

씀바귀 추출물들의 돌연변이 유발 억제 및 MG-63 암세포 성장 저해 효과

김 소 희

동주여자전문대학 식품영양과

Inhibitory Effects of *Ixeris Dentata* on the Mutagenicity of Aflatoxin B₁, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and the Growth of MG-63 Human Osteosarcoma Cells

So-Hee Kim

Dept. of Food and Nutrition, Dong-Ju Women's Junior College, Pusan 604 - 080, Korea

Abstract

Ixeris dentata was extracted with methanol and then the methanol extract was further fractionated to hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol and aqueous fraction. The methanol extract of *Ixeris dentata* had the strong antimutagenic effect on the aflatoxin B₁ (AFB₁) and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) in Ames mutagenicity test and SOS chromotest. Among the solvent extracted fractions from the methanol extract, the chloroform fraction exhibited the greatest antimutagenic effect suppressing the mutagenicity of AFB₁ with inhibition rate of 74 percent. The methanol extract of *Ixeris dentata* also revealed the inhibitory effect on the growth of MG-63 human osteosarcoma cells after 6 days of breeding at 37° C. The chloroform fraction and the ethyl acetate fraction from the methanol extract of *Ixeris dentata* were most effective and inhibited the growth of MG-63 cells by 97 and 93 percent, respectively. It is suggested that the inhibitory effects of *Ixeris dentata* on the mutagenicity and the growth of MG-63 human osteosarcoma cells are strong in the lipid soluble fractions.

Key words : *Ixeris dentata*, antimutagenicity, anticarcinogenicity, MG-63 human osteosarcoma cells

서 론

우리가 일상으로 섭취하고 있으며 생체내에서 독성이나 부작용이 비교적 적을 것으로 생각되는 식품에서 항암성분을 찾으려는 노력이 계속되는 가운데 최근에는 식물류, 특히 야생채소나 민간에서 약으로 쓰이는 식물들에 대한 항암 효과 및 그 성분 검출에도 주목하고 있다. Morita 등¹⁾과 Lai 등²⁾이 채소류의 돌연변이 유발 억제 효과를 보고했던 것을 비롯하여 많은 채소류들의 항돌연변이 및 항암 효과에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는 가운데 식물류에 존재하는 항암성분으로는 β -carotene과 vitamin C 등의 비타민류, cysteine, dietary fiber류, polyphenol류, indol류, peroxidase, protease inhibitor, 식물 sterol, 세레늄 등³⁻⁵⁾과, chlorophyll 및 chlorophyllin 등⁶⁾의 색소류들 등이 보고 되고 있다. 또한 Nataka 등⁷⁾과 Meng 등⁸⁾도 많은 약용식물의 엑기스들이 3-amino-1-methyl-5H-pyrido [4,3-b]indole (Try-P-

2) 등의 돌연변이 물질들에 대하여 항돌연변이 효과를 가짐을 보고하고 있다. 이와 같이 우리나라에서 생산되며 매일 섭취하거나 민간요법에서 경험적으로 쓰고 있는 식물류들의 효과를 증명할 수 있는 과학적 연구는 식물성 식품에 대한 관심이 높은 오늘날 더욱 의미 있는 일이라 하겠다.

한편 쑤바귀 (학명 ; *Ixeris dentata* Nakai, 영명 ; Sow-thistle)는 봄철에 뿌리를 포함한 식물의 모든 부분이 식용 또는 약용으로 사용되고 있는 국화과에 속하는 여러해살이 풀로서 건위, 소염제로서 소화불량, 식욕증진 등에 사용되어짐이 알려져 있으며⁹⁾ 한국의 민간에서는 생즙으로 만들어 당뇨병이나 간장병과 같은 성인병의 치료를 위해서도 사용하여 왔다.

이러한 쑤바귀에 대하여는 aliphatics와 triterpenoids¹⁰⁾, sesquiterpene glycosides 등의 성분이 함유됨이¹¹⁾ 알려져 있다. 또한 쑤바귀의 메탄올 추출물은 고콜레스테롤혈증을 가진 쥐에 대한 개선 효과와¹²⁾ 당뇨병 쥐의 혈

당을 감소시키고 혈액의 triglyceride와 총 cholesterol의 수준을 감소시키는 지방 저하 효과를 가지며 주성분으로는 cynaroside(luteolin 7-O-β-D-glucoside) 보고¹²⁾된 바 있다.

그러나 민간요법에서 성인병의 예방 및 치료에 크게 효과가 있을 것으로 기대하고 있는 이 썸바귀에 대한 화학분석적 연구나 생리활성 및 구체적인 임상 효과에 관한 연구는 미흡한 편이다. 특히 암과의 관계에 대하여는 같은 *Ixeris*속에 속하는 고들빼기 추출물의 항암 실험의 결과에 대한 보고¹³⁾는 있으나, 썸바귀의 암예방 및 항암 효과에 관한 실험적 확인이나 작용기작에 관한 연구는 거의 없었다.

따라서 본 연구는 썸바귀의 항암 효과 검색을 위한 기본 단계로서 썸바귀의 메탄올 추출물과 이를 다시 극성이 다른 용매들로 더욱 추출, 분획하여 얻은 분획물들이 암의 initiation을 유도할 수 있는 돌연변이에 미치는 영향과 암세포 성장에 대한 저해 효과를 검토해 보고자 하였다.

재료 및 방법

시료의 추출 및 분획

썸바귀를 92년 3월 부터 4월 까지 경남 밀양지역에서 수집하여, 흔히 민간에서 식용하는 것처럼 뿌리, 잎, 줄기가 달린 채로 선별하고, 이들을 동결건조한 후 마쇄하여 분말화한 것을 냉동보관하면서 시료로 사용하였다. 건조시료 0.25~1g을 20배의 메탄올로서 8시간씩 3회 교반 추출하고 회전식 진공 농축기로 농축한 후, 5ml의 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹인 것을 5~20%의 메탄올 추출물로 하여 실험에 사용하였다. 썸바귀의 돌연변이 유발 억제 및 암세포 성장 저해 성분들의 특성을 검토하고자 메탄올 추출물을 증류수에 현탁시키고 클로르포름을 가하여 분획여두에서 분배하는 과정을 세 번 반복한 후 클로르포름과 수층 분획물, 두획분으로 분획하였다. 또한 더욱 효과있는 부분만을 정제하기 위하여 메탄올 추출물을 다시 극성이 다른 용매들로 더욱 분획하였다. 즉, hexan과 메탄올, 물을 10 : 1 : 9의 비율로 혼합하여 분획여두에서 분획하는 과정을 3번 반복한 후 감압농축한 것을 hexan 분획물로 얻었다. 또한 그 잔여물을 분획여두에서 다시 클로르포름, 에틸아세테이트, 부탄올로 각각 3번씩 추출하여 클로르포름, 에틸아세테이트, 부탄올 분획물로 하고, 마지막 남은 잔여물은 수층 분획물로 얻었으며 모든 추출물은 농축한 후 DMSO에 녹여 실험하였다.

Mutagens / Chemicals

N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)는 Aldrich Chemical Co.(Milwaukee, WI, USA)에서, Aflatoxin B₁(AFB₁)은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 MNNG는 증류수, AFB₁은 dimethyl sulfoxide (DMSO, Aldrich Chemical Co.)에 녹여 실험에 사용하였다. O-nitrophenyl-D-galacto-pyranoside (ONPG)와 p-nitrophenyl phosphate (PNPP), phosphate buffered saline (PBS)는 Sigma Chemical Co.에서 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)와 fetal calf serum (FCS)는 GIBCO Co. (USA)로 부터 구입하였다. 돌연변이 유발 억제 및 암세포 성장 저해 효과 실험을 위해 쓰였던 다른 시약과 배지들은 Sigma사와 Difco사의 제품을 사용하였다.

돌연변이 유발 억제 효과 실험

실험 균주

Salmonella typhimurium TA98과 TA100은 *Salmonella typhimurium* LT-2의 histidine auxotroph로서 미국 California대학의 B. N. Ames박사로 부터 제공받아 정기적으로 histidine 요구성, deep rough (*rfa*)돌연변이, *uvrB* 돌연변이, R factor 등의 유전형질을 확인하면서 실험에 사용하였다. *Escherichia coli* PQ 37/plasmid PKM 101 (PQ 37)는 *Escherichia coli* GC4436에서 유래되어 *lac Z* gene이 *sf* A gene에 삽입 되고 *uvr B* mutation과 *rfa* mutation을 가진 균주를 사용하였다.

Ames mutagenicity test

Matsushima 등¹⁴⁾과 Yamanaka 등¹⁵⁾의 방법에 따라 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100을 이용하여 preincubation mutagenicity test를 하였다. Indirect mutagenicity를 검토하기 위하여는 Maron과 Ames¹⁶⁾의 방법에 따라 약 200g의 Sprague-Dawley rat (male)를 Aroclor 1254로 복강주사하여 induction 시킨 5일 후, 적출하여 얻은 간의 microsomal enzyme fraction으로 부터 S9 mixture를 조제하였다. S9 mix 0.5ml (indirect mutagen) 혹은 phosphate buffer 0.5ml (direct mutagen), 12시간 배양된 균주 ($1 \sim 2 \times 10^8$ cells/ml) 0.1ml, mutagen과 시료 각각 50μl씩을 ice bath에 담긴 cap tube에 첨가하여 vortex하고 37°C에서 30분간 preincubation 하였다. 45°C의 top agar 2ml씩을 각 tube에 붓고 3초간 vortex하여 minimal glucose agar plate에 도말하고 37°C에서 48시간 배양한 후 그의 revertant 숫자를 계수하였다. 또한 시료 추출물, mutagen, chemical들은 본실험에 앞서 Maron과

Ames¹⁶⁾의 방법에 따라 toxicity test를 하여 실험계에서 toxicity를 나타내지 않는 범위의 농도에서 실험하였다.

SOS chromotest

Quillardet와 Hofnung¹⁷⁾의 방법에 따라 냉동보관 하였던 균주(*Escherichia coli* PQ 37/plasmid PKM101) 50 μ 를 5ml의 L medium에 접종하여 37°C에서 12~18 시간 진탕 배양하였다. 이를 다시 5ml의 L medium에 접종하고 37°C에서 2시간 동안 진탕 배양시킨 것을 (2×10^8 bacteria/ml) L medium에 1/10로 희석하여, DMSO에 녹인 각 시료와 돌연변이 유발 물질들을 각 10 μ 씩 미리 분주해 둔 96 well plate의 각 well에 100 μ 씩 분주하고 90분간 37°C에서 진탕하여 SOS 반응을 유도하였다. 한쪽에는 β -galactosidase의 활성 측정을 위해 ONPG 100 μ , 다른쪽에는 alkaline phosphatase의 활성측정을 위해서 PNPP 100 μ 를 첨가하였다. 발색 시간은 20분으로 하였고, 발색정지를 위해서 각각 1.5M Na₂CO₃ 100 μ , 1M HCl 50 μ 를 첨가하여 5분간 방치시킨 후 spectrophotometer로 420nm에서의 흡광도를 측정하였다. Enzyme unit (Eu)값은 O.D.₄₂₀값을 이용하여 Miller¹⁸⁾의 공식(Eu=(1000 \times A₄₂₀)/t(min))에 따라 구하였다.

암세포 성장 저해 효과 실험

암세포 배양

사람의 골육암 세포인 MG-63을 한국세포주은행(KCLB)으로부터 분양받아 100units/ml의 penicillin-streptomycin과 10%의 FCS (fetal calf serum)가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 사용하여 37°C, CO₂ incubator에서 배양하였다. Culture는 일주일에 3번 refeeding하고 7~8일 만에 PBS (phosphate buffered saline)에 0.05% trypsin-0.02% EDTA를 녹인 용액으로 떼어내어 splitting 하고 계대배양 하면서 실험에 사용하였다.

암세포 성장 저해 효과 실험

MG-63 골육암 세포를 24 well plate에 2×10^4 cell/ml의 density로 plating하고 하룻밤 배양한 후, 세포가 plate에 부착되었을 때 배양액을 버리고 FCS (10%)와 썸바귀 추출물들이 농도별로 함유된 새로운 DMEM으로 교체하였다. 이 새배양액으로 2일에 한번씩 refeeding하고, 6일 후에 성장된 세포수를 hemocytometer로 계수하였다. 또한 이때의 형태학적 변화를 inverted microscope (model CK2, Olympus optical, Co LTD, Japan)로 관찰

하였다.

통계분석

실험에서 측정된 결과는 실험군당 평균치와 표준편차로 나타내었으며, 이들 data들은 SAS¹⁹⁾를 이용하여 분산분석을 한 후 Student's t test와 Duncan's multiple range test로서 분석하였다.

결과 및 고찰

썸바귀 추출물들의 돌연변이 유발 억제 효과

메탄올 추출물의 효과

썸바귀 추출물들의 돌연변이 유발 억제 효과를 검토하기 위해 이들 썸바귀 추출물들 자체가 실험 균주들에 대한 독성이나 돌연변이 유발성이 있는지에 대한 예비실험에서, data를 나타내지는 않았지만 실험에 사용된 썸바귀 추출물들은 실험균주들에 대해 독성과 돌연변이성을 전혀 나타내지 않음을 확인하였다. 또한 여러 가지 산채류 가열즙의 효과를 실험하였던 함²⁰⁾의 연구에서도 고들빼기, 냉이, 민들레 등의 다른 산채류들과 함께 썸바귀 가열즙 역시 돌연변이원성이 없다고 보고하였으므로 썸바귀 자체의 돌연변이 유발성은 없는 것으로 생각되었다.

Fig. 1은 썸바귀를 먼저 메탄올로 추출한 후, 돌연변이원을 달리하여 Ames mutagenicity test로서 추출물의 농도 증가에 따른 돌연변이 유발 억제 효과를 실험

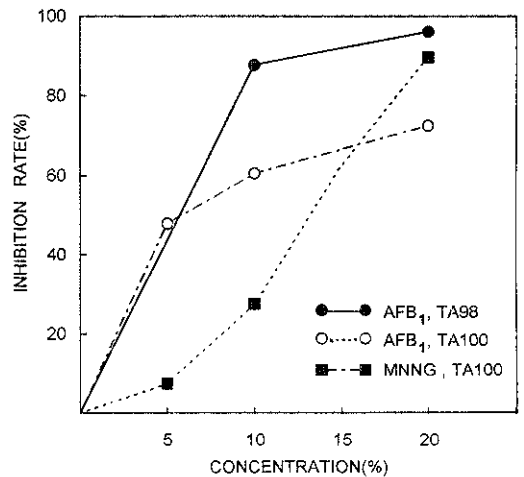


Fig. 1. Inhibitory effects of methanol extract from *Ixeris dentata* on the mutagenicities of aflatoxin B₁ (AFB₁, 0.5 μ g/plate) and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG, 0.45 μ g/plate) in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100.

한 결과이다. 썸바귀의 메탄올 추출물은, 활성화를 위해 S9 mix를 필요로 하는 AFB₁(0.5µg/plate)에 대해 농도에 비례하면서 돌연변이 유발 억제 효과를 나타내었다. 이 메탄올 추출물은 메탄올로 추출하기 전의 시료에 대한 20%의 농도로 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100 모두에서 AFB₁의 돌연변이를 유의적인 차이를 나타내며 ($p < 0.05$) 크게 억제시켰는데, 그 효과는 frame shift mutagen을 검출하는데 효과적인 *Salmonella typhimurium* TA98에서 더욱 강하여 96% 이상의 돌연변이 억제를 나타내었다. 썸바귀의 메탄올 추출물은 활성화 과정을 필요로 하지 않는 direct mutagen인 MNNG(0.45µg/plate)에 대하여도 돌연변이성을 억제시키는 항돌연변이 효과를 보였는데 (Fig. 1) 그 효과 역시 첨가되는 추출물의 농도에 비례하면서 증가하여 20% 농도의 메탄올 추출물의 첨가로 MNNG의 돌연변이를 89% 이상 까지 억제시킬 수 있었다 ($p < 0.05$).

Ames mutagenicity test에서의 돌연변이 유발 억제 효과에 관하여는 썸바귀와 같은 산채류의 일종인 고들빼기, 냉이, 민들래, 수리취, 질경이 등의 생즙도 benzo(a)pyrene, Try-P-1, 2-AF, 4-nitroquinoline-1-oxide(4-NQO)의 돌연변이성을 억제시킴이 보고²¹⁾된 바 있다.

또한 SOS chromotest로서 썸바귀의 메탄올 추출물의 항돌연변이 효과를 더욱 확인하여 Table 1에 나타내었는데 썸바귀의 메탄올 추출물은 SOS chromotest에서의 MNNG(0.07µg/plate)의 SOS response에 대하여도 큰 효과를 나타내었다. 즉 추출물 10µg 및 100µg의 첨가로 MNNG의 SOS response를 각각 69%와 89% 이상 까지 억제시키는 항돌연변이 효과를 보였다.

이상에서와 같은 AFB₁과 MNNG에 대한 썸바귀 메탄올 추출물의 돌연변이 유발 억제 효과는, AFB₁과 MNNG가 간암과 위암에 관계있는 발암물질임^{22,23)}을 생각할 때 위암과 간암이 흔한 우리나라에서 큰 의미를 가질 것으로 사료된다.

Table 1. SOS response of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG, 0.07µg/assay) treated with methanol extract of *Ixeris dentata*

Treatment	A* ₄₂₀	Eu**	Inhibition rate(%)
Spontaneous	0.232±0.001	11.6	
MNNG	0.278±0.002	13.9	
MNNG + Methanol extract			
10µg	0.246±0.001	12.3	69.6
100µg	0.238±0.001	11.9	89.0

*A₄₂₀ is the optical density at 420nm

**Eu means enzyme unit. Eu=(1000 × A₄₂₀)/20min

메탄올 추출물에서 분획한 분획물들의 효과

돌연변이 유발 억제 효과를 나타내는 썸바귀 성분들의 특성을 검토하고자 메탄올 추출물을, 지용성의 성분들과 수용성의 성분들로 나뉘어 추출되어질 것으로 예상되었던 클로로포름 분획물과 수층 분획물, 두획분만으로 분획하였다. Ames mutagenicity test에서의 이들 분획물들의 돌연변이 유발 억제 효과를 실험한 결과, Table 2, 3과 같이 클로로포름 분획물이 수층 분획물 보다 AFB₁(0.5µg/plate)과 MNNG(0.4µg/plate)의 돌연변이성을 더 크게 억제시키는 결과를 보였다. 따라서 썸바귀 추출물의 지용성 성분들이 수용성의 성분들 보다 돌연변이 유발 억제 효과가 큰 것으로 사료되었다.

그러나 수층의 분획물에서도 클로로포름 분획물에서 보다는 미흡했으나 돌연변이 유발 억제 효과가 있

Table 2. Inhibitory effects of chloroform and aqueous fraction from methanol extract of *Ixeris dentata* on the mutagenicities of aflatoxin B₁(AFB₁, 0.5µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100

Treatment	Revertants/plate	
	TA 98	TA100
Spontaneous	56 ± 6	110 ± 11
AFB ₁	1402 ± 24	680 ± 44
AFB ₁ + Chloroform fraction		
10%	82 ± 5 (98.1)*	23 ± 72 (77.7)*
5%	199 ± 11 (89.4)*	380 ± 11 (52.6)*
Aqueous fraction		
10%	486 ± 13 (68.1)*	458 ± 45 (38.9)*
5%	801 ± 21 (44.7)*	558 ± 35 (21.4)*

† The values in parentheses is the inhibition rate(%)

*Those asterisks mean different from the control by student's t test ($p < 0.01$)

Table 3. Inhibitory effects of chloroform and aqueous fraction from methanol extract of *Ixeris dentata* on the mutagenicities of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG, 0.4µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Treatment	Revertants/plate	Inhibition rate(%)
Spontaneous	115 ± 13	
MNNG	947 ± 33	
MNNG + Chloroform fraction		
10%	424 ± 36*	62.9
5%	543 ± 15*	48.6
Aqueous fraction		
10%	580 ± 22*	44.1
5%	734 ± 13*	25.6

*Those asterisks mean different from the control by student's t test ($p < 0.01$)

었으므로, 썩바귀의 메탄올 추출물에서 더욱 효과있는 부분을 분획하기 위해 극성이 다른 용매들로 각각 추출하여 헥산, 클로르포름, 에틸아세테이트, 부탄올, 수층 분획물들로 분획하고 농축한 후 DMSO에 녹여(메탄올 추출물에 대한 10% 농도) 이들의 돌연변이 유발 억제 효과를 실험하였다. 이들 분획물들은 Table 4 에서와 같이 AFB₁의 돌연변이를 억제시켰는데 특히 클로르포름 분획물과 헥산 분획물의 효과가 다른 분획물들의 효과에 비해 유의적인 차이(p<0.01)를 보이며 더욱 커서 각각 74%, 68%의 돌연변이를 억제시키는 항돌연변이 효과를 나타내었으며, 에틸아세테이트 분획물도 부탄올이나 수층 분획물 보다 비교적 높은 돌연변이 유발 억제 효과를 보였다.

본 실험에 사용하였던 AFB₁과 MNNG와 같은 돌연변이원에 대한 억제작용은 시금치, 사과 등의 dialyzate에서도 볼 수 있었는데 그들의 항돌연변이 활성은 polyphenol이 많은 fraction에서 검출되었음이 보고²¹된 바 있다. 또한 녹황색 채소류의 즙액에서는 분자량 43,000 정도의 peroxidase가 돌연변이 물질로 검출되었으며²², 우엉, 양배추, 콩나물 등에 함유된 식이 섬유소도 Trp-p-1과 Trp-p-2를 물리적으로 흡착하고 불활성화한다고 보고²³되고 있다. 이외에도 식물류의 항돌연변이 성분으로는 비타민 C와 E, indol 화합물, 셀레늄 등을 비롯하여 여러 성분들²⁰이 알려져 있다.

썩바귀의 항돌연변이 효과도 이상의 실험의 결과들에서와 같이 한 분획물에서만 나타나지 않고 혼여져 나타났으므로 단일 성분의 작용만은 아니며 여러 성분들에 의한 복합 작용에 의한 것으로 생각되었으나, 썩바귀의 경우 클로르포름이나 헥산에 잘 녹는 지용성 성분들의 돌연변이 유발 억제 효과가 큰 것으로 사료되

었다. 최근에는 올레인산, 리놀산 및 리놀렌산 등이 변이원성 물질을 둘러싸거나 활성화 효소와의 상호작용을 방해하는 작용 등으로 항돌연변이 및 항암작용을 가짐이 보고^{25,27}되고 있다. 또한 썩바귀에는 지방이 0.6%, 비타민 A가 100g 중 116301.U. 정도나 함유되어 있는 것으로 알려져 있으므로(배추의 경우 지방 0.2%, 비타민 A 100g 중 941.U. 함유)²⁸, 썩바귀의 분획물들 중 강한 돌연변이 억제 효과를 보였던 클로르포름 분획물이나 헥산 분획물에도 이러한 지방산들과 비타민 A 등이 다른 성분들과 함께 존재할 것으로 생각되었다.

썩바귀 추출물들의 암세포 성장 저해 효과

메탄올 추출물의 효과

썩바귀 추출물들이 암의 initiation 단계에서 일어날 수 있는 돌연변이 유발²⁹에 대한 억제 효과를 가졌으므로 암세포 성장에 대한 직접적인 이들의 효과를 실험하였다. 사람의 골육암 세포인 MG-63을 seeding한 후 썩바귀의 메탄올 추출물을 각각의 농도로 첨가한 배양액과 첨가하지 않은 배양액으로 6일간 배양하여 그의 암세포 성장 저해 효과를 검토하여 Fig. 2와 같은 결과를 얻었다. 즉 썩바귀의 메탄올 추출물은 골육암 세포의 성장을 크게 저해하여 50 μ g, 100 μ g의 첨가로 MG-63 cell의 성장은 각각 54%와 76% 정도 까지 저해되

Table 4. Effect of solvent extracted fractions from methanol extract of *Ixeris dentata* on the mutagenicity of aflatoxin B₁ (AFB₁, 0.5 μ g/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Treatment	Revertants/plate	Inhibition rate(%)
Spontaneous	110 \pm 5	
AFB ₁	680 \pm 44 ^a	
AFB ₁ + Hexane fr. ²	293 \pm 41 ^d	67.9
Chloroform fr.	257 \pm 9 ^c	74.2
Ethyl acetate fr.	393 \pm 33 ^c	50.3
Buthanol fr.	491 \pm 12 ^b	33.2
Aqueous fr.	513 \pm 36 ^b	29.2

¹ The different letters are significantly different at the p<0.01 level of significance as determined by Duncan's multiple range test

² The concentration of solvent extracted fractions was 10% concentration for methanol extract

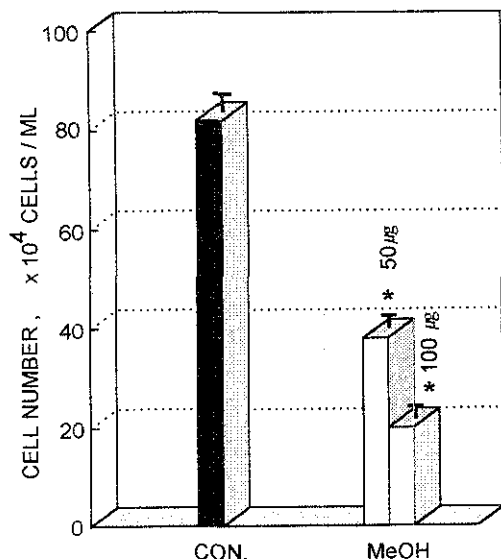


Fig. 2. Growth inhibitory effect of methanol extract (MeOH) from *Ixeris dentata* (50, 100 μ g/plate) in MG-63 human osteosarcoma cell after 6 days of incubation at 37 °C.

*The asterisks surmounted on the bars are significantly different from the control by student's t test (p<0.01).

었다. 또한 Fig로 나타내지는 않았지만 inverted microscope로 관찰된 이때의 골육암 세포는 썸바귀의 메탄을 추출물을 첨가하여 배양한 세포들이 추출물을 첨가하지 않고 배양한 대조군에 비해 밀도가 낮게 성장되었을 뿐 아니라 변형된 형태를 보였다.

메탄을 추출물에서 분획한 분획물들의 효과

썸바귀의 메탄을 추출물을 두획분으로 분획한 클로로포름 분획물과 수층 분획물도 암세포의 성장을 저해시키는 항발암 효과를 나타내었는데, 그 효과는 클로로포름 분획물이 수층 분획물 보다 더 강하여 50µg, 100µg씩의 첨가로 골육암 세포 MG-63의 성장을 각각 72%, 92%까지 저해시켰다 (Fig. 3). 이와 같은 결과로 미루어 썸바귀의 암세포 성장 저해 효과도 수용성 성분들보다는 클로로포름에 많이 용해되어 나오는 지용성 성분들의 작용이 더 클 것으로 생각되었다.

썸바귀의 효과를 보충 확인하기 위하여 메탄을 추출물에서 분리한 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올, 수층 분획물들이 첨가된 (메탄을 추출물에 대한 10% 농도) 배지와 첨가되지 않은 배지에서 MG-63 cell을 6일간 배양한 후 성장된 세포수를 검토하였다 (Fig. 4). 특히 클로로포름 분획물과 에틸아세테이트 분획물이 다른 분획물들에 비해 통계적인 유의차를 보이며 (p<0.01) 매우 큰 효과를 보여 MG-63 cell의 성장

을 거의 97%, 93% 까지 저해시키는 항암 효과를 나타내었다. 헥산 분획물도 부탄올이나 수층 분획물에 비해 암세포 성장을 크게 저해시켰다.

썸바귀의 암세포 성장 저해 효과 역시 지용성의 성분들이 많이 함유될 것으로 생각되는 분획물들에서 그 효과가 컸다. 이러한 식물류의 지용성 획분들의 효과에 대하여는 마늘의 항돌연변이 및 항암 효과에 대한 앞선 연구¹⁰⁾에서도 methyl linoleate를 그 주요성분으로 보고한 바 있으며 Joosens와 Kesteloot¹¹⁾는 위암 예방 인자의 하나로 고도불포화지방산을 들고 있다. 또한 불포화지방산은 암세포들에 대하여 직접적인 손상을 주거나 동물체내의 면역작용을 강화시켜서 세포독성을 나타내는 것으로 보고^{12,13)}되고 있다.

이상의 결과에서와 같이 썸바귀 추출물들의 항돌연변이 및 항발암 효과도 특히 클로로포름에 잘 용해되는 성분들의 작용이 클 것으로 생각되나 다른 극성의 분획물들에서도 효과는 있었으므로 여러 성분들의 복합작용에 의한 것으로 사료된다.

일반적으로 식이성 항암 인자들의 작용기작으로는 발암 물질의 해독에 관여하거나, 반응성이 높은 발암 물질의 종류를 scavenge하거나, 표적 세포에서 직접

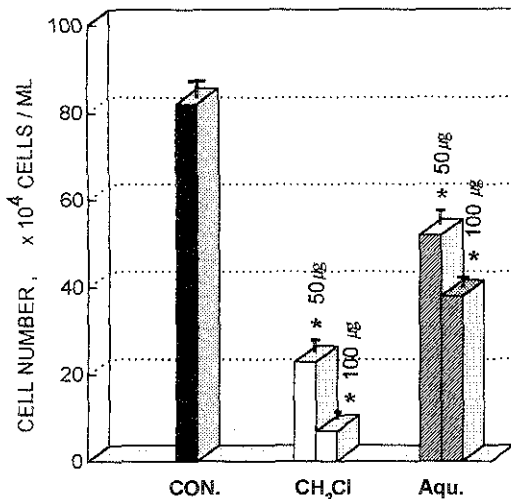


Fig. 3. Growth inhibitory effect of chloroform(CH₂Cl) and aqueous (Aqu.) fractions from methanol extracts of *Ixeris dentata* in MG-63 human osteosarcoma cell after 6 days of incubation at 37°C.

* The asterisks surmounted on the bars are significantly different from the control by student's t test (p<0.01).

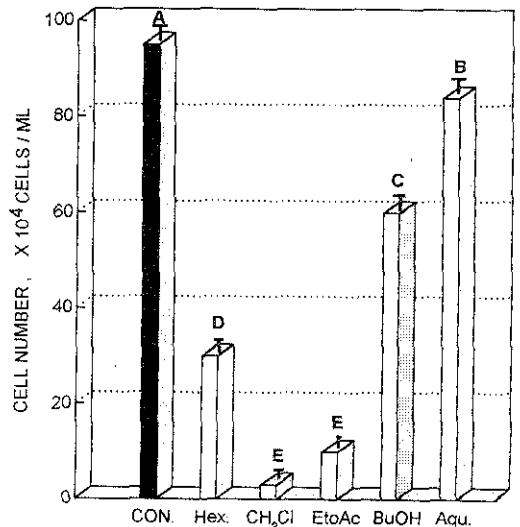


Fig. 4. Growth inhibitory effect of solvent extracted fractions (Hex.; hexane fr., CH₂Cl; chloroform fr., EtoAc; ethyl acetate fr., BuOH; butanol fr., Aqu.; aqueous fr.) from methanol extracts of *Ixeris dentata* in MG-63 human osteosarcoma cell after 6 days of incubation at 37°C.

The different letters surmounted on the bars are significantly different at the p<0.01 level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

DNA손상을 막거나 줄이는 작용, 세포의 differentiation을 유도하는 작용 등⁴⁾이 알려져 있는데, 썩바귀 성분들도 이러한 작용들을 할 것으로 생각되므로 후속 연구에서는 썩바귀의 항암기작에 대한 연구가 계속되어야 할 것으로 생각된다.

본 실험에서는 민간에서 성인병의 치료 및 예방에 많이 쓰이며 우리나라에서 보철 흔히 생산되는 산채류의 하나인 썩바귀가 돌연변이원, 발암원에 대한 저해 작용뿐 아니라 암세포의 성장도 크게 저해하였음을 밝혔으므로 계속되는 연구에서는 생체내 실험 및 면역 활성 증강 실험 등을 통하여 썩바귀의 항발암 효과를 더욱 증명하고 그 작용 기작 및 성분 검색도 이루어져야 할 것으로 사료된다.

요 약

썩바귀의 메탄올 추출물과 이를 더욱 분리한 분획물들의 돌연변이 유발 억제 효과를 Ames mutagenicity test와 SOS chromotest를 이용하여 검토하고 사람의 골육암 세포인 MG-63 cell의 성장에 대한 저해 효과를 실험하였다. 썩바귀의 메탄올 추출물은 Ames mutagenicity test에서 aflatoxin B₁(AFB₁)과 N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine(MNNG)의 돌연변이성을 크게 억제하였는데 (p<0.01), *Salmonella typhimurium* TA98에서의 AFB₁(AFB₁)에 대하여는 더욱 강한 효과를 보여 시료에 대한 20% 농도 추출물의 첨가로(실험계에서는 5% 농도) 96% 이상 억제시킬 수 있었으며, SOS chromotest에서도 MNNG의 SOS response를 억제시키는 강한 돌연변이 유발 억제 효과를 나타내었다. 아울러 그의 활성 성분들의 특성을 찾기 위하여 메탄올 추출물을 두 회분, 즉 클로르포름 분획물과 수층 분획물만으로 분획하여 돌연변이 유발 억제 효과를 실험한 결과, 지용성의 성분들이 추출되어질 것으로 예상되었던 클로르포름 분획물이 수층 분획물 보다 AFB₁(0.5µg/plate)과 MNNG(0.6µg/plate)의 돌연변이성을 더 크게 억제시키는 결과를 보였다. 썩바귀의 메탄올 추출물에서 더욱 효과있는 부분을 정제하기 위해 다시 극성이 다른 용매들로 각각 추출하여 얻은 헥산, 클로르포름, 에틸아세테이트, 부탄올, 수층 분획물들(메탄올 추출물에 대한 10% 농도) 중에는 특히 클로르포름, 헥산 분획물이 강한 항돌연변이 효과를 나타내어 AFB₁에 대하여 각각 74%, 68% 까지 돌연변이성을 억제시켰으며, 에틸아세테이트 추출물도 비교적 강한 돌연변이 유발 억제 효과가 있었다. 그리고 썩바귀의 메탄올 추출물은 사람의

골육암세포의 성장을 억제시키는 항발암 효과도 나타내어 100µg의 첨가로 MG-63 cell의 성장을 76% 까지 억제시켰다. 썩바귀의 메탄올 추출물을 두 회분으로 분획한 클로르포름 분획물과 수층 분획물도 암세포의 성장을 억제시키는 항발암 효과를 나타내었는데, 그 효과는 클로르포름 분획물이 수층 분획물 보다 더 강하였다. 메탄올 추출물에서 다시 극성이 다른 용매들로 분리한 분획물들 중에는 클로르포름 분획물과 에틸아세테이트 분획물들이(메탄올 추출물에 대한 10%농도) 암세포에 대하여 강한 항발암 효과를 나타내어 MG-63 cell의 성장을 각각 97%, 93% 까지 억제시켰다.

문 헌

1. Morita, K., Hara, M. and Kada, T. : Studies on natural desmutagens : Screening for vegetable and fruit factors active in inactivation on mutagenic pyrolysis products from amino acids. *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1235(1978)
2. Lai, C. H., Butler, M. N. and Matney, T. S. : Antimutagenic activities of common vegetables and their chlorophyll content. *Mutat. Res.*, **77**, 245(1980)
3. Ong, T. M., Whong, W. Z., Stewart, S. and Brockman, H. E. : Chlorophyllin ; a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixture. *Mutat. Res.*, **173**, 111(1986)
4. Shinohara, K., Kuroki, S., Miwa, M., Kong, Z-L. and Hosoda, H. : Antimutagenicity of dialyzates of vegetables and fruits. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1369(1988)
5. Wattenberg, L. W. : Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. *Cancer Res.*, **43**, 2488(1983)
6. Nataka, M., Kanazawa, K., Mizuno, M., Ueno, N., Kobayashi, T., Denno, G. I. and Minamoto, S. : Herb water-extracts markedly suppress the mutagenicity of Trp-P-2. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1423(1989)
7. Meng, Z. M., Sakai, Y., Ose, Y., Sato, T., Nagase, H., Kito, H., Sato, M., Mizuno, M., Ono, K. and Nakane, H. : Antimutagenic activity by the medicinal plants in traditional Chinese medicines. *Shoyakaku Zasshi*, **44**, 225(1990)
8. 福田次郎 : 原色牧野和漢藥草大圖鑑. 北降館, 東京, p.1068(1988)
9. Arai, Y., Kusumoto, Y., Nagao, M., Shiojima, K. and Ageta, H. : Composite constituents : Aliphatics and triterpenoids isolated from the whole plants of *Ixeris debilis* and *I. dentata*. *Yakugaku Zasshi*, **103**, 356(1963)
10. Seto, M., Miyasa, T. and Fukushima, S. : Sesquiterpene lactones from *Ixeris dentata* Nakai. *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 4170(1986)
11. Choi, J. S., Chung, H. Y. and Young, H. S. : Preliminary study on hypocholesterolemic and hypoglycemic activities of some medical plants. *Kor. J. Pharmacogn.*, **21**, 153(1990)
12. Choi, J. S., Young, H. S. and Kim, B. W. : Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Ixeris dentata* in

- diabetes rats. *Arch. Pharm. Res.*, **13**, 269 (1991)
13. 박수선 : 고들빼기 성분 및 생물학적 활성에 관한 연구(1). *한국생화학회지*, **10**, 241 (1977)
 14. 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" Norphth, K. H. and Garmer, R. C. (eds.), Springer, Berling, p.273 (1980)
 15. Yamanaka, H., Nagao, M., Sugimura, T., Fuuya, T., Shirai, A. and Matsushima, T. : Mutagenicity of purrolizidine alkaloids in the *Salmonella*/mammalian microsome test. *Mutat. Res.*, **68**, 211 (1979)
 16. Maron, D. M. and Ames, B. N. : Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983)
 17. Quillardet, P. and Hofnung, M. : The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins : Procedures. *Mutat. Res.*, **147**, 65 (1985)
 18. Miller, J. : Experiments in molecular genetics, cold spring harbor laboratory. Cold Spring Harbor, New York (1972)
 19. SAS : SAS USER' guide ; Statistics. Ver. 6.03 Ed. SAS Institute Inc. Cary (1988)
 20. 함승시 : 산채류 가열즙의 돌연변이 억제 작용에 관한 연구. *한국농화학회지*, **31**, 38 (1988)
 21. 이재훈 : 산채류 생즙의 항돌연변이원성에 관한 연구. 강원대학교 석사학위논문 (1989)
 22. Neal, G. E. : The effect of aflatoxin B₁ on normal and control-stimulated rat liver ribonucleic acid synthesis. *Biochem. J.*, **130**, 619 (1972)
 23. Tatematsu, M., Takahashi, M., Fukushima, S., Hananouchi, M. and Shirai, T. : Effects in rats of sodium chloride on experimental gastric cancers induced by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine or 4-nitroquinoline-1-oxide. *J. Natl. Cancer Inst.*, **55**, 101 (1975)
 24. Inoue, T., Morita, K. and Kada, T. : Purification and properties of a plant desmutagenic factor for the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 345 (1981)
 25. Shimoi, K. and Tomita, I. : Mutagens and antimutagens in the living environment. *Eisei Kagaku*, **37**, 149 (1991)
 26. Calle, L. M. and Sullivan, P. D. : Screening of antioxidants and other compounds for antimutagenic properties towards benzo(a)pyrene-induced mutagenicity in strain of *Salmonella Typhimurium*. *Mutat. Res.*, **101**, 99 (1982)
 27. Olson, J. A. : Biological actions of carotenoids. *J. Nutr.*, **119**, 94 (1989)
 28. 농촌진흥청 농촌영양개선연수원 : 식품성분표. p.66 (1991)
 29. Singer, B. and Grunberger, D. : Molecular biology of mutagens and carcinogen. Plenum Press, New York, p.1 (1983)
 30. 박건영, 김소회, 서명자, 정혜영 : 마늘의 돌연변이 유발 억제 및 HT-29 결장암세포의 성장 저해 효과. *한국식품과학회지*, **23**, 370 (1991)
 31. Joosens, J. V. and Kesteloot, H. : Salt and stomach cancer. In "Gastric carcinogenesis" Reed, P. I. and Hill, M. J. (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, p.105 (1988)
 32. Fischer, S. M., Leyton, J., Lee, M. L., Locniskar, M., Belury, M. A. and Maldve, R. E. : Differential effects of dietary linoleic acid on mouse skin-tumor promotion and mammary carcinogenesis. *Cancer Res. (suppl.)*, **52**, 2049 (1992)
 33. Morton, D. L., Holmes, E. C., Eilber, F. R. and Wood, W. C. : Immunological aspects of neoplasia. A rational basis for immunotherapy. *Ann. Internal Med.*, **74**, 587 (1971)
 34. Marc, S. M. and Tangrea, J. A. : General introduction : Rationale for the nutritional prevention of cancer. In "Nutrition and cancer prevention" Moon, T. E. and Micozzi, M. S. (eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, p.5 (1989)

(1995년 2월 13일 접수)