

잔대 추출물들의 항돌연변이 및 항종양 효과

함영안¹ · 최현진¹ · 김수현¹ · 정미자² · 함승시^{1*}

¹강원대학교 생명공학부

²강원대학교 BK21 사업단(뉴트라슈티컬 바이오)

Antimutagenic and Antitumor Effects of *Adenophora triphylla* Extracts

Young-An Ham¹, Hyun-Jin Choi¹, Soo-Hyun Kim¹, Mi-Ja Chung², and Seung-Shi Ham^{1*}

¹Dept. of Food Science and Biotechnology, Division of Biotechnology,

School of Bioscience and Biotechnology, and

²The Nutraceutical Bio Brain Korea 21 Project Group,

Kangwon National University, Gangwon 200-701, Korea

Abstract

This study was carried out to investigate the mutagenic, antimutagenic, cytotoxicity and antitumor effects of *Adenophora triphylla* (AT). AT was extracted with 70% ethanol and then further fractionated to hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol and water. Antimutagenic, cytotoxicity and antitumor effects of AT extracts were measured by using Ames test, SRB method, and the tumor growth inhibition test. AT extracts did not show any mutagenicity in the Ames test; however, 70% ethanol extracts and its fractions had strong antimutagenic effects against mutation induced by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) and 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO). The ethyl acetate fraction of AT (200 µg/plate) showed approximately 66.5% inhibitory effect on the mutagenesis induced by 4NQO against TA98 strain, whereas 83.3% and 75.1% inhibitions were observed on the mutagenesis induced by MNNG and 4NQO against TA100 strain. In anticancer effects, the cytotoxicity of AT extract and its fractions against cancer cell lines including human cervical adenocarcinoma (HeLa), human hepatocellular carcinoma (Hep3B), human breast adenocarcinoma (MCF-7), human gastric carcinoma (AGS), human lung carcinoma (A549) and transformed primary human embryo kidney (293) were investigated. The treatment of 1 mg/mL AT ethyl acetate fraction had the highest cytotoxicity of 79.9%, 74.9%, 66.0%, 71.0% and 74.3% against HeLa, Hep3B, MCF-7, AGS and A549 cells, respectively. In contrast, the extract and its fractions showed only 3~36% cytotoxicity for a normal human kidney cell line (293). *In vivo* anti-cancer effect of *Adenophora triphylla* extract was tested using Balb/c mice transplanted sarcoma-180 cells. *Adenophora triphylla* ethyl acetate fraction showed the highest inhibition rate of 37.2% at the 50 mg/kg concentration.

Key words: *Adenophora triphylla*, Ames test, antimutagenicity, antitumor, cytotoxicity

서 론

종양은 생체 자기세포가 계속해서 분화, 증식을 하는 특성을 가지는 이상세포 집단으로, 특히 다른 정상조직에 영향을 미치고 혈관과 림프계를 통하여 전이되는 악성종양이 문제가 되고 있다(1). 현대의학에서는 종양을 치료하기 위하여 다양한 종양치료제를 개발하고 있으나 이는 생체의 정상세포에서 동시에 독성을 나타내어 적용한계를 보이고 있다. 따라서 최근 자신의 면역세포를 자극시켜 cytokine 생성을 유도함으로써 종양에 대한 생체 방어를 강화시키는 연구가 다양하게 진행되어 면역계 자극을 통한 항암제 개발이 주목받고 있다(2,3).

하지만 이러한 항암제들이 각종 부작용을 나타내고 있기

에 최근 자연식품 중에서 기능성 물질을 섭취하려는 요구의 증가와 함께 노화와 암, 당뇨 등의 성인병에 대처방안으로 질병의 치료 및 예방에 효과가 있는 천연물질들이 주목받고 있다(4). 천연물 중에서도 약초식물들은 vitamins, carotenoids, flavonoids와 같은 페놀성 화합물들이 다량 존재하여 항산화성, 항알러지성, 항암성 등 다양한 생리기능을 갖고 있다(5).

이들 *in vivo*에서 천연 물질들의 항종양 효과가 있는지에 대해 알아보기 위한 동물실험의 전 단계 스크린을 위한 실험으로 Ames test가 많이 이용되고 있는데 이는 돌연변이원성 물질이 포유동물에서의 tumor initiation에 강한 활성을 나타내는 것으로 보고되어 있기 때문이다(6).

잔대의 학명은 *Adenophora triphylla* var. *japonica* Hara

*Corresponding author. E-mail: hamss@kangwon.ac.kr
Phone: 82-33-250-6453, Fax: 82-33-250-6453

이며 사삼(沙蔘)·딱주·제니라고도하며 우리나라에서는 7~9월경 전국 각지의 산과 들에서 자생하는 것으로 알려져 있다(7). 이러한 잔대는 한국·일본·중국·타이완 등지에 널리 분포하며 우리나라에서는 잎이 넓고 털이 많은 것을 털잔대, 꽃의 가지가 적게 갈라지고 꽃이 층층으로 달리는 것을 층층잔대 등 약 13종이 자생하고 있다. 뿌리는 “사삼”이라 하여 인삼과 비슷한 약효가 있다고 알려져 있으며, β -sitosterol, lupenone, daucosterol, triphyllol, adenophoric acid methyl ester 등을 함유하고 있다(8-11). 한방에서 거담, 진해, 건위, 강장제 등의 약제로 이용하며, 민간약으로도 기관지염이나 기침, 대하증, 복통 등에 거담, 건위, 강장약으로 쓰인다(12).

초롱꽃과에 속하는 식물 중에는 도라지 같은 경우는 항산화제인 BHT와 유사한 항산화능력이 있는 것으로 연구결과 밝혀졌으며(13), Lee(14)에 의하면 천연에 존재하는 도라지는 진정, 해열, 진통작용을 가지며 항염증 작용이 있고 위궤양에 대한 방어 및 치유작용을 가지고 있으며 특히 항궤양과 혈압강하의 목적으로 임상 응용의 가능성을 제시한 바 있다. Jang 등(15)은 도라지의 사포닌은 인삼의 사포닌과 같이 가수분해가 어렵고 식물체에 세포액 중에 용해되어 있으나 물리적, 화학적 방법으로 아직 규명되지 않았다고 보고하였다. 이러한 천연 항산화 활성 물질 중에 잔대에 관한 연구는 주로 crude saponin 성분분석(16), 잔대의 성분에 관한 연구(17), isozyme에 관한 연구(18,19), 잔대의 화학적 성분 및 무기물 함량에 관한 연구(20,21) 그리고 사염화탄소를 투여한 흰쥐의 항산화계 효소활성도에 미치는 영향(22) 등이 보고되어 있다. 그러나 잔대추출물의 항돌연변이능과 종양 활성 억제에 미치는 영향 등에 대한 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 잔대에 대한 기능성 검토의 일환으로 *in vitro*에서의 항돌연변이원성 및 항암활성 효과 등을 규명하고, *in vivo*에서 sarcoma-180 cell에 대한 항종양 효과를 검색함으로써 잔대를 가공하여 기능성을 가진 천연 고부가가치 식품으로 활용할 수 있을지에 대한 가능성을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

시료의 추출 및 분획

본 실험에 사용한 잔대 시료는 정선군 농업기술센터로부터 잔대뿌리를 동결 건조하여 분말로 제조된 시료를 구입하여 실험에 이용하였다. 분말상태인 잔대에 시료 중량의 10배인 70% 에탄올을 첨가하고 80°C에서 8시간 동안 3회 추출하였다. 감압여과 장치에서 뜨거운 상태로 여과한 후 감압농축기를 사용하여 추출용매를 제거한 다음 농축물을 얻었다. 70% 에탄올로 추출하여 얻은 농축물을 용매의 극성 차이에 따라 분리를 행하여 hexane, chloroform, ethyl acetate, butane 및 aqueous의 순서로 다섯 가지 분획물을 조제하였다. 분리된 각각의 용매 추출물은 감압 농축하여 용매를 제거한

후 동결하여 생리활성 측정용 시료로 사용하였다.

시약 및 재료

직접 돌연변이원(direct mutagen)으로서 4-introquinoline-1-oxide(4NQO), *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine(MNNG)은 미국 Sigma사에서 구입하여 사용하였고, 이들 변이원 물질은 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 실험에 사용하였다. 세포배양에 필요한 배지로 RPMI 1640과 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM) 및 Heps buffer, fetal bovine serum(FBS), trypsin-EDTA는 Hyclone사(USA)로부터 구입하였다. 그 외 추출 용매인 ethanol, hexane, ethyl acetate 및 butanol 등의 유기 용매는 특급시약을 사용하였다. 실험에 사용한 암세포주인 인간 자궁경부 암세포 HeLa(cervical adenocarcinoma, human), 인간 간암 세포 Hep3B(hepatocellular carcinoma, human), 인간 유방 암세포 MCF-7(breast adenocarcinoma, human), 인간 위암 세포 AGS(stomach adenocarcinoma, human), 인간 폐암 세포 A549(lung carcinoma, human), 인간 신장정상세포인 293(human transformed primary embryonal kidney) 그리고 mouse sarcoma cell line(sarcoma-180)은 Korea Cell Line Bank(KCLB)로부터 구입하여 사용하였다. HeLa, Hep3B, MCF-7 및 293 세포주는 DMEM 배지를 AGS 및 A549 세포주는 RPMI 1640 배지를 이용하여 10% fetal bovine serum, 37°C, 5% CO₂에 적응시켜 각각 배양시켰다.

돌연변이원성 실험

돌연변이원성 실험은 *Salmonella* Typhimurium의 변이주인 TA98과 TA100을 이용하여 Ames test를 개량한 pre-incubation(23)법으로 실시하였다. 추출물을 미리 건열 멸균시킨 glass cap tube에 각각 50 μ L씩 가하고 여기에 전배양시킨 균액 100 μ L를 가한 다음 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 전체량이 700 μ L가 되도록 하였다. 이것을 37°C에서 30분간 preincubation한 다음 histidine/biotin이 첨가된 top를 2 mL씩 가하여 잘 혼합한 후에 미리 조제해 놓은 minimal glucose agar plate상에 도말하고 평판 고화시켜 37°C에서 48시간 배양하여 생긴 복귀돌연변이(His⁺ revertant colony)수를 측정하여 돌연변이원성의 유무를 판정하였다.

항돌연변이원성 실험

건열멸균시킨 glass cap tube에 추출물들을 각각의 농도별로 50 μ L씩 첨가하고 변이원 물질을 각각 50 μ L씩 첨가하였다. 여기에 전배양시킨 *S. Typhimurium* 균액을 100 μ L씩 주입한 후에 0.2 M sodium phosphate buffer를 가하여 최종 부피가 700 μ L가 되도록 하였다. 이것을 37°C에서 20분간 진탕 배양한 다음 상기의 돌연변이원성 실험과 같은 방법으로 실험하여 생성된 복귀돌연변이 colony수를 측정하여 항돌연변이원성 유무를 판정하였다. 잔대 추출물과 변이원물

질의 농도는 예비실험을 통하여 결정하였으며 항돌연변이 활성은 변이원물질의 활성에 대한 시료의 억제율(inhibition, %)로 나타내었다.

암세포 성장 억제효과

세포 단백질 염색을 이용하여 세포 증식이나 독성을 측정하는 SRB(sulforhodamine B) assay(24)를 이용하여 항암 활성을 알아보았다. 10% fetal bovine serum 및 각각의 암세포들인 인간 자궁경부암세포(HeLa), 인간 간암세포(Hep3B), 인간 유방암세포(MCF-7), 인간 위암세포(AGS), 인간 폐암세포(A549)와 인간 신장정상세포(293)를 함유하는 RPMI 1640 및 DMEM 배지를 5×10^4 cells/mL 농도로 100 μ L씩 각 well에 첨가하여 24시간 동안 배양(37°C, 5% CO₂ incubator)시킨 후 0.2 M 이하의 DMSO로 녹인 시료를 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 mg/mL 농도로 100 μ L씩 첨가하여 48시간 동안 다시 배양하였다. 그 후 상등액을 aspirator로 조심스럽게 제거하고 냉장 보관한 10%(w/v) TCA를 100 μ L씩 첨가한 후 1시간 동안 4°C에서 방치한 뒤 증류수로 다섯 번 행구었다. 저온건조기를 이용해 건조시킨 후 1%(v/v) acetic acid에 녹인 0.4%(w/v) SRB용액 100 μ L를 첨가해 30분 동안 염색시켰다. 결합되지 않은 SRB 염색액은 1%(v/v) acetic acid 용액으로 네 번 정도 행구어, 다시 건조시킨 후 10 mM tris buffer 100 μ L로 염색제를 충분히 녹인 후 540 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였으며, 실험은 3회 반복하여 평균값을 결과에 이용하였다.

실험동물

실험에 사용된 동물은 웅성 Balb/c mice로 5주령의 체중 22~22 g인 개체를 선택코(주) 구입하여 환경이 조절된 사육장(온도 23±2°C, 습도 50±5%, lighting cycle은 12시간 주기)에서 표준 사료를 주어 일주일 동안 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

고형암 성장 저지실험

실험에 이용한 sarcoma-180 종양세포는 Balb/c mouse의 복강 내에 7~10일 간격으로 계대배양 하여 보존하면서 사용하였다. 즉 실험동물의 복강 내에서 7~10일간 배양된 sarcoma-180 세포를 복수와 함께 취하고 phosphate buffered saline(PBS)와 함께 원심분리(1,200 rpm, 10 min)하여 종양세포를 분리하였다. 분리된 세포를 다시 PBS에 부유시켜 재차 원심분리하여 상등액을 제거한 후 1.0×10^6 cell/mL 가 되도록 종양세포 부유액을 만들어 1 mL씩을 복강 주사하여 이식 보존하면서 실험에 사용하였다. 고형암 성장저지 실험은 각 군당 6마리 마우스의 왼쪽 서혜부(left groin)에 sarcoma-180 종양세포 부유액 0.2 mL(6×10^6 cell/mouse) 씩을 피하 이식하고, 24시간 후부터 20일간 매일 1회씩 시료 용액 200 μ L를 복강으로 투여하였다. 종양세포 이식 26~30 일째 되는 날 치사시켜 생성된 고형암을 적출하고 그 무게를

측정한 후 다음 식에 따라 종양성장 저지 백분율(tumor growth inhibition ratio, I.R: %)을 계산하였다.

$$I.R. (\%) = Cw - Tw / Cw \times 100$$

Cw: 대조군의 평균 종양무게, Tw: 처리군의 평균 종양무게

통계처리

실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 SPSS(Statistical Package for the Social Sciences) program을 이용하여 실험군당 평균±표준편차로 표시하였고, 각 농도의 평균치의 통계적 유의성을 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 검정하였다.

결과 및 고찰

돌연변이원성 실험

S. Typhimurium TA98과 TA100을 이용한 Ames test를 행한 결과, Table 1에 나타난 바와 같이 음성대조군의 복귀 돌연변이 집락수는 TA98이 34±4, TA100은 144±4이었다. 에탄올 추출물을 50, 100, 150 그리고 200 μ g/plate의 여러 농도를 첨가하여 시험한 결과 음성대조군에 비하여 농도 변화에 따른 집락수가 유의적 변화를 나타내지 않으므로 잔대의 에탄올 추출물은 돌연변이원성을 나타내지 않은 것으로 확인되었다.

항돌연변이원성 실험

항돌연변이원성을 검토하기 위하여 Ames test에서 양성 반응을 나타내며, 직접변이원물질로 알려진 MNNG와 4NQO를 사용하여 각각의 농도에 따른 항돌연변이원성을 검토하였다. MNNG는 직접 돌연변이원으로 체내에서 alkyl diazo hydroxide와 같은 높은 reactive electrophiles로 분해된 후 alkylation을 생성하여 DNA 염기의 nucleophilic site를 공격하여 alkylation을 일으킨다. 이러한 alkylation 결과 DNA breaking, chromosomal abnormality, mutation 등을 야기하는 것으로 알려져 있다(25).

잔대 에탄올 추출물과 그 분획물들의 항돌연변이원성을 검토한 결과는 Fig. 1, 2와 같다. Ames test에서 양성 반응을

Table 1. Mutagenicity of ethanol extract from *Adenophora tryphylla* 70% ethanol extract (ATEE) in *Salmonella* Typhimurium TA98 and TA100

Dose (μ g/plate)	His ⁺ revertants/plate ¹⁾	
	TA98	TA100
Spontaneous	34 ± 4 ^{a2)}	144 ± 4 ^a
ATEE 50	20 ± 2 ^a	204 ± 4 ^a
ATEE 100	23 ± 1 ^a	195 ± 5 ^a
ATEE 150	20 ± 4 ^a	191 ± 9 ^a
ATEE 200	19 ± 2 ^a	201 ± 8 ^a

¹⁾Each value represents the mean±SD of three plates.

²⁾Values not sharing common superscript letter in column were significantly different at p<0.05.

나타내며 강력한 발암물질인 직접변이원 물질로 알려진 MNNG(0.4 µg/plate)의 경우 *S. Typhimurium* TA100 균주에서 농도 의존적으로 변이원성 억제효과를 나타내었다(Fig. 1). 특히 시료 농도 200 µg/plate에서 핵산 및 에틸 아세테이트 분획물들에서 각각 86.2% 및 83.3%로 다른 분획물들에 비하여 다소 높은 항돌연변이원성을 나타내었다. 또한 같은 농도에서 에탄올 추출물, 부탄올, 클로로포름 및 물 분획물에서는 각각 79.5, 78.4, 75.4 및 69.9% 순으로 억제효과를 나타내었다.

한편 다른 직접변이원인 4NQO(0.15 µg/plate)에 대한 억제 효과를 측정된 결과 농도 의존적으로 억제활성을 나타내었으며 *S. Typhimurium* TA98의 경우 시료 농도 200 µg/

plate에서 에틸 아세테이트 분획물이 66.5%로 다른 시료에 비하여 높은 억제효과를 보였으며 에탄올 추출물 및 물 분획물에서는 각각 65.7%, 57%로 다른 분획물에 비해 높은 항돌연변이원성을 나타내었다. *S. Typhimurium* TA100 균주의 경우 에틸 아세테이트 분획물은 시료농도 200 µg/plate에서 75.1%의 억제효과를 나타내었다. 이밖에 에탄올 추출물, 핵산, 클로로포름 및 물 분획물에서 각각 71.1%, 68%, 63.5% 및 62.7%의 억제효과를 나타내었다(Fig. 2).

Shon 등(26)은 장생 도라지의 돌연변이 억제효과 실험 결과에서 직접 돌연변이 물질인 MNNG 사용 시 *S. Typhimurium* TA98과 TA100에서 70% 메탄올 추출물과 이것의 분획물들(핵산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올, 물층) 중 에틸아세테이트와 부탄올 분획물들이 가장 높은 항돌연변이 효과를 나타내었다고 보고하였는데, 이는 본 연구결과와 유사하였다. Jeon 등(27)은 *S. Typhimurium* TA100에 4NQO로 돌연변이를 유도함과 동시에 토사자 에탄올 추출물을 처리하였을 때 98.4%의 억제활성을 나타내었다고 보고하였는데, 이는 잔대 70% 에탄올 추출물의 62.7% 항돌연변이 효과가 나타난 본 연구 결과와 비교하면 토사자 에탄올 추출물이 높은 항돌연변이 효과를 나타낸 것이다.

S. Typhimurium TA98과 TA100와 각 돌연변이 물질에 따라 돌연변이 억제효과는 다소간의 차이는 있었으나 잔대 추출물과 그 분획물들은 강한 항돌연변이 활성을 나타냈다. 따라서 본 잔대 추출물 및 그 분획물들은 직접돌연변이원에 대한 항돌연변이 효과가 우수하여 항돌연변이 소재로 활용 가능성을 시사하고 있다. 그러나 S-9 mix를 필요로 하는 간접변이원 물질에도 이들 추출물과 그 분획물들이 직접돌연변이에서 보여준 항돌연변이 효과를 나타나는지에 대한 연구가 수행되어야 할 것이다.

인간 암세포 성장 억제효과 측정

본 실험에서는 암세포로 인간 자궁암세포(HeLa), 인간 간

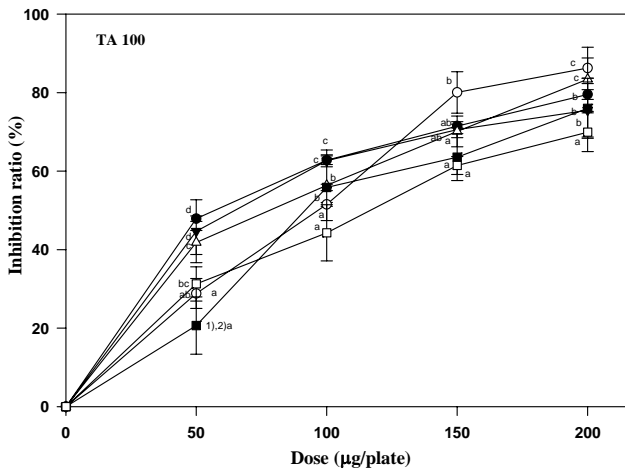


Fig. 1. The antimutagenic effects of 70% ethanol extract and its fractions from *Adenophora triphylla* against MNNG (0.4 µg/plate) in *Salmonella Typhimurium* TA 100.
 ● : ethanol extract, ○ : hexane fr., ▲ : chloroform fr., △ : ethyl acetate fr., ■ : butanol fr., □ : aqueous fr.
 1) Each value represents the mean ± SD of three plates.
 2) Values not sharing common superscript letter in the same concentration were significantly different at p < 0.05.

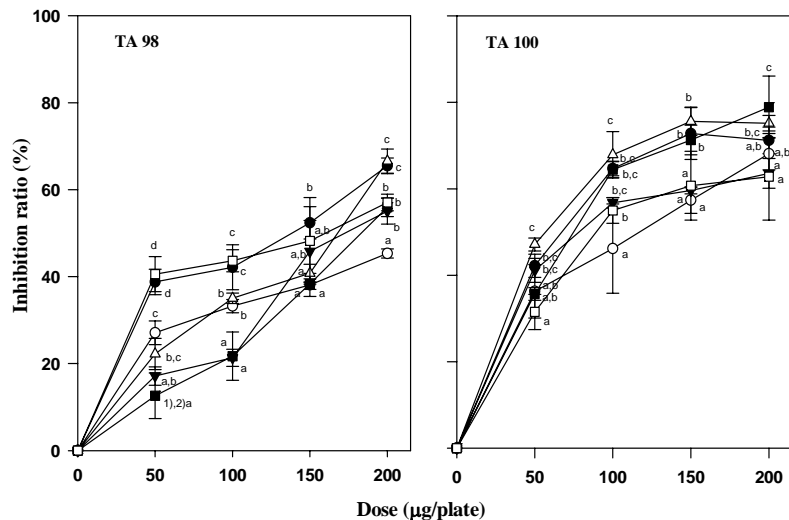


Fig. 2. The antimutagenic effects of 70% ethanol extract and its fractions from *Adenophora triphylla* against 4NQO (0.15 µg/plate) in *Salmonella Typhimurium* TA 98 and TA 100.
 ● : ethanol extract, ○ : hexane fr., ▲ : chloroform fr., △ : ethyl acetate fr., ■ : butanol fr., □ : aqueous fr.
 1) Each value represents the mean ± SD of three plates.
 2) Values not sharing common superscript letter in the same concentration were significantly different at p < 0.05.

Table 2. Inhibitory effects of 70% ethanol extract and its fractions from *Adenophora triphylla* on the human cells and 293 cell

Dose (mg/mL)	Growth inhibition (%)						
	293	HeLa	Hep3B	MCF-7	AGS	A549	
70% ethanol	0.25	3.28±2.79 ^{1)NS2)}	16.43±4.80 ^{a3)}	21.37±5.04 ^c	5.71±4.70 ^a	21.85±1.78 ^b	15.95±2.47 ^{bc}
	0.50	17.8±4.86 ^{NS}	40.93±7.20 ^{NS}	49.40±2.67 ^b	17.28±2.24 ^a	32.49±2.13 ^b	37.82±8.67 ^{bc}
	0.75	26.07±2.10 ^{bc}	58.51±5.5 ^{ab}	62.56±2.12 ^d	28.11±1.49 ^a	53.08±3.10 ^d	42.55±0.53 ^c
	1.00	31.63±2.86 ^{NS}	78.5±3.27 ^c	66.44±5.14 ^c	34.88±4.15 ^a	64.90±2.17 ^c	64.64±0.92 ^c
Hexane	0.25	5.67±1.21	20.14±1.40 ^{ab}	13.05±1.13 ^b	7.98±1.92 ^a	7.26±4.56 ^a	10.44±2.76 ^a
	0.50	16.79±3.21	35.37±1.13	21.91±2.92 ^a	19.74±1.39 ^a	21.17±2.60 ^a	18.21±3.95 ^a
	0.75	21.03±0.45 ^{ab}	62.50±7.01 ^c	57.52±2.91 ^{cd}	40.30±1.39 ^b	46.54±2.12 ^c	35.01±1.16 ^{ab}
	1.00	31.10±6.95	80.00±1.44 ^c	73.95±1.55 ^d	51.50±6.5 ^b	52.40±2.63 ^b	55.83±1.99 ^b
Chloroform	0.25	10.17±2.86	24.12±1.95 ^{bc}	12.71±2.47 ^b	14.08±1.89 ^{ab}	12.03±3.09 ^a	17.71±3.34 ^c
	0.50	16.53±2.75	41.62±1.02	24.44±8.24 ^a	28.48±3.10 ^b	39.17±5.14 ^c	31.32±2.10 ^b
	0.75	30.04±2.86 ^c	50.74±3.59 ^a	48.51±6.69 ^{ab}	42.51±3.18 ^b	42.78±3.09 ^c	38.92±1.39 ^{bc}
	1.00	34.81±4.83	68.47±0.84 ^b	62.42±1.53 ^{bc}	63.32±1.13 ^{cd}	60.04±1.65 ^c	56.27±2.40 ^b
Ethyl acetate	0.25	6.46±3.30	30.60±5.27 ^c	27.17±1.54 ^d	13.96±5.80 ^{ab}	36.72±2.90 ^c	32.09±2.03 ^d
	0.50	12.29±2.55	43.65±0.89	43.74±3.61 ^b	38.21±2.82 ^c	38.04±3.20 ^d	42.11±2.64 ^c
	0.75	17.33±2.10 ^a	60.92±3.68 ^{bc}	50.90±6.47 ^{bc}	56.30±5.02 ^c	55.81±1.48 ^d	53.90±5.90 ^d
	1.00	28.72±5.29	79.95±2.68 ^c	74.97±1.90 ^d	66.03±3.38 ^d	71.09±6.07 ^d	74.33±5.80 ^d
Butanol	0.25	7.26±2.00	13.75±1.18 ^a	8.96±0.70 ^{ab}	13.71±4.67 ^{ab}	8.76±2.17 ^a	12.10±3.09 ^{ab}
	0.50	14.14±3.64	40.97±3.48	21.30±1.23 ^a	41.78±6.61 ^c	15.99±2.72 ^a	32.86±2.12 ^b
	0.75	20.77±6.94 ^{ab}	52.73±2.47 ^{ab}	38.96±6.59 ^a	48.17±4.92 ^{bc}	35.35±4.15 ^b	42.78±4.30 ^c
	1.00	35.08±2.42	68.65±3.12 ^b	54.71±1.74 ^a	71.69±7.61 ^d	48.04±1.88 ^b	68.10±1.58 ^c
Aqueous	0.25	8.32±3.21	25.14±4.72 ^{bc}	5.41±1.53 ^a	20.24±6.65 ^b	9.57±3.27 ^a	9.01±0.48 ^a
	0.50	13.88±1.65	43.51±1.64	27.16±5.53 ^a	35.87±5.35 ^c	17.35±1.48 ^a	13.52±1.53 ^a
	0.75	18.38±2.00 ^a	53.51±1.52 ^{ab}	44.08±4.79 ^{ab}	47.93±8.34 ^{bc}	21.03±3.50 ^a	30.93±1.29 ^a
	1.00	32.96±3.30	61.52±1.36 ^a	60.72±0.93 ^b	55.32±2.67 ^{bc}	32.08±4.50 ^a	45.09±1.49 ^a

¹⁾Values are the mean±SD (n=3).

²⁾NS: not significant.

³⁾Values not sharing common superscript letter in column were significantly different at p<0.05.

암세포(Hep3B), 인간 유방암세포(MCF-7), 인간 위암세포(AGS), 인간 폐암세포(A549)와 인간의 정상신장세포(293)를 이용하였다. 인간 자궁암 세포 HeLa에 대한 잔대 추출물 및 분획물들의 억제 효과를 검토한 결과 1 mg/mL 첨가 시 핵산 분획물은 80%, 에틸 아세테이트 분획물은 79.9% 그리고 에탄올 추출물은 78.5%의 억제효과를 나타내었다(Table 2). 인간 간암세포인 Hep3B에 에틸 아세테이트 분획물 0.25, 0.5, 0.75 및 1 mg/mL를 각각 첨가 시 각각 27.1, 43.7, 50.9 및 74.9%로 높은 억제효과를 나타내었으며 모든 분획물에서 농도 의존적으로 암세포 성장저해효과를 나타내었다. 인간 유방암 세포인 MCF-7에서는 시료 농도 1 mg/mL에서 에탄올 추출물과 핵산 분획물에서 50% 전후의 억제효과를 나타낸 반면 부탄올 추출물에서 71.6%의 억제율을 보여 다른 분획물에 비해 유방암에 효과가 있음을 간접적으로 시사해 주고 있다. 또한 인간 위암세포 AGS의 경우는 에틸 아세테이트 분획물에서 시료 농도 1 mg/mL에서 71% 억제율을 보인 반면 물 추출물에서는 32%의 낮은 억제율을 나타내었다. 인간 폐암세포인 A549에 대한 억제효과는 에틸 아세테이트 분획물, 부탄올 분획물 및 에탄올 추출물을 최고 농도 1 mg/mL 처리하였을 때 각각 74.3, 68.1 및 64.6%의 높은 암세포 성장 억제효과를 나타내었다. 그 반면 인간 정상세포 293에 대한 저해효과는 1 mg/mL의 농도에서 모두 40% 이

하의 낮은 억제효과를 보였다. 이는 암세포에 대한 높은 억제효과에 비해 정상 세포에 대해서는 비교적 낮은 독성 효과를 나타낼 수 있었다.

잔대는 사포닌을 다량 함유하고 있으며, 이들 사포닌이 잔대의 주요 생리활성 물질로 알려져 있다(16). Park 등(28)의 보고에 의하면 대두박으로부터 분리된 식용 사포닌은 인간 폐암세포(A549)와 인간 유방암세포(MCF-7) 성장을 억제시켰고, 조사포닌 첨가 농도가 높을수록 암세포 성장 억제 효과가 증가하였다. 대두 사포닌도 암세포 성장을 효과적으로 억제하는 것으로 알려져 있어(29,30), 본 실험 사용된 잔대 추출물과 그것의 분획물들이 암세포 성장 억제효과를 나타내는 것은 이들 추출물과 분획물들이 사포닌 등과 같은 기능성 활성물질을 함유하고 있기 때문인 것으로 생각되어지고, 높은 암세포 성장 억제능을 가진 잔대 에틸 아세테이트 분획물에는 다량은 사포닌이 함유되어 있을 것으로 추정된다. 따라서 더 진행되어야 할 연구는 높은 암세포 성장 억제능을 가진 분획물들 안에 어떤 성분이 함유되어 있고, 얼마나 함유되어져 있는지에 대한 정성 및 정량분석이 진행되어야 할 것이다.

Sarcoma-180 cell을 이용한 *in vivo*계 항암실험

잔대 에탄올 추출물 및 그 분획물들의 종양 성장 저지 실험

Table 3. Antitumor activities of 70% ethanol extract and its fractions bearing *Adenophora triphylla* (AT) in tumor bearing Balb/c mouse with sarcoma-180 cell

Group	Dose mg/kg body weigh	Tumor weight (mean \pm SD) ¹⁾	Inhibition ratio (%)
Control	—	4.24 \pm 0.74 ^{a2)}	—
Ethanol extract	25	3.40 \pm 0.53 ^{bc}	19.75 \pm 12.7
Hexane fraction	25	3.49 \pm 0.38 ^{ab}	17.63 \pm 9.19
Chloroform fraction	25	3.83 \pm 0.29 ^{ab}	9.57 \pm 6.99
Ethyl acetate fraction	25	2.84 \pm 0.66 ^c	33.05 \pm 15.56
Butanol fraction	25	3.66 \pm 0.27 ^{ab}	13.62 \pm 6.42
Aqueous fraction	25	4.03 \pm 0.28 ^a	4.80 \pm 6.81
Ethanol extract	50	3.12 \pm 0.15 ^{bcd}	26.30 \pm 3.65
Hexane fraction	50	2.94 \pm 0.32 ^{cd}	30.50 \pm 7.57
Chloroform fraction	50	3.55 \pm 0.46 ^{ab}	16.12 \pm 10.96
Ethyl acetate fraction	50	2.66 \pm 0.64 ^d	37.24 \pm 15.14
Butanol fraction	50	3.35 \pm 0.34 ^{bc}	20.83 \pm 8.13
Aqueous fraction	50	3.99 \pm 0.43 ^a	5.89 \pm 10.15

Thirteenth groups were fed with commercial chow diet. After implantation of S-180 cells (6×10^6 cells/mouse), all mice were injected with PBS (phosphate buffered solution, control) or AT ethanol extract, hexane fraction, chloroform fraction, ethyl acetate fraction, butanol fraction and aqueous fraction, respectively every day for 20 days.

¹⁾Values are mean \pm SD of 6 mice (n=6 per group, total mice; n=78).

²⁾Means with the different letters are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

험 결과는 Table 3과 같다. 잔대 에탄올 추출물 및 그 분획물들은 모두 항종양 활성을 나타내었다(Table 3). 종양세포를 이식한 대조군은 4.24 \pm 0.74 g의 고형암 무게를 나타내었고, 잔대 에틸아세테이트 분획물의 농도를 50 mg/kg으로 처리하였을 경우 고형암의 무게는 2.66 \pm 0.64 g으로 대조군과 비교하여 고형암 무게가 유의적인 감소하였고, 잔대 추출물과 이들 분획물들 중 가장 높은 고형암 억제효과를 나타내었다. 또한 같은 농도에서 에탄올 추출물, 헥산, 클로로포름, 부탄올 및 물 분획물들에서의 무게는 각각 3.12, 2.94, 3.55, 3.35 및 3.99 g이었으며, 추출물과 그 분획물들은 농도 의존적으로 고형암 성장 저지효과를 나타내었다.

Min 등(31)은 종양 세포를 이식한 마우스에 달나무 추출물 및 그 분획물들을 투여한 결과 에틸아세테이트 층에서 41%의 억제율을 나타내었다고 보고하였는데, 본 연구에 사용된 잔대 에틸아세테이트 분획물의 37.2% 억제율과 비교하면 유사한 억제율을 나타내었다.

모든 결과를 종합하여 보면, 잔대 70% 에탄올 추출물과 그 분획물들은 *in vitro*에서 항돌연변이 효과 및 암세포주 성장억제효과를 확인할 수 있었으며, *in vivo* 실험에서 고형암 성장 저지효과를 나타내어 항돌연변이 및 항암 기능성 소재로서 활용가능성을 시사했다. 특히 잔대 에틸아세테이트 분획물이 잔대 70% 에탄올 추출물 및 그 분획물들 중 가장 높은 항돌연변이 및 항암 활성을 나타내었다. 따라서 이들 잔대 에틸 아세테이트 추출물은 암을 예방하거나 치료하고자 하는 목적으로 다양한 분야에서 활용될 수 있을 것으

로 사료된다.

요 약

본 연구는 잔대의 돌연변이원성, 항돌연변이원성, 세포독성, 항종양 효과를 조사하기 위해서 수행되었다. 잔대를 70% 에탄올로 추출하여 추출용매에 따라 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올과 물층으로 분획하였다. Ames test, SRB assay와 종양 억제실험 방법을 사용하여 실험하였다. Ames test결과, 잔대 에탄올 추출물과 그 분획물들은 돌연변이원성을 나타내지 않았을 뿐만 아니라, MNNG와 4NQO로 돌연변이를 일으켰을 때 높은 항돌연변이 효과를 나타내었다. 잔대 에틸아세테이트 분획물은 *S. Typhimurium* TA98를 4NQO로 돌연변이를 유도하였을 때 66.5%의 억제율을 나타내었으며, *S. Typhimurium* TA100에서 MNNG와 4NQO로 돌연변이를 유도했을 때는 83.3%와 75.1%의 억제율을 나타내었다. 잔대 추출물 및 그 분획물들의 암세포 성장 억제효과를 살펴보기 위해 인간 자궁암세포(HeLa), 인간 간암세포(Hep3B), 인간 유방암세포(MCF-7), 인간 위암세포(AGS), 인간 폐암세포(A549)와 인간 신장정상세포(293)를 사용하였다. 잔대 에틸아세테이트 분획물을 1 mg/mL를 처리하였을 때 각각 79.9%(HeLa), 74.9%(Hep3B), 66.0%(MCF-7), 71.0%(AGS)와 74.3%(A549)의 가장 높은 억제활성을 나타내었다. 반면에 인간 정상 신장세포에서는 3~36%의 세포독성을 나타내었다. *In vivo*에서 잔대 추출물의 항암효과를 시험하기 위하여 Balb/c 마우스에 sarcoma-180 종양세포로 고형암을 유발시켰다. 그 결과 잔대 에틸아세테이트 층의 최고농도 50 mg/kg에서 37.2%의 고형암 성장 억제효과를 나타내었고, 이는 모든 처리군 중 가장 높은 억제율이었다.

문 헌

1. Webb CP, Aelst LV, Wigler MH, Woue GF. 1998. Signaling pathways in mediated tumorigenicity and metastasis. *Proc Natl Acad Sci* 95: 8773-8778.
2. Yu GM, Hwang IG. 2004. *In vitro* effect of Yuza (*Citrus junos* SIEB ex TANAKA) extracts on proliferation of human prostate cancer cells and antioxidant activity. *Korean J Food Sci Technol* 36: 339-344.
3. Ha ES, Hwang SH, Shin KS, Yu KW, Lee KH, Choi JS, Park WM, Yoon TJ. 2004. Anti-metastatic activity of glycoprotein fractionated from *Acanthpanax senticosus*, involvement of NK-cell and macrophage activation. *Arch Pharm Res* 27: 217-224.
4. Lee HB, Kim HJ, Chong MS, Cho HE, Choi YH, Lim KS, Lee KN. 2008. Physiological activity of extracts from mixed culture of medical herbs and mycelia of *Tricholoma matsutake* and *Cordyceps militaris* by fermentation. *Kor J Herbology* 23: 1-8.
5. Yu MH, Im HG, Lee HJ, Ji YJ, Lee IS. 2006. Components and their antioxidative activities of methanol extracts from

- sarcocarp and seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder. *Korean J Food Sci Technol* 38: 128-134.
6. Ames BN, Kammen HO, Yamasaki E. 1975. Hair dyes are mutagenic: identification of a variety of mutagenic ingredients. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 2423-2427.
 7. Lee YE, Hong SH. 2004. *Traditional oriental medicine food material*. Kyomunsa, Seoul. p 161-162.
 8. Kuang HX, Shao CJ, Kasai R, Ohtani K, Tanaka O. 1991. Phenolic glycosides from roots of *Adenophora tetraphylla* collected in Heilongjiang. *China Chem Pharm Bull* 39: 2440-2442.
 9. Konno C, Saito T, Oshima Y, Hikino H, Kabuto C. 1981. Structure of methyl adenophorate and triphyllol, trierpenoids of *Adenophora triphylla* var. *japonica* roots. *Planta Med* 42: 268-274.
 10. Gorovoi PG, Ponomarchuk GI, Strigina LI. 1971. A chemotaxonomic study on Russian far-eastern Campanulaceae. *Phytochemistry* 10: 2419-2423.
 11. Wang ZT, Ma GY, Tu PF, Xu GJ, Ng TB. 1995. Chemotaxonomic study of *Codonopsis* (Family Campanulaceae) and its related genera. *Biochem Syst Ecol* 23: 809-812.
 12. Park YK, Yoo HH, Baek SH, Lee SH, Kim CM, Lee KS, Park MK, Park JH. 2003. Quality control of *Adenophora Radix*. *Kor J Pharmacogn* 34: 10-13.
 13. Kang BY, Kim MH, Bae SJ. 2002. Enhancement of anti-oxidation effect of *Platycodon grandiflorum* with vitamin C on the DLPC Liposomes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 506-510.
 14. Lee EB. 1974. Pharmacological studies on *Platycodon grandiflorum*. *Kor J Phamacogn* 5: 49-55.
 15. Jang JG, Lee KS, Kwon DW, Nam KY, Chio JH. 1983. Study on the changes of saponin contents in relation to root age of *Panax ginseng*. *Korean J Food Nut* 12: 37-45.
 16. Cho JT. 1985. Physiological and ecological studies on the Chinese bellflower, *Platycodon grandiflorum* DC. *J Kor Soc Hort Sci* 26: 22-28.
 17. Oh SW. 1972. Studies on components of Sasam. *MS Thesis*. Younsei University.
 18. Yoon ES, Lee SR, Lee YS. 1988. Estimation of gentic relationships and characterization among *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. fil. geographical variety by the electrophoretic patterns of isozymes. *J Oriental Bo't Res* 1: 34-41.
 19. Kanek Y, Park SY, Tanemura J, Lee SR, Lee YS. 1989. The present note describes that polymorphic isoelectrophoretic variation in leaves of the *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. fil. 4 enzymes within variety of the zone in Korea and Japan. *J Oriental Bo't Res* 2: 243-251.
 20. Lee SR, Yoon ES, Lee HJ, Lee YS, Lee JI. 1989. A basic study on development of anti-cancer medical wild plants growing in Korea. *J Oriental Bo't Res* 2: 1-214.
 21. Baek SE, Woo SK, Kim MU. 1991. Studies on the chemical composition of sa-sam. *Kor Life & Sci* 9: 103-115.
 22. Han EG, Cho SY. 1997. Effect of *Codonopsis lanceolata* water extract on the activities of antioxidative enzymes in carbon tetrachloride treated rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 1181-1186.
 23. Yahagi T, Nagao M, Seino Y, Matusushima T, Sugimura T, Okada M. 1997. Mutagenicities of N-nitrosamines in *Salmonella*. *Mutat Res* 48: 121-130.
 24. Martin A, Martin C. 1997. Comparison of 5 microplate colorimetric assay for *in vitro* cytotoxicity testing and cell proliferation assays. *Cytotechnology* 11: 49-54.
 25. Maron DM, Ames BN. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 113: 173-215.
 26. Shon MY, Seo JK, Kim HJ, Sung NJ. 2001. Antimutagenic effect of extract of *Platycodon grandiflorum*. *Korean J Food Sci Technol* 33: 651-655.
 27. Jeon YH, Kim MH, Kim MR. 2008. Antioxidative and anti-mutagenic activity of ethanol extracts from *Cuscutae Semen*. *Korean J Food Cookery Sci* 24: 64-51.
 28. Park KU, Wee JJ, Kim JY, Jeong CH, Kang KS, Cho YS, Seo KI. 2005. Anticancer and immuno-activities of edible crude saponin from soybean cake. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 1509-1513.
 29. Sung MK, Kendall CW, Koo MM, Rao AV. 1995. Effect of soybean saponins and gypsophilla saponin on growth and viability of colon carcinoma cells in culture. *Nutr Cancer* 23: 259-270.
 30. Rao AV, Sung MK. 1995. Saponin as anticarcinogens. *J Nutr* 125: 717-724.
 31. Min KJ, Choung SH, Koo SJ. 1999. Studies on the anti-cancer effect of *Broussonetia kazinoki* extracts. *Korean J Soc Food Sci* 15: 231-237.

(2008년 11월 28일 접수; 2009년 1월 7일 채택)