

금은화(Lonicerae Flos)의 Ethyl Acetate 분획이 돌연변이원성에 미치는 영향

정규찬 · 권동렬 · 백석환 · 김성환 · 장현욱

영남대학교 약학대학

(Received October 4, 1988)

Effects of Lonicerae Flos' Ethyl Acetate Fraction on Mutagenicity

Kyu Charn Chung, Dong Yeul Kwon, Suk Hwan Baek,

Sung Hwan Kim and Hyeun Wook Chang

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 713-800, Korea

Abstract—Based on the following tests with fractions extracted from organic solvents such as benzene, chloroform, ethyl acetate and methanol, this study is to analyse the antimutagenicity of Lonicerae Flos. When carrying out Ames test with *Salmonella typhimurium* strain, it seemed that there was stronger antimutagenicity in TA 100 treated by MNNG than did one in TA 98 by NPD, and that there was stronger antimutagenicity through base pair exchange than one through frame shift. In the *umu* test, each fraction tended to inhibit the activity of β -galactosidase induced by AF-2. As shown in these above tests, the ethyl acetate fraction was the strongest among four fractions. On the other hand, its component consisted of luteolin, apigenin, chlorogenic acid and five unknown ingredients. Of these unknown ingredients, E, F strongly tended to inhibit the activity of β -galactosidase. In addition, there was also the decrease in its activity of apigenin, luteolin and chlorogenic acid.

금은화(Lonicerae Flos)는 인동과(Caprifoliace)에 속하는 인동덩굴(*Lonicerae flos* Thunb.)의 꽃으로¹⁾ 6, 7월에 백색의 꽃이 황색으로 된다고 하여 금은화라 불리어져 왔다. 또한 꽃은 겨울에도 지지않고 겨울을 난다고 하여 인동과에 속한다한다. 한방에서는 이뇨, 해독, 화농증 및 종양의 치료제로 사용되어 왔으며 정혈, 하독에 유효하다고 기록되어 있다.²⁾ 금은화의 약효와 성분과 관한 연구는 1979년 문³⁾ 등이 ginnol, sterols 및 glycoside를 보고한 것과 1981년 Yee⁴⁾ 등이 chlorogenic acid, flavonoid화합물 및 tannin을 보고했으며 이런 물질들은 gram양성 및 음성균에 항균작용이 있음을 보고하였다. 또한 1986년 Li⁵⁾ 등이 isochlorogenic acid를 보고하였다. 이상과 같이 현재까지 보고된 금은화의 약효와 성분과의 연구는 미흡하며, 금은화의 화농증 및 종양치료에 대한 연구는 전혀 찾아볼수 없다.

따라서 금은화의 화농증 및 종양에 대한 치료작용을 구명하고 그 성분과 약효와의 관계를 밝히 고자 본 연구를 행하여 몇가지 결과를 얻었기에 보고하고자 한다. 종양 및 생체의 암화를 초래하는 원인에는 여러가지가 있으나 화학발암물질에 노출되었을 때 쉽게 발현된다고 보고되었다. 그래서 이미 mutagen으로 잘 알려져 있는 AF-2,^{6,7)} MNNG⁸⁾ NPD⁹⁾을 미생물 균주에 작용시켜 돌연변이를 유발시키고 금은화의 추출물을 가했을때 상기의 mutagen의 mutagenicity를 감소, 억제시키는지를 살펴보았다. 또한 약효와 성분과의 관계를 밝히고자 금은화를 유기용매로 추출하여 네 분획을 얻었으며 네 분획의 활성을 비교 검토하여 가장 활성이 강한 ethyl acetate 분획을 preparative TLC하여 각각의 성분을 얻었다. 이상의 분획 및 성분을 Ames test와 *umu* test하여 항돌연변이원성을 살펴보았다.

실험 방법

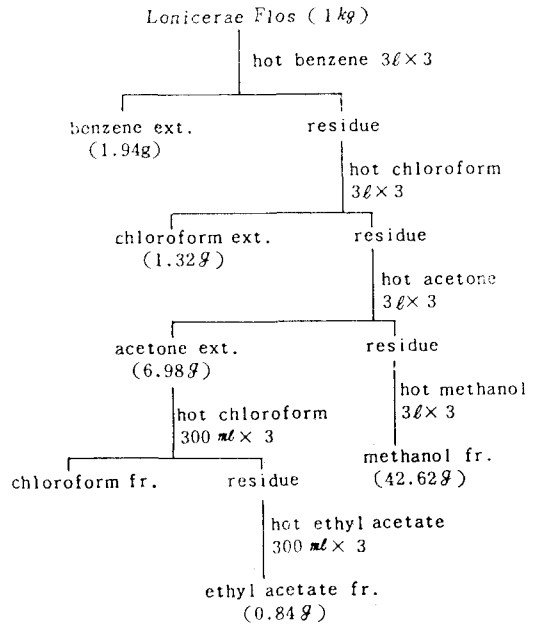
재료 및 시약—금은화는 시중에서 구입하여 음건 세절하여 사용하였다. NPD(4-nitro-o-phenylenediamine), MNNG(N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine), AF-2(2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acryl acid amide))는 wako사에서, glucose-6-phosphate, NADP (nicotine adenine dinucleotide phosphate)는 sigma사에서, ONPG(o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside)는 Fluka사에서, Beef extract, Yeast extract, Trypton배지는 Bacto사에서 구입했으며 기타 모든 시약은 특급 및 일급품을 사용하였다.

금은화 각 분획의 추출—실험에 사용한 각 분획은 T. Noro¹⁰⁾ 등의 추출법에 의한 것이며 scheme 1에 도시하였다.

금은화 ethyl acetate분획의 분리—Kieselgel 60F₂₅₄(Art. 5744)를 사용하고 전개용매를 CHCl₃ : CH₃OH : H₂O(6 : 4 : 1)로 하여 preparative TLC하여 8종의 성분을 분리하였다.

Ames test에 의한 항돌연변이원성 검토¹¹⁻¹⁴⁾ 실험에 사용한 균주는 *Salmonella typhimurium* TA series중 TA98과 TA100이며, NPD, MNNG 및 금은화 각 분획은 DMSO에 녹여 농도를 조절하였다. Ames 방법에 준하여 멸균된 cap tube 에 균주 및 mutagen을 처리한다. 이때 TA98에는 MNNG를, TA100에는 NPD를 가한다. test compound로 금은화 각 분획을 가하고, microsomal activation system을 사용할 경우에는 0.2 M-K.P. buffer (pH7.4) 대신 S-9 mix를 가한다. 37°C에서 20분간 반응시키고 soft agar 2ml 를 가하고 준비된 Vogel-Bonner citrate medium E. plate에 거품이 생기지 않게 고루 부어 퍼지게 한 다음 거꾸로 하여 37°C에서 48시간 배양시키고 histidine revertants를 count하였다.

S-9 mix제조¹⁵⁾—Phenobarbital (75mg/kg)을 4일동안 체중 200g 내외의 웅성 rat에 복강주사 하고 8시간 절식시킨 후 단두 도살하여 간장을 적출하였다. 3배의 0.15M-KCl을 가하고 homogenizer로 마쇄하여 9.000g에서 10분간 원심분



Scheme 1. Preparation of Lonicerae Flos fractions.

리하여 상중액을 취해 S-9으로 하였다. S-9은 미생물에 처리하기 직전에 NADP regeneration system을 포함한 S-9 mix로 만들어졌으며 그 혼합액의 조성은 Table 1과 같다.

umu-test에 의한 항돌연변이원성 검토^{16,17)}— 균주는 TA1535에 pSK1002를 도입시킨 것으로, TGA배지(trypton 10g, NaCl 5g, glucose 2g per 1l)를 사용했으며 Oda^{18,19)} 등의 방법에 준하였다. Contamination을 방지할 목적으로 ampicillin(20μg/ml)이 포함된 TGA배지에 균을 접종시키고 overnight 배양한다. 그 균주를 ampicillin이 없는 TGA배지에 50배 희석한후 37°C에서 OD₆₀₀이 0.25~0.30 될때까지 배양시킨다. 멸균된 cap tube에 균을 분주하고 AF-2 (0.04 μg)와 test compound로서 금은화의 각 분획을 농도를 달리하면서 가하고 microsomal activation system을 사용할때는 0.1M-K.P. buffer (pH7.0) 대신 S-9 mix를 가하고 37°C에서 2시간 배양시킨다. OD₆₀₀에서 cell density를 측정할 후 0.2ml의 균을 1.8ml Z buffer (Na₂H PO₄·2H₂O 16.1 g, NaH₂PO₄·H₂O 5.5g, KCl 0.75g, MgSO₄·7 H₂O 0.246g, β-mercaptoethanol 2.7ml per 1l)에 넣고 pasteur pipette를 한 방울의 toluene을

Table I-Composition of S-9 mix

Ingredient	Quantity per 50ml
Rat liver S-9(phenobarbital induced)	2.0ml(4%)
MgCl ₂ -KCl salts	1.0ml
1M glucose-6-phosphate	0.25ml
0.1M NADP	2.0ml
0.2M phosphate buffer (pH7.4)	25.0ml
Sterile distilled H ₂ O	19.75ml

가하고 vortexing하여 부분적으로 세포막을 파괴시킨다. 기질인 ONPG(o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside 4mg/ml in 0.1M K.P. buffer (pH7.0)) 0.2ml를 가하고 28°C에서 10~20분간 반응시킨다. 1M Na₂CO₃ 1ml를 가하여 반응을 종결시키고 OD₄₂₀, OD₅₅₀에서 각각의 흡광도를 측정한다. β-galactosidase 활성은 Miller²⁰⁾ 등의 방법에 따라 아래와 같이 계산하였다.

⊙ β-galactosidase unit 계산식

$$\text{unit} = \frac{\text{OD}_{420} - 1.75 \times \text{OD}_{550}}{t \times v \times \text{OD}_{600}}$$

t=reaction time (min)

v=cell volume (per ml)

실험 결과

금은화 ethylacetate 분획의 확인—Fig. 1에 도시되어있다. 8개의 spot가 나타났으며 Rf 0.13에서 chlorogenic acid, Rf 0.61에서 luteolin,

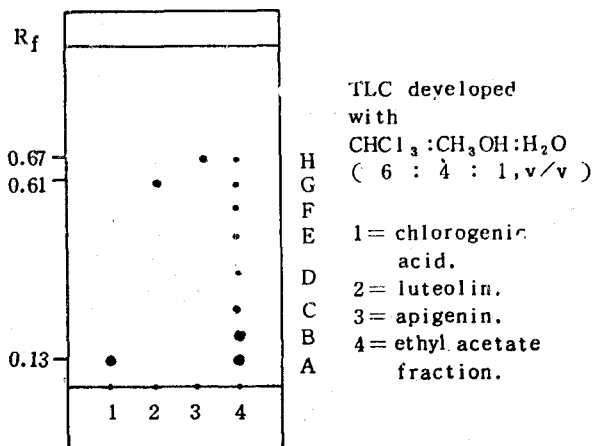


Fig. 1-TLC pattern of the ethyl acetate fraction of Lonicerae Flos

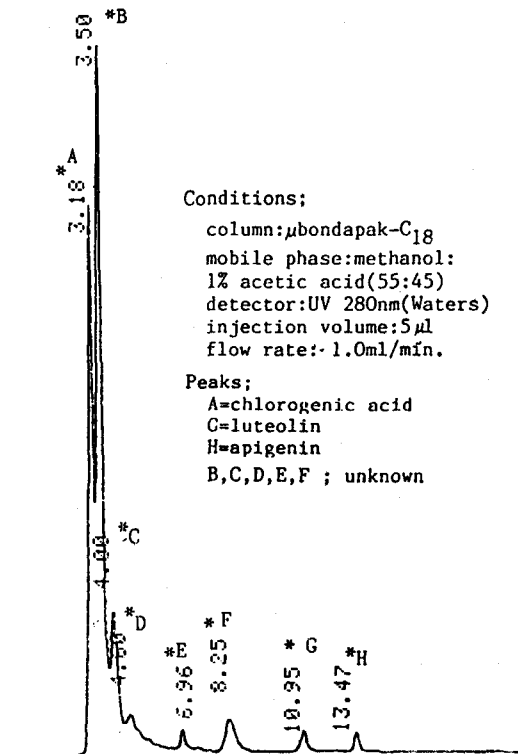


Fig. 2-HPLC profile of the ethyl acetate fr. of Lonicerae Flos.

Rf 0.67에서 apigenin의 표준물질과 spot 위치가 일치하였다. Fig. 2에 도시한 바와 같이 HPLC 조건은 아래와 같다. 3분 18초에 chlorogenic acid, 10분 95초에 luteolin, 13분 47초에 apigenin의 표준물질과 retention time이 일치하였다. 8개의 성분들 %로 나타내면 아래와 같다 A(chlorogenic acid)는 36.23%, B는 42.96%, C는 15.62%, D는 0.55%, E는 0.39%, F는 3.82%, G는 0.25%, H(apigenin)는 0.06%로 나타났으며 A, B, C성분이 전체의 94.81%를 차지하고 있으며 그 외 다른 성분들은 극히 미량으로 포함되어 있음을 알 수 있었다.

Ames test에 의한 항돌연변이원성 검토—금은화의 ethylacetate분획이 NPD로 유도한 TA98에 미치는 영향은 NPD (30μg/assay)를 가했을 때 2.100개의 revertant가 생성되었다. ethyl acetate분획의 농도를 10μl에서, 50μl그림 살펴 보았을 때 2.000개, 1.900개로 큰 감소를 확인할 수 없었고 10μg, 20μg에서도 유효한 억제치

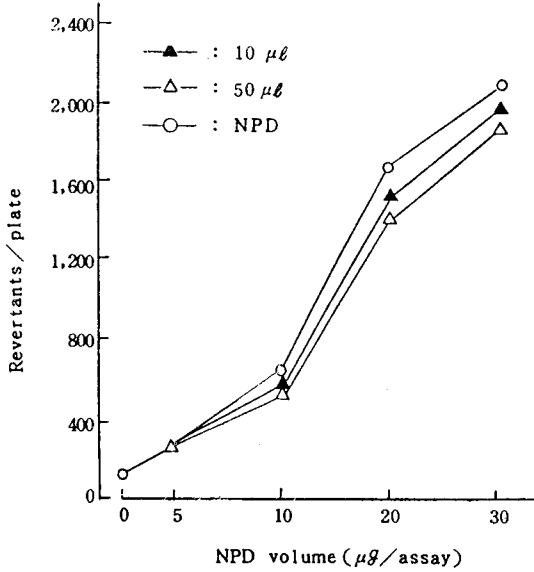


Fig. 3-Inhibition of NPD mutagenicity by ethyl acetate fraction. ▲, △: μl of ethyl acetate fr. (10mg/ml).

Table II-Antimutagenicity of ethyl acetate fraction on *Salmonella typhimurium* TA series.

Treatment	S9 ^{*b}	TA98 ^{*c}	Inhibition(%)
Control(DMSO)	-	35	-
NPD ^{*a}	-	1650	-
NPD+EtOAc	-	1580	4.24
NPD	+	1710	-
NPD+EtOAc	+	1550	9.36

Treatment	S9	TA 100 ^{*c}	Inhibition(%)
Control(DMSO)	-	57	-
MNNG ^{*d}	-	1810	-
MNNG+EtOAc	-	1270	29.83
MNNG	+	1850	-
MNNG+EtOAc	+	1260	31.89

*a=20μg/assay *b=In the presence (+) or absence (-) of the S-9mix *c=Histidine revertants per plate *d=2μg/assay.

를 볼 수 없었다. 그리고 MNNG로 유도한 TA 100에 ethyl acetate 분획이 미치는 영향을 살펴 보았는데 Fig. 4와 같다.

MNNG를 0.5μg 및 1μg가 했을때 현저하게 억제됨을 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 요약하면 Table 2와 같다.

즉 NPD로 유도한 TA98에서 ethyl acetate분획의 억제작용은 S-9 mix 첨가하지 않았을 때 4.24%, 첨가하였을 때 9.36%로 유효한 억제치를 관찰할 수 없는 반면에 MNNG로 유도한 TA 100에서 ethyl acetate 분획의 억제작용은 S-9 mix를 첨가하지 않았을 때 29.83%, 첨가하였을 때 31.89%로 억제시킴을 알수 있었다.

umu test에 의한 항돌연변이원성 검토-AF-2와 금은화의 각 분획을 가했을 때 β-galactosidase 활성은 농도에 따라 다소 차이는 있으나 ethyl acetate 분획에서 가장 강한 활성이 나타났으며 AF-2의 농도에 따라 ethyl acetate 분획의 억제작용은 Fig. 5에 나타내었다.

AF-2의 농도가 0.05μg일때 β-galactosidase의 활성은 510 unit였으며 ethyl acetate 농도를 10 μl, 50μl로 했을때 각각 310 unit, 270 unit로 현저하게 억제되었다. AF-2의 농도를 0.02μg 및 0.03μg일때도 현저한 억제치를 관찰할 수 있었다. S-9 mix를 가하고 위와 같은 조건에서 실험하였을 때 그 억제치는 S-9 mix를 첨가하지 않은 것과 거의 같음을 알 수 있었다. 또한 금은화의 ethyl acetate 분획의 각 성분들이 AF-2로 유도한 β-galactosidase 활성에 미치는 영향을 살펴보았다. AF-2(0.04μg)를 가했을 때 β-galactosidase의 활성은 387 unit이며, negative control인 DMSO는 150 unit로 Fig. 6에 나타내었다. A, B, C, D, E, F, G, H의 각 성분을 AF-2

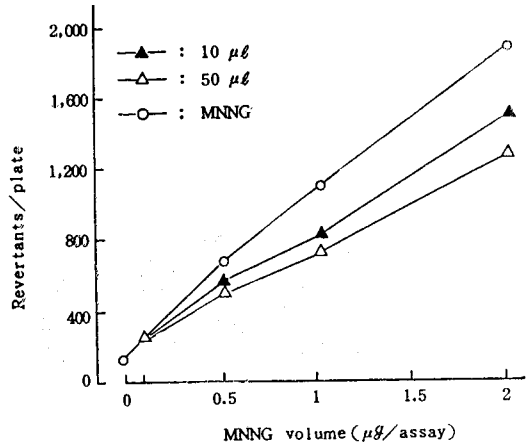


Fig. 4-Inhibition of MNNG mutagenicity by ethyl acetate fraction. ▲, △: μl of ethyl acetate fr. (10mg/ml).

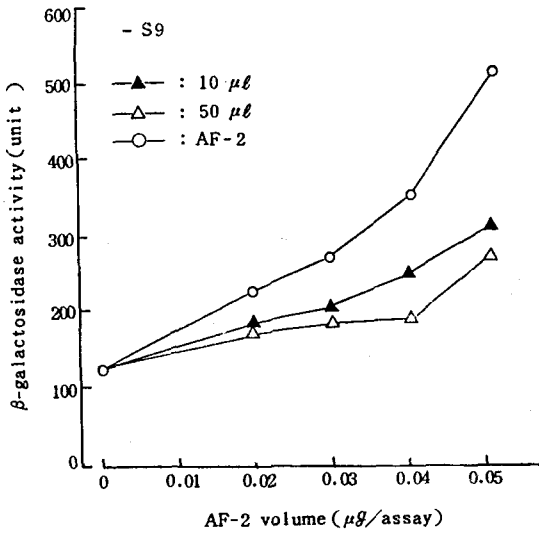


Fig. 5-Effect of the ethyl acetate fraction on SOS response induced by AF-2. \blacktriangle , \triangle : μl of ethyl acetate fr. (10mg/ml).

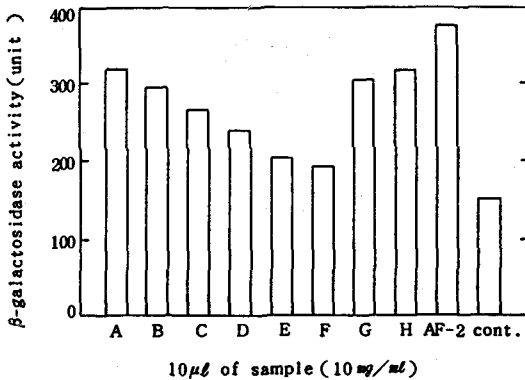


Fig. 6-Inhibition of AF-2 mutagenicity by components of ethyl acetate fraction. AF-2: 0.04 $\mu\text{g}/\text{assay}$. A=chlorogenic acid, G=luteolin, H=apigenin, B, C, D, E, F=unknown

와 같이 작용시켰을 때 β -galactosidase의 활성은 아래와 같다. A(chlorogenic acid)는 320 unit, B는 300 unit, C는 265 unit, D는 245 unit, E는 200 unit, F는 190 unit, G(luteolin)는 300 unit, H(apigenin)는 320 unit였다. Fig. 6에서 살펴본 바와 같이 기지의 성분인 A, G, H보다는 미지의 B, C, D, F성분이 높은 활성을 보였으며 그 중에서 특히 E, F성분이 강함을 알 수 있었다.

고 찰

본 실험 결과, 금은화의 ethyl acetate분획은

methanol, chloroform, benzene 분획에 비해 전반적으로 활성이 강하게 나타났다. 금은화의 ethyl acetate 분획은 MNNG로 유도한 TA100의 revertant를 강하게 억제시키는 반면, NPD로 유도한 TA98의 revertant를 억제시키는 작용은 거의 없었다. 따라서 frame shift mutation보다 base pair exchange에 의한 mutation 그 억제작용이 있음을 알 수 있었다. S-9 mix 실험에서는 첨가와 무관하게 활성이 일정하여 microsomal enzyme에 작용을 받지 않고 직접 작용함을 알 수 있었다. β -galactosidase 활성에서는 AF-2와 ethyl acetate 분획을 투여했을 때 AF-2만을 투여한 군에 비해 cell density가 훨씬 높음을 알 수 있었다. 따라서 ethyl acetate 분획이 세포분열 및 세포성장애 관여하여 그 작용을 촉진시키는 것으로 사료된다. 이상의 작용이 ethyl acetate 분획과 mutagen과 먼저 작용하여 mutagen의 활성을 억제시키는 것인지 혹은 mutagen에 의해 손상받은 ethyl acetate 분획이 작용하여 repair 시키는지에 대해서는 알수가 없었다. 또한 ethyl acetate 분획의 각 성분과 활성과의 관계를 연구하기 위해서는 먼저 미지성분의 구조가 결정되어야 하며 mutagen의 농도의존성 및 각 성분의 활성과 농도간의 관계가 폭넓게 연구되어야 할 것이다. mutagen으로 AF-2, MNNG, NPD뿐만 아니라 여러 종류의 mutagen을 사용하여 그 활성억제를 연구해야 할 것이다.

결 론

1. 금은화의 각 분획은 NPD로 유도한 TA98보다 MNNG로 유도한 TA100의 revertant 억제가 강하였다. 즉 base pair exchange에 의한 mutagenicity를 억제시키는 작용이 있었다.
2. 금은화 각 분획은 AF-2로 유도한 β -galactosidase 활성을 억제시켰다.
3. S-9 mix 첨가 실험의 결과로 microsomal activation system에 의해 대사받지 않고 직접 작용함을 알 수 있었다.
4. 금은화의 네가지 분획중에서 ethylacetate 분획이 가장 높은 활성을 보였으며, 그 성분은

로는 apigenin, luteolin, chlorogenic acid 및 5종의 미지성분임을 알았다.

5. 미지성분 중 E, F가 저농도(100 μ g/ml)에서도 항돌연변이원성이 기저물질보다 강함을 알 수 있었다.

문 헌

- 1) 鄭普燮, 金一赫, 金在佳, 原色天然藥物大事典 上卷 p.112. 南山堂(1984).
- 2) 陳在仁, 圖說漢方醫學大事典(中國藥學大典) 1, p.160 講談社(1982).
- 3) Sim Kyl Soon, Moon Chang Kyu, Ryu Chang Kyu, Cheon In Soo, Chung Jin Ho, Park Dae Sung. Ginnol, sterols and glycosides from *Lonicerae Flos*. Seoul Taehakkyo. *Yakhak Nonmun-jip*. 4, 79 (1979).
- 4) Wong-Leung, Yee Ling. Studies on the components of the flowers of *Lonicerae japonica* Thunb. and their antibacterial activities. *Hsiang-kang Ch'in Hui Hsueh Yuan Hsueh Pao*, 8, 115 (1981).
- 5) Li Buoting. Comparative analysis of the chlorogenic acid and isochlorogenic acid in flower and cane of *Lonicerae japonica* Thunb. *Zhongcaoyao*, 17, 10 (1986).
- 6) Kyu Charn Chung, Kyung Soo Nam, Uk Kyu Chang. Studies on the reaction between sodium nitrite and acetoaminophen and mutagenicity of the reaction product. 嶺南大學校 資源問題研究所 論文集 3, 133 (1984).
- 7) Hirota Obana and Sei-ichi Nakamura. Survey of anti-mutagens in food based on the inhibition of SOS response. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 28, 159 (1987).
- 8) Joyce McCann, Edmund Choi, Edith Yamasaki and Bruce N. Ames. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella* microsome test: Assay of 300 chemicals. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 72, 5135, December 1975.
- 9) Dorothy M. Maron and Bruce N. Ames. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*. 113, 173 (1983).
- 10) Tadataka Noro, Yasushi Oda, Toshio Miyase. Akira Ueno and Seigo Fukushima. Inhibitors of Xanthine oxidase from the flowers and bud of *Daphne genkwa*. *Chem. Pharm. Bull.* 31, 3984 (1983).
- 11) 田島彌太郎, 賀田恒夫, 匠藤宗平, 外村昌, 環境變異原實驗法, 231 講談社 (1980).
- 12) H. Grein, W. Göggelmann, K.H. Summer and T. Wolf. Mutagenicity testing with *Salmonella* microsome Test. *Arch. Toxicol.* 46, 31 (1980).
- 13) Gregory S. Probst, Robert E. McMahan, L.E. Hill, Christina, Z. Thompson, J.K. Epp and S.B. Neal. Chemically induced UDS in primary rat hepatocyte cultures: A comparison with bacterial mutagenicity using 218 compound. *Environmental Mutagenesis*. 3, 11 (1981).
- 14) Vogel-J.K. and Bonner, D.M., Acetyl ornithinase of E. Coli: Partial purification and some properties. *J. Biol. Chem.* 218, 97 (1956).
- 15) Bruce N. Ames, William E. Durston, Edith Yamasaki and Frank D. Lee. Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacterial detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 70(8), 2281. August 1973.
- 16) Philippe Quillardet and Maurice Hofnung. The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins procedures. *Mutation Research*. 147, 65 (1985).
- 17) Philippe Quillardet, Christine de Bellecombe and Maurice Hofnung. The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: Validation study with 83 compounds. *Mutation Research*. 147, 79 (1985).
- 18) Graham C. Walker. Inducible DNA repair system. *Ann. Rev. Biochem.* 54, 425 (1985).
- 19) Yoshimitsu Oda, Sei-ichi Nakamura, Iwas Roki, Takesi Kato and Hideo Shinagawa. Evaluation of the new system (*umu*-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutation Research*. 147, 219 (1985).
- 20) Miller J.H. Experiments in molecular genetics. 351-355. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York (1972).