

마늘의 돌연변이유발 억제 및 HT-29 결장암 세포의 성장저해 효과

박건영 · 김소희* · 서명자 · 정해영**

부산대학교 식품영양학과, *동주여자전문대학 식품영양과, **부산대학교 약학과

Inhibitory Effects of Garlic on the Mutagenicity in *Salmonella* Assay System and on the Growth of HT-29 Human Colon Carcinoma Cells

Kun-Young Park, So-Hee Kim*, Myung-Ja Suh and Hae-Young Chung**

Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University

*Department of Food and Nutrition, Dong Ju Women's Junior College

**Department of Pharmacy, Pusan National University

Abstract

The inhibitory effects of garlic on the mutagenicity in *Salmonella* assay system and on the growth of HT-29 human colon carcinoma cells were studied. Methanol extract of garlic inhibited the mutagenicities induced by aflatoxin B₁(AFB₁) and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG) in *Salmonella typhimurium* TA100. The inhibition rate increased significantly when the concentration of the methanol extract from garlic increased in both strains of *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100. The chloroform fraction from the methanol extract exhibited strong antimutagenicity against AFB₁. The chloroform fraction also inhibited greatly the growth of human HT-29 colon carcinoma cells in fetal bovine serum concentrations of 1% and 5%.

Key words: garlic, aflatoxin B₁, MNNG, antimutagenicity, HT-29 colon carcinoma cells

서 론

마늘은 백합과에 속하는 다년생 채소로서 오랫동안 우리 식생활에서 중요한 향신료로써 상식되어 왔다. 인디안의 고문헌에서도 밝혀있는 바와 같이 마늘은 피부염, 류마티스, 기침, 복통, 식욕부진 등의 많은 병에 대해 보호효과가 있음이 알려져 있다⁽¹⁾.

지금까지 마늘에 대하여 그 중요 약리작용과 생체에 대한 여러 보호작용이 있으리라는 기대와 함께 많은 연구가 진행되어 왔다. 특히 마늘 중에 0.3~0.4% 존재하는 알리신은 그람양성균과 그람음성균 모두에 대하여 포자의 발아와 균사의 성장을 막는 항균작용^(2,3)을 가지며 또한 대사질환에 대한 약리작용⁽⁴⁾과 함께 항암성이 주목되어 연구되어 왔다. 이미 mouse와 rat를 이용한 실험에서 알리신은 복수암 및 림프육종에 효과가 있다는 보고⁽⁵⁻⁷⁾가 있었다.

한편, 황 등⁽⁸⁾과 손과 황⁽⁹⁾은 여러 암세포 배양과 sarcoma-180을 이용한 실험에서 마늘의 석유 에테르 추출물 및 알콜 추출물이 항암효과가 있다고 밝힌 바 있지만 마늘의 항돌연변이성에 대한 연구는 그렇게 많지 않다. 또한 마늘의 항암효과에 관하여는 민간에서 많이 언급

되고 있는데 비하여 과학적인 실험에 의한 확인이 부족하며, 마늘에 존재할 것으로 예상되는 여러 성분 중 주로 알리신에 대한 보고들이 많고 마늘내의 다른 항암성분에 대해서는 거의 알려져 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 마늘의 항돌연변이성 효과를 먼저 검토하였고 그 성분이 암세포 성장에서도 같은 저해효과를 나타내는지를 연구하였다.

재료 및 방법

마늘 시료 및 추출

실험에 사용된 마늘(경북 의성마늘, 재래종)은 부산 온천시장에서 구입, 정선하여 시료로 사용하였다. 활성 물질을 분리하기 위해 Takahashi 등⁽¹⁰⁾의 방법에 따라 추출하였다. 즉, 시료들을 소량의 메탄올과 함께 혼합마쇄하여 메탄올을 10배 (w/v)로 되게 첨가하고 7시간씩 3번 추출하였는데 각각의 추출 후 9000×g에서 10분간 원심분리하고 추출액을 모았다. 잔사는 다시 메탄올-클로르포름(1:1, v/v)으로 더 추출하여 같은 방법으로 추출액을 모은 후 각각을 진공하에서 농축건조시킨 후 적당한 농도로 조정하여 실험에 사용하였다.

마늘의 항돌연변이 성분의 추출과 분리

마늘 중량의 10배의 메탄올로 12시간 교반을 2번 반복하여 얻은 메탄올 추출물을 감압농축한 후 다시 메탄올

Corresponding author: Kun-Young Park, Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

건조추출물을 증류수에 현탁시키고 동량의 클로르포름을 가하여 분획여두에서 분배하였다. 클로르포름분획 및 남은 물층은 추출을 각각 3회 반복한 후 감압 농축하였다.

Mutagens/Carcinogens

아플라톡신 B₁(AFB₁; Sigma Chemical Co.)과 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG; Aldrich Chemical Co.)는 각각 dimethylsulfoxide(DMSO)와 증류수에 녹여 실험에 사용하였다.

Ames mutagenicity test

실험균주는 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100으로써 Ames박사(미국 캘리포니아 버클리대학 생화학과)로부터 제공받았다. 실험 전에 균들은 정기적으로 histidine requirement, deep rough character, UV sensitivity 및 R factor 존재 등의 유전형질을 확인한 후 시험균주로 사용하였다. 돌연변이 실험을 위한 S9 mixture, 배지 및 필요한 시약의 조제는 Maron과 Ames⁽¹¹⁾의 방법에 따라 행하였으며 Matsushima 등⁽¹²⁾의 방법에 따라 돌연변이 실험을 행하였다. 즉, 각 캡시험관을 얼음액조에 보관하면서 S9 mix 0.5 ml(또는 인산완충액 0.5 ml), 하룻밤 배양된 균주(1~2×10⁹ cells/ml) 0.1 ml와 시료들을 각각 0.1 ml씩을 시험관에 첨가한 후 가볍게 vortex하고 37°C에서 30분간 예비 배양하였다. 45°C에 보관중이던 top agar 2 ml씩을 각 시험관에 붓고 3초간 vortex한 후 minimal glucose agar plate에 도말한 다음 37°C에서 48시간 배양하고 복귀돌연변이(revertant) 숫자를 계수하였다.

암세포 배양

사람의 결장암 세포인 HT-29은 황우익 교수(고려대학교 의과대학)로부터 분양받아 실험에 사용하였다. 세포는 100 units/ml의 penicilline 및 streptomycin과 5%의 FBS(fetal bovine serum)가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, GIBCO Co.)을 사용하여 37°C CO₂ 배양기(5% CO₂)에서 배양하였다. 배양세포는 일주일에 2~3번 refeeding하고 7~8일만에 PBS(phosphate buffered saline)에 0.05% trypsin-0.02% EDTA를 녹인 용액으로 부착한 세포를 떼어내고 분할하여 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

암세포 증식 억제효과 측정

암세포를 24 well plate에 15000 cells/ml의 농도로 하룻밤 배양하였다. 세포가 plate에 부착되었을 때 배양액을 버리고 FBS(1% 또는 5%)와 마늘 추출물을 well당 20 µl씩을 첨가하였는데 시료는 DMSO나 증류수에 녹여 0.1% 농도로 배지에 첨가하였다⁽¹³⁾. 이 새배양액은 2일에 한번씩 refeeding하였고 6일 후에 증식된 세포수를 he-

mocytometer로 계수하였다.

통계분석

실험 data로부터 ANOVA를 구한 후 Duncan's multiple range test를 이용하여 통계 분석하였다⁽¹⁴⁾.

결과 및 고찰

마늘의 항암효과에 대해서는 많은 연구가 되어 있지만 항돌연변이 효과에 대해서는 별로 보고된 바 없다. 마늘 자체가 돌연변이유발성을 나타내는지 또는 균주들에 대해 독성을 나타내는지를 검토해 본 결과 사용된 실험계에서 돌연이유발성은 전혀 없었고 균주에 대해서도 독성을 나타내지 않았다.

관련 마늘의 메탄올 추출물은 Fig. 1에 나타나 있듯이 AFB₁과 MNNG의 돌연변이유발성을 저해하였다. 두 물질 모두에서 돌연변이유발의 저해효과를 나타낸 점이 중요하다 하겠다. 여기에 사용되었던 농도는 생시료의 2% 농도이었는데 이는 우리 국민이 상식하는 김치의 경우 마늘을 양념으로 2% 정도 넣기에 그 농도를 기준으로 하였다. 김⁽¹⁵⁾은 마늘을 2% 농도에서 첨가하였을 때 nitrosodimethylamine의 돌연변이 유발성이 60% 정도 저해되는 것을 보고한 바 있다. 마늘은 간의 microsomal 효소계의 활성화에 관여하여 간접 돌연변이물질을 최종 돌연변이물질로의 전환을 방지하였거나 간 내에서 glutathione S-transferase 및 SH함유 화합물들을 증가시키므로 최종 돌연변이물질을 비독성 화합물로 전환하는데 기여하였다고도 추측되었다⁽¹⁵⁾. Mortica 등⁽¹⁶⁾은 여러 채소와 과일즙의 Trp-p에 대한 항돌연변이 효과를 검토한 결과 마늘은 다른 몇몇 채소 및 과일류에 비해서는 효과가 적었지만 TA98 균주에서 다소 항돌연변이 효과가 있다고 하였다. 이런 결과로부터 마늘은 광범위한 돌연변이물질들에 대해 항돌연변이 효과가 있는 것으로 사료되었다.

마늘의 메탄올 분획의 농도를 증가시키면 저해효과가 증가되는가를 검토하기 위해 마늘을 메탄올로 추출하여 건조 시료당 농도를 증가시켜 항돌연변이성을 측정하였다. Fig. 2에 나타나 있듯이 5%에서 10%로 증가하였을 때 AFB₁의 돌연변이유발의 저해효과가 증가하는 것을 관찰할 수 있었고 이 결과는 TA98과 TA100 모두 비슷한 효과를 나타내었다.

활성성분이 어떤 물질인가를 찾기 위해 헥산, 클로르포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물층으로 분획하여 항돌연변이 효과를 검토해 본 결과(data는 수록하지 않았음), 헥산, 클로르포름 및 에틸아세테이트 분획에서 각각 비슷한 활성을 관찰할 수 있었다. 이로부터 그 물질(들)은 상당히 비극성을 띤 화합물이라 추측되었다. 다시 메탄올 추출물을 클로르포름과 물층으로 분획하여 그 활성을 검토한 결과(Table 1) 클로르포름 추출물이 메

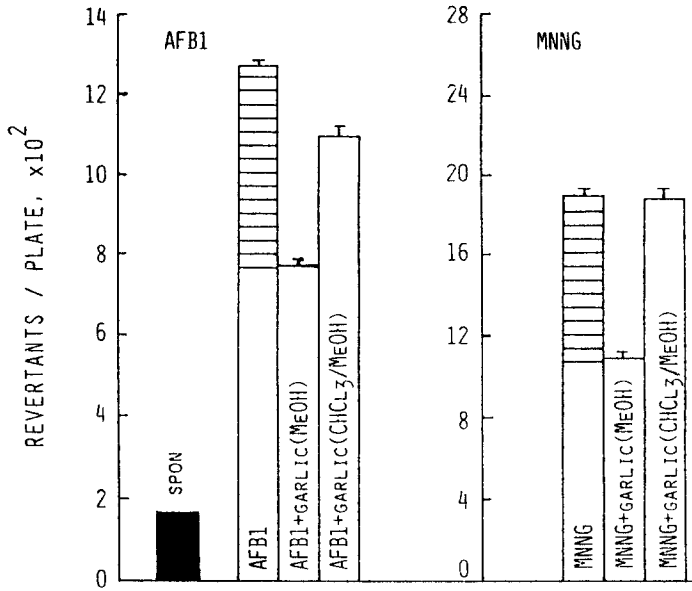


Fig. 1. Effect of the solvent extracted fractions (methanol and chloroform/methanol) from garlic on the mutagenicity of aflatoxin B₁ (AFB₁, 1 µg/plate) and MNNG(1 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

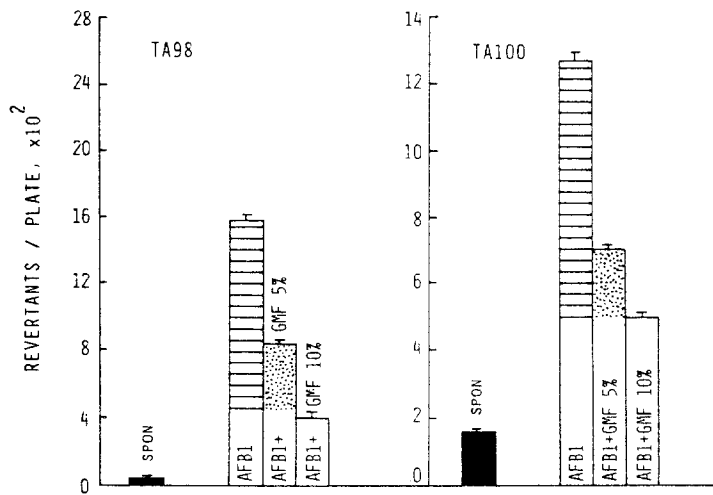


Fig. 2. Effect of methanol extract from garlic (GMF) on the mutagenicity of aflatoxin B₁ (AFB₁, 1 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* strains of TA98 and TA100

탄을 추출물보다 활성이 훨씬 강한테 반하여 물층은 전혀 항돌연변이성이 없었다. 클로르포름 분획의 경우 5%의 농도로 AFB₁에 대한 TA98이나 TA100의 복귀 돌연변이 수를 거의 자연 돌연변이 수준으로까지 억제시켰으나 물층 분획은 10%까지 농도를 높여도 억제효과는 없었다. 따라서 마늘의 항돌연변이 물질은 지용성 물질일 것이라고 사료된다.

황 등⁽⁸⁾과 손과 황⁽⁹⁾은 마늘의 알콜 추출물과 석유에 테르 추출물은 여러 암세포의 성장을 저해하며 항암효과가 있다고 하였다. 본 연구에서 강한 항돌연변이적 효과를 나타내었던 마늘의 클로르포름 분획도 이들이 발표한 물질들과 동일하게 항암적인 효과를 나타내는지를 검토하기 위해 암세포 성장저해 실험을 하였다.

마늘의 메탄올 분획, 클로르포름 분획 및 물층을 사람의 결장암 세포에 첨가하여 6일 동안 배양시킨 후 암세포 성장저해 효과를 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. FBS 농도에 따라 암세포 성장저해 효과가 다르기 때문에⁽¹³⁾ 1%와 5% 농도에서 성장저해 효과를 비교해 보았다. Ames mutagenicity test 때의 항돌연변이 효과와 비슷한 저해효과를 관찰할 수 있었는데 물 분획은 전혀 암세포 성장저해를 못하였고 메탄올 분획도 5% FBS에서는 물층과 비슷하게 저해효과가 없었지만 클로르포름 분획은 암세포 성장저해 효과를 크게 나타내었다(p < 0.05). 결국 마늘의 클로르포름 분획은 항돌연변이 효과 뿐 아니라 암세포 성장저해에도 비슷하게 관여하였다고 하겠다. GC-Mass data 등으로부터 이 물질(들)이 잠정

Table 1. Effect of chloroform and aqueous fraction from methanol extract of garlic on the mutagenicity of aflatoxin B₁(AFB₁, 1 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* strains of TA98 and TA100

	Revertants/plate	
	TA98	TA100
Spontaneous	26±4	103±7
AFB ₁	1428±54	1118±28
AFB ₁ +chloroform Fr 2.5%	474±16	416±55
AFB ₁ +chloroform Fr 5.0%	30±6	135±7
AFB ₁ +aqueous Fr 2.5%	1444±50	1084±56
AFB ₁ +aqueous Fr 5.0%	1453±24	1101±24
AFB ₁ +aqueous Fr 10.0%	1439±30	1105±47

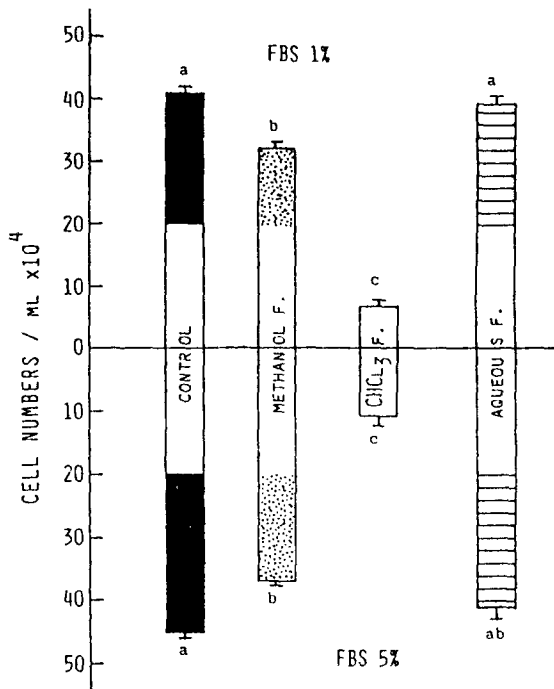


Fig. 3. Inhibitory effects of methanol extract, chloroform(CHCl₃) fraction and aqueous fraction from the methanol extract of the garlic on the growth of HT-29 cells after 6 days at 37°C in different FBS(fetal bovine serum) concentration

Each data point is the mean±SD for 4 samples and the different letters surmounted on the bars are significantly different at the 0.05 level as determined by Duncan's multiple range test

적으로 동정되었는데⁽¹⁵⁾ 여러 화합물 중 methyl linoleate가 주성분의 하나로 동정되었다. 한편 linoleic acid는 최근에 항돌연변이 및 항암작용이 있는 것으로 보고되고 있다^(17,18). 그러나 이에 대한 확실한 연구가 더욱 필요하다고 하겠다. 황 등⁽⁸⁾은 석유에테르 뿐만

아니라 알콜 추출물에서도 항암효과를 나타내었다 하였는데 이들 추출물 내의 활성물질(들)이 본 실험에서 나타났던 물질과 동일 물질인지에 대하여는 아직 알 수 없다.

결국 마늘 내에서 항암작용을 하는 물질은 알리신을 비롯한 함유량 물질외에 linoleic acid계 물질 등 몇몇 화합물이 마늘의 항암효과에 관여하고 있는 것으로 사료된다.

요 약

마늘의 돌연변이유발 억제효과와 사람의 HT-29 결장암 세포의 성장저해 효과에 대하여 검토하였다. 마늘의 메탄올 추출물은 김치 제조시 사용되는 첨가농도 2%에서 아플라톡신 B₁(AFB₁)과 MNNG에 대해 항돌연변이적 효과를 나타내었다. 이 메탄올 추출물의 농도를 증가시켰을 때 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100에서 모두 AFB₁에 대하여 돌연변이유발 억제효과가 증가되었다. 이를 다시 분획하였을 때 비극성 분획인 클로로포름 분획에서 더 큰 돌연변이유발 억제효과를 관찰할 수 있었다. 또한 마늘의 클로로포름 분획은 사람의 HT-29 결장암 세포의 성장을 FBS 농도 1%와 5%에서 각각 크게 저해하였다.

감사의 말

이 연구는 한국과학재단 연구비 지원(과제번호: 891-1508-059-1 및 과제번호: 90-0500-03)에 의한 결과의 일부이며 이를 감사드립니다.

문 헌

1. Nadkarni, A.K.: *Indian Materia Media*, 1st ed. Dhoot-papehwar prakashan Ltd., Popular book Dopot., Bombay, p.67(1954)
2. Yamata, Y. and Azuma, K.: Evaluation of the *in vitro* antifungal activity of allicin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 11, 743(1977)
3. Cavallito, C.J., Bailey, J.H. and Buck, J.S.: The antibacterial principle of *Allium sativum*. III. Its precursor and essential oil of garlic. *J. Am. Chem. Soc.*, 67, 1032 (1976)
4. Sharma, K.K., Sharma, A.L., Dwividi, K.K. and Sharma, P.K.: Effect of raw and boiled garlic on blood cholesterol in butter fat lipoemia. *Ind. J. Nutr. Dietet.*, 13, 7(1976)
5. Dipaolo, J.A. and Carruthers, C.: The effect of allicin from garlic on tumor growth. *Cancer Res.*, 20, 431 (1960)
6. Weisberger, A.S. and Pensky, J.: Tumor inhibition by a sulfhydryl-blocking agent related to an active principle of garlic (*Allium sativum*). *Cancer Res.*, 18, 1301 (1958)

7. Nakata, T.: Effect of fresh garlic extract on tumor growth. *Jap. J. Hyg.*, 27, 538(1973)
8. 황우익, 이성동, 손홍수, 백나경, 지유환 : 마늘성분에 의한 면역증강 및 항암효과. *한국영양식량학회지*, 19, 494(1990)
9. 손홍수, 황우익 : 마늘 중 지용성 성분의 암세포 증식 억제 효과 연구. *한국영양학회지*, 23, 135(1990)
10. Takahashi, Y., Nagao, M., Fujino, T., Yamaizumi, Z. and Sugimura, T.: Mutagens in Japanese pickle identified as flavonoids. *Mutat. Res.*, 68, 117(1979)
11. Maron, D.M. and Ames, B.N.: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 113, 173(1983)
12. Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M.: Factors modulating mutagenicity in microbial test. In *Short-term test systems for detecting carcinogens*. Norpoth, K.H. and Garner, R. C.(eds.), Springer, Berlin, p.273(1980)
13. Franceschi, R.T., James, W.M. and Zerlauth, G.: $1\alpha, 25$ -dihydroxy vitamin D_3 specific regulation of growth, morphology and fibronectin in a human osteosarcoma cell line. *J. Cell. Physiol.*, 123, 401(1985)
14. Steel, R.G.D. and Torrie, J.H.: *Principles and procedures of statistics*. McGraw-Hill Kogakusha, Ltd, Tokyo, p.187(1980)
15. 김소희 : 김치성분의 보툴리눔이유발 및 항돌연변이 효과. 부산대학교 박사학위논문(1991)
16. Morita, K., Hara, M. and Kada, T.: Studies on natural desmutagens: Screening for vegetable and fruit factors active in inactivation of mutagenic pyrolysis products from amino acids. *Agric. Biol. Chem.*, 42, 1235 (1978)
17. Hayatsu, H., Arimoto, S., Togawa, K. and Makita, M.: Inhibitory effect of the ether extract of human feces on activities of mutagens: inhibition by oleic and linoleic acids. *Mutat. Res.*, 81, 287(1981)
18. Siegel, I., Liu, T.L., Yaghoobzadeh, E., Keskey, T.S. and Gleicher, N.: Cytotoxic effects of free fatty acids on ascites tumor cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 78, 271 (1987)

(1991년 5월 1일 접수)