

## 지각 추출물이 quinone reductase 및 glutathion s-transferase의 유도활성에 미치는 영향

유미희 · 이인선<sup>1,\*</sup>

계명대학교 식품가공학 전공, <sup>1</sup>계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구(TMR) 센터

### Induction of Quinone Reductase and Glutathion S-transferase in Hepatoma Cells by *Citrus aurantium* Linn (Jikak) Produced in Cheju Island

Mi-Hee Yu and In-Seon Lee<sup>1,\*</sup>

Department of Food Science and Technology, School of Natural Science, Keimyung University  
<sup>1</sup>The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University

Phase II enzymes are transcriptionally induced by synthetic chemical agents and natural products, and such induction plays critical roles in protection against chemical carcinogens and other toxic xenobiotics. To discover natural products for use as cancer chemopreventive agents, the ability of *Citrus aurantium* Linn (Jikak) to induce activities of quinone reductase (QR) and glutathione S-transferase (GST) in wild-type murine hepatoma cell line (Hepa 1c1c7) and Ah-receptor-defective mutant of the same cell line (Bprc1) was investigated. Hexane and chloroform fractions of *C. aurantium* Linn (Jikak) at doses not exhibiting cytotoxicity were effective inducers of QR (~1.8-fold) and GST (~1.5-fold) in Hepa 1c1c7 cells, whereas showed low QR induction potency in Bprc1 cells, which indicates they have weak monofunctional action. Results suggest *C. aurantium* Linn (Jikak) as potentially useful cancer chemopreventive agent.

**Key words:** *Citrus aurantium* Linn (Jikak), quinone reductase, glutathione S-transferase

## 서 론

최근 식품 및 천연물을 이용한 생리활성 물질의 검색 및 그 작용기작에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 암을 예방하거나 치료할 수 있는 화학적 암예방법에 관한 연구가 계속적으로 진행되고 있다(1). 그 항암 기작 중 대표적인 것으로 체내 독성물질이나 발암물질을 무독화 시키는 NADP(H):quinone reductase(QR)와 glutathione S-transferase(GST) 및 UDP-glucuronosyltransferase 등의 phase II 효소계의 활성유도와 phase I 효소계인 cytochrome P450 효소활성 억제, glutathion 생성, transformed cell에서 그 함량이 증가되는 polyamine 생성억제 등을 들 수 있다(2). QR은 GST와 함께 간세포에서 주로 생성되는 phase II 효소계의 한 종류로 quinone을 환원시켜 무독하게 만들고 세포내에 유도되어 여러 돌연변이 물질에 의해 일어나는 돌연변이와 종양화를 막아주고 발암물질을 무독하게 하

는 역할을 한다(3). QR을 유도하는 활성 성분으로는 polycyclic aromatic hydrocarbons, flavonoids, azo dyes, diphenols, thiocarbamates, isocyanates, 1,2-dithiol-3-thiones 계통의 화합물 등이 밝혀져 있다(4,5). 그러나 이들 중 phase II 효소계의 유도와 함께 phase I 효소계의 활성을 동시에 유도해내는 성분들을 bifunctional inducer로 분류하여 phase II 효소계만 선택적으로 유도해내는 monofunctional inducer와 구분하고 있다(6).

우리나라에서는 200여종 이상의 한방 생약제가 암 환자에게 처방되고 있음이 통계적으로 밝혀졌고, 수종의 한약재와 향신료, 채소류, 과일류 등에서 항암 작용이 보고되고 있다(7). 많은 과학자들이 일부 한국에 자생하는 약용식물 및 식용식물 추출물의 항암 효과에 관한 연구를 보고한 바 있으며, 중국이나 일본에서도 각 나라의 자생 식용식물의 항암성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 식용식물의 QR 유도활성에 대해서는 최근 수년간 연구가 활성화되면서 sulforaphane(4), brassinin(8) 및 sulforamate(9) 등의 주요 성분들이 분리 확인되었다. 미국에서는 주로 채소류를 이용하여 연구를 진행하여 몇 가지 새로운 flavonoid 화합물을 분리하였으며, 80종 이상의 천연 또는 합성 flavonoid 화합물에 대한 실험 결과 flavone의 단순한 유도체인 4'-bromoflavone이 강력한 QR inducer로 밝혀지기도 하였다(10). 그러나 QR 및 GST 유도활성에 대해서 우리나라를

\*Corresponding author: In-Seon Lee, The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University, 1000 Sindang-dong, Dalseo-gu, Daegu 704-701, Korea  
Tel: 82-53-580-5906  
Fax: 82-53-580-5538  
E-mail: inseon@kmu.ac.kr

비롯한 동북아시아 지역에서는 주로 약용식물에 국한되어 연구가 되고 있는 경향이며, 각 국에 자생하는 산채류, 채소류 및 과일류에 대한 연구는 아직까지 보고된 바가 거의 없는 실정이다.

한편 감귤은 운향과(Rutaceae)에 속하는 감귤류의 열매로서 유기산과 당분의 독특한 향미를 지니고 있고, 우리나라에서는 제주지방에서 다량 생산되고 있다. 우리나라 제주도에서 자생하는 지각, 당유자, 산귤, 청귤 등의 감귤류는 예로부터 독이 없고 위 속에 악기를 없애며 술독을 풀어 주고 입맛을 좋게 한다고 알려져 있으며, 지각은 동의보감에 의하면 맛은 쓰고 시며, 독이 없고 주로 가슴속의 담체를 없애주고, 대장과 소장을 통리한다고 알려져 있다(11). 또한 감귤에는 다량의 Vitamin C 와 flavonoid, limonoid 및 carotenoid 등이 함유되어 있으며(12), 이들의 생리활성물질로서 항알러지성, 항염성, 항바이러스성, 항산화성 및 항암성 등의 기능성이 알려지고 있다(13-15).

따라서, 본 연구에서는 제주도에서 자생하는 지각, 당유자, 산귤, 청귤의 감귤류를 이용하여 각각의 메탄올 추출물을 제조한 다음, 대표적인 암예방 효소로 알려진 quinone reductase 및 glutathione S-transferase의 유도활성을 검색하여 암예방 효과를 가진 기능성 식품으로의 개발을 위한 기초적 자료로 살펴보았다.

## 재료 및 방법

### 시료의 제조 및 분획

본 실험에 사용된 지각[Citrus aurantium Linn (Jikak)], 당유자[C. grandis Osbeck (Dangyooja)], 산귤[C. sunkin Hort. ex Tanaka (Sankyul)], 청귤[C. nippokoreana Tanaka (Chungkyul)] 등의 감귤류(Table 1)는 제주도 감귤시험장으로부터 구입하여 사용하였다. 먼저 각 시료를 10배 용량의 80% methanol과 혼합하여 24시간 동안 정치 추출하고, 이를 총 3회 반복 추출하였다. 추출액은 여과지(Whatman No. 1, England)를 사용하여 2회 여과하고 회전감압 농축기(R-3000, Buchi, Switzerland)로 농축하여 동결건조를 한 후 분말화하여 본 실험의 시료로 사용하였다. 메탄올 추출물을 물에 녹인 후 극성이 서로 다른 용매(hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol)를 이용하여 순차 분획 후 각각 농축하고 동결건조 함으로써 각 용매에 대한 분획물을 얻었다.

### 세포주 및 배양

본 실험에 사용한 세포주로는 마우스 유래의 간암 세포주인 Hepa 1c1c7(murine hepatoma cell line), Bprcl(Ah-receptor-defective mutant of Hepa 1c1c7 cell line), 인간 유래의 간암 세포주인 Hep G2(human hepatoma cell) cells 로써, 이는 한국 세포주 은행으로부터 분양 받았으며, 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% antibiotics(penicillin/streptomycin)를 첨가한 MEM 배지를 이용하여 5% CO<sub>2</sub>가 존재하는 37°C 배양기에서 1주일 에 2-3회 계대 배양하였다.

### 세포독성 측정

Quinone reductase 유도활성 측정에 앞서 시료처리 농도를 결정하기 위한 각 시료의 세포독성은 Green 등(16)의 방법에 준한 MTT(3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) assay를 실시하여 측정하였다. 먼저 배양한 세포를 0.4% trypan blue 염색법으로 세포수를 측정 한 후 1×10<sup>4</sup> cells/well의 농도로 96-well microtiter plate의 각 well에 200 μL씩 분주하고 24시간 배양 후 배지를 제거하였다. 여기에 새로운 MEM배지

Table 1. Citrus used in this study

Citrus	Scientific name
지각	<i>Citrus aurantium</i> Linn (Jikak)
당유자	<i>Citrus grandis</i> Osbeck (Dangyooja)
산귤	<i>Citrus sunkin</i> Hort. ex Tanaka (Sankyul)
청귤	<i>Citrus nippokoreana</i> Tanaka (Chungkyul)

200 μL에 녹인 농도별 시료를 각 well에 첨가하였다. 시료가 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 후, MTT(5 mg/mL) 용액 10 μL를 각 well에 가하고 4시간 동안 배양한다. 배양 종료 후 상등액을 제거하고 각 well에 100 μL의 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 microplate reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 표시하였다.

### 세포내 QR 활성 측정

세포내 QR의 활성은 Benson 등(17)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 배양한 세포를 0.4% trypan blue 염색법으로 세포수를 측정 한 후 1×10<sup>4</sup> cells/well의 농도로 96-well microtiter plate의 각 well에 200 μL씩 분주하고 24시간 배양 후 배지를 제거하였다. 여기에 새로운 MEM배지 200 μL에 녹인 농도별 시료를 각 well에 첨가한다. 시료가 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 후, 배양액을 제거하고 pH 7.4의 phosphate buffered saline (PBS)로 3회 세척한 다음, 3회의 freeze-thaw cycles에 의해 세포를 용해시켰다. 세포를 용해시킨 후 각 well에 50 μL의 2% triton X-100을 첨가한 후 microplate shaker를 이용하여 300 rpm에서 10분간 흔들어 준다. 여기에 반응액 200 μL(증류수를 첨가한 최종 150 mL에 대해 7.5 mL의 0.5 μM Tris-HCl(pH 7.4), 100 mg의 BSA, 1.0 mL의 1.5% Tween-20, 0.1 mL의 7.5 mM FAD, 1.0 mL의 150 mM glucose-6-phosphate, 90 μL의 50 mM NADP, 300 units의 yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase, 45 mg의 MTT 및 150 μL의 50 mM menadione 함유)를 각 well에 첨가하고 5분간 반응시켰다. 반응 후, 0.5% DMSO에 녹인 0.3 mM dicumarol과 5 mM potassium phosphate가 함유된 용액 50 μL를 첨가하여 반응을 중지시키며, microplate reader를 이용하여 610 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Quinone reductase의 활성비(specific activity)는 환원된 MTT와 crystal violet에 의한 흡광도로 산정하고, QR 유도활성은 시료를 처리하지 않은 대조군의 QR 활성에 대한 시료를 처리한 QR 활성의 비로 나타낸다. 활성비의 계산은 다음과 같다.

$$\text{Specific activity} = [\text{absorbance change of MTT}/\text{min} \times 3,345 \text{ nmoles}/\text{mg of protein}] / \text{absorbance of crystal violet}$$

이때 도입된 3,345 nmoles/mg of protein은 crystal violet과 MTT의 흡광계수로부터 계산된 비례상수이다.

### 세포내 GST 활성 측정

세포내 GST 활성은 Habig 등(18)의 방법을 변형하여 측정하였으며, 사용된 세포주 및 배양조건은 QR 활성 측정 실험과 동일하였다. 세포를 용해시킨 후 각 well에 50 μL의 2% triton X-100을 첨가하고 microplate shaker를 이용하여 300 rpm에서 10분간 흔들어 주었다. 여기에 GST 활성 측정을 위한 반응액[0.1 M potassium phosphate buffer에 녹인 2.5 mM GSH와 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB), pH 6.5 함유] 100 μL를 첨

가하고 1분간 microplate shaker에서 흔들어 준 다음, 405 nm에서 5분간 흡광도의 증가를 측정하였다. GST 활성은 slope/min/mg of protein으로 계산하여 대조군의 GST 활성에 대한 시료를 처리한 GST 활성의 비로 나타내었다.

**Crystal violet 염색**

단백질 함량 및 살아있는 세포에 의한 QR의 유도활성만을 측정하기 위한 crystal violet 염색은 Drysdale 등(19)의 방법에 준하여 실시하였다. QR 활성 측정을 위한 앞 실험과 동일하게 96-well plate에 세포를 접종하여 24시간 배양한 후 시료를 처리하고 48시간 배양한다. 배양 후 배지를 제거하고, PBS로 3회 세척한 다음 2% 에탄올에 녹인 0.2%(w/v) crystal violet에 10분간 담근 후 2분간 흐르는 물에 씻는다. 여기에 50% 에탄올에 녹인 0.5%(w/v) sodium dodecyl sulfate(SDS)를 200 µL씩 각 well에 첨가하고 37°C의 CO<sub>2</sub> incubator에서 1시간 반응시킨 후 610 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**통계처리**

이상의 모든 실험 측정치는 3번 반복 실시하여 그 평균값으로 나타내었으며, 실험결과는 SAS program을 이용하여 분산 분석한 후 유의차가 있는 항목에 대해서는 Duncan's multiple range test로 p < 0.05 수준에서 시료간의 유의차를 검정하였다.

**결과 및 고찰**

**Hepa 1c1c7, Hep G2 세포에 대한 감귤류의 세포독성**

Hepa 1c1c7 및 Hep G2 세포에 대한 감귤류 메탄올 추출물의 세포독성을 알아보고, 세포독성을 나타내지 않는 최대 시료 농도를 결정하기 위하여 세포독성을 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 시료 종류별, 세포 종류별에 따른 독성의 차이는 나타나지 않았고, 메탄올 추출물의 최대농도인 200 µg/mL에서도 독성을 나타내지 않았다. 따라서 시료의 QR 및 GST 활성유도 실험에는 세포독성을 나타내지 않는 50, 100, 200 µg/mL의 농도를 적용하였다.

**Hepa 1c1c7, Hep G2 세포에 대한 감귤류의 QR 유도 활성**

암예방 효소계의 하나인 QR 효소의 활성을 증가시키는 시료에 대한 검색결과는 Fig. 2와 같다. 총 4종의 감귤류 중 mouse 유래의 Hepa 1c1c7 세포주에서는 지각 추출물의 QR 활성이 200 µg/mL에서 1.6배 이상으로 증가되었으며 당유자, 산귤, 청귤 추출물의 QR 활성은 200 µg/mL의 농도에서 각각 1.3, 1.1, 1.4배 정도로 나타났다. 그러나 인간 유래 Hep G2 세포주에서는 모든 시료에서 QR의 유도활성이 낮았다. 이들 4종의 감귤류와 활성이 이미 우수한 QR inducer로 알려진 β-naphthoflavone(β-NF)과 비교하기 위하여 β-NF에 대하여 QR 유도 활성을 측정된 결과, Hepa 1c1c7 세포주에서는 2 µM의 농도로 처리할 때 2.5배의 활성을 보였고, Hep G2 세포주에서는 0.5 µM의 농도일 때 1.7배의 활성을 나타내었다(Fig. 2). 이러한 QR 유도활성의 결과는 김(20) 등이 genistein의 QR 유도활성 연구에서 대조구로서 β-NF에 대한 QR 활성을 실험한 결과와 유사한 경향이였다. 본 연구에서 활성이 확인된 지각 추출물의 QR 유도활성은 QR inducer인 β-NF 보다는 높지 않았지만, 다른 3종의 감귤류에 비해 높은 QR 유도활성을 가지기 때문에 이를 여러 가지 유기용매에 각각 분획하여 세포주별 QR 및 GST 활성을 조사하였다.

**지각 분획물의 수득율**

QR 유도활성이 가장 우수하였던 지각의 메탄올 추출물 5g을 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol 및 수층의 용매별로 분획하여 hexane층은 0.0618 g(1.2%), chloroform 층은 0.0982 g(2.0%), ethyl acetate 층은 0.2278 g(4.6%), butanol 층은 2.0702 g(41.4%)을 얻었고, 나머지 수층은 2.3158 g(46.3%)의 분획물을 얻었다.

**지각 분획물의 QR 및 GST 유도 활성**

마우스 유래 간암세포주인 Hepa 1c1c7 세포주에 대한 지각 분획물의 QR 및 GST 유도활성은 Fig. 3과 같다. 대표적인 QR inducer로 알려진 β-NF의 QR 활성은 2 µM의 농도에서 2.7배로 높게 나타났으며, GST 활성은 1.2배에 그쳤다. 한편 지각 분획

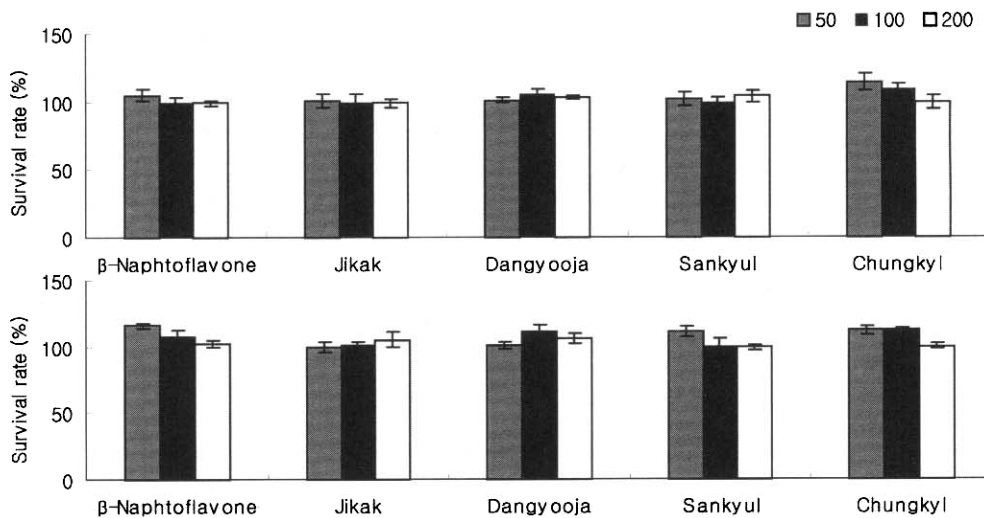


Fig. 1. Survival rate of Hepa1c1c7 cells (Up) and Hep G2 cells (Down) treated with extracts (50-100-200 µg/mL, β-Naphtoflavone; 0.5-1-2 µM) from four citrus fruits.

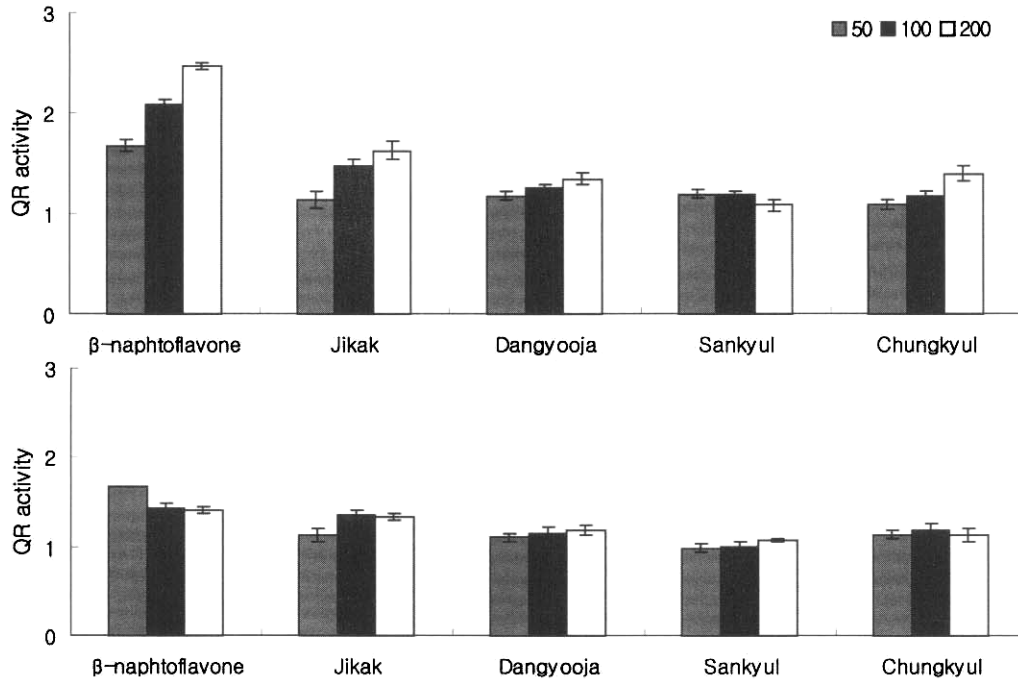


Fig. 2. QR activity of Hepa1c1c7 cells (Up) and Hep G2 cells (Down) treated with extracts (50-100-200 μg/mL, β-Naphtoflavone; 0.5-1-2 μM) from four citrus fruits.

Table 2. Recovery yields of various solvent fractions from methanol extract of *Citrus aurantium* Linn (Jikak)

Extract	Weight (g) of fraction recovered (%)				
	Hexane	Chloroform	Ethyl acetate	Butanol	Water
Methanol					
5 <sup>1)</sup>	0.0618 (1.2)	0.0982 (2.0)	0.2278 (4.6)	2.0702 (41.4)	2.3158 (46.3)

<sup>1)</sup>5 g of powdered methanol extract was dissolved in distilled water and partitioned with hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol in order.

물 중 hexane 층에서 1.9배의 높은 QR 유도활성을 보였으며, chloroform 층에서도 약 1.8배의 QR 활성을 보였다. 또한 GST의 유도활성에서도 hexane 층 및 chloroform 층에서 약 1.5배 이상의 활성을 나타내었다.

인간 유래 간암세포주인 Hep G2 세포주에서는 여러 가지 감귤류의 메탄올 추출물과 마찬가지로 지각의 분획물에서도 QR 및 GST의 활성이 거의 증가하지 않았으나(Fig. 4), chloroform 층의 200 μg/mL의 농도에서는 GST 유도활성이 1.7배 이상으로 증가하였는데, 이와 같은 결과는 세포종에 따른 차이로 생각된다.

김 등(21)은 한국산 채소들의 메탄올 추출물을 이용하여 QR 유도활성을 측정한 결과, 다수의 채소에서 1.4배 이상의 활성 증가를 보고하였고, Williamson 등(22)은 여러 가지 과일과 야채들의 GST 유도활성을 측정한 결과, cabbage와 brussels sprouts에서 약 1.6배 이상의 활성 증가를 보고하였으며, Hashimoto 등(23)은 ashitaba(明日葉)의 약 1.42배의 QR 활성의 증가를 보고하였다. 이들과 비교했을 때 지각의 분획물은 대표적인 암예방 효소인 QR 및 GST의 유도활성능이 매우 뛰어난 것을 알 수 있었다.

한편, 여러 항암성분들은 2상 효소계만을 활성화시키는 monofunctional inducer와 1상 효소계를 함께 활성화시키는 bifunctional inducer로 나뉘어진다. Bifunctional inducer는 세포질에 존재하는 Ah 수용체단백질에 결합하여 cytochrome P 450을

포함한 1상 효소계의 유전자에 작용하여 효소합성을 촉진하며, 유도된 1상 효소계에 의해서 대사된 화합물은 monofunctional inducer와 유사한 기작으로 2상 효소계를 활성화시키는 것으로 추정하고 있다. Monofunctional inducer는 Ah 수용체와는 독립적으로 2상 효소계만을 선택적으로 유도하는데, procarcinogen의 bioactivation과는 관련이 없으므로 bifunctional inducer 보다 항암활성이 더 우수한 것으로 알려져 있다(5,24-25). 2상 효소계만을 활성화시키는 monofunctional inducer와 1상 효소계를 함께 활성화시키는 bifunctional inducer를 구별하기 위해 1상 효소계의 유도가 억제되는 Hepa 1c1c7 세포의 변이주인 Bprc1 세포주를 이용하여 지각 분획물의 QR 및 GST 유도활성을 살펴본 결과는 Fig. 5와 같다. Bprc1 세포주에서는 Methanol 추출물과 분획물의 수층에서 QR 활성이 각각 1.3, 1.4배 이상으로 유도되었다. GST의 유도활성은 모든 분획물에서 약 1.2배의 증가를 보였다. 따라서 지각의 분획물의 항암성분은 monofunctional inducer보다는 bifunctional inducer에 더 가까운 것으로 생각된다. 모든 세포주에 대한 QR 및 GST 활성을 비교한 결과(Table 3)에서 알 수 있듯이 지각 분획물은 bifunctional inducer로써 Hepa 1c1c7 세포주에서 높은 QR, GST 활성을 가지며, 특히 hexane 및 chloroform 층에서 그 활성이 증가하는 경향을 보였다. 이와 같은 연구 결과들을 바탕으로 현재 지각의 hexane 층이나, chloroform 층에 존재하는 QR 및 GST의 유도활성 물질을 분리·정제하여 앞으로 계속적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

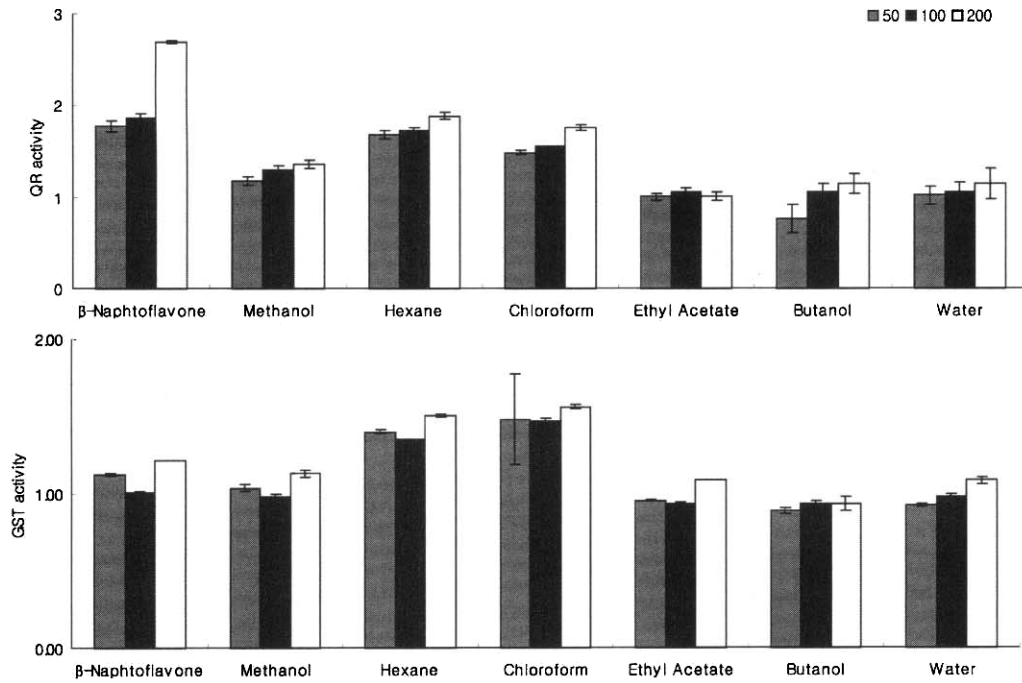


Fig. 3. Induction of QR and GST activities in Hepa1c1c7 cells by various fractions (50-100-200 µg/mL, β-Naphtoflavone; 0.5-1-2 µM) from *Citrus aurantium* Linn (Jikak).

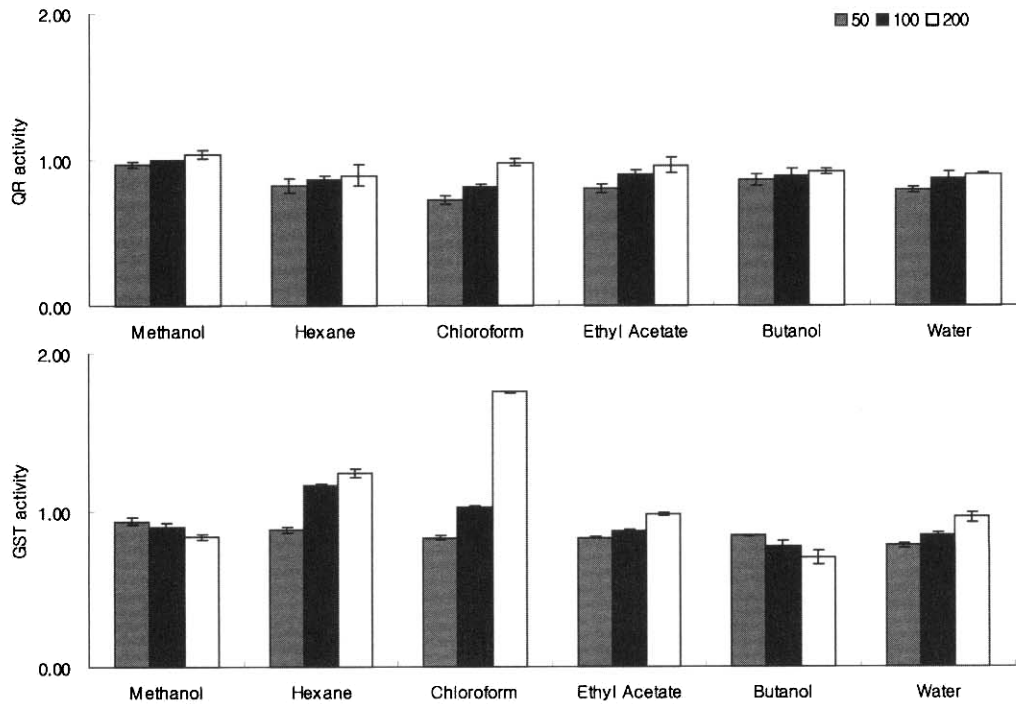


Fig. 4. Induction of QR and GST activities in Hep G2 cells by various fractions (50-100-200 µg/mL) from *Citrus aurantium* Linn (Jikak).

요 약

Phase II 효소계는 자연계에 존재하는 다양한 화학물질과 천연소재들에 의해 유도되며, 이들의 유도는 화학적 발암물질과 그 밖의 여러 가지 독성물질들로부터 생체를 보호하는데 중요한 역할을 한다. 특히, phase II 효소 중 QR은 quinone류 자체에 대한 보호효과가 있고 다른 암예방 효소계와 공통으로 유도되며, 항암 작용이 있는 많은 화합물에 의해 유도되어지기

때문에 암예방 물질 탐색의 지표가 되는 대표적인 효소로 많이 이용된다. 본 연구에서는 제주도에서 자생하는 굴류 중 지각을 이용하여 메탄올추출물을 제조한 후 대표적인 암예방계 효소로 알려진 quinone reductase 및 glutathion S-transferase의 유도 활성을 조사하였다. 우선 QR 및 GST 유도활성 측정에 앞서 각 시료의 Hepa 1c1c7 세포에 대한 독성을 조사하여 시료자체의 세포독성을 관찰하였으며, 이 결과를 바탕으로 QR, GST 유도 활성을 측정할 시 세포독성을 거의 나타내지 않는

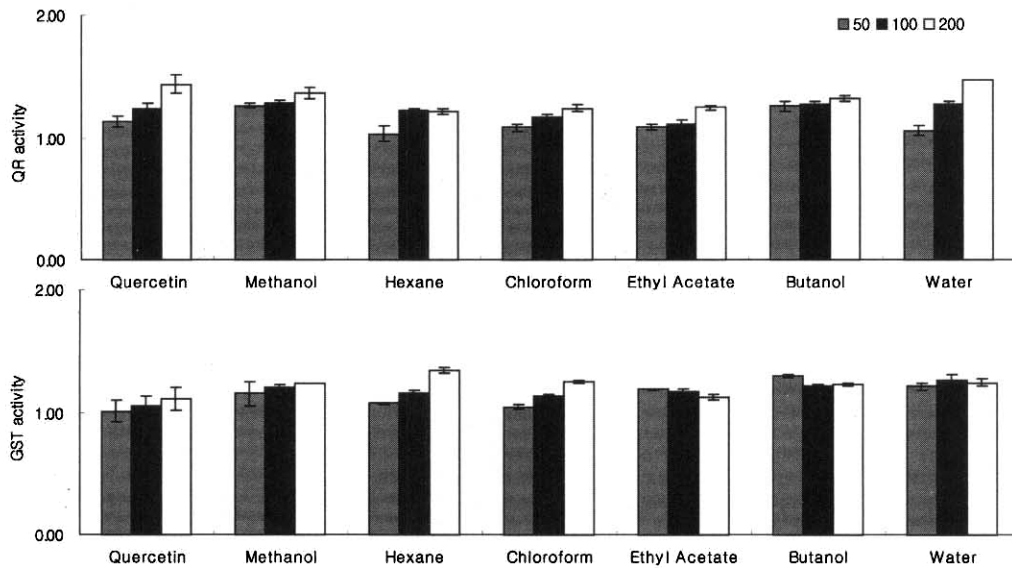


Fig. 5. Induction of QR and GST activities in Bprc1 cells by various fractions (50-100-200 µg/mL, Quercetin; 10-20-40 M) from *Citrus aurantium* Linn (Jikak).

Table 3. Comparison of QR and GST activities of various fractions from *Citrus aurantium* Linn (Jikak) in Hepa 1c1c7, Hep G2, and Bprc1 cells

Fractions	Concentration (µg/mL)	Hepa 1c1c7		Hep G2		Bprc1	
		QR (-fold)	GST (-fold)	QR (-fold)	GST (-fold)	QR (-fold)	GST (-fold)
Methanol	100	1.30 ± 0.04 <sup>d,1)</sup>	0.98 ± 0.01 <sup>d</sup>	1.00 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.90 ± 0.02 <sup>d</sup>	1.29 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.20 ± 0.03 <sup>b</sup>
	200	1.36 ± 0.04 <sup>d</sup>	1.13 ± 0.02 <sup>d</sup>	1.04 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.83 ± 0.01 <sup>d</sup>	1.36 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.24 ± 0.00 <sup>b</sup>
Hexane	100	1.72 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.34 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.87 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.16 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.22 ± 0.02 <sup>d</sup>	1.16 ± 0.01 <sup>b</sup>
	200	1.89 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.50 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.90 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.25 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.21 ± 0.02 <sup>d</sup>	1.34 ± 0.02 <sup>a</sup>
Chloroform	100	1.56 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.46 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.81 ± 0.24 <sup>a</sup>	1.03 ± 0.01 <sup>d</sup>	1.17 ± 0.03 <sup>d</sup>	1.13 ± 0.02 <sup>b</sup>
	200	1.76 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.56 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.99 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.75 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.24 ± 0.03 <sup>c</sup>	1.25 ± 0.01 <sup>b</sup>
Ethyl Acetate	100	1.06 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.93 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.91 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.87 ± 0.01 <sup>d</sup>	1.11 ± 0.04 <sup>d</sup>	1.17 ± 0.03 <sup>b</sup>
	200	1.01 ± 0.04 <sup>c</sup>	1.09 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.97 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.98 ± 0.01 <sup>d</sup>	1.24 ± 0.02 <sup>c</sup>	1.12 ± 0.02 <sup>b</sup>
Butanol	100	1.05 ± 0.09 <sup>c</sup>	0.93 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.89 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.77 ± 0.03 <sup>d</sup>	1.28 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.22 ± 0.01 <sup>b</sup>
	200	1.15 ± 0.10 <sup>c</sup>	0.93 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.92 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.70 ± 0.04 <sup>d</sup>	1.32 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.23 ± 0.01 <sup>b</sup>
Water	100	1.05 ± 0.11 <sup>c</sup>	0.98 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.88 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.85 ± 0.02 <sup>d</sup>	1.27 ± 0.02 <sup>c</sup>	1.26 ± 0.05 <sup>b</sup>
	200	1.15 ± 0.17 <sup>c</sup>	1.08 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.91 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.96 ± 0.03 <sup>d</sup>	1.47 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.24 ± 0.03 <sup>b</sup>

Different superscripts in the same column indicate significant differences between groups at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple comparison test.

각각 시료의 최대 처리 농도를 결정하였다. 총 6개의 지각 분획물 중 mouse 유래 Hepa 1c1c7 세포주에서는 hexane 층과 chloroform 층에서 QR, GST의 활성이 200 µg/mL에서 각각 1.8배, 1.5배 이상으로 증가되어 높은 QR 및 GST의 유도활성을 보였다. 따라서 지각의 hexane 층이나 chloroform 층에 존재하는 높은 QR 및 GST의 유도활성이 나타나는 물질을 분리·정제하여 앞으로 지속적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

### 감사의 글

본 연구는 계명대학교 대학원 학생학술연구장학금 및 과학기술부·한국과학재단 지정 계명대학교 전통 미생물자원 개발 및 산업화 연구센터의 지원에 의해 수행되었음에 감사드립니다.

### 문헌

- Kang GI. The conception by drugs of medical action and activity. pp. 245, 286-302. Hiseongchulpansa, Seoul, Korea (1993)
- Talalay P, Benson AM. Elvation of quinone reductase activity by anticarcinogenic antioxidants. Adv. Enzyme Reg. 20: 287-300 (1982)
- Wefers H, Komai T, Talalay P, Sies H. Protection against reactive oxygen species by NAD(P)H: quinone reductase induced by the dietary antioxidant butylated hydroxyanisole (BHA). FEBS Lett. 169: 63-66 (1984)
- Prochaska HJ, Santamaria AB. Direct measurement of NAD(P)H: Quinone reductase from cells cultured in microtiter well: A screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. Anal. Biochem. 169: 328-336 (1988)
- Zhang Y, Talalay P, Cho CG, Posner GH. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: Isolation and

- elucidation of structure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 2399-2403 (1992)
6. Prochaska HJ, Talalay P. Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver. Cancer Res. 48: 4776-4782 (1988)
  7. Kwak YJ, Jun HJ, Kwon TW, Kim JS. Modulation of anticarcinogenic enzyme and plasma testosterone level in male mouse fed leek-supplemented diet. Korean J. Food Sci. Nutr. 27: 968-972 (1998)
  8. Mehta RG, Liu J, Constantinou A, Thomas CF, Hawthorne M, Gerhuser C, Pezzuto JM, Moon RC, Moriarty RM. Cancer chemopreventive activity of brassinin, a phytoalexin from cabbage. Carcinogenesis 16: 399-404 (1995)
  9. Gerhuser C, You M, Liu J, Moriarty RM, Hawthorne M, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive potential of sulforamate, a novel analogue of sulforaphane that induces phase 2 drug-metabolizing enzymes. Cancer Res. 57: 272-278 (1997)
  10. Kim SM, Ryu SH, Choi HD, Kim SS, Kim JH, Kim JS. Screening for Korean vegetables with anticarcinogenic enzyme inducing activity using cell culture system. Korean J. Food Sci. Nutr. 27: 277-281 (1998)
  11. Koh JS, Kim SH. Physicochemical properties and chemical compositions of citrus fruits produced in Cheju, Agric. Chem. Biotechnol. 38: 541-545 (1995)
  12. Hwang HJ, Yoon KR. Carotenoid pigment of citrus fruits cultivated in Korea. Food Biotechnol. 27: 950-957 (1995)
  13. Eun JB, Jung YM, Woo GJ. Identification and determination of dietary fibers and flavonoids and peel of Korean Tangerine (*Citrus aurantium* var.). Korean J. Food Sci. Technol. 28: 371-377 (1996)
  14. Oshiba J, Kato M. Nutritional regulation III, depression of cardiac action by the isolated naringin, Mukogawa Joshidaigaku Kiyo. 29: 1-8 (1981)
  15. Oh HS, Park WB, An YS, Oh MC, Oh CK, Kim SH. Antimicrobial activity of extracts from citrus seeds. Korean J. Culinary Res. 9: 69-80 (2003)
  16. Green LM, Reade JL, Ware CF. Rapid colorimetric assay for cell viability: Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. J. Immunol. Method 70: 257-268 (1984)
  17. Benson A, Hunkeler MJ, Talay P. Increase of NAD(P)H: quinone reductase by dietary antioxidants. Possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5216-5220 (1980)
  18. Habig WH, Pabist MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferase: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem. 25: 7130-7139 (1974)
  19. Drysdale BE, Zacharchuk CM, Okajima M, Shin HS. In Methods in Enzymology (Di Sabato G, and Eberse T., Eds.). Academic press: Orlando. FL. 132: 549-555 (1986)
  20. Kim JS, Nam YJ, Kwon TW. Induction of quinone reductase activity by genistein, soybean isoflavone. Food Sci. Biotech. 5: 70-75 (1996)
  21. Kim HS, Kacew S, Lee BM. *In vitro* chemopreventive effects of plant polysaccharides (*Aloe barbadensis* Miller, *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum* and *Coriarius versicolor*). Carcinogenesis 20: 1637-1640 (1999)
  22. Williamson G, DuPont MS, Wanigatunga S, Heaney RK, Musk SRR, Fenwick GR, Hodes MJC. Induction of glutathione S-transferase activity in hepG2 cells by extracts from fruits and vegetables. Food Chem. 60: 157-160 (1997)
  23. Hashimoto K, Kawamata S, Usui N, Tanaka A, Uda Y. *In vitro* induction of the anticarcinogenic marker enzyme, quinone reductase, in human hepatoma cells by food extracts. Cancer Lett. 180: 1-5 (2002)
  24. Talalay P, De Long MJ, Prochaska HJ. Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8261-8265 (1988)
  25. Spencer SR, Wilczak CA, Talalay P. Induction of glutathione transferases and NAD(P)H: Quinone reductase by fumaric acid derivatives in rodent cells and tissues. Cancer Res. 50: 7871-7875 (1990)

---

(2004년 10월 12일 접수; 2005년 3월 15일 채택)