

감잎의 물 및 에탄올 추출물이 한국인 위암 세포주에 미치는 항암효과

김 호 정[§] · 김 미 경

이화여자대학교 식품영양학과

Anticancer Effect of Persimmon Leaf Extracts on Korean Gastric Cancer Cell

Kim, Ho Jung[§] · Kim, Mi Kyung

Department of Food and Nutrition, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

ABSTRACT

This study was performed to investigate the *in vitro* and *in vivo* anticancer effects of persimmon leaf extracts on human gastric cancer cells. *In vitro* anticancer effects of persimmon leaf extracts (water extract at 80°C for 3 hours, water extract at room temperature for 48 hours, 50% ethanol extract at 80°C for 3 hours, 50% ethanol extract at room temperature for 48 hours, 75% ethanol extract at 80°C for 3 hours and 75% ethanol extract at room temperature for 48 hours) on SNU16 (Korean gastric cancer cell) were investigated by MTT assay. Persimmon leaf extracts exhibited strong *in vitro* anticancer effects. We found that the higher the ethanol content of the solvent, the stronger the *in vitro* anticancer effects. Extraction yields, contents of flavonoids, vitamin A, vitamin C and vitamin E were measured. We found that the higher the ethanol content of the solvent, the higher the extraction yields and the contents of flavonoids, vitamin A and vitamin E. Among persimmon leaf extracts, 75% ethanol 80°C extract showed the highest extraction yield, the highest contents of flavonoids, vitamin A and vitamin E and exhibited the strongest *in vitro* anticancer effect on SNU16. Therefore, 75% ethanol 80°C extract was chosen as the material to investigate *in vivo* anticancer effects. *In vivo* anticancer effect of persimmon leaf 75% ethanol 80°C extract was investigated in SNU16 transplanted nude mice. Twenty five female nude mice (BALB/c) were blocked into five groups according to body weight and raised for 4 weeks with diets containing 4% (w/w), 8% (w/w) persimmon leaf 75% ethanol 80°C extract, with IT (intratumoral) injection treatment with 1.65 mg/100 μ l, 3.3 mg/100 μ l concentration every other day 3 weeks after SNU16 was transplanted. Persimmon 75% ethanol 80°C extract significantly lowered tumor weight and tumor volume in SNU16 transplanted nude mice. Tumor weight and tumor volume in all experimental groups were significantly lower than those in the control group. Helper T cell (CD4) levels of mice injected with 3.3 mg/100 μ l extract significantly increased. Cytotoxic T cell (CD8) levels in all experimental groups significantly increased and helper/cytotoxic T cell ratios in all experimental groups significantly decreased. Natural killer cell and MHC class II molecule in all experimental groups significantly increased. In conclusion, persimmon leaf 75% ethanol 80°C extract exhibited strong *in vitro* and *in vivo* anticancer effects against SNU16 cells and it increased cytotoxic T cell, natural killer cell and MHC class II molecule in experimental groups in SNU16 transplanted nude mice. (*Korean J Nutrition* 36(2) : 133~146, 2003)

KEY WORDS : persimmon leaf · SNU16 · anticancer effect · immunological capacity.

서 론

2001년 통계에 의하면 암은 현재 우리나라 전체 사망원인의 23.9%를 차지하는 주된 사망원인이다.¹⁾ 그 중 위암은 전체 사망원인의 4.7%를 차지하여 폐암에 이어 두 번

째로 높은 사망원인으로 나타났다.¹⁾ 암은 조기에 발견되지 못할 경우 완치가 거의 불가능하고, 병이 진전될수록 환자와 가족의 고통과 경제적 손실이 막대하며, 의료보험의 재정고갈 등 사회적으로도 큰 비용을 초래한다.²⁾ 그러므로 단순한 수명연장보다 즐겁고 건강한 삶을 원하는 삶의 질이 중요한 관심사로 대두되고 있는 요즘, 암의 예방과 조기 치료의 중요성은 매우 크다고 할 수 있다.^{2,3)}

암의 발병에는 유전적 소인도 깊이 관여하지만 환경적 요인 또한 큰 영향을 미치며 선진국일수록 암의 발병이 증

접수일 : 2002년 12월 3일

채택일 : 2003년 1월 21일

[§]To whom correspondence should be addressed.

가하는 경향을 보인다. 추정 가능한 이유로는 농약, 살충제 등의 사용량 및 식품내 잔유량 증가, 식품 보존제, 방부제, 착색제 등이 첨가된 가공식품의 소비 증가, 수질, 토양, 대기오염의 증가, 현대인의 스트레스의 증가, 활동량의 감소 그리고 풍요로운 식생활을 통한 비만 등을 들 수 있다.²⁻⁵⁾

암의 발병에 관여하는 환경적 요인 중 식생활의 비중이 매우 크다.²⁴⁾ 역학조사들에 의하면 암으로 인한 사망의 약 35%가 식사에서 기인한다고 추정되며,⁶⁾ 각 나라별로 발병 빈도가 높은 암이 특징적으로 다른데 이는 그 민족의 독특한 유전적 특징 이외에도 그 지역에서의 특수한 식생활이 영향을 미치는 것으로 추정된다.^{7,8)} 우리나라의 경우 위암의 발병률이 매우 높는데 이는 짜고 맵게 먹는 식습관과 높은 *helicobacter pylori* 감염율, 아질산염, 질산염 등이 함유된 젓갈류, 염장 식품의 소비, 그리고 아침을 거르는 등의 불규칙적인 식습관과 높은 음주율, 흡연율로 인한 것으로 추정된다.²³⁾

한편 암의 발병과 치료에는 우리몸의 면역상태가 크게 영향을 미친다.^{9,10)} 비만, 과도한 지방섭취, 운동부족, 스트레스 등 각종 이유로 우리 몸의 면역능력이 저하되면, 암세포의 발생 및 증식을 감지하고 암세포를 파괴하는 면역기능의 저하로 암 발병이 증가하게 된다.²⁾ 또한 암의 치료과정 중에도 면역세포들의 역할이 매우 중요하다.^{9,10)} 최근에는 손상된 면역세포를 회복시키고, 증강시켜 이를 암환자 치료에 이용하는 면역요법들이 활발히 시도되고 있다.^{9,10)} Natural killer cell은 종양에 대한 초기방어에서 매우 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. T cell subset은 주로 CD4를 발현하는 보조/유도 (helper/inducer) T cell과 CD8을 발현하는 세포독성 (cytotoxic)기능을 지닌 T cell로 나뉘며, cytotoxic T cell은 virus에 감염된 자가세포나 종양세포를 파괴하는 역할을 담당한다. 한편 성숙한 helper T cell은 MHC (major histocompatibility complex) class II 분자와 함께 제시되는 항원만을 인식한다. 이를 'MHC-제한'이라 하며, MHC class II-항원 (Antigen) 복합체의 인식은 helper T cell 표면의 T cell antigen receptor (TCR)가 담당한다. 이처럼 T cell의 항원인식과 활성화에 중요한 역할을 담당하는 항원제시세포는 다양하며, 대표적인 항원제시세포로는 B cell, 대식세포 (macrophage), 수상돌기세포 (dendritic cell) 등을 들 수 있다.^{9,10)}

다양한 역학조사 결과 비타민 A, C, E 등의 항산화 비타민과 flavonoids를 비롯한 항산화성 polyphenol 성분을 다량 함유한 과일,¹¹⁾ 야채,¹²⁾ 포도주,¹³⁾ 녹차⁴⁾ 등의 섭취량이 증가할수록 심순환계 질환 및 암의 발병률이 낮았다. 천연 식물자원에는 항산화성 polyphenol들이 광범위하게 존재

하며, flavonoids도 그 가운데 포함된다.¹⁵⁾ Flavonoids는 자연에 약 5000종 이상 존재하는 대표적인 항산화제로서 조직의 손상방지, 항암작용 등을 하는 것으로 알려지고 있다.¹⁶⁾ 특히 flavonoids는 면역능 증진효과와 더불어 최근에는 암세포의 DNA, RNA, protein의 합성을 억제, 또는 종양세포의 분열을 억제하거나 암세포의 apoptosis를 유도하는 등 다각적 기전을 통해 항암효과를 발휘하는 것으로 관심을 불러일으키고 있다.¹⁷⁾

감잎속에는 flavonoids를 포함한 polyphenol의 함량이 매우 높고, 항산화 비타민이 풍부하게 존재한다.¹⁸⁾ 그리고 항돌연변이 효과를 통한 염색체 보호,¹⁹⁾ 항산화 작용을 통한 면역세포의 보호,²⁰⁾ 암세포의 apoptosis 유도,²¹⁾ 종양유전자의 발현 억제,²²⁾ *helicobacter pylori*균에 대한 항균 작용,²³⁾ 면역능 증진효과²⁴⁾ 등을 발휘하는 것으로 알려진 축합형 탄닌과 그 분해산물인 ellagic acid, catechin의 함량이 높다.^{18,20)} 또한 암세포간 신호전달관여,²⁵⁾ K562의 apoptosis 유도,²⁶⁾ 암세포 증식억제효과,²⁷⁾ 종양의 성장억제효과,²⁸⁾ 면역능 증강효과²⁹⁾ 등 항암성이 널리 연구되고 있는 quercetin과 그 유도체인 isoquercetrin,³⁰⁾ kaempferol³¹⁾ 등도 함유되어 있다.^{20,32)} 그런데 현재까지 감잎의 항암성에 관한 연구로는 인간 위암세포에 대한 세포독성실험과³³⁾ sarcoma-180에 대한 항암실험이 있을 뿐이었다.^{34,35)} 이에 비해 감잎에 풍부하게 존재하는 축합형 탄닌과 그 분해산물인 catechin 등이 다량 함유되어 있는 녹차에서는 암세포의 apoptosis 유도,³⁶⁾ 암세포 증식억제효과,³⁷⁾ 세포간 신호전달관여,³⁸⁾ 종양의 성장억제효과^{39,40)} 등 항암효과가 다각적으로 연구된 바 있다.

Flavonoids는 그 특성 또한 매우 다양하다고 알려져 있다.^{15,16)} 지용성이 강한 quercetin, kaempferol 등이 있는 반면, 극성 용매에 더 잘 용해되는 catechin류 등도 있다.^{15,16)} 감잎속에는 지용성, 수용성 성질을 지닌 다양한 flavonoids를 포함한 polyphenol 물질들이 혼재되어 있다.^{18,20)} 그러므로 본 실험의 *in vitro* 항암실험시 추출용매의 극성을 달리하여 에탄올 0% (= 물 100%), 에탄올 50%, 에탄올 75%를 추출용매의 종류로 정하였다. 한편, 추출온도는 실온과 80℃의 두가지 수준으로 정하였다. 녹차나 감잎차의 경우 80℃ 정도의 물에 우려서 마시는 음용이 보편화되어 있으며, 또한 여름철에는 찬물에 녹차를 우려서 냉음료로 마시기도 하므로 실온에서의 추출도 행하기로 하였다.¹⁸⁾

본 실험에서는 다양한 flavonoids를 포함한 polyphenol 물질들과 항산화 비타민 등 여러 항산화 성분이 혼재되어 있는 감잎을 추출용매 (0%, 50%, 75% 에탄올)와 추출온도 (80℃, 실온)를 달리한 조건에서 추출하여 식생활과 밀

접한 관계가 있는 한국인 위암세포에 대한 세포독성실험을 실시하여 그 중 가장 강한 항암효과를 발휘하는 추출물을 선정하고자 하였다. 그리고 그 추출물을 한국인 위암 세포주를 이식한 nude mouse에 투여하여 *in vivo* 항암효과를 측정하고자 하였으며, 아울러 감잎 추출물 시료가 nude mouse의 면역능에 어떤 영향을 미치는지 살펴보고자 하였다.

실험재료 및 방법

1. 감잎 추출물 시료의 준비 및 항산화 물질 분석

1) 감잎의 물과 에탄올 추출물의 준비

전남 보성산 감 (*Diospyros kaki*) 잎을 2000년 6월 초순에 구입하여 얼처리를 통해 효소를 불활성화시킨후 건조시켰다. 건조시킨 감잎을 fitz mill (the Fitz Patrick Company, No. DASO6)로 분말화한후 40 mesh의 체를 통과시키고 추출용매 (0%, 50%, 75% 에탄올 용매)와 추출온도 (80°C, 실온)를 달리한 조건에서 감잎 추출물을 준비하였다. 추출시간은 80°C의 경우 3시간 동안 환류추출하였고, 실온의 경우 48시간 동안 추출하였다. 추출후 여과시켜 여과액을 얻고 여과액의 에탄올은 감압건조방법을 통해 휘발시키고, 여과액의 물은 동결건조방법을 통해 제거하여 분말상태의 추출물을 생산하였다.

2) 감잎 추출물의 항산화 물질 함량분석

총 flavonoids의 함량은 강 등의 방법⁴¹⁾을 이용하여 Naringin (Sigma Co. USA)의 농도가 0~0.5 mg/ml의 범위가 되도록 제조한 표준용액으로 표준곡선을 작성하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 비타민 A의 함량은 식품공전의 $SbCl_3$ 에 의한 비색정량법⁴²⁾으로 분석하였고, 비타민 C의 함량은 식품공전의 2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNP)에 의한 정량법⁴²⁾으로 측정하였으며, 비타민 E의 함량도 식품공전⁴²⁾의 방법으로 측정하였다.

2. 한국인 위암 세포주를 이용한 세포독성실험

SNU16 (한국인 위암세포주)를 선정하여, MTT (3-[4,5-dimethyl thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma) assay 방법⁴³⁾으로 감잎 추출물들의 SNU16에 대한 직접적인 세포독성효과를 측정하였다. 세포는 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Sigma)를 함유한 RPMI 1640 (Sigma)배지에서 배양하였다. 감잎 추출물은 최소량의 (시료를 용해시킨 용매의 1%) DMSO (Dimethylsulphoxide)에 용해시킨후 RPMI 1640 배지로 희석하여 사용하였다. 우선 100 mg/ml의 농도로 감잎 추출물의 stock solution

을 제조한후 RPMI 1640 배지로 단계희석하여 세포독성실험용 최종시료를 제작하여 사용하였다.^{27,33)}

암세포를 1×10^6 cells/ml의 농도로 준비하여 flat bottom 96-well microplate 각 well 당 균일하게 100 μ l씩 넣어주었고, 여기에 각 시료들을 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml, 0.0625 mg/ml 농도로 제작하여 100 μ l씩 넣어주었으며, control은 시료용액 대신 RPMI 1640 배지를 100 μ l씩 넣어주었다. 그 후 이 96-well microplate를 세포배양용 인큐베이터 (37°C, 5% CO₂)에 넣어 3일간 배양한 후 MTT (5mg/ml PBS)를 각 well 당 10 μ l씩 첨가하고 다시 세포배양용 인큐베이터에 넣은 후 4시간 뒤 ELISA reader (Bio Rad, microplate reader, Model 450, U.S.A.)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.^{27,33)} 각 시료의 농도당 3개씩 측정하였다.

3. 한국인 위암 세포주를 이용한 동물실험

1) 위암 세포주의 이식 및 Nude mouse의 사육과 식이

앞서 추출용매와 추출온도를 달리한 6가지 감잎추출물 중 세포독성에서 가장 탁월한 효과를 보인 75% 에탄올 80°C 추출물을 동물실험의 재료로 선정하였다. 실험동물은 면역세포 중 성숙된 T세포가 상대적으로 부족하여 인간 암세포주의 이식이 가능한 nude mouse를 선정하였다.^{9,10,44)} 수컷 mouse들은 공격적인 행동으로 인해 각군별 단체사육이 불가능하여 암컷을 사용하였다. 생후 6주된 암컷 nude mouse (BALB/c) 25마리를 구입하여 실험 시작 전 1주일간 멸균된 고형배합사료 (삼양사료)로 적응시켰다. 적응기간 후 체중이 23.8 ± 1.4 g인 nude mouse들을 체중에 따라 난괴법 (randomized complete block design)에 의해 5마리씩 5군으로 분류하여, 75% 에탄올 80°C 추출물을 식이의 4% (w/w), 8% (w/w) 수준으로 첨가하고, 75% 에탄올 80°C 추출물을 1.65 mg/100 μ l, 3.3 mg/100 μ l 농도로 준비하여 IT (intratumoral) injection 방식으로⁴⁵⁾ 이들에 한번씩 100 μ l씩 주입하고, 암은 이식하되 75% 에탄올 80°C 추출물을 투여하지 않은 군을 대조군으로 하였다.

암세포 2×10^6 cells를 nude mouse의 좌측 서혜부에 피하주입 (subcutaneous) 방식으로 주입하여 암을 발병시켜, 한마리의 조직이식용 nude mouse를 준비하였다. 조직이식용 nude mouse에서 큰 덩어리로 성장한 암조직을 분리하여, trocar needle을 이용해 피하주입방식으로 1 mm \times 1 mm \times 1 mm 크기로 균일하게 조직이식하였다.⁴⁶⁾ 이식한 암이 눈에 보일 정도의 크기로 나타나기 시작하는 3주 후부터 감잎 75% 에탄올 80°C 추출물을 식이와 IT (intra-

tumoral) injection 방식으로⁴⁵⁾ 4주간 투여하여 치료효과를 관찰한 후 희생시켰다. 이때 감잎 75% 에탄올 80℃ 추출물의 물성상의 특성으로 인해 DMSO를 용매의 1%로 제한하는 범위내에서 용해시킬 수 있는 시료의 최대량을 IT 고농도 주입시료의 농도로 하였고, 이 농도의 1/2 수준을 IT 저농도 주입시료의 농도로 하였다. 식이 섭취량은 일주일에 3회 일정한 시각에 측정하였고, 체중은 일주일에 1회 같은 시각에 측정하였다. 그리고 일주일에 2회 같은 시각에 caliper를 이용하여 종양의 세로, 가로, 높이를 측정하여 종양의 부피를 다음과 같이 계산하였다.⁴⁷⁾

$$\text{종양의 부피 (mm}^3\text{)} = \frac{\text{세로 (mm)} \times \text{가로 (mm)} \times \text{높이 (mm)}}{2}$$

실험에 사용한 식이의 구성성분은 Table 1과 같았다.⁴⁸⁾ 식이의 탄수화물 급원으로는 옥수수전분 (corn starch, 신통방)을, 지방 급원으로는 옥수수유 (corn oil, 해표)와 대두유 (soybean oil, 해표)를 사용하였으며, 단백질 급원으로는 casein (edible acid casein, Murray Goulburn Co-operative Co., Australia)을 사용하였다. 무기질과 비타민은 시약급을 사용하여 혼합한 것 (AIN-93⁴⁹⁾)을 각각 식이무게의 4%와 1% 수준으로 식이에 섞어 공급하였다. Nude mouse의 면역상태를 고려해 SPF (specific pathogen free) 환경하에서 사육하였고,⁴⁹⁾ 식이는 방사선 (gamma ray [60-Co] 10 KGy)을 쬐어 멸균하였다.^{50,51)}

2) Nude mouse의 종양, 장기의 채취

Nude mouse에 위암 세포주를 이식한 3주후부터, 75% 에탄올 80℃ 추출물을 4주간 투여하여 암치료 효과를 관찰한 후 희생시켜 종양, 장기를 채취하였다. Nude mouse를 경추탈골방법으로 희생시키고 체중과 종양의 부피를 측정하였다. 또한 종양조직을 채취하여 무게를 측정하였으며 그 후 회복하여 간과 비장을 채취하였다. 간은 떼어 즉시 ice cold saline에 넣어 세척한 다음 여지로 물기를 제거한 후 무게를 측정하였고, 무균상태에서 비장을 떼어 무게를 측정 후 면역실험에 이용하였다.

3) Nude mouse의 비장 면역세포 측정

앞서 무균적으로 채취한 비장에 LCM buffer (LCM buffer 1 liter 당 RPMI 1640 1봉 (1 liter 용), 1N HCl 5.5 ml, HEPES 4.766 g, NaHCO₃ 2 g, 5% FBS 50 ml, 1 × 10⁻³ M sodium pyruvate 10 ml, 2-ME 1 ml, nonessential amino acid 10 ml, glutamine 10 ml, penicillin streptomycin 5 ml를 넣은 후 filtering하여 멸균제작) 5

Table 1. Composition of experimental diets (g/kg diet)

Ingredients	Groups ¹⁾				
	C	EE-4	EE-8	EEIT-L	EEIT-H
Corn Starch	695.7	655.7	615.7	695.7	695.7
Casein	150	150	150	150	150
Corn oil	50	50	50	50	50
Soybean oil	50	50	50	50	50
Salt mixture ²⁾	40	40	40	40	40
Vitamin mixture ³⁾	10	10	10	10	10
Choline chloride	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
L-Cystine	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
EE Powder ⁴⁾	0	40	80	0	0

EE Powder Injection EEIT-L EEIT-H

- 1) C: Control group (not containing 75% ethanol 80℃ persimmon leaf extract)
 EE-4: 4% EE (75% ethanol 80℃ extract) diet
 EE-8: 8% EE (75% ethanol 80℃ extract) diet
 EEIT-L: 1.65 mg/100 μl EE (75% ethanol 80℃ extract dissolved in DMSO) intratumorally injected every other day
 EEIT-H: 3.3 mg/100 μl EE (75% ethanol 80℃ extract dissolved in DMSO) intratumorally injected every other day
- 2) AIN-93 salt mixture (g/kg mixture)⁴⁸⁾: Calcium carbonate, anhydrous 357 g, Potassium phosphate, monobasic 250, Sodium chloride 74, Potassium sulfate 46.6, Potassium citrate, tri-potassium, monohydrate 28, Magnesium oxide 24, Ferric citrate 6.06, Zinc carbonate 1.65, Manganous carbonate 0.63, Cupric carbonate 0.30, Potassium iodate 0.01, Sodium selenate, anhydrous 0.01025, Ammonium paramolybdate, 4 hydrate 0.00795, Sodium meta-silicate, 9hydrate 1.45, Chromium potassium sulfate, 12 hydrate 0.275, Boric acid 0.0815, Sodium fluoride 0.0635, Nickel carbonate 0.0318, Lithium chloride 0.0174, Ammonium vanadate 0.0066, Powdered sucrose 209.806
- 3) AIN-93 vitamin mixture (mg/kg mixture)⁴⁸⁾: Nicotinic acid 3000, Ca Pantothenate Pyridoxine-HCl 700, Thiamin-HCl 600, Riboflavin 600, Folic acid 200, D-Biotin 20, Vitamin B₁₂ (cyanocobalamin) 2500, Vitamin E (all-rac-α-tocopheryl acetate) (500 IU/g) 1500, Vitamin A (all-trans-retinyl palmitate) (500,000 IU/g) 800, Vitamin D₃ (cholecalciferol) (400,000 IU/g) 250, Vitamin K (phyloquinone) 75, Powdered sucrose 974.655
- 4) Freeze dried powder of 75% ethanol 80℃ persimmon leaf extract.

ml를 넣은 후 무균상태에서 비장을 으개어 single cell dispersion 상태로 만들었다. 그 후 이것을 멸균한 거어즈로 거른 후 ficoll (Sigma) 3 ml를 첨가하여 1350 rpm에서 10분간 원심분리한 후 중간층의 면역세포들을 모아 LCM buffer 4 ml를 넣고 1600 rpm에서 5분씩 2번 원심분리하여 ficoll을 제거한 후 suction으로 상층액을 제거하고 밑에 모인 cell pellet을 다시 LCM buffer에 재부유시킨 후 각 실험동물마다 4개의 tube를 준비하고 세포를 counting 하여 각 tube당 세포수가 1 × 10⁶가 되도록 넣어주었다. 그리고 staining solution (PBS + 2% FBS + 0.4% sodium azide)으로 3번 washing한 후 (1400 rpm, 5분간) suction으로 상층액을 제거하고 cell pellet위에 미리 희석되어 준비된 mouse 유래 단클론항체를 첨가한 후 vortex로 잘 섞어 얼음에서 20분간 반응시켰다. 그 후 다시 staining

solution으로 3번 washing한 후 (1400 rpm, 5분간) staining solution으로 final volume을 1 ml로 맞추어 flow cytometry (FACS Calibur, Becton Dickinson, USA)로 측정하였고, 분석은 Cell Quest (Becton Dickinson, USA)로 하였다.⁵²⁾

Mouse 유래 단클론항체들은 모두 Southern Biotechnology Associates, Inc. (USA)에서 구입하였다. 모두 형광 물질인 FITC (fluorescein isothiocyanate)가 결합된 형태의 제품이었으며, 제조사의 추천 희석농도에 의거하여 희석한 후 사용하였다.

4. 통계처리

본 연구의 세포독성 실험결과는 실험군당 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치 분산분석 (one-way analysis of variance)을 한 후 $\alpha = 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의하여 각 실험군 평균치간의 유의성을 검정하였다. 또한 추출용매의 종류, 추출온도 및 추출물의 농도의 세가지 요인으로 삼원배치 분산분석 (three-way analysis of variance)을 하여 각 요인 및 요인간 상호작용의 효과를 $\alpha = 0.05$ 수준에서 검정하였다. 한편 flavonoids의 함량 측정결과는 2회 반복 실험값의 평균을 구하여 나타내었고, 항산화 비타민의 함량 측정결과는 3회 반복 실험값의 평균을 구하여 나타내었다.

동물실험결과는 실험군당 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치 분산분석 (one-way analysis of variance)을 한 후 $\alpha = 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의하여 각 실험군 평균치간의 유의성을 검정하였다. 본 실험에서는 nude mouse를 cage당 5마리씩 각군별로 단체사육하여 식이섭취량을 각 개체별로 측정하는것이 불가능하였다. 따라서 식이섭취량은 군별로 측정하여 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치 분산분석을 한 후 $\alpha = 0.05$

수준에서 Duncan's multiple range test에 의하여 각 실험군 평균치간의 유의성을 검정하였다.

실험 결과

1. 감잎 추출물들의 Flavonoids와 항산화 비타민의 함량

위암 세포주를 이용한 세포독성실험에서 시료로 사용된 감잎 추출물들의 추출수율 및 추출물내에 함유된 flavonoids와 항산화 비타민인 비타민 A, 비타민 C, 비타민 E의 함량은 Table 2와 같았다. 추출용매의 에탄올 함량이 높을수록 추출수율과 flavonoids, 비타민 A, 비타민 E의 함량이 높은 경향을 나타내었다. 75% 에탄올 80°C 추출물이 추출수율과 flavonoids, 비타민 A, 비타민 E의 함량이 가장 높았으며, 이 추출물의 추출수율은 33.21%였고, 추출물 1 g 당 flavonoids 함량은 98.34 mg이었고, 비타민 A의 함량은 387.87 IU 였으며, 비타민 E의 함량은 1.6374 mg 이었다. 비타민 C의 함량은 물 실온 추출물이 가장 높았으며 추출물 1 g 당 145.75 mg이었다.

2. 한국인 위암 세포주를 이용한 세포독성실험

SNU16에 대한 감잎 추출물들의 세포독성 실험결과는 Table 3과 같았다. 물 80°C 추출물을 제외한 모든 추출물들이 SNU16에 대해 강한 세포독성효과를 나타내었다. 그 중 75% 에탄올 80°C 추출물은 0.25 mg/ml의 농도에서 이미 SNU16의 생존율이 16.9%로 나타나 가장 강한 세포독성효과를 나타내었고, 물 80°C 추출물을 제외한 나머지 추출물들도 0.5 mg/ml의 농도에서 SNU16의 생존율이 29% 이하로 나타나 강한 세포독성효과를 나타내었다. 그리고 물 실온 추출물이 물 80°C 추출물에 비해 강한 세포독성효과를 발휘하여, 물추출물들 사이에서 추출온도에 따른 차이가 뚜렷이 나타났다. 세가지 요인 (추출용매의 중

Table 2. Extraction yields of persimmon leaf extracts and contents of flavonoids, vitamin A, vitamin C and vitamin E in persimmon leaf extracts

Extracts ¹⁾	Contents	Extraction yield (%)	Flavonoids (mg/g)	Vitamin A (IU/g)	Vitamin C (mg/g)	Vitamin E (mg/g)
0-EEHT		22.37	65.57	7.21	132.37	0.0025
0-EERT		20.56	56.61	4.14	145.75	0.0017
50-EEHT		32.16	91.83	174.58	116.24	1.1842
50-EERT		26.24	95.57	152.35	121.94	0.9825
75-EEHT		33.21	98.34	387.87	98.24	1.6374
75-EERT		26.81	94.25	356.16	102.21	1.3726

1) 0-EEHT: 0% ethanol (= 100% water) extract of persimmon leaf at high (80°C) temperature
 0-EERT: 0% ethanol (= 100% water) extract of persimmon leaf at room temperature
 50-EEHT: 50% ethanol extract of persimmon leaf at high (80°C) temperature
 50-EERT: 50% ethanol extract of persimmon leaf at room temperature
 75-EEHT: 75% ethanol extract of persimmon leaf at high (80°C) temperature
 75-EERT: 75% ethanol extract of persimmon leaf at room temperature

Table 3. Viability of SNU16 cells in a culture medium containing persimmon leaf extracts¹⁾

Extracts	Concentration			
	0.0625 mg/ml	0.125 mg/ml	0.25 mg/ml	0.5 mg/ml
0-EEHT	86.87 ± 2.34 ^{b2)}	73.60 ± 0.18 ^b	82.11 ± 2.73 ^a	63.32 ± 3.57 ^a
0-EERT	97.23 ± 3.13 ^a	86.39 ± 3.10 ^a	78.48 ± 1.35 ^a	28.92 ± 2.81 ^b
50-EEHT	73.88 ± 1.82 ^c	65.19 ± 2.66 ^c	32.60 ± 1.55 ^b	14.83 ± 2.01 ^c
50-EERT	90.11 ± 1.98 ^b	78.39 ± 2.79 ^b	31.16 ± 3.50 ^b	16.04 ± 2.17 ^c
75-EEHT	97.13 ± 2.43 ^a	57.87 ± 2.21 ^c	16.87 ± 3.18 ^c	12.79 ± 0.55 ^c
75-EERT	79.91 ± 0.93 ^c	65.28 ± 3.27 ^c	29.96 ± 2.66 ^b	18.05 ± 3.69 ^c
Significant factor (3-way) ³⁾		A, C, AB, AC, BC, ABC		

- 1) Mean ± Standard Error
- 2) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha = 0.05$ by Duncan's multiple range test
- 3) Statistical significance of factors was calculated based on 3-way ANOVA
 - A: Effect of extracting solvent was significant at $\alpha = 0.05$
 - B: Effect of extracting temperature was significant at $\alpha = 0.05$
 - C: Effect of concentration was significant at $\alpha = 0.05$
 - AB: Interaction of extracting solvent and extracting temperature was significant at $\alpha = 0.05$
 - AC: Interaction of extracting solvent and concentration was significant at $\alpha = 0.05$
 - BC: Interaction of extracting temperature and concentration was significant at $\alpha = 0.05$
 - ABC: Interaction of extracting solvent and extracting temperature and concentration was significant at $\alpha = 0.05$

Table 4. Food intake, body weight gain, liver weight and spleen weight in SNU16 transplanted nude mice¹⁾

Groups ²⁾	Food intake (g/day/group)	Body weight gain (g/4 weeks)	Liver (g/100 g body weight)	Spleen (g/100 g body weight)
C	26.6 ± 0.6 ^{NS3)}	2.0 ± 0.2 ^{b4)}	5.39 ± 0.22 ^b	0.43 ± 0.03 ^{NS}
EE-4	27.5 ± 0.7	3.0 ± 0.3 ^a	6.53 ± 0.47 ^a	0.53 ± 0.03
EE-8	27.2 ± 0.7	2.8 ± 0.2 ^a	5.29 ± 0.20 ^b	0.41 ± 0.05
EEIT-L	26.7 ± 0.5	2.4 ± 0.2 ^{ab}	5.16 ± 0.26 ^b	0.49 ± 0.04
EEIT-H	27.1 ± 0.7	3.0 ± 0.4 ^a	5.44 ± 0.18 ^b	0.51 ± 0.05

- 1) Mean ± Standard Error (n = 5)
- 2) C: Control group (not containing 75% ethanol 80°C persimmon leaf extract)
 EE-4: 4% EE (75% ethanol 80°C extract) diet
 EE-8: 8% EE (75% ethanol 80°C extract) diet
 EEIT-L: 1.65 mg/100 μ l EE (75% ethanol 80°C extract dissolved in DMSO) intratumorally injected every other day
 EEIT-H: 3.3 mg/100 μ l EE (75% ethanol 80°C extract dissolved in DMSO) intratumorally injected every other day
- 3) Not significant at $\alpha = 0.05$ by Duncan's multiple range test
- 4) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha = 0.05$ by Duncan's multiple range test

류, 추출온도, 추출물의 농도)의 유의성 및 각 요인간 상호작용의 효과를 $\alpha = 0.05$ 수준에서 검정한 결과, 추출용매의 종류와 추출물의 농도가 SNU16의 생존율에 유의적으로 영향을 미치는 것으로 나타났고, 세가지 요인간 상호작용 모두 SNU16의 생존율에 유의적으로 영향을 미치는 것으로 나타났다.

3. 한국인 위암 세포주를 이용한 동물실험

1) Nude mouse의 식이섭취량과 체중증가량 및 간과 비장의 무게

SNU16을 이식한 nude mouse의 하루평균 식이섭취량과 실험기간동안의 체중증가량 및 체중 100 g 당 간과 비장의 무게를 측정한 결과는 Table 4와 같았다. SNU16을 이식한 nude mouse의 하루평균 식이섭취량은 모든 실험군들이 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 실험기

간동안의 체중증가량은 IT 저농도 주입군을 제외한 모든 실험군들이 대조군에 비해 유의적으로 높았으며, 특히 4% 식이군과 IT 고농도 주입군이 높았다. 한편 nude mouse의 체중 100 g 당 간의 무게는 4% 식이군만이 대조군에 비해 유의적으로 높았으며, 체중 100 g 당 비장의 무게는 모든 실험군들이 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다.

2) Nude mouse의 종양의 무게와 부피

SNU16을 이식한 nude mouse의 종양의 무게, 체중 100 g 당 종양의 무게 및 종양의 부피를 측정한 결과는 Table 5와 같았다. 종양의 무게, 체중 100 g 당 종양의 무게와 종양의 부피 모두 모든 실험군들이 대조군에 비해 유의적으로 낮았다. 특히 8% 식이군이 4% 식이군에 비해 종양의 무게와 부피가 낮은 경향을 보였으며, IT 주입군에서는 저농도 주입군이 고농도 주입군보다 종양의 무게와

부피가 낮은 경향을 보였다. 그리고 처리방법 (식이, IT injection)에 따른 효과를 살펴본 결과, 각각의 처리방법이 종양의 무게와 부피를 낮춘 정도가 유사하게 나타났다.

3) Nude mouse의 비장 면역세포 측정

SNU16을 이식한 nude mouse의 비장에서 면역세포를 분리한 후, 단클론항체 (monoclonal antibody)를 이용하여 T cell subpopulation (CD4, CD8), natural killer (NK) cell, MHC class II의 분포를 flow cytometry로 immunophenotyping한 결과는 Table 6과 같았다.

Helper T cell은 IT 고농도 주입군이 대조군에 비해 유의적으로 높았고, 4% 식이군이 높은 경향을 보였으며, IT 저농도 주입군과 8% 식이군은 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이에 비해 cytotoxic T cell은 모든 실험군

들이 대조군에 비해 유의적으로 높았고 그 차이의 폭도 helper T cell 보다 컸다. 그 결과 helper/cytotoxic T cell ratio도 모든 실험군들이 대조군에 비해 유의적으로 낮았으며, 특히 8% 식이군과 IT 저농도 주입군이 더욱 낮았다. 한편 natural killer cell과 MHC class II의 경우 모든 실험군들이 대조군에 비해 유의적으로 높았으며, 4% 식이군과 8% 식이군 사이에, 그리고 IT 저농도 주입군과 IT 고농도 주입군 사이에 뚜렷한 비례 관계는 나타나지 않았다.

고 찰

1. 감잎 추출물의 한국인 위암 세포주에 대한 세포독성효과

추출용매와 추출농도를 달리한 조건에서 감잎 추출물을 제조하여 MTT assay 방법으로 SNU16 (한국인 위암세포)에 대한 세포독성효과를 측정하였다. 그 결과 감잎 추출물들은 강한 세포독성효과를 나타내었으며 용매에 따른 차이가 특징적으로 나타나서 75% 에탄올 추출물, 50% 에탄올 추출물, 물추출물의 순서로 나타났다. 6가지 추출물 중 물 80℃ 추출물을 제외한 나머지 추출물들이 강한 효과를 나타내었다. 세가지 요인 (추출용매의 종류, 추출농도, 추출물의 농도)의 유의성을 $\alpha = 0.05$ 수준에서 검정한 결과, 추출용매의 종류와 추출물의 농도 그리고 세가지 요인간 상호작용 모두 SNU16의 생존율에 유의적으로 영향을 미치는 것으로 나타났다.

이처럼 75% 에탄올 80℃ 추출물이 매우 강한 세포독성효과를 나타낸 반면 물추출물의 경우 효과가 약하게 나타난 것은 추출조건에 따라 추출물의 총 flavonoids 함량과 항산화 비타민 함량이 달라진 것과 무관하지 않다고 생각된다. 본 실험에서 감잎 추출물 건조시료 1 g에 함유되

Table 5. Cancer weight, cancer weight per 100g body weight and cancer volume in SNU16 transplanted nude mice¹⁾

Groups ²⁾	Cancer weight (g)	Cancer weight (g/100 g body weight)	Cancer volume (mm ³)
C	1.43 ± 0.11 ^{ab}	4.49 ± 0.64 ^a	1298.93 ± 89.26 ^a
EE-4	0.38 ± 0.05 ^b	1.21 ± 0.17 ^b	243.99 ± 42.24 ^b
EE-8	0.28 ± 0.07 ^b	0.86 ± 0.21 ^b	136.83 ± 25.89 ^b
EEIT-L	0.26 ± 0.04 ^b	0.86 ± 0.13 ^b	106.00 ± 23.02 ^b
EEIT-H	0.36 ± 0.07 ^b	1.15 ± 0.20 ^b	222.37 ± 37.81 ^b

- 1) Mean ± Standard Error (n = 5)
- 2) C: Control group (not containing 75% ethanol 80℃ persimmon leaf extract)
 EE-4: 4% EE (75% ethanol 80℃ extract) diet
 EE-8: 8% EE (75% ethanol 80℃ extract) diet
 EEIT-L: 1.65 mg/100 μl EE (75% ethanol 80℃ extract dissolved in DMSO) intratumorally injected every other day
 EEIT-H: 3.3 mg/100 μl EE (75% ethanol 80℃ extract dissolved in DMSO) intratumorally injected every other day
- 3) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha = 0.05$ by Duncan's multiple range test

Table 6. Immunophenotyping of splenocytes in SNU16 transplanted nude mice¹⁾

Groups ²⁾	CD4 ⁴⁾ (%)	CD8 ⁴⁾ (%)	CD4/CD8 ⁴⁾ (ratio)	NK ⁴⁾ (%)	MHC class II ⁴⁾ (%)
C	2.51 ± 0.33 ^{ab}	2.65 ± 0.38 ^b	0.96 ± 0.07 ^a	26.96 ± 1.15 ^b	11.66 ± 0.97 ^c
EE-4	3.28 ± 0.24 ^{ab}	5.64 ± 0.41 ^a	0.60 ± 0.06 ^b	48.73 ± 1.52 ^a	29.10 ± 1.76 ^a
EE-8	2.61 ± 0.19 ^b	6.21 ± 0.60 ^a	0.43 ± 0.03 ^c	49.17 ± 1.28 ^a	27.23 ± 1.94 ^{ab}
EEIT-L	2.27 ± 0.17 ^b	5.86 ± 0.51 ^a	0.41 ± 0.06 ^c	50.29 ± 1.85 ^a	22.44 ± 2.24 ^b
EEIT-H	4.48 ± 0.32 ^a	6.64 ± 0.62 ^a	0.66 ± 0.04 ^b	48.82 ± 1.11 ^a	22.91 ± 2.26 ^b

- 1) Mean ± Standard Error (n = 5)
- 2) C: Control group (not containing 75% ethanol 80℃ persimmon leaf extract)
 EE-4: 4% EE (75% ethanol 80℃ extract) diet
 EE-8: 8% EE (75% ethanol 80℃ extract) diet
 EEIT-L: 1.65 mg/100 μl EE (75% ethanol 80℃ extract dissolved in DMSO) intratumorally injected every other day
 EEIT-H: 3.3 mg/100 μl EE (75% ethanol 80℃ extract dissolved in DMSO) intratumorally injected every other day
- 3) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha = 0.05$ by Duncan's multiple range test
- 4) CD4: helper T cell
 CD8: cytotoxic T cell
 CD4/CD8: helper/cytotoxic T cell ratio
 NK: natural killer cell
 MHC class II: major histocompatibility complex class II

어 있는 총 flavonoids 함량은 75% 에탄올 80°C 추출물이 98.34 mg로 가장 높았고 반면에 물추출물들은 낮았다. 추출물 건조시료 1 g 당 항산화 비타민 중 비타민 A의 함량은 75% 에탄올 80°C 추출물이 387.87 I.U.로 가장 높았으며 물추출물들의 함량은 매우 낮았다. 한편 비타민 E의 함량은 75% 에탄올 80°C 추출물이 1.6374 mg으로 가장 높았고, 75% 에탄올 실온 추출물이 다음으로 높았으며, 물 추출물들의 함량은 매우 낮았다. 전체적으로 75% 에탄올 80°C 추출물이 추출수율, 총 flavonoids 함량, 비타민 A, 비타민 E의 함량이 가장 높았으며 이것이 SNU16에 대해 가장 강한 세포독성을 나타내었다.

Flavonoids는 대표적인 항산화제로서 조직의 손상방지, 항암작용 등을 하는 것으로 알려지고 있다.¹⁶⁾ 특히 flavonoids는 최근 암세포의 DNA, RNA, protein의 합성을 억제, 또는 cAMP의 농도를 증가시킴으로써 종양세포의 분열을 억제하거나 암세포의 apoptosis를 유도하는 등 다각적 기전을 통해 항암효과를 발휘하는 것으로 관심을 불러 일으키고 있다.¹⁷⁾ 한편 Yamamoto 등의 연구에서는 비타민 A가 인간 상악골 암세포주에 대해 세포독성효과를 발휘하였다.⁵³⁾ 그리고 Menon⁵⁴⁾과 Maramag⁵⁵⁾ 등의 연구에서는 비타민 C가 전립선 암세포주에 대해 세포독성효과를 발휘하였으며, Zhao⁵⁶⁾ 등의 연구에서는 비타민 E가 인간 유방암세포의 apoptosis를 유도하였고, Wu⁵⁷⁾ 등의 연구에서는 비타민 E가 인간 위암세포주에 대해 세포독성효과를 발휘하였다.

이처럼 감잎 추출물의 추출수율과 flavonoids, 비타민 A, 비타민 E의 함량이 높을수록, SNU16에 대한 세포독성 효과가 큰 것으로 보아 이들 사이에 상관관계가 있을 수 있다고 생각된다. 즉, 추출용매의 에탄올 함량이 높아질수록 그 추출물 내의 flavonoids, 비타민 A, 비타민 E의 함량이 많아졌고, 이들 항산화 물질들이 전술한 다각적 기전들을 통해 암세포의 분열을 억제하고, apoptosis를 유도하여 SNU16에 대한 세포독성효과를 발휘했을 가능성이 있다고 생각된다.

2. 감잎 추출물의 한국인 위암 세포주를 이식한 Nude mouse에서의 항암효과

감잎 추출물들 중 75% 에탄올 80°C 추출물이 추출수율과 flavonoids, 비타민 A, 비타민 E의 함량이 가장 높았으며 SNU16에 대해 가장 강한 세포독성효과를 발휘하였으므로, SNU16을 이식한 nude mouse에 이 추출물을 투여하여 생체내에서의 항암효과와 이들 nude mouse의 면역능에 미치는 효과를 측정하였다.

SNU16을 이식한 nude mouse의 종양의 무게와 부피는 모든 실험군들이 대조군에 비해 유의적으로 낮았고, 식이내 감잎시료 함량이 높을수록 낮은 경향을 보여주었다. 세포독성 실험결과 추출수율, 총 flavonoids 함량, 비타민 A, 비타민 E의 함량이 가장 높았던 75% 에탄올 80°C 추출물이 SNU16에 대해 가장 강한 세포독성효과를 나타내었으며 SNU16을 이식한 nude mouse의 종양에 대해 75% 에탄올 80°C 추출물이 같은 방식으로 작용했을 가능성이 있다고 생각된다. 즉 flavonoids, 비타민 A, 비타민 C, 비타민 E 등 항산화 물질들이 전술한 다각적 작용을 통해 암세포의 분열을 억제하고,^{16,54-56)} apoptosis를 유도하여^{17,57)} 종양의 무게와 부피를 낮추는데 기여했을 가능성이 있다고 생각된다. 또한 flavonoids, 비타민 A, C, E 이외의 각종 미량성분들도 함께 항암효과를 발휘했을 가능성도 있다고 생각된다. 한편 *in vivo* 연구인 SNU16을 이식한 nude mouse에서는 전술한 기전 이외에 면역세포 연계를 포함한 다른 기전들도 항암효과 발현에 작용했을 가능성도 있다고 생각된다.

몇 차례의 대규모 역학조사결과 항산화성 polyphenol 및 flavonoids, 항산화 비타민 성분들을 다량 함유한 과일,¹¹⁻¹³⁾ 야채,^{12,13)} 녹차¹⁴⁾ 등의 섭취가 증가할수록 식도암, 위암을 비롯한 각종 암의 발병률이 낮았다. Flavonoids는 대표적인 항산화제로서 유전자 손상방지, 노화방지, 면역 활성화 및 항암작용 등을 하는 것으로 알려지고 있다.¹⁶⁾

Retinoids는 정상적인 세포증식과 분화를 유지하는 역할을 한다.⁵⁸⁾ Retinoids는 세포의 과도한 증식을 억제하고 정상세포로의 분화를 촉진하는데, 이를 통해 retinoids가 암 발생을 억제하거나 진행을 저지시키는 역할을 담당할 수 있다는 가능성이 제시되고 있다.⁵⁹⁾ 역학조사 결과 비타민 A 섭취 부족시 위암과 식도암의 발병률이 증가하였으며,^{60,61)} 비타민 A의 섭취가 충분하고 혈중 비타민 A 수준이 높을수록 각종 암의 발병률이 감소하였다.⁶²⁾ 한편 임상연구결과 암환자들의 혈중 비타민 A 수준이 매우 낮았으며⁶³⁾ 암환자들에게 비타민 A를 투여시 치료효과가 있는 것으로 나타났다.⁶⁴⁾ 또한 쥐를 이용한 동물실험에서도 비타민 A가 종양의 성장을 억제하는 효과를 발휘하였다.⁶⁵⁾

역학조사결과 충분한 비타민 C 섭취시 위암⁶⁶⁾으로 인한 사망률이 감소하였다. 특히 비타민 C는 항산화제로 작용하여 위암의 위험을 줄여주고,^{67,68)} *helicobacter pylori*에 감염된 사람들이 비타민 C를 충분한 섭취시 위암으로의 진행을 늦추었다는 연구결과들이 보고되고 있다.^{69,70)} 역학조사 결과 혈중 비타민 C 수준이 높을수록 위염, 위암의 발병률이 현저히 감소하였다.⁷¹⁾ 한편, 임상연구결과 암환자들의

혈중 비타민 C 수준이 매우 낮았으며⁷²⁾ 비타민 C를 암환자의 치료를 위해 다량 투입하여 좋은 효과를 거둔 연구도 보고되었다.⁷³⁾ 또한 유방암을 이식한 mouse에 비타민 C를 투여시 암의 성장이 억제되었다.⁷⁴⁾ 비타민 E 역시 역학조사에서 대장암,⁷⁵⁾ 위암^{66,76)}의 발생과 음의 상관관계를 나타내었고, 암환자들의 혈중 비타민 E 수준이 낮았으며,⁷⁷⁾ 동물실험에서 대장암 등의 성장을 억제하였다.⁷⁸⁾

SNU16을 이식한 nude mouse의 종양의 무게를 살펴보면, 4% 식이군의 종양무게는 대조군의 26.57%, 8% 식이군의 종양무게는 19.58%, IT 저농도 주입군의 종양무게는 18.18%, IT 고농도 주입군의 종양무게는 대조군의 25.17%에 불과해, 감잎 75% 에탄올 80℃ 추출물을 처리한 모든 군에서 73% 이상의 높은 종양 성장 억제효과가 나타났다. 감잎 추출물이 이처럼 SNU16을 이식한 nude mouse에서 종양의 무게와 부피를 유의적으로 낮춘 것이 nude mouse의 면역능 변화와 연계되었을 가능성은 없는지 알아보기 위해 nude mouse의 비장 면역세포들을 측정하였다. 그 결과 모든 실험군들의 natural killer cell과 cytotoxic T cell이 대조군에 비해 유의적으로 높아서 세포성 면역의 증강이 두드러졌고, 모든 실험군들의 MHC class II 분자도 대조군에 비해 유의적으로 높아 T cell의 암세포 인식을 돕는 항원제시세포들의 활동도 활발했음을 알 수 있었다. 그러므로 비록 IT 고농도 주입군을 제외한 실험군들의 helper T cell은 대조군에 비해 유의적으로 증가하지 않았지만, 나머지 면역지표들의 증가가 두드러져 이를 통해 감잎 75% 에탄올 80℃ 추출물이 nude mouse에서의 SNU16의 성장을 억제했을 가능성도 있을 것으로 생각된다. 이를 각 면역지표별로 좀 더 자세히 살펴보면 다음과 같다.

모든 실험군들의 natural killer cell이 대조군에 비해 유의적으로 높았으므로 감잎 추출물의 투여가 natural killer cell의 증강을 초래하였고, 이것이 초기에 암세포를 파괴했을 가능성이 있다고 생각된다. Natural killer cell은 신체 내를 순환하며 종양세포의 MHC class I 분자 발현 감소를 인식하여 종양세포를 직접 파괴한다.^{9,10)} 이같은 방식을 통해 natural killer cell은 암세포에 대한 비특이적 방어기전으로 작용한다. T cell이 활성화되기까지 상당한 시간이 소요되며 cytotoxic T cell은 활성화된 후에야 target cell을 공격할 과립들을 지니는 반면 natural killer cell은 처음부터 크고 많은 과립들을 지니고 다니다가 종양세포를 발견하면 이 과립들을 통해 즉시 종양세포를 파괴함으로써 암세포에 대한 초기방어에서 매우 중요한 역할을 담당한다.^{9,10)} 특히 nude mouse는 다른 종의 mouse에 비해 성

숙한 T cell이 상대적으로 부족하여 면역체계에서 natural killer cell의 중요성이 더욱 크다. 여러 연구를 통해 T cell이 상대적으로 부족한 상태인 nude mouse에서 natural killer cell은 정상수준이거나 오히려 높은 수준인 것으로 밝혀졌고, 이들 nude mouse에서 자연발생적인 암 발병률이 높지 않음이 밝혀졌다.¹⁰⁾

정상인과 비교시 암환자들의 natural killer cell activity가 낮았고,⁷⁹⁾ 특히 위암 환자들 혈액내 natural killer cell activity가 정상인에 비해 매우 낮았다.⁸⁰⁾ 그리고 암환자들에서 종양의 크기가 커지고, 전이가 될수록 natural killer cell의 activity는 더욱 감소하는 경향을 보였으며⁸¹⁾ 영양불량상태에 있는 암환자들에게 TPN 방법을 통해 각종 영양을 충분히 공급하자 natural killer cell의 activity가 급속히 회복되었다.⁸²⁾ 또한 암환자들 중 저절로 암이 완치된 환자들을 조사한 결과 이 환자들의 natural killer cell의 수가 증가한 것으로 나타났다.⁸³⁾ 본 실험에서 실험군들과 대조군간의 natural killer cell의 차이도 컸고, 본 실험이 초기 암치료 효과를 살펴본 것이었으므로 암세포에 대한 초기방어에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 natural killer cell이 본 실험에서 항암작용에 기여했을 가능성이 있다고 생각된다.

종양의 성장억제에는 T cell의 역할도 매우 중요하다. 항원제시세포의 도움을 받아 helper T cell이 항원을 인식하게 되면, 이 helper T cell이 각종 cytokine을 분비하여 cytotoxic T cell을 활성화시키며^{9,10)} 활성화된 cytotoxic T cell은 종양세포를 공격하여 파괴한다.^{9,10)} 정상인에 비해 위암환자들은 helper T cell (CD4)과 cytotoxic T cell (CD8)의 절대 수도 적었고,⁸⁴⁾ T cell subpopulation의 균형도 많이 깨어졌다.⁸⁵⁾ 또한 암환자들은 종양항원의 인식을 담당하는 TCR에 이상이 생겨 T cell이 종양을 제대로 인지하지 못하였으며,⁸⁶⁾ 위암 환자들의 T cell의 기능이 현저히 저하되어 있었다.⁸⁷⁾ 한편 T cell이 종양을 인식하기 위해 항원제시세포 (APC)의 도움을 필요로 하므로, 항원제시세포들의 기능이 저하되었을 때 종양의 성장이 가속화되었고,⁸⁸⁾ 반면에 항원제시세포의 기능이 향상되었을 때 cytotoxic T cell에 의한 종양 파괴가 증가하였다.⁸⁹⁾ 그러므로 이 연구들을 통해 항원제시세포가 T cell의 종양 인식과 파괴를 도움으로써 암의 치료에 매우 중요한 작용을 하고 있음을 알 수 있었다.

본 실험에서 SNU16을 이식한 nude mouse의 경우 실험군들의 helper T cell은 대체로 대조군과 유사하였던 반면, cytotoxic T cell은 모든 실험군들이 대조군에 비해 유의적으로 높았고 이로 인해 실험군들의 helper/cytotoxic

T cell ratio가 대조군에 비해 유의적으로 낮았다. 이처럼 세포성 면역의 작동자인 cytotoxic T cell이 유의적으로 증가함으로써 세포성 면역이 증강되었다고 볼 수 있고, 이렇게 증강된 세포성 면역이 종양세포를 파괴하였을 가능성이 있다고 생각된다. 그리고 본 실험에서 모든 실험군들의 MHC class II가 대조군에 비해 유의적으로 증가하여서, 항원제시세포의 항원제시능 또한 증가하였음을 알 수 있었다.

Flavonoids가 면역에 미치는 영향을 살펴본 연구들에 의하면, flavonoids는 T cell 등의 임파구 증식을 유도하는 효과를 발휘하였고,⁹⁰⁾ cytotoxic T cell의 증식 촉진 및 cytotoxic T cell의 파괴능력 증진 효과를 발휘하였다.⁹¹⁾ 이외에도 flavonoids는 natural killer cell의 activity 증진 효과도 발휘하였다.⁹²⁾ 한편 비타민 A가 면역에 미치는 영향을 살펴본 연구들에 의하면 비타민 A의 만성 부족시 rat의 natural killer의 수와 기능이 감소하였고,⁹³⁾ β -carotene을 노인들에게 공급시 natural killer cell의 activity가 증가하였으며,⁹⁴⁾ mouse에서도 β -carotene이 natural killer cell의 activity를 증가시켰다.⁹⁵⁾ 그리고 암환자에게 비타민 A를 투여시 임파구의 수와 기능도 증가되었고,⁹⁶⁾ mouse에 비타민 A를 보충시 T cell의 기능이 증진되었다.⁹⁷⁾

비타민 C와 면역과의 관계를 살펴본 연구들에 의하면, 노령 mouse에 비타민 C를 보충시 natural killer cell의 기능이 증진되었으며,⁹⁸⁾ 흡연자들에게 비타민 C를 보충시 natural killer cell의 수가 증가되었고,⁹⁹⁾ mouse에 비타민 C를 공급시 natural killer cell의 activity가 증가되었다.¹⁰⁰⁾ 노령 mouse에 비타민 E를 보충시 natural killer cell의 기능이 증진되었고,⁹⁸⁾ 노화로 인한 노인들의 T cell 기능 저하시 비타민 E를 보충해주자 T cell의 기능이 회복되었다.¹⁰¹⁾ 여러 연구결과 비타민 E가 T cell의 분화, 성숙에 중요한 역할을 담당하는 것으로 밝혀졌으며,¹⁰²⁾ T cell의 활성화 및 기능 증진에도 기여하는 것으로 밝혀졌다.¹⁰³⁾

이처럼 감잎 75% 에탄올 80°C 추출물내에 풍부하게 함유되어 있는 항산화 물질들이 natural killer cell, T cell 등 주된 면역세포들의 분화, 증식을 돕고 활성화 및 기능유지를 도움으로써 SNU16을 이식한 nude mouse에서 면역능 증가를 초래하였으며 이것이 SNU16의 성장을 억제하는데 기여했을 가능성이 있다고 생각된다. 본 실험에서는 flavonoids, 비타민 A, 비타민 C, 비타민 E 이외의 물질들의 함량은 측정하지 못하였다. 그러나 그 이외의 각종 미량성분들도 감잎 추출물의 항암작용에 기여했을 가능성이 있다고 생각된다. 또한 본 실험에서는 감잎추출물 시료내의 항산화 물질들의 항산화 기능을 직접적으로 측정하지는 못하였다. 그러나 이들 항산화 물질들이 염색체와 세포

를 보호하고,¹⁸⁾ 면역세포들을 산화적 변성으로부터 보호하여 면역능을 증진시키며,²⁰⁾ 세포성 면역의 작동자인 T cell과 natural killer cell의 수와 activity를 증진시키는⁹⁰⁻¹⁰¹⁾ 것으로 알려져 있다. 또한 이들 물질들이 암세포의 apoptosis 유도,²⁶⁾ 세포간 신호전달관여,²⁵⁾ 암세포의 증식억제²⁷⁾ 등 다양한 항암효과를 발휘하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 본실험에서는 감잎추출물 시료내에 풍부하게 함유되어 있는 이들 항산화 물질들의 면역, 항암 효과를 함께 살펴보고자 하였다.

한편 IT 주입군들의 경우 감잎 75% 에탄올 80°C 추출물이 암세포와 직접 접촉하여 세포독성효과를 발휘했을 가능성이 있다고 생각된다. 본 실험에서 MTT assay 방법을 통해 감잎 75% 에탄올 80°C 추출물의 SNU16에 대한 직접적인 세포독성효과를 측정 한 결과, 감잎 75% 에탄올 80°C 추출물이 nude mouse 이식에 사용된 SNU16에 대해 강한 세포독성효과를 발휘하였다. 그리고 박건영 등의 연구결과 감잎 추출물 성분이 AZ-521 인간 위암세포의 분열을 억제하였고,³³⁾ 문숙희 등의 연구와³⁴⁾ 김병기 등의 연구에서도³⁵⁾ 감잎 추출물이 sarcoma-180에 대해 세포독성효과를 발휘하였다. 무엇보다 IT 주입방법이 종양에 직접 시료를 주입하여 치료효과를 살펴보는 방법이므로 감잎 75% 에탄올 80°C 추출물이 SNU16 세포와 접촉하여 암세포의 분열을 억제하거나 암세포의 apoptosis를 유도하는 등 다각적 기전을 통해 직접적인 항암효과를 발휘했을 가능성도 있다고 생각된다.

Nude mouse의 비장 면역세포들을 측정 한 결과 natural killer cell과 cytotoxic T cell의 증가가 두드러져 이것이 nude mouse에서의 종양 성장 억제효과에 기여했을 가능성도 있다고 생각된다. 여러 연구결과 감잎 75% 에탄올 80°C 추출물 시료내에 풍부하게 함유되어 있는 flavonoids, 비타민 A, C, E 등의 항산화 물질들이 natural killer cell, T cell 등 주된 면역세포들의 분화, 증식을 돕고 활성화 및 기능유지를 돕는 것이 밝혀졌으므로, 본 실험에서도 이들 항산화 물질들이 SNU16을 이식한 nude mouse에서의 면역능 증가를 초래했고, 이것이 *in vivo* 항암작용을 나타내는데 기여했을 가능성이 있다고 생각된다. 아울러 감잎추출물의 항산화작용을 측정하지 못한 것이 본실험의 제한점으로 생각되며, 향후 항산화 작용 및 면역, 항암효과를 연계한 연구가 이루어지는 것이 바람직하다고 생각된다.

요약 및 결론

본 연구에서는 추출용매 (0%, 50%, 75% 에탄올)와 추

출온도 (80℃, 실온)를 달리한 감잎추출물들의 SNU16에 대한 세포독성효과를 알아보고, 그 가운데 가장 강한 항암효과를 나타낸 추출물을 선정하여 SNU16을 이식한 nude mouse에서의 항암효과 및 면역능에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

추출용매의 에탄올 함량이 높을수록 추출수율과 flavonoids, 비타민 A, E의 함량이 높은 경향을 나타내었다. 그리고 MTT assay 방법으로 감잎추출물들의 SNU16에 대한 세포독성효과를 측정한 결과 감잎추출물들은 강한 세포독성효과를 나타내었다. 이때 용매에 따른 차이가 특징적으로 나타나서 75% 에탄올 추출물들이 가장 강한 효과를 나타내었고, 50% 에탄올 추출물들, 물출물들의 순으로 나타났고, 물 80℃ 추출물을 제외한 모든 추출물들이 강한 효과를 나타내었다. 세가지 요인 (추출용매의 종류, 추출온도, 추출물의 농도)의 유의성을 $\alpha = 0.05$ 수준에서 검정한 결과, 추출용매의 종류와 추출물의 농도가 SNU16의 생존율에 유의적으로 영향을 미치는 것으로 나타났고, 세가지 요인간 상호작용 모두 SNU16의 생존율에 유의적으로 영향을 미치는 것으로 나타났다. 그리고 감잎추출물들 중 75% 에탄올 80℃ 추출물이 추출수율과 flavonoids, 비타민 A, E의 함량이 가장 높았으며, 가장 강한 세포독성효과를 발휘하여 SNU16을 이식한 nude mouse에서의 항암효과를 측정하기 위한 시료로 선정하였다.

SNU16을 이식한 nude mouse (BALB/c)에 75% 에탄올 80℃ 추출물을 투여하여 항암효과를 측정하였다. SNU16을 이식한 nude mouse의 종양의 무게와 부피는 모든 실험군들이 대조군에 비해 유의적으로 낮았고, 식이내 감잎 시료의 함량이 증가할수록 낮은 경향을 나타내었다. 한편 감잎 75% 에탄올 80℃ 추출물이 이들 nude mouse의 면역능에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 nude mouse의 비장에서 면역세포를 분리한 후, 단클론항체를 이용하여 T cell subpopulation (CD4, CD8), natural killer (NK) cell, MHC class II의 분포를 flow cytometry로 immunophenotyping 하였다. SNU16을 이식한 nude mouse의 경우 helper T cell (CD4)은 IT 고농도 주입군만이 대조군에 비해 유의적으로 높았으나 cytotoxic T cell (CD8)은 모든 실험군들이 대조군에 비해 유의적으로 높았으며 그 차이의 폭도 컸다. 그러므로 helper/cytotoxic T cell ratio (CD4/CD8)의 경우 모든 실험군들이 대조군에 비해 유의적으로 낮았다. 한편 natural killer cell과 MHC class II의 경우 모든 실험군들이 대조군에 비해 유의적으로 높았다.

이상의 결과를 종합해보면 추출용매와 추출온도를 달리

한 감잎추출물들이 SNU16에 대해 강한 세포독성효과를 나타내었고, 용매에 따른 차이가 특징적으로 나타나서 에탄올 함량이 높을수록 더욱 강한 세포독성효과가 나타났으며 추출수율과 flavonoids 함량, 비타민 A, 비타민 E의 함량도 높았다. 또한 SNU16을 이식한 nude mouse에서 감잎 75% 에탄올 80℃ 추출물의 투여가 종양의 무게와 부피를 모두 유의적으로 낮추어 항암효과를 나타내었다. 그리고 nude mouse의 비장의 면역세포들을 측정한 결과 natural killer cell이 대조군에 비해 유의적으로 높았으며, cytotoxic T cell도 증가하여서 세포성 면역의 증강이 두드러졌다. 그러므로 이처럼 항암효과를 발휘한 감잎을 기능성 식품 및 약효 식품의 신소재로 개발하는 것이 위암 발병률이 높은 우리 국민의 건강 증진을 위해 바람직할 것으로 생각된다.

Literature cited

- 1) Annual Report on the Cause of Death Statistics. National Statistical Office, Republic of Korea, 2001
- 2) Kim HJ, Wang SK. Dietary factors related with cancer. *Liv Sci of Tj Univ* 3: 99-130, 1997
- 3) Lee SR Food Safety Research Ewha Woman's University Press, 1993
- 4) Jacobs MM. Diet, Nutrition, and cancer research: an overview. *Nutr Tod* 28 (3): 19-23, 1993
- 5) Casarett D. Toxicology: The basic science of poisons. McGraw-Hill, 1996
- 6) Doll R. The lessons of life: keynote address to the nutrition and cancer conference. *Canc Res* 52: 2024s-2029s, 1992
- 7) Weiss SE, Tartert PI, Bratton J. Ethnic differences in risk and prognostic factors for breast cancer. *Canc* 76(2): 268-274, 1995
- 8) Zang EA, Cohen LA. Differences in nutritional risk factors for breast cancer among New York City white, Hispanic, and black college students. *Ethn and Dis* 4(1): 28-40, 1994
- 9) Janis Kuby. Immunology. Freeman, 1998
- 10) Abul KA, Andrew HL, Jordan SP. Cellular and Molecular Immunology. WB Saunders Company, 1994
- 11) Hollman PC, Hertog MG, Katan MB. Role of dietary flavonoids in protection against cancer and coronary heart disease. *Biochem Soc Trans* 24(3): 785-789, 1996
- 12) Garcia CR, Riboli E. Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of lung cancer in women in Barcelona, Spain. *Nutr Canc* 32(3): 154-158, 1998
- 13) Michael GLH, Martijin BK. Flavonoids intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* 155: 381-386, 1995
- 14) Gao YT, Mclaughlin JK, Dai Q, Fraumerni JF. Reduced risk of esophageal cancer associated with green tea consumption. *J Natl Canc Inst* 86: 855-858, 1994
- 15) Laura B. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 56(11): 317-333, 1998

- 16) Nijveldt RJ, Nood E, Hoom DE. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74: 418-425, 2001
- 17) Middleton E Jr. Some biological properties of plant flavonoids. *Anl Aller* 61: 53-57, 1988
- 18) Joung SY, Lee SJ, Sung NJ, Jo JS, Kang SK. The chemical composition of persimmon (*Disopyros kaki*) leaf tea. *J Kor Soc F Nutr* 24 (5): 720-726, 1995
- 19) Yu FS, Hisako I, Toshihiro O, Mie W. Suppressing effect of tannic acid on UV and chemically induced chromosome aberrations in cultured mammalian cells. *Agric Biol Chem* 52(10): 2423-2428, 1988
- 20) Kang WW, Kim GY, Park MR, Choi SW. Antioxidative properties of persimmon leaves. *F and Biotech* 5: 48-53, 1996
- 21) Sakagami H, Kuribayashi N, Kawazoe Y. Induction of DNA fragmentation by tannin and lignin related substances. *Antic Res* 15(5B): 2121-2128, 1995
- 22) Uchiumi F, Sato T, Tanuma S. Identification and characterization of a tannic acid responsive negative regulatory element in the mouse mammary tumor virus promoter. *J Biol Chem* 273 (20): 12499-12508, 1998
- 23) Annuk H, Hirno S, Wadstrom T. Effect on cell surface hydrophobicity and susceptibility of *helicobacter pylori* to medicinal plant extracts. *FEMS Microbiol Lett* 172(1): 41-45, 1999
- 24) Gensler HL. Prevention of photoimmunosuppression and photocarcinogenesis by tannic acid. *Nutr Canc* 29 (2): 157-162, 1997
- 25) Shen F, Herenyiova M, Weber G. Synergistic down-regulation of signal transduction and cytotoxicity by tiazofurin and quercetin in human ovarian carcinoma cells. *Life Sci* 64 (21): 1869-1876, 1999
- 26) Deora AB, Miranda MB, Rao SG. Down-modulation of P210 bcr/abl induces apoptosis/differentiation in K562 leukemic blast cells. *Tumori* 83 (4): 756-761, 1997
- 27) Kang TB, Liang NC. Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukemia cells. *Biochem Pharm* 54 (9): 1013-1018, 1997
- 28) Steerenberg PA, Garssen J, Dortant PM, Vliet H, Geerse E, Van LH. The effect of oral quercetin on UVB-induced tumor growth and local immunosuppression in SKH-1. *Canc Let* 114(1-2): 187-189, 1997
- 29) Carrero P, Ortega H, Martinez BJ, Gomez CD, Lasuncion MA. Flavonoid induced ability of minimally modified low density lipoproteins to support lymphocyte proliferation. *Biochem Pharm* 55 (7): 1125-1129, 1998
- 30) Abou KM, Shier WT. Isolation and characterization of an antiviral flavonoid from *Waldsteinia fragarioides*. *J of Nat Prod* 55 (10): 1525-1527, 1992
- 31) Palanichamy S, Nagarajan S. Analgesic activity of *Cassia alata* leaf extracts and kaempferol 3-o-sophoroside. *J of Ethnopharm* 29 (1): 73-78, 1990
- 32) Kwon EY, Kim MK, Jeon MH. Adsorptivities of Cu (II) and Pb (II) ions in water by persimmon leaves. *Bull of Environm Sci* 14: 3-8, 1993
- 33) Park KY, Moon SH, Rhee SH, Baek KA, Lim SY, Yi SY. Effect of tannin from persimmon leaves on the growth inhibition and the synthesis of mRNA of type IV collagen in AZ-521 human gastric cancer cells. *Environm Muta and Carcino* 15-1: 32-37, 1995
- 34) Moon SH, Kim KH, Park KY. Antitumor effect of persimmon leaves *in vivo* using sarcoma-180 cells. *J Kor Soc F Sci Nutr* 25 (5): 865-870, 1996
- 35) Kim BG, Rhew TH, Choe ES, Chung HY, Park KY, Rhee SH. Effect of selected persimmon leaf components against sarcoma 180 induced tumor in mice. *J Kor Soc F Nutr* 22 (3): 334-339, 1993
- 36) Hibasami H, Komiay T, Achiwa Y, Ohnishi K, Kojima T, Nakanishi K, Akashi K, Hara Y. Induction of apoptosis in human stomach cancer cells by green tea catechins. *Oncol Rep* 5 (2): 527-529, 1998
- 37) Yang CS, Yang GY, Landau JM, Kim S, Liao J. Tea and tea polyphenols inhibit cell hyperproliferation, lung tumorigenesis, and tumor progression. *Exp Lung Res* 24 (4): 629-639, 1998
- 38) Ahn HY, Hadizadeh KR, Seul C, Yun YP, Vetter H, Sachinidis A. Epigallocatechin-3 gallate selectively inhibits the PDGF-BB-induced intracellular signaling transduction pathway in vascular smooth muscle cells and inhibits transformation of sis-transfected NIH 3T3 fibroblasts and human glioblastoma cells (A172). *Mol Biol Cell* 10 (4): 1093-1104, 1999
- 39) Chen ZP, Schell JB, Ho CT, Chen KY. Green tea epigallocatechin gallate shows a pronounced growth inhibitory effect on cancerous cells but not on their normal counterparts. *Canc Lett* 129 (2): 173-179, 1998
- 40) Conney AH, Lu YP, Lou YR, Xie JG, Huang MT. Inhibitory effect of green and black tea on tumor growth. *Poc Soc Exp Biol Med* 220 (4): 229-233, 1999
- 41) Kang YH, Park YK, Ha TY, Moon KD. Effects of pine needle extracts on serum and liver lipid contents in rats fed high fat diet. *J Kor Soc F Nutr* 25 (3): 367-373, 1996
- 42) The Industrial Dictionary of Foods: 815-836. Department of health and welfare. Republic of Korea, 2000
- 43) Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J of Immun Meth* 94: 57-63, 1986
- 44) Lin QS, Ye XL, Louis G, Rene OM, Philippe AC. Antitumor and radiosensitizing effects of (E)-2'-Deoxy-2'-(fluoromethylene) cytidine, a novel inhibitor of ribonucleoside diphosphate reductase on human colon carcinoma xenografts in nude mice. *Canc Res* 57: 4023-4028, 1997
- 45) Lu M, Yin X, Shen Q, Lu J. Intratumoral injection of boiling carboplat in (BCBP) solution for treatment of liver cancer in the animal model. *Hepatogastro* 48 (41): 1328-1332, 2001
- 46) Zsuzsanna K, Attila N, Andrew VS, Francine H, Baodong S, Kate G, Gabor H. Inhibition of growth of MX-1, MCF-7-MIII and MDA-MB-231 human breast cancer xenografts after administration of a targeted cytotoxic analog of somatostatin, AN-238. *Int J Canc* 82: 592-598, 1999
- 47) Euhus DM, Hudd C, LaRegina MC, Johnson FE. Tumor measurement in the nude mouse. *J Surg Oncol* 31 (4): 229-234, 1986
- 48) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute Nutrition Ad Hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123: 1939-1951, 1993
- 49) Burger E, Vaz CC, Sano A, Calich VL, SingerVermes LM, Xi-

- dieh CF, Kashino SS, Nishimura K, Miyaji M. Paracoccidioides brasiliensis infection in nude mice: studies with isolates differing in virulence and definition of their T cell-dependent and T cell-independent components. *Am J Trop Med Hyg* 55(4) : 391-398, 1996
- 50) Steele JH. Food irradiation: a public health opportunity. *Int J Infect Dis* 4(2) : 62-66, 2000
- 51) Tritsch GL. Food irradiation. *Nutr* 16(7-8) : 698-701, 2000
- 52) Derby E, Reddy V, Kopp W, Nelson E, Baseler M, Sayers T, Malyguine A. Three-color flow cytometric assay for the study of the mechanisms of cell-mediated cytotoxicity. *Immun Lett* 78(1) : 35-39, 2001
- 53) Yamamoto Y, Inoue I, Takasaki T, Takahashi H. Inhibitory effects of selenium, vitamin A and butylated hydroxytoluene on growth of human maxillary cancer cells *in vitro*. *Auris Nasus Larynx* 23: 91-97, 1996
- 54) Menon M, Maramag C, Malhotra RK, Seethalakshmi L. Effect of vitamin C on androgen independent prostate cancer cells *in vitro*. *Canc Biochem Biophys* 16(1-2) : 17-30, 1998
- 55) Maramag C, Menon M, Balaji KC, Reddy PG, Laxmanan S. Effect of vitamin C on prostate cancer cells *in vitro*. *Prost* 32(3) : 188-195, 1997
- 56) Zhao B, Yu W, Kline K. Involvement of activator protein-1 in induction of apoptosis by vitamin E succinate in human breast cancer cells. *Mol Carcinog* 19(3) : 180-190, 1997
- 57) Wu K, Liu BH, Zhao Y. Effect of vitamin E succinate on expression of TGF-beta 1, c-Jun and JNK in human gastric cancer SGC-7901 cells. *W J Gastroen* 7(1) : 83-87, 2001
- 58) Jetten AM. Retinoids and their modulation of cell growth. In G. Giroff, ed. Growth and maturation factors wiley and sons, New York, 1985
- 59) De Luca LM. Retinoids and thier receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *Faseb J* 5: 2924-2933, 1991
- 60) Stehr PA, Gloninger MF, Kuller LH. Dietary vitamin A deficiencies and stomach cancer. *Am J Epid* 121(1) : 65-70, 1985
- 61) Yang CS, Sun Y, Yang QU, Li JY. Vitamin A and other deficiencies in Linxian, a high esophageal cancer incidence area in northern China. *J Natl Canc Inst* 73(6) : 1449-1453
- 62) Paganini HA, Ross RK, Gray GE, Henderson BE. Vitamin A and cancer incidence in a retirement community. *Natl Canc Inst Monogr* 69: 133-135, 1985
- 63) Flaim E, Williford WO, Mullen JL, Crosby LO. The relationship of serum cholesterol and vitamin A in hospitalized patients with and without cancer. *Am J Clin Nutr* 44(3) : 370-378, 1986
- 64) Istituto NT, Ospedale NM. Adjuvant treatment of stage I lung cancer with high dose vitamin A. *J Clin Oncol* 11(7) : 1216-1222, 1993
- 65) Seifter E, Padawer J, Rettura G, Goodwin P, Levenson SM. Cancer control: X-ray induced C3HBA tumor regression and prevention of its regrowth by beta-carotene or vitamin A. *Prog Clin Biol Res* 130: 237-247, 1983
- 66) Jacobs EJ, Connell CJ, McCullough ML, Chao A, Thun MJ. Vitamin C, vitamin E, and multivitamin supplement use and stomach cancer mortality in the cancer prevention study II cohort. *Canc Epide Biom Prev* 11(1) : 35-41, 2002
- 67) Cozzi R, Aglitti T, Gatta V, Salvia R. Ascorbic acid and β -carotene as modulators of oxidative damage. *Carcinoge* 18(1): 223-228, 1997
- 68) Weisburger JH. Causes of gastric and esophageal cancer : Possible approach to prevention by vitamin C. *Int J Vitam Nutr Res Suppl* 27: 381-402, 1985
- 69) You WC, Zhang L, Gail MH, Xu GW. Gastric dysplasia and gastric cancer: *Helicobacter pylori*, serum vitamin C, and other risk factors. *J Natl Canc Inst* 92(19) : 1607-1612, 2000
- 70) Feiz HR, Mobarhan S. Does vitamin C intake slow the progression of gastric cancer in *Helicobacter pylori*-infected populations? *Nutr Rev* 60(1): 34-36, 2002
- 71) Burr ML, Samloff IM, Bates CJ, Holliday RM. Atrophic gastritis and vitamin C status in two towns with different stomach cancer death rates. *Br J Cancer* 56(2) : 163-167, 1987
- 72) Anthony HM, Schorah CJ. Severe hypovitaminosis C in lung cancer patients: the utilization of vitamin C in surgical repair and lymphocyte related hot resistance. *Br J Canc* 46(3) : 354-367, 1982
- 73) Pauling L, Moertel C. A proposition: megadoses of vitamin C are valuable in the treatment of cancer. *Nutr Rev* 44(1) : 28-32, 1986
- 74) Frazier TG, McGinn ME. The influence of magnesium, calcium and vitamin C on tumor growth in mice with breast cancer. *J Surg Res* 27(5): 318-320, 1979
- 75) Bostick RM, Potter JD, Folsom AR. Reduced risk of colon cancer with high intake of vitamin E: the Iowa Women's health study. *Canc Res* 53(18) : 4230-4237, 1993
- 76) Knekt P, Aromaa A, Maatela J. Serum vitamin E, serum selenium and the risk of gastrointestinal cancer. *Int J Canc* 42(6) : 846-850, 1988
- 77) Torun M, Akgul S, Sargin H. Serum vitamin E level in patients with breast cancer. *J Clin Pharm Ther* 20(3) : 173-178, 1995
- 78) Watson RR, Odeleye OE, Eskelson CD, Mufti SI. Effects of supplemental vitamin E on cancer growth and promotion during murine AIDS. *Ann N Y Acad Sci* 669: 387-389, 1992
- 79) Lotzova E. Several aspects of natural killer cell-mediated cytotoxicity in normal individuals and cancer patients. *Cell Mol Biol* 26(4) : 423-431, 1980
- 80) Yoon SJ, Heo DS, Kang SH, Kim NK. Natural killer cell activity depression in peripheral blood and ascites from gastric cancer patients with high TGF-beta 1 expression. *Antic Res* 18(3A) : 1591-1596, 1998
- 81) Jamkar AV, Gore MM, Kedamath N, Banerjea AC, Ghosh SN. Natural killer cell activity in oral cancer patients. Correlation with tumor size and metastasis in regional lymph nodes. *Ind J Canc* 20(1A) : 49-53, 1983
- 82) Bozzetti F, Cozzaglio L, villa ML, Ferrario E, Trabattoni D. Restorative effect of total parenteral nutrition on natural killer cell activity in malnourished cancer patients. *Eur J Canc* 31A(12) : 2023-2027, 1995
- 83) Maiche AG, Jekunen A, Turunen JP. Sudden tumour regression with enhanced natural killer cell accumulation in a patient with stage IV breast cancer. *Eur J Canc* 30A(11) : 1642-1646, 1994
- 84) Watanabe T, Nakauchi H, Takakura K. T-cell subsets in patients with gastric cancer. *Oncol* 42(2) : 89-91, 1985
- 85) Kumano N, Suzuki S, Wakui A. Imbalance of T cell subsets in

- cancer patients and its modification with bestatin, a small molecular immunomodifier. *Toh J Exp Med* 147 (2) : 125-133, 1985
- 86) Schmielau J, Finn OJ. Suppressed T-cell receptor zeta chain expression and cytokine production in pancreatic cancer patients. *Clin Canc Res* 7 (3 Suppl) : 933s-939s, 2001
- 87) Amati L, Jirillo E. Impairment of phagocytic and T-cell-mediated antibacterial activity and plasma endotoxins in patients with untreated gastrointestinal cancer. *Scand J Gastroen* 33 (8) : 847-852, 1998
- 88) Sharma S, Dubinett SM. T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function. *J Immunol* 163 (9) : 5020-5028, 1999
- 89) Liu Y, Hermonat PL. Rapid induction of cytotoxic T-cell response against cervical cancer cells by human papillomavirus type 16 E6 antigen gene delivery into human dendritic cells by an adeno-associated virus vector. *Canc Gene Ther* 8 (12) : 948-957, 2001
- 90) Brattig NW, Berg PA. Immunoenhancing effect of flavonoids compounds on lymphocyte proliferation and immunoglobulin synthesis. *Int J Immunophar* 6 (3) : 205-215, 1984
- 91) Schwartz A, Middleton E. Comparison of the effects of quercetin with those of other flavonoids on the generation and effector function of cytotoxic T lymphocytes. *Immunophar* 7 (2) : 115-126, 1984
- 92) Wiltout RH, Hornung RL. Flavone-8-acetic acid augments systemic natural killer cell activity and synergizes with IL-2 for treatment of murine renal cancer. *J Immunol* 140 (9) : 3261-3265, 1988
- 93) Dawson HD, Li NQ, Decicco KL, Nibert JA, Ross AC. Chronic marginal vitamin A status reduces natural killer cell number and function in aging Lewis rats. *J Nutr* 129 (8) : 10-17, 1999
- 94) Santos MS, Gaziano JM. Natural killer cell activity in elderly men is enhanced by beta-carotene supplementation. *Am J Clin Nutr* 64 (5) : 772-777, 1996
- 95) Carlos TF, Favier A. Beta-carotene enhances natural killer cell activity in athymic mice. *In Vivo* 11 (1) : 87-91, 1997
- 96) Micksche M, Wrba H. Stimulation of immune response in lung cancer patients by vitamin A therapy. *Oncol* 34 (5) : 234-238, 1977
- 97) Malkovsky M, Medawar PB. T cell mediated enhancement of host versus graft reactivity in mice fed a diet enriched in vitamin A acetate. *Nature* 302 (5906) : 338-340, 1983
- 98) Ferrandew DM, Fuente M. Effects *in vitro* of several antioxidants on the natural killer function of aging mice. *Exp Gerontol* 23 (5) : 675-685, 1999
- 99) Kim WK. Effects of vitamin C supplementation on immune status in smoking and nonsmoking male college students. *Kr J of Nutr* 31 (8) : 1244-1253, 1998
- 100) Siegel BV, Morton JL. Vitamin C and immunity: influence of ascorbate on prostaglandin E2 synthesis and implications for natural killer cell activity. *Int J Vitam Nutr Res* 54 (4) : 339-342, 1984
- 101) Serafini M. Dietary vitamin E and T cell mediated function in the elderly: effectiveness and mechanism of action. *Int J Dev Neurosci* 18 (4-5) : 401-410, 2000
- 102) Moriguchi S. The role of vitamin E in T cell differentiation and the decrease of cellular immunity with aging. *Biofac* 7 (1-2) : 77-86, 1998
- 103) Corwin LM, Shloss J. Studies of the mode of action of vitamin E in stimulating T cell mitogenesis. *Scand J Immunol* 14 (5) : 565-571, 1981