

더덕 추출물의 항돌연변이 및 항종양 효과

김수현¹ · 최현진¹ · 정미자² · 최승필³ · 함승시^{1*}

¹강원대학교 생명공학부

²강원대학교 BK21 사업단(뉴트라슈티컬 바이오)

³연변대학농학원 식품과학부

Antimutagenic and Antitumor Effects of *Codonopsis lanceolata* Extracts

Soo-Hyun Kim¹, Hyun-Jin Choi¹, Mi Ja Chung², Cheng-Bi Cui³, 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

³Dept. of Food Science and Engineering, Agricultural College of Yanbian University, Longjing, People's Republic of China

Abstract

This study was carried out to investigate the mutagenic, antimutagenic, cytotoxicity and antitumor effect of *Codonopsis lanceolata* (CL). CL was extracted with 70% ethanol and then further fractionated to hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol and water. Antimutagenic, cytotoxicity and antitumor effects of CL extracts were measured by using Ames test, SRB method, and the tumor growth inhibition test. CL 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 CL (200 µg/plate) showed approximately 72.1% inhibitory effect on the mutagenesis induced by 4NQO against TA98 strain, whereas 69.6% and 67.0% inhibitions were observed on the mutagenesis induced by MNNG and 4NQO against TA100 strain. In anticancer effects, the cytotoxicity of CL extract and its fractions against cancer cell lines including human cervical adenocarcinoma (HeLa), human hepatocellular carcinoma (HepG2), human breast adenocarcinoma (MCF-7), human lung carcinoma (A549) and transformed primary human embryo kidney (293) were investigated. The treatment of 1 mg/mL CL ethyl acetate fraction had the highest cytotoxicity of 74.5%, 70.7% and 80.3% against HeLa, MCF-7 and A549 cells, respectively. In contrast, the extract and its fractions showed only 2~31% cytotoxicity for a normal human kidney cell line (293). *In vivo* anticancer effect of CL extract was tested using Balb/c mice transplanted sarcoma-180 cells. CL ethyl acetate fraction showed the highest inhibition rate of 56.4% at the 50 mg/kg concentration.

Key words: *Codonopsis lanceolata*, Ames test, antimutagenicity, antitumor, cytotoxicity

서 론

오래전부터 수많은 우수한 화학요법 항암제 및 항암요법이 개발되어 암의 치료율이 많이 향상되었지만 암세포의 제거에만 초점을 맞춘 기존 암치료법은 정상세포에도 작용하기 때문에 각종 부작용을 나타내고 있어 큰 문제로 대두되고 있다. 그러나 Kwak 등(1)은 홍삼 산성 다당체와 항암제의 병용 투여 시 종양에 대해서 저용량의 항암제 사용으로 고용량의 항암제 사용에서와 유사한 항암효과를 나타낼 수 있어서 항암효과를 극대화시킬 수 있을 뿐만 아니라 항암제 사용에 의한 면역 독성과 같은 부작용을 경감시킬 수 있는 항암치료 보조제로서의 사용 가능성을 제시한 바 있다. 이와

같이 화학요법 부작용에 대한 대처방안으로 수년전부터 자연식품 중에서 기능성 물질을 섭취하려는 요구의 증가와 함께 질병의 치료 및 예방 효과가 있는 천연물질들이 주목받고 있다. 특히 전통약용식물을 비롯한 각종 천연물에서 변이원성을 억제 시키는 돌연변이 억제물질의 존재가 밝혀지면서 천연물에 존재하는 생리활성 물질의 검색에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다(2-4).

더덕(*Codonopsis lanceolata*)은 한국, 중국 및 일본의 산간 지방에서 야생하는 다년생 초본으로 도라지와 함께 식용으로 널리 이용되고 있는 산채식품이다. 더덕은 예로부터 독특한 맛과 향으로 인해 여러 가지 조리 방법으로 조리되고 있다. 또한 한방에서는 폐 기운을 돌워주고 가래를 없애주는

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

약제로 사용되어 강장, 해열, 거담, 해독 및 배농 등의 질병치료의 목적으로 사용되고 있다(5).

더덕의 생리활성 효능에 관한 연구로는 성분분석(6), 휘발성 향기 성분 관련 연구(7), 항산화 효과(8-10), 사염화탄소를 투여한 흰쥐의 항산화계 효소활성에 미치는 영향(11), 고지방식이를 급여한 흰쥐의 체내 지질 수준에 미치는 영향(12-15), 면역 활성에 미치는 영향(16-19), 세포독성(20) 그리고 더덕과 일부 한약재 열수추출물의 혼합 비율에 따른 생리활성에 관한 연구 등(21,22)이 주로 보고되어 있다. 그러나 더덕 추출물 및 분획물의 항돌연변이원성 및 항암효과에 미치는 영향 등에 관한 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 더덕의 다양한 생리활성을 검토하기 위한 계획의 일환으로 먼저 돌연변이원성 및 항돌연변이원성을 규명하고 *in vitro* 및 *in vivo*에서의 항암효과를 검색함으로써 기능성식품 개발의 가능성을 살펴보는 데 그 목적이 있다.

재료 및 방법

시료의 추출 및 분획

본 실험에 사용한 더덕(*Codonopsis lanceolata*)은 2007년 구룡제약(주)(Cheolwon, Korea)으로부터 분말형태로 제공받아 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 핵산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 층의 순서로 다섯 가지 분획물을 제조하였다. 분리된 각각의 용매 추출물은 감압 농축하여 용매를 제거한 후 동결 건조하여 실험에 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 HEPES buffer, fetal bovine serum(FBS), trypsin-EDTA는 Hyclone사(USA)로부터 구입하였다. 그 외 추출용매인 ethanol, hexane, ethyl acetate 및 butanol 등의 유기 용매는 특급시약을 사용하였다. 실험에 사용한 암세포주인 인간 자궁경부암세포 HeLa(Human cervical adenocarcinoma, KCLB No. 1002), 인간 간암세포 HepG2(Hepatocellular carcinoma, KCLB No. 88065), 인간 유방암세포 MCF-7(Human Breast adenocarcinoma, KCLB No. 30022), 인간 폐암세포 A549(Lung carcinoma, Human, KCLB No. 10185), 인간 신장정상세포인 293(Transformed primary human embryonal

kidney, KCLB No. 21573) 그리고 mouse sarcoma cell line(sarcoma-180)은 Korea Cell Line Bank(KCLB)로부터 구입하여 사용하였다. HeLa, HepG2, MCF-7 및 293 세포주는 DMEM 배지를 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 µL씩 가하고 여기에 전 배양시킨 균액 100 µL를 가한 다음 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 전체량이 700 µL가 되도록 하였다. 이것을 37°C에서 30분간 preincubation한 다음 histidine/biotin이 첨가된 top agar를 2 mL씩 가하여 잘 혼합한 후에 미리 조제해 놓은 minimal glucose agar plate상에 도말하고 평판 고화시켜 37°C에서 48시간 배양하여 생긴 복귀돌연변이(His⁺ revertants colony) 수를 측정하여 돌연변이원성의 유무를 판정하였다.

항돌연변이원성 실험

건열 멸균시킨 glass cap tube에 추출물들을 각각의 농도별로 50 µL씩 첨가하고 변이원 물질을 각각 50 µL씩 첨가하였다. 여기에 전 배양시킨 *S. Typhimurium* 균액을 100 µL씩 주입한 후에 0.2 M sodium phosphate buffer를 가하여 최종 부피가 700 µL가 되도록 하였다. 이것을 37°C에서 20분간 진탕 배양한 다음 상기의 돌연변이원성 실험과 같은 방법으로 실험하여 생성된 복귀돌연변이 colony수를 측정하여 항돌연변이원성 유무를 판정하였다. 더덕 추출물과 변이원물질의 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(HepG2), 인간 유방암세포(MCF-7), 인간 폐암세포(A549)와 인간 신장정상세포(293)를 함유하는 RPMI 1640 및 DMEM 배지를 5×10⁴ cells/mL 농도로 100 µL씩 각 well에 첨가하여 24시간 동안 배양(37°C, 5% CO₂ incubator)시킨 후 배지에 녹인 시료를 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 mg/mL 농도로 100 µL씩 첨가하여 48시간 동안 다시 배양하였다. 그 후 상등액을 aspirator로 조심스럽게 제거하고 냉장 보관한 10%(w/v) TCA를 100 µL씩 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 µL를 첨가해 30분 동안 염색시켰다. 결합되지 않은 SRB 염색액은 1%(v/v) acetic acid 용액으로 네 번 정도 헹구어, 다시 건조시킨 후 10 mM Tris buffer 100 µL로 염색제를 충분히 녹인 후 540 nm에서 Micro-Reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 흡광도를 측정하였으며, 실험은 3회 반복하여 평균값을 결과에 이용하였다.

실험동물

본 실험에 사용한 실험동물은 웅성 Balb/c 마우스로 체중이 25 g 전후의 것을 샘타코(주)(Osan, Korea)에서 분양받아 강원대학교 생명공학부 동물사육실에서 일주일간 적응시켜 사용하였으며, 각각의 실험군 당 6마리를 사용하였다. 동물 사육실 실험조건은 온도 21~26°C, 습도 45~55%로 유지시켰으며, 조명은 오전 9시에 자동 점등, 오후 9시에 자동 소등하여 12시간 간격으로 조명을 조절하였다. 사료는 삼양 유지사료(주)의 마우스용 배합사료(조단백질 22.1%, 조지방 3.5%, 조섬유 5.0%, 회분 8.0%, 칼슘 0.6%, 인 0.4%)를 사용하였고, 물은 증류수를 공급하였으며 사료와 물을 자유롭게 먹도록 하였다.

고형암 성장 억제실험

실험에 이용한 sarcoma-180 종양세포는 Balb/c 마우스의 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)과 함께 원심분리(1,200 rpm, 10 min)하여 종양세포를 분리하였다. 분리된 세포를 다시 PBS에 부유시켜 재차 원심분리 하여 상등액을 제거한 후 1.0×10⁶ cells/mL가 되도록 종양세포 부유액을 만들어 1 mL씩을 복강 주사하여 이식 보존하면서 실험에 사용하였다. 고형암 성장억제 실험은 각 군당 6마리의 마우스의 왼쪽 서혜부(left groin)에 sarcoma-180 종양세포 부유액 0.2 mL(6×10⁶ cells/mouse)씩을 피하 이식하고, 24시간 후부터 20일간 매일 1회씩 PBS에 녹인 시료 용액 200 µL를 복강으로 투여하였다. 종양세포 이식 26~30일째 되는 날 치사시켜 생성된 고형암을 적출하고 그 무게를 측정 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(Version 10.0, SPSS, Chicago, IL, USA) program을 이용하여 실험군 당 평균±표준편차로 표시하였고, 각 농도의 평균차의 통계적 유의성을 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test

에 의해 검정하였다.

결과 및 고찰

돌연변이원성 실험

S. Typhimurium TA98과 TA100을 이용한 Ames test를 행한 결과, Table 1에 나타낸 바와 같이 음성대조군의 복귀 돌연변이 집락 수는 TA98이 27±5, TA100은 138±8이었다. 에탄올 추출물을 50, 100, 150 그리고 200 µg/plate의 여러 농도를 첨가하여 시험한 결과 음성대조군에 비하여 농도 변화에 따른 집락수가 유의적 변화를 나타내지 않으므로 더덕의 에탄올 추출물은 돌연변이원성을 나타내지 않은 것으로 확인되었다.

항돌연변이원성 실험

항돌연변이원성을 검토하기 위하여 Ames test에서 양성 반응을 나타내며, 직접변이원 물질로 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 분해, 염색체 이상, 돌연변이 등을 야기하는 것으로 알려져 있다(23).

S. Typhimurium TA98은 histidinol dehydrogenase를 coding하는 *hisD* gene에서 돌연변이를 일으킨 것으로 frame shift mutation이 일어난 부근에 반복되는 8개의 -GC-잔기들을 가진다. 또한 frame shift mutagen들은 DNA의 'hot spots'나 반복되는 염기서열에서 일어나는 shifted pairing을 안정화하므로 이들 돌연변이들에 의한 TA98에서의 frame shift mutation을 histidine sequence에 대한 옳은 reading frame으로 복귀시킬 수 있다. 따라서 *S. Typhimurium* TA98은 frame shift mutagen을 검출하기 위해 쓰인다. *S. Typhimurium* TA100은 histidine 생합성의 첫 번째 효소를 coding하는 *hisG* gene에 돌연변이를 일으켜 wild type의 leucine이 proline으로 치환되어 있다. 그러므로 *S. Typhimurium* TA100은 주로 이들 G-C pair들의 하나에

Table 1. Mutagenicity of ethanol extract from *Codonopsis lanceolata* 70% ethanol extract in *Salmonella* Typhimurium TA98 and TA100

Dose (µg/plate)	His ⁺ revertants/plate ¹⁾	
	TA98	TA100
Spontaneous	27±5 ^{NS2)}	138±8 ^{NS}
50	24±6	125±13
100	21±2	159±14
150	24±2	118±9
200	20±1	124±6

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

²⁾NS: not significant.

서 base-pair substitution을 일으키는 돌연변이 물질을 검출하기 위해 쓰인다(25).

더덕 에탄올 추출물과 그 분획물의 항돌연변이원성을 검토한 결과는 Fig. 1, 2에 나타내었다. Ames test에서 양성 반응을 나타내며 강력한 발암물질인 직접변이원 물질로 알려진 MNNG(0.4 $\mu\text{g}/\text{plate}$)의 경우 *S. Typhimurium* TA100 균주에서 농도 의존적으로 변이원성 억제효과를 나타내었으며, 특히 시료 농도 200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 에서 에틸 아세테이트 분획물 및 에탄올 추출물에서 각각 69.6% 및 64.8%로 다른 분획물들에 비하여 유의적으로 높은 항돌연변이원성을 나타내었다. 또한 같은 농도에서 부탄올, 물층, 클로로포름 및 핵산 분획물에서 각각 52.1%, 46.5%, 43.9% 및 43.4% 순으로 돌연변이를 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 1).

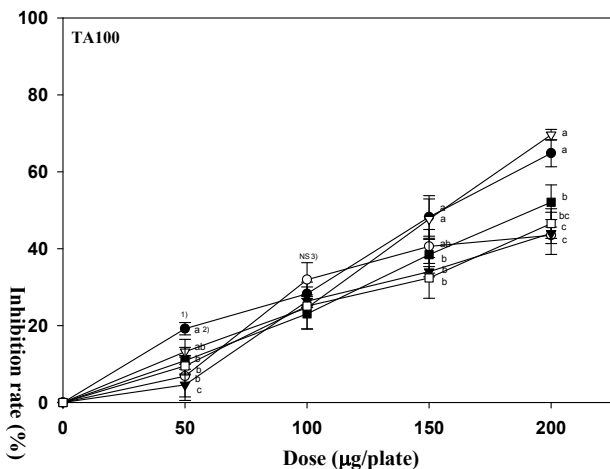


Fig. 1. The antimutagenic effects of 70% ethanol extract and its fractions from *Codonopsis lanceolata* against MNNG (0.4 $\mu\text{g}/\text{plate}$) in *Salmonella Typhimurium* TA 100. —●— : ethanol extract, —○— : hexane fr., —▼— : chloroform fr., —△— : ethyl acetate fr., —■— : butanol fr., —□— : aqueous fr. ¹⁾Each value represents the mean \pm SD of three plates. ²⁾Values not sharing common superscript letter in column were significantly different at $p < 0.05$. ³⁾NS: not significant.

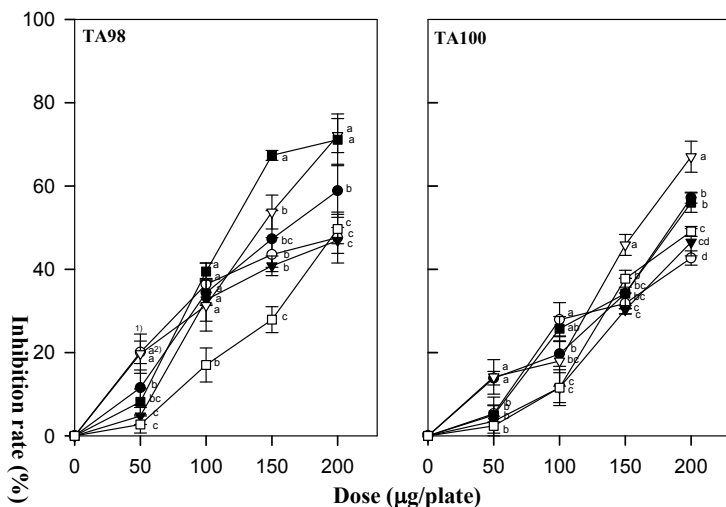


Fig. 2. The antimutagenic effects of 70% ethanol extract and its fractions from *Codonopsis lanceolata* against 4NQO (0.15 $\mu\text{g}/\text{plate}$) in *Salmonella Typhimurium* TA 98 and TA 100. —●— : ethanol extract, —○— : hexane fr., —▼— : chloroform fr., —△— : ethyl acetate fr., —■— : butanol fr., —□— : aqueous fr. ¹⁾Each value represents the mean \pm SD of three plates. ²⁾Values not sharing common superscript letter in column were significantly different at $p < 0.05$.

한편 다른 직접변이원인 4NQO(0.15 $\mu\text{g}/\text{plate}$)에 대한 억제 효과를 측정된 결과 농도 의존적으로 억제활성을 나타내었으며 *S. Typhimurium* TA98의 경우 시료 농도 200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 에서 에틸 아세테이트 및 부탄올 분획물에서 72.1% 및 71.1%로 다른 분획물에 비하여 유의적으로 높은 억제효과를 보였으며 *S. Typhimurium* TA100 균주의 경우 같은 농도에서 에틸 아세테이트 분획물, 에탄올 추출물 및 부탄올 분획물은 67.0%, 57.2% 및 56%의 억제효과를 나타내었다(Fig. 2).

Shon 등(26)은 장생도라지 메탄올 추출물의 분획물 중 에틸아세테이트 층과 부탄올 층이 효소활성화 단계를 필요로 하지 않는 MNNG 사용 시 *S. Typhimurium* TA100 균주에서 가장 높은 저해율을 나타내었다고 보고하였으며, Ham 등(27)도 MNNG와 4NQO 사용 시 *S. Typhimurium* TA100 균주에서 에틸아세테이트 분획물이 비교적 높은 항돌연변이 효과를 나타내었다고 보고하였고 이는 본 연구결과와 유사한 실험 결과였다. 이러한 결과로부터 MNNG 및 4NQO에 대해 가장 강력한 항돌연변이원성을 나타내었던 더덕 에틸 아세테이트 분획물은 frame shift mutation을 histidine sequence에 대한 옳은 reading frame으로 복귀시키고 base-pair substitution을 일으키는 돌연변이 물질을 억제함으로써 항돌연변이원성을 나타내는 것으로 추측된다. 그러나 S-9 mix를 필요로 하는 간접변이원 물질에서도 더덕 추출물 및 분획물에 대한 항돌연변이 효과를 나타내는지에 대한 연구가 수행되어야 할 것이다.

인간 암세포 성장 억제효과 측정

본 실험에서는 인간 자궁암세포(HeLa), 인간 간암세포(HepG2), 인간 유방암세포(MCF-7), 인간 폐암세포(A549)와 인간의 정상신장세포(293)를 사용하여 더덕 추출물 및 분획물에 대한 인간 암세포 성장 억제효과를 SRB assay 방법으로 조사하였다(Table 2). SRB assay는 미국 국립 암연

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

Dose (mg/mL)	Growth inhibition (%)					
	293	HeLa	HepG2	MCF-7	A549	
70% ethanol	0.25	6.4±2.1 ^{1)NS2)}	3.4±3.1 ^c	11.8±5.4 ^{NS}	1.8±2.4 ^c	12.5±4.4 ^{NS}
	0.50	10.1±1.1 ^{a3)}	17.1±2.1 ^c	19.8±4.3 ^c	13.3±4.6 ^c	22.2±4.1 ^b
	0.75	18.7±3.2 ^b	23.6±4.2 ^c	39.2±3.1 ^c	34.9±5.4 ^d	42.1±3.5 ^{bc}
	1.00	28.5±2.2 ^{NS}	59.1±5.2 ^c	62.2±6.5 ^b	66.5±2.4 ^{ab}	61.7±5.2 ^c
Hexane	0.25	2.7±1.1	6.5±2.1 ^b	4.5±4.1	13.9±5.1 ^{ab}	8.8±2.0
	0.50	11.4±2.2 ^a	37.9±1.1 ^a	27.8±2.0 ^{ab}	33.7±5.0 ^{ab}	39.8±1.8 ^a
	0.75	26.8±0.4 ^a	40.5±1.4 ^a	54.7±4.1 ^a	60.6±1.9 ^a	50.4±1.4 ^a
	1.00	30.1±2.1	70.8±1.4 ^{ab}	63.8±1.4 ^{ab}	62.5±3.4 ^{ab}	70.5±5.19 ^b
Chloroform	0.25	1.9±0.9	12.4±3.0 ^{ab}	12.6±4.6	7.0±5.6 ^b	10.5±6.2
	0.50	3.9±2.5 ^b	15.6±3.1 ^d	35.3±4.2 ^a	25.1±4.3 ^b	24.3±4.1 ^b
	0.75	10.2±2.1 ^c	41.2±6.2 ^a	49.1±6.2 ^{ab}	46.3±2.9 ^{bc}	36.6±4.2 ^b
	1.00	27.4±2.4	47.3±4.4 ^d	59.6±2.8 ^b	57.3±3.4 ^c	51.6±5.7 ^d
Ethyl acetate	0.25	4.9±1.0	6.5±4.5 ^b	9.5±3.6	4.5±1.2 ^c	7.2±3.1
	0.50	7.1±3.2 ^{ab}	22.5±2.1 ^{bc}	29.1±2.7 ^{ab}	20.5±4.2 ^{bc}	34.1±2.4 ^a
	0.75	24.4±2.1 ^{ab}	42.5±5.6 ^a	40.1±3.3 ^c	43.0±4.9 ^c	49.9±3.0 ^a
	1.00	24.8±3.0	74.5±2.6 ^a	66.3±5.9 ^{ab}	70.7±3.3 ^a	80.3±4.1 ^a
Butanol	0.25	3.1±2.0	4.1±6.1 ^b	12.7±3.9	7.9±3.3 ^{ab}	4.6±2.0
	0.50	12.8±3.1 ^a	28.2±2.3 ^b	26.8±5.8 ^b	25.2±6.6 ^b	23.8±2.9 ^b
	0.75	15.4±3.6 ^{bc}	32.4±2.1 ^b	45.1±3.5 ^b	52.9±1.0 ^b	36.5±4.3 ^b
	1.00	30.9±2.2	64.6±5.2 ^b	70.3±4.2 ^a	71.6±4.1 ^a	68.4±3.1 ^{bc}
Aqueous	0.25	5.9±4.1	17.3±3.4 ^a	3.7±5.2	15.4±2.9 ^a	14.7±4.5
	0.50	9.9±1.6 ^a	33.7±6.5 ^{ab}	20.9±4.5 ^c	34.8±4.2 ^a	19.9±4.1 ^b
	0.75	13.7±5.2 ^{bc}	44.0±2.1 ^a	39.2±6.7 ^c	51.5±3.2 ^b	36.1±5.9 ^b
	1.00	26.2±1.3	57.3±2.7 ^c	48.4±1.9 ^c	63.8±2.6 ^b	56.3±1.4 ^d

¹⁾Values are the mean±SD (n=3).

²⁾NS: not significant.

³⁾Means with the different letters in the same concentration of a column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

구소에서 많이 사용되는 방법으로써 특히 항암제를 대량 및 신속하게 검토했을 수 있는 장점이 있어 단시간에 1,000개 이상의 항암제를 가지고 60종류의 인체 암세포에 대한 효과를 알아볼 수 있으며 주위 환경 변화에 덜 민감하고 중간 대사물에 영향을 받지 않는 안정한 end point를 제공해 주는 것으로 알려져 있다(28).

인간 자궁암 세포 HeLa에 대한 더덕 추출물 및 분획물의 억제 효과를 검토한 결과 에틸아세테이트 분획물 0.25, 0.5, 0.75 및 1 mg/mL 첨가 시 6.5%, 22.5%, 42.5% 및 74.5%로 농도 의존적인 암세포 성장 억제율을 나타내었으며 다른 분획물에 비하여 시료 농도 1 mg/mL에서 가장 높은 암세포 성장 억제율을 나타내었으며 그 다음으로 핵산 및 부탄올 분획물에서 각각 70.8% 및 64.6%의 암세포 성장 억제율을 나타내었다. 또한 인간 간암 세포인 HepG2에서 시료농도 1 mg/mL으로 처리하였을 때 부탄올, 에틸아세테이트, 핵산, 에탄올 추출물, 클로로포름 및 물 층은 각각 70.3%, 66.3%, 63.8%, 62.2%, 59.6% 및 48.4%의 순으로 암세포 성장 억제 효과를 나타내었다. 인간 유방암 세포인 MCF-7에서는 시료 농도 1 mg/mL에서 부탄올 및 에틸아세테이트 분획물이 각각 71.6% 및 70.7%의 억제 효과를 나타내었으며 모든 분획물은 유방암세포에 대하여 55% 이상의 억제율을 나타내었

다. 인간 폐암세포인 A549에서 에틸 아세테이트 분획물을 최고 농도인 1 mg/mL로 처리하였을 때 80.3%의 높은 암세포 성장 억제 효과를 나타내었고 다른 암세포에 비해서 가장 높은 억제 효과를 나타내었다. 이상의 결과로부터 에틸아세테이트 분획물은 다른 분획물에 비해 자궁암, 유방암 및 폐암에 효과가 있음을 간접적으로 시사해 주고 있다. 그 반면 인간 정상세포 293에 대한 저해 효과는 1 mg/mL의 농도에서 모두 30% 이하의 낮은 억제 효과를 보였다. 이는 암세포에 대한 높은 억제 효과에 비해 정상 세포에 대해서는 비교적 낮은 독성 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

암에 있어서 유발 초기단계에서는 돌연변이가 매우 중요한 작용을 하며 대부분의 발암물질이 돌연변이원이라는 공통점은 항돌연변이원성을 나타내는 물질이 항암활성을 가질 수 있다는 것을 의미하며, Ham 등(29)은 높은 항돌연변이원성을 나타내었던 산마늘 에탄올 추출물은 높은 항암효과를 나타낸다고 보고하였고 Cui 등(30)은 메밀씨의 에틸아세테이트 및 부탄올 분획물은 탁월한 항돌연변이원성 및 암세포 성장 억제 효과를 나타낸다고 하였다. 그리고 Lim(31)은 대두 분획물 중 특히 에틸아세테이트 분획물에 의한 항돌연변이 및 항암활성 효과가 가장 높았다고 보고하였다. 따라서 본 실험에 사용된 더덕의 추출물과 분획물 중에서 가장

높은 항돌연변이원성 및 항암활성을 나타낸 에틸아세테이트 분획물은 돌연변이를 억제하기 때문에 발암의 억제에 이어서는 것이라고 추정할 수 있다. 그러나 앞으로 진행되어야 할 연구는 에틸아세테이트 분획물 안에 어떤 성분이 함유되어 있고 또한 얼마나 함유되어 있는지에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 사료된다.

Sarcoma-180 세포를 이용한 *in vivo*계 항암실험

Sarcoma-180 종양세포를 마우스에 이식시킨 후 더덕의 추출물 및 분획물을 투여하여 사육한 마우스에서 종양의 무게를 측정하여 대조군과 비교한 결과는 Table 3과 같다. 더덕을 첨가하지 않은 군의 종양 무게는 3.9 ± 0.5 g이었으나 더덕 에탄올 및 분획물을 투여한 군에서는 종양의 크기가 줄어든 것을 알 수 있었다. 즉, 더덕 에틸아세테이트 분획물의 농도를 25 mg/kg으로 처리하였을 경우 고형암의 무게는 2.1 ± 0.1 g으로 대조군에 비하여 46%의 유의적인 감소를 나타내었고, 더덕 추출물과 이들 분획물 중 가장 높은 고형암 억제 효과를 나타내었다. 또한 50 mg/kg의 농도에서 에틸아세테이트, 클로로포름 및 부탄올 분획물에서의 고형암 무게는 각각 1.7 ± 0.3 g, 1.9 ± 0.9 g 및 2.2 ± 0.9 g으로 대조군에 비하여 각각 56%, 50% 및 42%의 고형암 성장 억제 효과를 나타내었으며 특히 에틸아세테이트 분획물에서 가장 높은 고형암 성장 억제 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다.

Ham (32)등은 *in vivo* 상에서 sarcoma-180 세포에 대한 항종양효과를 검색한 결과 잔대 에틸아세테이트 분획물 50

mg/kg 농도에서 37.2%의 고형암 성장 억제율을 나타낸 반면 본 연구에 사용된 더덕 에틸아세테이트 분획물은 56.4%로 잔대보다 높은 억제율을 나타내었다.

따라서 본 연구결과 더덕 추출물과 분획물은 항돌연변이원성, 암세포주에 대한 성장 억제효과 및 항종양효과를 확인할 수 있었으며, 특히 더덕 에틸아세테이트 분획물은 다른 분획물에 비해 가장 강한 항돌연변이원성, *in vitro* 및 *in vivo*에서 항암활성을 나타내어 질병 예방의 소재로 활용 가능성을 확인하였을 뿐만 아니라 기능성식품 개발의 가능성을 확인하였다. 그러나 더덕의 어떤 성분이 항돌연변이원성, *in vitro* 및 *in vivo*에서 암세포 성장 억제에 영향을 미치는가에 대한 연구가 계속 필요하며 또한 더덕에 의한 직접적인 종양 생성 억제 또는 TNF(tumor necrosis factor)와 같은 물질을 유도하여 면역계의 매커니즘을 통해 암세포 성장이 억제되었는지의 확인 실험이 보충되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 더덕의 돌연변이원성, 항돌연변이원성, 세포독성, 항종양 효과를 조사하기 위해서 수행되었다. 더덕을 70% 에탄올로 추출하여 추출용매에 따라 hexan, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올과 물 층으로 분획하였다. Ames test assay, SRB assay와 sarcoma-180 세포를 이용한 항종양 실험을 실시하였다. Ames test 결과, 더덕 에탄올 추출물은 돌연변이원성을 나타내지 않았다. 더덕 에틸아세테이트 분획물은(200 µg/plate) 4NQO에 대하여 *S. Typhimurium* TA98과 TA100에서 각각 72.1% 및 67.0%의 억제율을 나타내었으며, MNNG에 대한 *S. Typhimurium* TA100은 69.6%의 억제율을 나타내었다. 더덕 추출물 및 분획물의 암세포 성장 억제효과를 살펴보기 위해 인간 자궁경부암세포(HeLa), 인간 간암세포(HepG2), 인간 유방암세포(MCF-7), 인간 폐암세포(A549) 및 인간 신장정상세포(293)를 사용하였다. 더덕 에틸아세테이트 분획물을 1 mg/mL의 농도로 처리하였을 때 각각 74.5%(HeLa), 70.7%(MCF-7) 및 80.3%(A549)의 가장 높은 억제활성을 나타내었다. 반면에 인간 정상 신장세포(293)에서는 2~31%의 세포독성을 나타내었다. *In vivo*에서 더덕 추출물 및 분획물의 항암 효과를 검토하기 위하여 Balb/c 마우스에 sarcoma-180 종양세포로 고형암을 유발시켰다. 그 결과 더덕 에틸아세테이트 분획물의 최고농도 50 mg/kg에서 56.4%의 고형암 성장 억제 효과를 나타내었고, 이는 다른 추출물 및 분획물 중에서 가장 높은 억제율이었다.

문 헌

1. Kwak YS, Kim YS, Shin HJ, Song YB, Park JD. 2003. Anticancer activities by combined treatment of red ginseng acidic polysaccharide (RGAP) and anticancer agents. *J*

Table 3. Antitumor activities of 70% ethanol extract and its fractions from *Codonopsis lanceolata* (CL) in tumor bearing Balb/c mouse with Sarcoma-180 cell

Group	Dose mg/kg body weight	Tumor weight	Inhibition ratio (%)
Control	—	$3.9 \pm 0.5^{1)a2}$	—
Ethanol extract	25	2.6 ± 0.2^b	34.4 ± 5.9
Hexane fraction	25	2.9 ± 0.1^b	26.4 ± 3.2
Chloroform fraction	25	2.6 ± 0.2^b	32.8 ± 3.8
Ethyl acetate fraction	25	2.1 ± 0.1^c	46.1 ± 3.5
Butanol fraction	25	2.6 ± 0.1^b	34.1 ± 1.2
Aqueous fraction	25	2.9 ± 0.1^b	25.4 ± 2.7
Ethanol extract	50	2.1 ± 0.2^c	46.2 ± 5.1
Hexane fraction	50	2.5 ± 0.0^b	35.0 ± 1.1
Chloroform fraction	50	1.9 ± 0.9^c	50.5 ± 2.9
Ethyl acetate fraction	50	1.7 ± 0.3^d	56.4 ± 7.6
Butanol fraction	50	2.2 ± 0.9^b	42.8 ± 0.1
Aqueous fraction	50	2.6 ± 0.1^b	33.4 ± 2.5

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 CL 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.

- Ginseng Res* 27: 47-51.
2. Kim HS, Hong SB, Sung HJ, Moon GA, Yoon YS. 2003. Effect of deer blood on reduction of the side effects of chemotherapeutic drugs. *Kor J Pharmacogn* 34: 145-149.
 3. 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.
 4. Goto T, Kondo T, Tamura H, Kawahori K. 1983. Structure of platycodin, a diacylated anthocyanin isolated from the Chinese bell-flower *P. grandiflorum*. *Terahedron Lett* 24: 2181-2187.
 5. Lee YE, Hong SH. 2003. *Natural food material*. Kyomusa Publishers Inc., Seoul, Korea. p 150-151.
 6. Park SJ, Seong DH, Park DS, Kim SS, Gou JY, Ahn JH, Yoon WB, Lee YH. 2009. Chemical compositions of fermented *Codonopsis lanceolata*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 396-400.
 7. Oh HS, Kim JH, Choi MY. 2006. The volatile flavor components of fresh *Codonopsis lanceolata* cultivated on a wild hill. *Korean J Food Cookery Sci* 22: 774-782.
 8. Jin JH, Yoo JM, Kwak SS, Woo YM, Oh SM, Kim KW, Chung GY. 1996. The effect of cultivated environments on the antioxidant enzyme activities of *Codonopsis lanceolata*. *Korean J Plant Res* 9: 203-210.
 9. Maeng YS, Park HK. 1991. Antioxidant activity of ethanol extract from Dodok (*Codonopsis lanceolata*). *Korean J Food Sci Technol* 23: 311-316.
 10. Kim SH, Choi HJ, Oh HT, Chung MJ, Cui CB, Ham SS. 2008. Cytoprotective effect by antioxidant activity of *Codonopsis lanceolata* and *Platycodon grandiflorum* ethyl acetate fraction in human HepG2 cells. *Korean J Food Sci Technol* 40: 696-701.
 11. 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.
 12. Han EG, Sung IS, Moon HG, Cho SY. 1998. Effect of *Codonopsis lanceolata* water extract on the levels of lipid in rats fed high fat diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 940-944.
 13. Kim SY, Kim HS, Kim SH, Kim HS, Su IS, Chung SY. 1993. Effects of the feeding *Platycodon grandiflorum* and *Codonopsis lanceolata* on the fatty acid composition of serum and liver in rats. *J Korean Soc Food Nutr* 22: 524-530.
 14. Won HR, Oh HS. 2007. Antioxidative activity and lipid composition from different part and supplement of *Codonopsis lanceolata* in rat. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1128-1133.
 15. Han EG, Lee YG, Cho HG. 2004. Extracts of *Codonopsis lanceolata* decrease CCl₄-induced hepatotoxicity on high fat diet in rats. *J Exp Biomed Sci* 10: 447-452.
 16. Ryu HS, Kim KO, Kim HS. 2009. Effects of plant water extract *Codonopsis lanceolata* on mouse immune cell activation ex vivo. *Korean J Nutr* 42: 207-212.
 17. Suh JS. 1996. Effect of *Codonopsis lanceolata* radix water extract on immunocytes. *Korean J Food Nutr* 9: 379-284.
 18. Lee YJ, Kim JM, Jung YM. 1995. Effect of *Codonopsis pilosula* on the cellular immunity. *Kor J Vet Publ Hlth* 19: 273-279.
 19. Ryu HS. 2008. Effects of *Codonopsis lanceolata* extracts on mouse immune cell activation. *Korean J Food Nutr* 21: 263-268.
 20. Kim HH, Yukio O, Lee SR, Heu H. 1998. Morphological characteristics and cytotoxic screening test of *Codonopsis lanceolata* in Korea. *Korean J Plant Res* 11: 168-172.
 21. Oh HS, Kim JH. 2006. Characterization of physiological functionalities of *Codonopsis lanceolata*, *Cornus officinalis* S. et Z, and their mixtures. *J Exp Biomed Sci* 12: 393-398.
 22. Oh HS, Kim JH. 2007. Physiological functionalities of hot water extract of *Codonopsis lanceolata* and some medicinal materials, and their mixtures. *Korean J Community Living Science* 18: 407-415.
 23. Maron DM, Ames BN. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 113: 173-215.
 24. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paul KD, Monks A, Tiemey S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. 1988. 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: 4827-4836.
 25. Lee KI. 1992. Inhibitory effects of green-yellow vegetables on the mutagenicity induced by various mutagens and on the growth of human cancer cells. *PhD Dissertation*. Pusan National University, Chunchon. p 17-19.
 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. Ham YA, Choi HJ, Kim SH, Chung MJ, Ham SS. 2009. Antimutagenic and antitumor effects of *Adenophora triphylla* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 25-31.
 28. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82: 1107-1112.
 29. Ham SS, Cui CB, Choi HT, Lee DS. 2004. Antimutagenic and cytotoxic effects of *Allium victorialis* extracts. *Korean J Food Preservation* 11: 221-226.
 30. Cui CB, Lee EY, Ham SS, Lee DS. 2008. Antimutagenic and cytotoxic effects of an ethanol extract of buckwheat sprout. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 51: 212-218.
 31. Lim SY. 2007. Antimutagenicity and anticancer activity of soybean fractions extracted by solvents. *J Life Sci* 17: 1368-1373.
 32. Ham YA, Choi HJ, Kim SH, Chung MJ, Ham SS. 2009. Antimutagenic and antitumor effects of *Adenophora triphylla* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 25-31.

(2009년 7월 2일 접수; 2009년 9월 15일 채택)