

컴프리 추출액에 의한 항돌연변이효과

함승시[†] · 박귀근 · 박양호* · 박원봉**

강원대학교 식품공학과

* 한국건강가족동호회

** 서울여자대학교 화학과

Antimutagenic Effect of the Extracts of Comfrey

Seung-Shi Ham[†], Gwi-Gun Park, Yang-Ho Park* and Won-Bong Park**

[†]Dept. of Food Science and Technology, Kangweon National University, Chuncheon 200-701, Korea

*The Korean Association of Health-minded Families, Seoul 135-010, Korea

**Dept. of Chemistry, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

Abstract

This study was carried out to investigate the antimutagenic effects of crude and heated comfrey extract on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), benzo(α)pyrene (B(α)P) and 3-amino-1, 4-dimethyl-5H-pyrido [4,3-b] indole (Trp-P-1). In spore rec-assay using *Bacillus subtilis* H17(rec⁺) and M45(rec⁻), crude comfrey extract showed strong antimutagenic effects on MNNG in the concentration of 40μl/disc (p<0.01). In the Ames test using *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100, the crude comfrey extract suppressed about 43% and 52% in the mutagenesis induced by B(α)P. However, the heated comfrey extract strongly suppressed about 75% and 76% in the mutagenesis in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 induced by Trp-P-1 (p<0.01).

Key words : comfrey, antimutagenic effect, spore rec assay, Ames test

서 론

산채류의 이용은 그 민족의 식생활습관이나 기호에 따라 이용방법이나 조리법 등이 각기 다른데 우리나라의 경우 산채류는 주로 식육을 돕는 반찬으로 중요하게 여겨왔으며 또한 일부 산채류는 민간요법 등에서 약초로서 이용되어왔다^{1,2)}.

현재 우리나라 산지에서 각종 산채류가 많이 생산되고 있으나 이러한 식품자원들의 생리작용에 대한 연구는 거의 이루어진바가 없이 전통적으로 식용되어왔다.

국민의 소득수준이 향상됨에 따라 식생활의 양상이

주식위주에서 탈피하여 점차 다양화 되어가고 있으며, 최근 각종 산채류에 대한 관심이 점차 높아지고 있는데 이것은 우리나라 전통식품에 대한 인식이 고조되어가고 있기 때문이다.

그러나 이러한 산채류의 영양적 측면이라든가 보다 과학적인 조리방법 등에 대해서는 전혀 인식을 갖지 못하였다. 그러나 다행히도 최근에 들어와서 건강지향적인 식생활에 관심이 커지면서 산채류에 대한 관심도 커져 산채류에 대한 성분분석에서부터 생리작용에 이르기까지 구체적인 효과에 대해 추적해 보려는 노력이 시작되었다^{3,4)}.

아직은 소수의 산채류에 대한 연구결과이지만 산채류는 일반 야채류와 비교해 볼 때 영양면에서도 뒤떨

[†]To whom all correspondence should be addressed

어지지 않으며 오히려 무기질과 비타민 그리고 섬유소 원으로서 우수하며 생리작용면에서도 강한 항돌연변이 억제효과를 나타내고 있다^{2,5-7)}.

본 연구에서는 여러가지 산채류 가운데서 comfrey의 생즙과 가열즙이 생체내에서 어떤 작용을 나타내는지에 대한 연구가 요구되므로 이를 규명하기 위해 일차적으로 미생물을 이용한 *in vitro* 실험을 실시하여 발암물질의 활성억제효과를 규명하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용한 컴프리는 강원도 춘천군에서 재배한 것을 농장에서 구입, 마쇄하여 얻은 생즙을 5,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 milipore filter (0.45 μ m)로 여과하여 사용하였으며, 가열즙의 경우는 마쇄하여 얻은 생즙을 90°C에서 20분간 원심분리하고 milipore filter (0.45 μ m)로 여과하여 실험에 사용하였다.

Spore rec-assay에 의한 항변이원성 실험

Kada⁹⁾의 방법에 따라 *B. subtilis* H17(rec⁺) M45(rec⁻)의 포자를 조제하였다. 1,000ml의 nutrient broth한천 배지를 조제하여 50°C로 냉각시켜 H17 및 M45포자현탁액을 배지에 각각 10ml당 포자현탁액 1ml의 비율로 혼합한 후 petri dish내에 10ml씩 각각 분주하여 평판 고화시킨 다음 이것을 돌연변이원성 및 항돌연변이원성 실험에 사용하였다.

시료에 대한 변이원성 실험으로서 이미 강력한 돌연변이 물질로 알려진 양성변이원물질의 변이원성을 조사하기 위하여 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG, 0.1 μ g/ μ l)를 H17 및 M45 포자한천 plate상의 paper disc에 각각 10, 20, 30, 40 μ l씩 농도를 증가시켜 순서대로 주입하였으며, 컴프리의 두가지 시료에 대해서는 H17 및 M45 포자한천 plate상의 4개의 paper disc에 각각 10, 20, 30, 40 μ l씩 농도를 증가시켜 순서대로 주입하여, 4°C에서 8시간 cold incubation한 다음 37°C에서 16시간 배양하여 paper disc주변에 형성된 생육저지대의 직경을 측정하여 변이원성 유무를 판정하였다.

항돌연변이원성 실험에서, 변이원물질로서 활성이 큰 MNNG를 양성변이원물질로서 사용하였으며, 대사활성물질(S-9mix)은 필요로 하지 않기 때문에 첨가하지 않고 실험하였다. 항돌연변이원성 실험에서는 시료

를 각각 10, 20, 30, 40 μ l씩 첨가하고, 변이원성물질 10 μ l씩을 첨가해서 이것을 37°C에서 30분간 반응시킨 후 미리 조제해둔 H17 및 M45 spore 한천 plate상의 paper disc상에 차례로 주입한 다음 4°C에서 8시간 cold incubation시키고 37°C에서 하룻밤 배양한 후 paper disc주변에 생성된 생육저지대의 직경을 측정하여 항돌연변이원성 유무를 조사하였다.

Ames test에 의한 돌연변이원성 및 항돌연변이원성

Ames test를 개량한 preincubation법⁹⁻¹¹⁾을 이용하였으며, 대사활성물질이 필요한 경우에는 S-9mix를 첨가하였다. 시료용액을 미리 전열멸균시킨 glass cap tube에 각각 50, 100, 150, 200 μ l씩 가하고 여기에 TA culture 배지에서 하룻밤 배양시킨 균배양액 100 μ l와 S-9 mix 250 μ l를 가한다음 0.2M sodium phosphate buffer (pH 7.4)로 총 700 μ l가 되도록 하였다. 이것을 37°C에서 20분간 예비 배양한 다음 histidine/biotin이 첨가된 top agar (45°C)를 2ml씩 가하여 잘 혼합한 후에 미리 조제해놓은 minimal glucose agar plate상에 흘려넣어 평판고화시켜 37°C에서 48시간 배양하여 생긴 his^r revertant colony를 계측하여 돌연변이원성 유무를 판정하였다.

한편, 항돌연변이원성 실험에서 변이원물질의 농도는 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido [4,3-b] indole의 경우 TA98에서는 0.02 μ g/plate, TA100에서는 1.0 μ g/plate를, benzo(a)pyrene의 경우 모두 20 μ g/plate를 사용하였다. 실험절차는 전열멸균시킨 glass cap tube에 시료물질을 각각 50, 100, 150, 200 μ l씩 첨가하고 변이원물질을 20 μ l씩 첨가한다음 대사활성물질이 필요한 경우에는 S-9 mix를 250 μ l씩 각각 첨가하였다. 여기에 하룻밤 배양시킨 TA98과 TA100을 100 μ l씩 주입한 후에 0.2M sodium phosphate buffer를 가하여 최종 부피가 700 μ l가 되도록하였다. 이것을 37°C에서 20분간 preincubation한 다음 상기의 돌연변이원성 실험과 같은 방법으로 실험하여 생성된 colony를 계측하여 항돌연변이원성 유무를 검토하였다. 실험 결과에 대한 억제정도(%)는 다음식에 의하여 산출하였다¹²⁾.

$$\text{Percent Inhibition} = 100 - \frac{\text{Number of revertants per plate in the presence of edible mountain herb juice}}{\text{Number of revertants per plate in the absence of edible mountain herb juice}} \times 100$$

통계분석

대조군과 각 시료에 대한 실험결과로부터 얻은 data를 student's t-test를 이용하여 통계분석하였다¹³⁾.

결과 및 고찰

Spore rec-assay

양성변이원 물질의 변이원성 실험결과 H17과 M45의 생육저지대 차이가 MNNG는 30mm의 강력한 돌연변이원 활성이 있는 것으로 나타났다. 한편, 컴프리의 생즙과 가열즙의 변이원성 실험결과는 Table 1과 같이 H17과 M45의 생육저지대의 차이가 양성변이원 물질인 MNNG에 비해 시료농도를 disc당 40 μ l첨가시에도 생즙과 가열즙 모두 변이원성은 없는 것으로 판정되었다. 이와같은 결과는 고들빼기, 냉이, 민들레, 방가지똥, 부추, 수리취, 썸바귀, 쇠비름, 질경이, 참비름, 솜대 등 대부분의 산채류들이 돌연변이원성이 없다고 하는 지금까지의 연구결과와 일치하였다^{2,14)}.

돌연변이원성에 미치는 금속이온의 영향을 비교하기 위하여 Al³⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺를 2.5mM용액으로 조제하여 시료용액 50 μ l와 금속이온용액 10 μ l를 가하여 rec assay를 실시한 결과 inhibition zone차이가 나타나지 않음으로 인하여 DNA손상에는 영향을 끼치지 않는 것으로 사료되었다(Table 2).

특정적으로 부추생즙의 경우, Ni²⁺의 첨가로서 inhibition zone차이가 다소 나타남으로서 DNA손상에 약간의 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다¹⁴⁾.

양성변이원물질에 대한 시료의 항돌연변이성 실험

Table 2. Effects of various metal ions on the spore rec assay of comfrey

Metal ion (2.5mM)	MNNG*	Comfrey	
		Crude extract	Heated extract
None	+++**	-	-
Al ³⁺	-	-	-
Cu ²⁺	-	-	-
Fe ²⁺	-	-	-
Mn ²⁺	-	-	-
Ni ²⁺	-	-	-
Pb ²⁺	-	-	-
Zn ²⁺	-	-	-

*MNNG ; N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (0.1 μ g/ μ l)
 **(-) : No inhibition zone, (\pm) : Length of inhibition zone is less than 5mm, (+) : 5~10mm of inhibition zone, (++) : 10~15 mm of inhibition zone, (+++) : 15~20mm of inhibition zone

결과 Table 3과 같이 MNNG에 대한 두가지 시료의 돌연변이 억제효과에서 양성대조구인 MNNG에 의한 저지대의 차이 30mm에 대하여 생즙 40 μ l첨가의 경우 20mm로 강하게 억제시킨 반면 가열즙의 경우에는 농도에 관계없이 26mm로 약한 억제작용을 나타내었다. 이와같은 시료추출물의 억제효과는 MNNG에 의한 고초균 DNA손상을 억제하는 것으로 판단된다.

Ames test

컴프리시료의 항돌연변이원성을 검토하기 위해 먼저 변이원성 유무를 검토하였다. *Salmonella typhimurium* TA 98 및 TA 100 두 균주를 이용하여 실험한 결과 Fig. 1에서 나타낸 바와같이 시료농도 증가에 따른 his⁻ revertant colony수의 증감이 없는 것으로 검토되

Table 1. The result of mutagenicity test of comfrey in the spore rec assay

Test compound	Dose(μ l/disc)	Inhibition zone (mm)		Difference	Conclusion
		H17(Rec ⁻)	M45(Rec ⁻)		
Crude extract	10	8	8	0	-
	20	8	8	0	-
	30	8	8	0	-
	40	8	8	0	-
Heated extract	10	8	8	0	-
	20	8	8	0	-
	30	8	8	0	-
	40	8	8	0	-
MNNG* control		10	40	30	+++

*MNNG ; N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(0.1 μ g/ μ l)

**(-) : No inhibition zone, (\pm) : Length of inhibition zone is less than 5mm, (+) : 5~10mm of inhibition zone, (++) : 10~15mm of inhibition zone, (+++) : 15~20mm of inhibition zone

었다.

컴프리의 두가지 시료에 의한 돌연변이 억제효과를 검토하기 위해 발암물질인 B(α)P 및 Trp-P-1을 사용하여 변이원성 억제효과를 검토하였다.

Fig. 2는 *Salmonella typhimurium* TA98 및 TA100균주를 이용하여 2종류의 시료에 의한 발암물질인 B(α)P의 억제활성을 검토한 결과로서, 각 시료를 plate당 50, 100, 150, 200μl첨가하여 실험한 결과 컴프리생즙, 가

Table 3. The antimutagenic effects of comfrey on MNNG (0.1 μg/μl) in *Bacillus subtilis* spore rec assay

Test compound	Dose(μl/disc)	Inhibition zone (mm)		Difference
		H17(Rec ⁺)	M45(Rec ⁻)	
Crude extract + MNNG	10	8	34	26
	20	8	32	22
	30	8	30	22
	40	8	28	20**
Heated extract + MNNG	10	8	34	26
	20	8	34	26
	30	8	34	26
	40	8	34	26
MNNG* control		10	40	30

*MNNG : N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
 **Significantly different from the MNNG control(p<0.01)

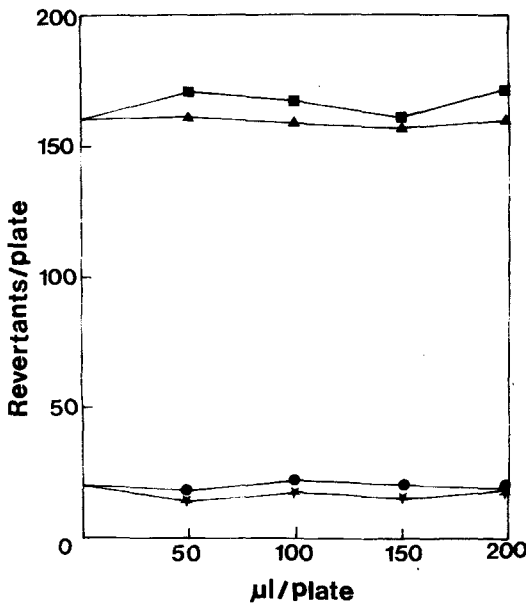


Fig. 1. Mutagenic effects of water extract of comfrey on the mutagenesis in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA 100.

● : Crude extract, TA98 ▲ : Crude extract, TA100
 ★ : Heated extract, TA98 ■ : Heated extract, TA100

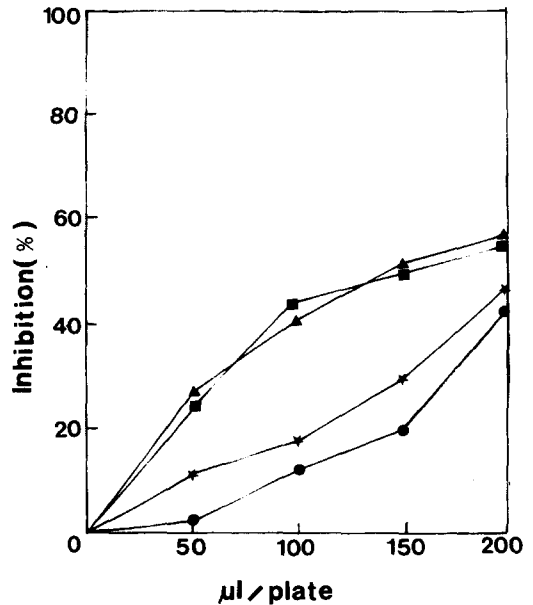


Fig. 2. Antimutagenic effects of water extract on B(α)P mutagenesis in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA 100 in presence of S-9mix.

● : Crude extract, TA98 ▲ : Crude extract, TA100
 ★ : Heated extract, TA98 ■ : Heated extract, TA100

열즙 모두 농도의 증가에 따라 돌연변이원물질의 활성 억제제를 나타내고 있으며, TA98의 경우 가열즙이 생즙보다 억제활성이 약간 강하게 나타나고 있으며, 200 μl 처리시 약 50%의 억제효과를 나타내었다. 한편 TA100의 경우에는 가열즙, 생즙 모두 유사한 억제효과를 나타내었다. 특히 냉이, 민들레, 수리취, 질경이의 경우는 80%이상의 억제효과를 나타내고 있음이 보고되었다¹⁴⁾.

육류나 생선을 구웠을때 생성되는 발암물질인 Trp-P-1에 대한 두가지 시료의 결과는 Fig. 3에 나타난 바와 같이 시료 모두 농도증가에 따라 활성억제력을 보이고 있으며 특히 TA 98균주에 대해서는 생즙의 경우 200μl 시료첨가시 85%이상의 활성억제력을 보이고 있는 반면(p<0.01), TA 100균주에 대해서는 50%의 약한 활성억제를 나타내고 있다(p<0.05).

한편, 고들빼기, 냉이, 민들레, 방가지뚱, 부추시료는 TA 100에 대해서 50%미만의 다소 약한 억제작용을 나타낸 반면, 수리취, 질경이는 강한 억제력을 나타내었다¹⁴⁾.

따라서 이들 산채는 가열요리한 육류를 섭취할 때 함께 섭취하면 어느정도 발암물질활성을 감소시킬 것으로 사료된다.

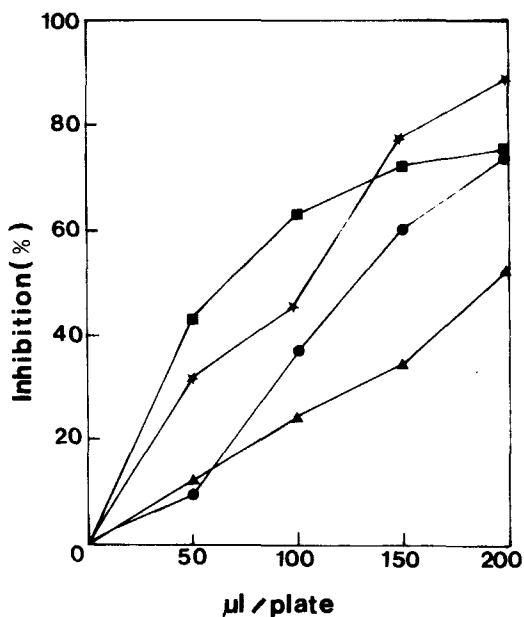


Fig. 3. Antimutagenic effects of water extract of comfrey on Trp-P-1 mutagenesis in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 in presence of S-9mix.

● : Crude extract, TA98 ▲ : Crude extract, TA100
 ★ : Heated extract, TA98 ■ : Heated extract, TA100

요 약

변이원물질인 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, benzo(α)pyrene, 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido [4,3-b] indole에 대한 컴프리의 생즙과 가열즙의 항돌연변이 효과를 spore rec-assay 및 Ames test방법을 이용하여 검토하였다. *Bacillus subtilis* H17(rec⁺)와 M45 (rec⁻)를 사용한 spore rec-assay에서 comfrey의 생즙시료 40µl처리시에 MNNG에 대한 강한 항돌연변이 효과를 나타내었다(p<0.01). *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100의 두 균주를 이용한 Ames test에서는, comfrey생즙의 경우 B(α)P에 대해 TA98과 TA100 두 균주 모두에서 각각 43% 및 52%의 다소 낮은 항돌연변이 효과를 나타낸 반면, 가열즙의 경우 Trp-P-1에 대해 TA98과 TA100의 균주에 대해서 각각 75% 및 76%의 강한 항돌연변이 효과를 나타내었다(p<0.01).

문 헌

1. 김용두, 양원모 : 산채의 성분에 관한 연구. 한국영양 식량학회지, 15(4), 10(1986)
2. 함승시 : 산채류 가열즙의 돌연변이 억제작용에 관한 연구. 한국농화학회지, 31(1), 38 (1988)
3. McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E. and Ames, B. N. : Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test : Assay of 300 chemicals. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72(12), 5135(1975)
4. Sugimura, T. and Sato, S. : Mutagens-carcinogens in foods. Cancer Res., 43, 2415(1983)
5. Kada, T., Morita, K. and Inoue, T. : Antimutagenic action of vegetable factor on the mutagenic principle of tryptophane pyrolysate. Mutation Res., 53, 351 (1978)
6. Lai, C. N., Butler, M. N. and Matney, T. S. : Antimutagenic activities of common vegetables and their chlorophyll content. Mutation Res., 77, 245(1980)
7. 함승시 : 재래종 황색 자두효소 갈변반응 생성물의 돌연변이 억제작용. 한국농화학회지, 30(1), 71(1978)
8. Kada, T., Tutikawa, K. and Sadaie, Y. : In vitro and host-mediated "rec-assay" procedures for screening chemical mutagens. Mutation Res., 16, 165(1975)
9. Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. : Factors modulation 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)
10. Yahagi, T., Nagao, M., Seino, Y., Matsushima, T., Sugimura, T. and Okada, M. : Mutagenicities of N-nitrosamines on *Salmonella*. Mutation Res., 48, 121 (1977)
11. Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. : Mutagenicity of carcinogenic azo dyes and their derivatives. Cancer Lett., 1, 91(1975)
12. Ong, T. M., Whong, W. Z., Stewart, J. and Brockman, H. E. : Chlorophyllin : a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixtures. Mutation Res., 173, 111(1986)
13. Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. : Principles and procedures of statistics. McGraw-Hill Kogakusha, Ltd, Tokyo, p.96(1980)
14. 이재훈 : 산채류 생즙의 항돌연변이원성에 관한 연구. 강원대학교 석사학위 논문(1989)
 (1992년 6월 26일 접수)