

솔잎 열수 증류액의 생리활성 효과

이효진 · 최승필¹ · 최형택² · 김수현 · 함영안 · 이득식³ · 함승시^{*}

강원대학교 바이오산업공학부, ¹연변대학 농학원 식품과학학부, ²(주)신원에프아이, ³동해대학교 외식산업학과

Biological Activities of the Vaporized Liquid of Water-boiled Pine Needle

Hyo-Jin Lee, Cheng-Bi Cui¹, Hyung-Taek Choi², Soo-Hyun Kim,
Young-An Ham, Deuk-Sik Lee³ and Seung-Shi Ham^{*}

School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

¹Department of Food Science and Engineering, Agricultural College of Yanbian University, Longjing 133-400, China

²Shin Won Food Industry Co., LTD. Hwasung, Kyunggi-do 445-940, Korea

³Department of Food Service Industry, Dong Hae University, Dong Hae 240-150, Korea

Abstract

This study was performed to determine the antioxidative, antimutagenic, and anticancer effects of vaporized liquid of water-boiled pine needle(VLP) using DPPH free radical donating method, Ames test, and cytotoxicity. VLP showed the highest electron donating activities (18.4 μ L). The inhibition rate of VLP (200 μ L/plate) in the *Salmonella typhimurium* TA100 strain showed 45.9% inhibition against the mutagenesis induced by MNNG. In addition, the suppression of with same concentration of VLP in the *S. typhimurium* TA100 strains showed 85.5% inhibition against 4NQO, respectively. The suppressions under the same condition against Trp-P-1 in the TA98 and TA100 strains were 91.0% and 62.1%, respectively. The cytotoxic effects of VLP against the cell lines with human lung carcinoma (A549), human hepatocellular carcinoma (HepG2), human gastric carcinoma (AGS), human breast adenocarcinoma (MCF-7) and human cervical adenocarcinoma (HeLa) were inhibited with increase of the VLP concentration. The treatment of 50 μ L/well VLP showed strong cytotoxicities of 78.7%, 90.3%, 90.8%, 62.3% and 93.7% against A549, HepG2, AGS, MCF-7 and HeLa, respectively.

Key words : Vaporized liquid of water-boiled pine needle, antioxidation, antimutagenicity, cytotoxicity

서 론

식생활의 변화와 삶의 질의 향상에 따라 건강 지향적인 식품개발이 활발히 진행되고 있다. 우리가 일반적으로 섭취하고 있는 식용식물에는 비타민, 미네랄, 폴리페놀류 등 건강유지에 중요한 대사산물이 포함되어 있으며(1) 이러한 대사산물이 발암과 노화를 예방한다는 기능성 연구가 보고되어 있다(2). 특히 최근 식물이 가지고 있는 phytochemical의 생체조절 기능에 대한 관심이 높아지면서 이에 대한

연구가 활발히 진행이 되어 식물성 식품에 함유되어 있는 phenolic compound, alkaloids, terpenes, steroids, carotenes 등 광범위한 화합물들이 인체의 신진대사 조절 능력을 가지고 있으며 암과 순환기 계통 질환에 대해서 예방 및 치료 효과를 나타낸다는 사실이 밝혀지고 있다(3,4). 이러한 식용식물 중의 솔잎은 예로부터 구황식물로 이용되어 왔으며 솔잎에는 엽록소, 비타민 A와 비타민 C가 함유되어 있으며, 그 외에도 단백질, 지방, 인, 철, 효소, 정유(식물성 휘발유, 테르펜 계열), 미네랄 등이 함유되어 있으며, 체내의 노폐물을 배출시켜 신진대사를 활발하게 하는 성분들이 함유되어 있다고 알려져 있다(5). 그 중 잎에 대한 이용으로는 대부분

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

신선한 솔잎을 그대로 사용해 왔는데 비타민 C의 원료로 괴혈병과 어린이의 영양 실조증에 이용되었고 잎에서 얻은 정유는 공기 정화제를 제조하는데 이용되었으며 또한 솔잎차를 만들어 신경통, 관절염, 팔다리마비, 동맥경화증 등의 치료에 사용되었던 기록이 전해져 오고 있다(6,7). 따라서 최근에는 솔잎에 대한 연구도 활발히 진행되고 있는데 그 연구로는 솔잎 첨가 식이가 흰쥐의 지질대사에 미치는 영향(8), 항균작용(9), 항암작용(10)등 보고가 있었으며 Moo 등(11)은 솔잎으로부터 free radical 소거작용이 뛰어난 항산화성분을 분리한 바가 있다. 그러나 솔잎을 기능성 식품소재로 활용하고자하는 평가는 이루어지고는 있으나 아직까지 미비한 실정이다.

이에 본 논문에서는 솔잎 열수 증류액의 생리활성 효과를 검토하였기에 이에 대해 보고하고자 한다.

시료의 조제

시료의 조제는 인제군, 횡성군 일대에서 적송 (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc)의 잎을 채취하여 깨끗이 물로 세척한 다음 표면의 물기를 완전히 제거한 다음 절단하여 시료와 물을 1:1 (v/v)의 비율로 혼합하였다. 이것을 20°C에서 1~2분간 가열 후 12시간 방치하였고 대기압 하에서 증류탱크에 넣고 100°C의 온도를 일정하게 유지시키며 1시간 20분 동안 가열하였다. 다시 110°C에서 1시간, 120°C에서 40분간 가열하여 농축기 벨브를 열면서 이때 증발되어 나오는 수증기를 냉각장치에 연결하여 솔잎 열수 증류액을 얻었다.

시약

직접 돌연변이원 (direct mutagen)으로서 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO), N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine (MNNG)은 미국 Sigma사, 간접 돌연변이원인 benzo(a)pyrene (B(a)P)과 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido-(4,3-b)indol (Trp-P-1)은 일본 和光純藥의 특급시약을 구입하여 사용하였다. 세포 배양에 필요한 배지로 RPMI 1640과 Hepes buffer, Fetal bovine serum (FBS), Trypsin-EDTA는 Gibco사 (U.S.A.)로부터 구입하였다. 본 실험에 이용된 인간 폐암세포 A549 (Lung carcinoma, Human), 인간 위암세포 AGS (Gastric carcinoma, Human), 인간의 유방암세포 MCF-7 (Breast adenocarcinoma, Human), 자궁암세포인 HeLa (Cervical adenocarcinoma, Human) 및 간암세포인 HepG2 (Hepatocellular carcinoma, Human)는 Korea Cell Line Bank (KCLB)로부터 구입하여 본 실험실에서 배양하면서 실험에 사용하였다.

수소전자공여능 (Electron donating ability)에 의한 항산화 활성

솔잎 열수 증류액은 Choi 등(12)의 방법에 의한 수소전자공여능에 의해 항산화 활성을 측정하였다. 솔잎 열수 증류

액은 원액 그대로 사용하였으며 BHA와 α -tocopherol은 각각 1 mg 을 methanol 10 ml에 용해하여 사용하였다. 4 mL methanol이 담겨 있는 실험관에 각 시료 용액 20 μ L, 40 μ L, 60 μ L, 80 μ L, 100 μ L를 각각 첨가 한 후 1.5×10^{-4} M 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl solution (in methanol) 을 1 ml를 첨가하여 30분간 암소에 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 수소전자공여능은 각 실험을 3회 반복하였으며 RC_{50} 은 시료가 대조구의 흡광도를 1/2로 감소시키는 농도로 표시하였으며, 검체의 농도에 따른 수소전자공여능 검정 (standard curve)을 통해 결정하였다.

돌연변이원성 실험

솔잎 열수 증류액의 돌연변이원성 실험은 *S. typhimurium*의 변이주인 TA98과 TA100을 이용하여 Ames test를 개량한 preincubation법(13)으로 실시하였다. 건열 멸균시킨 glass cap tube에 시료를 50 μ L/plate씩 가하고 여기에 전배양시킨 배양 균액 100 μ L를 가한 다음 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)로 전체량이 700 μ L가 되도록 하였다. 이것을 37°C에서 20분간 진탕 배양한 다음 histidine/biotin이 첨가된 top agar (45°C)를 2 mL씩 가하여 잘 혼합한 후 미리 조제해 놓은 minimal glucose agar plate상에 도말하고 평판 고정화 시켜 37°C에서 48시간 배양하여 생성된 복귀돌연변이 (his^+ revertant colony)수를 측정하여 돌연변이원성의 유무를 판정하였다.

항돌연변이원성 실험

Ames test를 개량한 preincubation법에 따라 항돌연변이원성 실험을 실시하였고, 실험에 사용한 변이원물질은 4NQO, MNNG, B(a)P 및 Trp-P-1이다. 건열 멸균시킨 glass cap tube에 시료를 각각 50 μ L, 100 μ L, 150 μ L, 200 μ L씩 각각 첨가하고 이어서 변이원 물질을 각각 50 μ L씩 첨가하였다. 간접 변이원인 경우 10% S-9 mix를 250 μ L씩 첨가하였다. 여기에 전배양시킨 균액을 100 μ L씩 주입한 후에 0.2 M sodium phosphate buffer를 가하여 최종부피가 700 μ L가 되도록 하였다. 이것을 37°C에서 20분간 진탕배양한 다음 상기의 돌연변이원성 실험과 같은 방법으로 실험하여 생성된 복귀돌연변이 수를 측정하여 항돌연변이성 유무를 판정하였다. 솔잎 열수 증류액과 변이원 물질의 농도는 예비실험을 통하여 결정하였으며, 항돌연변이활성은 변이원 물질의 활성에 대한 시료의 억제율 (inhibition, %)로 나타내었다.

암세포 성장억제 실험

SRB (sulforhodamine B) assay는 세포 단백질 염색을 이용하여 세포 증식이나 독성을 측정하는 방법 (14)으로 10%의 fetal bovine serum과 각각의 세포들인 인간 폐암세포 (A549), 인간 유방암세포 (MCF-7), 인간 위암세포 (AGS),

자궁암세포인 (HeLa) 및 간암세포 (HepG2)를 함유하는 RPMI 1640 배지를 5×10^4 cell/mL 농도로 100 μ L씩 각 well에 첨가하여 하루 동안 배양 (37°C, 5% CO₂)시킨 후 멸균된 술잎 증류액들을 각각 12.5 μ L, 25.0 μ L, 37.5 μ L 및 50.0 μ L/well씩 첨가하여 다시 48시간 배양시켰다. 그 후 상등액을 aspirator로 조심스럽게 제거하고 차가운 10% TCA (4°C) 용액을 50 μ L씩 첨가하여 세포들을 well 바닥에 고정시켰다. 한 시간 동안 4°C에서 배양시킨 후, TCA와 배지들을 제거하기 위하여 증류수로 다섯번 행구었다. Plate를 건조시키고 여기에 1% acetic acid에 녹인 0.4% SRB를 첨가해서 30분 동안 염색시킨 후 결합하지 않은 SRB염색액을 제거하기 위해 1% acetic acid 용액으로 네 번 세척하였다. 건조기에서 건조된 plate는 10 mM Tris buffer 100 μ L로 염색제를 충분히 녹인 후 540 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

DPPH radical 소거능에 의한 항산화활성

일반적으로 특정 물질에 대한 항산화활성 측정 하는 방법에는 여러 가지가 있으나 그 중에서 DPPH의 radical을 이용한 소거활성법은 비교적 간단하면서도 대량으로 측정이 가능한 방법이다.

Table 1은 술잎 열수 증류액에 대한 항산화 활성을 나타낸 결과이다. 술잎 열수 증류액의 RC₅₀값이 18.4 μ L로서 BHA나 α -tocopherol의 free radical 소거능과 비슷한 매우 강한 항산화 활성을 나타내었다. 이는 술잎에 함유되어 있는 항산화 활성이 높은 비타민류나 각종 폴리페놀 성분 혹은 미지의 성분들에 의한 것(5,11)으로 생각되며 이러한 결과로부터 술잎 증류액은 항산화제재로서 이용 가능성을 시사하여 앞으로 기능성 식품의 원료로 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

Table 1. DPPH radical scavenging activity of vaporized liquid of water-boiled pine needle

Sample	RC ₅₀ (μ L) ¹⁾
Vaporized liquid of water-boiled pine needle	18.4
0.01% BHA ²⁾	14.8
0.01% α -tocopherol	12.9

¹⁾ Amount required for 50% inhibition of DPPH after 30 min.

²⁾ Dibutyl hydroxy toluene.

돌연변이성 실험

S. typhimurium TA98과 TA100을 이용한 Ames test를 행한 결과 음성대조군의 복귀 돌연변이 집락수는 TA98이 18 \pm 3, TA100은 176 \pm 7 이었다. 술잎 열수 증류액을 50, 100, 150 및 200 μ L/plate의 여러 농도를 첨가하여 실험한 결과,

집락수가 음성대조군에 비하여 농도 변화에 따른 집락수의 큰 변화를 나타내지 않으므로 술잎 열수 증류액은 돌연변이 원성을 나타내지 않은 것으로 판단되었다 (Table 2). 이상의 결과는 술잎 에탄올 추출물이 농도의 증가에 따라 돌연변이 원성이 없다는 보고(15)와 일치한 결과를 얻었다.

Table 2. Mutagenicity of vaporized liquid of water-boiled pine needle in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100

Dose (μ L/plate)	His ⁺ revertants/plate ¹⁾	
	TA98	TA100
Spontaneous	18 \pm 3	176 \pm 7
50	19 \pm 5	182 \pm 8
100	17 \pm 7	179 \pm 9
150	18 \pm 8	169 \pm 7
200	19 \pm 2	177 \pm 6

¹⁾ Each value represents the mean \pm S.D. of three plates.

항돌연변이원성 실험

항돌연변이원성에 대해서는 시료를 50, 100, 150 및 200 μ L/plate의 여러 농도에 대하여 직접 변이원물질로 알려진 MNNG와 4NQO 그리고 대사활성을 필요로 하는 간접변이원물질인 B(a)P과 Trp-P-1을 사용하여 각각의 농도에 따른 돌연변이원성 억제효과를 검토하였다(Fig. 1). 항돌연변이원성 실험에서는 강력한 직접변이원인 MNNG (0.4 μ g/plate)의 경우 *S. typhimurium* TA100 균주에서 시료농도 200 μ L/plate에서 45.9%의 억제활성을 나타내었으며 4NQO (0.15 μ g/plate)에 대해서는 동일 시료농도에서 85.5%의 높은 억제활성을 나타내었다. 그리고 간접변이원인 B(a)P (10 μ g/plate)에 대해서는 동일 시료농도에서 88.3%의 높은 억제활성을 나타내었다. 한편 Trp-P-1 (0.15 μ g/plate)에 대해서는 50 μ L/plate의 낮은 시료농도에서도 85.1%의 높은 억제활성을 나타내었으며 200 μ L/plate 시료농도에서 91.1%의 높은 억제율을 나타내었고 농도 의존적으로 강한 억

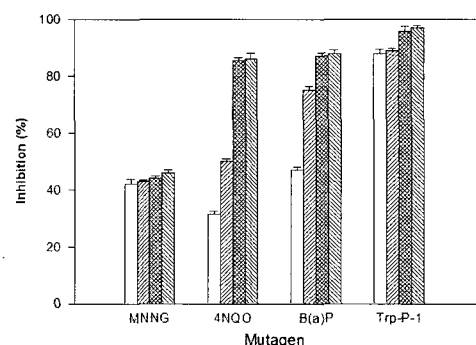


Fig. 1. Inhibitory effect of the vaporized liquid of water-boiled pine needle against each mutagen on *Salmonella typhimurium* TA100.

□ 50 μ L/plate, ▨ 100 μ L/plate, ▩ 150 μ L/plate, ▤ 200 μ L/plate

제활성을 보였다. 이상의 결과에서 알 수 있듯이 간접변이원에 대한 억제활성이 직접변이원에 대한 억제효과보다 높은 것으로 나타났으며 모든 시료가 농도 의존적으로 억제율을 나타내었다.

S. typhimurium TA98 균주에서는 역시 Trp-P-1 (0.15 μ g/plate)에 대하여 200 μ L/plate 시료농도에서 62.3%의 억제율을 보이는 등 *S. typhimurium* TA100 균주보다 현저히 낮은 억제율을 나타냈지만 농도 의존적으로 효과를 나타내었다 (Fig. 2). Kim 등(15)은 곰솔, 리기다, 잣나무, 적송의 에탄올 추출물들은 항돌연변이원성 효과가 시료 모두 농도의 증가에 따른 억제율을 나타내었고 또 각각의 시료들이 간접변이원인 Trp-P-1에 대하여 높은 억제활성을 나타내었다고 보고하였는데 이는 본 실험과 일치한 결과를 얻었다.

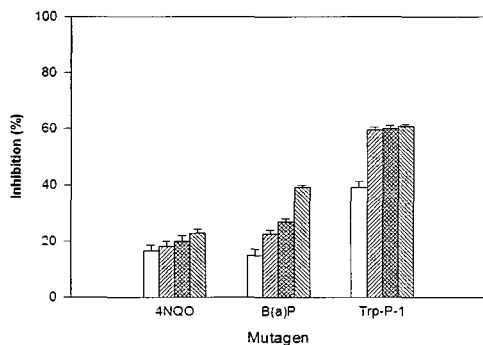


Fig. 2. Inhibitory effect of vaporized liquid of water-boiled pine needle against each mutagen on *Salmonella typhimurium* TA98.

□ 50 μ L/plate. ▨ 100 μ L/plate. ▩ 150 μ L/plate. ▤ 200 μ L/plate

암세포 성장억제효과 측정

암 유발 초기단계에서 돌연변이가 매우 중요한 작용을 하고 대부분의 발암물질이 돌연변이원이라는 공통점은 항돌연변이원성을 가진 물질이 항암활성을 가질 수 있다는 것을 의미한다. 이에 시료가 항돌연변이원성 효과를 나타내었으므로 인간 암세포에 대한 직접적인 효과를 살펴보기 위하여 본 실험에서는 암세포로 인간 폐암세포, 유방암세포와 위암세포, 자궁암세포, 간암세포를 이용하여 이들 암세포주에 대하여 SRB assay를 이용한 시료의 저해효과를 조사하였다.

폐암세포에 대한 추출물의 억제효과를 검토한 결과 50 μ L/well 첨가시 78.7%의 높은 억제효과를 보였으며, 위암세포의 경우 50 μ L/well의 농도에서 90.8%로 높은 억제효과를 보였다. 자궁암세포의 경우 50 μ L/well의 시료농도에서 62.3%의 억제효과를 나타내었다. HeLa 세포의 경우 50 μ L/well의 시료농도에서 93.7%의 높은 억제효과를 나타내었고 간암세포인 간암세포 역시 50 μ L/well의 시료 농도에서 90%의 높은 억제효과를 나타내는 등 농도 의존적으로 저해되었다(Fig. 3).

Chung 등(16)은 솔잎 수액 증류액이 인체의 monocyte-like cancer cell인 U937에 대해 81%, 인체 간암 세포주인 SNU-354에 대해 72%의 높은 암세포 성장 억제효과를 갖는다는 것을 보고한 바 있다. 이는 본 연구에서 솔잎 열수 증류액이 각종 암세포에 대해 높은 활성을 나타낸 것과 일치한 결과임을 알 수 있었는데 다소 차이를 나타내는 것은 시료와 각종 암세포의 종류 등에 기인된 것으로 생각된다.

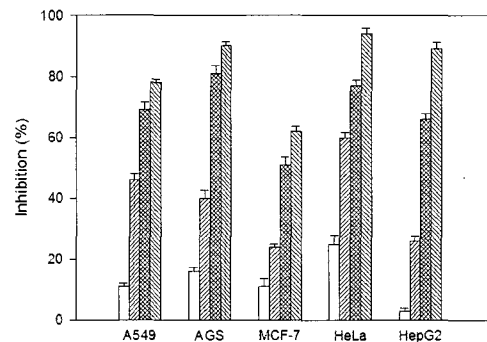


Fig. 3. Inhibitory effects of growth of human cancer cells in adding the vaporized liquid of water-boiled pine needle.

□ 12.5 μ L/well, ▨ 25 μ L/well, ▩ 37.5 μ L/well, ▤ 50 μ L/well

이상의 결과들로 솔잎의 증류액이 각종 암세포에 대한 세포독성효과를 나타내었으므로 생체내 실험을 통하여 더욱 그 효과를 구명하고 여러 가지 성분들의 상관관계에 대한 검색이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

요 약

솔잎 열수 증류액에 대한 항산화 활성은 RC_{50} 값이 18.4 μ L로서 매우 강한 항산화 활성을 나타내었다. 솔잎 열수 증류액에 대한 항돌연변이 활성은 *S. typhimurium* TA98과 TA100 균주를 이용한 돌연변이성 실험 결과 솔잎 열수 증류액 자체로서는 변이원성이 없었으며 항돌연변이원성 실험에서는 직접변이원인 MNNG (0.4 μ L/plate)의 경우 *S. typhimurium* TA100 균주에서 시료농도 200 μ L/plate에서 45.9%의 억제활성을 나타내었으며 4NQO (0.15 μ g/plate)에 대해서는 동일 농도에서 85.5%의 높은 억제활성을 나타내었다. 그리고 간접변이원인 B(a)P (10 μ g/plate)에 대해서는 시료농도 200 μ g/plate의 시료농도에서 88%의 높은 억제활성을 나타내었다. 한편 Trp-P-1 (0.15 μ g/plate)에 대해서는 50 μ g/plate의 낮은 시료농도에서도 85%의 높은 억제활성을 나타내었으며 모두 농도 의존적으로 억제하는 것으로 나타났다. 솔잎 열수 증류액의 암세포 성장억제효과를 검

토한 결과, 폐암세포, 유방암세포에 대해서 각각 78.7%, 62.3%의 비교적 높은 억제효과를 보였으며, 특히 위암세포, 자궁암세포, 간암세포에서 각각 90.8%, 93.7%, 90.0%의 높은 억제효과를 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 바이오모던의 연구비 지원에 의해 수행된 연구결과와 일부로서 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 藥原和毅, (1992) 食用植物中の生理的機能成分, 食品と開發, p.27-29
2. Kang, Y.H., Park, Y.K., Oh, S.R. and Moon, K.D. (1995) Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts (in korean), Korean. J. Food. Sci. Technol., 27, 978-984
3. Lin, R.I.S. (1994) Phytochemicals and antioxidants. In functional Foods, Chapman & Hall, New York, USA
4. Troll, W., Lim, J.S. and Frekel, K. (1994) Prevention of cancer by agents that suppress production of oxidants. In: Food Phytochemicals for cancer Prevention, Ho, C.T., Osawa, T., Huang, M.T. and Rosen, R.T.(eds), ACS Symp. Series 547, American Chemical Society, Washington DC, USA
5. 上原美鈴. (1995) 신비의 술잎치료법, 국일미디어, p.21
6. 최옥자. (1991) 약초의 성분과 이용, 일월서각, 서울, p.114-116
7. 과학백과사전. (1990) 종합출판사 동학사전, 도서출판 p.561
8. Kim, J.D., Yoo, T.H., Choi, N., Im, K.J., Ju, J.S. and Lee, S.Y. (1991) Effects of dietary supplementation with pine leaf on lipid parameters in rat (in korean), Kor. J. Gerontol., 1, 47-50
9. Choi, M.Y., Choi, E.J., Lee, E., Rhim, T.J., Cha, B.C. and Park, H.J. (1997) Antimicrobial activities of pine needle(*Pinus densiflora* Seid et Zucc.) extract, Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 25, 293-297
10. Kim, E.J., Jung, S.W., Choi, K.P., Ham, S.S. and Kang, H.Y. (1998) Cytotoxic effect of the pine needle extracts, Kor. J. Food. Sci. Technol., 30, 213-217
11. Moo, Y.C., Jeon, C.O. and Oh, J.Y. (1994) Isolation of 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanose from pine needles as an antioxidative principle(in korean), Agric. Chem. Biotech., 37, 310-314
12. Choi, J.S., Park, J.H., Kim, H.G., Young, H.S. and Mun, S.I. (1993) Screening for antioxidant activity of plants and marine algae and its active principles from *Prunus daviana*. Kor. J. Pharmacol., 24, 299-303
13. Yahagi, T., Nagao, M., Seino, Y., Matsushima, T., Sugimura, T. and Okada, M. (1997) Mutagenicities of N-nitrosoamines on *Salmonella*. Mutation Res., 48, 121-130
14. Scudiero, D.A., Shoemaker, R.H., Paul, K.D., Monks, A., Tiemey, S., Nofziger, T.H., Currens, M.J., Seniff, D. and Boyd, M.R. (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
15. Kim, E.J., Jung, S.W., Choi, K.P., Ham, S.S. and Kang, H.Y. (1998) Inhibitory effect of main pine needle extracts on the chemically induced mutagenicity, Korea. J. Food. Sci. Technol., 30, 450-455
16. Chung, Y.J., Bee, M.W., Chung, M., Lee, J.S. and Chung, K.S. (2002) Cytotoxic effect of the distilled pine-needle extracts on several cancer cell lines in vitro, J. Korea Soc. Food. Sci. Nutr., 31, 691-695

(접수 2005년 1월 7일, 채택 2005년 3월 25일)