

## 간암 및 자궁암 세포주 증식에 미치는 오매 추출물의 영향

정 승 은 · 배 지 현<sup>§</sup>

계명대학교 식품영양학과

### The Effect of *Prunus Mume* Extracts on the Growth of HepG2 and HeLa Cell Lines

Jung, Seung-Eun · Bae, Ji-Hyun<sup>§</sup>

Department of Food Science and Nutrition, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

#### ABSTRACT

This study was undertaken to investigate the inhibitory effect of *Prunus mume* extracts on the growth of Hep G2 and HeLa cells. *Prunus mume* was extracted using the following solvents: hexane, chloroform, ethylacetate, methanol, and hot water. The effect on the growth of each cancer cell line was examined by MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay, cytotoxicity testing, and microscopic observation. The ethylacetate extracts of *Prunus mume* at the concentration of 250 µg/ml exhibited the greatest inhibitory effect on the growth of Hep G2 in the MTT assay. In cytotoxicity testing, the treatment of the Hep G2 cells with ethylacetate extracts (1000 µg/ml for 72 hrs) destroyed 75% of the cells, and morphological changes were also observed. Furthermore, the hexane extracts of *Prunus mume* at the concentration of 250 µg/ml exhibited the greatest inhibitory effect on the growth of HeLa cells in the MTT assay. The treatment of the HeLa cells with the hexane extracts (1000 µg/ml for 72 hrs) resulted in the destruction of 68% of the cells. Fibroblasts were not affected by either ethylacetate or hexane extracts of *Prunus mume*. (*Korean J Nutrition* 35(4) : 439~445, 2002)

KEY WORDS: *Prunus mume*, MTT assay, cytotoxicity, Hep G2, HeLa.

## 서 론

현대 의학의 발달에도 불구하고 암은 여전히 치료하기 힘든 질병 중 하나이며 우리 나라에서도 암의 발생은 매년 증가 추세에 있다. 한국인의 암으로 인한 사망률은 전체 사망 비율의 1위를 차지하고 있으며 인구 10만명당 위암 발생과 간암 발생이 가장 높은 비중을 차지하고 있다.<sup>1)</sup> 또한 폐암, 자궁암, 대장암, 유방암 및 식도암 등의 발생도 보고되고 있으며 이러한 암의 원인으로는 흡연, 식이, 대기오염, 자외선이나 방사선, 바이러스 등의 환경적 요인이 80~90%를 차지하고 있으며 그밖에 유전과 성별에 의한 것이 있다.<sup>2)</sup> 환경적 요인 중에서 식이는 30~60%로 가장 큰 비중을 차지하는데<sup>3,4)</sup> 이런 식이 성분 중에는 암을 발생시키는 발암물질도 존재하지만 암의 발생을 억제하거나 지연시키는 성분들도 포함되어 있다.<sup>5,6)</sup> 현재 암치료를 사용되고 있는 방법으로는 화학요법, 방사선 요법, 외과적 수술 등을 들 수 있으나 이러한 치료법은 그 한계와 부작용으로 인해 많은 문제점을 가지

고 있어 최근에는 이러한 점을 보완하기 위해 천연물로부터 분리한 물질을 대상으로 항암 및 생리활성 효과 등을 검색하고, 이들을 암 치료의 보조 요법이나 암 예방을 위한 기능성 물질로 이용하고자 하는 노력이 많이 시도되고 있다.<sup>7,8)</sup>

한편 매실은 알칼리성 식품으로 예로부터 매실김치, 술, 엑기스, 잼, 차 등의 각종 식품으로 개발되어 왔으며 말린 매실은 오매라 하여 한방에서는 지혈, 지사, 해독 및 구충 등의 한약재로 이용하고 있다.<sup>9)</sup> 현재까지 매실의 효능을 과학적으로 연구한 결과들을 살펴보면 혈중 유산농도와 혈청지질 성분에 미치는 영향,<sup>10)</sup> 흰쥐의 간장장애와 당뇨병에 미치는 영향<sup>11,12)</sup> 및 식중독 유발세균의 증식에 미치는 영향<sup>13)</sup> 등이 있으며 오매의 항암 효과에 관한 연구 결과는 거의 없는 실정이다. 본 연구에서는 오매 추출물이 간암 (Hep G2) 및 자궁암 (HeLa) 세포주 증식에 미치는 영향을 MTT assay, cytotoxicity test, 현미경 관찰 등을 통해 조사해 보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료 준비

매실을 훈연처리로 말린 오매를 대구광역시 소재 한약방

접수일: 2002년 1월 21일

채택일: 2002년 4월 9일

<sup>§</sup>To whom correspondence should be addressed.

에서 구입하여 hexane, chloroform, ethylacetate, methanol의 4가지 유기용매와 열수를 이용하여 순차적으로 분획 추출하였다. 추출된 액은 rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan)에서 감압 농축시킨 후 DMSO (Dimethyl sulfoxide)에 농도별로 녹이고 0.22 µm sterile syringe filter (Corning Co., N.Y. USA)에 여과, 살균시켜 냉동 보관하면서 사용하였다.

## 2. 암세포주 배양

간암 세포주 (Hep G2), 자궁암 세포주 (HeLa) 및 정상 세포 (fibroblast)는 서울대학교 의과대학 소재 한국 세포주 은행에서 분양받아 -196°C 액체 질소탱크에 보관하면서 사용하였다. 자궁암 세포주인 HeLa와 정상 세포주인 fibroblast는 1% penicillin-streptomycin과 10% FBS (Fetal Bovine Serum)가 함유된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 10 배지에 배양하였고, 간암 세포주인 Hep G2는 RPMI 1640 배지에 1%의 penicillin-streptomycin과 10% FBS (Fetal Bovine Serum)를 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기 (Sanyo MCO-175, Japan)에서 배양하였다. 배양된 각각의 세포는 일주일에 2~3회 배지를 교환하면서 flask 바닥에 세포가 90%이상 자라면 PBS (Phosphate Buffered Saline)로 세척한 후 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 flask 바닥에서 떼낸 후 계대 배양하였다.<sup>14)</sup>

## 3. MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay

Trypsin-EDTA 처리로 수거한 cell을 210<sup>4</sup> cells/ml 농도로 96 well plate에 100 µl씩 분주하고 이것을 4시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양시킨 후 오매 추출액을 0 µg/ml, 50 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml 및 1 mg/ml의 농도별로 첨가하였다. 이 상태에서 48시간 동안 배양시킨 후 MTT 시약을 각 well당 10 µl씩 첨가하고 4시간동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 방치시켰다. 형성된 보라색의 formazan 결정을 용해시키기 위해 SDS (Sodium dodecyl sulfate) 용액을 well당 100 µl씩 첨가하여 하룻밤 배양시킨 후 ELISA-reader (DENLEY, Japan)로 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.<sup>15)</sup>

## 4. Cytotoxicity test 및 현미경 관찰

Trypsin-EDTA 처리한 cell을 2 × 10<sup>4</sup> cells/ml 농도로 60 mm Petri dish (Corning Co., N.Y. USA)에 분주한 후 4시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 배양시키고 오매 추출물을 0, 250, 500 및 1000 µg/ml 농도로 각각 첨가하

여 24, 48 및 72시간 배양하면서 살아있는 세포수를 계수하였다. 배양된 세포를 50 µl를 취하여 동일한 양의 0.4% trypan blue dye와 잘 섞어 실온에 1분간 방치시킨 후 hematometer (0.0025 mm<sup>2</sup>, Neubauer Co., W. Germany)를 이용하여 염색되지 않은 세포, 즉 살아있는 세포의 수를 계수하였다.<sup>16)</sup> 또한 오매 추출물에 의한 암세포주의 크기와 형태 변화를 inverted microscope (Olympus CK2 PM-10AK3, Japan)으로 관찰하고 촬영하였다.<sup>17)</sup>

## 5. 통계처리 및 분석

3회 반복 실험결과 얻어진 자료들은 SAS program을 이용하여 ANOVA분석을 실시하고, Duncan's multiple range test를 이용하여 각 그룹 간 유의적 차이를 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 간암 세포주 증식에 미치는 오매 추출물의 영향

본 실험에서 사용한 오매의 hexane, chloroform, ethylacetate 및 methanol 추출물과 열수 추출물을 각각 0 µg/ml, 50 µg/ml, 250 µg/ml 및 500 µg/ml의 농도로 투여한 뒤 MTT assay를 실행한 결과 Table 1과 같은 결과를 얻을 수 있었다. 간암 세포주인 Hep G2에 대한 오매 추출물의 성장 저해율은 농도가 높을수록 크게 나타남을 알 수 있었다. 특히 오매의 ethyl acetate 추출물의 경우 500 µg/ml 농도에서 Hep G2의 증식을 45%까지 억제할 수 있었으며 250

**Table 1.** Inhibitory effect of *Prunus mume* extract on the growth of Hep G2 cell<sup>1)</sup> in MTT assay

| Sample concentration (ug/ml) | Absorbance (O.D.)          | Inhibition rate %         |
|------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Control                      | 0.59 ± 0.06 <sup>a2)</sup> |                           |
| Hexane extract               | 50                         | 0.55 ± 0.04 <sup>a</sup>  |
|                              | 250                        | 0.51 ± 0.02 <sup>b</sup>  |
|                              | 500                        | 0.50 ± 0.02 <sup>b</sup>  |
| Chloroform extract           | 50                         | 0.58 ± 0.03 <sup>ab</sup> |
|                              | 250                        | 0.52 ± 0.02 <sup>bc</sup> |
|                              | 500                        | 0.46 ± 0.01 <sup>c</sup>  |
| Ethylacetate extract         | 50                         | 0.56 ± 0.70 <sup>a</sup>  |
|                              | 250                        | 0.34 ± 0.02 <sup>b</sup>  |
|                              | 500                        | 0.32 ± 0.02 <sup>b</sup>  |
| Methanol extract             | 50                         | 0.57 ± 0.02 <sup>a</sup>  |
|                              | 250                        | 0.52 ± 0.02 <sup>ab</sup> |
|                              | 500                        | 0.50 ± 0.02 <sup>b</sup>  |
| Hot water extract            | 50                         | 0.58 ± 0.03 <sup>a</sup>  |
|                              | 250                        | 0.49 ± 0.01 <sup>ab</sup> |
|                              | 500                        | 0.47 ± 0.01 <sup>b</sup>  |

1) The cell concentration was 2 × 10<sup>4</sup> cells/ml

2) Means with the different letters (a,b,c) within a column are significantly different from one another at p < 0.05

µg/ml 농도에서도 증식 억제 효과를 보였다. 오매의 hexane 추출물을 500 µg/ml 농도로 첨가했을 경우 15% 성장 저해율을 보였고, chloroform 추출물은 23%, methanol 추출물 및 열수 추출물은 각각 21%와 20%의 성장 저해율을 나타내었다. 오매 ethylacetate 추출물의 간암 세포주 증식 억제 효과는 50 µg/ml에서는 5%, 250 µg/ml에서는 42%, 500 µg/ml에서는 45%의 저해율을 각각 나타내었고 250 µg/ml 농도 이상부터 유의적인 ( $p < 0.05$ ) 성장 저해를 보였다. 따라서 본 실험에 사용한 오매 추출물 중 간암 세포주 증식을 가장 유의적으로 억제하는 물질은 ethyl acetate 추출물임을 알 수 있었고 250 µg/ml 농도 이상에서부터 성장 저해 효과가 나타남을 알 수 있었다.

**2. 자궁암 세포주 증식에 미치는 오매 추출물의 영향**

자궁암 세포주인 HeLa에 대한 오매 추출물의 성장 저해 효과는 Table 2와 같이 나타났다. 오매의 hexane 추출물을 500 µg/ml 농도로 첨가한 경우 23%의 성장 억제 효과를 보였고 chloroform, ethyl acetate, methanol 및 열수 추출물의 경우 동일 농도에서 각각 21%, 11%, 10% 및 12%의 성장 저해율을 나타내 오매의 hexane 추출물이 자궁암 세포주 증식에 가장 큰 영향을 미침을 알 수 있었다. 오매의 hexane 추출물이 자궁암 세포 증식에 미치는 영향을 50 µg/ml, 250 µg/ml 및 500 µg/ml의 농도별로 살펴본 결과 각각 4%, 19% 및 23%의 성장 저해율을 나타내었으며 250 µg/ml 농도에서부터 유의적인 ( $p < 0.05$ ) 성장 저해를 보였다. 오매의 ethylacetate 추출물과 hexane 추출

**Table 2.** Inhibitory effect of *Prunus mume* extract on the growth of HeLa cell<sup>1)</sup> in MTT assay

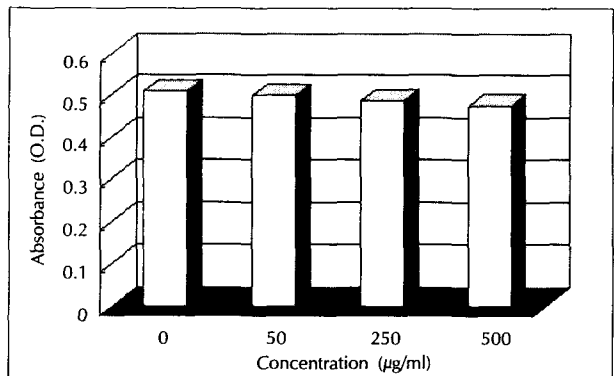
| Sample concentration (µg/ml) | Absorbance (O.D.)          | Inhibition rate %            |
|------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| Control                      | 0.61 ± 0.03 <sup>az1</sup> |                              |
| Hexane extract               | 50                         | 0.59 ± 0.03 <sup>a</sup> 4   |
|                              | 250                        | 0.49 ± 0.03 <sup>b</sup> 19  |
|                              | 500                        | 0.47 ± 0.03 <sup>b</sup> 23  |
| Chloroform extract           | 50                         | 0.60 ± 0.02 <sup>a</sup> 2   |
|                              | 250                        | 0.49 ± 0.02 <sup>b</sup> 20  |
|                              | 500                        | 0.48 ± 0.02 <sup>b</sup> 21  |
| Ethylacetate extract         | 50                         | 0.60 ± 0.03 <sup>a</sup> 1   |
|                              | 250                        | 0.55 ± 0.05 <sup>ab</sup> 11 |
|                              | 500                        | 0.54 ± 0.03 <sup>ab</sup> 11 |
| Methanol extract             | 50                         | 0.60 ± 0.02 <sup>ab</sup> 3  |
|                              | 250                        | 0.58 ± 0.03 <sup>abc</sup> 5 |
|                              | 500                        | 0.55 ± 0.03 <sup>bc</sup> 10 |
| Hot water extract            | 50                         | 0.60 ± 0.30 <sup>a</sup> 2   |
|                              | 250                        | 0.54 ± 0.02 <sup>b</sup> 12  |
|                              | 500                        | 0.54 ± 0.03 <sup>b</sup> 12  |

1) The cell concentration was  $2 \times 10^4$  cells/ml  
 2) Means with the different letters (a,b,c) within a column are significantly different from one another at  $p < 0.05$

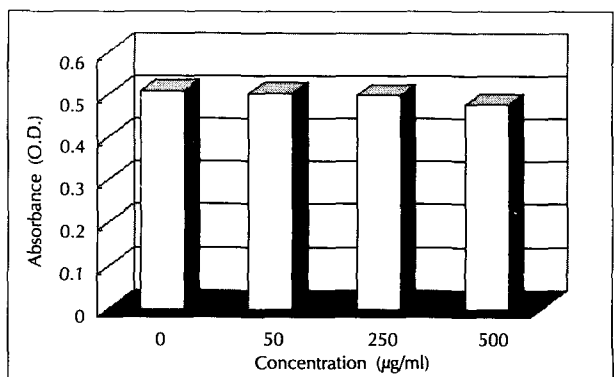
물이 정상 세포주인 fibroblast에 미치는 영향을 조사해 본 바, Fig. 1 및 Fig. 2와 같이 두 분획물 모두 정상 세포의 성장에는 변화를 초래하지 않음을 알 수 있었다. 한편 Hwang 등<sup>18)</sup>은 쑥의 석유 에테르 추출물이 간암 세포인 Hep G2의 증식을 억제한다고 하였으며, Lim 등<sup>19)</sup>은 SRB assay를 통하여 된장의 항암효과를 살펴본 바, 간암 세포의 증식이 된장의 ethylacetate 추출물에서 가장 크게 억제되며 위암 세포증식에는 된장의 hexane 추출물이 가장 큰 성장 저해 효과를 나타낸다고 보고하였다.

**3. 오매 추출물의 간암 및 자궁암 세포주에 대한 세포독성 효과**

오매 추출물이 간암 및 자궁암 세포주 사멸에 미치는 영향을 측정하기 위하여 5가지 종류의 오매 추출물을 농도별 (0 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml 및 1000 µg/ml)로 각각 첨가하고 24, 48 및 72시간 배양하면서 살아있는 세포수를 계수하였다. Table 3에서와 같이 Hep G2의 경우 각종 오매 추출물을 1000 µg/ml 농도로 첨가하여 72시간 배양시키면 hexane 추출물의 경우 51%의 세포 파괴율을 나타내었으며, chloroform 추출물은 61%, ethylacetate 추출물은



**Fig. 1.** Effect of ethylacetate extract from *Prunus mume* on the growth of fibroblast cell in MTT assay.



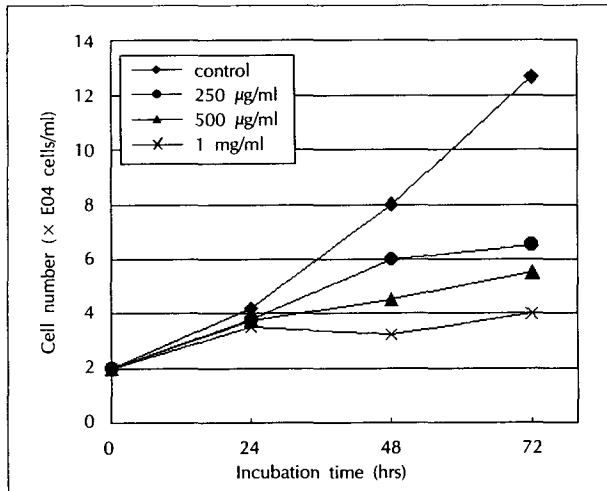
**Fig. 2.** Effect of hexane extract from *Prunus mume* on the growth of fibroblast cell in MTT assay.

**Table 3.** Cytotoxic effect of each *Prunus mume* extract on the Hep G2 cell<sup>1)</sup>

| Sample concentration (ug/ml) | Cell number ( $\times 10^4$ cells/ml) | Cytotoxicity %       |
|------------------------------|---------------------------------------|----------------------|
| Control                      | $11.92 \pm 1.66^{a2)}$                |                      |
| Hexane extract               | 250                                   | $8.75 \pm 1.95^b$    |
|                              | 500                                   | $7.87 \pm 1.12^{bc}$ |
|                              | 1000                                  | $5.83 \pm 0.52^c$    |
| Chloroform extract           | 250                                   | $7.50 \pm 1.09^b$    |
|                              | 500                                   | $5.00 \pm 0.66^c$    |
|                              | 1000                                  | $4.60 \pm 0.73^c$    |
| Ethylacetate extract         | 250                                   | $5.50 \pm 1.39^b$    |
|                              | 500                                   | $4.00 \pm 0.25^{bc}$ |
|                              |                                       | $3.00 \pm 0.25^c$    |
| Methanol extract             | 250                                   | $9.00 \pm 1.15^b$    |
|                              | 500                                   | $8.92 \pm 1.13^b$    |
|                              | 1000                                  | $5.00 \pm 0.25^c$    |
| Hot water extract            | 250                                   | $7.00 \pm 0.75^b$    |
|                              | 500                                   | $6.75 \pm 0.75^b$    |
|                              | 1000                                  | $4.50 \pm 0.50^c$    |

1) The Hep G2 was incubated with each *Prunus mume* extract for 72 hrs

2) Means with the different letters (a,b,c) within a column are significantly different from one another at  $p < 0.05$



**Fig. 3.** Inhibitory effect of ethylacetate extract from *Prunus mume* on the growth of Hep G2 cell for 24, 48 and 72 hrs incubation time in cytotoxicity test.

75%, methanol 추출물은 58%, 그리고 열수 추출물은 62%의 세포 파괴율을 나타내어 오매의 ethylacetate 추출물이 간암세포주에 대해 가장 큰 세포독성 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 초기 배양 세포수를  $2 \times 10^4$  cells/ml 농도로 하여 시간대별 (24, 48 및 72시간)로 생존하고 있는 세포수를 확인해 본 바 오매 추출물을 주지 않은 대조군의 경우 시간의 증가에 따라 각각  $4 \times 10^4$  cells/ml,  $8 \times 10^4$  cells/ml,  $12 \times 10^4$  cells/ml로 세포수가 증가하는 반면 오매의 ethylacetate 추출물을 농도별로 준 결과 세포의 성장이 억제됨

**Table 4.** Cytotoxic effect of each *Prunus mume* extract on the HeLa cell<sup>1)</sup>

| Sample concentration (ug/ml) | Cell number ( $\times 10^4$ cells/ml) | Cytotoxicity %       |
|------------------------------|---------------------------------------|----------------------|
| Control                      | $12.67 \pm 0.38^{a2)}$                |                      |
| Hexane extract               | 250                                   | $6.50 \pm 0.35^b$    |
|                              | 500                                   | $5.50 \pm 0.57^b$    |
|                              | 1000                                  | $4.00 \pm 0.87^c$    |
| Chloroform extract           | 250                                   | $8.00 \pm 1.15^b$    |
|                              | 500                                   | $7.20 \pm 0.83^{bc}$ |
|                              | 1000                                  | $5.50 \pm 1.09^c$    |
| Ethylacetate extract         | 250                                   | $10.50 \pm 1.15^b$   |
|                              | 500                                   | $10.00 \pm 0.87^b$   |
|                              | 1000                                  | $8.00 \pm 0.25^c$    |
| Methanol extract             | 250                                   | $10.75 \pm 1.32^b$   |
|                              | 500                                   | $9.00 \pm 0.25^{bc}$ |
|                              | 1000                                  | $7.80 \pm 1.43^c$    |
| Hot water extract            | 250                                   | $10.00 \pm 0.25^b$   |
|                              | 500                                   | $8.75 \pm 0.25^c$    |
|                              | 1000                                  | $7.20 \pm 0.43^d$    |

1) The HeLa cell was incubated with each *Prunus mume* extract for 72 hrs

2) Means with the different letters (a,b,c) within a column are significantly different from one another at  $p < 0.05$

을 알 수 있었다 (Fig. 3).

HeLa cell에 대한 오매 추출물의 세포독성 효과는 Table 4와 같이 나타나 오매 추출물을 종류별로 1000 µg/ml 농도로 첨가한 경우, 72시간 뒤 hexane 추출물은 68%, chloroform 추출물은 57%, ethylacetate 추출물은 37%, methanol 추출물은 38% 그리고 열수 추출물은 43%의 세포 파괴율을 나타내어 오매의 hexane 추출물이 자궁암 세포주에 대해 가장 세포독성 효과가 큼을 알 수 있었다. 오매의 hexane 추출물을 HeLa배양액에 농도별 (0 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml 및 1000 µg/ml)로 첨가하여 세포 사멸효과를 살펴 본 바, 오매 추출물을 주지 않은 대조군의 경우 시간대별로 (24, 48 및 72시간) 각각  $4 \times 10^4$  cell/ml,  $8 \times 10^4$  cells/ml 및  $13 \times 10^4$  cells/ml로 세포수가 증가하는 반면 오매의 hexane 추출물이 첨가된 경우 세포 파괴가 일어남을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4). 한편 오매의 ethylacetate 추출물 및 hexane 추출물이 정상세포주인 fibroblast에 미치는 효과를 살펴본 바 Fig. 5 및 6과 같이 유의적인 세포파괴가 일어나지 않았다.

Yang 등<sup>20)</sup>은 띠미로버섯의 열수 추출물을 1.5 mg/100 ml 농도로 HeLa cell에 투여한 결과 70%의 항암효과를 볼 수 있었으며, Hep G2에 대해서는 40% 정도의 항암효과를 관찰했고 methanol 추출물의 경우 4 mg/ml 농도에서 HeLa cell에 대해 60%의 성장 억제 효과가 있다고 보고하였다. 한편 Kim과 Park은<sup>21)</sup> 초피의 항돌연변이 효과

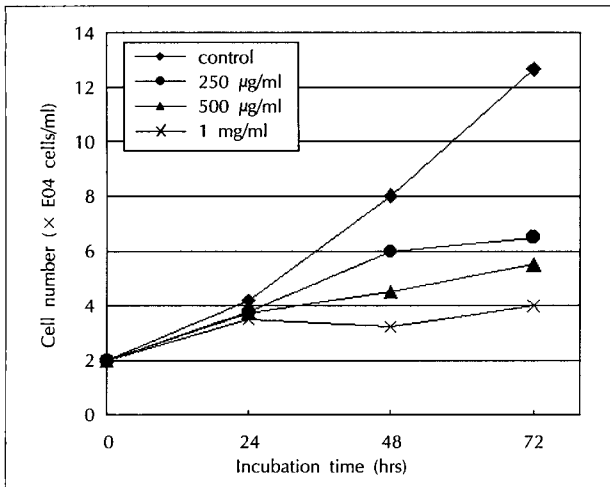


Fig. 4. Inhibitory effect of hexane extract from *Prunus mume* on the growth of HeLa cell for 24, 48 and 72 hrs incubation time in cytotoxicity test.

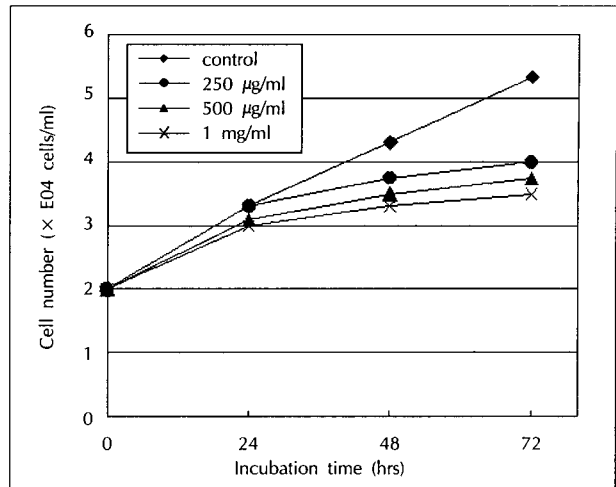


Fig. 6. Effect of hexane extract from *Prunus mume* on the growth of fibroblast cell for 24, 48 and 72 hrs incubation time in cytotoxicity test.

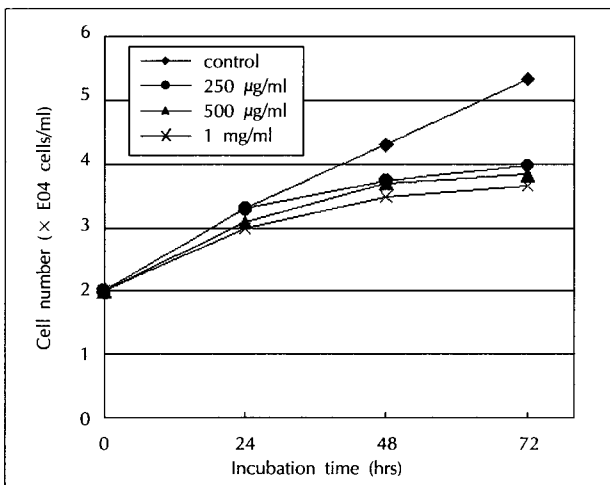


Fig. 5. Effect of ethylacetate extract from *Prunus mume* on the growth of fibroblast cell for 24, 48 and 72 hrs incubation time in cytotoxicity test.

를 살펴본 결과 hexane 추출물이 가장 항돌연변이 효과가 컸으며, 골육암 세포의 증식 억제에 대해서는 초피의 hexane 추출물과 chloroform 추출물이 가장 큰 효과를 나타낸다고 보고한 바 있다. 또 Hwang과 Sohn은<sup>22)</sup> 인삼 및 다른 생약재들의 항암효과를 보고한 바 있는데 이들의 수용성 추출물보다 석유에테르 추출물이 더 효과적이라고 하였고, Park 등<sup>23)</sup>도 마늘의 항돌연변이 및 항암효과에 관한 연구에서 지용성 추출물이 결장암 세포에 대해 항암 효과가 있다고 발표하였다. 간암의 발생을 감소시켜 준다고 알려진 식품으로 야채나 과일 등을 들 수 있는데 녹황색 채소의 섭취가 간암의 위험을 낮춘다는 보고가 있으며<sup>24)</sup> Lavecchia 등<sup>25)</sup>은 과일의 섭취가 간암의 발생을 감소시켰다고 하였다. 자궁암의 발생을 감소시켜 주는 식품으로 짙은 녹색이나 황

색 야채, 과일 주스 등이 알려져 있는데 이들의 섭취는 자궁암 발생에 보호적 역할을 한다고 한다.<sup>26,27)</sup> Marshall 등<sup>28)</sup>은 broccoli, carrots, tomatoes의 섭취가 자궁암 발생 위험을 낮춘다고 하였고, 그 밖에 Brock 등<sup>29)</sup>은 과일 주스, 야채 샐러드 등이 자궁암 발생에 예방적 역할을 한다고 보고한 바 있다.

#### 4. 암세포주 형태 변화의 현미경 관찰

오매 추출물이 간암 및 자궁암 세포주의 크기와 형태 변화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 inverted microscope으로 세포의 모양을 관찰한 바 Fig. 7와 같은 결과를 얻을 수 있었다. 사진 촬영하였다. 간암 세포주 (Hep G2)에서 가장 큰 증식 억제 효과를 나타낸 오매의 ethylacetate 추출물을 1 mg/ml 농도로 배양액에 첨가한 뒤 37, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 3일간 배양한 결과 세포가 파괴되어 배양액 상층부로 떠오르는 것을 볼 수 있었다. 한편 오매 추출물을 첨가하지 않고 3일간 배양시킨 대조군의 경우 Hep G2 (A)와 HeLa (C) 모두 flask바닥에 잘 붙어 증식이 빨리 진행되었으나, 오매의 hexane 추출물을 1 mg/ml 농도로 투여한 HeLa cell의 경우 세포가 바닥에서 떨어지거나 세포의 형태가 변화되는 것을 관찰할 수 있었다. 한편 정상 세포주인 fibroblast는 오매의 ethylacetate 추출물과 hexane 추출물을 첨가해도 아무런 형태학적 변화를 초래하지 않았다.

#### 요약 및 결론

본 연구에서는 예로부터 민간과 한방에서 널리 이용되어 온 오매를 이용하여 오매 추출물이 간암 및 자궁암 세포주

증식에 미치는 효과를 알아보았다. 오매를 hexane, chloroform, ethylacetate, methanol 및 열수로 순차 추출하여 분획물을 농도별로 조제하였으며, MTT assay, cytotoxicity test 및 현미경 관찰 등을 통하여 암세포의 성장 억제 효과를 알아보았다. Hep G2의 경우 오매의 ethylacetate 추출물이 가장 큰 성장 저해 효과를 나타내었으며 MTT assay 결과 250 µg/ml 농도 이상에서부터 유의적인 증식 억제 효과를 보

였다. 또한 cytotoxicity test결과 오매의 ethylacetate 추출물 1000 µg/ml 농도에서 72시간 배양시 75%의 세포 파괴율을 나타내었으며 현미경 관찰 결과 세포의 모양이 변화되고 죽은 세포가 배양액위에 떠있음을 관찰할 수 있었다. HeLa cell에서는 오매의 hexane 추출물이 가장 큰 저해 효과를 나타내었으며 MTT assay 결과 250 µg/ml농도 이상에서부터 유의적인 증식 억제 효과를 보였다. 또한 cytotoxicity test

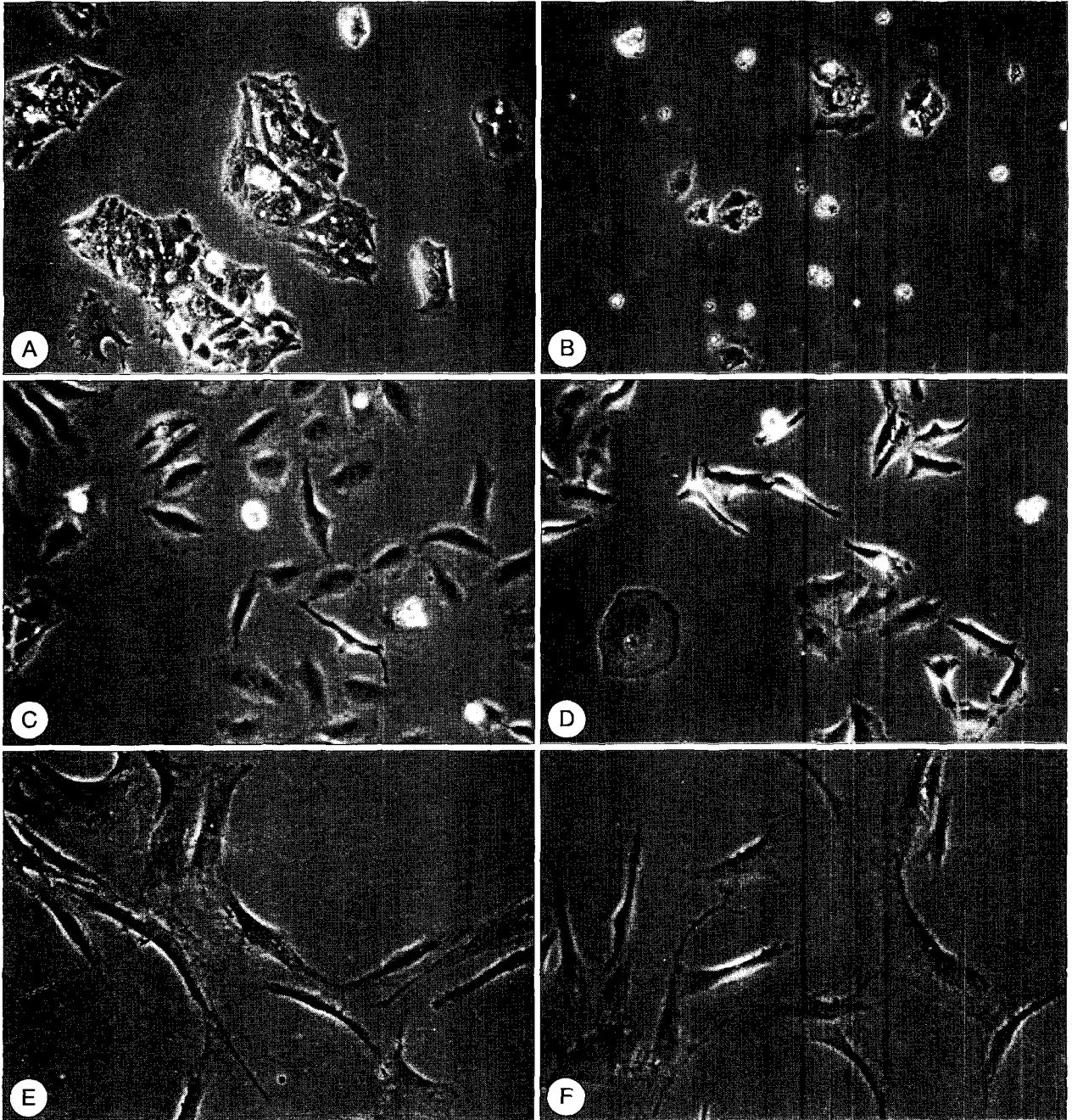


Fig. 7. Photomicrographs of Hep G2, HeLa and fibroblast with and without treatment of either ethylacetate extract or hexane extract from *Prunus mume* at the concentration of 1 mg/ml for 72 hrs. A: Hep G2 (control) × 100, B: Hep G2 (treated) × 100, C: HeLa (control) × 100, D: HeLa (treated) × 100, E: fibroblast (control) × 100, F: fibroblast (treated) × 100.

결과 오매의 hexane 추출물 1000 µg/ml농도에서 72시간 배양시 HeLa cell의 68%가 파괴되었으며 현미경 관찰 결과 세포 모양의 형태학적 변화가 일어났다. 정상세포주인 fibroblast에는 오매의 ethylacetate 및 hexane 추출물이 아무런 유의적 영향을 미치지 않았으며 현미경 관찰 시에도 변화가 일어나지 않았다.

Literature cited

- 1) Kim SS. A Study on the related factors of Korean cancer-outbreaks. *J of the Korean Society of Health Statistics* 23: 1-16, 1998
- 2) Doll R, Peto R. The causes of cancer. *J Natl Cancer Inst* 66: 1191-1308, 1981
- 3) Wynder EL, Gori G. Contribution of the environment to cancer incidence: an epidemiologic exercise. *J Natl Cancer Inst* 58: 825, 1977
- 4) Phillips DH. Chemical carcinogenesis, In: The molecular basis of cancer. Wiley-Interscience, New York, pp.133, 1985
- 5) Wakabayashi K, Nagao M, Esumi H, Sugimura T. Food -derived mutagens and carcinogens. *Cancer Res* 52: 2092, 1992
- 6) Wattenberg LW. Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents. *Cancer Res* 52: 2985, 1992
- 7) Ha YL, Michael WP. Naturally-occurring novel anticarcinogens: Conjugated dienoic derivatives of linoleic acid (CLA) (in Korean). *J Korean Soc Food Nutr* 20: 401-407, 1991
- 8) Miyazaki T, Nishijima M. Structural examination of a water soluble antitumor polysaccharide of Ganoderma lucidum. *Chem Pharm Bull* 29: 3611-3616, 1981
- 9) Jee HJ. Health Foods form Herbs. pp.52, Seoul National Univ. Press, Seoul, 1999
- 10) Youn MS. Effect of Maesil extracts ingestion on blood lactate density and serum lipid components. *M S Thesis, Kyungnam Univ, Korea*, 1989
- 11) Sheo HJ, Lee MY, Chung DL. Effect of *Prunus mume* extracts on the gastric secretion in rats and carbon tetrachloride induced liver damage of rabbits. *J Korean Soc Food Nutr* 19: 21, 1990
- 12) Sheo HJ, Ko EY, Lee MY. Effect of *Prunus mume* extracts on experimentally Alloxan induced diabetes in rabbits. *J Korean Soc Food Nutr* 16: 41-47, 1987
- 13) Bae JH, Kim KJ. Effect of *Prunus mume* extract containing beverages on the proliferation of food-borne pathogens. *J East Asian Diet Life* 9(2): 214-222, 1999
- 14) Jacoby WB, Pastan LH. Methods in enzymology Vol. VIII. *Cell culture*. Adademic press, New York, pp.132, 1979
- 15) Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* 48: 589-601, 1988
- 16) Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 65: 55, 1983
- 17) Franceschi RT, James WM, Zerlauth G. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> specific regulation of growth, morphology and fibronectin in a human osteosarcoma cell line. *J Cell Physiol* 123: 401, 1985
- 18) Hwang YK, Kim DC, Hwang WI, Han YB. Inhibitory effect of Artemisia princeps Pampan extracts on growth of cancer cell lines. *Korean J Nutr* 31: 799-808, 1998
- 19) Lim SY, Park KY, Rhee SH. Anticancer effect of Doenjang in vitro Sulforhodamine (SRB) Assay. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 240-245, 1999
- 20) Yang KH, Yang JH, Ryu BH. Antitumor effects of extracts obtained from *Daedalea dickinsii*. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 25: 178-182, 1997
- 21) Kim SH, Park KY. Inhibitory effects of Chinese pepper on the mutagenicity and the growth of MG-63 human osteosarcoma. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 21: 628-634, 1993
- 22) Hwang WI, Sohn JW. Comparative study on the cytotoxic activities of red ginseng of Korea and China (in Korean). *Korean J Ginseng Sci* 17: 196, 1993
- 23) Park KY, Kim SH, Suh MJ, Chung HY. Inhibitory effects of Garlic on the mutagenicity in Salmonella Assay system and on the growth of HT-29. *Korean J Food Sci Technol* 23: 370-374, 1991
- 24) Yu MW, Hsieh HH, Pan WH, Yang CS, Chen CJ. Vegetable consumption, serum retinol level, and risk of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 55: 1301-1305, 1995
- 25) LaVecchia C, Negri E, Decarli A, D'Avanzo B, Franceschi S. Risk factors for hepatocellular carcinoma in Northern Italy. *Int J Cancer* 42: 872-876, 1988
- 26) Verreault R, Chu J, Mandelson M, Shy K. A case-control study of diet and invasive cervical cancer. *Int J Cancer* 43: 1050-1054, 1989
- 27) Ziegler RG, Jones CJ, Brinton LA. Diet and risk of in situ cervical cancer among white women in the United States. *Cancer Causes Control* 2: 17-29, 1991
- 28) Marshall J, Graham X, Byers T. Diets and smoking in epidemiology of cancer of the cervix. *J Natl Cancer Inst* 70: 847-851, 1983
- 29) Brok K, Berry G, Mock P. Nutrients in diet and plasma and risk of in situ cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 80: 580-585, 1988