Journal of Korean Association
of Cancer Prevention
2001; 6(1): 26-35

마우스에서 솔잎의 항암효과 및 독성연구

부산대학교 식품영양학과, [1]동의대학교 한의학과

길 정 하 · 최 병 태[1] · 박 건 영

Antitumor Effect and Toxicity of Pine Needle in Mice

Jeung-Ha Kil, Byung-Tae Choi[1] and Kun-Young Park

Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Busan 609-735, Korea
[1]Department of Anatomy, College of Orental Medicine, Dong-eui University, Busan 614-714, Korea

In vivo anticancer effect and toxicity of pine needle was tested using sarcoma-180 cell transplanted mouse. Each group was fed AIN-76 diets containing different levels of powdered pine needle. All mice were sacrificed at 4 weeks followed by the transplantation of sarcoma-180 cells. The growth of tumor induced by sarcoma-180 cells was significantly suppressed in the 10% pine needle added diet group. When the pine needle added diets were fed, glutathione *S*-transferase activities and glutathione contents in the liver were increased. To determine the levels of toxicity, serum aminotransferase (AST, ALT) activities, blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (CRE) levels in the serum were evaluated in the pine needle diets fed mice. Twenty percent of the powdered pine needle added diet group exhibited higher alanine transaminase (ALT) activity and blood urea nitrogen (BUN) level than normal group, suggesting that high level of the pine needle in the diet might cause a toxicity in the liver and kidney of the Balb/c mouse. The distribution of glycogen was improved by the intake of the pine needle in the diet, while the injection of sarcoma-180 cells significantly decreased the glycogen content in the liver. Anticancer effect of 10% pine neddle added diet was higer than that of 20% pine needle added. These results indicated that pine needle might have an antitumor activity and its optimal level in the diet was 10% in this experimental system.

Key Words: Antitumor, Toxicity, Pine needle

서 론

솔잎(*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc)은 온대 기후 지역에서 자생하는 소나무과의 식물로서 한국, 일본, 중국에서 자생하며, 우리 나라에서는 전통적으로 솔잎의 꽃가루로 다식을, 수피로는 송기떡을 만들어 먹었다.[1)] 솔잎에는 정유성분으로는 α-pinene, β-pinene, camphene과 flavonoid류로 quer-

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

cetin, kaempferol과 수지 등의 성분이 함유되어 있으며, 수분 58.1%, 단백질 4.5%, 지질 3.9%, 당질 19.6%, 섬유소 13.3%, 회분 0.6%정도가 함유되어 있다.[2] 그리고 솔잎은 옛부터 '신선의 식사'라 했으며, 간장질환, 위장질환, 신경계질환, 순환기계질환, 피부질환 등의 치료에 효과가 있다고 알려져 있다.[3] 솔잎에 대한 선행 연구로는, 솔잎의 섭취가 흰쥐에서 간의 총지방농도와 중성지방농도 및 혈당을 낮추었다는 연구가 있었다.[4,5] 고지방식이에 대한 rat의 효소활성 및 간조직에 대한 연구에서 솔잎의 섭취는 간 기능 개선에 효과가 있었으며,[6,7] 또한 솔잎은 cholesterol을 저하시키는 기작에도 영향을 주었다.[8,9] 그리고 솔잎은 *in vitro*에서 항변이원성과 전자공여작용, 아질산염 소거작용이 높은 것으로 나타났으며,[10] 마우스 비장세포와 cytokine분비에도 영향을 주었다.[11] 또한 솔잎은 항(발)암효과를 낼 수 있는 여러 영양 성분을 함유하고 있는데, 그 중 비타민 A의 함량은 1534.40 IU로, 과일과 비교하면 복숭아, 귤, 감 등에 함유되어 있는 비타민 A와 비슷하고, 비타민 C의 함량도 배추가 46 mg%인데 비해 솔잎은 158 mg%로 매우 높은 것을 알 수 있다.[12] 그리고 솔잎에는 linoleic acid ($C_{18:2}$, n-6)가 20.15% 함유되어 있는데,[12] linoleic acid는 필수 지방산으로 체내에서 합성되지 않으므로 1.5% 정도를 음식물에서 섭취해야 하며, 체내 면역기능을 조절할 수 있는 eicosanoid들의 전구체이다.[13] 이런 linoleic acid는 임의 연구[14]에 따르면 항돌연변이 및 항암효과가 있다고 알려진 바도 있다. 이런 연구들을 볼 때 솔잎의 항돌연변이 및 항암성이 기대되기는 하나 직접적으로 그 효과에 대해 밝혀낸 연구가 없어서, 본 연구에서는 *in vivo*에서 sarcoma-180 cell을 이식한 마우스에게 솔잎을 섭취시켜 항암효과를 살펴 보았다.

한편 이러한 천연물질들은 적당한 양을 섭취했을 때는 건강에 이로운 역할을 하지만, 과량 섭취시에는 오히려 독성을 나타내는 경우가 있다. 따라서 과량 섭취시 솔잎의 독성 유무를 알아보기 위해 혈청에서 간독성의 지표로 aminotransferase (AST, ALT)를, 신장독성의 지표로 blood urea nitrogen (BUN)과 creatinine (CRE)을 측정함으로써, 간과 신장에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1) Sarcoma-180 cell을 이용한 종양형성저지 실험

(1) 시료의 준비: 솔잎은 전라남도 무안에서 채취되어 동결건조된 상태로 GMF(주)로부터 구하여 사용하였다. 실험 식이는 표준식이인 AIN-76 diet[15] 조성을 대조군으로 하여, 솔잎을 2%, 10%, 20% 첨가한 식이를 솔잎의 일반성분을 고려하여 에너지 수준이 동일하게 조제하였다(Table 1). 실험식이 중 casein, mineral mixture, vitamin mixture, cellulose는 ICN (Biomedical. Inc., Ohio, USA)제품을 사용하였다. 그리고 choline bitartarate는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)제품을 이용하였다.

(2) 실험 동물 사육: 실험 동물은 6주령의 체중이 22 g 전후인 웅성 Balb/c mouse를 한국화학연구소(대전)로부터 분양 받아 사용하였으며, 생쥐들은 체중에 따라 난괴법(randomized block design)에 의해 6마리씩 8군으로 분류하였다. 실험 식이

Table 1. Composition of experimental diets[1] (g/kg)

	Control[2]	Pine needle		
		2%	10%	20%
Casein	200	199	196	191
Methionine	3	3	3	3
Corn starch	150	146	130	111
Sucrose	500	500	500	500
Fiber (cellulose)	50	47	37	23
Corn oil	50	49	46	42
Mineral mixture	35	35	35	35
Vitamin mixture	10	10	10	10
Choline bitartarate	2	2	2	2
Pine needle powder	-	20	100	200

[1]In order to meet the equal energy among diets, carbohydrate, protein, lipid and fiber contents of pine needle powder were considered (Contents of calorie, carbohydrate, fiber, protein, lipid level per 100 g were 161 Cal, 19.6 g, 13.3 g, 4.5 g, 3.9 g, respectively).
[2]Control diets was prepared following AIN-76 guidelines for mouse experiment.

는 각 군간에 섭취량의 차이를 조정하기 위해, 실험 전 2주간 섭취시키고, 각 군간에 섭취량이 비슷한 것을 확인한 후, 실험을 하였다. 이때 실험식이와 물은 자유롭게 먹도록 하였으며, 동물실험실은 온도 22±1°C, 습도 55±5%를 유지하였으며, 12시간 간격으로 light-dark cycle을 유지하였다.

(3) 종양 세포: Balb/c mouse의 복강내에 1주일 간격으로 계대배양하여 보존하고 있는 sarcoma-180 세포를 실험용 종양세포로 사용하였다. 즉 실험동물의 복강내에서 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 1.0×10^6 cells/ml가 되도록 종양세포 부유액을 만들어 1 ml씩을 복강주사하여 이식 보존하면서 실험에 사용하였다.

(4) 고형암 성장 저지 실험: 실험동물은 각 군당 6마리씩으로 하여 실험실에서 1주일 간격으로 계대 보관 중인 종양세포부유액 0.2 ml (6.0×10^6 cells/mouse)씩을 실험동물의 왼쪽 서혜부(left groin)에 피하 이식하였다. 종양세포 이식 4주째 되는 날 치사시켜 생성된 고형암을 적출하고 그 무게를 측정한 후 다음 식에 따라 종양 성장 저지 백분율(tumor growth inhibition ratio, I.R.: %)을 계산하였다.[16~18]

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

Cw: 대조군의 평균 종양무게
Tw: 처리군의 평균 종양무게

(5) 간조직에서 효소원의 조제: 마우스를 치사시킨 후 4°C 이하의 생리 식염수로 간을 관류하여 간 내에 남아있는 혈액을 제거한 후 간장을 적출하였다. 간조직 1 g당 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4)를 가하여 빙냉하에서 glass teflon homogenizer (Tokyo rikakikai Co., Ltd, Japan)로 마쇄하였다. 이 마쇄액을 homogenate 분획으로 하였으며, 이것을 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄 세포부분을 제거하고 다시 105,000 ×g에서 1시간 동안 초원심분리하여 얻은 상등액을 cytosol 분획으로 하였다. 이렇게 얻은 hemogenate 분획은 glutathione 함량 측정에, cytosol 분획은 glutathione *S*-transferase 활성 측정에 이용하였다.

(6) 간조직 중의 glutathione의 함량측정: Ellamin의 방법[19]에 준하여 효소원(400~600㎍ 단백질)에 제단백시약으로 4% sulfosalicylic acid를 가하여 단백질을 제거한 상등액에 disulfide reagent (0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0)에 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)를 녹인 후 2.7 ml를 가하여 생성되는 청색을 412 nm에서 측정하고 표준곡선에 따라 산정하였고, 단위는 조직 1 g당 glutathione ㎛mole로 표시하였다.

(7) Glutathione *S*-transferase의 활성 측정: Habig 등[20]의 방법에 준하여 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.5) 중에 0.04 M reduced glutathione 75 ㎕와 효소액을 0.1 ml 넣고 blank에 20% trichloroacetic acid 0.5 ml를 가해 효소를 실활시킨 다음 25°C에서 5분간 반응시켰다. Blank와 시료 각각에 0.12 M 1-chloro-2,4-dinitrobenzene 25㎕를 가하여 25°C에서 2분간 반응시키고 시료에 20% trichloroacetic acid를 가해 반응을 완결시킨 후 원심분리하여 얻은 상등액을 340 nm에서 흡광도를 측정하여 1-chloro-2,4-dinitrobenzene의 mole 흡광계수 9.6 $mM^{-1}cm^{-1}$을 이용하여 활성도를 산정하였다. 효소 활성의 단위는 1분간 mg protein이 생성한 2,4-dinitrobenzene-glutathione의 nmole수로 표시하였다.

(8) Protein 정량: 단백질의 함량은 Lowry등[21]의 방법에 준하여 bovine serum albumin (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA)을 표준품으로 하여 측정하였다.

2) 독성 실험

(1) 간독성 검사: 혈청 aminotransferase의 활성은 Reitman과 Frankel의 방법[22~25]에 준하여 조제된 kit (영동제약)를 사용하여 alanine transaminase (100 ml 당 DL-alanine 1,780 ml 및 α-ketoglutaric acid 29.2 mg 함유) 및 기질액 1.0 ml를 가하여 37°C에서 5분간 preincubation시킨 다음 혈청 0.2 ml를 넣어 37°C에서 alanine transaminase는 30분, aspartate

transaminase는 60분 반응시킨 후 정색시약(2,4-dinitrophenylhydrazine) 1.0 ml를 첨가한 다음 0.4N-NaOH 용액 1.0 ml를 가하여 혼합한 후 10분간 실온에서 방치하고 파장 505 nm에서 흡광도를 측정하였다. 한편 활성도는 표준검량선에 준하여 혈청 1 ml당 Karmen unit로 표시하였다.

(2) 신장독성 검사: Blood urea nitrogen은 urease 효소법[26]에 준하여 조제된 kit (영동제약)를 사용하였다. Urease효소 0.1 ml과 완충액 20 ml을 섞은 urease효소완충액에 혈청을 가하고 37°C에서 15분간 반응시켰다. 여기에 salicylic acid와 alkalic hyperchloric acid를 가하여 37°C에서 5분간 반응시켜 생성된 indophenol을 urea nitrogen 기준액(60 mg/100 ml urea-N)와 비교해서 비색정량하였다.

Creatinine 측정은 Jaffé modified 직접법(creatinine Jaffé 반응 변법[27,28])을 이용했는데 혈청에 피크린산시약 3 ml을 넣고 37°C water bath에서 20분간 방치 후 흡광도 값을 읽었다. 그리고 여기에 acid 시약을 두 방울 넣어서 37°C water bath에서 5분간 방치 후 읽은 흡광도 값을 빼서 표준(creatinine 기준액)와 대조해 계산하였다.

3) 조직학적인 관찰과 glycogen의 분포

솔잎을 첨가한 식이를 섭취한 마우스의 간을 절취하여 4% paraformaldehyde/phosphate buffered saline (PBS) 용액에 4°C, 12시간 고정하여 순차적인 alcohol 탈수와 투명화를 거쳐 paraffin에 포매한 후 6㎛ 연속 절편을 제작하였다. 간의 조직학적인 변화와 glycogen 분포관찰을 위해 탈 파라핀한 후 hematoxylin-eosin (H-E) 염색과 periodic acid schiff (PAS) 반응을 실시하였다.

4) 통계처리

각 시료로부터 얻은 실험자료로부터 ANOVA를 구한 후 Duncan' multiple range test를 이용하여 통계 분석하였다($p<0.05$).

결과 및 고찰

1) 솔잎의 항종양 효과

(1) 고형암 성장저지 효과: 솔잎섭취에 의한 항종양효과를 보기 위하여 마우스의 왼쪽 서혜부 피하에 종양세포를 이식시킨 후 4주 동안 솔잎이 포함된 식이를 공급하고, 마우스를 해부하여 종양을 분리하여 그 무게를 측정하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 대조군의 고형암 무게는 2.8 g인데 반해서, 솔잎첨가 식이군에서는 유의적으로 고형암 무게가 감소하는 것을 볼 수 있었다. 솔잎을 식이 중량의 2%를 첨가시킨 경우 종양의 무게는 1.2 g으로 대조군에 비해 59%의 저해율을 보였고, 또한 10%를 첨가시킨 군에서는 1.0 g으로 66%의 높은 저해율을 나타내었다. 그러나 솔잎을 20%를 첨가시킨 군에서는 고형암이 1.8 g으로 저해율이 37%로 오히려 솔잎을 10%를 첨가한 군보다 고형암 생성 저해효과가 낮았다.

솔잎에는 항(발)암효과를 낼 수 있는 비타민 A, 비타민 C 등이 많이 함유되어 있고, 또한 체내 면역 기능을 조절할 수 있는 eicosanoid들의 전구체인 linoleic acid 등도 함유되어 있다. 그리고 김등[28]은 솔잎추출물이 항돌연변이 효과를 나타낸다고 하였으며, *in vitro*에서 항변이원성과 전자공여작용, 아질산염 소거작용이 높은 것으로 나타났다.[10] 최의 연구[11]에서는 솔잎의 부탄올 추출물이 비장세포 증식능과 IL-1β와 TNF-α의 분비능을 증가시켜 면역능을 조절할 수 있는 것으로 보고

Table 2. Antitumor activities of various levels of pine needle (PN) added diets in tumor bearing Balb/c mouse with sarcoma-180 cell

Group	Tumor weight (g)	Inhibition rate (%)
S-180 +Control	2.83±0.62[1),a]	
+PN diet 2%	1.15±0.22[bc]	59
+PN diet 10%	0.97±0.12[c]	65
+PN diet 20%	1.77±0.16[b]	37

[1)]Values are mean±SD of 5 mice

[a~c]The different letters are significantly different at the $p<0.05$ level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

7-days sarcoma-180 ascites cells were s.c. transplanted into the left groin of inbred strain. All control mice were fed with AIN-76 diet. Each group was fed diets containing 2%, 10%, 20% pine needle. All mice were sacrificed at 4 weeks following the transplantation, and tumor weight were measured.

된 바도 있다. 이러한 결과들을 볼 때 솔잎의 암 예방 활성이 기대되는데, 본 연구결과에서도 *in vivo*에서 솔잎을 섭취시켜 고형암 무게를 측정해 본 결과 고형암 무게는 솔잎을 첨가시킨 식이를 섭취한 군에서 유의적으로 감소되는 것을 볼 수 있었다. 솔잎은 생체내에서 종양의 성장을 억제할 수 있는 것으로 나타나 생식 등에 솔잎의 첨가는 암을 예방하는 효과가 있을 것으로 기대되나 이에 대한 다른 실험 system 및 임상적인 연구가 뒤따라야 하겠다.

(2) 각 장기의 중량 변화: 솔잎섭취와 sarcoma-180 cell의 이식이 각각의 장기에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 각 장기의 중량을 측정해 보았다. 간의 중량비에서는 종양을 이식하지 않은 군들(PN diet group)에서 솔잎 2% 첨가 식이군은 대조군과 큰 차이가 없었으나, 솔잎을 10%, 20% 첨가한 군에서 약간 증가하는 경향을 보였고, 종양을 이식한 군(S-180+PN diet group)에서는 종양을 이식하지 않은 군(PN diet group) 보다 간중량비가 증가하는 것을 볼 수 있었다. 또한 신체의 면역에 관여하는 비장의 경우 PN diet group에 비해서 S-180+PN diet group에서 전반적으로 무게가 증가하는 경향을 관찰할 수 있었다. 그 외의 장기들(심장, 신장)은 군간에 큰 차이가 발견되지 않았다(Table 3).

(3) 간에서 GST활성 및 GSH함량 변화: 간에서 효소계의 phase II 단계는 내인성 물질이나 외부에서 투여되어지는 독성물질을 포합하거나 수용성 물질로 전환시켜 체외로 배출시킴으로써 이물질을 제거하는 작용을 하는데, GST (glutathione *S*-transferase)는 reduced glutathione을 이용하여 체내 독성물질과 과산화물질을 전이, 배설함으로서 무독화에 관여하는 효소이다.[29] Fig. 1에서 보는 바와 같이 종양을 이식하지 않은 군들(PN diet group)에서는 대조군에 비해서 솔잎을 10%, 20%로 첨가하여 섭취시킨 군에서 GST활성이 유의적으로 증가하는 것을 볼 수 있었다($p<0.05$). 또한 종양을 이식한 군들(S-180+PN diet group)에서도 대조군에 비해서 솔잎을 섭취시킨 군에서 GST활성이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

Glutathione은 세포를 유해산소로부터 방어하는 물질로 sulfhydryl radical을 가지고 있으며 친전자성 물질들과 활성산소 및 과산화지질의 대사작용에 관여하여 무독화 과정에 이용된다. 또한 이것은 lipid peroxidation의 환원에 관여하는데 이는 glutathione이 여러 활성증가물질과 conjugation을 이루어 glutathione *S*-transferase의 작용에 의해 urine으로 배설하도록 함으로서 체내의 독성물질

Table 3. Effects of the various levels of pine needle (PN) added diets on changes of the weights of spleen, liver, heart and kidney and body weight of Balb/c mice

Sample	Body wt. (g)	Spleen/body wt. (%)	Liver/body wt. (%)	Heart/body wt. (%)	Kidney/body wt. (%)
Control	30.32±1.46[1)]	0.41±0.02	5.49±0.09	0.56±0.03	1.49±0.02
PN diet 2%	25.76±1.80	0.41±0.01	6.08±0.14	0.59±0.01	1.50±0.06
10%	28.28±1.80	0.36±0.01	7.28±0.18	0.65±0.01	1.55±0.04
20%	25.23±2.19	0.39±0.01	7.68±0.19	0.63±0.02	1.50±0.06
S-180 +Control	30.43±3.32	0.67±0.04	5.93±0.16	0.49±0.02	1.53±0.07
+PN diet 2%	30.70±1.47	0.62±0.04	6.08±0.14	0.55±0.01	1.44±0.05
+PN diet 10%	29.58±1.65	0.61±0.03	8.01±0.29	0.54±0.03	1.44±0.05
+PN diet 20%	27.06±1.71	0.65±0.03	8.54±0.22	0.54±0.02	1.44±0.02

[1)]The values are means of tumor weight±SD

7-days sarcoma-180 ascites cells were s.c. transplanted into the left groin of inbred strain. All control mice were fed with AIN-76 diet. Each group was fed diets containing 2%, 10%, 20% pine needle. All mice were sacrificed at 4 weeks following the transplantation, and tumor weight were measured.

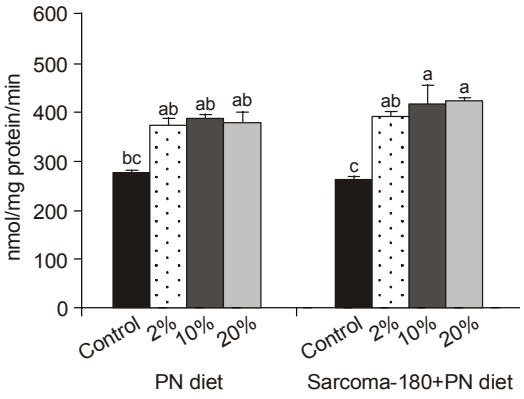

Fig. 1. The effects of various levels of pine needle (PN) added diets on hepatic cytosolic glutathione *S*-transferase activity in sarcoma-180 cell treated Balb/c mice. [a~c]Means with the different letters surmounted on the bars are significantly different at the 0.05 level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

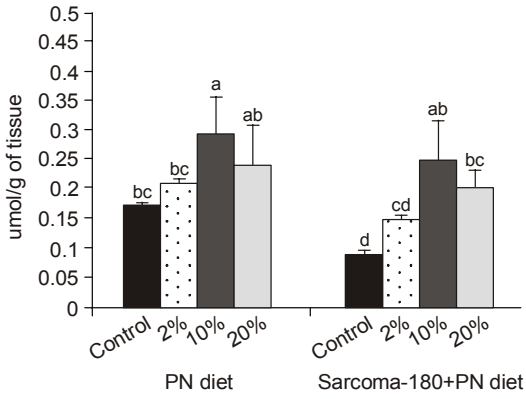

Fig. 2. The effects of various levels of pine needle (PN) added diets on hepatic glutathione content in sarcoma-180 cell treated Balb/c mice. [a~d]Means with the different letters surmounted on the bars are significantly different at the 0.05 level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

들을 제거한다.[30] Fig. 2에서 보는 바와 같이 종양 비이식군(PN diet group)에 비해서 종양 이식군(S-180+PN diet group)에서는 glutathione함량이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다. 종양 비이식군(PN diet group)중에서도 솔잎을 10% 섭취시킨 군에서 glutathione 함량이 0.29 umol/g of tissue로 대조군이 0.17 umol/g of tissue인데 반해서 현저히 증가되었다($p<0.05$). 또한 S-180+PN diet group에서도 대조군이 0.08 umol/g of tissue인데 반해서, 솔잎을 2%, 10%, 20%를 섭취시킨 군에서 각각 0.15, 0.25, 0.20 umol/g of tissue로 유의적으로 증가한 것을 관찰할 수 있었고, 특히 솔잎을 10%함유한 식이를 섭취한 군에서 간의 glutathione의 함량이 가장 많이 증가한 것을 볼 수 있었다($p<0.05$).

이를 볼 때 솔잎의 섭취는 친전자성 발암물질의 활성대사산물을 해독하는 GST활성을 증가시키는 방법으로도 암예방 활성을 가져 고형암의 무게가 대조군에 비해 줄어드는 것으로 사료된다.

2) 솔잎식이의 독성 효과

Table 4에서 보듯이 솔잎을 첨가하지 않은 식이인 대조군에서는 AST (Karmen unit/ml of serum)가 123.0인데 반해서 솔잎을 2%, 10%, 20% 첨가시켜 섭취시킨 군에서는 각각 109.7, 136.3, 165.8으로 솔잎을 2% 첨가군에서는 감소되었으나, 솔잎을 20% 섭취하였을 때는 AST가 유의적으로 증가되는 것으로 나타났다($p<0.05$). 또한 종양 이식군(S-180+PN diet group)에서는 식이에 솔잎을 첨가하지 않고, 종양을 이식한 대조군에서는 142.3이였고, 솔잎이 2%, 10%, 20% 첨가한 식이를 섭취시키고 종양을 이식한 군들에서는 각각 139.5, 127.1, 156.7으로 솔잎을 20% 첨가하여 먹인 군에서만 증가하였지만 처리군간에는 유의적인 차이를 보이지 않았다.

ALT (Karmen unit/ml of serum)도 AST와 비슷한 경향을 보였는데, 식이에 솔잎을 첨가하지 않은 대조군에서는 30.8인데 반해서 솔잎을 20% 섭취한 군에서는 43.5까지 증가하는 것을 볼 수 있었다. 그러나 2% 및 10% 첨가식이군에서는 대조군과 큰 차이가 없었다. 또한 종양 비이식군(PN diet group)에 비해서 종양 이식군(S-180+PN diet group)에서 ALT가 증가하였고, S-180+PN diet group에서도 솔잎을 20% 섭취한 군에서 증가하는 것을 볼 수 있었다(Table 4).

아미노기전이효소는 간 세포막에 존재하는 것으로 독성물질에 의해 간세포가 손상을 받을 경우 혈중으로 유리되어 효소의 농도가 상대적으로 증가되므로 간독성의 지표로 널리 이용되고 있

Table 4. Effects of the pine needle (PN) added diets on serum aminotransferase (AST, ALT) activities in sarcoma-180 cell treated mice

Treatment	AST	ALT
	Karmen unit/ml of serum	
Control	123.0±27.1[bc]	30.8±1.5[c]
PN diet 2%	109.7±16.2[c]	32.8±1.9[c]
10%	136.3±15.0[abc]	33.3±1.6[c]
20%	165.8±14.3[a]	43.5±1.8[a]
S-180 +Control	142.3±1.1[abc]	26.7±2.4[d]
+PN diet 2%	139.5±25.9[abc]	26.8±1.8[d]
+PN diet 10%	127.1±4.9[abc]	30.8±1.4[c]
+PN diet 20%	156.7±5.8[ab]	38.0±1.5[b]

[a~c]The different letters in the same column are significantly different at the $p<0.05$ level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

Table 5. Effects of the pine needle (PN) added diets on serum blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (CRE) levels in sarcoma-180 cell treated mice

Treatment	BUN	CRE
	mg/dl	
Control	12.6±4.5[ab]	1.2±0.8[a]
PN diet 2%	11.9±4.3[ab]	1.4±0.6[a]
10%	19.1±3.5[ab]	1.3±0.4[a]
20%	18.8±1.2[a]	1.2±0.3[a]
S-180 +Control	15.2±4.1[ab]	1.2±0.3[a]
+PN diet 2%	8.5±0.5[b]	1.3±0.4[a]
+PN diet 10%	14.1±6.8[ab]	1.1±0.4[a]
+PN diet 20%	18.5±7.9[ab]	1.3±0.4[a]

[a~b]The different letters in the same column are significantly different at the $p<0.05$ level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

다.[31,32] 간독성 검사에 주로 사용되는 아미노기 전이효소는 aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT)로서 amino acid와 α-keto acid와의 사이에 amino기 전이반응을 촉매하는 것으로 알려져 있으며, AST와 ALT는 모든 장기에 존재하지만, AST는 주로 심장, 간, 골격근에 많고, ALT는 간에 많아 그 위치 특이성이 인정된다. 간장 장해의 지표가 되는 AST 및 ALT의 활성의 증가는 알코올, 유기용매 및 기타 독소에 의한 간 실질세포에 장해가 발생하여 혈중으로 방출이 증가되어 나타난다. 또한 이 효소활성의 증가는 지방대사의 저해로 간 실질 세포의 장애가 발생하여 혈중으로 방출이 항진되어 나타나는 것으로 알려져 있다.[31~34]

혈중 요소 농도(BUN)는 고단백 섭취나 절식에 의한 조직붕괴시 그리고 배설장해나 신장기능 장해 뇨독증 등에서 증가하고 정상 흰쥐의 blood urea nitrogen값은 15~21 mg/dl임이 알려져 있다.[35~37] PN diet group에서 솔잎을 섭취하지 않은 대조군에서는 BUN수치가 12.6 mg/dl인데 반해서, 솔잎을 2%, 10%, 20% 섭취한 group에서는 각각 11.9, 19.1, 18.8 mg/dl으로 솔잎양이 증가함에 따라서 다소 증가하는 것을 볼 수 있었다. 또한 S-180+PN diet group에서도 비슷한 경향을 보였다. BUN은 솔잎 10%와 20% 첨가한 식이를 섭취한 group에서 섭취하지 않은 group에 비해서 어느 정도 증가하였지만, 모두 정상 범위 이내였다(Table 5).

그리고 신장 배설능력의 척도로서 크레아티닌 배설능이 측정되고 있는데, 혈중 creatinine량은 사구체 신염 등에서 증가되며 정상 흰쥐의 creatinine량은 0.4~1.5 mg/dl이다.[35,37,38] 솔잎을 첨가하지 않은 식이를 섭취한 대조군은 1.2 mg/dl인데 반해서, 솔잎을 첨가한 식이를 섭취한 군에서 혈중 creatinine량은 모두 1.1~1.4 mg/dl 범위 이내로 정상군과 거의 차이를 보이지 않고, 모두 정상 범위 이내였다.

최등의 연구[39]에 따르면 최고 체중 kg당 10 g의 솔잎추출물을 rat의 위에 직접 투입하여 14일간 관찰하였을 때 사망예가 관찰되지 않았다. 본 실험에서는 한달 정도 솔잎을 꾸준히 섭취할 때 간이나 신장 등의 장기에 미치는 영향을 보기 위하여 혈청에서 aminotransferase활성과 BUN, CRE 농도를 측정해 본 결과 솔잎을 20% 첨가 시켜 섭취시킨 군에서 그 농도가 다소 증가하는 것으로 볼 때, 솔잎을 식이에 20% 이상 첨가하여 섭취할 시는 간과 신장의 기능에 약간의 무리를 줄 수 있는 것으로 사료되나, 이에 대한 더 많은 후속 연구가 필요하다.

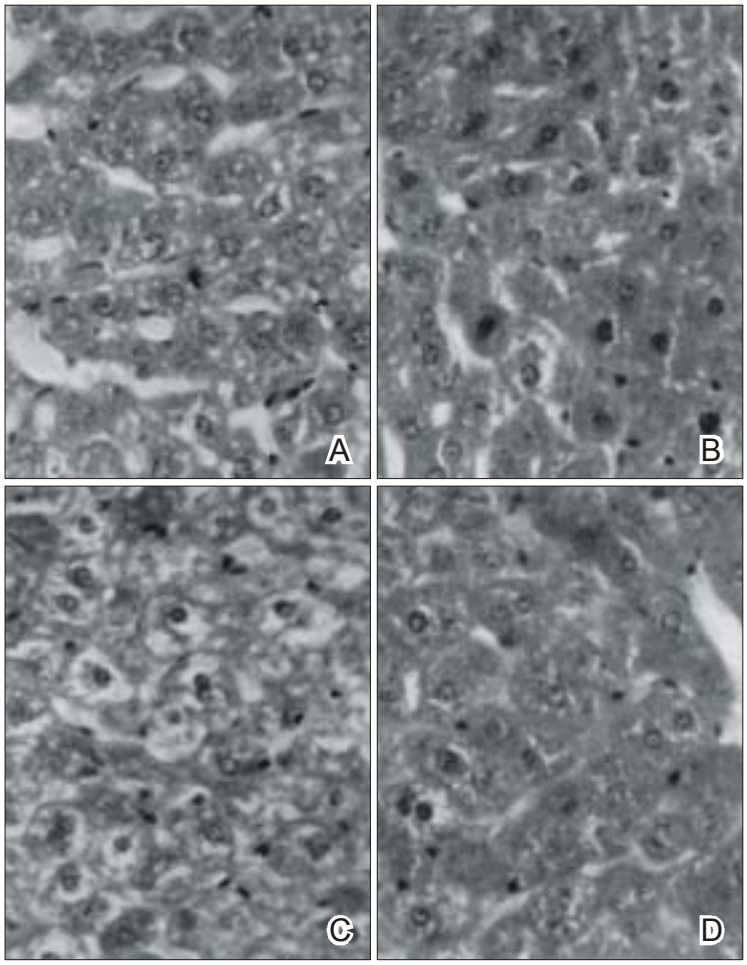

Fig. 3. Histological changes in the liver of mouse with H-E stain (×400). A: Control, B: PN 10% diet group, C: S-180+Control, D: S-180+PN 10% diet group.

3) 솔잎식이 섭취시 간의 조직학적 변화와 glycogen 분포

종양세포를 이식하고 솔잎섭취(10%)에 의한 간의 조직학적 변화를 관찰하기 위해서, 여러 농도의 솔잎식이와 종양세포를 이식한 솔잎식이를 섭취한 마우스의 간을 절취하여 hematoxylin-eosin염색과 periodic acid schiff (PAS) 반응 후 조직을 관찰하였다. 정상군의 간은 정연한 간소엽 형태를 갖추고 있으나, sarcoma-180 종양세포를 이식한 대조군에서 혼탁종창, 수포성변성, 지방변성 등의 변화가 현저히 증가했을 뿐 아니라 국소적 염증, 호산성세포와 핵이 농염되는 세포 등이 증가하였다. 그러나 솔잎을 섭취한 군에서는 이러한 변화들이 감소되었고, 식이에 첨가한 솔잎의 농도에 따른 형태적 차이와 변화는 크게 관찰되지 않았다(Fig. 3). 정상군에 비해 종양세포를 이식한 대조군에서 glycogen 분포가 감소하였으며, 종양 이식군(S-180+PN diet group)에 비해 종양 비이식군(PN diet group)에서 다소 증가하였다. 따라서 솔잎의 섭취에 대한 간 조직의 독성은 발견되지 않았고, sarcoma-180 종양세포를 투여한 대조군에 비해서 솔잎을 섭취하고 종양세포를 투여한 군들에서 정연한 간소엽형태를 갖추고 있으며, glycogen

분포 역시 증가하였다. 그러나 솔잎의 농도에 따른 군간의 차이는 발견되지 않았다. Glycogen분포는 정상인에 비해서 간질환이 있는 환자에게서는 떨어지는 경향을 보인다.[40] 따라서 종양세포를 이식하면 간에 손상을 주나, 솔잎을 첨가한 식이를 섭취하면 종양에 의해 손상된 간조직을 개선할 수 있는 것으로 생각된다.

결 론

솔잎의 섭취에 의한 *in vivo* 항암효과를 보기 위한 본 실험에서, 솔잎을 식이 중량의 10% 첨가하여 섭취시킨 군에서 고형암 성장 저지 효과가 가장 높게 나타났다. 또한 간에서 해독과정에 관여하는 효소인 GST활성은 솔잎을 10%와 20% 첨가하여 섭취시킨 군에서 높게 나타났으며, GSH의 함량은 솔잎을 10% 함유된 식이를 섭취한 군에서 가장 높은 것을 볼 수 있었다. 이를 볼 때 식이에서 솔잎의 섭취량의 10% 정도로는 친전자성 발암물질의 활성대사산물을 해독하는 GST활성을 증가시켜, *in vivo*에서 고형암의 무게가 감소되는 것으로 기대된다. 또한 솔잎 섭취에 의한 간과 신장의 독성을 알아보기 위하여 혈청에서의 aminotransferase활성과 BUN, CRE 농도를 측정해 본 결과, 솔잎을 20% 첨가시켜 섭취시킨 군에서 그 활성 및 농도가 증가하는 것으로 볼 때, 솔잎의 20% 이상 섭취는 간과 신장의 기능에 다소의 무리를 줄 수 있는 것으로 사료되나 이에 대한 더 많은 연구가 필요하다. 또한, 솔잎 식이는 간조직에서도 S-180 세포 이식에 의한 간조직 손상 및 glycogen 분포의 감소를 회복시키는 효과를 보였다. 결국 적당량의 솔잎 섭취는 마우스에서 종양의 성장을 저해할 수 있는 것으로 보여지며, 그 섭취량을 고려해 볼 때, 솔잎을 식이 중량의 20%를 섭취하였을 때는 간이나 신장 조직에 손상을 주어서 독성물질에 대한 방어 역할을 충분히 못한 것으로 생각되어진다. 그러므로 mouse에서 항암효과를 높힐 수 있는 솔잎의 섭취농도는 식이 중량의 10% 정도까지가 적당한 것으로 보여진다.

감사의 글

이 연구는 (주)엄마사랑의 연구비지원에 의한 것으로 이에 감사를 드립니다.

참고 문헌

1) 농촌진흥청시험국. 약용식물도감. 농촌진흥청시험국, 1971; pp 7.
2) 농촌영양개선연수원. 식품성분표. 농촌진흥청, 1991; pp 194.
3) 장준근, 산야초 건강학. 넥서스, 1997; pp 320-324.
4) 김은성, 김미경. 감잎, 녹차 솔잎의 건분 및 에탄올추출물이 흰쥐의 지방대사와 항산화능에 미치는 영향. 한국영양학회지 1999; 32(4): 337-352.
5) 김종대, 윤태헌, 최 면, 임경자, 주진순, 이상영. 솔잎 첨가식이가 흰쥐의 혈청 지방질대사에 미치는 영향. 한국노화학회지 1991; 1(1): 47-50.
6) 강윤한, 박용곤, 하태열, 문광덕. 솔잎추출물이 고지방식이를 급여한 흰쥐의 혈청과 간장 지질조성에 미치는 영향. 한국영양식량학회지 1996; 25(3): 367-373.
7) 강윤한, 박용곤, 하태열, 문광덕. 솔잎추출물이 고지방식이를 급여한 흰쥐의 혈청, 간장의 효소 및 간조직구조에 미치는 영향. 한국식품과학회지 1996; 25(3): 367-373.
8) 이윤형, 최용순, 이상영. 닭에서 Pinus strobus 잎추출물의 혈청콜레스테롤저하 효과. 한국영양식량학회지 1996; 25(2): 188-192.
9) 이윤형, 신용목, 이재은, 최용순, 이상영. 식물 추출물로부터 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase의 활성저해제 탐색. 한국생물공학회지 1991; 6(1): 55-61.
10) 강윤한, 박용곤, 오상룡, 문광덕. 솔잎과 쑥 추출물의 기능성 검토. 한국식품과학회지 1995; 27(6): 978-984.
11) 최승은. 솔잎추출물이 마우스 비장세포 증식능과 복강대식세포의 cytokine분비능에 미치는 영향. 숙명여자대학교 석사학위논문 1999.
12) 황병호, 조재현, 함승시, 강하영. 소나무속 잎의 성분 분석. 한국식품영양과학회지 2000; 29(1): 6-9.
13) 최혜미, 21세기 영양학, 교문사, 1998; pp 74-80.
14) 임선영. Linoleic acid의 항돌연변이 및 항암효과. 부산대학교 석사학위논문. 1994.
15) American Institute of Nutrition. Report of the American institute of nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. *J Nutr* 1977; 107: 1340-1343.

16) 이영숙, 김동석, 류병호, 이성호. 파래와 곤피에서 추출한 당단백질의 sarcoma-180 cell에 대한 항암효과 및 면역활성. 한국영양식량학회지 1992; 21(5): 544-550.
17) Goldin A, Kline I, Sofina ZP, Syrikin AB. Experimental evaluation of antitumor drugs in the USA and USSR clinical correlation. NIH, 1980; pp 33.
18) Ryu BH, Kim DS, Cho KJ, Sin DB. Antitumor activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Korean J Food Sci Technol* 1989; 21(5): 595-601.
19) Ellamin GL. Tissue sulfhydryl group. *Arch Biochem Biophys* 1950; 82: 70-77.
20) Habig WH, Pabist MJ, Jakoby WB. Glutathione *S*-transferase. The first step in mercapturate acid formation. *J Biol Chem* 1974; 249: 7130-7139.
21) Lowry OH, Rosebrough NH, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
22) Reitman S, Frankel SA. Colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol* 1957; 28: 50-63.
23) Sax SM, Moore JF. Determination of glutamic oxalacetic transaminase activity by coupling of oxalacetate with diazonium salts. *Clin Chem* 1967; 13(3): 175-185.
24) Masaki F, Albert S. Adaptation of Babson's method for the determination of serum glutamic oxalacetic transaminase in the clinical laboratory. *Clin Chem* 1965; 11(1): 23-28.
25) Elliott WB, Harold R. The basis for elevation of serum glutamic pyruvic transaminase levels in serum stored on clots. *Clin Chem* 1965; 11(1): 29-36.
26) Jean LO, Catherine M, Marie C, Patrick L. Simple and sensitive determination of urea in serum and urine. *Clin Chem* 1992; 29: 619-623.
27) Blijenberg BG, Liesing EC, Zwang L. Creatinine and automatic analysers in relation to icteric specimens. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992; 90: 779-784.
28) Robert M, Jacobs JH, Lumsden JA, Taylor G, Evert G. Effects of interferents on the kinetic Jaffé reaction and an enzymatic colorimetric test for serum creatinine concentration determination in cats, cows, dogs and horses. *Can J Vet Res* 1991; 55: 150-154.
29) Wim AN, Marinka AB, Martijin HS, Wilbert HM. Enhancement of rat hepatic and gastointestinal glutathione and glutathione S-transferase by □-angelicalactone and flavone. *Carcinogenesis* 1995; 16(3): 607-612.
30) Burk RF, Trumble MJ, Lawerence RA. Rat hepatic cytosolic glutathione dependent enzyme protection against lipid peroxidation in the NADPH-microsomal lipid peroxidation system. *Biochem Biophys Acta* 1980; 618: 35-41.
31) Hayes AW. Principles and methods of toxicology. Raben Press, 1982; pp 407.
32) 이귀녕, 이종순. 임상병리파일. 의학문화사, 1990; pp 228.
33) Kew MC. Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage. *Lancet* 2000; 355 (9204): 591-592.
34) LaDue JS, Wroblewski F, Karmen A. Transaminase activity in human blood. *Science* 1954; 120: 474.
35) Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH. The laboratory rat. Academic Press, Inc., New York, 1984; Vol. II: pp 123.
36) Beeson PB, McDermott W, Wyngaarden JB. Text book of medicine. Saunders Co., Philadelphia, 1979; pp 77.
37) Klaassen CD, Doull J, Amdur MO. Toxicology. 2nd ed., Macmillan Publishing Co., Inc., New York, 1980: pp 415.
38) Goodman A, Goodman LS, Gilman A. The pharmacological basis of therapeutics. 6th ed., Macmillan Publishing Co., Inc. New York, 1975; pp 1615.
39) 최명달, 김동호, 김재흥, 김승호. 솔잎추출물의 랫트에 대한 단기 급성경구 독성시험. 한국식품과학회지 1999; 31(5): 1401-1404.
40) Stauber AJ, Bull RJ. Differences in phenotype and cell replicative behavior of hepatic tumors induced by dichloroacetate (DCA) and trichloroacetate (TCA). *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 17: 1364-1374.