

## 감잎의 용매별 추출물의 돌연변이 유발 억제 및 암세포 증식억제 효과

문 숙 회

김남정보대학 식품과학계열

### Inhibitory Effect of Persimmon Leaves on the Mutagenicity in Spore *Rec* Assay and on the Growth of Human Cancer Cells

Suk-Hee Moon

Food Science Subdivision, Kyungnam College & Technology, Pusan 617-701, Korea

#### Abstract

The inhibitory effects of persimmon leaves on the mutagenicity in spore *rec* assay and on the growth of HT-29 human colon cancer cells and AZ-521 human gastric cancer cells were studied. Methanol extract of persimmon leaves inhibited the mutagenicity induced by N-methyl- N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG) in spore *rec* assay. The hexane, chloroform and ethylacetate fraction from the methanol extract exhibited strong antimutagenicity against MNNG in spore *rec* assay. The methanol extract of persimmon leaves also revealed the inhibitory effects on the growth of HT-29 human colon cancer cells and AZ-521 human gastric cancer cells. Among the solvent extracted fraction from the methanol extract, the chloroform fraction was most effective and inhibited the growth of HT-29 and AZ-521 cells by 100 percent.

Key words : persimmon leaves, antimutagenicity, HT-29 human colon cancer cells, AZ-521 human gastric cancer cells.

#### 서 론

우리나라는 최근 암이 심혈질환과 함께 사망의 주 원인이 되고 있으며, 유전적 요소와 함께 식이를 포함한 여러 환경적 요소가 원인으로 작용하여 발암을 증가시킨다고 생각된다. 따라서 식이를 조절함으로써 암에 걸리지 않도록 하는 일, 암 발생을 억제시키는 일, 암의 예방 등에 관심이 높아지고 있다. 현재 우리가 섭취하고 있는 식품 중에는 발암물질, 돌연변이 유발물질 뿐만 아니라 항발암 물질, 종양축진 물질, 항종양축진 물질, 항돌연변이 물질과 같은 여러 가지 조 절소가 포함되어 있다.<sup>1~3)</sup>

감잎은 비타민 A, C, D 및 엽록소가 풍부해서 고혈

압, 호흡기질환 및 성인병 예방에 좋으며 지혈, 기관지염의 치료에도 효과가 있다고 알려져 있다.<sup>4)</sup> 특히 비타민 C의 함유량은 감귤류보다 높아 어린 감잎 100 g당 500~1,000mg 이나 들어있다. 감잎의 비타민 C는 비교적 열에 안정하며 뜨거운 물에 5분 정도 우려내어 감잎차로 마실 경우 부작용이 없는 이노제의 역할을 하며 감잎차에 꿀을 조금 곁들이면 해소천식에 좋다고 한다.<sup>5)</sup> 발암에 대한 비타민 C의 작용으로는 암 유발 물질들과의 상호반응에 의해 암 형성을 막는 작용, 종양축진제의 대사를 방해하는 작용, 세포의 면역성을 증가시키는 작용 및 nitrite scavenger로서의 작용 등이 알려져 있다.<sup>6)</sup> 감잎에 많이 들어있는 색소 성분인 엽록소는 3-amino-1-methyl-5H-pyridine(4,3b) indole(Trp-

† Corresponding author : Suk-Hee Moon

P-2)를 포함한 식품의 열분해 돌연변이 물질, 담배연기 응축물 및 benzo(a)pyrene(BP) 등의 돌연변이성을 억제하며,<sup>7-9)</sup> V79 포유류 세포의 항돌연변이 실험에서도 엽록소는 N-methyl-N'-nitrosourea (MNU)와 2-amino anthracene(2-AA)의 돌연변이성을 억제한다고 한다.<sup>10)</sup> 또한 감잎에 존재하는 astragalin인 kaempferol-3-glucoside는 kaempferol로 쉽게 가수분해 될 수 있으며 kaempferol은 종양세포의 핵산합성 및 RNA polymerase II에 의한 전사를 저해한다고 보고된 바 있다.<sup>11)</sup> 또한 한국산 감잎으로부터 분리한 폴리페놀 화합물이 알레르기성 접촉성피부염에 대해 알레르기 반응을 지연 또는 예방한다는 보고도 있다.<sup>12)</sup> 문 등<sup>13)</sup>에 의하면 감잎의 메탄올 추출물과 이를 다시 분획한 획분 중 핵산 획분은 Ames 실험계에서 aflatoxin B1(AFB1), dimethyl-amino-bi-phenyl(DMAB), N-methyl- N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG), 그리고 4-nitroquinoline-1-oxide(4-NQO)의 돌연변이 유발성을 억제한다고 하였으며, 김 등<sup>14)</sup>은 간접 돌연변이원에 해당되는 담배연기 응축물(cigarette smoke condensate: CSC)에 대해 감잎이 51%의 항돌연변이 효과를 나타낸다고 하였다. 따라서 본 연구에서는 감잎의 메탄올 추출물과 이를 다시 극성이 다른 용매들로 분획한 용매별 획분들에 대해 spore rec assay를 이용하여 항돌연변이 효과를 확인하고 사람의 결장암 세포와 사람의 위암 세포의 증식에 미치는 효과를 살펴보았다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

본 실험에 사용한 감잎(Persimmon leaf: *Diospyros kaki* Thunberg)은 경남 하동군 회계면 탐리에서 6~7월에 채집한 삼시 품종의 감잎으로 이를 분쇄한 후 시료로 사용하였다.

### 2. 시료의 추출 및 분획

시료의 용매추출 획분은 시료 중량의 20배의 메탄올로 3시간씩 3회 교반 추출하여 감압 농축한 후 극성이 다른 용매, 즉 핵산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물로 추출하여 각각의 획분으로 분획하였다.

### 3. 항돌연변이 실험

#### 1) Spore Rec Assay

Hirano 등<sup>15)</sup> 및 Kada 등<sup>16,17)</sup> 방법에 따라 *B. subtilis* H17(Rec<sup>+</sup>)와 M45(Rec<sup>-</sup>) 포자를 조제하였다. Spore

agar plate를 조제하기 위해 nutrient broth 8g, bacto agar 15g을 각각 2개씩 증류수에 용해한 후 가압멸균(121°C, 20 min.)하여 45°C로 식힌 후 여기에 M45 및 H17 포자현탁액을 각 배지에 넣어 혼합하였다 (포자현탁액 1ml/배지 10ml). 이것을 멸균된 petridish에 분주하여 고화시킨 후 이 위에 paper disc.(Toyo Co., Japan)를 고정시키고 미리 incubation(37°C, 30 min.)하여 반응시킨 MNNG 와 시료를 paper disc에 주입한 후 4°C에서 8시간 동안 cold incubation하고, 다시 37°C에서 24시간 incubation 시켜 각 paper disc 주위에 생성된 생육 저지대의 직경을 측정하여 항돌연변이성의 유무를 측정하였다.<sup>18-20)</sup>

### 4. 암세포 증식억제 효과

#### 1) 암세포 배양

사람의 결장암 세포인 HT-29은 황우익 교수(고려대학교 의과대학)로부터, 사람의 위암세포인 AZ-521은 Japanese Cancer Research Resources Bank(JCRB) - Cell Bank (일본, 동경)로부터 각각 분양받아 실험에 사용하였다. 세포는 100 units/ml의 penicillin 및 streptomycin과 5%의 fetal calf serum(FCS: Gibco Lab., USA)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM: Gibco Lab., USA)을 사용하여 37°C, 5% incubator에서 배양하였다. 배양중인 세포는 일주일에 3번 refeeding 하고 일주일 후 phosphate buffered saline(PBS)로 세척한 뒤 0.05% trypsin-0.02% EDTA(Gibco Lab., USA)로 분리, 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

#### 2) 암세포 증식 억제효과 측정

암세포를 24 well plate에 15,000 cells/ml의 농도로 seeding 하여 24시간 배양하였다. 세포가 plate에 부착되면 배양액을 버리고 5% FCS와 감잎 시료가 함유된 새로운 배양액으로 2일에 한번씩 refeeding 하면서 37°C, 5% incubator에서 배양하였다. 배양 6일 후에 증식된 세포를 PBS로 세척한 뒤 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 분리하여 각 세포수를 hemocytometer로 측정하여 대조군과 비교하여 암세포 증식 억제효과를 관찰하였다.<sup>21,22)</sup>

#### 3) 암세포의 형태학적 관찰

사람의 결장암 세포인 HT-9와 사람의 위암 세포인 AZ-521의 형태학적 관찰을 위해 암세포를  $1.5 \times 10^4$  cells/ml 농도로 seeding한 후 감잎시료가 첨가된 새로운 배지로 2일에 한번씩 refeeding하면서 일주일간 배

양한 뒤 암세포의 모양을 inverted microscope(Olympus Co., Japan)로 관찰하였다.<sup>23,24)</sup>

## 5. 통계분석

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 data로부터 ANOVA를 구한 후 Duncan's multiple range test를 이용하여 통계 분석하였다.<sup>25)</sup>

## 결과 및 고찰

### 1. 감잎 메탄올 추출물과 용매별 획분들의 항돌연변이 효과

이전의 보고에서 감잎의 메탄올 추출물 및 용매별 획분이 Ames test에서 aflatoxin B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>)과 dimethyl-amino-biphenyl(DMAB)과 같은 간접 돌연변이원 뿐만 아니라 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)와 4-nitroquinoline-1-oxide(4-NQO)와 같은 직접 돌연변이원에 대해서도 항돌연변이 효과를 나타내었으므로<sup>26)</sup> 본 실험에서는 *rec* assay에서 MNNG에 대한 감잎의 항돌연변이 효과를 확인하고 항암 효과를 살펴보기 위해서 사람의 결장암 세포인 HT-29와 사람의 위암세포인 AZ-521을 이용하여 이들 암세포 증식에 미치는 영향을 살펴보았다. Spore *rec* assay는 야생 균주인 *Bacillus subtilis* strain H17 *Rec*<sup>+</sup>와 H17에 비해 여러 가지 화학적인 돌연변이원에 대해 50배나 민감하여 세포의 DNA에 큰 손상을 주게되는 M45 *Rec* 를 사용하여 이들의 생육저지대의 차이를 조사함으로써 시료의 항돌연변이 효과를 검토하는 것이다. *Rec* assay에서 강력한 돌연변이원인 MNNG를 사용하여 감잎의 메탄올

추출물의 항돌연변이 효과를 살펴본 결과, 대조군인 MNNG(20  $\mu$ g/disc)에 의한 생육저지대의 차이는 18 mm인데 반해 감잎의 메탄올 추출물의 경우 11 mm로 대조군에 비하여 MNNG의 돌연변이성을 61% 정도 억제하였다 (Table 1). 이로부터 감잎의 메탄올 추출물에는 MNNG와 같은 직접 돌연변이원이 DNA에 결합하여 유전적 돌연변이를 일으키는 것을 차단하는 작용을 하는 항돌연변이 물질들이 있으리라 추정되었다. 또한 감잎의 용매별 획분의 경우 hexan, 클로로포름 및 에틸아세테이트 획분이 *rec* assay에서 MNNG의 돌연변이성을 억제하는 것으로 관찰되었으며, 부탄올 획분의 경우 약간의 항돌연변이 활성이 있었고, 물 획분은 MNNG에 대해 돌연변이 억제효과가 관찰되지 않았다 (Table 1). MNNG의 발암작용은 hexan의 알킬화와 같은 DNA 염기배열에 이상을 일으키는 유전적인 작용과 단백질의 아미노산의 니트로아미노화 등 DNA 유전정보 발현에 이상을 일으키는 기전 등이 관련된다고 알려져 있다.<sup>27)</sup>

### 2. 감잎 메탄올 추출물의 암세포 증식 억제효과

사람의 결장암 세포인 HT-29와 사람의 위암세포인 AZ-521을 seeding 한 후 감잎의 메탄올 추출물을 각각의 농도로 첨가한 배양액과 첨가하지 않은 대조군을 6일간 배양하여 각 암세포 증식에 미치는 저해효과를 살펴본 결과는 다음과 같다. 즉, 사람의 결장암 세포인 HT-29의 증식에 미치는 감잎의 메탄올 추출물의 효과를 살펴보면 대조군의 경우 6일간 배양한 후  $83 \times 10^4$  cells/ml로 증식한 반면 감잎의 메탄올 추출물을 5, 50  $\mu$ g/ml 첨가시 결장암 세포의 증식율이 61%, 90%로

Table 1. Inhibitory effects of methanol extract and solvent fractions from the methanol extract of persimmon leaves on the mutagenicity induced by MNNG in the spore *rec* assay

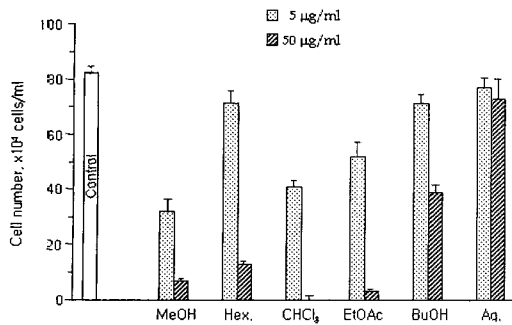
Sample	Inhibition zone(mm)		Difference	Conclusion
	M45( <i>Rec</i> <sup>-</sup> )	H17( <i>Rec</i> <sup>+</sup> )		
Control	18	0	18	-
Methanol extract	11	0	11	++
Hexane Fr.	3	0	3	+++
Chloroform Fr.	0	0	0	+++
Ethylacetate Fr.	0	0	0	+++
Butanol Fr.	12	0	12	+
Aqueous Fr.	18	0	18	-

(-) : No antimutagenicity or mutagenicity.

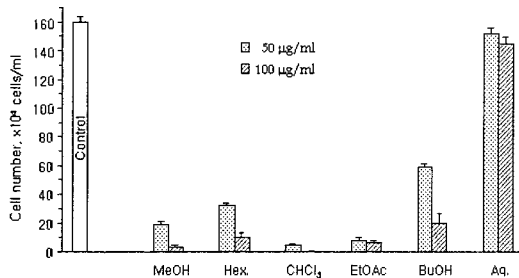
(+) : Weak or no antimutagenicity (12 - 17).

(++) : Moderate antimutagenicity (6 - 11).

(+++): Strong antimutagenicity (0 - 5).



**Fig. 1.** Effects of methanol extract and the solvent fractions from the methanol extract of persimmon leaves on the growth of HT-29 human colon cancer cells.

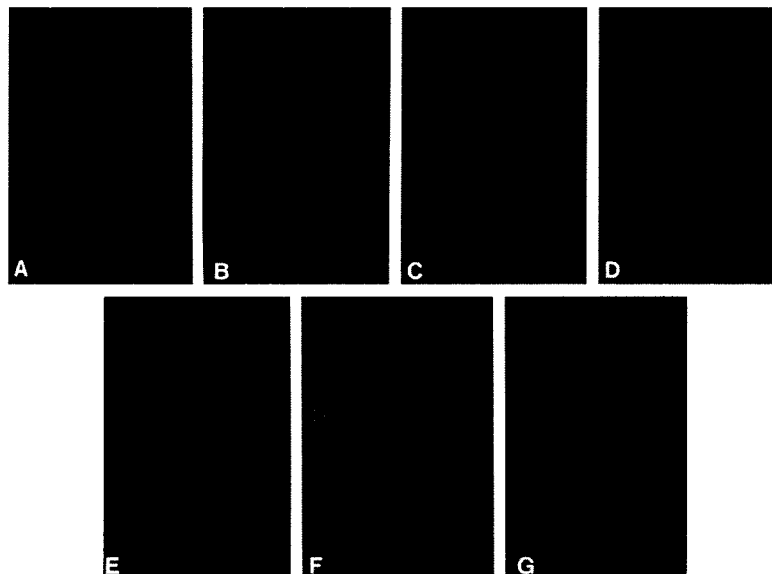


**Fig. 2.** Effects of methanol extract and the solvent fractions from the methanol extract of persimmon leaves on the growth of AZ-521 human gastric cancer cells.

억제되었다(Fig. 1). 사람의 위암세포인 AZ-521의 증식에 대한 감잎의 메탄올 추출물의 효과는 대조군에 비하여 감잎의 메탄올 추출물을 50, 100 µg/ml 첨가시 위암 세포의 증식율이 88%, 99%로 크게 억제되었다 (P<0.05) (Fig. 2). 또한 감잎의 메탄올 추출물이 AZ-521 위암세포의 형태 변화에 미치는 영향을 inverted microscope로 관찰한 결과는 Fig. 3과 같다. 감잎의 메탄올 추출물을 50 µg/ml 농도로 AZ-521 위암 세포 배양액에 첨가하여 48시간 배양 후 세포의 모양을 살펴본 결과 대조군은 위암 세포가 조밀하게 정상적으로 증식한 반면, 감잎의 메탄올 추출물 50 µg/ml를 첨가하고 배양한 경우는 암세포의 형태가 변하고 밀도도 낮아 암세포의 증식이 크게 억제되었음을 관찰할 수 있다.

**3. 감잎 메탄올 추출물로부터 분획한 획분들의 암세포 증식억제 효과**

사람의 결장암 세포인 HT-29와 사람의 위암 세포인 AZ-521에 감잎의 용매별 추출물을 5, 50, 100 µg/ml 농도로 첨가하여 암세포 증식 억제효과를 살펴보았다. 사람의 결장암 세포인 HT-29에 감잎의 용매별 추출물을 5 µg/ml와 50 µg/ml의 농도로 첨가한 후 그 증식율을 살펴본 결과 초기 세포수 4×10<sup>4</sup> cells/ml로 6일간 배양 후 대조군의 경우 83×10<sup>4</sup> cells/ml로 증식한 반면, 감잎의 클로로포름 획분을 5 µg/ml 및 50 µg/ml 농



**Fig. 3.** Photomicrographs of AZ-521 human gastric cancer cells incubated with methanol extract, hexane fr., chloroform fr., ethylacetate fr., butanol fr. and aqueous fr. (50 µg/ml) from persimmon leaves (× 200). A: Control cells cultured for 48 hrs. B, C, D, E, F and G: Treated with methanol ext., hexane fr., chloroform fr., ethylacetate fr., butanol fr. and aqueous fr. for 48hrs., respectively.

도로 첨가한 결과 각각  $41 \times 10^4$  cells/ml와 0 cells/ml로 세포수가 크게 감소되어 결장암 세포의 증식이 각각 50% 및 100%로 억제되었으며, 감염의 에틸아세테이트 희분도 결장암 세포의 증식을 35% 및 97%까지 저해시키는 효과를 나타내었다. 핵산 희분도 부탄올 희분이나 물 희분에 비해서는 암세포 성장을 저해시켰으나, 클로로포름 희분이나 에틸아세테이트 희분보다는 결장암 세포 증식 억제효과가 낮았다 (Fig. 1). 또한 사람의 위암 세포인 AZ-521에 감염의 용매별 추출물을 50  $\mu$ g/ml와 100  $\mu$ g/ml 첨가했을 때 감염의 핵산, 클로로포름 및 에틸아세테이트 희분이 위암 세포의 증식을 크게 억제하여 결장암 세포의 증식량과 비슷한 양상을 나타냈으며, 특히 클로로포름 희분의 경우 위암세포 증식 억제율이 100%에 달하였나 (Fig. 2). 이와 같은 결과로 미루어 감염의 암세포 증식 억제 효과는 수용성 성분보다는 핵산, 클로로포름 및 에틸아세테이트에 많이 용해되어 나오는 지용성 성분의 작용이 클 것으로 생각된다. 한편 손 등<sup>28)</sup>은 바늘 중의 지용성 성분이 종양세포의 발육을 억제함으로써 항암 효과를 나타낸다고 하였으며, 황 등<sup>29)</sup>도 침기의 석유 에테르 추출물 중에 *in vitro*에서 인체 장암세포의 증식을 억제하는 성분이 존재한다고 보고하였다.

Fig. 3은 감염의 용매별 추출물이 위암 세포의 형태학적 변화에 미치는 영향을 살펴보기 위해 inverted microscope로 세포의 모양을 관찰한 것으로 대조군은 암세포가 조밀하게 중첩되어 증식되어 있으나 감염의 클로로포름 희분과 에틸아세테이트 희분은 50  $\mu$ g/ml 첨가시 세포의 결속력이 크게 감소되어 암세포 증식이 저해되었으나 물 희분은 대조군과 마찬가지로 암세포들이 모두 정상적으로 조밀하게 잘 증식되어 돌연변이 암세포 증식 억제효과가 거의 없었던 결과와 일치되는 것을 관찰할 수 있었다. 감염 세포의 암세포 증식 억제효과 및 암세포의 형태변화에 미치는 영향 등에 대해서는 더 광범위하게 여러 종류의 암세포 및 정상세포를 대상으로 실험을 하면 감염 시료가 특이적으로 작용하는 암세포도 밝혀낼 수 있을 것이며, 이들 희분에서 활성물질의 분리 및 동정 등 지속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

## 요 약

감염의 메탄올 추출물과 이를 극성이 다른 용매로 더욱 분리한 용매별 희분들의 돌연변이 유발 억제효과를 spore *rec* assay를 이용하여 검토하고 사람의 결장암 세포인 HT-29와 사람의 위암 세포인 AZ-521의

증식에 대한 저해효과를 실험하였다. 감염의 메탄올 추출물은 spore *rec* assay에서 N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)의 돌연변이성을 61% 정도 억제하였으며, 감염의 메탄올 추출물에서 효과가 있었던 활성물질을 정제하기 위하여 다시 극성이 다른 용매들로 각각 추출하여 얻은 희분 중에서는 핵산, 클로로포름 및 에틸아세테이트 희분이 강한 돌연변이 유발 억제효과를 나타내었다. 그리고 감염의 메탄올 추출물은 암세포의 증식을 억제시키는 항발암 효과가 관찰되었는데 사람의 결장암 세포인 HT-29와 사람의 위암 세포인 AZ-521에 감염의 메탄올 추출물을 50  $\mu$ g/ml와 100  $\mu$ g/ml 첨가시 이들 암세포의 증식이 각각 90%와 99%까지 크게 억제되었다. 감염의 메탄올 추출물을 다시 극성이 다른 용매들로 분리한 희분들 중에서는 사람의 결장암 세포인 HT-29와 사람의 위암세포인 AZ-521에 감염의 클로로포름 희분을 각각 50  $\mu$ g/ml와 100  $\mu$ g/ml 첨가시 이들 암세포의 증식 억제율이 100%에 달하였고 감염의 에틸아세테이트 희분도 사람의 결장암 세포(HT-29)와 사람의 위암세포(AZ-521)에 대해 클로로포름 희분 다음으로 강한 항발암 효과가 관찰되었으며, 핵산 희분도 이들 두 희분(클로로포름 및 에틸아세테이트)보다는 낮았으나 암세포 증식을 억제하는 효과가 관찰되어 항돌연변이 실험에서와 일치하는 결과를 얻었다.

## 참고문헌

1. Sugimura, T. : Mutagens, carcinogens and tumor promoters in dairy food. *Cancer*, **49**, 1970 (1982).
2. Ames, B. N. : Dietary carcinogens and anticarcinogens; Oxygen radicals and degenerative disease. *Science*, **221**, 1256 (1983).
3. Wattenberg, L. W. : Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. *Cancer Res.*, **43**, 2448 (1983).
4. 江蘇新醫院編 : 中藥大辭典, 上海科學技術出版社, p.15 (1978).
5. 유태종 : 식품카르테. 박영사, p.129 (1976).
6. Glatthaar, B. E., Homig, D. H. and Moser, U. : The role of ascorbic acid in carcinogenesis, Hoffmann-La Roche Co., Ltd., Switzerland (1987).
7. Lai, C., Butler, M. A. and Matney, T. S. : Antimutagenic activities of common vegetables and their chlorophyll content. *Mutat. Res.*, **77**, 245 (1980).
8. Terwel, L. and Van der Hoeven, J. C. M. : Antimutagenic activity of some naturally occurring compounds towards cigaret smoke condensate and benzo(a)pyrene in the *Salmonella*/microsome assay. *Mutat. Res.*, **152**, 1 (1985).

9. Arimoto, S., Ohara, Y., Namba, T., Negishi, T. and Hayatsu, H. : Inhibition of the mutagenicity of amino acid pyrolysis products by hemin and other biological pyrrole pigments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**, 662 (1980).
10. Lawson, T., Nunnally, J., Walker, B., Bresnick, E., Wheeler, D. and Wheeler, M. : Isolation of compounds with antimutagenic activity from Savoy Chieftain cabbage. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 1363 (1989).
11. Nose, K. : Inhibition by flavonoids of RNA synthesis in permeable WI-38 cells and of transcription by RNA polymerase II. *Biochem. Pharm.*, **33**, 3823 (1984).
12. 박무희, 최청, 배만중 : 감잎 Polyphenol 화합물군이 알레르기 접촉피부염에 미치는 영향. *한국식품영양과학회지*, **29**(1), 111 (2000).
13. Suk-Hee Moon, Jeong-Ok Kim, Sook-Hee Rhee, Kun-Young Park, Kwang-Hyuk Kim and Tae-Hyong Rhew : Antimutagenic effects and compounds identified from hexane fraction of persimmon leaves. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **22**(3), 307 (1993).
14. 김석중, 진재순, 김동만, 김길환 : 무즙의 돌연변이 억제 효과 및 그 특성. *한국식품과학회지*, **24**(3), 193 (1992).
15. Hirano, K., Hagiwara, T., Ohta, Y., Matsumoto, H. and Kada, T. : *Rec*-assay with spores of *Bacillus subtilis* with and without metabolic activation. *Mutat. Res.*, **97**, 339 (1982).
16. Kada, T., Tutikawa, K. and Sadaie, Y. : *In vitro* and host-mediated *rec*-assay procedures for screening chemical mutagens and phloxine, a mutagenic red dye detected. *Mutat. Res.*, **16**, 165 (1972).
17. Kada, T. : *Rec*-assay with cold incubation with and without metabolic activation. *Mutat. Res.*, **38**, 340 (1976).
18. Bak, C. Y. and Ham, S. S. : Antimutagenic effects of browning products reacted with polyphenol oxidase extracted from apple. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **22**(6), 625 (1990).
19. Ham, S. S., Park, B. K., Lee, S. Y., Lee, J. H., Kang, C. K., Lee, D. S. and Omura, H. : *Rec*-assay and DNA-breaking action on the enzymatic browning reaction products. *J. Korean Agri. Chem. Society*, **27**(4), 264 (1984).
20. 백창원, 함승시 : SOS chromotest에 의한 사과와 효소 갈변반응 생성물의 항돌연변이 효과. *한국식품과학회지*, **22**(6), 618 (1990).
21. Isove, N. N., Senn, J. S., III, J. E. and McCulloch, E. A. : Colony formation by normal and leukemic human marrow cells in culture. *Blood*, **37**, 1 (1971).
22. Hayflick, L. and Moorhead, P. : The serial cultivation of human diploid strains. *Exp. Cell Res.*, **25**, 585 (1961).
23. 황우익, 백나경, 황윤경, 이성동 : 참치 추출물의 항암 및 면역효과. *한국영양과학회지*, **21**(4), 353 (1993).
24. 김교식, 백정미, 황우익 : 국산 항암성 생약제로부터 항암 성분의 추출 및 그의 항암활성 측정. *고려대학교의과대학 논문집*, **25**, 759 (1988).
25. Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. : Principles and procedure of statistics. McGraw-Hill Kogakusha, Ltd., Tokyo, p.96 (1980).
26. 배재민 : 한국 인진호의 화학성분 및 항돌연변이 활성에 관한 연구. 부산대학교 석사학위논문, (1992).
27. 장자준 : 발암연구에 있어서의 동물실험 모델. *생화학뉴스*, **84**(4), 231 (1989).
28. 손홍수, 황우익 : 마늘 중 지용성 성분의 암세포 증식 억제효과 연구. *한국영양학회지*, **23**(2), 135 (1990).

---

(2002년 2월 20일 접수)