

아플라톡신에 대한 익모초의 돌연변이 억제 효과

안병용 · 이갑상 · 맹일경* · 송근섭** · 최동성***

원광대학교 생명자원과학대학, * 전북대학교 식품공학과, **이리농공전문대학 식품공업과,

***우석대학교 생물식품 및 환경화학공학부

Desmutagenic Effect of *Leonurus sibiricus* L. to Aflatoxin B₁ in *Salmonella* Mutation Assay

Byung-Yong An, Gap-Sang Lee, Il-Keyong Maeng*,

Keun-Seob Song**, Dong-Seong Choi***

Division of Life Science and Natural Resource, Wonkwang University, Iksan 570-749

* Dept. of Food Science and Technology, Iri National Junior College, Iksan 570-110

** Dept. of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Chonju 561-756

*** Division of Food, Enviromental and Chemical Engineering and Biotechnology,

Woosuk University, Chonju 565-701

Abstract

By the SOS chromotest which utilized *Escherichia coli* PQ 37, Korean medicinal plants had been screened to investigate the antimutagenic effect to aflatoxin B₁(AFB₁). Ikmocho(IMC, *Leonurus sibiricus* L.) was extracted with hot water. The extract was not found to be mutagenic in the *Salmonella* mutation test with or without metabolic activation, and the extract was showed to possess the antimutagenic properties towards AFB₁-induced mutation. The mutagenicity of AFB₁ was inhibited by methanol soluble fraction(IMC-MS) in dose-dependent. However, water-soluble fraction exhibited comutagenic activity. The greatest inhibitory effect of IMC-MS on AFB₁ mutagenicity occurred when IMC-MS was first incubated, AFB₁ followed by a second incubation with the cells and S9 mixture. Also lower inhibition was occurred when S9 mixtures were first incubated, with IMC-MS followed by a second incubation with AFB₁. The results of the sequential incubation study support the probability that one mechanism of inhibition could involve the formation of chemical complex between IMC-MS and AFB₁ rather than deactivation of S9 enzyme.

Key words : aflatoxin B₁, sequential incubation, desmutagen, *Leonurus sibiricus* L.

서 론

식품에 함유된 극소수 돌연변이원성 전구물질과 환경에 오염되어 있는 발암물질은 암을 일으키는 주요 원인이다. 암발생의 환경적 요인은 발암물질에 대한 노출, 항돌연변이 및 항암물질의 섭취 부족 등이 있다.¹⁾ 최근 Kada 등은 식품을 비롯한 각종 천연물 중에 변이원의 활성을 억제하거나 검감시키는 돌연변이 억제물질이 존재하는 것을 발견하였다. 그리고²⁾, 암과 유전 질병의 발생, 조절 및 예방 효과가 있는 기능성 성분을 확인하려는 연구가 오랫동안 이루어지고 있고³⁾, 비타민 A, C, β

carotene과 페놀 성분이 함유된 식물성 식품의 소비가 암발병 감소와 관련이 있는 것으로 보고되었다^{4,5)}. 아플라톡신 B₁은 간암을 유발하는 강한 발암원으로 노출될 경우 간암 발병율이 매우 높아진다⁶⁾. 기능성 식품의 소재인 생약제는 발암물질 노출로 인한 암발생의 예방과 치료제로서 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 생각된다.

익모초(*Leonurus sibiricus* L.)에는 알카로이드인 leonurinin과 stachydrine, 지방산인 linolenic acid와 oleic acid, 플라보 배당체인 rutin 성분이 알려져 있으며, 민간에서는 산후 부인병과 혈액순환, 간 질환을 치료하는데 사용하고 있다⁷⁾. 그러나 항돌연변이원성 및

항암성에 대한 효능에 관해서는 보고된 바 없다. 저자들은 아플라톡신 B₁의 돌연변이성에 대한 95종의 생약재의 억제 효과를 SOS chromotest로 검색하여 그중 돌연변이 억제 효과가 우수한 익모초를 찾아냈다. 본 논문은 장류가공 및 식품저장중 빈번하게 생성되는 아플라톡신 B₁⁹⁾을 불활성화시킬 수 있는 식품 첨가물을 개발할 목적으로 익모초에서 추출한 메탄올 가용성 부분에 대한 아플라톡신 억제 효과와 메커니즘을 규명하고자 실험한 결과이다.

재료 및 방법

1. 균 주

Salmonella typhimurium TA 98(hisD 3052, rfa, ΔuvrB, pKM 101) 균주는 California(USA)대학의 Dr. B.N. Ames로부터 제공받아 Maron과 Ames의 방법⁹⁾에 따라 히스티딘 요구성, uvr 돌연변이와 R-factor에 대한 유전형질을 확인하였다.

2. 시 약

아플라톡신 B₁(AFB₁), nicotinic adenine dinucleotide(NADP), β-naphthoflavone은 Sigma (St. Louis MO, U.S.A) 제품을 사용하였다.

3. 쥐 간 마이크로솜 제조

Ong 등¹⁰⁾의 방법에 따라 β-naphthoflavone을 옥수수기름에 용해시켜 Sprague Dawley rat (200g)에 체중 kg당 80mg을 주사하여 2일간 사육한 다음, 무균적으로 적출한 간으로부터 S9를 조제하였다. S9를 보조효소 혼합액(salt 용액: 0.2ml, 1M glucose-6-phosphate; 0.05ml, 0.1M NADP용액: 0.4ml, 0.2M phosphate 완충용액; 5ml, 멸균수; 3.35ml)에 10% 첨가하여 S9-보조효소 혼합액을 조제하였다.

4. 시료의 추출 및 분별

80mesh로 분쇄한 익모초 10g과 증류수 100ml를 혼합하여 열탕 환류추출(100℃, 2hr)하여 원심분리(6,000×g, 25min)한 상정액을 여과(Whatman No. 2)하였다. 같은 추출 과정을 2회 반복하여 각 상정액을 모아 냉장고(4℃)에 하룻밤 정치 후 동일조건에서 원심여과하였다. 이를 동결 건조한 건조물을 물추출물로 사용하였다. 물추출한 건조 분말 5g에 메탄올 500ml을 가하여 37℃에서 12시간 방치한 후 6,000×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 여과액을 메탄올 가용성 부분으로 하였다. 침전물에 증류수를 첨가하여 회전 감압 농축기

로 메탄올을 제거시킨 후 같은 방법으로 건조시켜 물 수용성 부분으로 하였다. 각 시료는 -20℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

5. 돌연변이 억제 효과 실험

S. typhimurium TA 98을 이용하여 Maron과 Ames의 preincubation법⁹⁾에 따랐다. 시험관에 아플라톡신 B₁[2μg/μl(DMSO)] 50μl, S9-보조효소 혼합액 0.5ml, 하룻밤 배양한 균액[1~2×10⁸cells/ml; colorimeter(mansostat, U.S.A) ADS≈65] 0.1ml, 증류수에 용해한 시료 50μl를 가하여 혼합한 다음 진탕배양(37℃, 210rpm, 20min)하였다. 여기에 45℃ dry block bath에 보관 중인 top agar(histidine과 biotin을 각각 0.5mM 함유한 용액을 10% 함유) 2ml를 가하여 minimal glucose agar plate에 도말한 다음 37℃에서 48시간 배양하였다. 배양 후 콜로니 수를 계측하여 다음 식에 따라 항돌연변이원성을 산출하였다.

$$\text{Percent inhibition}(\%) = (M - S_1 / M - S_0) \times 100$$

M ; 돌연변이 물질만 존재한 경우의 복귀 돌연변이 수
S₀ ; 자연복귀 돌연변이 수
S₁ ; 시료를 첨가하였을 경우의 복귀 돌연변이 수

시료 농도는 1 plate 당 0.5, 1, 2, 4mg 농도로 조제하였으며, 메커니즘에 관한 실험 농도는 저해율이 41% 농도인 4mg을 사용하였다.

결 과

1. 돌연변이원의 용량 반응

플레이트 당 아플라톡신 B₁의 50, 100, 250, 500, 1,000ng 농도에 대한 *S. typhimurium* TA 98의 복귀돌연변이 수의 결과는 Fig. 1과 같다.

이 결과에서 균수는 플레이트 당 50ng 농도에서 900개의 복귀 돌연변이수를 나타낸 Vinitketkumnie 등¹¹⁾의 결과보다 약간 낮으며, 900개의 돌연변이수 결과를 참조하여 최적농도를 100ng으로 결정하였다. 복귀 돌연변이수는 평균 830개였다.

2. 물 추출물의 돌연변이 억제효과

아플라톡신 B₁에 대한 익모초의 돌연변이 억제 효과는 추출별 시료의 첨가량을 달리하여 조사하였다(Table 1).

물 추출물과 메탄올 수용부분에서는 돌연변이원성 억

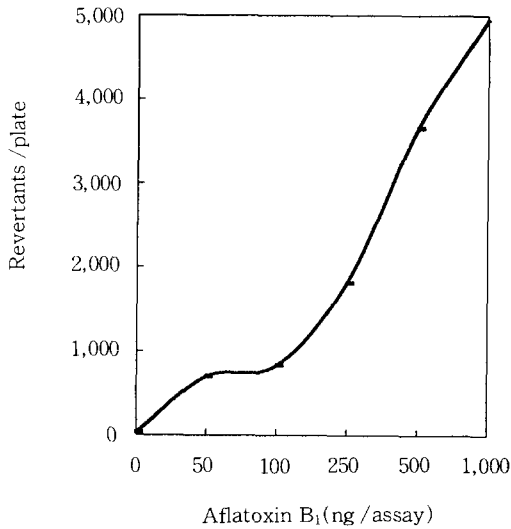


Fig. 1. Dose response curve of aflatoxin B₁ mutagenicity in TA 98.

제효과를 나타냈다. 시료농도가 증가할수록 돌연변이 억제 효과도 증가하여 고농도에서 강한 억제 효과를 나타내었다. 그러나 물 수용부분에서는 모든 농도에서 돌연변이 상승효과가 나타났었다. 부분별로는 메탄올 가용성 부분 > 불추출물 순으로 나타났고, 메탄올 가용성 부분 4mg / assay 첨가구에서 항돌연변이성이 가장 높아 41% 가량의 억제 효과를 나타내었다.

3. 반응조건에 따른 메탄올 가용성 부분의 돌연변이성 억제 작용

아플라톡신 B₁에 의해 유발된 돌연변이의 억제 메카니즘은 41%의 돌연변이 억제 효과를 나타낸 4mg / 플레이트 농도의 시료와 S9 혼합액, 아플라톡신 B₁의 첨가 순서를 달리하여 조사하였다(Table 2).

S9 혼합액과 dimethyl sulfoxide(DMSO)용액을 1차 배양한 다음, TA98 균체를 첨가하여 2차 배양한 경우의 자연돌연변이수(실험구 1)와 S9 혼합액 + DMSO 혼합액을 1차 배양한 후 2차 배양시 TA 98 균체와 아플라톡신 B₁를 첨가하였을 경우의 복구 돌연변이수(실험구 2)는 Fig. 1의 결과와 일치하지 않았으나, 반응 조건을 달리하였을 때의 조건변화의 영향보다는 S9의 영향으로 확인되었다. 실험구 3에서 1차 배양시 S9 혼합액과 시료를 첨가한 다음, 2차배양시 아플라톡신 B₁ 및 TA98 균체를 첨가한 반응구는 42%의 돌연변이 억제 효과를 나타낸 반면, 변이원+S9 혼합액+시료를 동시에 첨가한 반응구(실험구 5)는 45%의 억제효과를 나타내었다. 반면 아플라톡신 B₁과 시료를 첨가한 다음 2차 배양시 TA 98균체를 첨가한 반응구(실험구 7)는 50%의 돌연변이 억제효과를 나타냈다.

고 찰

아플라톡신 B₁은 *Aspergillus flavus*와 *A. parasiticus*가 생산하는 간장독으로 13종의 동족체가 알려져 있

Table 1. Antimutagenic effects of water-soluble, methanol-soluble fraction and crude water extract of *Leonurus sibiricus* L. on the mutagenicity of aflatoxin B₁ to *Salmonella typhimurium* TA 98 in the presence of S9 mixture

Partions	Dose(mg / plate)	Net revertant ^a	Percent inhibition
Water-extract	Spontaneous control(100ng / assay)	23 ± 830 ± 16	
	0.5	718 ± 12	13.87
	1	660 ± 9	21.06
	2	625 ± 8	25.40
	4	566 ± 7	32.71
Methanol-soluble	0.5	637 ± 10	23.25
	1	657 ± 6	21.43
	2	560 ± 4	33.45
	4	496 ± 4	41.38
Water-soluble	0.5	942 ± 53	-13.87
	1	1,154 ± 80	-40.14
	2	1,116 ± 77	-35.43
	4	1,095 ± 19	-31.92

a : Represent mean ± S.D of double independent experiment, Percent inhibition(%) = $(M - S_1 / M - S_0) \times 100$, M : Revertants of control plates(only mutagen), S₀ : Spontaneous revertants, S₁ : Revertants of test plates(mutagen+sample), - : Comutagenic effect

Table 2. Inhibition of aflatoxin B₁(100ng/50 μ g) mutagenicity in TA 98 under various test conditions with methanol-soluble fraction of *Leonurus sibiricus* L. with 4mg per assay

Test serious	First incubation ^a	Second incubation ^b	Percent inhibition(%)
1	S9 + DMSO + D.W	TA 98	spotaneous
2	S9 + D.W	TA 98 + AFB ₁	control
3	S9 + Sample	TA 98 + AFB ₁	42
4	Distilled water(D.W)	TA 98 + AFB ₁ + S9	control
5	0	TA 98 + AFB ₁ + S9 + Sample	45
6	AFB ₁ + D.W	TA 98 + S9	control
7	AFB ₁ + Sample	TA 98 + S9	50

a. First : DMSO, AFB₁, Sample, and S9 mixtures were incubated at 37°C for 15 min, b. Second incubation : S9, AFB₁, and Sample were incubated at 37°C with TA 98 for 20 min, Percent inhibition(%) = $(M - S_1 / M - S_0) \times 100$, M : Revertants of control plates(mutagen), S₀ : Spontaneous revertants, S₁ : Revertants of test plates(mutagen+sample)

며¹²⁾, cytochrome P-450에 의존하는 혼합기능 산화효소⁶⁾, 플라빈 효소인 monooxygenase¹³⁾와 prostaglandin H synthase¹⁴⁾에 의해 활성을 나타내는 간접변이원이다. 인체 간 조직의 미크로솜에서 대사될 때 형성되는 AFB₁-exo-8,9-epoxide가 DNA의 구아닌 염기를 공격하여 8,9-dihydro-8-(n'-guanyl)-9-hydroxy-AFB₁을 형성하면 돌연변이원성 및 발암성을 나타내는 것으로 알려져 있다¹⁵⁾. 한국인이 하루에 노출되는 아플라톡신 B₁ 예상량은 1.86 \pm 0.46ng/kg/day로, 규정 허용량 10ppb 이하보다 적기 때문에 간암 발병의 주요 원인이 아니라고 보고된 바 있다¹⁶⁾. 그러나 1996년 7월 식품의약품 안전본부는 일부 식품회사의 장류제품에서 22.9ppb의 아플라톡신 B₁을 검출하였고, 11개 식품 393개 제품의 3.3%인 13개 제품에 발암물질이 들어 있다고 하였다⁸⁾. 그러나 식품을 통한 발암물질 오염원의 근본적 차단은 불가능하기 때문에 위험도를 낮추기 위한 장류제조시 아플라톡신 B₁의 돌연변이원성을 억제하는 익모초를 첨가하는 것도 좋을 것으로 보인다.

돌연변이원성 억제효과는 메탄올 가용성 부분, 물 추출물 순으로 나타났고, 시료농도가 증가할수록 돌연변이원성의 억제 및 상승 효과가 뚜렷하였다. 익모초 물추출물의 물 수용성 부분에서 아플라톡신 B₁의 돌연변이 유발상승효과가 나타난 것은 유발물질성분이 혼재되어 있음을 나타낸다. 물추출물의 돌연변이 유발물질 억제 작용은 김 등¹⁷⁾의 쑥 추출물 성분이 돌연변이원성의 상승 및 억제효과를 나타낸 결과와 유사하다. 간접변이원의 경우 S9의 효소활성을 저해하면, 대사활성화를 필요로 하는 변이원의 활성이 감소하는 듯 보여지나, 변이원은 그대로 있을 가능성이 있기 때문에 억제효과에 대한 해석은 주의가 필요하다¹⁸⁾. 따라서 간접변이원에 대한 돌연변이 억제효과가 나타나면, 1차적으로 S9의 효소활성이 저해를 받는지 유무를 확인하여 효소에 관한 영향이 아닌 것으로 확인되면, 대사활성화를 받아 생성된

변이원의 활성체를 실험시키는지 promutagen 자체의 활성화를 억제하는지 살펴 보아야 한다.

아플라톡신 B₁을 시료와 반응시킨 다음 S9 혼합액으로 활성화시킨 반응구에서는 돌연변이원성 억제효과가 가장 우수하였다(Table 2의 실험구 7). 이 결과는 익모초의 항돌연변이원성 작용 메커니즘은 메탄올 가용성 부분이 아플라톡신 B₁과 직접적으로 화학적 복합물을 형성하여 promutagen의 활성화를 차단시키는 desmutagen으로 작용하는 것을 시사하고 있다. 1차 배양시 S9 혼합액과 시료를 혼합한 반응구에서는 억제효과가 뚜렷하게 상승하지는 않았으나, S9 효소의 영향을 확인하기 위해서는 monooxygenase 측정이 필요하다. 익모초에는 linoleic acid와 oleic acid가 다량 함유되어 있다. 종자유에는 oleic acid 64%, linoleic acid 21%가 고농도로 함유되어 있어⁷⁾, 유익한 돌연변이 억제물질로 작용할 것으로 보인다. *S. typhimurium*을 이용한 Ames test로 두 불포화지방산의 항돌연변이 효과가 보고된 바 있으며^{19,20)}, Ha 등²¹⁾은 햄버거에서 linoleic acid와 결합된 dienoid 유도체의 항암 효과를 보고한 바 있다. 익모초에 의한 돌연변이의 억제 메커니즘을 상세히 밝히기 위해서는 유효 활성물질의 분리 동정에 관한 연구가 더 수행되어야 하고, 분리 동정된 물질과 *E. coli* strains, *S. typhimurium* strains의 돌연변이 주들을 사용하여 작용 메커니즘을 더 연구해야 할 것으로 생각된다. 저자들은 현재 이에 관한 연구를 진행하고 있다.

요 약

Escherichia coli PQ 37 균주를 이용한 SOS Chromotest계에서 아플라톡신 B₁의 돌연변이원성에 대한 생약재의 항돌연변이원성을 검색하였다. 익모초의 열탕 추출물은 *Salmonella typhimurium* TA 98 균주를 이용

한 Ames 시험계에서 S9 혼합액의 첨가와 비첨가시 돌연변이원성을 나타내지 않았다. 그리고 익모초의 추출물은 아플라톡신 B₁으로 유도된 돌연변이원성에 대하여 항돌연변원성을 나타냈으나 익모초의 물추출물의 메탄올 수용부분(IMC-MS)은 아플라톡신 B₁으로 유도된 돌연변이원성에 대하여 용량반응의 항돌연변이 효과를 나타냈고, 물 수용분획에서는 comutagenic 효과를 나타내었다. IMC-MS와 아플라톡신 B₁을 혼합하여 일차 배양한 경우 아플라톡신 B₁으로 유도된 돌연변이원성에 대하여 가장 강한 억제 효과를 나타내었다. 또한 1차배양시 IMC-MS와 S9 혼합액을 첨가한 후 아플라톡신 B₁을 첨가하였을 때는 낮은 저해효과를 나타내었다. 일련의 배양 결과는 S9 효소의 불활성화에 의한 영향보다는 IMC-MS와 아플라톡신 B₁의 화학적 복합물을 형성하여 나타나는 저해 메카니즘일 가능성을 시사하고 있다.

참고문헌

- Hayatsu, H., Arimoto, S. and T. Negishi : Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *J. Mut. Res.*, **202**, 429 (1988).
- Kata, T., Morita, K. and Inoue, T. : Anti-mutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. *Mut. Res.*, **53**, 351 (1981).
- Guadalupe Loarca-Pina and Paul A. Kuzmicky, Elvira Gonzalez de Mejia, Norman Y. Kado, Dennis P. H. Hsieh : Antimutagenicity of ellagic acid against aflatoxin B₁ in the *Salmonella* micro-suspension assay. *Mut. Res.*, **360**, 15 (1996).
- Kuo, M., Lee, K. and Lin, J. : Genotoxicities of nitropyrenes and their modulation by apigenin, tannic acid, and indole-3-carbinol in the *Salmonella* and CHO system. *Mut. Res.*, **270**, 87 (1992).
- Ho, C. Lee, C. Y. and Huang, M. (Eds.) : Phenolic compounds in food and their effects on health I. *Analysis, Occurrence & Chemistry, American Chemical Society*, p.1-7 (1992).
- David L. Eaton and Evan P. Gallagher : Mechanism of aflatoxin carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **34**, 135 (1994).
- 과학·백과사전출판사 편 : 약초의 성분과 이용. 일월서각, p.511 (1994).
- 식품과 위생 : 위기를 치닫는 국민보건. 세광종합인쇄(주), 8월호, 33 (1996).
- Ames, B. N. and Maron, D. M. : Revised methods for the *Salmonella typhimurium* mutagenicity test. *Mut. Res.*, **113**, 173 (1983).
- Ong, T. M., Mukhtar, M., Wolf, C. R. and Zeiger, E. : Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activity of S-9 from rat liver. *J. Envir. Path. Tox.*, **4**, 55 (1980).
- Vinitketkumnue, U., Puatanachokchai, R. Komgtawelert, P., Lertprasertsuke, N. and Matsushima, T. : Antimutagenicity of lemon grass (*Cytopogon citratus* Stapf) to various known mutagens in *Salmonella* mutation assay. *Mut. Res.*, **341**, 71 (1994).
- 이상조, 배상용, 문정기 : 공중보건학. 수학사, p. 195 (1994).
- Daniel M. Ziegler : Recent studies on the structure and function of multisubstrate flavin containing monooxygenases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **33**, 179 (1993).
- Eling, T. E., Thompson, D. C., Foureman, G. L., Curtis, J. F. and Hughes, M. F. : Prostaglandin H synthase and xenobiotic oxidation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **30** 1-4 (1990).
- 오현숙 : Cytochrome P450 3A4의 활성기작에 대한 연구. 원광대학교 대학원 박사학위논문 (1995).
- 최문정, 변수현, 김형식, 이병목 : 아플라톡신 B₁ 노출에 의한 발암 위해성 평가. 한국식품위 안전학회지, **10**(2), 81 (1995).
- Kim, J. O., Kim, Y. S., Lee, J. H., Kim, M. N., Rhee, S. H., Moon, S. H. and Park, K. Y. : Antimutagenic effect of the major volatile compounds indentified from mugwort (*Artemisia asiatica* Nakai) leaves. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **21**, 308 (1992).
- 임선영 : Linoleic acid의 항돌연변이 및 항암효과. 부산대학교 대학원, 석사학위논문 (1994).
- 中村良, 川岸舞朗, 渡邊乾二, 大澤俊産 : 食品機能化學. 三共出版, p.113 (1991).
- 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 acid. *Mut. Res.*, **81**, 287 (1981).
- Ha, Y. L., Grimm, N. K. and Pariza, M. W. : Anticarcinogens form fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*, **8**(12), 1881 (1987).

(1996년 9월 4일 접수)