34, 1752-1757.
5. Adan, Y., K. Shibata, M. Sato, I. Ikeda and K. Imaizumi. 1999. Effects of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid on lipid metabolism, eicosanoid production, platelet aggregation and atherosclerosis in hypercholesterolemic rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 111-119.
6. Yamada, N., J. Shimizu, M. Wada, T. Takita and S. Innami. 1998. Changes in platelet aggregation and lipid metabolism in rats given dietary lipids containing different n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo).* 44, 279-289.
7. Kestin, M., P. Clifton, G. B. Belling and P. J. Nestel. 1990. N-3 fatty acids of marine origin lower systolic blood pressure and triglycerides but raise LDL cholesterol compared with n-3 and n-6 fatty acids from

- plants. *Am. J. Clin. Nutr.* 51, 1028-1034.
8. Weber, P. C. and A. Leaf. 1991. Cardiovascular effects of omega 3 fatty acids. In: Simopoulos, A. P., R. R. Kifer, R. E. Martin and S. Barlow. (eds). *Health effects of  $\omega$ 3 polyunsaturated fatty acids in seafoods. World Review of Nutrition and Dietetics*, Basel, Karger, Vol. 66, pp. 218-232.
  9. Froyland, L., H. Vaagenes, D. K. Asiedu, A. Garras, O. Lie and R. K. Berge. 1996. Chronic administration of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid as ethyl esters reduced plasma cholesterol and changed the fatty acid composition in rat blood and organs. *Lipids* 31, 169-178.
  10. Harris, W. S., W. E. Connor, S. B. Inkeles and D. R. Illingworth. 1984. Dietary omega-3 fatty acids prevent carbohydrate-induced hypertriglyceridemia. *Metabolism* 33, 1016-1019.
  11. Illingworth, D. R., W. S. Harris and W. E. Connor. 1984. Inhibition of low density lipoprotein synthesis by dietary omega-3 fatty acids in humans. *Arteriosclerosis* 4, 270-275.
  12. Harris, W. S., W. E. Connor and M. P. McMurry. 1983. The comparative reductions of the plasma lipids and lipoproteins by dietary polyunsaturated fats : Salmon oil versus vegetable oils. *Metabolism*. 32, 179-184.
  13. Newman, R. E., W. L. Bryden, E. Fleck, J. R. Ashes, W. A. Buttemer, L. H. Storlien and J. A. Downing. 2002. Dietary *n*-3 and *n*-6 fatty acids alter avian metabolism: metabolism and abdominal fat deposition. *Br. J. Nutr.* 88, 11-18.
  14. Bourre, J. M., O. Dumont, G. Pascal and G. Durand. 1993. Dietary alpha-linolenic acid at 1.3 g/kg maintains maximal docosahexaenoic acid concentration in brain, heart and liver of adult rats. *J. Nutr.* 123,

1313-1319.

15. Bourre, J. M., O. S. Dumont, M. J. Piciotti, G. A. Pascal and G. A. Durand. 1992. Dietary alpha-linolenic acid deficiency in adult rats for 7 months does not alter brain docosahexaenoic acid content, in contrast to liver, heart and testes. *Biochim. Biophys. Acta* 1124, 119-122.
16. Hamosh, M. and N. Salem. 1998. Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids. *Biol. Neonate* 74, 106-120.
17. Simopoulos, A. P. 1991. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr.* 54, 438-463.
18. Neuringer, M. and W. E. Connor. 1986. N-3 fatty acids in the brain and retina ; Evidence for their essentiality. *Nutr. Rev.* 44, 285-294.
19. Singh, G. and R. K. Chandra. 1988. Biochemical and cellular effects on fish and fish oils. *Prog. Food Nutr. Sci.* 12, 371-419.
20. Tinoco, J. 1982. Dietary requirements and functions of alpha-linolenic acid on animals. *Prog. Lipid Res.* 21, 1-45.
21. Greiner, R. S., T. Moriguchi, B. M. Slotnick, A. Hutton and N. Salem. 2001. Olfactory discrimination deficits in n-3 fatty acid-deficient rats. *Physiol. Behav.* 72, 379-385.
22. Moriguchi, T., R. S. Greiner and N. Salem. 2000. Behavioral deficits associated with dietary induction of decreased brain docosahexaenoic acid concentration. *J. Neurochem.* 75, 2563-2573.
23. Weisinger, H. S., A. J. Vingrys and A. J. Sinclair. 1996. Effect of dietary n-3 deficiency on the electroretinogram in the guinea pig. *Ann. Nutr. Meta.* 40, 91-98.
24. Moriguchi, T., R. Greiner and N. Salem. 2000. Behavioral deficits associated with dietary induction of decrease brain docosahexaenoic acid concentration. *J. Neurochem.* 75, 2563-2573.

25. Neuringer, M., W. E. Connor, D. S. Lin, L. Barstad and S. Luck. 1986. Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal w3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4021-4025.
26. Salem, N., B. Litman, H-Y. Kim and K. Gawrisch. 2001. Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids* 36, 945-959.
27. Hibbeln, J. R. and N. Salem. 2001. Omega-3 fatty acids and psychiatric disorders. *In Fatty acids*, Mostofsky et al. editors, Humana Press Inc., Totowa. p 3-22.
28. WHO. 2002. *Nutrition and lifestyle opportunities for cancer prevention*. IARC press, Lyon. 156.
29. Birt, D. F. 1990. The influence of dietary fat on carcinogenesis : Lessons from experimental models. *Nutr Rev.* 48, 1-5.
30. Bartsch, H., J. Nair and R. Owen. 1999. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum : emerging evidence for their roles as risk modifiers. *Carcinogenesis.* 20, 2209-2218.
31. Roynette, C. E., P. C. Calder, Y. M. Dupertuis and C. Pichard. 2003. N-3 polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. *Clinical Nutrition*, In press.
32. Reddy, B. S. and S. Sugie. 1988. Effect of different levels of omega-3 and omega-6 fatty acids on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Cancer Res.* 48, 6642-6647.
33. Sasagawa, T., K. Kosai, Y. Ota, M. Mori and M. Okita. 2002. Influences of a dietary fatty acid composition on the emergence of glutathione S-transferase-P (GST-P) positive foci in the liver of carcinogen treated rats. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 67, 327-332.

34. Pryor, W. A. 1984. Free radicals in biology. *Academic Press*. VI. 371.
35. Fukuzawa, K. and Y. Takaishi. 1990. Antioxidant. *J. Act. Oxyg. Free Rad.* 1, 55-61.
36. Frei, B. 1994. Bovezymatic antioxidant defense systems. In Batural antioxidants in human health and disease, Briviba, K. and Sies, H.(eds). *Academic Press*, London, pp. 107-120.
37. Kim, Y. K. and K. J. Joo. 1994. EPA, DHA and tocopherols contents in fish oil products and fishes. *J. Kor. Soc. Food. Nutr.* 23, 68-72.
38. Kim, S. B., J. H. Kang and Y. H. Park. 1987. DNA damage of lipid oxidation products and its inhibition mechanism. *Korean Fish. Soc.* 20, 419-430.
39. Kang, J. H., D. M. Yeum, S. A. Choi, S. B. Kim and Y. H. Park. 1987. Formation of active oxygens by linoleic acid peroxidation. *Korean J. Food Sci. Technol.* 19, 471-474.
40. Kim, K. K. 1999. Thermal characteristics of agriculture and fisheries by low temperature vacuum dryer. Proceedings of the KSME 1999 Spring Annual Meeting. pp 1-6.
41. Kim, K. K., B. Y. Sung, H. S. Jung, S. Y. Choi and S. B. Moon. 2000. A study on the thermal characteristics of the large low temperature vacuum dryer for biological drying. *J. Kor. Soc. Marine Engineers.* 24, 427-434.
42. AOAC International. 2005. Official methods of anlysis of AOAC International 18th ed. AOAC International.
43. Folch, J., M. Lees and G. H. Sloane Stanley. 1957. A Simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
44. Morrison, W. R. and L. M. Smith. 1964. Preparation of fatty acid methyl

- esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res.* 5, 600-608.
45. Salem, N., M. Reyzer and J. Karanian. 1996. Losses of arachidonic acid in rat liver after alcohol inhalation. *Lipids* 31, 153-156.
46. Denizot, F. and R. Lang. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods.* 89, 271-277.
47. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 25, 1199-1200.
48. LeBel, C. P., H. Ischiropoulos and S. C. Bondy. 1992. Evaluation of the probe 2', 7'-Dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 5, 227-231.
49. Tsuchiya, M., M. Suematsu and H. Suzuki. 1994. *In Vivo* visualization of oxygen radical-dependent photoemission. *Methods Enzymol.* 233, 128-140.
50. Poot M., A. Verkerk., J. F. Koster and J. F. Jongkind. 1986. De novo synthesis of glutathione in human fibroblasts during in vitro ageing and in some metabolic diseases as measured by a flow cytometric method. *Biochim Biophys Acta.* 883, 580-584.
51. Green, L. C., D. A. Wagner, G. J. Logowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok and S. R. Tannenbaum. 1982. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. l Biochem.* 126, 131-138.
52. Kong, C. S., S. S. Bak, K. O. Jung, J. H. Kil, S. Y. Lim and K. Y. Park. 2005. Antimutagenic and anticancer effects of salted mackerel with various kinds of salts. *J. Kor. Fish. Soc.* 38, 281-285.
53. Han, D. S., H. G. Choi, J. I. Kang, H. J. Choi and S. H. Baek. 2008. Growth inhibitory effects of omega-3 unsaturated fatty acid against

- cancer cell lines. *J. Pharm. Soc. Korea* 52, 264-273.
54. Hwang, W. I., N. G. Baik, Y. K. Hwang and S. D. Lee. 1992. Antitumor and immunological effects of tuna extract. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 21, 353-366.
55. Shin, M. O., M. J. Ku and S. J. Bae. 2007. Cytotoxicity and quinone reductase activity stimulating effects of fin of *Thunnus Thynnus* extracts in various cancer cells. *Korean J. Nutr.* 40, 147-153.
56. Bokov, A., A. Chaudhuri and A. Richardson. 2004. The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech. Ageing Dev.* 125, 811-826.
57. Cavalca, V., G. Cighetti, F. Bamonti, A. Loaldi, L. Bortone, N. Novembrino, M. De Franceschi, R. Belardinelli and M. D. Guazzi. 2001. Oxidative stress and homocysteine in coronary artery disease. *Clin. Chem.* 47, 887-892.
58. Fenster, C. P., R. L. Weinsier, V. M. Darley-Usmar and R. P. Patel. 2002. Obesity, aerobic exercise, and vascular disease: the role of oxidant stress. *Obes. Res.* 10, 964-968.
59. Stuehr, H. H. J., N. S. Kwon, M. Weise and C. Nathan. 1991. Purification of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD-and FMN-containing flavoprotein. *Proc. Natl. Sci. USA.* 88, 7771.
60. McCartney-Francis, N., J. B. Allen, D. E. Mizel, Q. W. Xie, C. F. Nathan and S. M. Wahl. 1993. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 178, 749.
61. Weisz, A., I. Cicatiello and H. Esumi. 1996. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem. J.* 316, 209.



62. Jeong, Y. S., J. H. Hong and D. S. Byun. 1995. Antioxidant activity of different lipid extracts from mackerel viscera. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 24, 98-104.
63. Yeum, D. M. and Y. S. Kim. 1994. Antioxidative action of enzymatic hydrolysates of mackerel muscle protein. *Kor. J. Food & Nutr.* 7, 128-136.
64. Park, J. H., K. C. Kang, S. B. Baek, Y. H. Lee and K. S. Rhee. 1991. Separation of antioxidant compounds from edible algae. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 23, 256-261.
65. Yan X., T. Nagata and X. Fan. 1998. Antioxidative activities in some common seaweeds. *Plant Foods for Human Nutr.* 52, 253-262.
66. Lee, H. S., H. J. Kim, J. I. Choi, J. H. Kim, J. G. Kim, B. S. Chun, D. H. Ahn, Y. J. Chung, Y. J. Kim, M. W. Byun and J. W. Lee. 2008. Antioxidant activity of the ethanol extract from cooking drips of *Thunnus thynnus* by gamma irradiation. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 37, 810-814.

## 6. 맺음말

이 논문이 나오기까지 격려와 조언을 아끼지 않으신 임선영 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 해양환경생명과학부에 입학하여 지금까지 많은 가르침을 주신 교수님들께도 감사를 드리며, 지금 이 논문을 받으신 모든 분들께 고마운 마음을 전합니다. 현재를 발판삼아 더욱 노력하고, 발전하는 사람이 되겠습니다. 감사하고, 축복합니다.

