

## 헛개나무 잎 추출물의 항돌연변이원성 및 암세포 성장억제효과

박선희<sup>†</sup> · 장은영

영남대학교 식품영양학과

### Antimutagenic and Cytotoxic Effects of *Hovenia dulcis* Thumb Leaves Extracts

Sun-Hee Park<sup>†</sup> and Eun-Young Chang

Dept. of Food and Nutrition, Yeungnam University, Kyoungsan 712-749, Korea

#### Abstract

The effect of *Hovenia dulcis* Thumb leaves on the mutagenicity in *salmonella* assay and inhibitory effects on the growth of cancer cells were studied. On antimutagenicity as evaluated by Ames test, the extract and fractions of *Hovenia dulcis* Thumb leaves had no effect on the mutagenicity by themselves. However, methanol extract and fractions from *Hovenia dulcis* Thumb showed strong inhibitory effect on the mutagenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine (MNNG) and benzo(a)pyrene (B(a)P). Among the solvent fractions of methanol extract, the hexane, chloroform and butanol fraction exhibited stronger inhibitory activity against MNNG and B(a)P induced mutagenesis than water fraction. For anticancer effects, *Hovenia dulcis* Thumb leaves extract and fractions against cancer cell lines including HepG2 and HT29 were investigated. The methanol extract, the hexane fraction and the chloroform fraction of *Hovenia dulcis* Thumb leaves inhibited growth of cancer cells but they had no effect on the cytotoxicity of normal human liver cells under the same conditions.

**Key words:** antimutagenic effect, *Hovenia dulcis* Thumb, cytotoxic effect

#### 서 론

현대사회는 경제발전 에 따른 생활수준의 향상과 외식문화의 급격한 보급으로 인해 식생활이 서구화됨에 따라 질병형태에 있어서 많은 변화를 가져왔으며, 특히 암을 비롯한 만성퇴행성 질환이 증가되고 있다. 이 중 암은 생명과학의 발달에도 불구하고 여전히 치료하기 힘든 병의 하나로 환경요인과 식이에 의해 크게 좌우됨이 여러 연구들을 통해 보고되어 왔다(1-3). 그러나 우리가 일상생활에서 섭취하는 식품에는 역으로 암의 발생을 억제하거나 지연시키는 효과가 있는 성분들이 다수 포함되어 있으며(4,5) 또한 화학약제와는 달리 생체 내에서 큰 부작용을 나타내지 않으리라는 기대로 식품에 존재하는 많은 항암 성분의 확인과 그 작용 기작, 이들 물질들의 분리와 동정에 대한 연구가 많이 진행되고 있다(6-11). 특히 약용식물에 대한 여러 가지 항암 및 생리활성 기능이 밝혀짐에 따라 이미 국내에서도 수종의 생약재 및 마늘, 인삼, 단삼, 석류, 솔잎, 도라지 등에서 항암효과가 있는 것으로 보고되었다(12,13). 이 중 헛개나무(*Hovenia dulcis* Thumb)는 갈매나무과의 교목으로 지구자 나무라고도 한다. 높이는 10~17 m이고 수피는 흑회색이며 열매는

갈색이 돌고 지름 8 mm정도이며 닭의 발톱모양이다. 열매와 줄기는 단맛과 향을 내어 식용, 과주 및 약용으로 주독을 제거하는데 사용되어 왔다. 또한 헛개나무는 민간요법으로 잎, 줄기 및 열매로 만든 차가 주독제거와 과음 시 부작용으로 나타나는 황달, 지방간, 간경화증, 위장병 및 대장염 등의 간 기능 보호에 효능이 뛰어난 것으로 전해지는데 이는 헛개나무 열매의 알코올 분해능과 간 해독작용에 대한 연구가 그 효능을 뒷받침하고 있다. 최근에는 헛개나무의 열매에서 분리한 (+)-dihydromyricetin이 알코올 분해 및 간 기능 회복에 효과가 있다는 보고가 있다. 또한 헛개나무 열수 추출물에서 분리한 3-methyl-4-hydroxybenzoic acid와 3-methyl-4-hydroxycinnamic acid는 항산화 및 항균작용을 나타낸다고 보고되고 있으며 헛개나무 열매 추출물에서 분리한 hovenodulinol은 쥐의 알코올 분해에 효과가 있음을 보고하였다(14,15). 이와 같이 헛개나무의 근피, 수피, 열매에 대해서는 생리활성물질의 분리가 이루어지며 그 효능에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으나 잎에 대한 생리활성 효과는 거의 없는 상태이다. 이에 본 연구에서는 헛개나무 잎 추출물의 항돌연변이원성 및 항암효과를 검토하기 위하여, 헛개나무 잎으로부터 메탄올 추출물과 그 분획물을 조제

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: schizandra@hanmail.net  
Phone: 82-53-810-2870, Fax: 82-53-810-4768

하여 Ames test로서 항돌연변이원성을 확인한 후 사람의 암세포에 대한 성장 저해 효과를 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용한 헛개나무 잎은 경북 의성군 봉양면 백석농업협명 회사에서 건조된 것을 구입하여 이물질을 제거한 후 사용하였고, *Salmonella* Typhimurium TA98과 TA100은 미국 캘리포니아 대학의 B. N. Ames 교수로부터 제공받아 사용하였다. 돌연변이 유발원인 N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine(MNNG), benzo(a)pyrene(B(a)P)은 Sigma(St. Louis, USA)사로부터 구입하였으며, 기타시약들은 특급 또는 일급을 사용하였다.

### 시료의 추출 및 분획

건조된 헛개나무 잎은 분쇄기로 분말화한 다음, 분말시료(750 g)에 10배의 80% 메탄올을 첨가한 후 10시간씩 3회 교반 추출하고 회전식 진공 농축기로 농축 건조시켜 메탄올 추출물(48 g)로 사용하였다. 이 추출물(30 g)을 다시 헥산과 증류수를 동량 혼합한 용액을 첨가하여 분획여두에서 분획하는 과정을 3번 반복한 후 감압 농축한 것을 헥산 분획물(9.5 g)로 얻었다. 그 잔여물을 분획여두에서 다시 클로로포름, 부탄올로 각각 3번씩 추출하여 클로로포름(6.0 g), 부탄올 분획물(5.5 g)로 하고 남은 잔여물은 물 분획물(5.2 g)로 하였으며 모든 추출물은 농축한 후 동결 건조하여  $-30^{\circ}\text{C}$ 에 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 항변이원성 검사

Maron과 Ames(16)의 방법에 의해 실험하였다. 즉, 미리 멸균시킨 capped tube에 시료 50  $\mu\text{L}$ , 돌연변이원 50  $\mu\text{L}$ , S9 mix 500  $\mu\text{L}$ (직접변이원의 경우, 0.2 M phosphate buffer), 균주 100  $\mu\text{L}$ 를 넣고  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 20분동안 preincubation시켰다. 이것을 top agar 2 mL와 혼합한 후 최소평판배지(minimal glucose agar plates)에 골고루 도말하였다.  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 48시간 배양한 후 배지 위의 복귀변이주(revertant)의 콜로니 수를 계수하였다. 체내 대사 활성 체계인 microsomal fraction 즉 S9 mixture 제조는 Maron과 Ames(16)의 방법으로 제조하였다. 한 시료에 대하여 3개의 최소평판배지를 사용하였으며, 변이원에 대한 억제효과는 변이원 물질의 활성에 대한 시료의 억제율(inhibition %)로 나타내었다. 한편 시료와 변이원 물질의 농도는 예비 실험을 통하여 결정하였다.

### 암세포 성장 저해 효과

**세포주 및 세포배양:** 본 실험에 사용한 세포주는 암세포로 사람의 간암세포 HepG2(hepatoma cell, human)와 결장암세포 HT29(colon carcinoma cell, human) cell을 사용하였다. 그리고 사람의 정상 간세포인 Chang cell을 사용하였다. 세포 배양시에는 HT29와 Chang 세포는 RPMI-1640 배지

에 10% FBS(10%-heat-inactivated fetal bovine serum)와 1% antibiotics(penicillin G/streptomycin)을 가하여 배양하였으며 HepG2 세포는 DMEM 배지에 10% FBS, 1% antibiotics를 첨가하여 배양하였다. 이들 세포주는  $37^{\circ}\text{C}$ 의 5%  $\text{CO}_2$ 에 적응시켜 배양하였으며 2~3일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

**Cytotoxicity 측정:** 동물세포에 대한 시료의 cytotoxicity를 측정하기 위하여 Green 등(17)의 방법에 따라 MTT assay를 실시하였다. 먼저 배양된 세포에서 배지를 제거한 다음 PBS를 첨가하여 가볍게 섞은 후 PBS를 다시 제거하고 0.25% trypsin-EDTA를 첨가하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 배양하여 세포가 culture dish의 바닥으로부터 완전히 분리되었는지 현미경으로 관찰한 후, culture 배지를 첨가하여 잘 혼합한 다음 세포수를  $1 \times 10^6$  cells/mL로 조정하여 실험에 사용하였다. 한편 헛개나무 잎의 메탄올 추출물과 분획물들은 각각 적당한 농도로 DMSO에 용해시킨 후 membrane filter로 여과한 후 사용하였다. 96-well microtiter plate에 준비된 세포를 198  $\mu\text{L}$ 씩 분주한 후 24시간 배양하였다. 배양한 후 각 농도의 시료를 2  $\mu\text{L}$ 씩 well에 첨가한 후  $37^{\circ}\text{C}$ 의 5%  $\text{CO}_2$  하에서 48시간 배양하였다. 배양 후 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(0.5 mg/mL)] 용액을 각 well에 가해주고 다시 4시간 더 배양하였다. 배양 종료 시 1,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 제거하고 DMSO 200  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 microplate reader(Bio-Rad Co.)로 540 nm에서 흡광도를 측정한 후 다음과 같이 cytotoxicity를 구하여 세포 성장 억제효과의 지표로 하였다.

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료처리군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

### 통계분석

대조군과 각 시료에 대한 실험 결과는 SAS program을 이용하여 Duncan's multiple range test로 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 헛개나무 잎의 항돌연변이원성 효과

헛개나무 잎 추출물과 그 분획물 자체가 돌연변이원 유발성을 나타내는지 또는 균주들에 대해 독성을 나타내는지 확인하기 위하여 Ames test로 검토해 본 결과 자료로는 나타내지 않았지만, 시료농도의 증가에 따른 his<sup>+</sup> revertant colony 수의 증감이 없는 것으로 보아 본 실험에 사용한 추출물의 농도에서 시료 자체에 의한 돌연변이원성은 없는 것으로 나타났다. 따라서 헛개나무 잎 추출물의 돌연변이 억제작용을 검토하기 위하여 직·간접 발암물질을 첨가하여 이들 발암물질에 대한 억제효과를 살펴보았다.

MNNG는 직접 돌연변이원으로 세포 내에서 alkyl diazo-

**Table 1. Antimutagenic effects of methanol extracts from *Hovenia dulcis* Thumb leaves on the mutagenicity of N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine (0.2 µg/plate) in *S. Typhimurium* TA100**

Treatment	Revertants/plate	Inhibition rate (%)
Spontaneous	127±3.53 <sup>1)</sup>	
MNNG	820±14.14 <sup>a2)</sup>	
MNNG+Methanol ext.		
10%	244±4.95 <sup>c</sup>	83
5%	252±8.48 <sup>c</sup>	82
2.5%	300±9.48 <sup>b</sup>	75

<sup>1)</sup>The values are mean±SD of 3 replications.

<sup>2)</sup>Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

hydroxide의 활성 높은 친전자성 물질로 분해된 후 alkyl ion을 형성하여 DNA 염기의 nucleophilic site를 알킬화하고 DNA 절단, 염색체 이상의 변이를 일으키는 것으로 알려져 있다(18). 헛개나무 잎을 먼저 메탄올로 추출하여 *S. Typhimurium* TA100 균주에서 MNNG에 대한 항돌연변이 효과를 검토하였다. 그 결과, Table 1에서와 같이 메탄올 추출물 2.5%, 5% 및 10%의 시료 농도에서 각각 75%, 82% 및 83%의 높은 저해효과를 나타내었으며 농도를 증가시켜도 농도 의존적인 항돌연변이원성은 크게 나타나지 않았다. 이러한 결과는 참취 뿌리 에탄올 추출물이 MNNG에 대해 시료농도 증가에 따른 변화가 거의 없다는 보고와 유사한 경향을 나타내었다(19).

한편 B(a)P은 S9 mixture에 의해서 DNA와 반응성이 강한 물질로 변화해서 돌연변이 활성을 나타내는 간접 변이원으로 최종 대사산물인 dihydrodiol epoxide가 DNA와 반응하여 DNA 변성 및 염기쌍 분열을 초래하여 미생물을 포함한 포유동물 세포에 강한 돌연변이원성을 나타낸다고 알려져 있다(20). 따라서 헛개나무 잎의 B(a)P에 대한 항돌연변이원성을 *S. Typhimurium* TA98과 TA100에 대하여 검토한 결과, 두 균주 모두에서 비슷한 억제활성을 나타내었으며 특히, 10%의 시료 농도에서 TA98의 경우는 92%, TA100의 경우는 90%의 높은 저해효과를 나타내었다(Table 2). 이와 같이 헛개나무 잎 메탄올 추출물은 직접 및 간접 변이원에 대해 높은 항돌연변이 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

**메탄올 추출물에서 분획한 분획물들의 효과**

돌연변이 유발 억제효과를 나타내는 헛개나무 잎 추출물들의 특성을 자세히 조사하고자 용매의 극성을 이용한 용매 분획을 실시하여 헥산, 클로르포름, 부탄올, 물 분획물로 세 분획하여 항돌연변이 효과를 관찰하였다. 그 결과 이들 분획물들은 MNNG의 돌연변이를 억제시켰으며 특히, 시료농도 10% 첨가 시 헥산, 클로르포름, 부탄올 분획물은 각각 77%, 81%, 71%의 높은 돌연변이 억제효과를 나타내었으나 물 분획물은 29%의 낮은 저해효과를 나타내었다(Table 3). 또한 B(a)P에 대해서는 TA98과 TA100 균주 모두에서 비슷한

**Table 2. Antimutagenic effects of methanol extracts of *Hovenia dulcis* Thumb leaves on the mutagenicity of benzo(a)pyrene (10 µg/plate) in *S. Typhimurium* TA 98 and TA 100 with S9 mixture**

Treatment	Revertants / plate			
	TA98	Inhibition rate (%)	TA100	Inhibition rate (%)
Spontaneous	63±4.24 <sup>1)</sup>		117±6	
B(a)P	711±7.07 <sup>a2)</sup>		750±11.13 <sup>a</sup>	
B(a)P+Methanol ext.				
10%	114±5.65 <sup>b</sup>	92	125±6.57 <sup>c</sup>	90
5%	129±2.82 <sup>b</sup>	90	138±8.91 <sup>c</sup>	88
2.5%	151±9.89 <sup>b</sup>	86	171±5.11 <sup>b</sup>	83

<sup>1)</sup>The values are mean±SD of 3 replications.

<sup>2)</sup>Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

**Table 3. Antimutagenic effects of solvent fractions from methanol extracts of *Hovenia dulcis* Thumb leaves on the mutagenicity of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (0.2 µg/plate) in *S. Typhimurium* TA100**

Treatment	Revertants/plate	Inhibition rate (%)
Spontaneous	127±3.53 <sup>1)</sup>	
MNNG	820±14.14 <sup>a2)</sup>	
MNNG+Hexane fr.		
10%	283±8.38 <sup>d</sup>	77
5%	348±7.43 <sup>c</sup>	68
2.5%	369±9.19 <sup>d</sup>	65
MNNG+Chloroform fr.		
10%	258±3.53 <sup>d</sup>	81
5%	335±12.72 <sup>c</sup>	70
2.5%	438±7.67 <sup>c</sup>	55
MNNG+Butanol fr.		
10%	335±4.04 <sup>c</sup>	71
5%	369±5.18 <sup>c</sup>	66
2.5%	452±6.36 <sup>c</sup>	53
MNNG+Water fr.		
10%	618±3.53 <sup>b</sup>	29
5%	639±7.55 <sup>b</sup>	26
2.5%	695±4.24 <sup>b</sup>	18

<sup>1)</sup>The values are mean±SD of 3 replications.

<sup>2)</sup>Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

억제활성을 나타내었으며 분획물의 첨가농도가 증가할수록 억제효과도 증가하였다. TA98 균주에서는 헥산, 클로르포름, 부탄올 분획물을 10% 농도로 첨가 시 각각 90%, 96%, 76%의 강한 저해효과를 나타내었으며 TA100 균주에서도 각각 79%, 87%, 71%의 강한 억제효과를 나타내었다. 그리고 물 분획물은 TA98과 TA100에서 시료를 10% 농도로 첨가 시 각각 46%, 34%의 보다 낮은 저해효과를 나타내어 MNNG에서와 마찬가지로 B(a)P을 돌연변이 유발물질로 사용하였을 경우에도 비슷한 경향을 나타내었다(Table 4). 이러한 결과는 상황버섯 분획물들의 항돌연변이 효과가 물분획을 제외한 분획물에서 높은 돌연변이 억제효과를 나타내었다는 보고와 유사한 경향을 나타내었다(21). 이상에서 알 수 있듯이 헛개나무 잎 메탄올 추출물 및 분획물들은 직·

**Table 4. Antimutagenic effects of solvent fractions from methanol extracts of *Hovenia dulcis* Thumb leaves on the mutagenicity of benzo(a)pyrene (10 µg/plate) in *S. Typhimurium* TA98 and TA100 with S9 mixture**

Treatment	Revertants / plate			
	TA 98	Inhibition rate (%)	TA 100	Inhibition rate (%)
Spontaneous	63 ± 4.24 <sup>1)</sup>		117 ± 6	
B(a)P	711 ± 7.07 <sup>a2)</sup>		750 ± 11.13 <sup>a</sup>	
B(a)P+Hexane fr.				
10%	129 ± 9.72 <sup>d</sup>	90	267 ± 5 <sup>c</sup>	79
5%	136 ± 5.65 <sup>d</sup>	89	388 ± 11 <sup>d</sup>	60
2.5%	190 ± 2.82 <sup>d</sup>	80	467 ± 5 <sup>d</sup>	48
B(a)P+Chloroform fr.				
10%	86 ± 11.31 <sup>d</sup>	96	211 ± 8 <sup>d</sup>	87
5%	99 ± 9.89 <sup>d</sup>	94	342 ± 14 <sup>d</sup>	67
2.5%	144 ± 5.65 <sup>e</sup>	88	393 ± 3 <sup>e</sup>	59
B(a)P+Butanol fr.				
10%	217 ± 3.09 <sup>c</sup>	76	301 ± 7 <sup>c</sup>	71
5%	313 ± 5.65 <sup>c</sup>	61	477 ± 4 <sup>c</sup>	43
2.5%	414 ± 12.72 <sup>c</sup>	46	578 ± 5 <sup>c</sup>	31
B(a)P+Water fr.				
10%	416 ± 5.65 <sup>b</sup>	46	557 ± 10 <sup>b</sup>	34
5%	474 ± 2.82 <sup>b</sup>	37	593 ± 7 <sup>b</sup>	29
2.5%	564 ± 8.48 <sup>b</sup>	23	649 ± 4 <sup>b</sup>	20

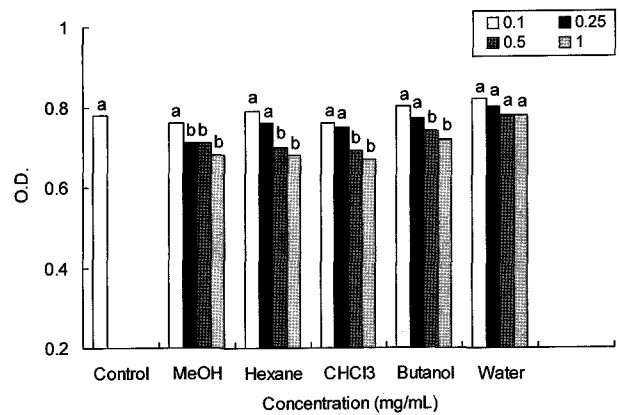
<sup>1)</sup>The values are mean ± SD of 3 replications.  
<sup>2)</sup>Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

간접 변이원에 대하여 비슷한 억제효과를 나타내었으며 그 중에서도 메탄올 추출물로부터 분획한 핵산, 클로르포름, 부탄올이 높은 억제 활성을 보였으나 물 분획물에서도 효과가 나타났으므로 헛개나무 잎의 활성물질은 한 성분이 아니라 여러 활성 물질이 존재하여 작용한 것으로 사료된다. 이러한 결과는 이들 추출물에 함유된 성분들이 세포 내에서 변이원에 의한 DNA의 손상을 억제함으로써 생체 암 발생과정 중 발암 초기단계의 억제 인자로 작용할 가능성을 나타내주고 있다.

**헛개나무 잎 추출물의 암세포 성장 저해 효과**

암 유발 초기단계에서 돌연변이가 매우 중요한 작용을 하고 대부분의 발암물질이 돌연변이원이라는 공통점은 항돌연변이원성을 나타내는 물질이 항암 활성을 가질 수 있다는 것을 의미한다. 특히 헛개나무 잎 추출물 및 분획물들이 직·간접 발암물질에 대하여 암의 개시단계에서 일어날 수 있는 돌연변이 유발 억제 효과를 가졌으므로, 암 연구 검색방법으로 이용되고 있는 MTT 정량분석법을 이용하여 암세포에 대한 이들의 직접적인 효과를 살펴보았다.

먼저 헛개나무 잎 메탄올 추출물 및 분획물들의 항암 효과가 암세포에 대해 선택적으로 작용해 나타낸 효과인지 혹은 모든 세포를 죽여 항암 효과를 나타낸 효과인지를 확인하기 위하여, 정상 간세포인 Chang cell에 대하여 농도별 세포독성을 살펴보았다. 그 결과 Fig. 1에서의 같이 시료와 농도에 관계없이 14% 이하의 낮은 세포독성을 나타냈으며 특히, 시료농도 100 µg/mL 첨가 시 Chang 세포에 대해서는 헛개



**Fig. 1. Inhibitory effects of methanol extract and its fractions of *Hovenia dulcis* Thumb leaves on the growth of Chang cells.** Bars within different letters are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

**Table 5. Inhibitory effects of methanol extract of *Hovenia dulcis* Thumb leaves on the growth of HepG2 and HT29 cells**

Treatment	HepG2		HT29	
	Cell growth (O.D.)	Inhibition rate (%)	Cell growth (O.D.)	Inhibition rate (%)
Control	0.850 ± 0.022 <sup>1)a2)</sup>		0.900 ± 0.017 <sup>a</sup>	
Methanol ext. (µg/mL)				
100	0.207 ± 0.009 <sup>d</sup>	76	0.184 ± 0.011 <sup>e</sup>	80
50	0.335 ± 0.012 <sup>c</sup>	61	0.301 ± 0.008 <sup>d</sup>	67
10	0.363 ± 0.017 <sup>c</sup>	57	0.396 ± 0.042 <sup>c</sup>	55
1	0.533 ± 0.044 <sup>b</sup>	37	0.565 ± 0.015 <sup>b</sup>	37

<sup>1)</sup>The values are mean ± SD (n=5).  
<sup>2)</sup>Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

나무 잎 추출물 및 분획물의 처리에 따른 세포 증식 저해 효과가 나타나지 않았다. 따라서 헛개나무 잎 메탄올 추출물 및 분획물들이 사람의 간암세포 HepG2와 결장암 세포 HT29 성장에 미치는 영향을 검토하였다. 그 결과 Table 5에서와 같이 헛개나무 잎의 메탄올 추출물은 두 암세포에 대한 저해효과가 높았으며 이 같은 효과는 첨가되는 추출물의 농도에 비례하면서 증가하였다. 간암세포 HepG2의 경우 시료 농도 1 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL 및 100 µg/mL 농도에 대해 각각 37%, 57%, 61% 및 76%의 성장 저해효과를 나타내었으며 또한 결장암 세포 HT29에 대해서도 시료농도 1 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL 및 100 µg/mL 농도에 대해 각각 37%, 56%, 67% 및 80%의 저해 효과를 나타내었다. 또한 헛개나무 잎 분획물들의 암세포 성장 억제효과를 실험한 결과, 핵산, 클로르포름 분획물은 높은 암세포 성장 저해 효과를 나타내었으며 시료농도에 비례하여 저해율이 증가하였다. HepG2에 대해 시료 농도 100 µg/mL 첨가 시 74%, 84%의 각각 높은 저해 효과를 보였으며 또한 HT29에 대해서도 78%, 91%의 높은 저해 효과를 나타내었다(Table 6, 7). 그러나 부탄올과 물 분획물은 HepG2와 HT29에 대해

**Table 6. Inhibitory effects of solvent fractions from methanol extract of *Hovenia dulcis* Thumb leaves on the growth of HepG2 cells**

Treatment	Cell growth (O.D.)	Inhibition rate (%)
Control	0.850 ± 0.022 <sup>1)a2)</sup>	
Hexane fr. (µg/mL)		
100	0.221 ± 0.018 <sup>b</sup>	74
50	0.344 ± 0.035 <sup>b</sup>	60
10	0.556 ± 0.010 <sup>b</sup>	35
5	0.733 ± 0.007 <sup>b</sup>	14
Chloroform fr.		
100	0.136 ± 0.024 <sup>c</sup>	84
50	0.272 ± 0.007 <sup>c</sup>	68
10	0.539 ± 0.013 <sup>b</sup>	37
5	0.731 ± 0.016 <sup>b</sup>	14
Butanol fr.		
100	0.810 ± 0.008 <sup>a</sup>	5
50	0.859 ± 0.015 <sup>a</sup>	-
10	0.868 ± 0.016 <sup>a</sup>	-
5	0.871 ± 0.015 <sup>a</sup>	-
Water fr.		
100	0.820 ± 0.003 <sup>a</sup>	4
50	0.833 ± 0.004 <sup>a</sup>	-
10	0.857 ± 0.009 <sup>a</sup>	-
5	0.861 ± 0.006 <sup>a</sup>	-

<sup>1)</sup>The values are mean ± SD (n=5).

<sup>2)</sup>Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

**Table 7. Inhibitory effects of solvent fractions from methanol extract of *Hovenia dulcis* Thumb on the growth of HT29 cells**

Treatment	Cell growth (O.D.)	Inhibition rate (%)
Control	0.900 ± 0.017 <sup>1)a2)</sup>	
Hexane fr. (µg/mL)		
100	0.198 ± 0.013 <sup>c</sup>	78
50	0.360 ± 0.010 <sup>c</sup>	60
10	0.639 ± 0.007 <sup>b</sup>	29
5	0.675 ± 0.010 <sup>b</sup>	25
Chloroform fr.		
100	0.081 ± 0.015 <sup>d</sup>	91
50	0.216 ± 0.011 <sup>d</sup>	76
10	0.513 ± 0.009 <sup>c</sup>	43
5	0.649 ± 0.004 <sup>b</sup>	28
Butanol fr.		
100	0.810 ± 0.007 <sup>b</sup>	10
50	0.813 ± 0.011 <sup>b</sup>	10
10	0.856 ± 0.014 <sup>a</sup>	5
5	0.884 ± 0.008 <sup>a</sup>	2
Water fr.		
100	0.819 ± 0.012 <sup>b</sup>	9
50	0.831 ± 0.005 <sup>a</sup>	-
10	0.875 ± 0.009 <sup>a</sup>	-
5	0.857 ± 0.017 <sup>a</sup>	-

<sup>1)</sup>The values are mean ± SD (n=5).

<sup>2)</sup>Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

암세포 증식 억제 효과가 관찰되지 않았다. 그러므로 헛개나무 잎의 항암 효과는 이들 용매에 잘 용해되는 지용성 성분들의 작용이 클 것으로 사료된다. 이는 감잎의 암세포 증식

억제효과가 헥산, 클로르포름 및 에틸아세테이트에 잘 용해되는 지용성 성분들에 의한 작용이라는 보고(22)도 있으며 또한 마늘의 항돌연변이 및 항암 연구에서 지용성 획분들이 효과를 나타내며 methyl linoleate를 그 주요 성분으로 보고한 바 있다(23). 이상의 결과에서 헛개나무 잎의 메탄올 추출물 및 헥산, 클로르포름 분획물은 사람의 암세포주인 HepG2와 HT29세포의 증식을 억제하거나 세포 독성효과를 나타내어 세포수가 감소된 것으로 사료되며 또한 헛개나무 잎의 항암 활성 성분은 주로 지용성이라고 생각되며 추후 이들 획분에서 활성물질의 분리 및 동정 등 지속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

### 요 약

예로부터 약용으로 이용되어온 헛개나무 잎을 이용하여 항돌연변이원성 및 암세포 성장 저해효과를 조사하였다. 헛개나무 잎의 돌연변이 억제 효과를 Ames test로 검색한 결과, 헛개나무 잎의 메탄올 추출물과 분획물 그 자체의 돌연변이원성은 없었으며, 헛개나무 잎의 메탄올 추출물은 직접 변이원인 N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine(MNNG)와 간접변이원인 benzo(a)pyrene(B(a)P)의 돌연변이 유발성을 크게 저해하였다. 또한 메탄올 추출물에서 분리한 분획물들도 유의성 있는 돌연변이 억제효과를 나타내었으며 특히 헥산, 클로르포름, 부탄올 분획물의 경우는 물 분획물보다 MNNG와 B(a)P에 대해서 더 큰 항돌연변이 효과를 나타내었다. 그리고 헛개나무 잎의 메탄올 추출물과 그 분획물들의 사람의 암세포주인 HT29와 HepG2에 대한 성장 저해 효과를 MTT assay로 검토한 결과 헛개나무 잎의 메탄올 추출물과 헥산, 클로르포름 분획물들이 높은 암세포 성장 저해효과를 나타내었으며 농도 의존적인 경향을 보였다. 그러나 사람의 정상 간세포인 Chang cell에서는 세포독성이 나타나지 않았다. 이상의 실험 결과로 헛개나무 잎은 발암물질로부터 생체를 보호하는 물질을 함유하고 있을 것으로 사료된다.

### 문 헌

1. American Cancer Society. 1997. Cancer facts and figures.
2. Singleton P, Sainsbury D. 1987. *Dictionary of molecular biology and microbiology*. 2nd ed. John Wiley & Sons, New York.
3. Doll R, Pert R. 1997. The cause of cancer. *J Natl Cancer Inst* 66: 1191-1195.
4. Kada T, Inoue T, Morita K, Namiki M. 1986. Dietary desmutagens. In *Genetic toxicology of the diet*. Knudsen I, ed. Alan R. Liss Inc., New York. p 245.
5. Micozzi MS, Tangrea JA. 1989. General introduction: relation for the nutritional prevention of cancer. In *Nutrition and cancer prevention*. Moon TE, Micozzi MS, eds. Marcel Dekker, Inc., New York. p 3.
6. Ong TM, Whong WZ, Stewart S, Brockman HE. 1986. Chlorophyllin; a potent antimutagen against environmental

- and dietary complex mixture. *Mutat Res* 173: 111-115.
7. Murakami A, Jiwajinda S, Ohigashi H. 1992. Screening for *in vitro* antitumor promoting activities of edible plants from Thailand. *Cancer Letters* 95: 139-146.
  8. Zhang Y, Talalay P, Cho CG, Posner GH. 1992. An anticarcinogenic protective enzyme from broccoli. *Pro Natl Acad Sci USA* 89: 2399-2403.
  9. Yang CS, Brady JF, Hong JY. 1992. Dietary effects on cytochrome p450: xenobiotic metabolism and toxicity. *FASEB J* 6: 737-744.
  10. John TP, Sharad SS, Mohammad SS, Robert TT, Yogesh C. 1998. Mechanisms of anticarcinogenic properties on curcumin: the effect of curcumin on glutathione linked detoxification enzymes in rat liver. *Int J Biochem Cell Biol* 30: 445-456.
  11. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275: 218-220.
  12. Goodman GE, Yen YP, Cox TC, Crowley J. 1987. Effect of verapamil on *in vitro* cytotoxin and vinblastine in human tumor cell. *Cancer Res* 47: 2295-2304.
  13. Kim HJ, Lee IS, Lee KR. 1999. Antimutagenic & anticancer effects of *Ramaria botrytis* rick extracts. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 28: 1321-1325.
  14. An SW, Kim YG, Kim MG, Lee BI, Lee SH, Kwon HI, Hwang B, Lee HY. 1999. Comparison of hepatic detoxification activity and reducing serum alcohol concentration of *Hovenia dulcis* Thumb and *Alnus japonica* Steud. *K J Medical Corp Sci* 7: 263-268.
  15. Kim MG, Chung YT, Lee JH, Park YS, Shin MK, Kim DH, Lee HY. 2000. Hepatic detoxification activity and reduction of serum alcohol concentration of *Hovenia dulcis* Thumb from Korea and China. *K J Medical Corp Sci* 8: 225-233.
  16. Maron DM, Ames BN. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 113: 173-215.
  17. Green LM, Reade JL, Ware CF. 1984. Rapid colometric assay for cell viability; Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J Immunological Methods* 70: 257-263.
  18. Laemmli UK. 1970. Cleavage of the structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-683.
  19. Hwangbo HJ, Ham SS. 1999. Antimutagenic and cytotoxic effects of *Aster scaber* root ethanol extract. *Kor J Food Sci Technol* 31: 1065-1070.
  20. Gelboin HV. 1980. Benzo(a)pyrene metabolism, activation carcinogenesis; role and regulation of mixed function oxidases and related enzymes. *Physiol Rev* 60: 1107-1166.
  21. Ji JH, Kim MN, Chung CK, Ham SS. 2000. Antimutagenic and cytotoxic effects of *Aster scaber* root ethanol extract. *Kor J Food Sci Technol* 29: 322-328.
  22. Moon SH. 2002. Inhibitory effect of persimmon leaves on the mutagenicity in spore rec assay and on the growth of human cancer cells. *Kor J Food & Nutr* 15: 23-28.
  23. Park KY, Kim SH, Suh MJ, Chung HY. 1991. Effects of garlic on the mutagenicity in *Salmonella* assay system and on the growth of HT-29 human colon carcinoma cells. *Kor J Food Sci Technol* 23: 370-374.

(2007년 8월 17일 접수; 2007년 10월 15일 채택)