

## 녹황색 채소류의 돌연변이유발 억제 및 AZ-521 위암세포의 성장 저해효과

박건영<sup>†</sup> · 이경임 · 이숙희

부산대학교 식품영양학과

### Inhibitory Effect of Green-Yellow Vegetables on the Mutagenicity in *Salmonella* Assay System and on the Growth of AZ-521 Human Gastric Cancer Cells

Kun-Young Park<sup>†</sup>, Kyeong-Im Lee and Sook-Hee Rhee

Dept. of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

#### Abstract

The antimutagenic effect of green-yellow vegetables on the mutagenicities induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG) and N-nitrosodimethylamine(NDMA) in *Salmonella* assay system and also their inhibitory effect on AZ-521 human gastric cancer cells were studied. Twenty-four items from twenty six kinds of vegetables(92%) revealed antimutagenic activity toward MNNG( $p < 0.01, 0.05$ ). Perilla leaf, Korean cabbage, cauliflower, lettuce, mustard leaf, water dropwort, small water dropwort, carrot and burdock inhibited the mutagenicity more than 80%. The methanol extracts of the vegetables also showed the antimutagenic activity toward NDMA ( $p < 0.01, 0.05$ ). Especially, perilla leaf, kale, soybean sprout and onion inhibited more than 80% of the NDMA induced mutagenicity in *S. typhimurium* TA100. Small water dropwort and perilla leaf exhibited the strong inhibitory effect (97~100%) on the growth of the AZ-521 human gastric cancer cells. Soybean sprout, water dropwort, broccoli, crown daisy, green red pepper, red pepper leaves, spinach, cabbage and sweet potato also inhibited growth of the cancer cells ( $p < 0.001-0.05$ ).

**Key words** : green-yellow vegetables, antimutagenic, MNNG, NDMA, gastric cancer cells

#### 서 론

산업이 발달되면서 우리나라의 암발생이 최근에 급격히 증가되고 있다. 특히 위암은 발생율이 가장 높는데 통계청 보고에 의하면 일본 다음으로 높아 세계 제 2위의 발생율을 나타내고 있다. Joossens과 Kesteloot<sup>1)</sup>는 위암의 위험인자는 NO<sub>3</sub>/NO<sub>2</sub>, 소금, 절인식품, 훈제식품, 고탄수화물식품이라 하였고 예방인자는 신선한 채소류, 고도 불포화 지방산(PUFA), 섬유소, 비타민

C 등이라 하였다. 최근 중국에서 위암과 관련한 역학 조사의 연구 결과에 의하면 채소류의 소비증대는 위암 발생을 크게 감소시키는 부의 상관관계를 가지고 있는데 특히 배추섭취는 위암발생감소에 중요한 역할을 한다고 하였다<sup>2)</sup>.

녹황색 채소류는 위암뿐 아니라 다른 여러 암 발생과 관련하여 예방적인 역할을 하는데 Bresnick 등<sup>3)</sup>에 의하면 양배추 식이를 섭취한 쥐는 위암 발생을 크게 감소시켰으며 유방종양세포가 폐로 전이되는율을 감소시켜<sup>4)</sup> 암예방에 십자화과의 채소류는 중요한 역할을

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

한다고 하였다. 또한 동결건조한 양배추를 먹인 쥐군에  $^3\text{H}$  아플라톡신 B<sub>1</sub>을 투여하여 2시간뒤 hepatic DNA에 대한 아플라톡신 B<sub>1</sub>의 결합능을 검토한결과 87%나 감소되었다고 하였다<sup>5)</sup> 녹황색 채소류, 특히 당근에 많이 들어 있는  $\beta$ -caratene은 식도암<sup>6)</sup>, 폐암<sup>7)</sup>, 전립선암<sup>8)</sup> 등에 역학적으로 부의 관련성을 가지고 있다고 하였으며 비트, 시금치, 상치, 양배추 등의 녹황색 채소류를 많이 섭취하면 결장암<sup>9)</sup> 및 위암<sup>10)</sup>발생이 크게 방지된다고 보고 되어있다. 또한 Colditz 등<sup>11)</sup>도 미국의 메사츄세츠주민들을 이용한 역학조사에서 카로틴 함유 채소를 많이 소비할수록 암발생은 감소 되었다고 하였다.

Shinohara 등<sup>12)</sup>은 16가지의 채소 및 과일류의 투석액(dialyzates)으로 항돌연변이 효과를 연구하는 중 Ames 실험계에서 우엉, 가지, 시금치등은 Trp-p-2, Trp-p-1, 벤조피렌, Strigmatocystin, 아플라톡신 B<sub>1</sub>, 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)-acrylamide와 MNNG의 돌연변이성을 모두 저해 하였다고 하였다.

본 실험에서는 돌연변이 유발물질 중 위암 발생과 관련되어 있다고 알려진 니트로소 화합물인 MNNG와 NDMA의 돌연변이 유발성에 미치는 녹황색채소류의 항돌연변이 효과와 사람의 위암세포의 성장에 미치는 녹황색 채소류의 성장저해 효과를 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 채소 시료

실험에 사용된 녹황색 채소류는 부산시 부전시장에서 구입하여 채소시료로 사용하였다.

### 돌연변이 유발물질/발암물질

N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)는 미국 Aldrich 회사로부터 구입하여 증류수에 녹여 사용하였으며 N-nitrosodimethylamine(NDMA)는 미국 Sigma 회사에서 구입하여 95% 메탄올에 녹여 실험에 사용하였다.

### 시료제조

채소의 생시료를 흐르는 물 및 증류수로 깨끗이 씻고 동결건조 시킨다음 건조 시료 1g을 메탄올(20ml)로 3회 추출하였다. 회전식 진공 농축기를 사용하여 농축

시킨후 2ml (50%)의 DMSO (MNNG와 반응할 경우)와 95% 메탄올 (NDMA와 반응할 경우)에 녹여서 시료로 조제하고 항돌연변이 효과 및 위암세포 성장 저해 효과 실험에 사용하였다.

### 항돌연변이 유발실험

실험은 Ames의 방법을 이용하였는데 실험 균주는 *Salmonella typhimurium* TA100 균주로서 실험전에 균은 정기적으로 histidine requirement, deep rough character, UV sensitivity 및 R factor 존재 등의 유전형질을 확인한후 시험균주로 사용했다. 돌연변이유발 실험을 위한 hamster S9mix, 배지 및 필요한 시약의 조제는 Maron과 Ames<sup>13)</sup>와 Kim 등<sup>14)</sup>의 방법에 따랐으며 Matushima 등<sup>15)</sup>의 방법에 따라 돌연변이유발 실험을 하였다. 항돌연변이 실험을 위해 켈 시험관을 얼음액조에 보관하면서 S9mix 0.5ml (또는 인산완충액 0.5ml), 하룻밤 배양된 균주 ( $1\sim 2 \times 10^9$  cells/ml) 0.1ml와 시료 50 $\mu$ l와 mutagen 50 $\mu$ l씩을 시험관에 첨가한후 가볍게 vortex하고 37°C에서 30분간 예비 배양 하였다. 45°C에 보관중이던 top agar 2ml씩을 각 시험관에 붓고 3초간 vortex 한후 minimal glucose agar plate에 도말한다음 37°C에서 48시간 배양하고 revertant 숫자를 계수하였다. 한편 실험에 사용된 시료와 돌연변이 유발물질의 농도는 예비실험(dose response 및 독성실험)을 통하여 결정하였다.

### 암세포 배양

사람의 위암 세포인 AZ-521은 일본의 cell line collection 본부로부터 분양받아 실험에 사용하였다. 세포는 항생제를 첨가하지 않고 5%의 FCS(fetal calf serum)가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, Co.)을 사용하여 37°C, CO<sub>2</sub>배양기 (5% CO<sub>2</sub>)에서 배양하였다. 배양세포는 일주일에 2~3번 refeeding하고 7~8일만에 PBS (phosphate buffered saline)에 0.05% trypsin-0.02% EDTA를 녹인 용액으로 부착한 세포를 떼어내고 분할하여 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

### 암세포 증식억제 효과 측정

암세포를 24 well plate에 well당 20,000cells/ml의 농도로 분주하여 하룻밤 배양하였다. 세포가 plate에 부착되었을 때 배양액을 버리고 FCS(5%)가 함유된

DMEM과 시료 추출물을 well당 DMSO에 녹인 메탄올 추출물 200µg/ml를 첨가하여 암세포 증식억제 효과를 관찰하였다<sup>16)</sup>. 새 배양액 및 시료를 2일후에 refeeding 하고 첫 시료를 넣은 4일후에 증식된 세포수를 hemocytometer로 계수 하였다.

통계분석

실험 data로 부터 대조군과 시료 사이를 각각 student t-test하여서 통계 분석하였다<sup>17)</sup>.

결과 및 고찰

MNNG는 특히 위암 발생과 관련된 수 있는 direct mutagen으로 알려져 있는데 Table 1에서 보는 바와 같이 사용된 대부분의 채소류가 MNNG의 돌연변이 유발성을 크게 감소시키는 역할을 하였다(p<0.01, 0.05). 26종의 채소류중 24종(92%)이 항돌연변이 효과가 있는것으로 관찰되었다. 특히 80%이상 저해효과를 보인 시료는 들깨잎, 배추, 꽃양배추, 상치, 갓, 미나리, 들미나리, 당근, 우엉 등이었고 양배추, 케일, 셀러리, 썬갓, 고추잎, 부추, 시금치, 비름, 애호박, 가지, 무, 무청, 근대 등도 상당히 큰 저해 효과를 나타내었다(p<0.01). Shinohara 등<sup>12)</sup>도 *Salmonella typhimurium* TA100 에서 우엉, 가지, 시금치, 사과 등의 dialyzates 는 MNNG의 돌연변이 유발성을 저해하는 효과가 있다고 하였다.

Table 2는 니트로소아민중 발암물질로 널리 알려진 N-nitrosodimethylamine (NDMA)의 돌연변이 유발성에 미치는 녹황색 채소류의 항돌연변이성을 검토한 결과이다. NDMA의 activation을 위해 hamster S9mix<sup>14)</sup>를 사용하였는데 이 경우에도 20종류의 검사 채소중 17종류(85%)가 항돌연변이 효과가 있는 것으로 관찰되었다(p<0.01, 0.05). 80%이상 저해 효과를 보인시료는 들깨잎, 배추, 케일, 콩나물, 양파 등으로 나타났고 양배추, 브로콜리, 풋고추, 시금치, 파, 무청, 우엉도 NDMA의 돌연변이 유발성을 크게 억제하였다 (p<0.01). 그러나 상치, 오이, 당근은 저해 효과는 다소 있었지만 통계적인 유의성은 없었다.

이러한 결과로부터 우리나라와 같이 위암발생율이 높은 경우 신선한 녹황색 채소류의 충분한 섭취는 암 발생의 위험을 방지할 수 있는 요소중에 하나가 될 수 있다고 사료되며 특히 우리나라민이 즐겨 먹는 들깨잎

**Table 1. Inhibitory effect of green-yellow vegetables on the mutagenicity induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG, 0.5µg / plate) in *Salmonella typhimurium* TA100**

시료(Sample)	Revertants / plate	Inhibition (%)
들깨잎(Perilla leaf)	290±40 <sup>1</sup>	84**
배추(Korean cabbage)	329±59 <sup>1</sup>	80**
양배추(Cabbage)	504±59 <sup>1</sup>	64**
꽃양배추(Cauliflower)	288±16 <sup>1</sup>	84**
케일(Kale)	531±1 <sup>1</sup>	61**
상치(Lettuce)	248±42 <sup>1</sup>	88**
브로콜리(Broccoli)	1280±167 <sup>1</sup>	-
셀러리(Celery)	387±16 <sup>1</sup>	75**
갓(Mustard leaf)	451±47 <sup>2</sup>	81**
썬갓(Crown daisy)	398±67 <sup>1</sup>	74**
미나리(Water dropwort)	337±24 <sup>3</sup>	80**
들미나리(Small water dropwort)	302±19 <sup>3</sup>	82**
풋고추(Green red pepper)	936±4 <sup>1</sup>	23
고추잎(Red pepper leaves)	228±17 <sup>4</sup>	58**
피망(Green sweet pepper)	776±80 <sup>1</sup>	38*
부추(Leek)	387±43 <sup>5</sup>	60**
시금치(Spinach)	370±91 <sup>1</sup>	76**
비름(Amaranth)	383±17 <sup>5</sup>	60**
콩나물(Soybean sprout)	779±94 <sup>1</sup>	38*
애호박(Pumpkin, immature)	523±11 <sup>1</sup>	62**
오이(Cucumber)	759±22 <sup>1</sup>	40*
가지(Egg plant)	477±35 <sup>5</sup>	47**
고구마(Sweet potato)	1106±54 <sup>1</sup>	8
당근(Carrot)	269±27 <sup>1</sup>	86**
무(Radish root)	377±75 <sup>1</sup>	76**
무청(Radish leaves)	517±10 <sup>2</sup>	77**
우엉(Burdock)	330±20 <sup>1</sup>	80**
근대(Chard)	335±21 <sup>5</sup>	67**

<sup>1</sup>118± 7 ; 1186±175, <sup>2</sup>97±6 ; 1936±117, <sup>3</sup>77±10 ; 1354±72, <sup>4</sup>94±10 ; 410±2, <sup>5</sup>88±7 ; 827±49 (The first values are spontaneous revertants / plate and the seconds are revertants / plate from the control of MNNG)

\*Significantly different from the control at the p<0.05 level

\*\*Significantly different from the control at the p<0.01 level

이 이들 발암원의 돌연변이 유발성을 크게 저해한다는 사실은 매우 흥미로운 결과라고 하겠다.

그리고 사람의 위암세포의 성장에 미치는 녹황색 채소류의 저해 효과를 관찰한 결과는 Fig. 1에 나타나 있는 바와 같다. 위암세포 AZ 521의 성장에 미치는 녹황색 채소 추출물질들의 효과를 보면 대조군은 4일 성장

**Table 2. Inhibitory effect of green-yellow vegetables on the mutagenicity mediated by N-nitrosodimethylamine (NDMA, 3mg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100**

시료(Sample)	Revertants / plate <sup>1</sup>	Inhibition (%)
들깨잎(Perilla leaf)	282 ± 13	86**
배추(Korean cabbage)	346 ± 21	80**
양배추(Cabbage)	361 ± 27	78**
케일(Kale)	323 ± 14	82**
상치(Lettuce)	992 ± 75	20
브로콜리(Broccoli)	472 ± 58	68**
셀러리(Celery)	882 ± 8	30*
썩갓(Crown daisy)	887 ± 64	30*
풋고추(Green red pepper)	403 ± 77	74**
피망(Green sweet pepper)	779 ± 140	40*
시금치(Spinach)	488 ± 40	70**
콩나물(Soybean sprout)	339 ± 82	80**
파(Green onion)	353 ± 128	79**
양파(Onion)	220 ± 6	91**
애호박(Pumpkin, immature)	837 ± 40	34*
오이(Cucumber)	1070 ± 83	13
고구마(Sweet potato)	890 ± 11	30*
당근(Carrot)	971 ± 25	22
무청(Radish leaves)	502 ± 89	65**
우엉(Burdock)	484 ± 88	67**

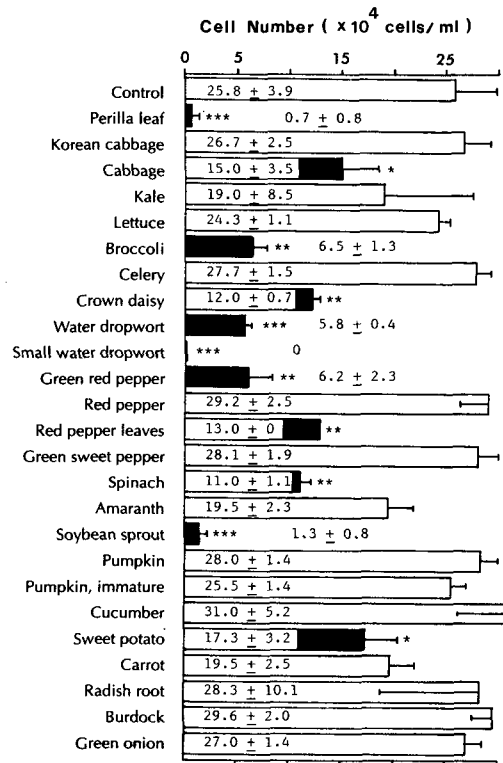
<sup>1</sup>Spon ; 125 ± 2, Control(NDMA) ; 1211 ± 180

\*Significantly different from the control at the p < 0.05 level

\*\*Significantly different from the control at the p < 0.01 level

후 25.8 × 10<sup>4</sup> cells/ml이었는데 들미나리 시료첨가군은 같은 농도에서 암세포의 성장을 완전히 억제 하였으며 (100%) 들깨잎도 거의 대부분의 암세포 성장이 억제되었다(97%). 그리고 미나리와 콩나물도 각각 78%와 95%의 저해 효과를 나타내었다 (p < 0.001). 브로콜리, 썩갓, 풋고추, 고추잎, 시금치, 양배추, 고구마 등도 위 암세포의 성장을 유의성있게 저해하는 효과가 있었다 (p < 0.01, 0.05). 채소류의 암세포 성장저해 효과에 대해서 최근에 몇몇 보고가 발표된 바 있다. 박 등<sup>18)</sup>은 마늘의 크로로포름 분획은 HT-29 human 결장암세포의 성장을 크게 저해하였다 하였으며, 또한 황 등<sup>19)</sup>과 손과 황<sup>20)</sup>은 마늘의 알콜 추출물과 석유에테르 추출물은 여러 암세포의 성장을 저해하며 항암 효과가 있다고 보고 하였다.

그러나 배추, 케일, 상치, 셀러리, 붉은고추, 피망, 비름, 호박, 애호박, 오이, 당근, 무청, 우엉, 파 등은 암세



**Fig. 1. Inhibitory effect of green-yellow vegetables on the growth of AZ-521 human gastric cancer cells.**

\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001

포 성장에 저해효과를 나타내지 않았다.

이 실험 결과로부터 특히 들깨잎, 들미나리, 미나리는 위암발생과 관련되어 사용된 발암원에 대한 저해 효과도 컸으며 사람의 위암세포 성장에도 관여하여 암세포의 성장을 크게 억제하는것으로 나타났다. 이외에 양배추, 시금치, 고추잎, 썩갓, 콩나물 등도 상당히 항(발)암적인 효과가 있는 식품이라고 생각되어 이와관련된 자세한 후속 연구가 필요하다고 하겠다. 이들 채소류로부터 활성물질이 어떤 것인지 동정하며, 이들의 분자생물학적 항(발)암 기작에 대한 연구가 계속되어야 하고 이들이 복합될 때의 상승 및 복합 효과에 대한 연구도 진행되어야 하리라 사료된다.

### 요 약

N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)와 N-nitrosodimethylamine (NDMA)의 돌연변이 유발성 및 AZ-521 사람의 위암세포의 성장에 미치는 농항색

채소류의 저해 효과를 검토하였다. 26종의 시험 채소 중 24종(92%)이 MNNG에 대한 항돌연변이성이 있었으며 ( $p < 0.01, 0.05$ ) 80%이상 저해 효과를 보인 시료는 들깨잎, 배추, 꽃양배추, 상치, 갓, 미나리, 들미나리, 당근, 우엉 이었다. 한편 NDMA에 대해서도 실험 채소중 85%가 항돌연변이성을 나타내었는데 ( $p < 0.01, 0.05$ ) 들깨잎, 배추, 케일, 콩나물, 양파는 80%이상의 저해 효과를 나타내었다. 위암세포의 성장 저해 효과에서는 들미나리와 들깨잎이 가장 저해 효과가 컸으며(97~100%) 콩나물과 미나리가 다음으로 효과가 컸었다( $p < 0.001$ ). 또한 브로콜리, 쑥갓, 풋고추, 고추잎, 시금치, 양배추, 고구마도 통계적인 유의성을 나타내며 암세포 성장을 억제하는 효과가 있었다( $p < 0.01, 0.05$ ).

### 감사의 글

이연구는 한국과학재단 연구비 지원(과제번호 : 90-0500-03)에 의한 결과의 일부이며 이를 감사드린다.

### 문 헌

1. Joossens, J. V. and Kesteloot, H. : Salt and stomach cancer In "Gastric carcinogenesis", Reed, P. I. and Hill, M. J. (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, p.105(1988)
2. Hu, J. F., Zhang, S. F., Jia, E. M., Wang, Q. Q., Lie, S. D., Liu, Y. Y., Wu, Y. P. and Cheng, Y. T. : Diet and cancer of the stomach : a case-control study in China. *Int. J. Cancer*, **41**(3), 331(1988)
3. Bresnick, E., Birt, D. F., Wolterman, K., Wheeler, M. and Markin, R. S. : Reduction in mammary tumorigenesis in the rat by cabbage and cabbage residue., *Carcinogenesis*, **11**(7), 1159(1990)
4. Scholar, E. M., Wolterman, K., Birt, D. F. and Bresnick, E. : The effect of diets enriched in cabbage and collands on murine pulmonary metastasis. *Nutr. Cancer*, **12**(2), 121(1989)
5. Whitty, J. P. and Bjeldanes, L. F. : The effects of dietary cabbage on xenobiotic-metabolizing enzymes and the binding of aflatoxin B<sub>1</sub> to hepatic DNA in rats. *Food Chem. Toxicol.*, **25**(8), 581(1987)
6. Decarli, A., Liati, P., Negri, E., Franceschi, S. and LaVecchia, C. : Vitamin A and other dietary factors in the etiology of esophageal cancer. *Nutr. Cancer*, **10**, 29(1987)
7. Pisani, P., Berrino, F., Macaluso, M., Pastorino, U., Crosignani, P. and Baldasseroni, A. : Carrots, green

- vegetables and lung cancer : A case-control study, *Int. J. Epidemiol.*, **15**(4), 463(1986)
8. Oishi, K., Okada, K., Yoshida, O., Yamabe, H., Ohno, Y., Hayes, R. B. and Schroeder, F. H. : A case-control study of prostatic cancer with reference to dietary habits. *Prostate*, **12**(2), 179(1988)
9. Manousos, O., Day, N. E., Trichopoulos, D., Gerovasilis, F., Tzonou, A. and Polychronopoulou, A. : Diet and colorectal cancer : A case control study in Greece. *Int. J. Cancer*, **32**(1), 1 (1983)
10. Kada, T., Inoue, T., Morita, K. and Namiki, M. : Dietary desmutagens. In "Genetic toxicology of the diet", Knudsen, I. (ed.), Alan R. Liss Inc., New York, p.245(1986)
11. Colditz, G. A., Branch, L. G., Lipnick, R. J., Willett, W. C., Rosner, B., Posner, B. M. and Hennekens, C. H. : Increased green and yellow vegetable intake and lowered cancer deaths in an elderly population. *Am. J. Clin. Nutr.*, **41**(1), 32(1985)
12. Shinohara, K., Kuroki, S., Miwa, M., Kong, Z-L. and Hosoda, H. : Antimutagenicity of dialyzates of vegetables and fruits. *Agric. Biol. Chem.*, **52**(6), 1396 (1988)
13. Maron, D. M. and Ames, B. N. : Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* **113**, 173(1983)
14. Kim, S. H., Park, K. Y. and Suh, M. J. : Mutagenicity of N-nitrosodimethylamine in *Salmonella*/Microsome assay and the effect of vitamin C on the formation of N-nitrosodimethylamine. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **20**(3), 260(1991)
15. Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. : Factors modulating mutagenicity in microbial test. In "Short-term test systems for detecting carcinogens", Norpoth, K. H. and Garner, R. C. (eds.), Springer, Berlin, p. 273(1980)
16. Franceschi, R. T., James, W. M. and Zerlauth, G. : 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> specific regulation of growth, morphology and fibronectin in a human osteosarcoma cell line. *J. Cell Physiol.*, **123**, 401(1985)
17. Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. : Principles and procedures of statistics. McGraw-Hill Kogakusha, Ltd, Tokyo, p. 96(1980)
18. 박건영, 김소희, 서명자, 정해영 : 마늘의 돌연변이유발억제 및 HT-29 결장암 세포의 성장저해효과. 한국식품과학회지, **23**(3), 370(1991)
19. 황우익, 이성동, 손홍수, 백나경, 지유환 : 마늘성분에 의한 면역 증강 및 항암효과. 한국영양식량학회지, **19**, 494(1990)
20. 손홍수, 황우익 : 마늘중 지용성 성분의 암세포 증식 억제 효과연구. 한국영양학회지, **23**, 135(1990)

(1992년 3월 5일 접수)