

Daunorubicin과 4NQO의 DNA damaging activity에 대한 천연물질의 영향

이완희 · 이행숙 · 권혁일[†] · 박진서 · 최수영 · 이길수*

한림대학교 자연과학대학 생명과학부

[†]한림대학교 의과대학 생리학교실

Effect of Some Natural Products on the DNA Damaging Activity of 4NQO (4-nitroquinoline n-oxide) and Daunorubicin

Wanhee Lee, Haengsook Lee, Hyeok Yil Kwon[†], Jinseu Park,
Soo Young Choi and Kil Soo Lee*

Faculty of Life Science, College of Natural Science, [†]Department of Physiology,
College of Medicine, Hallym University, Chunchon, Kangwondo 200-702, Korea

(Received July 30, 1999 / Accepted August 30, 1999)

ABSTRACT : The action mechanism of the inhibitory effect of some natural products on the DNA strand break and DNA damage was investigated *in vitro* and *in vivo*. In the *E. coli* chromosomal DNA strand break experiment *in vitro*, three mushroom water extracts were effective on the DNA strand breaking by daunorubicin. *Phellinus linteus* water extract inactivated daunorubicin, a DNA strand breaking agent, but did not protect DNA from daunorubicin-induced DNA strand breaking. *Agaricus blazei* water extract inhibited DNA strand breaking action of daunorubicin not only by daunorubicin inactivation, but also by DNA protection from daunorubicin. An inhibitory effect of *Ganoderma lucidum* water extract on the DNA strand break was based on the DNA protection rather than daunorubicin inactivation. In *in vivo* mutagen assay system (SOS-chromotest), among three mushroom water extracts *Phellinus linteus* water extract was the most effective one on the inhibition of DNA damage by 4-NQO. The results suggest that all three mushroom water extracts inhibit daunorubicin-induced DNA damage and *in vivo* DNA damaging action of 4-NQO by the reaction of mutagen inactivation or DNA protection from the mutagen.

Key words: *Phellinus linteus*, *Agaricus blazei*, *Ganoderma lucidum*, DNA strand break, DNA damage

서 론

담자균류인 버섯은 과거부터 식용이나 약용으로 사용되어 왔으며, 최근에는 각종 유효성분이 분리되고 그 효과가 입증되고 있다. 이미 운지버섯으로부터 krestin(Tsukagoshi and Ophashi, 1974), 표고버섯으로부터 letinan(Chihara *et al.*, 1970) 그리고 치마버섯으로부터 schizophyllan(Tabata *et al.*, 1981)과 같은 다당체가 분리되어 항암 및 면역증강제로 사용

되고 있다. *Phellinus linteus*(목질진흙버섯, 상황버섯)는 최근 에 인공배양이 가능해 졌으며, *P. linteus*에서 분리된 다당체는 mouse에서 암의 성장과 전이를 억제하였고(Han *et al.*, 1999), immune system에 영향을 미치는 것으로 보고되었다(Kim *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1995).

Agaricus blazei(신령버섯)는 브라질이 원산지인 버섯으로, *A. blazei*에서 분리된 다당체인 (1→6)-beta-D-glucan(FIII-2-b)은 항종양 효과(Mizuno *et al.*, 1999)와 면역계 활성화(Fujimiya *et al.*, 1999; Mizuno *et al.*, 1998)이 보고되었다. *A. blazei*의 자실체에서 추출된 linoleic acid는 antimutagenic ac-

*To whom correspondence should be addressed.

tivity를 나타내었다(Osaki *et al.*, 1994). *Ganoderma lucidum* (영지버섯)은 고대부터 약용으로 사용되어 온 버섯으로, *G. lucidum*의 다당체가 interleukin등의 level을 증가시키는 것으로 보고되었고(Wang *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1993), ganoderic acid alpha는 HIV-1-protease의 활성을 억제 하였다(Min *et al.*, 1998). 또한 *G. lucidum*에서 분리된 ganoderan B는 저혈당 활성(hypoglycemic activity)을 나타내었고(Hikino *et al.*, 1989), *Ganoderma* spp.의 열수 추출물(hot water extract)은 radical scavenger로서 또는 항간독소 활성(antihepatotoxic activity)이 있는 것으로 보고되었다(Lin *et al.*, 1995). 천연물질들의 이러한 항종양 작용, 면역활성증대에 관한 보고는 다수 있으나, DNA 손상 또는 돌연변이성(mutagenicity)에 대한 이들 천연물질의 영향은 연구된 바 없으므로, 본 실험은 daunorubicin에 의하여 유도되는 DNA strand break에 대하여 천연물질로서 3가지 버섯 추출물의 영향을 *in vitro*에서 실험하였고, antimutagenic activity를 관찰하기 위하여 *in vivo*에서 4NQO의 DNA damage에 대한 버섯 추출물들의 영향을 mutagen assay system (SOS-chromotest)으로 수행하였다.

재료 및 방법

균주, 시약 및 배지

DNA strand break 실험에 사용된 chromosomal DNA 추출에는 *E. coli* W3110을 사용하였고, SOS-chromotest에 사용되는 *E. coli* PQ37(*sfIA::Mud(Ap lac)*)은 Hofnung, M.(Institut Pasteur, France)으로부터 증여받았다. o-nitrophenyl- β -galactoside(ONPG), daunorubicin, 4-nitroquinoline n-oxide (4NQO), dimethylsulfoxide(DMSO)는 Sigma사 제품을 사용하였다. 상황버섯(*Phellinus linteus*)과 아가리쿠스(*Agaricus blazei*)는 강원생물농장(강원도 춘천시 동면 만천3리 306번지, 우200-850)에서 증여받고, 영지버섯(*Ganoderma lucidum*)은 시판되는 제품을 사용하였다. 각 시료는 건량 10 g을 정량하여 400 ml의 증류수로 120°C에서 2시간동안 성분을 추출하였다. 열수 추출물 400 ml은 여과한 후, rotary evaporator를 이용해 10 ml로 농축시켰다. 4NQO(4-nitroquinoline n-oxide)는 5 mg/ml의 농도로 DMSO(dimethylsulfoxide)에 녹여 사용하였다. Lamp media는 Bacto-trypton 10 g, NaCl 10 g, yeast extract 5 g을 1 liter의 증류수에 녹여 멸균한후 100 mg의 ampicillin을 첨가하였다.

DNA strand-break assay

E. coli W3110 strain을 배양하여 chromosomal DNA를 분리하였고, chromosomal DNA 0.16 μ g에 daunorubicin, 천연

물질로서 *P. linteus* extract(상황버섯 추출물), *A. blazei* extract(아가리쿠스 추출물) 그리고 *G. lucidum* extract(영지버섯 추출물)를 각각 첨가한 후, 전체 반응액을 10 μ l로 하여 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. loading buffer 2 μ l를 넣고 1.0% agarose gel에서 100V, 60 mA로 3시간 동안 전기영동한 후, gel은 ethidium bromide(1.0 μ g/ml TBE buffer)에서 30분간 염색하였고, 증류수에서 1시간 동안 탈색하였다. gel을 UV transilluminator로 관찰하고, Polaroid 667 film으로 촬영하였다.

SOS-chromotest

SOS-chromotest는 Quillardet(Quillardet and Hofnung, 1985)의 방법에 따라 10 ml의 Lamp media에 *E. coli* PQ37을 접종하여 37°C에서 overnight culture 하였다. 새로운 Lamp media에 *E. coli* PQ37을 배양한 후 흡광도(A600nm) 0.5~0.6에서 4NQO와 상황버섯 추출물, 아가리쿠스 추출물, 영지버섯 추출물을 각각 처리하였다. 매 30분마다 A600 nm에서 세포농도를 측정하고, β -galactosidase assay를 수행하였다.

결과 및 고찰

E. coli chromosomal DNA에 대한 버섯 추출물의 영향을 관찰하기 위하여 daunorubicin의 DNA strand 절단에 대한 버섯 추출물의 작용을 실험하였다. daunorubicin은 DNA strand breaking agent로서 *in vitro*에서 *E. coli* chromosomal DNA를 절단하였고(Fig. 1, lane 2), 동량의 버섯 추출물(50 μ g/assay)을 각각 daunorubicin과 처리한 결과 상황버섯 추출물, 아가리쿠스 추출물, 영지버섯 추출물의 순서로 daunorubicin의 action을 억제하였다(Fig. 1-A, B, C. lane 7). 버섯 추출물에 의한 DNA strand breaking 억제작용이 daunorubicin의 inactivation에 기인하는 것인지, 또는 버섯 추출물의 DNA protection 기능에 있는 것인지를 확인하기 위하여, 두 가지 농도의 버섯 추출물(상황버섯 추출물 10 μ g, 50 μ g/assay, 아가리쿠스 추출물, 영지버섯 추출물 20 μ g, 50 μ g/assay)을 chromosomal DNA 또는 daunorubicin과 1시간 동안 preincubation한 후 total reaction mix에 첨가, 반응시킨 결과, 상황버섯 추출물과 chromosomal DNA를 preincubation하였을 때(Fig. 1-A, lane 3, 4) 보다 상황버섯 추출물과 daunorubicin을 preincubation하였을 때(Fig. 1-A, lane 5, 6) 상황버섯 추출물의 농도(10 μ g, 50 μ g/assay)에 의존적으로 daunorubicin에 의한 DNA strand break이 억제되었다. 아가리쿠스 추출물은 chromosomal DNA와 preincubation하였을 때(Fig. 1-B, lane 3, 4)와 아가리쿠스 추출물과 daunorubicin을 preincubation하였을 때(Fig. 1-B, lane 5, 6) 아가리쿠스 추출

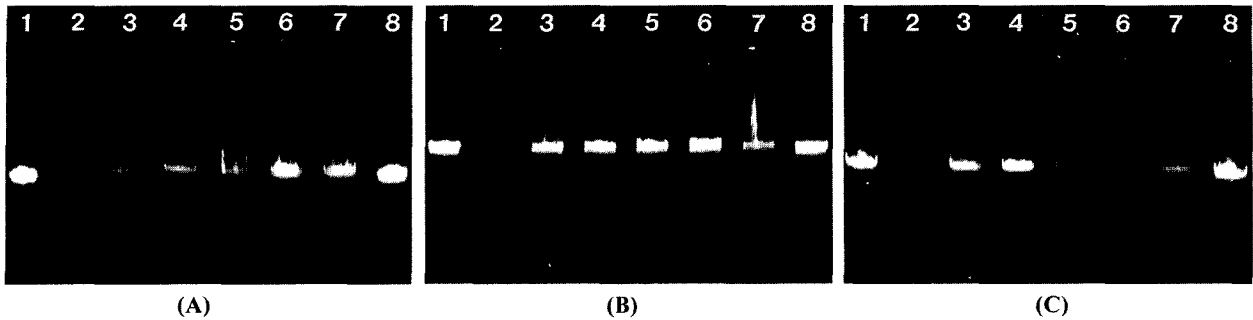


Fig. 1. Inhibitory effect of natural product extracts on the daunorubicin-induced DNA strand break. lane 1: control (*E. coli* chromosomal DNA 0.16 μ g), lane 2: daunorubicin 90 μ M (A) *P. linteus* extract(PLE)-lane 3: (DNA + PLE 10 μ g/assay preincubation for 1 hr) + daunorubicin 90 μ M, lane 4: (DNA + PLE 50 μ g/assay preincubation for 1 hr) + daunorubicin 90 μ M, lane 5: (PLE 10 μ g/assay + daunorubicin 90 μ M preincubation for 1 hr) + DNA, lane 6: (PLE 50 μ g/assay + daunorubicin 90 μ M preincubation for 1 hr) + DNA, lane 7: DNA + PLE 50 μ g/assay + daunorubicin 90 μ M, lane 8: PLE 50 μ g/assay. (B) *A. blazei* extract(ABE)-lane 3: (DNA + ABE 20 μ g/assay preincubation for 1hr) + daunorubicin 90 μ M, lane 4: (DNA + ABE 50 μ g/assay preincubation for 1 hr) + daunorubicin 90 μ M, lane 5: (ABE 20 μ g/assay + daunorubicin 90 μ M preincubation for 1 hr) + DNA, lane 6: (ABE 50 μ g/assay + daunorubicin 90 μ M preincubation for 1 hr) + DNA, lane 7: DNA + ABE 50 μ g/assay + daunorubicin 90 μ M, lane 8: ABE 50 μ g/assay. (C) *G. lucidum* extract(GLE)- lane 3: (DNA + GLE 20 μ g/assay preincubation for 1 hr) + daunorubicin 90 μ M, lane 4: (DNA + GLE 50 μ g/assay preincubation for 1 hr) + daunorubicin 90 μ M, lane 5: (GLE 20 μ g/assay + daunorubicin 90 μ M preincubation for 1hr) + DNA, lane 6: (GLE 50 μ g/assay + daunorubicin 90 μ M preincubation for 1 hr) + DNA, lane 7: DNA + GLE 50 μ g/assay + daunorubicin 90 μ M, lane 8: GLE 50 μ g/assay.

물의 농도(20 μ g, 50 μ g/assay)에 의존적으로 daunorubicin에 의한 DNA strand break 억제에 유사하게 이루어 졌다. 영지 버섯 추출물은 DNA와 preincubation하였을 때(Fig. 1-C, lane 3, 4), 영지버섯 추출물의 농도(20 μ g, 50 μ g/assay)에 의존적으로 daunorubicin에 의한 DNA strand break이 억제되었다. 위의 실험결과로서 *in vitro*에서 daunorubicin에 의하여 유발되는 DNA strand break에 대한 버섯 추출물의 억제 작용은 각각 버섯 추출물의 DNA protection 또는 daunorubicin inactivation에 의하여 이루어지는 것으로 설명될 수 있다. 상황버섯 추출물은 Fig. 1-A의 lane 5, 6에서 나타나는 DNA strand break 억제작용이 lane 3, 4보다 높게 나타났으므로 상황버섯은 주로 DNA strand breaking agent인 daunorubicin을 불활성화시키는 것으로 추측된다. 아가리쿠스 추출물은 Fig. 1-B에서 lane 5, 6과 lane 3, 4의 DNA damage 억제작용의 정도가 비슷하게 나타나므로 DNA protection뿐만 아니라 daunorubicin inactivation에 의하여 daunorubicin에 의한 DNA strand break을 억제하는 것으로 보인다. 한편 영지버섯 추출물은 Fig. 1-C의 lane 3,4에서 보이는 DNA strand break 억제작용이 lane 5, 6보다 크게 나타났기 때문에, 영지버섯 추출물은 DNA protection에 의하여 DNA strand break을 억제하는 것으로 생각된다.

In vitro 실험결과로서 얻어진 DNA strand break에 대한 버섯 추출물의 작용을 *in vivo* 실험에서 확인하기 위하여 mutagen assay system으로 많이 사용되는 SOS-chromotest을 이용하여 실험하였다. 이 system에서 positive control로서 4NQO를, 균주로는 *E. coli* PQ37(*sfiA::Mud(Ap lac)*)이 사용

되었으며, 4NQO(2 μ g/ml)에 의한 DNA damage로부터 유발되는 SOS-response로서 *lacZ* gene expression을 β -galactosidase assay로 측정하였다. 동량(20 μ g/ml)의 버섯 추출물을 각각 이 system에 4NQO와 2시간 동안 처리한 결과, 4NQO에 의한 DNA 손상에 따른 SOS-function으로서 합성

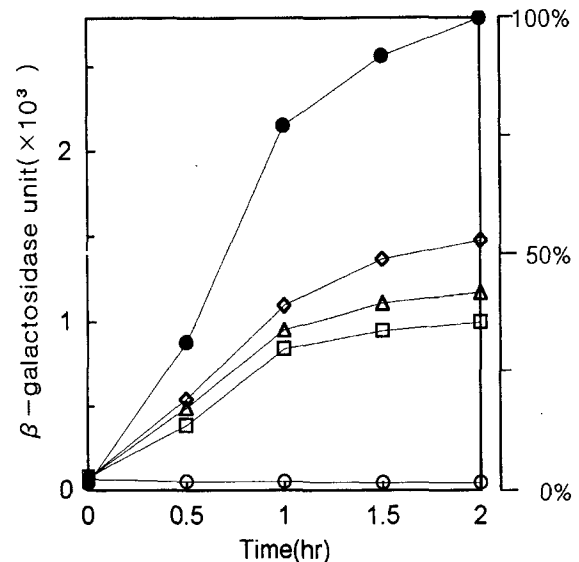


Fig. 2. Effect of natural product extracts on the β -galactosidase synthesis as DNA damage-induced SOS-function in *E. coli* PQ37. (○-○): Control, (●-●): 4NQO 2 μ g/ml, (◇-◇): 4NQO 2 μ g/ml+*Ganoderma lucidum* extract 20 μ g/ml, (△-△): 4NQO 2 μ g/ml+*Agaricus blazei* extract 20 μ g/ml, (□-□): 4NQO 2 μ g/ml+*Phellinus linteus* extract 20 μ g/ml.

되는 β -galactosidase가 4NQO만 처리한 것(100%)과 비교하여 상황버섯 추출물에 의하여 64%, 아가리쿠스 추출물에 의하여 58%, 영지버섯 추출물에 의하여 47% 감소되었다(Fig. 2). Fig. 2에서 버섯 추출물들의 antimutagenic activity의 결과는 Fig. 1-A, B, C의 lane 7의 버섯 추출물에 의한 DNA strand break 억제 효과의 순서와 일치하는 것으로, 상황버섯 추출물이 다른 버섯 추출물과 비교하여 DNA strand break 억제 효과 및 antimutagenic activity가 가장 높은 것으로 관찰되었다. 아가리쿠스 추출물의 antimutagenic activity는 아가리쿠스 추출물에 포함된 linoleic acid(Osaki *et al.*, 1994)에 의한 것으로 생각되며, 영지버섯 추출물의 antimutagenic activity는 다른 버섯 추출물보다 낮지만, 그 기작이 아가리쿠스 추출물과는 반대로 DNA protection에 의하여 이루어지는 것으로 확인되었다. 이러한 버섯 추출물들의 antimutagenic activity는 주로 버섯 추출물에 포함된 다당체에 의하여 이루어지는 것으로 생각되며, 상황버섯 추출물에서 분리되어 항암 효과가 보고된 다당체(Han *et al.*, 1999), 아가리쿠스 추출물의 (1 \rightarrow 6)-beta-D-glucan(Fujimiya *et al.*, 1999) 또는 linoleic acid(Osaki *et al.*, 1994) 그리고 interleukin의 level을 증가시키는 영지버섯 추출물의 다당체(Wang *et al.*, 1997)등이 antimutagenic activity를 유도하는 것으로 추측된다.

감사의 글

본 연구는 1997년도 한국 학술진흥재단 대학부설 연구소 지원 연구비에 의하여 수행되었음.

참고문헌

- Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. (1970): Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially letinan, from *Letinus edodes*(Berk.) Sing.(an edible mushroom). *Cancer Res.*, **30**, 2776-2781.
- Fujimiya, Y., Suzuki, Y., Katakura, R. and Ebina, T. (1999): Tumor-specific cytotoxic and immunopotentiating effects of relatively low molecular weight products derived from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murill. *Anticancer Res.*, **19**, 113-118.
- Han, S.B., Lee, C.W., Jeon, Y.J., Hong, N.D., Yoo, I.D., Yang, K.H. and Kim, H.M. (1999): The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. *Immunopharmacology*, **41**, 157-164.
- Hikino, H., Ishiyama, M., Suzuki, Y. and Konno, C. (1989): Mechanism of hypoglycemic activity of ganoderan B: a glycan of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Planta. Med.*, **55**, 423-428.
- Kim, H.M., Han, S.B., Oh, T.G., Kim, Y.H., Hong, D.H., Hong, N.D. and Yoo, I.D. (1996): Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Int. J. Immunopharmacol.*, **18**, 295-303.
- Lin, J.M., Lin, C.C., Chen, M.F., Ujiiie, T. and Takada, A. (1995): Radical scavenger and antihepatotoxic activity of *Ganoderma formosanum*, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma neo-japonicum*. *J. Ethnopharmacol.*, **47**, 33-41.
- Min, B.S., Nakamura, N., Miyashiro, H., Bae, K.W. and Hattori, M. (1998): Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their inhibitory activity against HIV-1 protease. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **46**, 1607-1612.
- Mizuno, M., Minato, K., Ito, H., Kawade, M., Terai, H. and Tsuchida, H. (1999): Anti-tumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* Murill. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **47**, 707-714.
- Mizuno, M., Mirimoto, M., Minato, K. and Tsuchida, H. (1998): Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. *Biosci. Biotechnol.*, **62**, 434-437.
- Osaki, Y., Kato, T., Yamamoto, K., Okubo, J. and Miyazaki, T. (1994): Antimutagenic and bactericidal substances in the fruit body of a Basidiomycete *Agaricus blazei*, Jun-17. *Yakugaku Zasshi.*, **114**, 342-350.
- Quillardet, P. and Hofnung, M. (1985): The SOS Chromotest, a Colormetric bacterial assay for genotoxins: Procedures. *Mutation Research.*, **147**, 65-78.
- Song, K.S., Cho, S.M., Lee, J.H., Kim, H.M., Han, S.B., Ko, K.S. and Yoo, I.D. (1995): B-lymphocyte-stimulating polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **43**, 2105-2108.
- Tabata, K., Ito, W., Kojima, T., Kawabata, S. and Misaki, A. (1981): Ultrasonic degradation of schizophyllan, an antitumor polysaccharide produced by *Schizophyllum commune* Fries. *Carbohydr. Res.*, **89**, 121-135.
- Tsukagoshi, S. and Ophashi, F. (1974): Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma-180 and rat ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Gann.*, **65**, 557-558.
- Wang, S.Y., Hsu, M.L., Hsu, H.C., Tzeng, C.H., Lee, S.S., Shiao, M.S. and Ho, C.K. (1997): The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. *Int. J. Cancer.*, **70**, 699-705.
- Zhang, L.X., Mong, H. and Zhou, X.B. (1993): Effect of Japanese *Ganoderma lucidum* on Production of interleukin-2 from murine splenocytes. *Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih.*, **13**, 613-615.