

솔잎 수액 증류액의 암세포주에 대한 *in vitro* 세포독성

정영진[†] · 배명원 · 정명일 · 이지선* · 정경수*

충남대학교 식품영양학과

*충남대학교 약학과

Cytotoxic Effect of the Distilled Pine-Needle Extracts on Several Cancer Cell Lines *in vitro*

Young-Jin Chung[†], Myung-Won Bae, Myoung-II Chung
Ji-Seon Lee* and Kyeong-Soo Chung*

Dept. of Food and Nutrition, and

*Dept. of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Abstract

This study was performed to examine the cytotoxic effects of the distilled pine-needle extracts against several cancer cell lines. First, cell lines including mice leukemic cancer cell line (L1210), sarcoma 180 and human monocyte-like cancer cells (U937) were tested using XTT methods *in vitro*. Pine-needle extracts were prepared by pressing the pine needles and distilling it at below 98°C and then added to the growth medium in a final dilution of 10, 20, and 40 times. Growth of three kinds of cancer cells was significantly inhibited by more than 50% with the addition of the extracts. Fifty six to seventy six % of inhibition was shown with the 40 times dilution of the extracts. Greater inhibition was achieved with the 20 times dilution (81~90%) and the 10 times dilution (77~89%) of the extracts. Next, other human cancer cell lines including 3 kinds of breast cancer cell lines (T47D, MDA-MB-231 and MH7A) and one hepatoma cell line (SNU-354) were tested with the 20 times dilution of the extract. T47D and MDA-MB-231 cell lines showed lower inhibition (12%) with the addition of the extract. However, MH7A and SNU-354 cell lines showed 64% and 72% inhibition with the extract, respectively. These results suggest that the distilled pine-needle extracts have strong cytotoxic effect on certain cancer cell lines and the intensity of the effect may vary depending on the process of the pine needle.

Key words: distilled pine-needle extracts, cytotoxicity, cancer cell lines, XTT assay

서 론

국민의 전반적인 삶의 질이 향상되고, 식생활이 서구화되면서 질병의 양상도 크게 바뀌어 영양부족으로 인한 질환은 감소한 반면, 비만, 관상동맥질환, 암과 같은 만성퇴행성질환은 크게 증가하고 있다. 특히 이들 만성퇴행성질환 중에서도 암은 서구 선진국은 물론 국내에서도 꾸준히 증가하고 있지만 발암 기전은 아직 명확히 밝혀지지 않고 있으며, 각종 암은 조기에 발견되어 치료하지 않으면 완치율이 매우 낮은 질병으로 아직 현대 의학은 이에 대한 확실한 치료방법을 제시하지 못하고 있다(1,2). 이에 암의 원인을 규명하고, 치료방법을 찾고자 하는 노력들이 계속되고 있으며, 특히 천연과 전통 식품 및 한약재를 대상으로 새로운 항암성분을 찾으려는 노력이 계속되고 있다(3-7). 항암 또는 항종양 물질을 검색하는 방법으로는 발암물질 분해능 실험, 암세포주를 이용한 *in vitro* 세포독성실험, 실험동물을 이용한 *in vivo* 항암실험, 면역화학적 접근법 등의

다양한 방법이 이용되고 있다(8).

솔잎은 신비의 약초라 불리울 만큼 예로부터 민간요법에서 약용과 건강식품으로 널리 이용되어 왔으며(9), 솔잎의 효능에 관한 구체적인 연구로는 건조한 솔잎 분말의 에틸아세테이트 및 부탄올 분획이 강한 항노화 작용을 하는 것으로 보고되었고(10,11), 솔잎의 열수 추출물과 에틸아세테이트, 에탄올 분획이 강한 항산화 작용을 한다는 연구(12,13) 결과도 있다. 건조한 솔잎의 에탄올 추출물이 높은 돌연변이 억제효과(14,15) 및 항균효과(16-18)를 지니고 있음을 보고한 논문도 있으며 최근에는 암에 대한 관심이 고조되면서 항암효과를 가진 물질을 천연에서 찾고자하는 노력이 계속되고 있는 가운데 솔잎에 대한 관심도 증대되어 연구가 활발히 이루어지고 있는 추세이다. 현재까지 이루어진 솔잎의 세포독성 및 항암효과에 대한 연구로는 건조한 솔잎 분말 및 열수 추출물이 *in vitro*에서 세포독성을 나타냈으며(19-21), 건조한 솔잎 분말의 에탄올 추출물을 기존 항암제에 첨가하여 마우스에 먹였을 때 항암작용의 상승

[†]Corresponding author. E-mail: yjchung@cnu.ac.kr
Phone: 82-42-821-6833, Fax: 82-42-822-8283

효과를 나타내었다는 보고(21)가 있다. 그러나 건조시키지 않은 솔잎 수액의 항암효과에 대해서는 아직 보고된 바 없으며, 선행 연구는 모두 건조된 솔잎 분말을 출발 시료로 하고 있기 때문에 건조과정에서 휘발성 방향성분들의 많은 부분이 소실되었을 가능성이 있다. 즉, 솔잎의 주요 생리활성 물질들은 건조과정에서 소실되기 쉬운 휘발성 방향성분으로 볼 수 있으므로 본 연구는 건조 분말 과정을 거치지 않은 솔잎액의 효과를 연구하기 위하여 솔잎으로부터 수액을 분리하여 얻은 수액을 증류한 솔잎 수액 증류액의 항암효과를 *in vitro*에서의 세포독성 실험을 통해 살펴보았다.

재료 및 방법

시료

충남 태안산 흑송(*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc)의 잎을 채취, 깨끗한 물로 씻은 후 솔잎 표면의 수분을 완전히 제거하고 고압 프레스로 가압·압착하여 솔잎 수액을 얻었다(수득률 35.5%). 이 솔잎 수액을 증류솥에 넣고 온도를 일정하게 유지시키며 증류하되 수증기 토출 배관을 통해 나오는 증류액을 냉각장치에 연결하여 솔잎 수액 증류액 원액(수득률 26.2%)을 얻고 이를 5배 농축하여 시료로 사용하였다. 원액의 제조는 (주)신호 바이오텍에서 행하였다.

세포주 및 세포주 배양

실험에 이용한 세포주는 쥐 백혈병 세포주인 L1210, 쥐 육종 암세포인 sarcoma 180, 사람의 monocyte-like cancer cell인 U937, 사람의 유방암 세포주인 T47D, MDA-MB-231, MH7A 및 사람 간암 세포주인 SNU-354 등 총 7종이다. 암세포의 배양은 RPMI 1640 배지(Gibco, USA)에 fetal bovine serum(FBS: Gibco, USA) 10%를 첨가하고 penicillin(Sigma, USA) 100 U/mL와 streptomycin(Sigma, USA) 100 µg/mL가 섞인 배양액을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기(Forma 3546, Forma Scientific Inc., USA)에서 48시간 동안 배양하였다.

암세포주에 대한 세포독성 실험

T-75 culture flask에 자란 각 암세포주를 PBS(phosphate buffered saline)로 세척한 후 10% FBS-phenol red-free RPMI 1640 배지(Gibco, USA)에 현탁시킨 후 1,800 rpm에서 5분간 원심분리 후 상층액을 제거하여 얻은 세포를 96 well culture plate에 세포현탁액 100 µL를 가하고, 솔잎 수액 증류액을 동일한 배지(10% FBS-phenol red-free RPMI 1640)로 희석하여 50 µL를 첨가하여 세포의 최종농도가 5×10^4 cells/mL이 되도록 하였고, 시료의 최종 농도는 원액대비 10배, 20배, 40배 희석되게 하였다. 대조군은 솔잎 수액 증류액 대신 RPMI 1640 배지를 가하였다. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양한 후 XTT(sodium 3'-[1-[(phenylamino)-carbonyl]-3, 4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene-sulfonic acid hydrate)(Sigma, USA) 용액을 50 µL씩 가하고 2시간 더 배양하였다.

발색정도는 ELISA reader(THEROMmax microplate reader, Molecular Devices, USA)로 490 nm 및 650 nm에서 흡광도를 각각 측정하고 흡광도의 차이를 구하여 살아있는 세포수로 간주하였으며, 이로부터 세포독성을 확인하였다(22). XTT는 살아있는 세포내에서 효소분해되어 노란색을 띠는 시약으로 세포독성을 측정하기 위해 널리 사용되던 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)와 같은 원리를 이용한 것이다. 그러나 MTT와 달리 XTT는 수용성 formazan을 만들기 때문에 용매를 사용하여 추출하는 단계를 거칠 필요가 없어서 편리할 뿐만 아니라 발색이 충분치 않을 경우 추가 배양하여 발색도를 최대화시킬 수 있다는 장점이 있다(23).

통계처리

실험결과는 SPSS Package(version 10.0)을 이용하여 실험군당 평균±표준편차로 표시하였으며, 각 군간 유의성은 one-way ANOVA로 사전 검증한 후 Duncan's multiple range test에 의해 사후 검정하였다.

결과 및 고찰

쥐 백혈병 세포주 L1210 증식 억제 효과

본 실험에 사용된 솔잎 수액 증류액 시료는 맑은 액체상태로서, 솔잎 수액 증류액 원액 10 mL를 동결건조한 결과 1 mg의 고형분을 얻을 수 있었다. 따라서 솔잎 수액 증류액의 원액은 100 µg/mL의 농도이며 최종 사용된 솔잎 시료는 이를 5배 농축한 500 µg/mL의 농도이다. 10배 희석액의 농도는 50 µg/mL, 20배 희석액은 25 µg/mL, 40배 희석액은 12.5 µg/mL의 농도이다. 쥐 백혈병 세포주인 L1210 암세포 증식에 미치는 영향을 XTT법으로 실험한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 솔잎 수액 증류액을 가한 실험군에서 암세포의 생존율이 유의적으로($p < 0.001$) 현저히 감소하였다. 즉, 솔잎 수액 증류액을 40배 희석하여 넣은 경우 생존한 암세포수가 대조군의 24%에 머물러서 현저한 억제효과(암세포 성장 억제율 76%)를 나타내었고, 20배 희석한 경우에는 생존 암세포수가 대조군의 18%(암세포 성장 억제율 82%)였으며, 최고농도인 10배 희석의 경우에는 생존 암세포수가 11%(암세포 성장 억제율 89%)를 나타내었다. 즉, 솔잎 수액 증류액의 농도가 증가함에 따라 암세포 성장 억제 효과도 증가한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 동일한 암세포주인 L1210에 대해 독성효과를 비교한 된장 및 청국장 메탄올 추출물의 경우 250 µg/mL의 처리 농도에서 L1210의 성장을 50% 이상 억제한 것으로 나타난 Chung 등(24)의 연구 결과와 비교해볼 때 40배 희석액인 12.5 µg/mL의 낮은 솔잎 수액 증류액 농도에서도 76% 이상의 억제효과를 나타내, 쥐 백혈병 세포주인 L1210에 대해 강한 세포독성을 갖는 것으로 나타났다. 또한 Moon 등(21)의 연구에서 채취한 솔잎의 methanol 추출물을 감압농축장치에서 용매를 모두 제거한 용

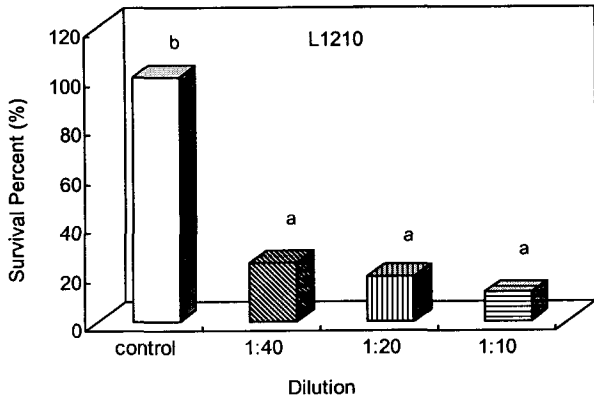


Fig. 1. Cytotoxicity of the distilled pine-needle extracts on mouse leukemia L1210 cells by XTT assay.

The cancer cells (5×10^4 cells/mL) were cultured in 5% CO₂ incubator at 37°C for 48 hrs, and the distilled pine-needle extracts (final dilution of 1 : 40, 1 : 20, and 1 : 10) was added and incubated at 37°C, 5% CO₂ for 48 hrs. Viable cells were measured by the XTT method. The number of viable cells in the control (no addition of the pine-needle extracts) was set to 100%.

Survival percent was calculated according to the following formula:

$$\% \text{ survival} = \frac{A_{\text{test}} - A_{\text{control}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

$$A = A_{650} - A_{490}$$

^{a,b}Values with different alphabets are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

액의 dichloromethane 추출물, ethyl acetate 추출물, 증류수 추출물 중 효과가 가장 좋았던 증류수 추출물이 L1210에 대해 50% 억제효과를 나타내는 농도가 250 µg/mL임과 비교해볼 때에도 술잎 수액 증류액이 상대적으로 낮은 농도에서 강한 세포독성을 갖는 것을 알 수 있었다. 즉, 술잎을 시료로 하되 메탄을 추출 과정을 거친 후 다시 증류수로 추출한 경우보다 본 연구에서 사용한 술잎 수액을 증류하여 얻은 술잎 수액 증류액의 세포독성이 약 10배정도 더 강한 것으로 나타났다. 이는 추출과정중에 일부 술잎성분이 소실된 때문으로 추측된다.

쥐 육종암세포인 sarcoma 180 증식 억제효과

쥐 육종암세포인 sarcoma 180에 대한 술잎 수액 증류액의 세포독성을 분석한 결과, Fig. 2에서 보듯이 술잎 수액 증류액을 처리한 군은 강한 세포독성을 나타내어($p < 0.001$) 쥐 육종암 세포 성장이 억제되었다. 즉, 술잎 수액 증류액 40배 희석군은 생존한 암세포수가 대조군의 39%에 머물러서 61%의 억제율을 나타내었고, 20배 희석군은 암세포수가 10%(암세포 성장 억제율 90%), 10배 희석군은 11%(암세포 성장 억제율 89%)로서 20배 희석군 및 10배 희석군이 농도가 낮은 40배 희석군에 비해 훨씬 더 강한 세포독성을 나타내었다. 본 실험과 동일한 암세포주인 sarcoma 180에 대한 세포독성을 연구한 Moon 등 (25)의 결과에서 감잎이 sarcoma 180 암세포주에 대해 감잎 hexane 분획물의 경우 0.5 mg/mL의 농도에서 90% 수준의 억제율을 나타내고, 감잎 chloroform 분획물의 경우 0.1 mg/

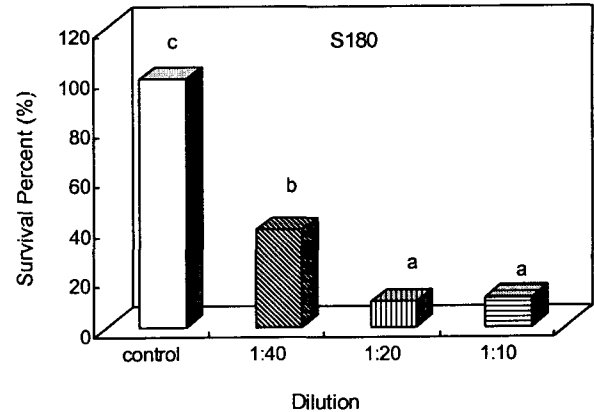


Fig. 2. Cytotoxicity of the distilled pine-needle extracts on sarcoma 180 cells by XTT assay.

The cancer cells (5×10^4 cells/mL) were cultured in 5% CO₂ incubator at 37°C for 48 hrs, and the distilled pine-needle extracts (final dilution of 1 : 40, 1 : 20, and 1 : 10) was mixed and incubated at 37°C, 5% CO₂ for 48 hrs. Viable cells were measured by the XTT method. The number of viable cells in the control (no addition of the pine-needle extracts) was set to 100%.

Survival percent was calculated according to the following formula:

$$\% \text{ survival} = \frac{A_{\text{test}} - A_{\text{control}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

$$A = A_{650} - A_{490}$$

^aValues with different alphabets are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

mL 농도에서 88.1%의 억제율을 나타낸 것과 비교할 때 본 실험에서 사용한 술잎시료는 20배 희석액인 25 µg/mL의 농도에서 90%의 억제율을 나타냄으로써 술잎 수액 증류액의 암세포 성장 억제 효과가 매우 큼을 알 수 있었다.

인체 monocyte-like cancer cell인 U937 증식 억제 효과

술잎 수액 증류액이 U937에 미치는 세포독성을 분석한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 대조군에 비해 술잎 수액 증류액을 처리한 경우 U937 암세포주에 대해 강한 세포독성을 나타내었다($p < 0.001$). 술잎 수액 증류액 40배 희석군은 암세포수가 대조군의 44%로서 56%의 억제율을, 20배 희석군은 대조군의 19%(암세포 성장 억제율 81%), 그리고 10배 희석군은 대조군의 23%의 세포수(암세포 성장 억제율 77%)를 나타내었다. 즉, 술잎 수액 증류액의 농도가 낮은 40배 희석군의 경우 암세포 성장 억제율이 56%에 머물렀으나, 고농도인 20배와 10배 희석군의 경우 암세포의 성장이 각각 81%, 77%로 크게 억제되었다. 본 연구에서는 25 µg/mL의 농도에서 81%의 세포 성장 억제효과를 나타냈으나, 같은 U937에 대한 세포독성에 미치는 영향을 간암, 폐암 같은 종양에 탁월한 효과를 나타내는 식물로 알려진 (26) 권백을 사용하여 Park과 Rhee(27)가 연구한 결과 10 mg/mL의 농도에서 84%의 세포독성을 나타내었다고 함으로써 monocyte-like cancer cell인 U937에 대해서도 술잎 수액 증류액이 강한 세포독성을 가짐을 알 수 있었다.

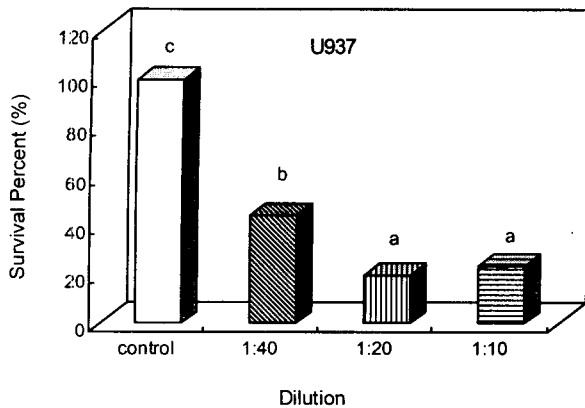


Fig. 3. Cytotoxicity of the distilled pine-needle extracts on U937 cells by XTT assay.

The cancer cells (5×10^4 cells/mL) were cultured in 5% CO₂ incubator at 37°C for 48 hrs, and the distilled pine-needle extracts (final dilution of 1 : 40, 1 : 20, and 1 : 10) was mixed and incubated at 37°C, 5% CO₂ for 48 hrs. Viable cells were measured by the XTT method. The number of viable cells in the control (no addition of the pine-needle extracts) was set to 100%.

Survival percent was calculated according to the following formula:

$$\% \text{ survival} = \frac{A_{\text{test}} - A_{\text{control}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

$$A = A_{650} - A_{490}$$

^{ab}Values with different alphabets are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

인체 유방암 세포주와 간암 세포주의 증식억제 효과

솔잎 수액 증류액이 다른 종류의 인체 암세포 증식에 미치는 효과를 알아보기 위하여 3종의 유방암 세포주(T47D, MDA-MB-231, MH7A)와 간암 세포주(SNU-354)를 대상으로 솔잎 수액의 세포 독성효과를 알아보았다. 위의 3가지 암세포주(L1210, S180, U937)에 대한 세포독성 연구에서 솔잎 수액 원액을 40배, 20배, 10배로 희석하였을 때 40배 희석에 비해서는 20배와 10배 희석에서 독성효과가 더 뛰어났고, 20배 희석에서는 10배 희석보다 효과 면에서 떨어지지 않는 것으로 나타나 인체 유방암 세포주와 간암 세포주에 대한 세포독성 실험에서는 20배 희석의 한 농도에 대해서만 시험하였다. 그 결과 유방암 세포주인 T47D와 MDA-MB-231의 경우에는 솔잎 수액 증류액에 의한 세포증식 억제율이 12%로 낮았으나, MH7A 유방암 세포주와 SNU-354 간암 세포주의 증식 억제율은 각각 64%와 72%로 높았다(Table 1). 인체 암세포주 중 특히 솔잎 수액 증류액에 의해 성장이 크게 억제된 SNU-354 세포주는 대부분의 기존 항암제에 내성을 나타내는 암세포(28) 본 실험에서 사용한 시료인 솔잎 수액 증류액이 SNU-354 세포주에 대해 강한 세포독성을 나타냄으로써 기존 항암제에 의해 내성을 가진 암세포주의 성장을 억제할 수 있음을 확인하였다. 또한 Kim 등(20)의 연구에서 솔잎을 채취하여 물로 씻은 후 풍건하여 에탄올 추출한 솔잎이 인체 유방암(MCF-7)과 간암세포주(Hep3B)의 세포독성에 미치는 영향을 조사한 결과 본 실험에서 사용한 세포주와는 다르지만 같은 인체 유방암 세포주인 MCF-7의 성장

Table 1. Anti-proliferative effects of pine-needle extracts on the human breast and liver cancer cell lines

Cell line	T47D	MDA-MB-231	MH7A	SNU-354
Inhibition (%) ¹⁾	12	12	64	72

The cancer cells (5×10^4 cells/mL) were cultured in 5% CO₂ incubator at 37°C for 48 hrs, and incubated at 37°C, 5% CO₂ for 48 hrs in the media containing pine-needle extracts diluted by 20 times. Viable cells were measured by the XTT method. The number of viable cells in the control (no addition of the extracts) was set to 100 and then survival percent of the cells in the test was calculated according to the following formula:

$$\% \text{ survival} = \frac{A_{\text{test}} - A_{\text{control}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

$$A = A_{650} - A_{490}$$

¹⁾Inhibition % was calculated by the subtraction of the survival % from 100.

을 50% 억제하는 농도는 241 µg/mL이었으며, 간암세포인 Hep 3B의 성장을 50% 억제하는 농도는 211 µg/mL이었다고 하였다. 본 실험 결과, 솔잎을 분말화하지 않고 가압·압착하여 얻은 수액을 증류한 솔잎 수액 증류액이 25 µg/mL의 농도에서 유방암 세포주인 MH7A의 성장을 64%, 간암 세포주인 SNU-354의 성장을 72% 억제함으로써 본 시료인 솔잎 수액 증류액은 매우 낮은 농도에서도 인체 유방암(MH7A)과 간암 세포주(SNU-354)의 성장을 크게 억제함을 알 수 있었다.

솔잎 수액 증류액의 농도별로 암세포주 증식 억제효과를 살펴 보았을 때 농도가 가장 낮은 40배 희석액의 경우 sarcoma 180, U937 암세포주에 비해 쥐 백혈병 세포주인 L1210의 성장 억제효과가 가장 좋았으며, 고농도의 10배 희석액에서는 L1210과 쥐 육종암 세포주인 sarcoma 180에 대한 억제 효과가 U937보다 컸으나 U937도 77%의 억제효과를 나타내어 고농도에서 강한 세포독성을 보였다. 또한 중간 농도인 20배 희석액에서의 인체 유방암 세포주와 간암 세포주들의 성장억제 효과를 비교했을 때 인체 유방암 세포주인 MH7A와 간암 세포주인 SNU-354는 각각 64%, 72%의 억제효과를 보인 반면 또다른 인체 유방암 세포주 T47D와 MDA-MB-231에 대한 세포독성은 12%에 불과하여 동일한 솔잎 증류액의 농도에서도 암세포주의 종류에 따라 성장 억제율이 달랐다.

요 약

한국산 솔잎을 가압·압착하여 얻은 수액을 증류한 솔잎 수액 증류액의 각종 암세포주에 대한 *in vitro* 세포독성을 시료액 대비 10배, 20배, 40배 희석군과 대조군에 대해 XTT법으로 실험한 결과, 쥐 백혈병 세포주인 L1210에 대해서는 76~89%, 쥐 육종암세포인 sarcoma 180에 대해서는 61~90%의 세포성장 억제효과를 나타내었다. 또한 인체의 monocyte-like cancer cell인 U937에 대해서는 56~81%, 인체 유방암 세포주인 T47D와 MDA-MB-231에서는 각기 12%, 또 다른 유방암 세포주인 MH7A에서는 64%, 인체 간암 세포주인 SNU-354에

대해서는 72%의 높은 세포 증식 억제효과를 나타내었다. 이로써 본 연구 시료인 술잎 수액 증류액은 쥐 백혈병 세포주인 L1210, 쥐 육종암세포인 sarcoma 180, 인체 monocyte-like cancer cell인 U937, 인체 유방암 세포주인 MH7A, 인체 간암 세포주인 SNU-354에 대해 강한 세포독성을 갖는 것을 알 수 있었다. 이와 함께 술잎 수액 증류액의 암세포에 대한 독성효과는 술잎의 처리과정에 따라 다를 수 있으며, 또한 동일한 술잎 수액 증류액의 농도에서도 암세포주 종류에 따라 세포독성정도가 다를 수 있었다. 따라서 최적 투여 농도와 적용 암세포주를 찾을 경우 새로운 항암제로 개발될 수 있음을 제시하였다.

문 헌

- Shin HK. 1997. The development of functional food and research trends. *Food Sci and Industry* 30: 2-13.
- Choe M. 1991. Dietary fats and cancer. *J Korean Soc Food Nutr* 20: 513-518.
- Murakami A, Ohigashi H, Koshimizu K. 1996. Anti-tumor promotion with food phytochemicals: a strategy for cancer chemoprevention. *Biosci Biotech Biochem* 60: 1-8.
- Steinmetz KA, Potter JD. 1991. Vegetable, fruit and cancer II mechanisms. *Cancer Causes Control* 2: 427-442.
- Newmark HL. 1996. Plant phenolics as potential cancer prevention agents. *Adv Exp Med Biol* 401: 25-34.
- Dragsted LO, Strube M, Larsen JC. 1993. Cancer-protective factor in fruits and vegetables: biochemical and biological background. *Pharmacol Toxicol* 72: 116-135.
- Azuine MA, Goswami UC, Kayal JJ, Bhide SV. 1992. Antimutagenic and anticarcinogenic effects of carotenoids and dietary palm oil. *Nutr Cancer* 17: 287-295.
- Seo YJ. 1997. Chemoprevention of cancer with foods. *Food Sci and Industry* 30: 59-63.
- Yoon SU. 1997. *Pine tree and naturopathy*. Academy book, Seoul. p 40-43.
- Choi JH, Kim DI, Park SH, Kim DW, Lee JH, Kim HS. 2001. Investigation of anti-aging effect and determination of chemical structure of pine needle (*Pinus densiflora*) through animal experiment. III. Effects of butanol fraction on oxygen radicals and their scavenger enzymes in brain of SD rats. *Korean J Gerontol* 11: 7-13.
- Choi JH, Kim DI, Park SH, Kim DW, Lee JH, Kim HS. 2001. Investigation of anti-aging effect and determination of chemical structure of pine needle (*Pinus densiflora*) through animal experiment. IV. Effects of ethyl acetate fraction on oxygen radicals and their scavenger enzymes in brain of SD rats. *Korean J Gerontol* 11: 7-13.
- Kim SM, Cho YS, Kim EJ, Bae MJ, Han JP, Lee SH, Sung SK. 1998. Effect of hot water extracts of *Salvia miltiorrhiza* Bge., *Prunus persica* Stokes, *Angelica gigas* Nakai and *Pinus strobus* on lipid oxidation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 399-405.
- Kang YH, Park YK, Oh SR, Moon KD. 1995. Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. *Korea J Food Sci Technol* 27: 978-984.
- Kim EJ, Choi KP, Ham SS, Kang HY. 1998. Inhibitory effect of pine needle extracts on the chemically induced mutagenicity. *Korean J Food Sci Technol* 30: 450-455.
- Kong Z, Liu Z, Ding B. 1995. Study on antimutagenic effect of pine needle extract. *Mutat Res* 347: 101-104.
- Choi EJ, Lee E, Rhim TJ, Cha BC, Park HJ. 1997. Antimicrobial activities of pine needle (*Pinus densiflora*) extract. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* 25: 293-297.
- Park CS. 1998. Antibacterial activity of ethanol extract of pine needle against pathogenic bacteria. *Korean J Postharvest Sci Technol* 5: 380-385.
- Kuk JH, Ma SJ, Park KH. 1997. Isolation and characterization of benzoic acid with antimicrobial activity from needle of *Pinus densiflora*. *Korean J Food Sci Technol* 29: 204-210.
- Kobayashi N, Unten S, Kakuta H, Komatsu N, Fujimaki M, Satoh K, Aratsu C, Nakashima H, Kikuchi H, Ochiai K, Sakagami H. 2001. Diverse biological activities of healthy foods. *In vivo* 15: 17-23.
- Kim EJ, Jung SW, Choi KP, Ham SS. 1998. Cytotoxic effect of the pine needle extracts. *Korean J Food Sci Technol* 30: 213-217.
- Moon JJ, Han YB, Kim JS. 1993. Studies on antitumor effects of pine needles, *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc. *Korean Vet Res* 33: 701-710.
- Chan EW, Cheng SC, Sin FW. 2001. Triptolide induced cytotoxic effects on human promyelocytic leukemia, T cell lymphoma and human hepatocellular carcinoma cell lines. *Toxicology Letters* 122: 81-87.
- 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: 4927-4833.
- Chung KS, Yoon KD, Kwon DJ, Hong SS, Choi SY. 1997. Cytotoxicity testing of fermented soybean products with various tumour cells using MTT assay. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 25: 477-482.
- Moon SH, Kim KH, Park KY. 1996. Antitumor effect of per-simmon leaves *in vivo* using Sarcoma-180 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 25: 865-870.
- Lee IR, Song JY, Lee YS. 1992. Cytotoxicity of folkloric medicine and human cancer cells. *Kor J Pharmacogn* 23: 132-136.
- Park SH, Rhee IJ. 1994. Effect of *Selaginella tamariscina* on U937 cytotoxicity. *J Korean Soc Food Nutr* 23: 799-804.
- Park JG, Hyun JW, Lim KH, Shin JE. 1993. Antineoplastic effect of extracts from traditional medicinal plants. *Kor J Pharmacogn* 24: 223-230.

(2002년 3월 18일 접수; 2002년 6월 29일 채택)