

참취뿌리 에탄올추출물의 항돌연변이성 및 암세포 성장억제효과

황보현주 · 함승시
강원대학교 식품생명공학부

Antimutagenic and Cytotoxic Effects of *Aster scaber* Root Ethanol Extract

Hyun-Su Hwnng Bo and Seung-Shi Ham
Division of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University

Abstract

This study was performed to determine the antimutagenic and cytotoxic effect of *Aster scaber* root ethanol extract on *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 and cancer cell lines using Ames test and cytotoxicity assay, respectively. Cancer cell lines include chronic myelogenous leukemia(K562), human gastric carcinoma(KATOIII), human hepatocellular carcinoma(Hep3B) and human breast adenocarcinoma(MCF-7). Futher fractionations with hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol and water from ethanol extract of *Aster scaber* root were performed to obtain effective fraction. Ethanol extract and ethyl acetate fraction showed 79% and 82% inhibitory effect on the mutagenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG) against TA100, while 48% and 60% inhibition was observed on the mutagenesis induced by 4-nitroquinoline-1-oxide(4NQO) against TA98. In the meanwhile, ethyl acetate fraction showed 78% and 85% inhibitory effect on the mutagenesis induced by benzo(α)pyrene[B(α)P] against TA98 and TA100, respectively, while 83% inhibition was observed on the mutagenesis induced by 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido(4,3-b) indole(Trp-P-1) against TA98. Ethyl acetate fraction (0.125 mg/mL) showed the strongest cytotoxic effect against K562, KATOIII, Hep3B and MCF-7 at the same concentration compared to those of other fractions. Ethanol extract and water fraction showed the least inhibitory effect.

Key words: *Aster scaber* root, antimutagenic effect, cytotoxic effect

서 론

일상생활에서 섭취하고 있는 각종 식품으로부터 생체내에 어떠한 유해성과 부작용이 적을 것으로 생각되는 약리성분을 찾으려는 노력이 계속되고 있다. 또한 일반 채소류를 포함하여 식용 및 약용으로 쓰이는 야생 식물자원들로부터 약리성분을 찾으려는 연구가 활발해지고 있는 추세이다. 이러한 연구는 자국민의 성인병 유발 경향을 중심으로 이루어지는데 우리나라의 경우 악성 신생물인 암에 의한 사망빈도가 가장 높아서 이러한 연구가 시급하다.

참취(*Aster scaber* T_{HUNB})는 국화과에 속하는 다년초로 전국 산야에 자생하며 백운초, 백산국, 동풍, 나물채 및

암취등의 별명이 있으며, 한방에서는 동풍채라고 한다. 어린순은 나물이나 쌈으로 이용하고 성숙한 참취는 두통, 현기증, 해소, 이뇨 및 방광염에 사용하여 왔다. 또한, 비타민 A 함량이 3,504 IU로 비교적 많이 함유되어 있고^(1,2) 총 아미노산이 665.7 mg% 함유되어 있으며 음지에서 자연 건조시킨 참취의 판능검사 결과 전체적인 기호도에서 참취가 가장 우수한 것으로 나타났다⁽³⁾. 또한, 참취는 색소 선호도와 chlorophyll의 열안정성 실험 결과 썩과 취나물의 한 종류인 곰취보다 훨씬 높아서 식품의 천연 착색료로도 주목받고 있다. 최근 식물체의 전초나 잎 또는 뿌리로부터 천연 항돌연변이 물질들을 찾으려는 시도가 계속되고 있으며, 실제로 야채류, 과실류, 해조류로부터 이들이 발견되고 있다⁽⁴⁾. 일련의 논문에서 *Aster tataricus*로부터 oleanane-type의 triterpene saponin분리와 구조에 대해서 보고하였으며 이 연구에 이어 *Aster scaber* T_{HUNB}의 saponin의 화학적 분석이 이루어

Corresponding author: Division of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Hyoja 2-dong, Chuncheon-si, Kangwon-do 200-701, Korea

졌다. 특히 뿌리로부터 얻어진 glycoside 분획물은 polystyrene resin (Dianion HP-20)을 이용한 컬럼크로마토그래피에 의해 두 개의 saponin 분획물(A와 B)로 분리되었으며 비극성 쪽의 B 분획물을 methyl ester화한 산성 산물은 scaberoside B₁-B₆ methyl ester로 밝혀졌다.⁽⁵⁾

본 실험에서는 약리효과가 있어 물질의 정제가 이루어지고 있는 참취뿌리를 시료로 하여 에탄올추출물과 여러종류의 용매 분획물을 조제하여 항돌연변이성과 암세포 성장억제효과를 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료

4-Nitroquinoline-1-oxide (4NQO)와 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)은 미국 Sigma 사로부터 구입하였고, 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido(4,3-b)indole (Trp-P-1) 및 benzo(α)pyrene[B(α)P]은 일본 和光純藥 회사의 특급시약을 구입하였다. 암세포주인 human gastric carcinoma (KATOIII), human hepatocellular carcinoma (Hep3B), human breast adenocarcinoma (MCF-7) 그리고 chronic myelogenous leukemia (K562)는 한국 세포주 은행(KCLB)으로부터 구입하였다.

시료의 추출물 및 분획물의 조제

참취(*Aster scaber*)는 강원도 횡성, 현리의 야산에서 자생하는 것을 채취하였으며, 뿌리만 선별, 수세하였다. 이것을 40°C에서 건조시킨 후 분쇄하여 적정량을 취한 후 10배의 70% 에탄올을 용매로 80°C, 12시간 3회 추출하였다. 이것을 여과하여 농축시켜 동결건조 후 사용하였으며 각각의 분획물의 조제의 경우, 용매의 극성에 따라 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올 순으로 순차적으로 분획 한 후 농축시킨 다음 동결건조하여 일정량을 실험에 사용하였다.

항돌연변이성 실험

Maron 등의 방법⁽⁶⁾에 따라 항돌연변이성 실험을 실시하였으며 실험에 사용된 변이원물질은 MNNG, 4NQO, Trp-P-1 및 B(α)P를 사용하였다. 건열멸균시킨 glass cap tube에 시료의 추출물을 각각 50 μL씩 첨가하고 이어서 변이원 물질을 각각 50 μL씩 첨가하였다. 간접변이원인 경우 10% S-9 mix를 250 μL씩 첨가 하였다. 여기에 전 배양시킨 균액을 100 μL씩 주입한 후에 0.2 M sodium phosphate buffer를 가하여 최종부피가 700 μL가 되도록 하였다. 이것을 37°C에서 20분간 진탕배양 한 다음 상기의 돌연변이성 실험과 같은 방법으로 실험하여 생성

된 복귀돌연변이 수를 측정하여 항돌연변이성 유무를 판정하였다. 참취뿌리 추출물과 변이원물질의 농도는 예비실험을 통하여 결정하였으며, 항돌연변이활성은 변이원물질의 활성화에 대한 시료의 억제율(inhibition, %)로 나타내었다. 한편, 참취뿌리 추출물 자체의 돌연변이성 실험을 변이원물질이 없는 상태에서 같은 방법으로 병행하여 비교하였다. 각각의 실험은 실험군당 triplicate로 3번씩 반복실험하여 결과를 나타내었다.

암세포 성장 억제효과

MTT(3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) assay는 세포의 생육 및 분화를 측정하는 방법⁽⁷⁾으로서 이 실험은 살아있는 세포의 미토콘드리아 내의 dehydrogenase가 황색 수용성 물질인 MTT에 의해 dark blue formazan을 생성해내는 점을 기초로 하였다. KATOIII 및 K562 세포를 10% fetal bovine serum을 함유한 RPMI 1640배지를 5×10⁴ cell/mL 농도로 각각의 well에 100 μL씩 첨가하여 24시간 동안 배양(37°C, 5% CO₂)시킨 후 각각의 시료를 0.13, 0.25, 0.36 및 0.50 mg/mL의 농도로 100 μL씩 첨가하여 48시간 동안 다시 배양하였다. 여기에 MTT(5 μg/5 μL)용액을 20 μL씩 첨가하여 4시간동안 배양시켜 formazan을 형성시킨 후 조심스럽게 aspirator로 상등액을 제거시켰다. 그리고 DMSO(dimethyl sulfoxide) 150 μL를 첨가하여 formazan을 녹인 후 540 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

SRB[sulforhodamine B] assay^(8,9)는 세포 단백질 염색을 이용하여 세포 증식이나 독성을 측정하는 방법으로 10%의 fetal bovine serum과 각각의 세포들(MCF-7, Hep3B)을 함유하는 RPMI 1640이나 DMEM 배지를 100 μL씩 각 well에 첨가하여 하루동안 배양(37°C, 5% CO₂)시킨 후 PBS에 녹인 추출물들을 각각 0.13, 0.25, 0.36 및 0.5 mg/mL씩 첨가하여 다시 48시간 배양시켰다. 그 후 상등액을 aspirator로 조심스럽게 제거하고 차가운 10% TCA(4°C) 용액을 50 μL씩 첨가하여 세포들을 well 바닥에 고정시켰다. 한시간동안 4°C에서 배양시킨 후, TCA와 배지들을 제거하기 위하여 증류수로 다섯번정도 행구었다. plate를 건조시키고 여기에 1% acetic acid에 녹인 0.4% SRB를 첨가해서 30분 동안 염색시킨 후 결합하지 않은 SRB염색액을 제거하기 위해 1% acetic acid 용액으로 네번 세척하였다. 건조기에서 건조된 plate는 10 mM Tris buffer 100 μL로 염색제를 충분히 녹인 후 540 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

참취뿌리 에탄올 추출물과 분획물의 수득률

참취뿌리 건조분말 200 g을 시료중량의 10배인 2 L의 70% 에탄올을 가하여 80°C에서 12시간 동안 세번 추출을 반복하여 모두 합하여 진공 농축 후 동결 건조하여 25.4 g의 추출물을 얻었다. 이 에탄올 추출물을 부탄올, 물, 클로로포름, 에틸 아세테이트, 및 헥산으로 각각 분획하여 Table 1과 같은 분획물을 얻었다.

참취뿌리 추출물의 항돌연변이성

참취뿌리 추출물을 이용하여 *S. typhimurium* TA98과 TA100에서의 돌연변이성 실험결과 시료의 농도를 50, 100, 150 및 200 µg/plate 첨가한 결과 균주자체의 자연복귀돌연변이의 colony수를 유지하므로써 변이원성은 없는 것을 알 수 있었다.

에탄올 추출물과 각각의 용매 분획물에 대한 항돌연변이 실험결과는 Fig. 1과 같다. 직접변이원인 MNNG (0.45 µg/plate)의 경우 *S. typhimurium* TA100

균주에서 시료농도를 100 µg/plate 첨가시 돌연변이 억제율은 에탄올 추출물이 79%, 에틸 아세테이트 분획물의 경우 82%로 거의 비슷한 값을 나타내었으며 물, 헥산, 부탄올 및 클로로포름 분획물에서는 각각 72%, 51%, 61% 및 20%로 나타났다. 한편, Fig. 2와 같이 4NQO에 대한 *S. typhimurium* TA98과 TA100에서의 실험결과 에탄올 추출물의 경우 시료농도 100 µg/plate에서 TA98에서는 48%의 억제율을 나타낸 반면 에틸 아세테이트와 물분획물의 경우 각각 60%와 58%의 다소 높은 억제효과를 나타내었다. TA100에서는 에탄올 추출물에 비해 같은 시료농도에서 물, 에틸 아세테이트 그리고 부탄올 분획물이 각각 62%, 60% 및 54%의 순으로 나타났다. 이 실험 결과는 같은 시료농도에서 곰취 에탄올 추출물이 TA98과 TA100에서 각각 59%와 56%의 항돌연변이 효과를 나타낸 것에 비해 다소 높음을 알 수 있었다⁽¹⁰⁾. 또한 수리취 추출물의 항돌연변이성 실험결과와 비교하여도 참취뿌리 에탄올 추출물의 항돌연변이 활성이 높았다⁽¹¹⁾.

그리고 간접돌연변이원에 대한 억제활성에서 B(α)P을 10 µg/plate의 농도로 첨가한 후 시료농도 200 µg/plate를 처리한 경우 TA98에 대해서 에틸 아세테이트와 부탄올 분획물이 각각 78%와 64%로 에탄올 추출물의 60%에 비해 높게 나타났으며 물과 클로로포름 분획물의 경우 각각 47%와 42%로써 낮은 억제활성을 보였다. TA100의 경우에는 Fig. 3과 같이 동일 시료농도에서

Table 1. Yields of each fraction from the ethanol extract of *Aster scaber* root

Solvent	Butanol	Chloroform	Ethyl acetate	Hexane	Water
Extracts(g)	8.4	1.5	1.4	2.3	10.0
Yield(%)	32.8	0.1	0.1	0.1	39.4

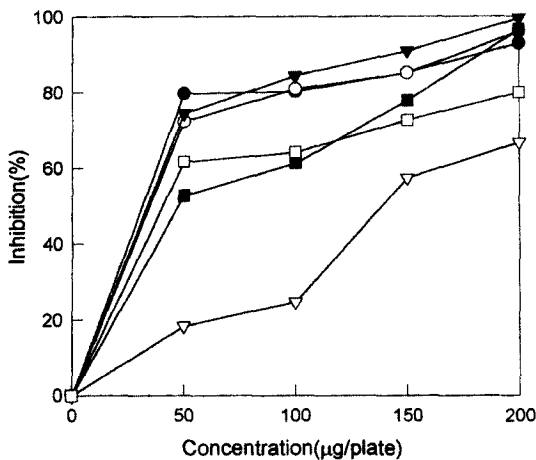


Fig. 1. Inhibitory effects of each fraction of *Aster scaber* root ethanol extract on the mutagenicity by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG, 0.45 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100.

- ▽— : Chloroform fr.
- : Butanol fr.
- : Water fr.
- : Hexane fr.
- : Ethanol extract.
- ▼— : Ethyl acetate fr.

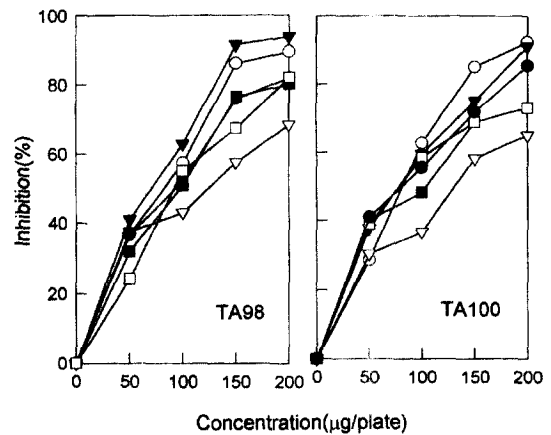


Fig. 2. Inhibitory effects of each fraction of *Aster scaber* root ethanol extract on the mutagenicity by 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO, 0.15 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100.

- : Butanol fr.
- : Water fr.
- ▽— : Chloroform fr.
- ▼— : Ethyl acetate fr.
- : Ethanol extract.
- : Hexane fr.

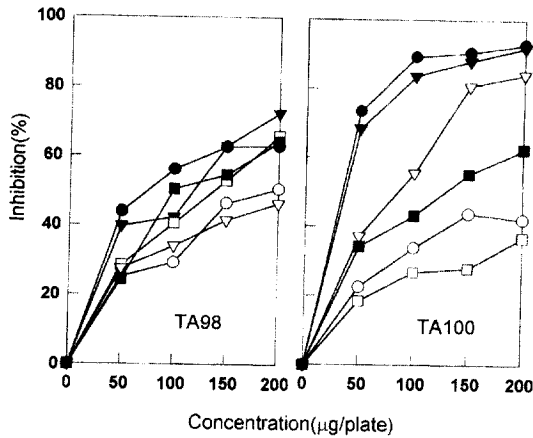


Fig. 3. Inhibitory effects of each fraction of *Aster scaber* root ethanol extract on the mutagenicity by benzo (α) pyrene[B(α)P], 10 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100.

- : Water fr.
- : Butanol fr.
- ▽ : Chloroform fr.
- ▼ : Ethyl acetate fr.
- : Ethanol extract.
- : Hexane fr.

부탄올과 물분획물이 각각 37%와 41%로 낮은 항돌연 변이성 효과를 나타내는데 비해 에탄올, 에틸 아세테이트 및 클로로포름 분획물의 경우 각각 85%, 84% 그리고 81%의 순으로 나타났다. 한편, 참취(*Aster scaber*), 개미취(*Aster tataricus*), 곰취(*Ligularia fischeri*), 수리취(*Symurus deltoides*)의 생즙을 이용한 항돌연변이성 실험

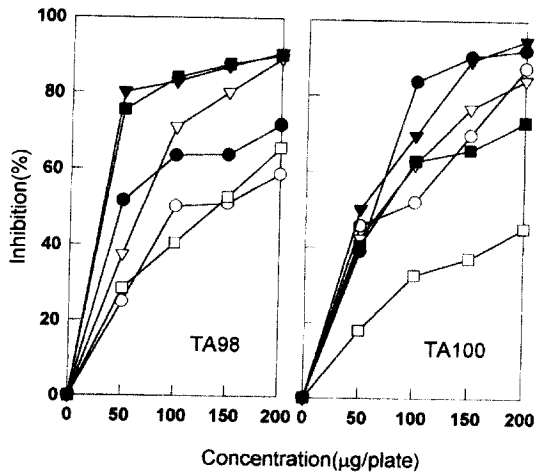


Fig. 4. Inhibitory effects of each fraction of *Aster scaber* root ethanol extract on the mutagenicity by 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido(4,3-b)indole (Trp-P-1, 5 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100.

- : Water fr.
- : Butanol fr.
- ▽ : Chloroform fr.
- ▼ : Ethyl acetate fr.
- : Ethanol extract.
- : Hexane fr.

결과 B(α)P을 사용한 경우 TA98 균주에서는 시료농도 100 µg/plate에서 참취, 개미취, 곰취 그리고 수리취의 경우 각각 82, 86, 75 및 89%의 억제율로 참취뿌리 에탄올 추출물의 58.5%보다 높은 억제효과를 보였으며 TA100에서는 각각 78, 30, 61 및 80.4%로써 참취뿌리 에탄올 추출물의 89%보다 다소 낮은 억제효과를 나타내었다¹²⁾. 그리고 Fig. 4에서와 같이 Trp-P-1을 사용한 경우, TA98의 경우에는 에틸 아세테이트, 헥산, 클로로포름 분획물이 200 mg/plate에서 각각 89%, 83%와 85%로서 비슷한 억제율을 나타내었으며 에탄올 추출물이 69%의 억제활성을 나타낸 것에 비해 부탄올과 물분획물이 각각 64%와 58.5%로 다소 낮은 억제율을 보였다.

TA100에서는 TA98의 경우와 비슷한 양상을 보였으나 낮은 시료농도(50 µg/plate)에서 TA98의 경우는 에틸 아세테이트와 헥산 분획물이 각각 80.5%와 78%의 억제율을 보인 반면 TA100에서는 각각 52%와 41%로 낮은 억제활성을 나타내었다.

암세포 성장억제효과

부유상태로 성장하는 K562와 KATOIII의 경우 MTT방법으로 암세포 성장억제 효과를 측정된 결과 Fig. 5에서 처럼 참취 에탄올 추출물이 K562세포에서는 최저농도 0.25 mg/mL와 최고농도 1.0 mg/mL에서 각각 52%와 81%의 세포독성효과를 나타내었다. Fig. 6은 에탄올 추출물과 각종 용매 분획물에 대한 세포 성장 억제 실험으로서 KATOIII에서는 에탄올 추출물과 각각의 용매 분획물을 0.25 mg/mL 처리한 결과 에

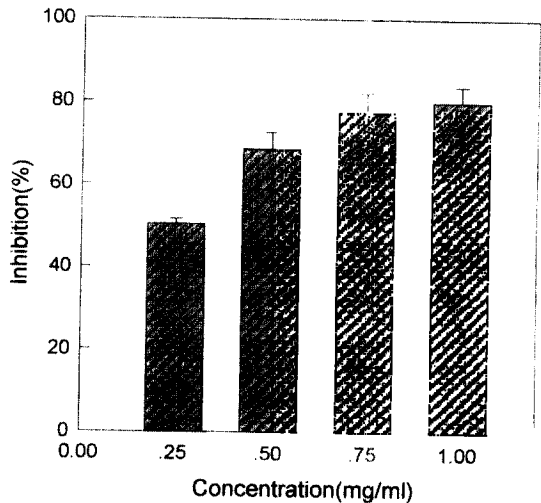


Fig. 5. Inhibitory effects of the ethanol extract of the *Aster scaber* root on K562 (chronic myelogenous leukemia) with MTT assay.

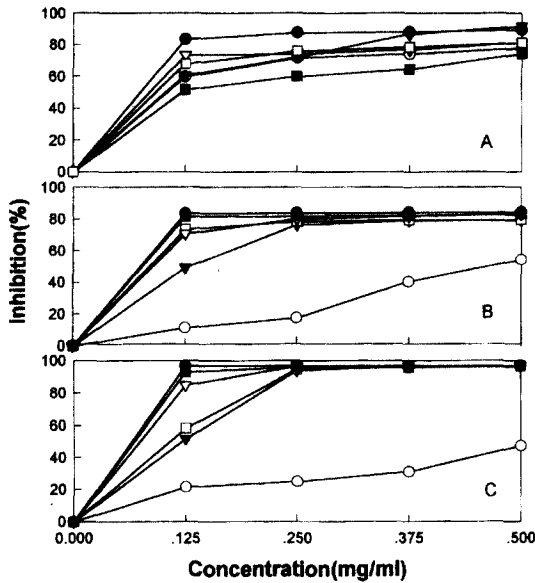


Fig. 6. Growth inhibitory effects of each fraction of *Aster scaber* root ethanol extract on KATOIII(A), Hep3B(B) and MCF-7(C).

● : Ethanol extract. □ : Butanol fr.
 ▼ : Ethyl acetate fr. ○ : Water fr.
 ■ : Hexane fr. ▽ : Chloroform fr.

탄올 추출물이 81%로서 가장 높은 세포독성을 보였으나 0.5 mg/mL의 농도에서는 에틸 아세테이트 분획물이 83%로서 가장 높은 세포독성을 나타내었다. 그리고 에탄올, 클로로포름, 부탄올, 물 및 헥산 분획물들은 각각 82, 79, 78, 73 및 70%의 세포독성을 나타내었다. 인간 간암세포(Hep3B)와 인간 유방암세포(MCF-7)의 경우 생육 형태가 부착성 세포이기 때문에 SRB실험을 행한 결과 Hep3B세포에 있어서는 0.5 mg/mL의 최고 농도 첨가에서 물분획물이 57%로 가장 낮은 암세포 성장억제 효과를 나타내었으며 에틸 아세테이트, 부탄올, 헥산 및 클로로포름 분획물과 에탄올 추출물은 각각 82, 82, 81, 80 및 81%로서 비슷한 억제효과를 나타내었다. 한편 유방암세포에 대한 세포성장 억제실험에서는 0.125 mg/mL의 낮은 시료농도에서 에탄올 추출물과 헥산 분획물이 각각 98%와 94%의 높은 억제활성을 보였으며 다른 용매 분획물에 비해 가장 낮은 농도에서 가장 높은 억제효과를 나타내었다.

요 약

참취뿌리의 에탄올 추출물과 용매 분획물에 대한 생리활성 효과를 밝히기 위해 항돌연변이성 및 암세포 성

장억제효과를 실시한 결과 에탄올 추출물 자체의 돌연변이성은 없었다. 직접변이원인 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)에 대해서는 *Salmonella typhimurium* TA100의 경우 에탄올 추출물이 79%, 에틸아세테이트 분획물은 82%의 억제효과를 나타내었다. 4-Nitroquinoline-1-oxide(4NQO)에 대해서는 *Salmonella typhimurium* TA98에서 에탄올 추출물이 48%, 에틸 아세테이트 분획물은 60%의 억제효과를 보였다. 한편 간접 변이원인 benzo(α)pyrene[B(α)P]에 대해서는 에틸아세테이트 분획물의 경우 TA98에서는 78%, TA100에서는 85%의 높은 억제활성을 나타내었다. 그리고 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido(4,3-b)indole(Trp-P-1)에 대해서는 TA98에서 89%의 높은 억제효과를 보였다. 한편 참취 에탄올 추출물에 대한 암세포 성장억제 실험에서도 chronic myelogenous leukemia (K562), human gastric carcinoma (KATOIII), human hepatocellular carcinoma (Hep3B) 및 human breast adenocarcinoma (MCF-7)에 대하여 높은 세포독성을 나타내었으며 용매 분획물의 경우 KATOIII 세포에서는 모든 분획물이 높은 세포독성을 나타내었으나 이외세포에 대해서는 물분획물을 제외한 에틸아세테이트, 부탄올 및 클로로포름 분획물이 높은 세포독성을 나타내었다.

문 헌

1. National Rural Living Science Institute, R.D.A. Food Composition Table 126 (1996)
2. Chung, M.S. and Lee, M.S. Stability of chlorophyll extracted from *Aster scaber* THUNB. Res. Bull. Duksung Women's Univ. 27: 147 (1996)
3. Kim, Y.D. and Yang, W.M. Studies on the components of wild vegetables in Korea. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 15: 10-16 (1986)
4. Park, J.C., Ha, J.O. and Park, K.Y. Antimutagenic effect of flavonoids isolated from *Oenanthe javanica*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 25: 588-592(1996)
5. Nagao, T., Tanaka, R. and Okabr, H. Studies on the constituents of *Aster Scaber* THUNB. I. Structures of scaberosides, oleanolic acid glycosides isolated from the root. Chem. Pharm. Bull. 39: 1966-1703 (1991)
6. Maron, D.M. and Ames, B.N. Revised method for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutation Res. 113: 199-200 (1983)
7. Scudiero, D.A., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T.H., Currens, M.J., Seniff, D. and Boyd, M.R. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. Cancer Res. 48: 4827-4836 (1988)
8. Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R.,

- Paull, K., Bistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J. and Boyd, M. Feasibility of a high-flux anti-cancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 83: 757-766 (1991)
9. Skehan, P., Storeng, R., Monks, S.A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 1107-1112 (1990)
10. Ham, S.S., Lee, S.Y., Oh, D.H., Jung, S.W., Kim, S.H., Chung, C.K. and Kang, I.J. Antimutagenic and antigenotoxic effects of *Ligularia fischeri* extract. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27: 745-750 (1998)
11. Ham, S.S., Han, H.S., Choi, K.P. and Oh, D.H. Inhibitory effects of *Synurus deltooides* extracts on the mutagenesis induced by various mutagen. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 26: 528-533 (1997)
12. Ham, S.S., Oh, D.H., Hong, J.K. and Lee, J.H. Antimutagenic effects of juices from edible Korean wild herbs. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 2: 155-160 (1997)
-
- (1998년 11월 13일 접수)