

복분자 딸기(*Rubus coreanum*) 에탄올 및 열수추출물의 항돌연변이 활성과 암세포 성장 억제 효과

전연희 · 최상원¹ · 김미라^{2*}

경북대학교 식품영양학과, ¹대구가톨릭대학교 식품영양학과, ²경북대학교 식품영양학과 · 장수생활과학연구소

Antimutagenic and Cytotoxic Activity of Ethanol and Water Extracts from *Rubus coreanum*

Yeon Hee Jeon, Sang Won Choi¹ and Mee Ra Kim^{2*}

Department of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University

¹Department of Food Science and Nutrition, Catholic University of Daegu

²Department of Food Science and Nutrition, Center for Beautiful Aging, Kyungpook National University

Abstract

The antimutagenic and cytotoxic activities of ethanol and water extracts from *Rubus coreanum* were investigated in this study. Their antimutagenic activities were measured by the Ames test and their cytotoxic activities were evaluated by the growth inhibition of cancer cells via the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay and the sulforhodamine B (SRB) assay. In the results, the inhibition rates of the ethanol and water extracts toward mutagenicity induced by 4-NQO were 95.0% and 93.6% at 5 mg/plate, respectively, while their inhibition rates against mutagenicity induced by sodium azide were 27.2% and 40.8%, respectively. According to MTT assay, the cytotoxicity values of the ethanol extract against Hep3B and HeLa cells were 67.2% and 68.5%, respectively, and the values for the water extract were 65.8% and 66.4%, respectively. In the SRB assay, the ethanol and water extracts inhibited over 60% of cancer cell growth. In conclusion, both the ethanol and water extracts of *Rubus coreanum* offer potentially good antimutagenic and anticancer effects.

Key words: *Rubus coreanum*, antimutagenic activity, cytotoxic activity

1. 서론

식생활의 다양화와 가공식품의 발달로 인하여 식품 첨가물의 사용이 증가하고 건강과 장수에 대한 관심이 고조됨에 따라 천연 식품에 함유된 생리활성물질의 탐색과 생리활성물질을 이용한 기능성 식품의 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 항산화제는 활성산소종을 소거하여 산화적 스트레스에 의해 유발되는 여러 만성적 질병을 예방할 뿐 아니라 불포화지방의 자동산화에 의한 지방의 산패를 억제하여 식품의 저장성을 향상시키는 중요한 기능을 가진다. 또한 free radical에 의한 DNA 손상으로 발생하는 여러 질병을 효과적으로 예방할 수 있는 β -

carotene, tocopherol, vitamin C, selenium 등과 같은 항산화적 항돌연변이원성 물질도 관심의 대상이 되고 있다. 이는 발암물질의 85% 이상이 돌연변이원으로 알려져 있어 돌연변이원과 발암사이에 밀접한 상관관계가 있기 때문이다.

일부 합성항산화제는 항산화력은 매우 우수하나 발암, 돌연변이 및 독성 등의 안전성이 문제시되면서 최근 사용 제한에 대한 논의가 계속되고 있다(Branen AL 1975, Ito N 등 1983). 따라서 합성 항산화제를 대체할 수 있는 보다 안전하고 효과적인 천연 항산화제 소재의 개발이 요구되고 있으며(Iqbal 등 2005) 항돌연변이와 항암 활성을 가지고 있는 유용생리자원의 탐색도 요구되고 있다.

장미과(Rosaceae)의 다양한 식물 속(屬) 중의 하나인 산딸기속(Rubus)에 속하는 복분자 딸기(覆盆子: *Rubus coreanus* Miquel)는 주로 한국과 중국, 일본 등의 아시아에 많이 분포한다. 복분자 딸기는 작은 단과가 여러 개 모여서 덩어리를 이룬 것으로 원추형이나 눌러진 구형을 이

*Corresponding author: Mee Ra Kim, Department of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University
Tel: 053-950-6233
Fax: 053-950-6229
E-mail: meerak@knu.ac.kr

루고 있으며 꽃받침의 중심부는 함몰되어 있다. 음력 5월에 익은 열매가 검붉은색을 띠어 오표자(烏標子), 대맥매(大麥莓), 삽전표(插田蓼), 재양표(栽秧蓼)라고도 불린다. 복분자 딸기는 식용으로 이용될 뿐만 아니라, 동의보감·당본본초·본초중신록 등의 여러 고문헌에 그 효능이 언급되어 있어 예로부터 한방에서는 미성숙 열매를 당뇨병 및 발기부전 치료, 청량(淸涼), 지갈(止渴), 강장약(强壯藥) 등의 약재로 사용하고 있으며(배기환 2000, Moon GS 1991), 전통주 및 화장품, 음료 등의 재료로 다양하게 이용되고 있다. 복분자 딸기에 대한 연구로는 잎과 줄기에 함유된 tannin 및 flavonoids 화합물 등의 성분분석(Kim KH 등 2000, Kim MS 등 1997, Kim YH와 Kang SS 1993)과 몇 가지 식중독 균에 대한 항균활성(Choi OK 등 2002), linoleic acid 과산화 저해활성(Lee SE 등 2002), 항중양효과(Park JH 등 2006), 면역활성 증진 효과(Kim DH 등 2005), 설기떡의 저장에 미치는 효과(Cho EJ 등 2006) 및 두부의 저장에 미치는 효과(Oh SW 등 2002) 등이 있으나 복분자 딸기의 항돌연변이 활성과 항암 활성에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 복분자 딸기의 생리활성을 탐색하고 새로운 천연 기능성 소재로의 이용 가능성을 살펴보기 위하여 복분자 딸기의 항돌연변이 활성과 항암 활성을 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료 및 시료 추출

본 실험에서 사용한 복분자 딸기는 2006년 전라남도 고창에서 재배하여 수확한 것을 구입하여 -20℃에서 냉동보관하면서 시료로 사용하였다. 에탄올추출물은 복분자 딸기 100 g에 70% 에탄올 20배를 가하여 진탕배양기(25℃, 108 rpm)에서 12시간 동안 진탕한 후 여과지(Toyo No. 2, Advantec)로 여과하고 회전감압농축기(EYELA, Tokyo Rikakikai Co., Japan)로 40℃에서 감압농축하여 제조하였다. 복분자 딸기 열수추출물은 복분자 딸기 100 g에 10배의 증류수를 넣어 95℃ 항온수조에서 4시간 동안 환류냉각하여 추출한 후, 여과지로 여과하여 농축하였다. 에탄올추출물 및 열수추출물은 동결건조 후 냉동보관하며 실험에 사용하였다.

2. 시약

실험에 사용된 dimethyl sulfoxide(DMSO)와 sodium azide, 4-nitroquinoline-1-oxide(4-NQO), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium(MTT), sulforhodamine B(SRB)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터, Nutrient broth와 agar는 Acumedia(Lansing, Michigan, USA)에서 구입하였고, minimum essential medium(MEM, with

L-glutamine & Earle's Balanced salts)은 Hyclone Co.(USA)로부터, fetal bovine serum은 Gibco BRL(USA)로부터 구입하여 사용하였다.

3. 돌연변이 및 항돌연변이 활성 측정

염기쌍 치환 변이주인 *Salmonella typhimurium* TA100 (KTCT 2054, hisG46, rfa, Δ uvrB, R⁺) 균주를 한국세포주은행(KCLB)에서 분양받아 돌연변이 및 항돌연변이 활성을 측정하였다. 균주는 액체질소에 보관하며 정기적으로 histidine 요구성, deep rough(rfa) 돌연변이, uvrB 돌연변이와 R-factor의 유전형질을 확인하였다. 돌연변이 유발물질로는 직접돌연변이 물질인 sodium azide(1.5 μ g/plate)와 4-NQO(0.15 μ g/plate)를 사용하였다. 돌연변이원의 사용량은 예비실험을 통하여 결정하였다.

Maron DM과 Ames BN(1983)의 방법에 따라 pre-incubation법으로 복분자 딸기추출물의 돌연변이 및 항돌연변이 활성을 측정하였고, 실험 전 시료에 대한 돌연변이 유발실험을 실시하여 돌연변이를 일으키지 않는 범위 내에서 시료의 농도를 결정하였다. 멸균된 cap tube에 변이원 50 μ L와 시료 50 μ L, 배양된 균액 100 μ L를 넣고 0.2 M phosphate buffer(pH 7.0)를 이용하여 최종 부피를 700 μ L로 맞추어 준 후, 37℃ 항온수조(Vision Co., Korea)에서 30분간 진탕배양하였다. 각 배양액에 0.5 mM histidine/biotin이 포함된 top agar 2 mL를 첨가하고 3초간 섞은 후 minimal glucose agar plate에 중층하였다. 이 plate들을 암소에서 1시간 굳힌 뒤 37℃ 배양기(SW90B, Sangwoo Scientific Co., Korea)에서 48시간 배양하여 복귀돌연변이의 colony 수를 측정하였으며, 이때 항돌연변이 활성은 다음 식에 따라 산출하였다.

$$\text{항돌연변이 활성(\%)} = \frac{\text{변이원함유복귀돌연변이} - \text{시료함유복귀돌연변이}}{\text{변이원함유복귀돌연변이} - \text{자연복귀돌연변이}} \times 100$$

4. 암세포 성장 억제 효과 측정

본 실험에 사용된 암세포는 인체 간암세포(Hep3B)와 자궁암세포(HeLa)이며, 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였다. 세포 배양액으로는 10% FBS, 1% penicillin-K-streptomycin이 첨가된 MEM을 사용하였다. 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 세포가 plate의 70~80% 가량 자라나는 3~4일 간격으로 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

1) MTT assay

MTT assay는 Carmichael J 등(1987)의 방법에 따라 암세포를 96 well plate에 1×10⁴ cells/well이 되도록 180 μ L씩 분주하고 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 전 배양에 사용된 배지 80 μ L를 제거하고 최

중 부피가 200 μL 되도록 증류수에 용해한 일정농도의 시료를 100 μL 첨가하여 48시간 동안 배양하였다. 그 후 각 well에 MTT 용액(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in distilled water)을 20 μL 씩 첨가하여 동일한 배양 조건에서 4시간 동안 배양하였다. 배양액을 모두 제거하고 각 well당 DMSO:ethanol (1:1, v/v)용액 150 μL 를 첨가하여 진탕배양기에서 30분간 교반한 후 ELISA reader(Versamax, USA)로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) SRB assay

SRB assay는 Doll R과 Peto R(1981)의 방법에 따라, 암세포를 96 well plate에 5×10^4 cells/well이 되도록 희석한 균 배양액을 100 μL 씩 분주하고 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 각 well에 증류수에 녹인 일정농도의 시료를 100 μL 씩 첨가하여 48시간 배양 후 배양액을 제거하였다. 각 well에 10% TCA 100 μL 를 첨가하여 1시간 동안 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 냉장 배양 한 후에 TCA를 제거하고 멸균수로 여러 번 세척하여 건조하였다. 건조된 plate의 각 well에 0.4% SRB를 100 μL 씩 첨가하여 30분간 염색한 후 1% acetic acid로 여러 번 세척하여 건조하였다. Cell에 염색된 SRB를 녹여내기 위해 10 mM Tris buffer(pH 10.5) 100 μL 를 각 well에 첨가하여 10분간 교반해준 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. MTT와 SRB assay를 통한 암세포 성장 억제 효과는 다음 식에 따라 산출하였다.

$$\text{항암 활성(\%)} = (1 - \frac{\text{시료를 첨가한 well의 흡광도}}{\text{시료를 첨가하지 않은 well의 흡광도}}) \times 100$$

5. 통계분석

모든 실험 결과는 SPSS(v. 14.0) 프로그램을 이용하여 통계처리하였다. 각 실험군 사이의 유의성은 분산분석(ANOVA)을 실시한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 검정하였다. 또한 돌연변이능 측정에서 시료와 양성대조군 간의 평균 차이를 검정하기 위해 Student's t-test를 사용하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 추출물의 수율

복분자 딸기 에탄올 및 열수추출물의 수율을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 복분자 딸기 100 g에 대한 에탄올 및 열수추출물의 수율은 각각 7.92%와 6.68%로 에탄올추출물의 수율이 열수추출물보다 높았다.

2. 돌연변이 및 항돌연변이 활성

1) 추출물의 돌연변이능

Table 1. Yields of the ethanol and water extracts from *Rubus coreanum*

Extract	Symbol	Yield(% , w/w) ³⁾
70% Ethanol extract	RC(E) ¹⁾	7.92 \pm 0.92 ⁴⁾
Water extract	RC(W) ²⁾	6.68 \pm 0.52

¹⁾ Ethanol extract of *Rubus coreanum*

²⁾ Boiling water extract of *Rubus coreanum*

³⁾ Yield (%) per fresh *Rubus coreanum* (100 g)

⁴⁾ Data were expressed as mean \pm SD of triplicate determinations.

Table 2. The mutagenicity induced by the ethanol and water extracts from *Rubus coreanum* against *Salmonella typhimurium* TA100

Treatment	Concentration	His ⁺ (colony/plate)	Induction Factor(IF) ³⁾
Spontaneous revertants		143.0 \pm 6.4 ^{1) b2)}	1.0
RC(E)	0.5 mg/plate	126.3 \pm 3.9 ^b	0.9
	1.0 mg/plate	120.3 \pm 6.9 ^b	0.8
	5.0 mg/plate	142.7 \pm 9.0 ^b	1.0
RC(W)	0.5 mg/plate	130.5 \pm 4.5 ^b	0.9
	1.0 mg/plate	126.0 \pm 4.1 ^b	0.9
	5.0 mg/plate	154.5 \pm 2.0 ^b	1.1
Sodium azide	1.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$	1466.7 \pm 217.6 ^a	10.1 ^{*4)}
4-Nitroquinoline-1-oxide	0.15 $\mu\text{g}/\text{plate}$	1347.0 \pm 25.6 ^a	9.4 [*]

¹⁾ His⁺: mean \pm SD of histidine positive revertant colonies on plates (n=3).

²⁾ The different superscript in the same column indicates significant difference among different samples by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

³⁾ Induction factor was calculated as the ratio of colony of sample treatment to colony of spontaneous revertants.

⁴⁾ *: The value is significantly different from the control group at $p < 0.05$ by Student's t-test.

항돌연변이 활성 측정에 앞서 돌연변이원과 시료의 돌연변이 활성을 검증하였다. 그 결과, 세포내 DNA 정보 발현에 직접적으로 이상을 일으켜 돌연변이를 유발하는 직접돌연변이원인 4-NQO와 sodium azide는 실험농도에서 대조군에 비해 복귀돌연변이의 숫자를 유의하게 증가시켰으나 시료는 사용된 농도에서 돌연변이를 유발하지 않아 항돌연변이 실험에 적합함을 확인할 수 있었다(Table 2).

2) 추출물의 항돌연변이 활성

Sodium azide로 야기된 돌연변이에 대한 복분자 딸기 추출물들의 항돌연변이 활성을 Table 3에 나타내었다. 에탄올 및 열수추출물 모두 농도의존적인 항돌연변이 활성이 나타났다. 복분자 딸기 열수추출물은 5 mg/plate의 농도에서 에탄올추출물의 항돌연변이 활성(27.2%)보다 유의적으로 높은 항돌연변이 활성(40.8%)을 나타내었다. 복분

Table 3. The inhibitory effect of the ethanol and water extracts from *Rubus coreanum* on the mutagenicity induced by sodium azide in *Salmonella typhimurium* TA100

Sample	Sodium azide (µg/plate)	Amount of extracts (mg/plate)	His ⁺ (colony/plate)	Inhibition rate (%)
RC(E)				
	0	0	146.5±5.5 ^{1)d2)}	
	(spontaneous revertants)			
	1.5	0	1231.3±88.2 ^a	
	1.5	0.5	1108.0±28.0 ^b	11.4
	1.5	1.0	952.5±23.5 ^c	25.7
	1.5	5.0	936.5±28.5 ^c	27.2
RC(W)				
	0	0	162.3±6.5 ^d	
	(spontaneous revertants)			
	1.5	0	1505.7±332.4 ^a	
	1.5	0.5	1433.0±5.0 ^b	5.4
	1.5	1.0	1012.5±36.5 ^c	36.7
	1.5	5.0	957.5±16.5 ^c	40.8 ^{*3)}

¹⁾ His⁺: mean±SD of histidine positive revertant colonies on plates (n=3).
²⁾ The different superscript in the same column indicates significant difference among 5 different amounts by Duncan's multiple range test (p<0.05).
³⁾ *: The value is significantly different between ethanol extract and water extract at the same concentration by Student's t-test (p<0.05).

자 딸기추출물들의 항돌연변이 활성은 Ahn BY 등(1999)에 의해 보고된 단삼의 항돌연변이 활성(26%)과 수영의 핵산, 에틸아세테이트, 부탄올 분획의 항돌연변이 활성(8~39%)보다는 높게 나타났으나 수영의 염화메틸렌 분획물의 항돌연변이 활성(76.7%)보다는 낮게 나타났다(Lee NJ 등 2001).

복분자 딸기추출물들의 4-NQO에 대한 항돌연변이 활성을 측정된 결과는 Table 4와 같다. 두 시료 모두 농도의존적으로 항돌연변이 활성이 증가하여 5 mg/plate의 농도에서 가장 높은 항돌연변이 활성을 나타내었다. 복분자 딸기의 에탄올 및 열수추출물은 1 mg/plate의 농도에서 열수추출물이 83.2%, 에탄올추출물이 93.4%의 항돌연변이 활성을 나타내어 에탄올추출물이 열수추출물보다 유의적으로 크게 나타났다. 또한 5 mg/plate의 농도에서는 에탄올추출물이 95.0%, 열수추출물이 93.6%의 돌연변이 억제 활성을 나타내어 두 시료 모두 매우 높은 항돌연변이 효과를 보여주었다.

한약재로 상용되는 물질들의 4-NQO에 대한 항돌연변이 활성과 복분자 딸기추출물들의 항돌연변이 활성을 비

Table 4. The inhibitory effect of the ethanol and water extracts from *Rubus coreanum* on the mutagenicity induced by 4-NQO in *Salmonella typhimurium* TA100

Sample	4-NQO (µg/plate)	Amount of extracts (mg/plate)	His ⁺ (colony/plate)	Inhibition rate (%)
RC(E)				
	0	0	164.3±9.4 ^{1)c2)}	
	(spontaneous revertants)			
	0.15	0	1197.3±108.3 ^a	
	0.15	0.5	453.0±37.0 ^b	72.1
	0.15	1.0	232.0±0.0 ^c	93.4 ^{*3)}
	0.15	5.0	215.5±33.5 ^c	95.0
RC(W)				
	0	0	162.3±6.5 ^c	
	(spontaneous revertants)			
	0.15	0	1347.0±224.9 ^a	
	0.15	0.5	440.5±15.5 ^b	76.5
	0.15	1.0	361.5±1.5 ^c	83.2
	0.15	5.0	238.0±5.0 ^d	93.6

¹⁾ His⁺: mean±SD of histidine positive revertant colonies on plates (n=3).
²⁾ The different superscript in the same column indicates significant difference among 5 different amounts by Duncan's multiple range test (p<0.05).
³⁾ *: The value is significantly different between ethanol extract and water extract at the same concentration by Student's t-test (p<0.05).

교해보면, Kim MJ 등(2002)은 썸바귀 부탄올 분획물의 항돌연변이 활성이 88.93%, 물 분획물과 핵산 분획물의 항돌연변이 활성은 80%를 넘지 않는 것으로 보고하여 복분자 딸기추출물들의 활성이 이들보다 높았고, Hwang BO HS과 Ham SS(1999)은 참취뿌리의 각 분획물별 항돌연변이 활성이 54~62%라고 보고하여 복분자 딸기추출물들의 항돌연변이 활성이 이들보다도 높은 것으로 나타났다. 또한 복분자 딸기추출물들의 항돌연변이 활성은 Ahn BY 등(1999)에 의해 보고된 생약재 빈랑(71%)과 Park YS(2002)에 의해 보고된 환삼덩굴 메탄올추출물(19.7%)보다도 높았고, Lee KI 등(1992)에 의해 보고된 비름(92%), 콩나물(94%)의 항돌연변이 활성과 비슷한 수치를 나타내었다.

두 종류의 직접 변이원에 대한 항돌연변이 활성 측정 결과, 복분자 딸기추출물들은 *S. typhimurium* TA100에 의해 검출되는 염기쌍 치환 돌연변이를 효과적으로 억제하여 직접 돌연변이원에 대한 항돌연변이 효과가 우수하였다. 이는 SOS chromotest를 통해 복분자의 강한 세포독성 및 항변이원성을 보고한 Nam SH 등(1999)의 결과

와 일치하는 결과이다. 한편, Song GS 등(1997)은 복분자 추출물이 간접 돌연변이원인 benzo(a)pyrene에 대하여 항돌연변이 활성을 갖고 있다고 보고한 바 있어, 복분자 딸기는 직·간접 돌연변이원에 대한 항돌연변이 활성을 모두 가지고 있는 것으로 보인다.

돌연변이 억제물질은 작용방식에 따라 세포내 항돌연변이원(bio-antimutagen)과 세포외 항돌연변이원(des-mutagen)으로 구분되며 세포내 항돌연변이원성 물질은 질병과 유전독성물질에 의해 유도되는 돌연변이를 차단함으로써 암의 예방에 기여한다(Kinae N과 Masuda S 2002, Nohmi T 2002). 이에 따라 복분자 딸기추출물의 보호 효과를 두 가지로 설명해 볼 수 있는데, 첫 번째는 복분자 딸기추출물이 돌연변이원의 흡수를 방해하는 작용을 하는 것이고 둘째는 복분자 딸기추출물이 DNA-repair system을 향상시키는 화합물을 함유하고 있어 돌연변이에 대한 회복 기능을 향상시킬 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 복분자 딸기추출물들의 항돌연변이원으로서의 효과에 대한 보다 정확한 기작을 알기 위해서는 복분자 딸기의 돌연변이 억제 작용에 대한 더욱 다양한 연구가 이루어져야 할 것이다.

3. 항암 활성

1) MTT assay

MTT assay를 통해 인체 간암세포인 Hep3B 세포와 인체 자궁경부암 세포인 HeLa 세포에 대한 복분자 딸기추출물의 암세포 증식 억제도를 측정된 결과는 Fig. 1과 Fig.

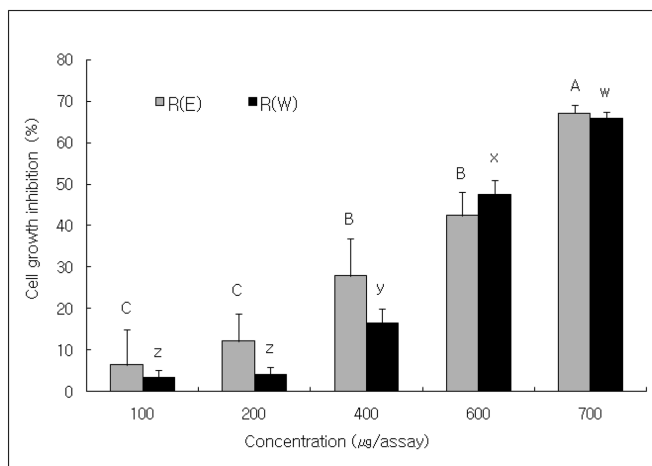


Fig. 1. Cytotoxicity of the ethanol and water extracts from *Rubus coreanum* on the growth of Hela cell by MTT assay.

The different upper case letters (A~C) and lower case letters (w~z) indicate significant difference ($p < 0.05$) among different concentrations of each extract by Duncan's multiple range test. All experiments were independently performed triplicate.

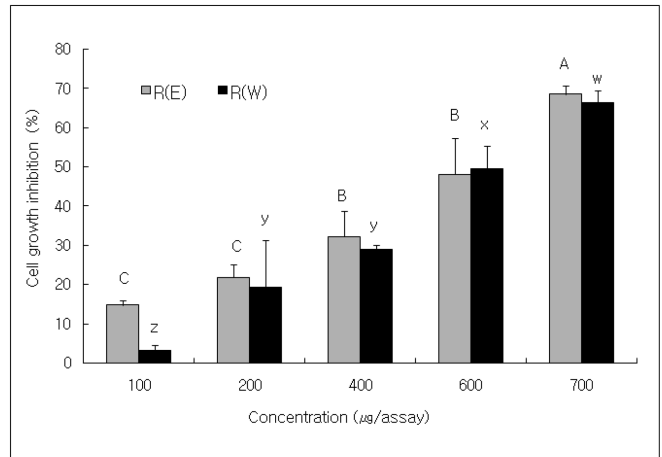


Fig. 2. Cytotoxicity of the ethanol and water extracts from *Rubus coreanum* on the growth of Hep3B cell by MTT assay.

The different upper case letters (A~C) and lower case letters (w~z) indicate significant difference ($p < 0.05$) among different concentrations of each extract by Duncan's multiple range test. All experiments were independently performed triplicate.

2와 같다. 복분자 딸기 에탄올추출물과 열수추출물 모두 Hep3B와 HeLa 세포의 증식을 농도의존적으로 억제하였다. HeLa 세포에 대한 암세포 증식억제는 700 µg/assay의 농도에서 복분자 딸기 에탄올추출물이 68.5%, 열수추출물이 66.4%로 수치상으로 에탄올추출물의 항암활성이 더 큰 것으로 나타났으나 통계적으로 유의적인 차이는 없었다. Hep3B 세포에 대한 복분자 딸기 에탄올추출물과 열수추출물의 항암 활성은 700 µg/assay의 농도에서 각각 67.2%와 65.8%를 나타내어 복분자 딸기 에탄올과 열수추출물 모두 50%가 넘는 항암 활성을 나타내었다. Park JG 등(1993)에 의해 보고된 복분자 CH₂Cl₂:MeOH=1:1 분획물의 SUN-1(위암 세포), SUN-C4(대장암 세포), SUN-354(간암 세포)에 대한 세포독성 효과의 IC₅₀값은 모두 300 µg/mL 이상으로 항암 활성이 높지 않았으나, 복분자주(酒)의 HeLa 세포에 대한 세포독성은 89.7%로 본 실험에서 사용된 복분자 딸기 에탄올추출물보다 높은 항암 활성을 보였다(Shin SM 2008).

2) SRB assay

복분자 딸기추출물들의 SRB assay를 통한 암세포 성장 억제 활성도는 Fig. 3과 Fig. 4에 나타내었다. 복분자 딸기 열수추출물의 SRB assay를 통한 항암 활성 측정 결과는 MTT assay와 마찬가지로 Hep3B와 HeLa 세포의 증식에 대한 억제 활성이 농도의존적으로 나타났다. HeLa 세포에 대한 복분자 딸기 에탄올추출물의 항암 활성은 700 µg/assay의 농도에서 59.5%, 열수추출물의 항암 활성은 63.6%로 열수추출물의 항암 활성이 더 높게 나타났으나

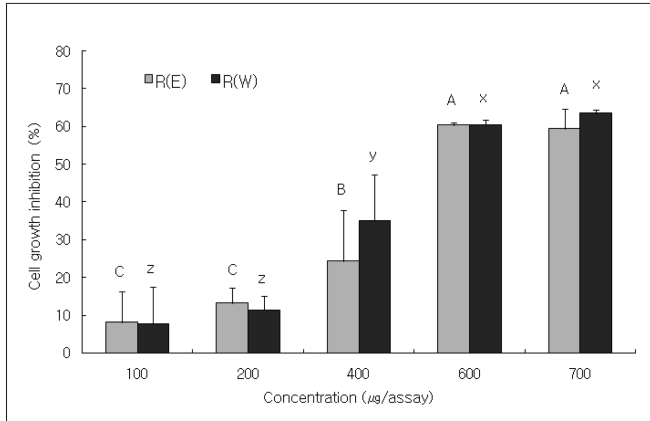


Fig. 3. Cytotoxicity of the ethanol and water extracts from *Rubus coreanum* on the growth of Hela cell by SRB assay.

The different upper case letters (A~C) and lower case letters (x~z) indicate significant difference ($p < 0.05$) among different concentrations of each extract by Duncan's multiple range test. All experiments were independently performed triplicate.

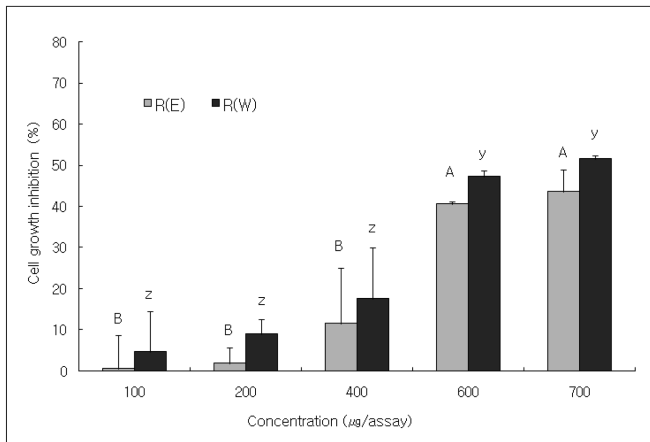


Fig. 4. Cytotoxicity of the ethanol and water extracts from *Rubus coreanum* on the growth of Hep3B cell by SRB assay.

The different upper case letters (A~B) and lower case letters (y~z) indicate significant difference ($p < 0.05$) among different concentrations of each extract by Duncan's multiple range test. All experiments were independently performed triplicate.

유의적인 차이는 나타나지 않았다. 한편, Hep3B 세포에 대한 추출물의 항암 활성은 700 µg/assay 농도에서 에탄올 추출물이 43.7%, 열수추출물이 51.6%로 나타나 HeLa 세포에 대한 항암 활성보다 낮게 나타났다. 이 결과는 HeLa 세포에 대해 항암 활성이 더 높게 나타난 MTT assay의 결과와 일치하였다. 한편 동일한 세포에서 SRB assay에서의 항암활성은 MTT assay에서의 항암활성보다 대체로 낮게 나타났는데, 이는 살아있는 세포의 효소 작용에

의해 MTT가 환원되어 formazan crystal로 침전되는 정도를 흡광도로 측정하여 암세포의 사멸 또는 증식 억제 정도를 측정하는 MTT assay와 SRB가 2개의 SO₃ 작용기를 갖고 있어 약산성인 조건에서 세포분자에 결합하게 되는 원리를 이용하여 세포내 단백질량을 측정하는 SRB assay간에 방법적인 차이와 감도의 차이에 기인한 것으로 사료된다(Scudiero DA 등 1998, Pauwels B 등 2003). 복분자 딸기 추출물의 항암 활성에 대한 다른 연구를 살펴보면, Lee MK 등(2003)은 복분자 열수추출물의 Hep3B 세포에 대한 세포독성이 77.1%, 에탄올추출물의 세포독성은 73.8%이었다고 보고하여 본 실험 결과와 같이 열수추출물의 항암활성이 높게 나타났다. Kim JH 등(2006)은 종양세포인 Sarcoma-180을 마우스에 접종한 후 복분자 열수추출물을 통한 종양세포 성장 억제도를 측정한 결과 복분자가 당귀보다 더 좋은 암세포 억제 효과를 나타내었다고 보고하였다. Park JH 등(2004)에 따르면 초음파를 이용한 복분자의 저온 열수추출물의 Hep3B 세포에 대한 항암 활성은 60% 이상으로 나타났고, 암세포만을 선택적으로 저해하는 효과 또한 우수한 것으로 보고되었다.

IV. 요약

복분자 딸기 에탄올 및 열수추출물의 *Salmonella typhimurium* TA100에 대한 항돌연변이 활성을 측정한 결과 두 종류의 추출물 모두 농도의존적으로 항돌연변이 활성을 나타내었다. Sodium azide에 의해 야기된 돌연변이에 대한 억제 활성은 5 mg/plate의 추출물 농도에서 열수추출물이 에탄올추출물에 비해 높았고, 4-NQO에 의해 야기된 돌연변이에 대한 억제 활성은 1 mg/plate의 농도에서 에탄올추출물이 더 높게 나타났다. 또한 4-NQO에 대한 항돌연변이 활성은 5 mg/plate의 농도에서 에탄올추출물이 95.0%, 열수추출물이 93.6%로 매우 높게 나타났다. 항암실험에서는 복분자 딸기 에탄올 및 열수추출물의 인체 자궁암세포(HeLa)와 간암세포(Hep3B)에 대한 항암 활성이 700 µg/assay의 농도에서 모두 65% 이상으로 높게 나타났다. 또한 두 추출물은 MTT assay와 SRB assay에서 HeLa 세포에 대한 항암활성이 Hep3B에 대한 항암활성보다 높은 경향을 보였다. 따라서 본 연구에서 복분자 딸기 에탄올 및 열수추출물은 직접돌연변이원인 4-NQO에 대한 강한 항돌연변이 활성을 나타내었고 HeLa 세포에 대한 성장 억제 효과도 높게 나타나 복분자 딸기가 항돌연변이와 항암 활성을 가진 천연 기능성 소재로서 사용될 수 있는 가능성을 보여주었다.

V. 감사의 글

본 논문은 2007년도 경북대학교 학술연구비에 의하여

연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 배기환. 2000. 한국의 약용식물. 교학사. 서울. pp 127-129
- Ahn BY, Kim DG, Choi DS. 1999. Antimutagenic effect of *Salvia Miltiorrhiza* Bunge. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 27(3):197-202
- Branen AL. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxy anisole and butylated hydroxy toluene. *J Am Oil Chem Soc* 52(2):59-63
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of Chemosensitivity Testing. *Cancer Res* 47:936-942
- Cho EJ, Yang MO, Hwang CH, Kim WJ, Kim MJ, Lee MK. 2006. Quality characteristics of *Sulfidduk* added with *Rubus coreanum* Miquel during storage. *J East Asian Soc Dietary Life* 16(4):458-467
- Choi OK, Kim YS, Cho GS, Sung CK. 2002. Screening for antimicrobial activity from Korean Plants. *Korean J Food & Nutr* 15(4):300-306
- Doll R, Peto R. 1981. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 66(6):1191-1308
- Hwang Bo HS, Ham SS. 1999. Antimutagenic and cytotoxic effects of aster acaber root ethanol extract. *Korean J Food Sci Technol* 31(4):1065-1070
- Ito N, Fukushima S, Hasegawa A, Shibata M, Ogiso T. 1983. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. *J. Cancer Inst* 70(22):343-347
- Iqbal S, Bhanger MI and Anwar F. 2005. Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan. *Food Chem.* 93(2):265-272
- Kim DH, Park JH, Kim JH, Kim CH, You JH, Kwon MC, Lee HY. 2005. Enhancement of immune activities of *Ephedrae herba* and *Rubi Fructus* at low temperature extraction. *Korean J Med Crop Sci* 13(3):81-86
- Kim JH, Kim CH, Kim HS, Kwon MC, Song YK, Seong NS, Lee SE, Yi JS, Kwon OW, Lee HY. 2006. Effect of aqueous extracts from *Rubus coreanus* Miquel and *Angelica gigas* Nakai on Anti-tumor and Anti-stress activities in mice. *Korean J Med Crop Sci* 14(4):206-211
- Kim KH, Lee YA, Kim JS, Lee DI, Choi YW. 2000. Antioxidative activity of tannins from *Rubus coreanum*. *Yakhak Hoeji* 44(4):354-357
- Kim MJ, Kim JS, Kang WH, Jeong DM. 2002. Effect on antimutagenic and cancer cell growth inhibition of *Ixeris dentata* nakai. *Korean J Medicinal Crop Sci* 10(2):139-143
- Kim MS, Pang GC, Lee MW. 1997. Flavonoids from the leaves of *Rubus coreanum*. *Yakhak Hoeji* 41(1):1-6
- Kim YH, Kang SS. 1993. Triterpenoids from *Rubi Fructus* (*Bog-bunja*). *Arch Pharm Res* 16:109-113
- Kinae N, Masuda S. 2002. Studies on antimutagens (A review). *Environ Mutagen Res* 24(3): 129-144
- Lee KI, Park KY, Rhee SH. 1992. Antimutagenic effect of green-yellow vegetables toward aflatoxin B1 and 4-nitroquinoline-1-oxide. *J Korean Soc Food Nutr* 21(1):143-148
- Lee SE, Seong NS, Park CG, Seong JS. 2002. Screening for antioxidative activity of priental medicinal plant materials. *Korean J Medicinal Crop Sci* 10(3):171-176
- Lee MK, Lee HS, Choi GP, Oh DH, Kim JD, Yu CY, Lee HY. 2003. Screening of biological activities of the extracts from *Rubus coreanus* Miq. *Korean J Medicinal Crop Sci* 11(1):5-12
- Lee NJ, Lee KH, Lee DU, Park SS, Han YH, Ryu SY. 2001. Antimutagenic activity and cytotoxicity of the whole plant of *Rumex acetosa*. *Korean J Pharmacogn* 32(4):338-343
- Maron DM, Ames BN. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mut Res* 113:173-215
- Moon GS. 1991. Constituents and uses of medicinal herbs. *Ilweolseogak*. Seoul. pp. 310-311
- Nam SH, Jung JE, Kang MY. 1999. Screening of the mutagenicity and antimutagenicity of the hot water extracts from medicinal plants. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 42(4):344-350
- Nohmi T. 2002. Translesion DNA polymerases from microorganisms. *Environ Mutagen Res* 24(3):153-159
- Oh SW, Lee YC, Hong HD. 2002. Effects on the shelf-life Tofu with ethanol extracts of *Rubus coreanus* miquel, *Terminalia chebula* Retz and *Rhus javanica*. *Korean J Food Sci Technol* 34(4):746-749
- Park JG, Hyun JW, Lim KH and Shin JE. 1993. Antineoplastic effect of extracts from traditional medicinal plants. *Korean J Pharmacogn.* 24(3):223-230
- Park JH, Lee HS, Mun HC, Kim DH, Seong NS, Jung HG, Bang JK, Lee HY. 2004. Improvement of anticancer activation of ultrasonicated extracts from *acanthopanax senticosus* Harms, *Ephedra sinica* Srapf, *Rubus coreanus* Miq. and *Artemisia capillaris* Thunb. *Korean J Medicinal Crop Sci* 12(4):273-278
- Park JH, Oh SM, Lim SS, Lee YS, Shin HK, Oh YS, Choe NH, Park JHY, Kim JK. 2006. Induction of heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effects of the ethanol extract of *Rubus coreanus* in murine macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 351(1):146-152
- Park YS. 2002. Antioxidative activities and contents of polyphenolic compound of medicinal herb extracts. *J Fast Asian Soc Dietary Life* 12(1):23-31
- Pauwels B, Pooter CMJ, Lambrechts HAJ, Lardon F. 2003. Comparison of the sulforhodamine B assay and the clonogenic assay for in vitro chemoradiation studies. *Cancer Chemother Pharmacol* 51:221-226
- Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S,

Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. 1998. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 48:4827-4833

Shin SM. 2008. Cytotoxic effects of korean black raspberry wine on various human cancer cells. Master thesis. Dogduk University. pp 2-31

Song GS, Ahn BY, Lee KS, Maeng IK, Choi DS. 1997. Effect of hot water extracts from medical plants on the mutagenicity of indirect mutagens. *Korean J Food Sci Technol* 29(6):1288-1294

2009년 5월 11일 접수; 2009년 6월 17일 심사(수정); 2009년 6월 17일 채택