

주요 솔잎 추출물의 돌연변이 억제효과

김은정 · 정성원 · 최근표 · 함승시 · 강하영*
강원대학교 식품생명공학부 · *임업연구원

Inhibitory Effect of Main Pine Needle Extracts on the Chemically Induced Mutagenicity

Eun-jeong Kim, Sung-won Jung, Keun-pyo Choi, Seung-Shi Ham and Ha-young Kang*

Division of food and Biotechnology, Kangwon national university
*Forestry Research Institute

Abstract

Pine has been known as a traditional medicinal plant and as showing a physically beneficial function to a human being. Therefore, this study was performed to investigate the physiological activities of main pine needles. Ethanol extracts from pine needles did not exhibit any mutagenicity. On the contrary, inhibitory effects of ethanol extract were observed on mutagenicity induced by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine(MNNG), 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO), 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido-(4,3-b)indol (Trp-P-1) and benzo(a)pyrene (B(a)P) using *Salmonella typhimurium* reversion assay. On direct-acting mutagen (MNNG, 4NQO) and indirect-acting mutagen (Trp-P-1, B(a)P), we observed higher inhibitory effect. Stepwise fractionation of the ethanol extract was done by using ether, chloroform, ethyl acetate, butanol and water to obtain effective fraction. Among them, water fractions (100 µg/plate) of *Pinus thunbergii*, *Pinus rigida*, *Pinus densiflora* and *Pinus koraiensis* showed high inhibition of 91.65%, 94.7%, 84.22% and 79.02%, respectively, on the mutagenicity of MNNG in *Salmonella typhimurium* TA100.

Key words: pine needles, spore rec-assay, *Salmonella typhimurium* reversion assay, antimutagenicity

서 론

오래전부터 인류는 어떤 물질이 인체에 해로우며, 또 먹어서 안전한 것인가를 습관적으로 짐작해 왔다. 그러나 아주 미약한 독성물질일 경우 계속하여 체내에 축적되어서 일어나는 질병에 대한 위험을 인식하게 된 것은 최근의 일이다. 특히 암발생의 80~90%는 환경인자에 의해 일어나는데⁽¹⁾ 이 환경요인으로 발생하는 암환자 중 30~60%가 식이와 관련된다고 알려져 있다⁽²⁾. 그래서 지금까지 질병에 대한 예방이나 치료에 주로 합성 의약품을 사용하여 왔는데 이들 약재들은 사용량이나 사용 빈도에 따라, 체내에서 부작용이나 독성이 밝혀지고 있다.

따라서 합성의약품의 사용에 따른 부작용이나 독성 부담이 없는 우수한 치료제를 천연물로부터 개발하고

자 하는 노력이 전세계적으로 이루어지고 있는 실정이다.

솔잎의 약용효과에 관한 실험으로는 솔잎의 임상학적 연구의 일환으로 솔잎첨가 식이가 정상 흰쥐의 지질대사에 미치는 영향에 관한 보고⁽³⁾를 시작으로 솔잎 중의 항산화성 물질의 존재와 항산화 활성에 대한 보고⁽⁴⁾가 있었으며 부 등⁽⁵⁾은 솔잎으로부터 free radical 소거작용이 뛰어난 항산화 성분을 분리한 바 있다. 특히 잣나무(*Pinus koraiensis* S. et Z)의 기능 특성 연구의 일환으로 열수와 70% acetone으로 제조한 추출물들의 특성을 조사한 연구⁽⁶⁾가 있으며 솔잎을 추출용매와 농도별로 섭취시킨 흰쥐의 혈청과 간장 지질 성분에 미치는 영향에 대한 연구 보고⁽⁷⁾ 뿐만 아니라 솔잎 열수 추출물과 아세톤 추출물이 고지방 식이를 섭취한 흰쥐의 혈청 중 GOT, GPT 활성, 간장의 항산화관련 효소 활성도 및 간장 조직에 미치는 영향에 대한 보고⁽⁸⁾가 있었다. 또한 솔잎(*Pinus strobus*)의 메탄올 추출물이 닭에서 유의하게 혈청 콜레스테롤 농도를 낮추었다는

Corresponding author: Seung-Shi Ham, Division of food and Biotechnology, Kangwon National University, Hyoja 2-dong, Chunchon, Kangwon-do 200-701, Korea

연구⁽⁹⁾와 이것을 건강식품의 소재로서 그 응용가능성을 평가한 연구⁽¹⁰⁾들이 진행 되었을 뿐이다. 따라서 솔잎을 이용한 *in vitro* 실험, 사람암세포에 미치는 영향에 대한 자료는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 항암효과 검색을 위한 기본 단계로서 4종의 솔잎 에탄올 추출물과 이를 다시 극성이 다른 용매들로 분획하여 얻은 분획물들이 암의 initiation 단계를 유도할 수 있는 돌연변이에 미치는 영향을 검색하기 위해 *Bacillus subtilis* spore rec-assay를 이용한 시료의 돌연변이성 검색과 종래의 Ames test를 개량한 preincubation방법을 통해 각종 솔잎 추출물들의 항돌연변이성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 추출 및 분획

실험에 사용된 적송(*Pinus densiflora*), 잣나무(*Pinus koraiensis*), 리기다(*Pinus rigida*), 곰솔(*Pinus thunbergii*) 잎을 강원대 구내림과 학술림 및 동해수련원에서 1996년 9월에 채취하여 깨끗한 물로 씻은 후 실험실에서 풍건하여 Willey mill로 분쇄하여 시료중량의 10배 에탄올을 첨가하고 5시간씩 3회 열탕추출하고 그 추출액을 감압농축한 후 동결건조 시켰다. 돌연변이 억제활성 성분들을 분리하기 위하여 에탄올 추출물은 다시 극성이 다른 용매들로 더욱 분획하였다. 즉, 에테르, 에탄올과 물을 각각 10:1:9의 비율로 혼합하여 분획여두에서 분획하는 과정을 3회 반복한 후 감압농축하여 에테르 분획물을 얻었다. 또한 그 잔여물을 분획여두에 넣어 다시 클로로포름, 에틸아세테이트,

부탄올로 각각 3회씩 반복하고, 마지막 남은 잔여물은 수층 분획물로 얻었다(Fig. 1).

Mutagen

4-nitroquinoline-1-oxide(4NQO)와 *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG)은 미국 Sigma회사로부터 구입하였고 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 실험에 사용하였다.

3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido-(4,3-b)indol(Trp-P-1) 및 benzo(a)pyrene(B(a)P)은 일본 和光純藥 특급 시약을 구입하여 사용하였고 이는 DMSO에 녹여서 실험에 사용하였다.

Spore rec-assay

Kada^(11,12)의 방법에 따라 *B. subtilis* H17(R_{ec}⁺)와 M45(R_{ec}⁻)의 포자를 조제하였으며, 1,000 mL의 nutrient broth 한천배지를 조제하여 45°C로 식힌 후 H17 및 M45 포자 현탁액을 두 본의 배지에 각각 배지 10 mL 당 포자현탁액 1 mL의 비율로 혼합한 후 포자 한천배지를 petridish에 10 mL씩 각각 분주하여 평판으로 굳힌 다음 이것을 돌연변이원성 실험에 사용하였다.

네가지 시료의 변이원성 유무를 조사하기 위해서 시료의 농도를 10, 20, 40, 80 µg/disc씩 H17 및 M45 포자한천 plate상의 네 개의 paper disc (직경 8 mm, 두께 1.2 mm)에 순서대로 주입하였으며 37°C에서 16시간 배양하여 paper disc 주위에 생성된 생육저지대의 직경을 측정하여 변이원성 유무를 조사하였다. 비교 control로 양성 변이원 물질인 MNNG (10 µg/ disc)를 사용하였다.

Mutagenicity test

솔잎 추출물 및 그 분획물의 돌연변이원성 실험은 *Salmonella typhimurium*의 변이주인 TA98과 TA100을 이용하여 Ames test를 개량한 preincubation법⁽¹³⁾으로 실시하였다.

솔잎 추출물을 건열 멸균된 glass cap tube에 시료 50 µL씩 가하고 여기에 전배양시킨 균액 100 µL을 가한 다음 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)로 최종부피가 700 µL가 되도록 하였다. 이것을 37°C에서 20분간 진탕배양한 다음 histidine/biotin이 첨가된 top agar (45°C)를 2 mL씩 가하여 잘 혼합한 후에 미리 조제된 minimal glucose agar plate상에 도말한 다음 37°C에서 48시간 배양하여, 이 때 생성된 복귀돌연변이(His⁺ revertant colony)수를 계수하여 돌연변이원성의 유무를 판정하였다.

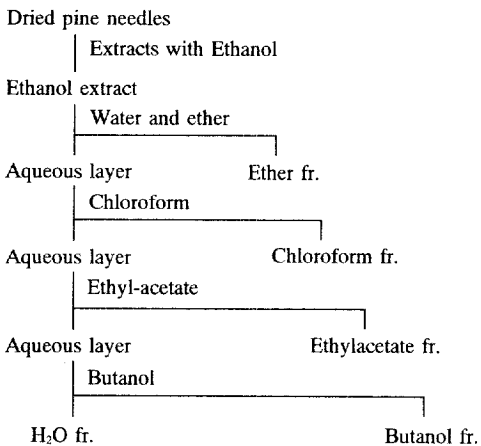


Fig. 1. Scheme for fraction of ethanol extracts from pine needles.

Antimutagenicity test

항돌연변이원성 실험에 사용된 발암물질은 4NQO, MNNG, Trp-P-1 및 B(a)P를 사용하였다. 건열멸균시킨 glass cap tube에 시료의 추출물을 각각 50 µL씩 첨가하고 이어서 변이원 물질을 각각 50 µL 첨가하였다. 간접변이원인 경우 10% S-9 mix를 250 µL씩 첨가하였다. 여기에 전배양시킨 균액을 100 µL씩 주입한 후에 0.2 M sodium phosphate buffer를 가하여 최종 부피가 700 µL가 되도록 하였다. 이것을 37°C에서 20분간 진탕배양 한 다음 상기의 돌연변이원성 실험과 같은 방법으로 실험하여 생성된 복귀돌연변이수를 측정하여 항돌연변이원성 유무를 판정하였다. 소나무류잎과 변이원물질의 농도는 예비실험을 통하여 결정하였으며 항돌연변이활성은 변이원물질의 활성화에 대한 시료의 억제율(inhibition, %)로 나타내었다.

결과 및 고찰

Spore rec-assay

시료들의 돌연변이 유발억제효과를 검토하기에 앞서 spore rec-assay를 이용한 시료자체의 변이원성 유무를 검색한 결과 Table 1과 같은 결과를 보였다. 4종류 시료 모두 농도 증가에 따라 생육저지대(inhibition zone)의 차가 2 mm이하로서 돌연변이원성이 없는 것으로 나타났고 비교 control로 양성 변이원 물질인 MNNG (10 µg/disc) 처리시 inhibition zone의 차가 14 mm 생김으로서 DNA손상에 영향을 미친 것으로 나타났다.

Antimutagenicity test

Salmonella typhimurium TA98과 TA100을 이용한 Ames test를 행한 결과 Table 2에 나타낸 바와 같이 음성대조군의 복귀 돌연변이 집락수는 TA98이 15±3, TA100은 123±7이었고, 에탄올 추출물을 첨가하여 시험한 결과 집락수가 음성 대조군에 비하여 농도의존성을 나타내지 않으므로 이 소나무류들의 에탄올

Table 1. The results of mutagenicity test of pine needle ethanol extracts in the spore rec-assay

Sample	Dose (µg/disc)	Inhibition zone (mm)		Difference
		H17 (Rec+)	M45 (Rec-)	
<i>P. thunbergii</i>	10	8	8	0
	20	8	8	0
	40	8	8	0
	80	8	8.7	0.7
<i>P. rigida</i>	10	8	8	0
	20	8	8	0
	40	8	8	0
	80	8	8	0
<i>P. koraiensis</i>	10	8	8	0
	20	8	8	0
	40	8	8	0
	80	8	8.5	0.5
<i>P. densiflora</i>	10	8	8	0
	20	8	8	0
	40	8	8.5	0.5
	80	9	10	1
MNNG ¹⁾	10	10	24	14

¹⁾MNNG: *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine.

추출물은 돌연변이원성 및 독성을 나타내지 않은 것으로 판단되었다.

곰솔, 적송, 잣나무, 리기다오의 에탄올 추출물을 plate당 100, 200, 300, 400 µg의 농도로 첨가하여 돌연변이 억제효과를 조사한 결과는 Fig 2, 3, 4와 같다.

S. typhimurium TA100을 이용하여 직접변이원인 MNNG (0.5 µg/plate)와 4NQO (0.15 µg/plate)로 유도된 변이원성 억제효과를 조사한 결과 적송(400 µg/plate)에서 각각 88.39 %, 96.72 %의 억제효과를 나타내었다.

또 변이원의 활성화를 위해 S9 mix를 필요로 하는 간접변이원인 Trp-P-1 (0.5, 5 µg/plate)과 B(a)P (10 µg/plate)이 나타나는 변이원성에 대한 솔잎 에탄올 추출물의 억제효과를 TA98, TA100에서 시료의 농도별 첨가에 따라 검토해보았다. Fig. 3에서와 같이 Trp-P-1에 대해서는 4가지 시료 모두 TA98과 TA100 균주에 대하여 억제효과가 높았으며 특히 곰솔과 적송은 농도

Table 2. Mutagenicity of Pine needle ethanol extracts in *Salmonella typhimurium* TA100 and TA98

His ⁺ revertants/plate	TA100					TA98				
	Spontaneous					Spontaneous				
	123±7					15±3				
Dose (µg/plate)	50	100	200	400	800	50	100	200	400	800
<i>P. thunbergii</i>	92±9	84±9	69±8	108±5	118±12	11±1	10±3	6±5	8±4	8±3
<i>P. rigida</i>	98±6	76±12	95±5	80±8	114±9	11±2	16±4	16±2	13±1	12±2
<i>P. koraiensis</i>	89±6	64±10	126±2	124±1	102±10	4±2	19±1	19±1	19±1	16±1
<i>P. densiflora</i>	124±2	103±5	124±4	119±5	127±1	13±3	12±1	12±2	7±4	10±2

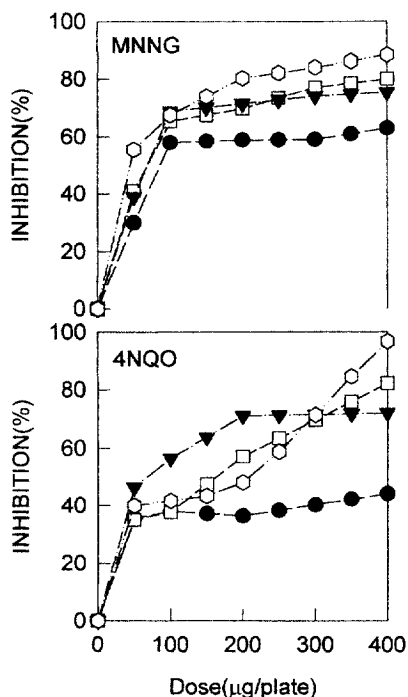


Fig. 2. Antimutagenic effect of ethanol extracts from pine needles against *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG, 0.5 µg/plate) and 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO, 0.15 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100. ●—●: *P. thunbergii*, □—□: *P. rigida*, ▼—▼: *P. koraiensis*, □—□: *P. densiflora*.

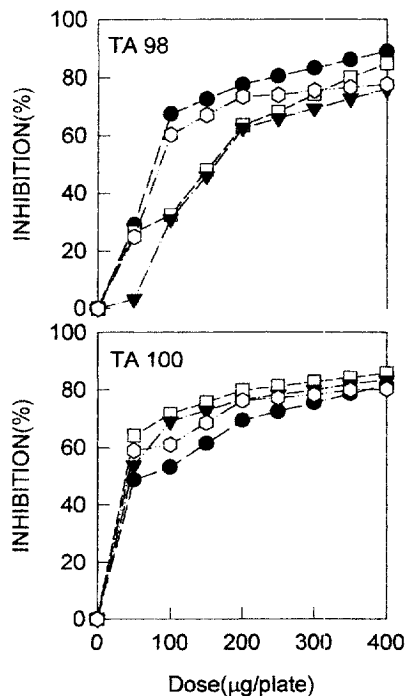


Fig. 3. Antimutagenic effect of ethanol extracts from pine needles against 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido-(4,3-b)indol(Trp-P-1, 0.5 µg/plate, 5 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 with S-9 mix. ●—●: *P. thunbergii*, □—□: *P. rigida*, ▼—▼: *P. koraiensis*, □—□: *P. densiflora*.

변화에 따른 영향에서 frame shift mutagen을 검출하는데 효과적인 TA98에서 그 효과가 더 두드러졌다. B (a)P를 사용하였을 경우에는 Fig. 4에 나타낸 바와 같이 그 효과가 첨가되는 추출물의 농도에 비례하면서 증가하였으며 적송의 에탄올 추출물은 400 µg/plate의 농도를 첨가하였을 때 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100에서 각각 89.33%와 89.74%의 높은 돌연변이 억제효과를 보였다.

변이원에 대한 용매 분획물의 억제특성을 검색하고자 에탄올 추출물을 에테르, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 수층으로 분획하여 MNNG와 Trp-P-1을 사용하여 항돌연변이원성 실험을 행하였으며 100 µg/plate로 처리하였다. Fig. 5에서와 같이 곱술의 경우 에테르 분획물이 직접변이원 보다는 간접변이원의 돌연변이원을 강하게 억제하는 것을 알 수 있었으며 리기다의 경우는 Fig. 6에서와 같이 직접변이원에 대해서 수층 분획물이 94% 그리고 에틸아세테이트 분획물은 90%의 높은 억제율을 보였다. 그리고 잣나무의 경우에는 Fig. 7에 나타낸 바와 같이 에테르 분획물이

간접변이원에 대하여 89%의 높은 억제율을 보였으며 적송의 경우도 Fig. 8에 나타낸 것 처럼 에테르 분획물이 간접변이원에 대하여 65.9%의 억제율을 보였다. 이와같이 대부분의 분획물에서 50% 이상의 높은 억제율을 보였고 억제율이 다섯가지 분획물에서 고루게 나타났으며 직접변이원에 대해서는 수층분획물이 다른 분획물에 비해 높은 억제효과를 보였다.

술잎과 쑥에 대한 기능성 검토에 대한 연구⁽⁶⁾에서는 술잎의 열수 추출물이 항변이원성 효과가 쑥 열수 추출물보다 높은 것으로 나타났다.

돌연변이 생성을 경감시키는 항돌연변이 인자는 그 작용방식에 따라 변이원과 쉽게 반응하여 작용하는 세포의 항돌연변이 물질(desmutagen)과 DNA 수복활성을 촉진시키는 작용을 하는 세포내 물질(bio-antimutagen)로 구분⁽¹⁴⁾된다. 변이원의 억제 작용 기구를 규명하기 위한 예비실험 결과 본 논문에서 보여지지 않았지만 술잎 에탄올 추출물과 변이원을 반응시킨 후 행한 실험결과가 술잎 에탄올 추출물을 균주와 미리 반응시킨후 행한 실험결과에 비해 그 억제효과가 더 크

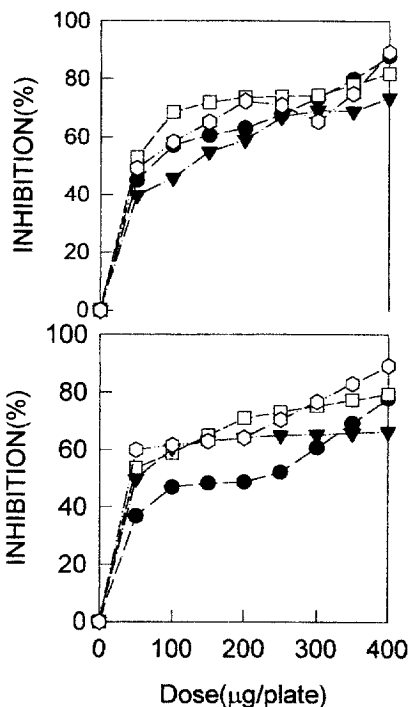


Fig. 4. Antimutagenic effect of ethanol extracts from pine needles against Benzo(a)pyrene(B(a)P, 10 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 with S-9 mix. ●—●: *P. thunbergii*, □—□: *P. rigida*, ▼—▼: *P. koraiensis*, □—□: *P. densiflora*.

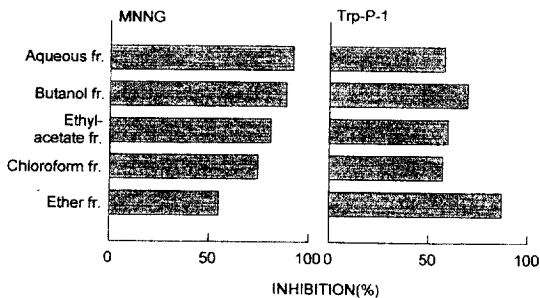


Fig. 5. Antimutagenic effects of each fraction of *pinus thunbergii* (100 µg/plate) on mutagenicity induced by *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG, 0.5 µg/plate) and 3-amino-1, 4-dimethyl-5H-pyrido-(4,3-b)indol (Trp-P-1, 5 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100.

게 나타나 솔잎에 존재하는 활성 물질은 세포외에서 변이원의 작용을 불활성화 시키는 과정에 작용했을 것으로 생각되었다. 따라서 앞으로 솔잎의 활성물질의 분리정제 및 억제 메커니즘에 관한 연구의 수행 및 효과를 체계적으로 밝혀내는 것이 필요할 뿐만 아니라 항암효과 검색시스템으로 사람 암세포주를 이용한

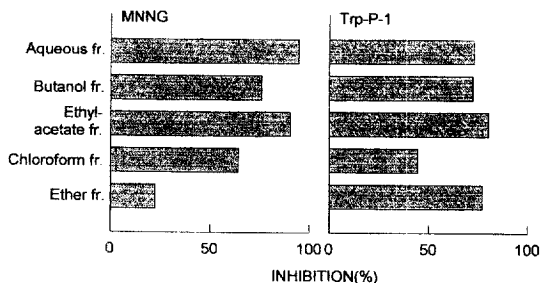


Fig. 6. Antimutagenic effects of each fraction of *pinus rigida* (100 µg/plate) on mutagenicity induced by *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG, 0.5 µg/plate) and 3-amino-1, 4-dimethyl-5H-pyrido-(4,3-b)indol (Trp-P-1, 5 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100.

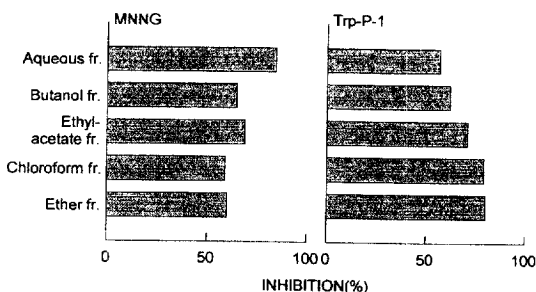


Fig. 7. Antimutagenic effects of each fraction of *pinus koraiensis* (100 µg/plate) on mutagenicity induced by *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG, 0.5 µg/plate) and 3-amino-1, 4-dimethyl-5H-pyrido-(4,3-b)indol(Trp-P-1, 5 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100.

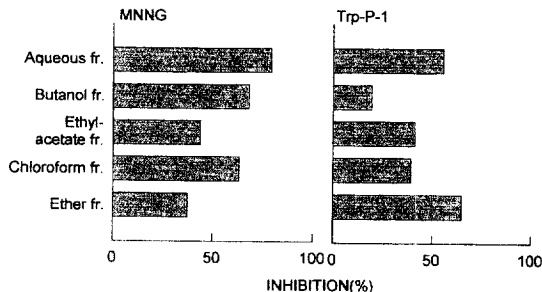


Fig. 8. Antimutagenic effects of each fraction of *pinus densiflora* (100 µg/plate) on mutagenicity induced by *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG, 0.5 µg/plate) and 3-amino-1, 4-dimethyl-5H-pyrido-(4,3-b)indol(Trp-P-1, 5 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100.

세포독성 효과 검색이 필요한 것으로 사료된다.

요 약

한국에 널리 분포하고 있는 곰솔, 리기다, 잣나무,

적송의 에탄올추출물과 각 용매 분획물을 이용하여, *in vitro* assay로서 spore rec-assay와 *Salmonella typhimurium* reversion assay법으로 시료자체 변이원성 유무와 4가지 양성변이원 물질(MNNG, 4NQO, Trp-P-1 및 B(a)p)에 대한 돌연변이 억제효과를 고찰하였다.

곰솔, 리기다, 잣나무, 적송의 에탄올 추출물은 spore rec-assay와 *S. typhimurium*를 이용한 mutagenicity assay에서 변이원성을 나타내지 않았다. 돌연변이 억제 시험에서는 4가지 시료 모두 농도 증가에 따른 억제율을 나타내었고 또 각각의 시료들의 분획물 중 잣나무와 소나무의 에테르 분획물들이 간접변이원인 Trp-P-1의 변이원성에 대하여 다른 분획물에 비하여 높은 억제율을 보여주었다.

감사의 글

이 논문은 1997년도 임업연구원의 임산자원의 신용도 개발 연구비에 의해 연구되었으며 이에 감사를 드립니다.

문헌

- Doll, R. and Peto, R.: The cause of cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, **66**, 1191 (1981)
- Rhew, T.H.: Food, nutrition and cancer (in Korean). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **14**(3), 305-313 (1985)
- Kim, J.D., Yoon, T.H., Choi, N., Im, K.J., Ju, J.S. and Lee, S.Y.: Effect of dietary supplementation with pine leaf on lipid parameters in rats (in Korean). *Kor. J. Gerontol.*, **1**(1), 47-50 (1991)
- Lee, M.S.: Studies on antioxidant substances of pine needles. *M.S. Thesis*, Hanyang Univ., Seoul, Korea (1985)
- Boo, Y.C., Jeon, C.O. and Oh, J.Y.: Isolation of 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanose from pine needles as an antioxidative principle (in Korean). *Agric. Chem. Biotech.*, **37**(4), 310-314 (1994)
- Kang, Y.H., Park, Y.K., Oh, S.R. and Moon, K.D.: Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts (in Korean). *Korean J Food Sci. Technol.*, **27**(6), 978-984 (1995)
- Kang, Y.H., Park, Y.K., Ha, T.Y. and Moon, K.D.: Effects of pine needle extracts on serum and liver lipid contents in rats fed high fat diet. (in Korean) *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **25**(3), 367-373 (1996)
- Kang, Y.H., Park, Y.K., Ha, T.Y. and Moon, K.D.: Effects of pine needle extracts on enzyme activities of serum and liver, and liver morphology in rats fed high fat diet (in Korean). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **25**(3), 374-378 (1996)
- Lee, Y.H., Choi, Y.S. and Lee, S.Y.: The cholesterol-lowering effects of the extracts from *pinus strobus* chickens (in Korean). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **25**(2), 188-192 (1996)
- Lee, Y.H., Shin, Y.M., Cha, S.H., Choi, Y.S. and Lee, S.Y.: Development of the health foods containing the extract from *pinus strobus* leave (in Korean). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **25**(3), 379-383 (1996)
- Kada, T.: Rec-assay with cold incubation with and without metabolic activation *in vitro*. *Mutation Res.*, **38**, 340 (1976)
- Kada, T., Tutikawa, K. and Sadaie, Y.: *In vitro* and host-mediated rec-assay procedures for screening chemical mutagens: and phloxine, a mutagenic red dye detected. *Mutation Res.*, **16**, 165 (1972)
- Maron, D.M. and Ames B.N.: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.*, **113**, 173 (1983)
- Kuroda, Y. and Inoue, T.: Antimutagenesis by factors affecting DNA repair in bacteria. *Mutation Res.*, **202**, 387-391 (1988)

(1997년 10월 20일 접수)