

## 토복령(*Smilax china*)의 Steroid Saponin 이 돌연변이원성에 미치는 영향

김성환·손건호·정규찬

영남대학교 약학대학

(Received August 6, 1989)

### Mutagenic Effect of Steroidal Saponins from *Smilax china* Rhizomes

Sung Whan Kim, Kun Ho Son and Kyu Charn Chung  
College of Pharmacy, Yeungnam University, Kyongsan 713-749, Korea

**Abstract**—Potential mutagenic and antimutagenic activities of four steroidal saponins from *Smilax china* rhizomes were investigated. These saponins did not revealed mutagenicity in the Ames and SOS *umu* test. For antimutagenic activity by SOS *umu* test, two spirostanol glycosides, dioscin and gracillin, inhibited the activity of  $\beta$ -galactosidase induced by AF-2, but their proto-type furostanol glycosides did not show this activity.

**Keywords** □ *Smilax china* Rhizome, steroidal saponin, mutagenicity

전보<sup>1)</sup>에서 저자 등은 토복령으로부터 sterol glucoside 및 5종의 steroid saponin 을 단리하여 그 구조를 밝힌바 있다. 앞에서 분리된 saponin 중 spirostanol 배당체인 dioscin 과 gracillin, furostanol 배당체인 protodioscin 과 methylprotodioscin 의 혼합물(이하 M. P. M) 및 methylprotogracillin 의 돌연변이원성 및 항돌연변이원성의 효과를 검토하였다.

토복령의 약리작용에 관한 연구로는 1973년에 Furusawa 등<sup>2)</sup>이 항염증작용이 있음을 보고하였으며 1980년에 Perry<sup>3)</sup>는 통풍, 경부임파선결핵, 매종 및 월경통에 유효하다고 보고하였으나 현재까지 이 식물의 steroid saponin 의 돌연변이원성에 대한 연구는 전혀 찾아볼 수 없었다.

생체에 암화나 종양을 일으키는 원인은 여러가지가 있으나 돌연변이원성물질이나 발암성물질에 노출되었을 때 쉽게 발현된다고 하며<sup>4)</sup> 돌연변이원성이나 발암을 일으키는 화학물질은 다수 알려져 있으나 천연물 중에서 돌연변이원성이나 발암성을 억제하는

성분도 많이 발견되고 있다.<sup>5)</sup>

이에 미생물 system 을 이용하여 토복령 중의 steroid saponin 의 돌연변이원성을 검토하고 이미 mutagen 으로 알려져 있는 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acryl acid amide(이하 AF-2)<sup>6)</sup>를 균주에 작용시켜 돌연변이를 유발시키고 시료를 가했을 때 돌연변이원성을 억제시키는가를 살펴보기 위하여 본 실험을 시행하여 몇 가지 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

#### 실험방법

**재료 및 시약**—전라북도에서 자생하는 토복령을 1986년에 구입하여 음건, 세절하여 사용하였다. 4-nitro-O-phenylenediamine(이하 NPD), sodium azide, AF-2는 Wako 사로부터 NADP, O-nitro phenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (이하 ONPG)는 Sigma 사로부터 agar, tryptone 은 Difco 사로부터 구입한 제품을 사용하였고 기타 모든 시약은 특

급내지 일급품을 사용하였다.

**Ames test에 의한 돌연변이원성시험**—실험에 사용한 균주는 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100이며 negative control로서는 DMSO, positive control로서는 TA98에는 NPD, TA100에는 sodium azide를 사용하였다. Ames 방법<sup>7-9)</sup>에 준하여 미리 멸균된 cap tube에 준비된 top agar를 2ml씩 나누어 담는다. 여기에 농도를 달리한 시료 0.1ml씩 가하여 혼화한 다음 12-16시간 배양한 균현탁액을 0.1ml씩 가했으며 microsomal activation system을 사용하는 경우에는 S-9 mix를 가하여 미리 준비된 Vogel-Bonner citrate medium E. plate 위에 부어 37°C에서 48시간 배양하고 histidine revertants colony 수를 측정하였다.

**S-9 mix 제조**<sup>10)</sup>—phenobarbital을 체중 200g 내외의 웅성 rat에 Kg당 75mg씩 4일동안 복강내로 주사한 다음 16시간 절식시킨 후 생리식염수로 관류시킨 간장을 적출하였다. 적출한 간장을 생리식염수로 씻은 다음 3배량의 0.15 M KCl을 가해 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 homogenate를 9,000g에서 10분간 원심분리하여 그 supernatant를 취해 S-9으로 하였다. S-9은 Ames test를 하기 직전에 NADPH regeneration system을 포함한 S-9 mix로 만들었으며, 이상의 모든 조작은 0-4°C에서 행하였다.

**SOS umu test에 의한 돌연변이원성 및 항돌연변이원성시험**—실험에 사용한 균주는 *Salmonella typhimurium* TA1535에 plasmid pSK 1002를 도입시킨 것이며 Oda 등<sup>11-13)</sup>의 방법에 준하여 행하였다. ampicillin(20 µg/ml)이 함유된 TGA (tryptone 10g, NaCl 5g, glucose 2g/1l H<sub>2</sub>O) 배지에 균주를 접종시키고 12-16시간 배양한 다음 그 균액을 TGA 배지에 50배 희석한 후 37°C에서 OD<sub>600nm</sub>가 0.25-0.30이 될 때까지 배양시킨다. test tube에 배양균액 2.4ml씩 분주한 다음 negative control로서는 DMSO, positive control로서는 AF-2를 가하고 각 시료의 농도를 변화시켜 돌연변이원성을 검토하였다.

항돌연변이원성을 관찰하는 경우에는 분주된 균액에 AF-2와 농도를 달리한 각 시료를 혼화하여 실험

을 행하였다. microsomal activation system을 사용하는 경우에는 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4) 대신 S-9 mix를 가하고 37°C에서 2시간 배양시킨 다음 OD<sub>600nm</sub>에서 cell density를 측정 한 후 반응균액 0.2ml에 B-buffer(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 16.1g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 5.5g, KCl 0.75g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.246g, SDS 1.0g, β-mercaptoethanol 2.7 ml/1l H<sub>2</sub>O) 1.8ml를 넣고 혼화한 후 기질인 ONPG 용액 0.2ml를 가하고 28°C에서 10-20분간 반응시킨 다음 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.0ml를 가해 pH를 높여서 반응을 종결시키고 OD<sub>420nm</sub>와 OD<sub>550nm</sub>에서 각각의 흡광도를 측정한다. β-galactosidase 활성은 Miller 등<sup>14)</sup>의 방법에 준해서 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{Unit} = \frac{1000(\text{OD}_{420\text{nm}} - 1.75 \times \text{OD}_{550\text{nm}})}{(t \times v \times \text{OD}_{600\text{nm}})}$$

t : reaction time(min)

v : cell volume(ml)

OD<sub>600nm</sub> : cell population density

### 실험결과

**Ames test에 의한 돌연변이원성 검토**—토복령에서 분리된 steroid saponin의 돌연변이원성을 관찰한 성적이 Table I이다. negative control에 비해서 revertants colony의 수가 2배 이상일 때 돌연변이원성이 있는 것으로 판정하였다. TA98에서는 negative control의 colony수가 11개인데 비하여 positive control의 colony수는 681개로 돌연변이원성을 나타내었으며 각 시료의 농도가 500 µg일 때 dioscin은 9개, gracillin은 10개, M. P. M은 13개, methylprotogracillin은 13개로서 돌연변이원성을 나타내지 않았다. S-9 mix를 첨가하였을 때에도 S-9 mix를 첨가하지 않은 경우와 유사한 경향을 나타내었다.

Table II는 *Salmonella typhimurium* TA100을 사용하여 돌연변이원성을 관찰한 성적이다. negative control에서는 colony의 수가 102개인데 비하여 positive control은 887개로 현저하게 증가하였으나 각 시료의 농도가 500 µg일 때 dioscin은 134개, gracillin은 169개, M. P. M은

**Table I.**—Mutagenicity of steroidal saponins on *Salmonella typhimurium* TA 98

	Concentration ( $\mu\text{g}/0.1 \text{ ml}$ )	Histidine revertants per plate	
		-S-9	+S-9
Positive control (NPD)	10	681	704
Negative control (DMSO)		11	65
Dioscin	250	12	69
	500	9	62
Gracillin	250	7	57
	500	10	63
M.P.M	250	8	59
	500	13	58
Methylproto-gracillin	250	14	68
	500	13	64

Two-fold increase in activity above the negative control levels was defined to be positive. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are means for 3 separate experiments.

**Table II.**—Mutagenicity of steroidal saponins on *Salmonella typhimurium* TA 100

	Concentration ( $\mu\text{g}/0.1 \text{ ml}$ )	Histidine revertants per plate	
		-S-9	+S-9
Positive control ( $\text{NaN}_3$ )	1.0	887	1594
Negative control ( $\text{H}_2\text{O}$ )		102	157
Dioscin	250	129	149
	500	134	157
Gracillin	250	181	168
	500	169	144
M.P.M	250	150	164
	500	162	171
Methylproto-gracillin	250	169	165
	500	160	130

Two-fold increase in histidine revertants above the negative control levels was defined to be positive. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are means for 4 separate experiments.

162개, methylprotogracillin은 160개로서 돌연변이원성을 나타내지 않았다. S-9 mix를 첨가하였을

**Table III.**—Assay of potential mutagenicity of steroidal saponins

	Concentration ( $\mu\text{g}/0.1 \text{ ml}$ )	$\beta$ -galactosidase activity (unit)	
		-S-9	+S-9
Positive control (AF-2)	0.08	472	388
Negative control (DMSO)		180	152
Dioscin	250	189	158
	500	193	157
Gracillin	250	181	157
	500	179	164
M.P.M	250	202	157
	500	205	164
Methylproto-gracillin	250	214	165
	500	213	170

Two-fold increase in  $\beta$ -galactosidase activity above the control levels was defined to be positive. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are means for 3 separate experiments.

때에도 첨가하지 않은 경우와 유사한 양상을 나타내었다.

**SOS umu test에 의한 돌연변이원성 검토—***Salmonella typhimurium* 1535/pSK 1002를 사용하여 steroid saponin의 돌연변이원성을 관찰한 성적이 Table III이다. 대조군에 비해서  $\beta$ -galactosidase 활성이 2배 이상 증가할 때 돌연변이원성이 있는 것으로 판정하였다. 대조군의  $\beta$ -galactosidase 활성이 180 unit인데 비하여 AF-2로 유도한 효소활성은 472 unit로 돌연변이원성을 관찰할 수 있었으며 steroid saponin의 경우에는 각 시료의 농도가 500  $\mu\text{g}$ 에서 dioscin은 193 unit, gracillin은 179 unit, M. P. M은 205 unit, methylprotogracillin은 213 unit로 돌연변이원성을 나타내지 않았다. S-9 mix를 첨가하였을 때에도 S-9 mix를 첨가하지 않은 경우와 유사한 경향을 나타내었다.

**SOS umu test에 의한 항돌연변이원성 검토—**Fig. 1에서는 돌연변이원성의 억제효과를 나타내었다. 대조군의  $\beta$ -galactosidase 활성은 AF-2만을 가했을 때 481 unit이었으며 AF-2에 steroid saponin의 농도를 달리하면서 첨가하였을 때

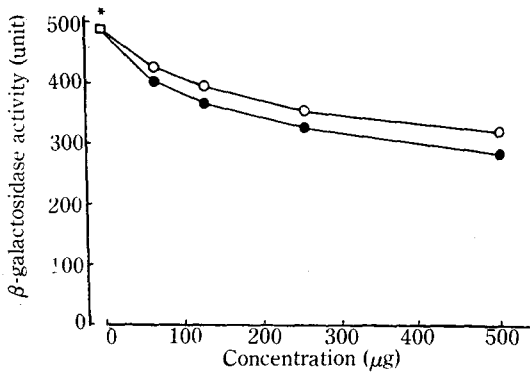


Fig. 1.—Antimutagenicity by using SOS umu test for spirostanol saponins against AF-2 in the absence of S-9 mix.

\*; AF-2; 0.08 μg/assay, β-galactosidase activity was 481 unit, control level was 185 unit. The assay procedure was described in the experimental methods. Data points represent means for 5 experiments.

dioscin, ○: gracillin, ●.

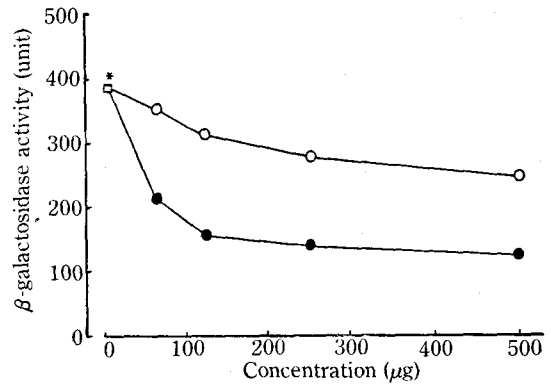


Fig. 2.—Antimutagenicity by using SOS umu test for spirostanol saponins against AF-2 in the presence of S-9 mix.

\*; AF-2; 0.08 μg/assay, β-galactosidase activity was 380 unit, control level was 157 unit. The assay procedure was described in the experimental methods. Data points represent means for 5 experiments.

dioscin, ○: gracillin, ●.

Table IV.—Inhibition of mutagenicity by furostanol saponins

	Concentration (μg/0.1 ml)	β-galactosidase activity (unit)	
		-S-9	+S-9
AF-2	0.08	481	380
DMSO		185	157
M.P.M	250	443	373
	500	436	357
Methylproto- gracillin	250	434	378
	500	426	351

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are means for 5 separate experiments.

dioscin의 농도가 62.5 μg에서 423 unit, 125 μg에서 396 unit, 250 μg에서 348 unit, 500 μg일 때는 316 unit로 첨가농도에 비례하여 억제작용을 나타내었다. gracillin의 경우에도 dioscin과 유사한 억제작용을 관찰할 수 있었다.

furostanol saponin인 M.P.M과 methylprotogracillin은 농도를 500 μg까지 첨가하여도 억제작용을 거의 나타내지 않음을 알 수 있었다 (Table IV).

S-9 mix를 첨가하였을 때, spirostanol sapo-

nin의 항돌연변이원성을 관찰한 실험성적이 Fig. 2이다.

대조군의 효소활성은 DMSO에서는 157 unit, mutagen만을 처리한 경우에는 380 unit로 현저한 증가를 나타내었으며 AF-2에 dioscin의 농도를 달리하여 가했을 때 62.5 μg에 357 unit, 125 μg에서 305 unit, 250 μg에서 273 unit, 500 μg에서는 242 unit로 첨가농도에 비례하여 억제작용을 나타내었으며 gracillin은 62.5 μg에서 218 unit, 125 μg에서 157 unit, 250 μg에서 138 unit, 500 μg에서는 134 unit로서 현저한 억제작용을 나타냄을 관찰할 수 있었다. gracillin은 S-9 mix를 첨가하지 않았을 때보다 첨가하였을 때 현저한 억제작용을 나타냄을 알 수 있었다.

## 고 찰

토복령의 steroid saponin의 돌연변이원성을 관찰하였을 때 활성이 나타나지 않음을 알 수 있었다.

SOS umu test을 이용한 항돌연변이원성시험의 경우 spirostanol glycoside인 dioscin, gracillin은 억제작용을 나타내었으므로 microsomal enzyme에 작용을 받지 않고 직접 작용함을 알 수

있었다. gracillin은 S-9 mix를 첨가했을 때, 가하지 않았을 때보다 현저한 억제작용을 나타내는 것으로 보아 체내에서 대사를 받아 강한 활성을 나타내는 화합물로 사료된다.

또한 AF-2에 spirostanol glycoside를 첨가한 군이 AF-2만을 가한 군이나 furostanol glycoside를 첨가한 군에 비해 cell density가 높음을 알 수 있었다. 따라서 spirostanol glycoside가 세포분열 및 성장에 관계하여 그 작용을 촉진시키는 것으로 사료되며, 이러한 작용은 spirostanol glycoside가 mutagen에 작용하여 mutagen의 활성을 억제시키는 것인지 아니면 mutagen에 의해 손상을 받은 균을 spirostanol glycoside가 repair시키는 것인지에 대해서는 분명하지 않았다.

### 결 론

1. 토복령에서 분리된 steroid saponin은 Ames test와 SOS umu test에서 돌연변이원성을 나타내지 않았다.
2. dioscin은 S-9 mix 유무와 관계없이 돌연변이원성의 억제작용을 나타내었다.
3. gracillin은 S-9 mix를 첨가하지 않았을 때보다 가했을 때 돌연변이원성의 억제작용을 현저하게 나타내었다.
4. furostanol glycoside는 돌연변이원성의 억제작용을 거의 나타내지 않았다.

### 문 헌

- 1) Sung Whan Kim, Kyu Charn Chung, Kun Ho Son, and Sam Sik Kang: Steroidal saponins from the rhizomes of *Smilax china*. *Kor. J. Pharmacogn.* **20**, 76 (1989).
- 2) Furusawa, Y., Kurosawa, Y. and Chuman, I.: Studies on trypsin inhibitor in oriental drug plants and its anti-inflammatory effect. *Japan. J. Agr. Chem. Soc.* **47**, 359 (1973).

- 3) Perry, L.M.: Medicinal plants of east and southeast asia. The MIT press, Cambridge, p.240 (1980).
- 4) Heidelberger, C.: Chemical carcinogenesis. *Ann. Rev. Biochem.* **44**, 79 (1975).
- 5) Ramel, C., Alekperov, U.K., Ames, B.N., Kata, T., and Wattenberg, L.W.: Inhibitor of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis reported by ICPEC expert group on antimutagens and desmutagens. *Mutat. Res.* **168**, 47 (1968).
- 6) McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E. and Ames, B.N.: Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella* microsome test. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72**, 5135 (1975).
- 7) Grein, H., Goggelmann, W., Summer, K.H. and Wolff, T.: Mutagenicity testing with *Salmonella* microsome test. *Arch. Toxicol.* **46**, 31 (1980).
- 8) Vogel, J.K. and Bdnner, D.M.: Acetyl ornithinase of *E. coli* Partial purification and some properties. *J. Biol. Chem.* **218**, 97 (1956).
- 9) Maron, D.M. and Ames, B.N.: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* **113**, 173 (1983).
- 10) Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E. and Lee, F.D.: Carcinogens are mutagens. A simple test system combining liver homogenates for activation and bacterial detection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **70**, 2281 (1973).
- 11) Oda, Y., Nakamura, S., Oki, I., Kato, T. and Shingawa, H.: Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutat. Res.* **147**, 219 (1985).
- 12) Quillardet, P. and Hofnung, M.: The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins procedures. *Mutat. Res.* **147**, 65 (1985).
- 13) Obana, H. and Nakamura, S.: Survey of antimutagens in food based on the inhibition of SOS response. *Japan. J. Food Hygienic Society.* **28**, 159 (1987).
- 14) Miller, J.H.: Experiments in molecular genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring harbor press, N. Y. p. 351 (1972).