Journal of Korean Association
of Cancer Prevention
1999; 4(2): 68-78

In vitro 및 *in vivo*에서 된장의 암예방 효과

-1. 된장 추출물의 항돌연변이 및 *in vivo* 항암효과-

부산대학교 식품영양학과 및 암연구소, [1]경남정보대학 식품영양학과
[2]고신의대 미생물학교실

박건영 · 손미현 · 문숙희[1] · 김광혁[2]

Cancer Preventive Effects of *Doenjang in vitro* and *in vivo*

-1. Antimutagenic and *in vivo* Antitumor Effects of *Doenjang*-

Kun-Young Park, Mi-Hyun Son, Suk-Hee Moon[1], and Kwang-Hyuk Kim[2]

Department of Food Science and Nutrition, and Pusan Cancer Research Center,
Pusan National University, Pusan 609-735, Korea
[1]Department of Food and Nutrition, Kyungnam College of Information
& Technology, Pusan 616-701, Korea
[2]Department of Microbiology, College of Medicine, Kosin University
Pusan 602-702, Korea

Antimutagenic and *in vivo* antitumor effects of *doenjang* (hexane, methanol and boiling extracts) were studied by using Ames test, SOS chromotest and Sarcoma-180 tumor cell-transplanted mice. The hexane, methanol and boiling extracts from *doenjang* showed strong antimutagenic activities (90 ~ 91% inhibition) toward aflatoxin B_1 (AFB_1) in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100. In SOS chromotest using *Escherichia coli* PQ37, the extracts also exhibited strong antimutagenicity toward N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG). The solid tumor growth was inhibited when 5 mg/kg of the hexane, methanol and boiling extracts were administrated to the Balb/c mice by 64.0, 79.3 and 49.7%, respectively and the life span (prolongation effects) of the mice increased by 58.2%, 66.3% and 38.9%, respectively, showing the methanol extract was the highest effect. Spleen index, a marker for immunological activity, increased in the mice administrated the *doenjang* extracts compared to the control group. The phagocytic activity of the mice increased about twice by the treatment of the hexane extract. The nitroblue tetrazolium (NBT) reduction rate in the peritoneal phagocytic cells of the mice also increased about 3 times when the hexane extract was treated.

Key Words: *Doenjang*, Antimutagenicity, Sarcoma-180 cells, Antitumor, Phagocytic acitivity

책임저자 : 박건영, ㉾ 609-735, 부산시 금정구 장전동 30, 부산대학교 식품영양학과
Tel: 051-510-2839. Fax: 051-514-3138, E-mail: kunypark@hyowon.pusan.ac.kr

서 론

된장은 육류 섭취량이 많지 않았던 우리 민족의 식생활에 주식인 쌀밥과 함께 주요 단백질원이 되어왔다. 된장의 주요성분은 수분이 50~60%로 가장 많고 단백질이 12~14%, 지방이 4~5%, 당질이 10~15% 정도를 차지한다.[1)]

돌연변이 유발 저해제를 찾는 것은 항암제를 발견하는 데 유용하며 많은 돌연변이 저해제들은 short-term assays 특히 Ames 실험계 사용에 의해 많이 발견되었는데, 돌연변이와 발암의 식이 저해제들은 둘 다 사람의 암방지를 위해 유용하게 여겨진다. 식품에 존재하는 발암물질 및 돌연변이 유발성 물질의 유형에는 첫째 천연식품 자체에 존재하는 물질, 둘째 식품의 저장, 가공 및 조리에 의하여 생성되는 물질, 셋째 살충제, 농약 또는 식품 첨가물 등으로 나눌 수 있다.[2)] 그러나 식품 중에는 이들 발암물질 및 돌연변이 유발성 물질뿐만 아니라 항돌연변이 물질과 항암효과가 있는 물질도 상당량 존재한다.[3)]

박등[4)]은 된장의 아플라톡신 오염 가능성에 대해 연구한 결과 아플라톡신을 생성하는 균주로 발효시켰을 경우 아플라톡신은 메주발효기에는 생성되었다가 숙성기간 중 대부분이 파괴되는 것을 관찰하였다. 된장발효와 관련하여 재래식 된장의 발효시 이 곰팡이의 오염도 거의 없을 뿐 아니라 발효 숙성 과정중 여러 조건에서 아플라톡신이 미량 생성된다 하더라도 거의 파괴되는 것으로 확인되었다. 박등[5)]은 재래식 된장의 항돌연변이성을 콩으로 제조된 다른 발효식품들, 즉 청국장, 상품용 된장과의 차이를 비교해 본 결과 재래식 된장의 활성이 가장 컸으며, 다음으로 상품용 된장, 청국장, 일본 된장 순이었다고 보고하였다. 이러한 결과로부터 콩만으로 만들어진 재래식 된장의 경우 여러 종류의 미생물, 곰팡이류와 세균류가 발효에 관여하고, 그 발효기간이 길기 때문에 항돌연변이성이 가장 높은 것으로 나타났으며, 계속적인 분석, 동정 결과 항돌연변이 물질로 불포화지방산 및 genistein이 유력한 물질로 추출, 동정하게 되었다.[6)] 또한 최근의 보고에 의하면 된장을 된장찌개 및 국으로 하여도 된장의 항돌연변이 활성은 여전히 높았다.[7)] 일본 된장인 Miso와 암과의 관련 연구가 일본에서 연구된 바 있는데 Asahara 등[8)]은 Miso에 존재하는 효모와 곰팡이는 3-amino-1-methyl-[H-5]pyrido [4, 3-b] indole (Trp- P-2)에 대한 세포벽과의 결합능력이 높은 특성이 있어 항돌연변이 효과가 크다고 하였고, Nishijima 등[9)]은 sarcoma-180에 대한 Miso의 실험에서 항암작용을 관찰하였으며, Kurechi등[10)]은 일본 된장을 비롯한 콩으로 만든 식품은 nitrite를 파괴하고 N-nitrosamine 생성을 방해하므로 이들로 인한 위암발생을 감소시켜 준다고 하였다. 또한 일본에서는 콩제품이 위암발생을 방지하며 그 활성물질이 트립신 저해제라 하였으며[11)] 생콩내에 존재하는 트립신 저해제의 항발암효과가 잘 알려져 있으나 이 단백질은 열에 불안정하다고 알려져 있다.[12~14)]

본 연구에서는 된장으로부터 헥산추출물과 메탄올추출물, 그리고 열탕추출물을 조제하고 Ames test와 SOS chromotest 실험계를 이용하여 이들의 항돌연변이 활성을 살펴보았으며, 항암효과는 *in vivo*에서 Balb/c 마우스를 이용하여 연구하였다. 즉, Sarcoma 180 세포를 이용한 고형암 성장 저지 실험, 수명연장 실험을 비롯하여, 된장 시료에 의한 면역계의 활성 증강 작용을 검토, 확인하기 위하여 위의 마우스에서 적출한 비장의 무게에 대한 질량비, 대식세포에 의한 phagocytic activity, NBT의 생성능 및 nitric oxide 생성능 등을 검토하였다.

재료 및 방법

1) 된장 시료의 조제

(1) 된장 시료: 실험에 사용된 조선(콩)된장은 (주)화영식품[현, 대상식품(주), 전남 순창]으로부터 제공받았으며, *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus subtilis*를 이용하여 재래식 된장과 비슷한 방법으로 발효 숙성시킨 제품이었다. 실험에 사용된 된장의 일반성분은 수분이 49.5%, 단백질이 11.9%, 지질이 4.5%, 탄수화물이 19.0%, 회분이 2.0%이었고, 염도는 11.5%였으며 pH는 5.1이었다.

(2) 된장 추출물: 헥산추출물은 된장 시료를 동결 건조하여 분말로 만든 후, 분말시료 100 g당 헥산 1 *l*를 첨가하여 8시간 교반을 반복하여 여과하고, 농축하여 얻었다. 메탄올추출물은 탈지된 된장분말 100 g당 메탄올 1 *l*를 첨가하여 2분간 고속으로 Waring blender로 균질화하여 90분간 가열한 후, Whatman #42 여과지로 여과하고, 41~43°C에서 농축하여 얻었다. 위의

헥산추출물 및 메탄올추출물은 dimethylsulfoxide (DMSO)에 희석하여 실험에 사용하였다. 열탕추출물은 된장 50 g에 물 300 ml를 넣고 끓기 시작한 후 15분간 더 끓이고 여과한 다음, 냉동건조하고, 멸균수로 희석하여 실험에 사용하였다. 실험시료의 농도는 본래 된장시료 무게로 희석(100%시료)하고 다시 실험농도로 희석한 후 실험에 사용하였다.

2) Ames 돌연변이 유발 실험

(1) 실험균주 및 돌연변이 유발물질: *Salmonella typhimurium* TA98 및 TA100은 *Salmonella typhimurium* LT-2의 histidine 요구성 균주로서 미국 California대학의 B. N. Ames박사로부터 제공받아 정기적으로 histidine 요구성, deep rough (*rfa*) 돌연변이, *uvr*B 돌연변이, R factor 등의 유전형질을 확인하면서 실험에 사용하였다. 돌연변이 유발물질인 aflatoxin B_1 (AFB_1)과 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)는 Sigma Chemical Co. (USA)와 Aldrich Chemical Co. (USA)에서 구입하여 각각 DMSO 및 증류수에 녹여 실험에 사용하였다.

(2) 시료의 독성실험 및 돌연변이 유발물질의 농도결정: 균주에 대한 시료의 독성유무를 살펴보기 위해서 실험에 사용하기 전에 독성실험을 행하여 독성이 나타나지 않는 범위 내에서 시료의 농도를 결정하였다. 먼저 멸균된 cap test tube에 top agar 2 ml를 분주한 후, 균주 100 μl (1~2×10^9 cells/ml)와 시료를 첨가하고 가볍게 vortex한 후 nutrient agar plate에 분주, 고화시켜서 37°C에서 24시간 배양시킨 다음, 그 독성유무를 판정하였다.[15,16]

(3) 항돌연변이 효과실험: 간접 돌연변이원(AFB_1)을 활성화시키기 위하여 Maron과 Ames의 방법[15,16]에 따라 S9 mixture를 첨가하였다. S9 mixture는 쥐의 간으로부터 얻은 S9 fraction 10%에 MgCl- KCl salts (2%), 1M glucose-6-phosphate (0.5%), 1 M NADP (4%), 0.2M phosphate buffer (pH 7.4) 및 멸균수를 혼합하여 S9 mixture를 조제하였다. 항돌연변이 실험은 preincubation mutagenicity test[17]를 이용하여 미리 건열 멸균시킨 cap test tube에 S9 mixture 0.5 ml (간접 돌연변이원인 경우) 혹은 인산 완충액 0.5 ml (직접 돌연변이원인 경우), 하룻밤 배양된 균주 0.1 ml (1~2×10^9 cells/ml)와 돌연변이 유발물질(50 μl) 및 희석된 된장 시료(50 μl)를 가하여 37°C에서 20분간 예비배양한 다음 histidine/biotin이 첨가된 top agar (45°C) 2 ml씩을 가하고 3초간 vortex하여 minimal glucose agar plate에 도말하고 37°C에서 48시간 배양한 후 revertant 숫자를 계수하였다.

3) SOS chromotest

Quillardet의 방법을 변형시킨 백과 함[18]의 방법을 사용하였다. 냉동 보관된 균주 50 μl를 5 ml의 L medium에 접종하고 37°C에서 하룻밤 진탕 배양한 후 이를 다시 5 ml L medium에 접종하여 흡광도가 0.3~0.4에 이를 때까지 37°C에서 2시간 동안 진탕 배양시킨 후, 여기서 얻은 균주를 L medium에 1/10로 희석하였다. 각 농도별로 준비된 시료와 돌연변이 유발물질이 혼합된 것 20 μl를 미리 분주해 둔 96 well plate의 각 well에 위의 희석된 균주 100 μl씩 분주하고 90분간 37°C에서 진탕 후 SOS 반응을 유도한 후 한쪽에는 β-galactosidase의 활성 측정을 위해 ONPG (*o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside) 100 μl, 다른 쪽에는 alkaline phosphatase의 활성측정을 위해 PNPP (*p*-nitrophenyl phosphate disodium) 100 μl를 첨가하였다. 발색시간은 10분으로 하였으며 β-galactosidase는 1.5M Na_2CO_3 100 μl, alkaline phosphatase는 1M HCl 50 μl로 효소에 의한 발색반응을 정지시키고 5분 후 alkaline phosphatase쪽에 50 μl의 2M Tris buffer를 첨가하여 HCl을 중화하고 spectrophotometer로 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 420 nm에서 측정한 O.D.값은 아래에 나타난 Miller[19]의 공식에 의해 enzyme unit (Eu)값을 구하였다.

$$Eu = \frac{(1{,}000 \times A_{420})}{t\ (min.)}$$

4) 마우스를 이용한 *in vivo*에서의 항암효과 실험

(1) 실험동물: 본 실험에 사용한 동물은 웅성 Balb/c mouse (한국생명공학센터, 대구)로 체중이 25~30 g에 속하는 것을 사용하였으며, 사료는 표준사료(퓨리다, 삼양유지사료(주))로 사육하였다. 사육시 물과 사료는 충분한 양을 공급하였고, 동물실은 12시간 간격의 light- dark cycle을 유지하였다.

(2) 종양세포: 마우스의 복강내에 1주일 간격으로 계대배양하여 보존하고 있는 sarcoma-180 세포를 실험용 종양세포로 사용하였다. 즉 실험동물의 복강 내에서 1주일간 배양된 sarcoma-180 세포를 복수와 함께

취하고, phosphate buffered saline (PBS)와 함께 원심분리(1,200 rpm, 10 min.)하여 종양세포를 분리하였다. 분리된 세포를 다시 PBS에 부유시켜 재차 원심분리하여 상등액을 제거한 후 sarcoma-180 세포, 1.0×10^6 cells/ml가 되도록 종양세포 부유액을 만들어 1 ml씩을 복강 주사하여 이식 보존하면서 실험에 사용하였다.

(3) 시료의 조제: 시료는 멸균된 PBS를 사용하여 조제하였으며, 투여량은 마우스 kg당 0.05, 0.1, 0.5 및 1 mg으로 하고, 대조군은 멸균 PBS만 투여하였으며, 투여하지 않을 때는 냉장고에 보관하면서 사용하였다.

(4) Viability test (Cytotoxicity test): 항발암효과를 나타낸 된장 시료의 직접적인 세포독성작용의 유무를 알아보기 위해서 dye exclusion method를 이용하여 *in vitro*에서 viability test를 행하였다.[20] 1회용 24 well plate에 조제한 종양세포 부유액 0.1 ml (2.5×10^5 cells)와 최종 농도 20% HFCS (Heat inactivated Fetal Calf Serum: Gibco Lab., USA)의 EMEM (Eagle's Minimal Essential Medium: Gibco Lab., USA) 배지 2 ml를 가하였다. 여기에 100 μl의 된장 시료를 넣어서 37°C, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간 배양후 세포 50 μl를 0.2% trypan blue 용액 50 μl와 잘 섞어 hemocytometer를 사용하여 전체의 세포수와 염색되어진 세포(non-viable cell) 및 염색되지 않은 세포(viable cell)의 수를 계산한 다음, 된장 시료를 넣지 않은 대조세포군과 비교하여 viability 비율을 계산하였다.

$$\text{Viable cells (\%)} = \frac{\text{Number of viable cells per ml of aliquot}}{\text{Total number of cells per ml of aliquot}} \times 100$$

(5) 고형암 성장 저지 실험: 실험동물을 각 군당 7마리씩으로 하여 실험실에서 1주일 간격으로 계대 보관중인 종양세포 부유액 0.2 ml (6×10^6 cells/mouse)씩을 실험동물의 왼쪽 서혜부(left groin)에 피하 이식한 후 24시간 후부터 20일간 매일 1회씩 시료용액 200 μl씩을 복강으로 투여하였다. 종양세포 이식 32일째 되는 날 치사시켜 생성된 고형암을 적출하고 그 무게를 측정한 후 다음 식에 따라 종양 성장저지 백분율(tumor growth inhibition ratio, I.R.;%)을 계산하였다.[21]

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

Cw : 대조군의 평균 종양무게
Tw : 처리군의 평균 종양무게

(6) 수명연장 실험: 실험동물을 각 군당 7마리씩으로 하여 전술한 방법으로 조제한 종양 세포 부유액 1 ml (1×10^6 cells/mouse)씩을 실험동물의 복강 내에 이식한 뒤 24시간 후부터 20일간 매일 시료를 복강으로 200 μl 씩 투여하고 35일까지의 생존여부를 관찰하여 평균수명 일수를 계산하고 다음 식으로부터 수명연장 백분율(prolongation ratio, P.R.; %)을 구하였다.[22]

$$\text{P.R. (\%)} = \frac{T - C}{C} \times 100$$

C : 대조군의 평균수명
T : 처리군의 평균수명

(7) 비장 및 각 장기의 중량변화: 실험동물을 각 군당 7마리씩으로 하여 시료 투여군과 대조군으로 나누어 시료 투여군은 시료를, 대조군은 생리식염수를 7일간 연속으로 마우스의 복강내에 투여하고 투여 최종일부터 5주째 되는 날 마우스를 경추탈골법에 의하여 치사시키고 체중을 측정한 후 비장을 적출하여 무게를 측정하였고, 체중에 대한 비장, 간, 심장 및 신장의 비율을 계산하였다.[23]

(8) Phagocytic activity의 측정 실험: Smith등[24]의 방법에 따라 분리된 세포를 RPMI 1640 (Gibco, USA)에 우태아혈청(FCS, Boehringer Mannheim, Germany)을 10%되게 포함시킨 배지(10% FCS RPMI 1640)로 부유시켜 2×10^5 cells/ml되게 조정하였다. 이 세포부유액을 미리 coverglass를 내재시킨 24 well microplate(Coster, Cambridge, MA, USA)에 1 ml씩 분주하고 37°C, 5%CO_2 조건에서 45분동안 배양하였다. 각 well들을 PBS (pH 7.2)로 가볍게 씻어냄으로서 비부착성의 세포를 제거하였다. 부착성의 대식세포가 존재하는 coverglass상에 2×10^6 cells/ml의 *C. albicans* (ATCC 10231) 0.2 ml을 작용시켰다. 이때의 배지는 RPMI 1640에 마우스의 autologous serum을 10%되게 포함시켜 사용하였다. 또 다시 plate를 37°C, 5%CO_2 조건에서 45분동안 배양하였다. 배양이 완료된 후 coverglass를 PBS로 가볍게 씻어낸 다음 Wright stain액에 10분간 작용시켰다. 판독은 1,000×

의 현미경 하에서 대식세포 50개 가운데 식균된 *C. albicans*의 수를 산정하였다.

(9) Nitroblue tetrazolium (NBT) **reduction**의 측정: 시료에 노출된 대식세포의 과산화물(O^-) 생성능의 변화를 측정하기 위하여 Ostrem등[25]의 방법에 준하여 실시하였다. 상기와 같이 주사된 마우스의 복강으로부터 세포를 분리한 후 1.5×10^6 cells/ml되게 조정하였다. 상기 세포액 0.2 ml에 PMA/NBT액 0.2 ml을 섞어 37°C 수조에서 30분동안 방치하였다. PMA/NBT액은 PBS, ml당 phorbol- 12-myristate-13-acetate (TPA, Sigma)를 100 mg 그리고 nitroblue tetrazolium (NBT, Sigma)을 1 mg 포함시켜 조제하였다. 판독은 1000× 현미경하에서 세포내에 검푸른 formazan 침착물을 함유하는 세포를 hemocytometer상에서 관찰하였으며, 총 200개의 세포를 산정하였다.

(10) Nitric oxide (NO)의 생성: 마우스에 시료를 각각 복강 내로 0.5 ml씩 접종시킨 후 24시간 후에 마우스를 희생시켜 혈액을 취하고 혈청을 분리하였다. NO의 정량은 세포에서 생성되는 NO가 순간 NO_2^-으로 바뀌기 때문에 실제는 NO_2^-을 정량하게 된다. Nitrite 이온의 측정은 Ding등[26]의 microplate 검사법에 준하여 시행하였다. 즉 혈청 각각으로부터 0.1 ml씩의 검체를 96 well microplate로 옮긴 다음 Griess시약(1% sulfanilamide/0.1% naphthylethylene diamine dihydrochloride/2.5% phosphoric acid) 0.1 ml씩을 작용시킨 후 실온에서 10분동안 방치하였다. Optical density는 multiscanner를 이용하여 540 nm에서 측정하였으며, 표준곡선은 sodium nitrite로 작성하였다.

결 과

된장의 헥산추출물, 메탄올추출물 및 열탕추출물의 Ames test에 의한 항돌연변이 효과를 살펴본 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다. 즉 *Salmonella typhimurium* TA100에서 헥산추출물과 메탄올추출물은 농도 의존적으로 AFB_1의 돌연변이성을 저해하여 10%에서 각각 92%와 89%의 저해를 보였고, 열탕추출물은 1%의 낮은 농도에서도 60%의 항돌연변이 효과가 나타났으며 첨가농도에 따라서도 항돌연변이 효과가 크게 나타났다. 또한 TA98 균주에서도 TA100의 결

Table 1. Antimutagenic effect of the hexane, methanol and boiling extracts from *doenjang* on the mutagenicity induced by aflatoxin B_1 (AFB_1 0.3 μg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100

Treatment		Revertants/plate	
		TA98	TA100
Spontaneous		103±13[1]	115±8
Aflatoxin B_1 (AFB_1)		970±14	1216±14
AFB_1+Hexane ext.	1.0%	527±12 (51)[2]	899±16 (29)
	2.5%	349±17 (72)	562±71 (59)
	5.0%	221±15 (86)	375±45 (76)
	10.0%	166±13 (93)	208±32 (92)
AFB_1+Methanol ext.	1.0%	771±14 (23)	918±24 (27)
	2.5%	727±13 (28)	669±21 (50)
	5.0%	684±17 (33)	503±18 (65)
	10.0%	285±11 (79)	232±35 (89)
AFB_1+Boiling ext.	1.0%	790±13 (21)	558±14 (60)
	2.5%	658±23 (36)	356±27 (78)
	5.0%	564±15 (47)	302±13 (85)
	10.0%	126±12 (97)	205±15 (93)

[1]The values are means of triplicates ±SD.
[2]The values in parentheses is the inhibition rate (%).

과와 유사하게 된장의 헥산추출물과 메탄올추출물 10%의 농도에서 93% 및 79%, 열탕추출물은 첨가농도 10%에서 그보다 더 높은 97%의 항돌연변이 효과를 나타내었다.

SOS chromotest system은 시료에 histidine이 있어도 영향을 받지 않고, frame shift mutation과 point mutation을 동시에 측정할 수 있도록 고안된 방법으로,[27,28] 본 실험에서는 돌연변이원인 MNNG를 이용하여 dose response을 통해 실험에 필요한 농도를 먼저 구하였다. PNPP/ONPG의 발색시간은 20분으로 하여 dose에 따른 SOS response의 결과로부터 최적 실험농도를 구하였다. 최적 농도는 MNNG의 경우 0.007 μg/assay로서 이후 이 농도를 모든 실험에 적용하였다. 된장의 헥산추출물은 1 μg/ml에서 MNNG에 대해 85%의 저해효과를, 2.5 μg/ml에서는 91%의 저해효과를 나타내었고, 첨가농도 10 μg/ml에서는 99%의 매우 높

Table 2. SOS response of hexane, methanol and boiling extracts from *doenjang* against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG 0.007 μg/assay) in *E. coli* PQ37

Sample	Concentration (μg.ml)	*A_{420}	**Eu	Inhibition rate (%)
Spontaneous		0.158	7.9	
Control		0.232	11.6	
MNNG+Hexane ext.	1.0	0.169	8.5	85
	2.5	0.165	8.3	91
	5.0	0.161	8.1	96
	10.0	0.159	8.0	99
MNNG+Methanol ext.	1.0	0.172	8.6	81
	2.5	0.171	8.6	82
	5.0	0.167	8.4	90
	10.0	0.163	8.2	93
MNNG+Boiling ext.	1.0	0.213	10.7	26
	2.5	0.209	10.5	31
	5.0	0.209	10.5	31
	10.0	0.201	10.1	41

*A_{420} is the optical density at 420 nm.
**Eu means enzyme unit. Eu=(1,000×A_{420})/20 min.

Table 3. Effect of hexane, methanol and boiling extracts from *doenjang* on antitumor activities and life span of mice transplanted with sarcoma-180 cells to Balb/c mice

Sample	Tumor weight[1] (g)	Survival time[4] (day)
S-180+PBS	3.28±0.29[2]	20.8±3.6
S-180+Hexane ext.	1.18±0.15 (64.0)[3]	32.9±3.7 (58.2)[5]
S-180+Methanol ext.	0.68±0.29 (79.3)	34.6±0.8 (66.3)
S-180+Boiling ext.	1.65±0.18 (49.7)	28.9±2.7 (38.9)

[1]7-day-old sarcoma-180 ascites cells were s.c. transplanted into the left groin of inbred strain. 5 mg/kg of hexane, methanol and boiling extracts from *doenjang* or the equal volume of phosphate buffered saline (control) was I.P. injected once a day for 20 days from 24hr following transplantation. All mice were sacrified at 5 weeks following the transplantation, and tumor weights were measured.
[2]Values are mean±SD of 10 mice.
[3]The values in parentheses are the inhibition rate (%).
[4]Balb/c mice were intraperitioneally injected with 1.0 ml (1×10^6 cells) of ascites tumor cells (7-day-old sarcoma-180 cell). 5 mg/kg of hexane, methanol and boiling extracts from *doenjang* or the equal volume of phosphate buffered saline(control) was I.P. injected once a day for 20 days from 24hr following transplantation, and the survival time of the mice was recorded.
[5]The values in parentheses are the prolongation rate (%).

은 돌연변이유발 억제효과를 나타내었다. 메탄올추출물은 헥산추출물에 비해서는 다소 활성이 낮았으나 1~10 μg/ml 농도에서 81~93%의 높은 항돌연변이 효과를 나타내었고, 열탕추출물은 전반적으로 그 효과가 낮았다(Table 2).

된장의 헥산추출물, 메탄올추출물 및 열탕추출물의 종양세포에 대한 직접적인 세포살해효과를 보기 위하여 여러 농도로 이들 시료가 포함되어 있는 배지에 배양하여 24시간 후에 종양세포의 생존율을 관찰하였다. 된장의 헥산추출물은 전체 세포수와 cell viability가 가장 급격히 떨어지는 농도인 5.0 mg/ml를, 메탄올추출물과 열탕추출물도 같은 농도를 선택하여 sarcoma-180 종양세포에 대한 독성이 급격히 증가하고 세포에 큰 영향을 주지 않는 범위 내에서 고형암 성장 저해효과 및 수명연장 효과를 살펴보았다. *In vivo*에서 된장 시료에 의한 항암효과를 검토하기 위해 sarcoma-180 암세포를 접종한 후 32일 후에 마우스의 서혜부의 암조직을 적출하여 종양의 무게를 측정한 결과는 Table 3과 같다. 즉 대조군은 3.28 g인데 반해 된장의 헥산추출물, 메탄올추출물 및 열탕추출물을 각각 5.0 mg/kg 투여한 경우, 종양의 무게가 각각 1.18 g, 0.68 g 및 1.65 g으로 된장의 메탄올추출물이 79.3%의 저해율로 가장 높은 고형암 성장 저지효과를 나타내었고, 다음으로는 헥산추출물(64.0%) 및 열탕추출물(49.7%) 순이었다.

정상 마우스에 종양세포를 이식시킨 후 시료를 투여했을 때 시료로 인한 수명연장 효과를 보기 위하여 복강 내로 sarcoma-180 세포를 이식한 다음 매일 1회씩 20일간 시료를 복강으로 투여하였다. 수명연장 효과에서는 대조군이 20.8일인데 비해 된장의 헥산추출물은 32.9일로 58.2%의 수명연장 효과를 나타내었으며, 메탄올추출물은 34.6일로 66.3%의 가장 높은 수명연장 효과가 관찰되었으며, 열탕추출물은 28.9로 38.9%의 수명연장 효과를 나타내었다(Table 3).

된장시료의 투여로 면역 관련 장기중의 하나인 비장의 체중에 대한 중량변화가 있는지를 살펴본 결과, 대조군의 경우 0.52%였으나 된장의 헥산추출물은 0.68%, 메탄올추출물은 0.57%였으며, 열탕추출물은 0.54%로 체중에 대한 비장의 중량은 약간의 증가를 나타내었다(Table 4). 간무게의 경우 대조군은 총 체중당 간의 비율이 5.47%인데 반해 된장의 헥산추출물, 메탄올추출물 및 열탕추출물은 총 체중당 간의 비율이 각각 5.34%, 5.07% 및 5.27%로 메탄올추출물을 투여한 경우가 다소 작게 나타났다. 심장의 경우는 대조군이 총 체중당 0.57%인데 비해 된장의 헥산추출물은 0.55%, 메탄올추출물은 0.56%를, 열탕추출물은 0.52%로 대조군과 유사하였다. 신장은 대조군이 1.58%를 나타낸 것에 비해 메탄올추출물은 1.96%로 높은 증가가 있었으나 된장의 헥산추출물 및 열탕추출물은 1.69% 및 1.42%로 대조군과 유사하게 나타났다.

Sarcoma-180 세포를 투여한 마우스의 장기의 중량변화(Table 4)에서는 비장의 체중에 대한 중량변화는

Table 4. Effects of hexane, methanol and boiling extracts from *doenjang* on the spleen, liver, heart, kidney weights of Balb/c mice

Sample	Body wt. (g)	Spleen/body wt. (%)	Liver/body wt. (%)	Heart/body wt. (%)	Kidney/body wt. (%)
Control	26.6±3.6	0.52±0.15	5.47±0.46	0.57±0.05	1.58±0.29
Hexane ext.	27.3±2.9	0.68±0.11	5.34±0.48	0.55±0.01	1.69±0.30
Methanol ext.	28.3±4.0	0.57±0.11	5.07±0.56	0.56±0.02	1.96±0.20
Boiling ext.	27.3±2.1	0.54±0.10	5.24±0.69	0.52±0.07	1.42±0.29
S-180+PBS	27.1±6.0	0.61±0.14	5.59±0.74	0.46±0.05	1.44±0.27
S-180+Hexane ext.	29.8±4.8	0.66±0.19	5.30±0.30	0.56±0.11	1.74±0.11
S-180+Methanol ext.	29.4±3.1	0.71±0.19	5.43±0.30	0.53±0.07	1.54±0.38
S-180+Boiling ext.	28.8±4.1	0.68±0.20	5.04±0.46	0.42±0.05	1.66±0.17

7-days sarcoma-180 ascites cells were s.c. transplanted into the left groin of inbred strain. 5 mg/kg of hexane, methanol and boiling extracts from *doenjang* or the equal volume of phosphate buffered saline (control) was I.P. injected once a day for 20 days from 24hr following the transplantation. All mice were sacrified at 5 weeks following the transplantation, and spleen, liver, heart and kidney weights were measured (n=10).

대조군이 0.61%였으나 된장의 헥산추출물은 0.66%를, 메탄올 추출물은 0.71%로 대조군에 비해 다소 높게 나타났고, 열탕추출물은 0.68%를 나타내어 된장의 헥산추출물과 유사한 증가를 보였다. 대조군 및 된장의 메탄올추출물 투여군은 총 체중당 간의 비율이 5.59% 및 5.43%로 정상적인 마우스에 비해 높게 나타났으나 된장의 헥산 추출물을 투여한 것은 5.30%로 정상적인 마우스와 유사하였고, 열탕추출물을 투여한 것은 5.04%로 다소 낮았다. 총 체중당 심장의 비율은 대조군 및 열탕추출물 투여군이 0.46% 및 0.42%를 나타내어 정상적인 마우스보다 낮게 나타났고 된장의 헥산추출물 및 메탄올추출물로 처리한 것은 0.56% 및 0.53%로 정상적인 마우스와 유사하였다. 신장의 경우 대조군은 1.44%로 정상적인 마우스보다 낮게 나타났으나 된장의 헥산추출물 및 열탕추출물 투여군은 1.74% 및 1.66%로 정상적인 마우스보다 다소 높았고, 메탄올추출물을 처리한 것은 1.54%로 정상적인 마우스보다 낮게 나타났다.

마우스의 복강 내로 헥산추출물을 일정량 1회 주사시킨 후 분리한 복강 내 대식세포의 탐식기능을 관찰한 결과 phagocytic activity는 대조군이 12.0인데 비해 헥산추출물을 처리한 것은 20.0으로 높게 나타났다. 결국 이와 같이 된장 투여로 대식세포의 식작용이 증가되므로 암세포를 제거할 능력이 크게 증대되는 것으로 생각할 수 있다. Superoxide의 생성능의 변화를 나타내는 NBT 역시 대조군에 16.0인데 비해 44.7로 매우 높게 나타나 된장의 헥산 추출물의 투여로 superoxide의 생성을 자극하여 암세포를 사멸시키는 능력이 현저히 증가됨을 알 수 있다. Nitric oxide 생성은 대조군이 31.8을 나타낸 것에 비해 된장의 헥산추출물을 처리한 것은 26.6으로 다소 낮게 나타났다 (Table 5).

Table 5. Effect of hexane extract from *doenjang* on the phagocytic activity and nitroblue tetrazolium (NBT) reduction in the peritoneal phagocytic cells of Balb/c mice and nitric oxide production in the blood serum of the mice

Sample	Phagocytic activity	NBT (%)	Nitric oxide
Control	12.0±1.8	16.0±3.4	31.8±0.5
Hexane ext.	20.0±3.9	44.7±1.10*	26.6±0.9

Mice were injected I.P. with hexane extract from *doenjang* (0.125 μg/mouse) and PBS (0.5 ml, control) 1 time each. Phagocytic activities were calculated with *C. albicans* to be phagocytized in 50 phagocytes. NBT reduction (%) were counted with cells to have intracellular blueblack formazan in 200 phagocytes.
*: Significantly different from the control with $p<0.05$

고 찰

된장의 헥산추출물, 메탄올추출물 및 열탕추출물은 *Salmonella typhimurium* TA100에서 AFB_1에 대해 농도 의존적으로 강한 항돌연변이 효과를 나타냈으며 TA98균주에 대해서도 유사한 결과를 나타내었고, 특히 열탕추출물이 가장 높은 항돌연변이 효과를 나타내었다. AFB_1은 *Aspergillus flavus*와 *Aspergillus parasiticus*에 의해 생성되는 2차 대사산물로서 잠재적인 hepatotoxin이며 강력한 발암원으로 알려져 있다.[29] AFB_1에 대해 된장의 헥산추출물, 메탄올추출물 및 열탕추출물이 항돌연변이 효과가 컸다는 것은 된장이 간의 microsomal 효소계의 활성화에 관여하여 돌연변이 전구물질을 최종 돌연변이 물질로의 전환을 방지하거나 활성화된 돌연변이 물질에 직접 반응하여 제거하는 효과가 있으리라고 생각된다.

된장 시료의 항돌연변이 효과를 SOS chromotest로 살펴본 결과 된장의 헥산추출물은 농도에 비례하여 MNNG에 대해 SOS response를 억제하여 된장의 헥산추출물 10 μg/ml 첨가시 MNNG의 돌연변이성이 99%나 크게 억제되었다. 이는 spore *rec* assay를 이용한 된장의 항돌연변이 실험에서 된장의 헥산 획분이 MNNG의 돌연변이성을 억제하였다는 이등[30]의 보고와도 일치한다. 된장의 메탄올추출물도 농도에 비례하여 MNNG의 돌연변이성을 현저히 저해하였으나 열탕추출물은 항돌연변이 효과가 다소 낮았다. 이런 결과는 암발생을 방지하는 생콩 내에 있는 트립신 억제제가 열에 불안정하여 삶을 경우 생콩에 비해 항돌연변이 효과가 다소 감소된다는 보고[31]와도 일치한다. 이런 차이는 추출액, 방법에 따라 활성성분의 용해성이 틀리기 때문으로 생각된다. 박등[5]에 의하면 된장의 메탄올추출물이 AFB_1에 대해 강력한 항돌연변이성을 나타내었는데 생콩이 삶은 콩보다 저해능이 컸으나, 그보다 된장이 돌연변이 유발 억제효과가 가장 큰 것으로 관찰되었다. 특히 된장의 메탄올추출물은 direct mutagen (MNNG와 4- NQO)에서 강력한 항돌연변이 활성을 나

타냈으며, S9 microsomal activation을 요구하는 다른 indirect mutagen (BaP와 DMN)의 돌연변이성도 억제했다고 한다. 또한 이 보고에 의하면 다른 콩 발효제품인 상품용 된장, 청국장, 일본 된장들도 된장과 함께 항돌연변이 효과가 있었지만 재래식 된장이 가장 효과가 컸었다고 하였다. 이 실험에 사용된 된장은 상품용이기는 하나 주로 콩으로 재래방법을 따른 시료이기에 효과가 좋았다고 생각된다.

김[32]은 *in vivo*에서 재래식 된장, 미소(Miso) 및 콩의 메탄올추출물의 고형암 성장 저지 효과를 살펴본 결과 대조군에 비해 재래식 된장, 미소 및 콩의 메탄올추출물 투여시 종양의 무게가 크게 감소되어 재래식 된장의 경우 90%의 고형암 성장 저지 효과가 있다고 하였다. 된장의 이러한 항종양 효과는 된장이 종양세포의 증식에 직접적으로 관여하거나 TNF (tumor necrosis factor)와 같은 물질을 유도하여 면역계의 메카니즘을 통해 고형암의 성장을 억제하리라 추정된다. 이등[30]은 HT-29 인체 결장암세포에서 된장 추출물의 암세포 성장 저해 효과를 살펴본 결과 된장의 메탄올추출물 첨가시 결장암 세포의 성장이 억제되었으며, 메탄올 분획중 헥산 분획이 가장 현저한 암세포 성장 억제 효과를 나타내었다고 하였다. 또한 된장의 활성물질 중 하나인 linoleic acid가 C3H/ 10T1/2 세포에서 발암물질로 인한 세포독성효과를 감소시켜 발암성을 현저히 억제한다고 하였다.[30]

Sarcoma-180 암세포를 복강에 이식시킨 Balb/c 마우스에 된장의 헥산추출물, 메탄올추출물 및 열탕추출물을 투여하였을 때 수명 연장 효과를 살펴본 결과 대조군에 비해 평균 수명이 헥산추출물은 38.9%, 메탄올추출물은 66.3%, 열탕추출물은 58.2%의 수명연장 효과가 관찰되었다. 김[32]은 정상 마우스에 종양세포를 이식한 후 재래식 된장, 미소(Miso) 및 콩을 투여하고 이들 시료로 인한 수명연장 효과를 살펴본 결과 대조군에 비해 재래식 된장의 메탄올추출물은 68%의 수명연장 효과를 나타내어 본 연구와 비슷한 결과를 보고하였으며, 미소(Miso) 및 콩은 각각 41% 및 11%의 수명연장 효과가 있다고 하였다.

면역 관련 장기중 하나인 비장의 체중에 대한 중량변화를 살펴본 결과 대조군에 비해 된장의 헥산추출물, 메탄올추출물 및 열탕추출물은 약간의 증가를 나타내었으며, 종양세포를 이식한 경우도 비슷한 경향을 나타내었다. 이러한 비장의 중량증가는 비장에 splenic macrophage 등 면역계에 관련된 세포들의 활성이 증가되었으리라 생각되며 된장의 항암성은 이런 면역계의 활성 증가와도 관련이 있으리라 추측된다.

된장추출물 투여시 다른 장기에 대한 중량변화를 살펴본 결과 먼저 대사과정중에 생기는 여러 유해물질들의 해독작용을 담당하는 간의 체중당 비율은 메탄올추출물이 가장 작게 나타났고, 심장은 메탄올추출물이 다소 높은 증가를 보였다. Sarcoma-180 세포를 투여한 경우는 정상적인 마우스에 비해 대조군 및 메탄올추출물 투여군의 경우가 간의 비율이 높게 나타났고, 신장의 중량은 헥산추출물 및 열탕추출물 투여시 정상적인 마우스에 비해 다소 높았다.

숙주에서 종양세포 등의 병적인자에 대한 방어력 증강은 중요한 일이라 하겠으며, 특히 종양면역에서 결정적 역할을 수행하고 있는 숙주세포의 방어력 증강을 위한 시도가 과거 수 십 년동안 부단히 진행되어 왔다. 숙주세포 중에서도 표적세포를 살해할 수 있는 대식세포의 세포 독성효과를 항진시키는 물질들이 그동안 다수 발견되어 현재는 괄목할만한 성과를 거두고 있다. 어떤 미생물 그 자체, 미생물의 추출물이나 산물, cytokine, 특정 종양세포, 특정 화학물질 등이 대식세포에 작용하면 세포는 활성화되고, 그 결과로 신호전달물질의 생성과 세포독성 자체의 항진이 나타난다.[33-36] 즉 대식세포는 외부로부터의 감염이나 자극물질의 작용을 받게 되면 활성화되고, 그 결과 spreading, 탐식작용, pinocytosis, lysozyme, cytoplasmic granule, O_2^- 생성, PGE_2 생성, 항균작용 및 항종양작용 등의 증가가 나타나게 된다. 본 연구에서 된장의 헥산추출물은 대조군에 비해 마우스 비장의 phagocytic activity와 NBT 환원능을 현저히 증가시켰고 된장은 이와 같이 대식세포의 활성을 증가시켜 항암효과를 가지는 것으로도 나타났으며, 이 때 NO의 생성은 다소 감소시켰다.

결 론

된장의 헥산추출물, 메탄올추출물 및 열탕추출물은 Ames test에서 농도에 의존적으로 AFB_1에 대해 강한 항돌연변이 효과를 나타냈으며, 특히 열탕추출물이 그 효과가 가장 컸었다. 또한 SOS chromotest에서도 이들 시료는 MNNG의 돌연변이 유발을 강하게 억제하였으며, 이 경우 헥산추출물이 가장 높은 항돌연변이 활성을 나타내었다. 마우스의 서혜부에 고농도의

sarcoma-180 종양세포 부유액을 주사시킨 후 된장추출물을 투여하였을 때 된장의 헥산추출물, 메탄올추출물 및 열탕추출물은 각각 64.0%, 79.3% 및 49.7%의 항종양효과를 나타내었으며 이 때 메탄올추출물이 가장 효과가 컸었다. Sarcoma-180 암세포를 복강에 이식시킨 Balb/c 마우스에 된장추출물을 투여했을 때도 항종양효과 실험에서와 비슷한 수명 연장 효과가 관찰되었다. 또한 비장의 체중에 대한 중량변화를 살펴본 결과 이들 된장추출물 모두 약간의 증가를 나타냈으며, 특히 된장의 헥산추출물은 마우스 비장의 phagocytic activity와 NBT 환원능을 증가시켜, 된장은 발암물질에 대해 항돌연변이효과 그리고 *in vivo*에서도 항암효과를 나타내었다.

참고 문헌

1) 이한창. 발효식품. 신광출판사 1991; pp 28.
2) Sugimura T, Sato S. Mutagens-carcinogens in foods. *Cancer Res (suppl.)* 1983; 43: 2415.
3) Renner HW. *In vivo* effect of single or combined dietary antimutagens on mutagen-induced chromosomal aberations. *Mutat Res* 1990; 244: 185.
4) 박건영, 이규복. 재래식 된장, 간장 제조중 Aflatoxin B_1에 대한 항돌연변이 효과. 한국영양식량학회지 1987; 13: 49.
5) 박건영, 문숙희, 백형석, 최홍식. 된장의 Aflatoxin B_1에 대한 항돌연변이 효과. 한국영양식량학회지 1990; 19 (2): 156.
6) 임선영. Linoleic acid의 항돌연변이 및 항암효과. 부산대학교 대학원, 석사학위논문 1994.
7) 박건영, 문숙희, 이숙희. 된장의 항돌연변이 효과 -된장찌게 및 된장국의 Aflatoxin B_1에 대한 돌연변이유발 억제효과. 한국환경성돌연변이발암원학회지 1994; 14 (2): 145.
8) Asahara N, Zhang XB, Ohta Y. Antimutagenicity and Mutagen-binding activation of mutagenic pyrolyzates by microorganisms isolated from Japanese Miso. *J Sci Food Agric* 1992; 58(3): 395.
9) Nishijima M, Saito K. Antitumor of Miso by sarcoma-180 cell treated mice. *Miso Science Technology* 1993; 41(12): 451.
10) Kurechi T, Kikugawa K, Fukuda S, Hasunuma M. Inhibition of N-nitrosamine formation by soya products. *Fd Cosmet Toxicol* 1981; 19: 425.
11) 青木宏. みそ汁三十不健康法. ごま書房, 日本. 1981.
12) Yavelow J, Finlay TH, Kennedy AR, Troll W. Bowman-Birk soybean protease inhibitor as an anticarcinogen. *Cancer Res (Suppl)* 1983; 43: 2454S.
13) Weed HG, McGandy RB, Kennedy AR. Protection against dimethylhydrazine-induced adenomatous tumors of the mouse colon by the dietary addition of an extract of soybeans containing the Bowman-Birk protease inhibitor. *Carcinogenesis* 1985; 6(8): 1239.
14) Messadi DV, Billing P, Shklar G, Kennedy AR. Inhibition of oral carcinogenesis by a protease inhibitor. *J Natl Cancer Inst* 1986; 76(3): 447.
15) Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 1983; 113: 173.
16) Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 1975; 31: 347.
17) Matsushima T, Sugimura T, Nagao M, Yahagi T, Shirai A, Sawamura M. Factors modulating mutagenicity in microbial test, In; Norphth KH and Gamer RC, eds. Short terms for detecting carcinogens. Berline, Springer, 1980; pp 273.
18) 백창원, 함승시. SOS chromotest에 의한 사과의 효소 갈변반응 생성물의 항돌연변이 효과. 한국식품과학회지 1990; 22: 618.
19) Miller, J. Experiments in molecular genetics. Cold spring harbor laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1972.
20) Mishell BB, Shiigi SM. Selected methods in cellular immunology. Freeman and W.M. Co., San Francisco 1980; pp 16.
21) Suga T, Shiio T, Maeda YY, Chihara G. Antitumor activity of lentinan syngenetic and autochthonous hosts and its suppressive effect on 3-methyl cholanthrene-induced carcinogenesis. *Cancer Res* 1992; 52: 154.
22) Maeda YY, Chihara G. The effect of neonatal thymectomy on the antitumor activity of lentinan, carboxylmethyl pachymaran and zymosan and their effects on various immune responses. *Int J Cancer* 1993; 11: 153.
23) Ishitsuka H, Miwa A, Takenoto K, Fukuoka K, Itoga A, Maruyama HB. Role of uridine phosphorylase for antitumor activity of 5'-deoxy-5-fluorouridine. *Gann* 1980; 71: 112.
24) Smith DL, Rommel F. A rapid micro method for the simultaneous determination of phagocytic-microbicidal activity of human peripheral blood leukocytes *in vitro. J Immunol Methods* 1977; 17: 241.
25) Osterm VK, Tanaka Y, Prahl J, Deluka HF, Ikekania N. 24- and 26-homo-1,25-dihydroxyvitamin D_3: Preferential activity in inducing differentiation of human leukemia cell HL-60 *in vitro. Proc Natl Acad Sci* 1987; 84: 2610.
26) Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive mitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophage. *J Immunol* 1988; 141(7): 2407.
27) Quillardet P, Huisman O, D'Ari R, Hofnung M. SOS

chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K12 to measure genotoxicity. *Proc Natl Acad Sci* 1982; 79: 5971.
28) Quillardet P, Bellecombe C, Hofnung M. The SOS chromotest a colorimetric bacterial assay for genotoxin; Validation study with 83 compounds. *Mutat Res* 1985; 147: 79.
29) 박건영. Aflatoxin과 그 생성에 관련되는 주요인. 한국영양식량학회지 1984; 13(1): 117.
30) 이정민. 된장추출물과 linoleic acid의 항돌연변이 및 항암효과. 부산대학교 대학원, 석사학위논문 1993.
31) 박건영. 된장의 안정성과 암예방 효과. 대한암예방학회지 1997; 2: 27.
32) 김문경. Sarcoma-180 투여 마우스에서 재래식 된장의 항암효과. 부산대학교 대학원, 석사학위논문 1998.
33) Lee SY, Kim YC. Cytocidal effect of immune lymphocyte on transplantable target tumor cells (Ehrlich carcinoma and Sarcoma-180) *in vivo. Korean J Path* 1970; 4: 91.
34) Markovic SN, Murasco DM. Anesthesia inhibits poly I: C induced stimulation of natural killer cell cytotoxity in mice. *Clin Immunol Immunopathol* 1990; 56: 202.
35) Oehler JR, Lindsay LR, Nunn ME, Holden HT, Herberman RB. Natural cell-mediated cytotoxicity in rat. II. *In vivo* augmentation of NK-cell activity. *Int J Cancer* 1978; 21: 210.
36) Talcott PA Exon JH, Koller LD. The effect of methylnitrosourea (MNU) on natural killer (NK) cell cytotoxicity and cytokine production in rats. *Carcinogenesis* 1990; 11: 829.