도라지 추출물의 안전성 및 항암 효과

김수현¹ · 정미자²

¹구운식품 기업부설연구소

²광주대학교 식품영양학과

Safety and Anticancer Effects of *Platycodon grandiflorum* Extracts

Soo-Hyun Kim¹ and Mi Ja Chung²

¹Guwoon Food & Research Institute

²Department of Food Science & Nutrition, Gwangju University

ABSTRACT This study investigated the antimutagenic and anticancer effects of *Platycodon grandiflorum* extract (PGE) and its fractions against carcinogenic *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) and genotoxicity. The Ames Salmonella mutagenicity test employing histidine mutants of *Salmonella* Typhimurium TA98 and TA100 was used to examine the mutagenicity of PGE and its fractions. Bacterial reversion assay with *S. Typhimurium* TA98 and TA100 did not show a significantly increased number of revertant colonies. The same test was used to examine the ability of PGE and its fractions to prevent acquisition of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine- and 4-introquino-line-1-oxide-induced mutations. PGE and its fractions inhibited mutagenesis in a dose-dependent manner. Among the fractions, ethyl acetate fraction from PGE (PGEA) exhibited a higher antimutagenic effect than other fractions. PGE and its fractions suppressed the growth of cancer cell lines, including human cervical adenocarcinoma, human hepatocellular carcinoma, human breast adenocarcinoma, human lung carcinoma, and transformed primary human embryonic kidney cells. In addition, we evaluated the antitumor activity of PGEA and its fractions in sacoma-180 solid tumor-bearing mice. *In vivo* anticancer activity results showed that PGE and its fractions could more effectively suppress tumor growth than the control. PGEA showed higher *in vitro* and *in vivo* anticancer effects than PGE and other fractions, and PGEA inhibited NDMA formation. Thus, we showed that PGEA has antimutagenic and anticancer activities, making it a candidate anticancer material under these experimental conditions.

Key words: Ames test, antimutagenicity, anticancer, *Platycodon grandiflorum*, safety

서 론

산업이 발달하고 인간의 수명이 증가하였지만 다양한 질병으로부터 위협을 받고 있고 특히 암은 아직 완전히 정복되지 않은 질병이다. 암을 정복하고자 하는 다양한 노력들이 진행되고 있으며 그중의 한 연구방향은 예부터 음식으로 섭취하여 오고 있는 식물로부터 암을 유발할 수 있는 물질 생성을 차단하고 암을 유발하기 전의 앞 단계인 돌연변이를 억제함으로써 결국 항암 효과를 나타내는 부작용을 최소화할 수 있는 천연소재를 찾는 것이다(1,2). 따라서 파이토뉴트리언트(phytonutrient)라는 분야가 생겨나게 되었고 과일, 채소, 곡류 및 기타 식물성 식품에 함유된 생리활성 물질로부터 암뿐만 아니라 다양한 질병들을 예방하거나 개선하고자 하는 연구들이 진행되고 있다(1,2).

도라지(*Platycodon grandiflorum*)는 우리나라, 일본, 중국 등지에 분포하며 산과 들에 자라지만 요즘은 농가에서 대량 재배하고 있다. 도라지는 당질과 섬유소가 많고 칼슘이 풍부한 우수한 알칼리성 식품으로 우리나라에서는 약용 및 나물용으로 사용되고 있다(3). 도라지 부탄을 분획물은 세포 내 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 및 nitric oxide(NO) 생성을 억제하였고(4), 도라지 에틸아세테이트 분획물 처리는 세포 내 항산화 유전자 발현량을 증가시켰으며(5), 도라지 물 추출물 경구투여에 의해 마우스 비장세포 증식능 증가 및 사이토카인 분비량이 증가되었다(6). 이외에 도라지 뿌리의 건조방법에 따른 무기 성분 및 사포닌 함량의 변화(3), 숙성온도와 기간에 따른 도라지의 이화학적 특성과 활성의 변화(7), 장생 도라지의 생리활성 물질 탐색을 위하여 장생 도라지의 항돌연변이 효과(8) 등에 대한 연구들이 보고되어 있으나 4년근 도라지 추출물 및 이들 분획물들이 발암 유발 물질 억제 및 항돌연변이 효과에 의해 종양 억제 효과와 암세포 사멸 효과를 나타내므로 항암 효과가 있을 것이라는 체계적인 연구는 전무하다.

Received 27 January 2015; Accepted 25 February 2015

Corresponding author: Mi Ja Chung, Department of Food Science and Nutrition, Gwangju University, Gwangju 503-703, Korea
E-mail: mijachung@gwangju.ac.kr, Phone: +82-62-670-2049

N-Nitrosamines(NA)은 식품 중에 존재하는 대표적인 발암성 물질로 NA 중 가장 강력한 발암 물질 중 하나인 *N*-nitrosodimethylamines(NDMA)은 전구물질인 아질산염과 아민류가 산성조건 하에서 반응하여 생성된다(9). 화학물질에 의해 암 유발과 돌연변이 유발에 대한 강한 상관관계가 있는 것으로 알려져 있으며(10), NA에 의한 발암성을 측정하기 위하여 돌연변이 유무를 알 수 있는 Ames test를 수행하기도 하고 이런 방법들은 식품의 안전성을 평가하기 위한 연구방법으로도 활용되고 있다(1,8,11).

본 연구에서는 도라지 70% 에탄올 추출물과 분획물에 대하여 돌연변이원성, 항돌연변이원성을 실험하였고 *in vitro* 및 *in vivo*에서의 항암 효과를 검색하였으며, 항돌연변이 및 항암 효과가 가장 뛰어난 분획물을 선택하여 NDMA 생성 억제 효과를 살펴봄으로써 도라지 추출물 및 분획물이 암 예방 및 개선 효과를 가진 안전성이 확보된 천연 소재로 활용 가능한지 알아보았다.

재료 및 방법

시료의 추출 및 분획

본 실험에 사용한 도라지는 국내산 4년근으로 구룡제약(주)(Cheolwon, Korea)로부터 분말 형태로 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 헥산(hexane), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 부탄올(butanol) 및 물(aqueous) 분획물 순서로 다섯 가지 분획물을 제조하였다. 분리된 각각의 용매 추출물은 감압 농축하여 용매를 제거한 후 동결 건조하여 실험에 사용하였다.

돌연변이원성 실험

직접 돌연변이원(direct mutagen)으로 *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitroso-guanidine(MNNG; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)과 4-nitroquinoline 1-oxide(4NQO; Sigma-Aldrich Co.)를 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 실험에 사용하였다. 돌연변이원성 실험은 *Salmonella* Typhimurium의 변이주인 TA98과 TA100을 이용하여 Ames test를 개량한 preincubation(12)법으로 실시하였다. 시료를 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 preincubation 한 다음 histidine/biotin이 첨가된 top agar를 2 mL씩 가하여 잘 혼합한 후에 미리 조제해 놓은 minimal glucose agar plate 상에 도말하고 평판 고화시켜 37°C에서 48시간 배양하여 생긴 복귀돌연변이(his⁺ revertants colony) 수를 측

정하여 돌연변이원성의 유무를 판정하였다.

항돌연변이원성 실험

건열 멸균시킨 glass cap tube에 시료를 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 colony 수를 측정하여 항돌연변이원성 유무를 판정하였다. 시료와 변이원 물질의 농도는 예비실험을 통하여 결정하였으며 항돌연변이 활성은 변이원 물질의 활성에 대한 시료의 억제율(inhibition, %)로 나타내었다.

In vitro 항암실험

인체 암세포주는 HeLa 인간 자궁경부암세포(HeLa human cervical adenocarcinoma), HepG2 인간 간암세포(HepG2 human hepatocellular carcinoma), MCF-7 인간 유방암세포(MCF-7 human breast adenocarcinoma), A549 인간 폐암세포(A549 human lung carcinoma) 그리고 293 인간 신장정상세포(293 transformed primary human embryonal kidney)이며, 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받았다. 세포배양에 필요한 배지로 RPMI 1640, Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), 0.05% trypsin-0.02% EDTA 그리고 100 units/mL penicillin-streptomycin(PEST)은 Gibco(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다. HeLa, HepG2, MCF-7 및 293 세포주는 DMEM 배지를, A549 세포주는 RPMI 1640 배지를 이용하였고, 10% FBS와 1% PEST를 함유한 배지로 37°C, 5% CO₂ 조건에서 각각 배양시켰다.

세포 단백질 염색을 이용하여 세포 증식이나 독성을 측정하는 SRB(sulforhodamine B) assay(13)를 이용하여 항암 활성을 알아보았다. HeLa, HepG2, MCF-7, A549와 293을 10% FBS가 함유하는 RPMI 1640 또는 DMEM 배지를 사용하여 5×10⁴ cells/mL 농도로 100 µL씩 각 well에 첨가하여 24시간 동안 배양시킨 후 배지에 녹인 다양한 농도의 시료를 100 µL씩 첨가하여 48시간 동안 다시 배양하였다. 그 후 상등액을 조심스럽게 제거하고 냉장 보관한 10%(w/v) TCA를 100 µL씩 첨가한 후 1시간 동안 4°C에서 방치한 뒤 증류수로 다섯 번 행구었다. 건조시킨 후 1%(v/v) acetic acid에 녹인 0.4%(w/v) SRB 용액 100 µL를 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 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 일주일간 적응시켜 사용하였으며, 각각의 실험군당 6마리를 사용하였다. 동물사육실 실험조건은 온도 23±2°C, 습도 45~55%로 유지시켰으며, 조명은 오전 9시에 자동 점등, 오후 9시에 자동 소등하여 12시간 간격으로 조명을 조절하였다. 사료는 (주)샘타코 표준사료로 사용하였고 물은 증류수를 공급하였으며, 사료와 물을 자유롭게 먹도록 하였다. 동물실험은 강원대학교 윤리위원회의 승인을 받아 시행되었으며 강원대학교 동물실험 윤리지침을 준수하였다.

In vivo 항암실험

Mouse sarcoma cell line(sarcoma-180)은 한국세포주은행에서 구입하여 사용하였다. 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 원심분리하여 상등액을 제거한 후 1.0×10⁶ cells/mL가 되도록 종양세포 부유액을 만들어 1 mL씩을 복강 주사하여 이식 보존하면서 실험에 사용하였다. 고형암 성장 억제 실험은 각 군당 6마리 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 한 후 다음 식에 따라 종양성장 저지 백분율(tumor growth inhibition ratio, I.R.: %)을 계산하였다.

$$I.R. (\%) = \frac{Cw - Tw}{Cw} \times 100$$

Cw: 대조군의 평균 종양 무게

Tw: 처리군의 평균 종양 무게

NDMA 생성 억제 실험, NDMA의 분석 및 동정

NDMA 생성 억제 실험은 시험관이 100 mM 아질산나트륨 용액 1 mL, 다양한 농도의 시료를 각각 1 mL, 200 mM dimethylamine(DMA) 용액 0.5 mL를 가하여 혼합한 후 0.2 M 구연산 완충용액(pH 2.5)으로 총 부피를 10 mL로 만들어 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 ammonium sulfamate 500 mg을 가한 다음 dichloromethane(DCM) 1 mL로 DCM층을 모아 무수황산나트륨으로 탈수시켜 Chung 등(9,14)의 방법으로 분석 및 동정하였다.

통계처리

실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 SPSS(Version

10.0, SPSS, Chicago, IL, USA) 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

도라지 추출물 및 분획물들의 복귀돌연변이원성에 미치는 영향

돌연변이 유발성을 시험하기 위해 도라지 추출물 및 분획물들을 시험물질로 사용하여 *S. Typhimurium* TA98과 TA100에 대한 복귀돌연변이 집락수를 조사한 결과는 Table 1에 나타내었다. 음성대조군의 복귀돌연변이 집락수는 TA98이 28±5, TA100은 182±12로 나타났다. 도라지 에탄올 추출물을 50, 100, 150, 200 및 1,000 µg/plate의 여러 농도로 첨가하여 실험한 결과 음성대조군에 비하여 농도에 따

Table 1. Mutagenicity of 70% ethanol extract and its fractions from *Platycodon grandiflorum* in *Salmonella* Typhimurium TA98 and TA100

Dose (µg/plate)	His ⁺ revertants/plate ¹⁾	
	TA98	TA100
Spontaneous	28±5 ^{NS2)}	182±12 ^{NS}
70% ethanol extract	50	25±6
	100	21±4
	150	28±1
	200	21±1
	1,000	27±1
Hexane fraction	50	23±8
	100	27±2
	150	25±3
	200	26±4
	1,000	27±5
Chloroform fraction	50	37±4
	100	26±5
	150	20±4
	200	28±4
	1,000	31±4
Ethyl acetate fraction	50	27±5
	100	27±2
	150	32±7
	200	31±2
	1,000	29±3
Butanol fraction	50	21±2
	100	26±5
	150	24±5
	200	22±4
	1,000	24±4
Aqueous fraction	50	23±2
	100	24±5
	150	23±3
	200	22±2
	1,000	25±2

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

²⁾NS: not significant.

른 집락수 변화가 유의적으로 나타나지 않았다. 또한 핵산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 분획물에 대해서도 50, 100, 150, 200 및 1,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 의 여러 농도로 첨가하여 실험한 결과 음성대조군에 비하여 농도에 따른 유의적인 변화를 나타내지 않았다. 도라지 70% 에탄올 추출물, 핵산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 분획물은 1,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 에서도 돌연변이성을 나타내지 않았지만 고농도라 제외하였고, 항돌연변이 실험을 위한 농도를 0~200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 로 하였다.

시료 처리에 의해 음성대조군 복귀변이 집약수보다 2배 이상인 경우를 양성으로 판정하여 그 시료가 돌연변이성이라고 한다(12). 복귀돌연변이성 실험은 수입 오렌지 등 식품의 안정성을 평가하기 위한 실험 기법 중의 하나로 사용되고 있다(15).

도라지 추출물 및 분획물들의 항돌연변이원성 효과

항돌연변이원성을 검토하기 위하여 Ames test에서 양성 반응을 나타내며, 직접 변이원 물질로 알려진 MNNG와 4NQO를 사용하여 각각의 농도에 따른 항돌연변이원성을 검토하였다. 도라지 70% 에탄올 추출물과 그 분획물들의 항돌연변이 실험 결과는 Fig. 1과 2에 나타내었다. MNNG (0.4 $\mu\text{g}/\text{plate}$)의 경우 *S. Typhimurium* TA100에서 농도의존적으로 변이원성 억제 효과를 나타내었으며, 특히 시료 농도 200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 에서 에틸아세테이트 분획물 및 부탄올 분획물에서 각각 64.2% 및 61.1%로 다른 분획물들에 비하여 유의적으로 높은 항돌연변이원성을 나타내었다(Fig. 1). 또한 같은 농도에서 물 분획물, 70% 에탄올 추출물, 핵산 및 클로로포름 분획물에서 각각 53.9%, 53.6%, 45.5% 및 43.6% 순으로 돌연변이를 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 1). Shon 등(8)은 *S. Typhimurium* TA100에 대하여 직접 변이원 물질인 MNNG를 사용하여 돌연변이를 유발시켰을 경우 장생 도라지 메탄올 추출물 200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 의 농도로 첨가하였을 때 약 65%의 억제율을 나타내었고 부탄올 분획물이 에틸아세테이트 분획물보다 높은 항돌연변이 효과를 나

Fig. 1. The antimutagenic effects of 70% ethanol extract and its fractions from *Platycodon grandiflorum* against MNNG (0.4 $\mu\text{g}/\text{plate}$) in *Salmonella* Typhimurium TA100. Values are mean $\pm$ SD (n=3). NS: not significant. Means with the different letters (a-c) above the bars in the same concentration are significantly different by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

타내었다고 보고하였는데, 본 연구에서는 에탄올 추출물 200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 의 농도에서 53.6% 항돌연변이 억제율을 나타내었고 에틸아세테이트 분획물과 부탄올 분획물이 비슷한 항돌연변이 효과를 나타내었다. Shon 등(8)의 연구에서 장생 도라지 분획물의 MNNG에 대항하는 *S. Typhimurium* TA100에 대한 항돌연변이 효과가 있다는 것은 본 연구 결과와 유사하였다.

다른 직접 변이원인 4NQO(0.15 $\mu\text{g}/\text{plate}$)에 대한 억제 효과를 측정한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 4NQO에 의한 *S. Typhimurium* TA98 및 TA100 돌연변이를 70% 에탄올 추출물 및 분획물 처리에 의해 농도 의존적으로 억제되었다. *S. Typhimurium* TA98의 경우 시료 농도 200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 에서 에틸아세테이트 분획물 및 부탄올 분획물에서 각각 69.4% 및 64.0%로 다른 분획물들에 비하여 유의적으로 높은 항돌연변이원성을 나타내었다. *S. Typhimurium* TA100 균주의 경우 같은 농도에서 에틸아세테이트 분획물 및 부탄올 분획물에서 66.2% 및 66.6%로 다른 분획물들에 비하여 높은 항돌연변이원성을 나타내었다. Cho 등(16)은 matrine

Fig. 2. The antimutagenic effects of 70% ethanol extract and its fractions from *Platycodon grandiflorum* against 4NQO (0.15 $\mu\text{g}/\text{plate}$) in *Salmonella* Typhimurium TA98 (A) and TA100 (B). Each value represents the mean $\pm$ SD of three plates. Means with the different letters (a-d) above the bars in the same concentration are significantly different by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

을 함유하는 고삼 추출물을 4NQO에 대한 TA98, TA1535, TA1537이 S-9 mix를 처리 유무에 대하여 항돌연변이 효과를 살펴보고 그 결과 5 mg/plate의 최고 농도에서는 S-9 mix를 처리 유무에 상관없이 모든 균주에서 80% 이상의 돌연변이 억제 효과를 나타내었다. Kim 등(2)은 4NQO에 의한 *S. Typhimurium* TA98과 TA100의 돌연변이 유발이 더덕 에틸아세테이트 분획물 처리에 의해 억제되었고 이는 다른 분획물보다 강한 억제 효과를 나타내었다고 보고하였는데 본 연구 결과와 일치하였다.

도라지 추출물 및 분획물들의 *in vitro* 항암 효과

본 실험에서는 도라지 70% 에탄올 추출물 및 분획물들에 대해서 인간 자궁암세포(HeLa), 인간 간암세포(HepG2), 인간 유방암세포(MCF-7), 인간 폐암세포(A549)와 인간의 정상 신장세포(293)를 사용하여 SRB assay 방법으로 인간 암세포 성장 억제 효과를 Fig. 3~7에 나타내었다. SRB assay는 미국 국립 암연구소에서 많이 사용되는 방법으로 특

히 항암제를 대량 및 신속하게 검토할 수 있는 장점이 있고 주위 환경 변화에 덜 민감하고 중간 대사물에 영향을 받지 않는 안정한 end point를 제공해 주는 것으로 알려져 있다 (17).

인간 자궁암세포인 HeLa에 대한 도라지 추출물과 분획물의 억제 효과를 검토한 결과 1 mg/mL의 농도에서 50% 이상의 억제 활성을 나타내었으며, 특히 도라지 에틸아세테이트 분획물과 부탄올 분획물에서 다른 분획물보다 높은 억제 활성을 보여주었는데 각각 66.1% 및 62.6%의 억제율을 나타내었다(Fig. 3). 인간 간암세포인 HepG2 세포에서 에틸아세테이트 분획물을 1 mg/mL의 농도로 처리하였을 때 72.0%로 높은 암세포 성장 억제율을 나타내었고, 부탄올 및 물 분획물 그리고 70% 에탄올 추출물에서는 모두 60% 이상의 억제율을 나타내었다(Fig. 4). 인간 유방암세포인 MCF-7에서는 부탄올 분획물을 1 mg/mL의 농도로 처리하였을 때 71.4%로 높은 암세포 성장 억제율을 나타내었으며, 그다음으로 같은 농도에서 헥산 분획물은 69.1%, 에틸아세

Fig. 3. Growth inhibitory effects of 70% ethanol extract and its fractions from *Platycodon grandiflorum* on human cervical adenocarcinoma (HeLa). Each value represents the mean $\pm$ SD of three plates. NS: not significant. Means with the different letters (a-d) above the bars in the same concentration are significantly different by Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

Fig. 4. Growth inhibitory effects of 70% ethanol extract and its fractions from *Platycodon grandiflorum* on human hepatoblastoma (HepG2). Each value represents the mean $\pm$ SD of three plates. Means with the different letters (a-c) above the bars in the same concentration are significantly different by Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

Fig. 5. Growth inhibitory effects of 70% ethanol extract and its fractions from *Platycodon grandiflorum* on human breast adenocarcinoma (MCF-7). Each value represents the mean $\pm$ SD of three plates. NS: not significant. Means with the different letters (a-d) above the bars in the same concentration are significantly different by Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

Fig. 6. Growth inhibitory effects of 70% ethanol extract and its fractions from *Platycodon grandiflorum* on human lung carcinoma (A549). Each value represents the mean $\pm$ SD of three plates. Means with the different letters (a-d) above the bars in the same concentration are significantly different by Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

Fig. 7. Growth inhibitory effects of 70% ethanol extract and its fractions from *Platycodon grandiflorum* on transformed primary human embryonal kidney (293). Each value represents the mean±SD of three plates. NS: not significant. Means with the different letters (a,b) above the bars in the same concentration are significantly different by Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

테이트 분획물은 67.4%, 70% 에탄올 추출물은 60.2%, 클로로포름 분획물은 57.7% 및 물 분획물은 54.6% 순으로 억제율을 나타내었다(Fig. 5). 인간 폐암세포인 A549에 대한 도라지 70% 에탄올 추출물 및 모든 분획물에서 50% 이상의 암세포 성장 억제율을 나타냈으며, 0.25~0.75 mg/mL 처리 농도에서는 부탄올 분획물이 가장 높은 암세포 성장 억제율을 나타내었으나 1 mg/mL 처리 농도에서는 에틸아세테이트 분획물이 가장 높은 암세포 성장 억제율을 나타내었다(Fig. 6). 반면 인간 정상세포 293에 대해서는 모든 처리군에서 30% 이하의 낮은 암세포 성장 억제 효과를 나타내었다(Fig. 7). 이는 암세포에 대한 높은 억제 효과에 비해 정상세포에 대해서는 비교적 낮은 독성 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 이상의 결과로부터 HeLa, HepG2 및 A549 세포에서는 도라지 에틸아세테이트 분획물과 부탄올 분획물이

다른 분획물에 비해 높은 암세포 성장 억제율을 나타내었다.

Jang 등(4)은 부탄올 분획물이 세포 내 활성산소종 생성 억제 효과 및 NO 생성 저해 효과가 메탄올 추출물보다 높다고 보고하여 본 연구 결과와 같이 부탄올 분획물에서 높은 활성을 나타내었다. Kim 등(2)은 더덕 추출물 및 분획물들 처리가 HeLa, HepG2, MCF-7 그리고 A549 암세포의 세포 생존율에 미치는 영향을 알아보았고 에틸아세테이트 분획물이 다른 분획물들보다 높은 암세포 성장 억제율을 가지고 있었다고 보고하였는데 본 연구 결과와 일치하였다.

도라지 추출물 및 분획물들의 *in vivo* 항암 효과

도라지 70% 에탄올 추출물 및 분획물들의 *in vivo*에서의 항암 효과를 검토하기 위하여 복수 암세포(sarcoma-180)를 이용한 실험동물에서의 고형암 성장 억제 효과를 알아보았으며, 그 결과는 Table 2에 나타내었다. 도라지를 첨가하지 않은 군의 종양 무게는 3.91 g이었으나 도라지 70% 에탄올 추출물 및 분획물을 투여한 군에서는 종양의 크기가 유의적으로 줄어든 것을 알 수 있었다. 즉 도라지 에틸아세테이트 분획물의 농도를 25 mg/kg의 저농도로 처리하였을 경우 고형암의 무게는 2.44 g으로 대조군에 비하여 37.56%의 유의적인 감소를 나타내었으며 다른 분획물에 비해 높은 억제율을 나타내었다. 또한 50 mg/kg의 고농도에서는 에틸아세테이트 분획물, 클로로포름 분획물 및 부탄올 분획물에서의 고형암 무게는 각각 1.44 g, 1.85 g 및 1.96 g으로 대조군에 비하여 각각 62.98%, 52.57% 및 49.67%의 고형암 성장 억제 효과를 나타내었으며, 특히 에틸아세테이트 분획물에서 가장 높은 고형암 성장 억제 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다.

Kim 등(2)은 더덕 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 sarcoma-180 세포에 대한 항종양 효과를 검색한 결과 더덕 에틸아세테이트 분획물 50 mg/kg 농도에서 56.4%의 고형

Table 2. Antitumor activities of 70% ethanol extract and its fractions from *Platycodon grandiflorum* in tumor bearing Balb/c mouse with Sarcoma-180 cell

Group	Dose (mg/kg body weight)	Tumor weight (g)	Inhibition ratio (%)
Control	—	3.91±0.45 ^{a1)2)}	—
Ethanol extract	25	2.83±0.05 ^b	27.41±1.31
Hexane fraction	25	2.73±0.15 ^b	30.14±3.93
Chloroform fraction	25	2.65±0.16 ^b	32.01±4.23
Ethyl acetate fraction	25	2.44±0.14 ^b	37.56±3.69
Butanol fraction	25	2.63±0.19 ^b	32.53±4.91
Aqueous fraction	25	2.90±0.09 ^b	25.70±2.30
Ethanol extract	50	2.36±0.06 ^{bc}	39.61±1.59
Hexane fraction	50	2.57±0.06 ^b	34.15±6.81
Chloroform fraction	50	1.85±0.11 ^c	52.57±2.96
Ethyl acetate fraction	50	1.44±0.14 ^d	62.98±3.71
Butanol fraction	50	1.96±0.05 ^c	49.67±1.47
Aqueous fraction	50	2.66±0.11 ^b	31.76±2.95

All groups were fed with commercial chow diet. Control group was injected with phosphate buffered solution and other groups were injected with ethanol extract or its fraction (25 mg/kg/d, 50 mg/kg/d) once a day for 20 days from 24 h following transplantation.

¹⁾Value are mean±SD of 6 mice.

²⁾Means with the different letters (a-c) within a column are significantly different by Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

암 성장 억제율을 나타낸 반면 본 연구에 사용된 도라지 에틸아세테이트 분획물은 같은 농도에서 62.9%로 더덕보다 높은 억제율을 나타내었으나 다른 분획물들보다 에틸아세테이트 분획물이 높은 항종양 효과가 있다는 것은 본 연구 결과와 같았다.

본 연구에서는 70% 에탄올로 추출하여 얻은 농축물을 용매의 극성 차이에 따라 분리를 행하여 핵산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 분획물 순서로 다섯 가지 분획물들을 얻었다. 일반적으로 어떤 시료에 대해서 생리활성을 검정하고자 할 때는 통상 메탄올 추출한 후 다음 단계를 진행한다. 메탄올 추출은 다양한 성분의 추출이 용이한 장점이 있으나 당성분이나 사포닌처럼 추출 대상에 따라서 에탄올을 사용하기도 한다. 도라지의 주요 생리활성 물질이 사포닌으로 알려져 있어(3) 본 연구에서는 에탄올을 사용하여 추출하였다. 비극성의 대표적인 용매는 핵산이 있고, 극성 용매로는 알코올과 물 그리고 중간 정도로는 에틸아세테이트가 있다(5). 따라서 본 연구에서는 도라지에 들어 있는 유기화합물 중에서 비극성 물질로부터 차차 극성이 큰 물질 순으로 추출하였고 중간 정도의 극성을 가진 에틸아세테이트 분획물이 가장 강한 항돌연변이 및 항암 효과가 있었다. 약용식물의 에틸아세테이트 분획물은 사포닌이 함유되어 있고(18) 식물 유래 기능성 영양성분 중 페놀성 화합물은 에틸아세테이트에 잘 용해된다(19). 따라서 도라지의 주요 생리활성 물질은 중간 정도의 극성을 가진 용매인 에틸아세테이트 분획물에 잘 용해되는 사포닌, 페놀성 화합물 등일 것으로 추정된다. 도라지 에틸아세테이트 분획물에 함유된 생리활성 물질 분리, 분석 및 동정에 대한 연구와 이들 단일 물질의 항돌연변이 및 항암 효과 등의 생리활성에 관한 연구들이 계속되어야 할 것이다.

도라지 에틸아세테이트 분획물의 NDMA 생성 억제 효과

도라지 추출물과 5개의 분획물들 중에 에틸아세테이트 분획물은 가장 높은 항돌연변이 및 항암 효과가 있었으므로 NDMA 생성 억제 효과를 알아보기 위해 에틸아세테이트 분획물을 선택하였다. NDMA는 강력한 발암 물질로 아질산염과 아민이 산성조건 하에서 반응하여 생성된다(15). 아질산염, 2급 아민 그리고 시료를 산성조건(pH 2.5)에서 반응시켜 도라지 에틸아세테이트 분획물들이 NDMA 생성에 미치는 영향력을 알아보았고, 그 결과는 Table 3과 같다. 도라지 에틸아세테이트 분획물은 농도 의존적으로 NDMA 생성 억제 효과를 나타내었고, 5 mg/mL 처리군에서는 75.5% NDMA 생성 억제 효과를 나타내었다(Table 3).

Chung 등(14)은 딸기, 마늘 및 케일 주스가 산성조건에서 NDMA 생성을 억제시킨다고 하였고 마늘의 메탄올 분획물은 89% 강한 NDMA 생성 억제 효과를 나타내었다. Kim 등(1)은 인공위액에서 아질산염과 2급 아민을 반응시키면서 유기농 케일즙을 첨가한 결과 케일즙은 강한 NDMA 생성 억제 효과가 있었고, 케일즙은 역시 강한 항돌연변이 효과도

Table 3. Inhibition rate (%) of *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) formation by ethyl acetate fraction from *Platycodon grandiflorum*

Group	Concentration (mg/mL)	NDMA inhibition rate (%)
Control	0	0
Ethyl acetate fraction	0.5	32.0±2.7 ^{c1)}
	1	60.2±5.5 ^b
	5	75.5±6.2 ^a

Values are mean±SD (n=3).

¹⁾Means with the different letters (a-c) within a column are significantly different by Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

있었는데 이는 항돌연변이 효과가 높은 도라지 에틸아세테이트 분획물이 NDMA 생성 억제 효과도 우수하다는 본 연구 결과와 일치하였다.

이상의 결과를 종합해보면 도라지 70% 에탄올 추출물과 분획물들은 항돌연변이원성, 암세포주에 대한 성장 억제 효과 및 항종양 효과를 확인할 수 있었으며, 특히 도라지 에틸아세테이트 분획물과 부탄올 분획물은 다른 분획물에 비해 강한 항돌연변이원성, *in vitro* 및 *in vivo*에서 항암 활성을 나타내었다. 더하여 도라지 에틸아세테이트 분획물을 강한 발암물질인 NDMA 생성 억제 효과를 알아본 결과 강한 NDMA 생성 억제 효과를 나타내었다. 따라서 도라지 에틸아세테이트 분획물은 발암물질인 NDMA 생성 억제, 항돌연변이 효과에 의해 암 발생의 위험을 줄여 주므로 항암 활성을 나타내는 천연 항암 소재로 활용 가능할 수 있다는 것을 제시하였다.

요 약

도라지 추출물과 그것의 분획물들(핵산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물)의 발암물질 *N*-nitrosodimethylamine(NDMA)과 유전독성에 대항하는 안전성, 항돌연변이 및 항암 효과를 연구하였다. 도라지 추출물과 그것의 분획물들의 유전독성학적 안전성 평가를 위한 복귀돌연변이 시험은 *S. Typhimurium* TA98과 TA100의 복귀변이 집락수를 조사하는 Ames test로 수행하였다. 도라지 추출물과 그것의 분획물들은 복귀변이 집락수를 유의적으로 변화시키지 않았고, *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitroso-guanidine과 4-nitroquinoline 1-oxide에 의해 유발된 돌연변이에 대해 농도 의존적으로 돌연변이 억제 효과가 있었다. 도라지 추출물과 그것의 분획물들 중에 에틸아세테이트 분획물이 가장 높은 항돌연변이 효과를 나타내었다. 도라지 70% 에탄올 추출물 및 분획물들은 인간 자궁경부암세포(HeLa), 인간 간암세포(HepG2), 인간 유방암세포(MCF-7) 및 인간 폐암세포(A549) 성장 억제 효과를 나타내었고, 인간 신장정상세포(293)는 암세포보다 억제 효과가 낮았다. 더하여 *in vivo*에서 도라지 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 항암 효과를 검토하기 위하여 Balb/c 마우스에 sarcoma-180 종양세포로

고형암을 유발시키면서 도라지 추출물과 그것의 분획물들의 고형암 성장 억제 효과를 알아본 결과 농도 의존적으로 고형암 성장 억제 효과를 나타냈고 도라지 에틸아세테이트 분획물이 가장 높은 억제 효과를 보였다. 그리고 도라지 에틸아세테이트 분획물은 NDMA 생성을 억제하였다. 따라서 도라지 에틸아세테이트 분획물은 항돌연변이 및 항암 효과가 있었고 현재 실험 조건에서 안전한 새로운 항암 소재 후보라는 것을 알 수 있었다.

감사의 글

이 연구는 세계김치연구소 기관고유사업(KE1501-3)의 연구비 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Kim JD, Lee OH, Lee JS, Jung HY, Kim BK, Park KY. 2014. Safety effects against nitrite and nitrosamine as well as anti-mutagenic potentials of kale and *Angelica keiskei* vegetable juices. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 1207-1216.
- Kim SH, Choi HJ, Chung MJ, Chi CB, Ham SS. 2009. Anti-mutagenic and antitumor effects of *Codonopsis lanceolata* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1205-1301.
- Lee BJ, Jeon SH, Lee SW, Chun HS, Cho YS. 2014. Effect of drying methods on the saponin and mineral contents of *Platycodon grandiflorum* Radix. *Korean J Food Sci Technol* 46: 636-640.
- Jang JR, Hwang SY, Lim SY. 2011. Inhibitory effect of extracts of *Platycodon grandiflorum* (the Ballon Flower) on oxidation and nitric oxide production. *Korean J Food Preserv* 18: 65-71.
- 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.
- Ryu HS. 2014. Effects of water extract from *Platycodon grandiflorum* on mouse immune cell activation *ex vivo* by oral administration. *Korean J Food & Nutr* 27: 99-104.
- Lee SH, Song EM, Jang GY, Li Meishan, Kim MY, Park HJ, Kang TS, Jeong HS. 2013. Physicochemical characteristics and antioxidant activities of *Doragi* (*Platycodon grandiflorum*) at different aging temperatures and for various durations. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1405-1411.
- Shon MY, Seo JK, Kim HJ, Sung NJ. 2001. Antimutagenic effect of extract of *Platycodon grandiflorum*. *Korean J Food Sci Technol* 33: 651-655.
- Chung MJ, Lee SJ, Choi SY, Sung NJ. 2003. Screening of effective components from kale to inhibit N-nitrosodimethylamine formation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 223-229.
- Ames BN, McCann J. 1981. Validation of the *Salmonella* test: a reply to Rinkus and Legator. *Cancer Res* 40: 4192-4196.
- Yahagi T, Nagao M, Seino Y, Matsushima T, Sugimura T. 1977. Mutagenicities of N-nitrosamines on *Salmonella*. *Mutat Res* 48: 121-129.
- Maron DM, Ames BN. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 113: 173-215.
- Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney 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: 4827-4833.
- Chung MJ, Lee SH, Sung NJ. 2002. Inhibitory effect of whole strawberries, garlic juice or kale juice on endogenous formation of N-nitrosodimethylamine in humans. *Cancer Lett* 182: 1-10.
- Huang YH, Jung DW, Kang IJ. 2014. Genotoxicological safety evaluation of imported oranges irradiated with ionizing energy. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 909-915.
- Cho HJ, Yoon HJ, Park KH, Lee JB, Shim CK, Kim JH, Jeong MH, Oh JA, Kim DH, Paik MK. 2013. *In vitro* anti-mutagenic and genotoxic effects of *Sophora Radix* extracts. *Korean J Pesticide Science* 17: 335-342.
- 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.
- Martínez-Vázquez M, González-Esquinca AR, Cazares Luna L, Moreno Gutiérrez MN, García-Argáez AN. 1999. Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K. *J Ethnopharmacol* 66: 79-82.
- Jun HI, Kim YA, Kim YS. 2014. Antioxidant activities of *Rubus coreanus* Miquel and *Morus alba* L. fruits. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 381-388.