

## Comet assay에 의한 한국산 겨우살이(*Viscum album coloratum*)의 항유전독성 규명

박종흠 · 지승택 · 현창기\* · 진구복\*\* · 신현길\*

한동대학교 식품 기능성 및 안전성 연구소, \*한동대학교 생물식품공학부, \*\*전남대학교 생명공학연구소

### Investigation of *in vitro* Antigenotoxic Effect of Korean Mistletoe(*Viscum album coloratum*) Using Comet Assay

Jong-Heum Park, Seung-Taek Ji, Chang-Kee Hyun\*, Koo-Bok Chin\*\* and Heuyn-Kil Shin\*  
Institute of Functional Foods and Safety, Handong University, \*School of Bioscience and Food Technology,  
Handong University, \*\*Biotechnology Research Institute, Chonnam National University

#### Abstract

To investigate the antigenotoxicity of Korean mistletoe using Comet assay, the crude extract was divided into 4 fractions, i.e. fraction I (MW range over 14,000), fraction II (8,000~14,000), fraction III (3,500~8,000), and fraction IV (below 3,500) by molecular weight fractionation. In the non-tumoral 3T3 cells, fraction IV could reduce DNA damage induced by MNNG in a dose dependent pattern while fraction I and III which were known to contain lectins and viscotoxins, respectively, did not show the activity. By heat treatment, the antigenotoxic activity of fraction IV, though was gradually diminished according to heating time, was found to be maintained significantly. From the Sephadex G-25 gel filtration chromatography, a more purified fraction responsible for the activity of fraction IV was obtained from the latter part of total elute. Therefore, it was concluded that the antigenotoxic components of Korean mistletoe were water soluble substances of MW below 1,000 and there is a possibility of utilization as a material of functional foods for chemoprevention.

Key words : Korean mistletoe, antigenotoxicity, Comet assay, DNA damage, chemoprevention

#### 서 론

겨우살이는 여러 나무에서 자라는 전세계에 걸쳐 있는 다년생 반기생 상록 식물로 유럽에서는 고혈압 및 암과 같은 질병의 치료를 위해 차나 드링크제 등의 건강식품이나 주사제와 같은 의약품의 형태로 이용하고 있으며 이를 위하여 잎과 줄기를 차엽(茶葉)으로 가공하거나 물로 추출하고 발효시키며 또는 알코올로 추출하기도 한다. 또한 마늘, 쥘레꽃과 같은 다른 식물 추출물과 단일 또는 혼합하여 추출한 형태도 있다<sup>(1-2)</sup>. 동양에서는 전통적으로 진정(鎮靜), 요통(腰痛), 치통(齒痛) 및 자통(刺痛)의 완화, 고혈압, 관절염, 유산 및

해산 후 출혈의 방지 그리고 종양의 제거 등을 위해 차나 탕재의 재료로 끓는 물에 우려내어 사용하는 방식이 널리 이용되고 있다<sup>(3-5)</sup>.

지금까지 겨우살이에 관한 연구는 주로 여러 암세포에 대한 세포독성 및 선택적인 세포독성 효과<sup>(6-11)</sup>와 항종양 면역조절작용<sup>(12-16)</sup>에 관한 연구가 수행되어 왔으며 이와 관련된 겨우살이 주성분이 lectin임이 널리 인정되어 왔다<sup>(13,15,17)</sup>. 한편 국내에서도 동북아산(일명 한국산) 겨우살이의 생물학적 활성에 대한 연구가 최근에 이르러 활발히 진행되고 있으며 발효에 의한 겨우살이 lectin 성분의 변화<sup>(18)</sup>, cytokine의 분비 및 면역세포의 활성 유도<sup>(19)</sup>, 종양세포의 항진이 및 혈관형성 유도억제<sup>(20)</sup>, lectin I 단백질의 1차구조 해석<sup>(21-23)</sup> 등이 보고되고 있다. 또한 본 연구진도 겨우살이가 동양에서 차나 탕재의 재료로 널리 이용된다는 사실에 착안하여 열처리된 겨우살이 추출물이 갖는 세포독성 효과<sup>(24)</sup> 및 lectin, viscotoxin 그리고 alkaloid와 같은 주요

Corresponding author : Heuyn-Kil Shin, School of Bioscience and Food Technology, Handong University, Heungghae, Pohang, Kyungbuk, 791-940, Korea  
Tel : 82-562-260-1316, 1360  
Fax : 82-562-261-4603  
E-mail : hkshin@han.ac.kr, foodinst@han.ac.kr

성분의 열처리를 통해 항종양 활성에 미치는 이들의 영향을 조사하였으며<sup>(25-26)</sup> 이중 열처리된 겨우살이의 주된 세포독성을 나타내는 viscotoxin과 alkaloid 성분 중 alkaloid가 종양세포에 대한 특이적인 세포독성을 지니고 있음도 보고하였다.

한편 겨우살이가 갖는 변이원적 및 항변이원적 특성에 관한 연구는 거의 수행되고 있지 않은 상황이다. 양수 및 임파구 세포에서 염색분체교환이상의 감소<sup>(27-29)</sup>, 화학요법이나 방사선 요법을 받은 유방암 환자 임파구 세포 DNA의 복구능 촉진<sup>(30)</sup>, 인위적인 발암물질투여에 의한 육종의 감소<sup>(31)</sup> 및 겨우살이 추출물 자체의 돌연변이 유발능은 없음<sup>(32)</sup>과 같은 몇몇의 보고 이외에는 전혀 연구가 되어 있지 않으며 더구나 동양에서처럼 겨우살이를 차로 만들어 상시 복용하는 식문화 환경에서 겨우살이의 암 예방효능 연구는 지금까지 전혀 이루어져 있지 않다. 즉, 앞에서 보고된 열처리 겨우살이 추출물의 세포독성 효과와 더불어 그 항유전독성을 규명함으로써 민간요법으로 차나 탕재의 형태로 이용되어 오고 있는 겨우살이에 대한 과학적인 평가가 필요한 시점에 이르렀다고 본다.

본 연구에서는 겨우살이의 항유전독성 활성을 측정하기 위하여 이전의 보고<sup>(33-34)</sup>에서 제시된 바 있는 DNA 손상도의 정량적인 방법인 Comet assay 법을 이용하여 겨우살이가 발암물질에 의해 인위적으로 유도되는 DNA 손상을 억제하는 효과를 측정함으로써 새로운 암 예방성 물질로서 겨우살이가 지니는 기능적 가치를 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 겨우살이

강원도 치악산에서 서식하고 있는 참나무를 숙주로 하는 겨우살이를 2월 중에 채집하여 잎과 줄기 부분을 혼합하여 사용하였으며, 채집된 겨우살이는 Park 등<sup>(24)</sup>의 방법에 따라 동일 부피의 중류수를 가하여 Waring blender(Dynamic, U.S.A.)로 균질화한 후, -50°C의 deep freezer(REVCO, U.S.A.)에서 실험에 사용하기 전까지 냉동보관하였다.

### 실험 세포주의 배양 및 보존

*In vitro* 항유전독성 실험을 위하여 mouse embryo 기원의 비종양성 3T3 세포주(ATCC CCL No.163)를 한국세포주은행으로부터 분양받아 사용하였으며 세포주의 배양 및 보존을 위해서는 Park 등<sup>(24)</sup>의 방법에 따라 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM,

Sigma, U.S.A.)에 foetal calf serum(Gibco, U.S.A.)을 10%, penicillin G(Sigma, U.S.A.) 100 unit/mL, streptomycin sulfate(Sigma, U.S.A.) 100 µg/mL을 첨가하여 사용하였으며, 직경 10 cm의 둥근 조직배양접시(Falcon, U.S.A.)에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>를 유지하는 습윤 배양기(Labline instrument, U.S.A.)로 배양을 실시하였고, 주 2회 정도로 계대를 실시하여, 20 계대를 넘기면 폐기하고 새로운 세포로 대체하여 실험에 이용하였다.

### 발암원

직접 발암원인 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)는 Fluka(Germany) 사로부터 구입하여 4°C에 냉장 보관하며 사용하였다.

### 분자량대별 겨우살이 분획의 제조 및 열처리

-50°C deep freezer에서 냉동된 겨우살이 균질액은 4°C 냉장고로 옮겨 하룻밤 방치하여 해동시켰으며 100 mL의 3차 중류수에 100 g을 첨가하여 최대속도로 1분간 4회 반복하여 Waring blender로 균질화하였고 12,000 rpm의 속도로 20분간 원심분리(Beckmann, U.S.A.)한 후, 그 상층액을 동결건조(Ilshin, Korea)하여 약 6.8 g의 짙은 갈색의 겨우살이 건조분말을 얻었다. 이 겨우살이 분말은 다시 10 mL의 3차 중류수에 녹여 molecular weight cut off(MWCO) 범위가 다른 4 종류의 dialysis tube(Spectrum, U.S.A.)에서 연이어 투석하여 분자량 14,000 이상의 겨우살이 추출물 분획 I, 8,000~14,000 사이의 분획 II, 3,500~8,000 사이의 분획 III 그리고 3,500 이하의 분획 IV와 같이 4 종류의 분획으로 분리하였으며 열처리에 따른 항유전독성의 변화를 살펴보기 위해서는 일정 농도로 녹인 겨우살이 분획을 끓는 물에 3시간의 증탕가열처리와 121°C에서 15분간 고압 열처리를 실시하였다.

### 유기용매 분획의 추출

겨우살이로부터 추출된 유기용매 분획들이 갖는 항유전독성 효과를 살펴보기 위하여 Mukhtar 등<sup>(35)</sup>의 방법에 따라 겨우살이 추출물을 chloroform과 ethyl acetate로 연이어 처리하여 각각의 분획을 얻었다. 즉 겨우살이 분획 1 g을 20 mL의 3차 중류수에 녹인 후, 4회 반복 2배량의 chloroform을 가하여 격렬하게 진탕시켜 chloroform 분획을 얻었고 상층의 수용액에 다시 2배량의 ethyl acetate를 4회 가하여 ethyl acetate 분획을 얻었으며 이들 모두 감압하여 농축한 후, 동결건조하고 항유전독성 실험에 사용하였다.

### Sephadex G-25 gel filtration chromatography

겨우살이 분획으로부터 활성성분을 탐색하기 위하여 1.5 g의 시료를 3 mL의 증류수에 녹이고 Sephadex G-25(Pharmacia, Sweden) resin이 충전된 column(2.6×100 cm)에서 이동상을 3차 증류수로 하여 gel permeation chromatography를 실시하였다. Column으로부터 용출되는 겨우살이 분획의 형태를 탐색하기 위하여 단백질과 당 분석을 하여 4개의 분획으로 나누었으며 이들이 갖는 항유전독성 효과를 측정하였다.

### In vitro comet assay

겨우살이의 항유전독성(antigenotoxicity) 효과에 대한 *in vitro* 실험은 Choi 등<sup>(34)</sup>의 방법을 일부 수정하여 다음과 같이 수행하였다. 겨우살이 분획을 일정농도로 녹인 HBSS 완충용액에 최종 0.5~1 µg/mL이 되도록 MNNG를 첨가한 후, 3T3 세포에 처리하였다. 한편 음성 대조구는 mL당 10 µL의 PBS 완충 용액이 첨가된 HBSS 용액을 사용하였고 양성 대조구로는 마찬가지로 MNNG가 0.5~1 µg이 되도록 첨가된 HBSS 용액을 실험에 이용하였다. 또한 항유전독성 효과의 메커니즘을 규명하기 위해서 발암물질과 겨우살이 추출물을 혼합한 후, 0.5~1시간동안 반응시키는 전배양(pre-incubation) 방법을 사용하여 37°C, 25 rpm의 속도로 진탕 항온기에서 처리하였다.

본 실험의 세포주로 사용된 비종양성 3T3 세포는 매 세포 계대시에 직경 3 cm의 둥근 조직 배양접시에  $1.0 \times 10^5$  cell/plate로 분주하여 48시간 동안 배양한 후, PBS 완충 용액(Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> free)으로 철저히 세척하고 겨우살이 분획 및 MNNG 혼합물로 교환한 다음, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>를 유지하는 습윤배양기에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 3T3 세포는 PBS 완충용액으로 다시 세척하고 농도 0.125 mg/mL인 proteinase K(Amresco, U.S.A.) 용액 100 µL로 처리하였으며 약 1 mL의 세포 배양액을 첨가하여 세포를 현탁시킨 후, 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 원심분리된 처리구별 3T3 세포 pellet은 육안으로 관찰하여 그 양에 따라서 150~200 µL의 세포 배양액에 재현탁하였으며 이중 10 µL를 항온 수조에서 40°C로 유지되던 PBS 완충용액에 녹아 있는 0.75% low melting point agarose (LMA) 용액 80 µL와 섞은 후, 즉시 0.5% normal melting point agarose가 precoating된 slide 위로 옮기고 coverglass를 사용하여 그 세포 현탁액이 골고루 분산되게 덮은 뒤, ice bath 위에 올려 놓아 굳혔다. 여기에 다시 0.75% LMA 용액 80 µL로 한층 더 덮어 마찬가지로 ice bath 위에서 굳혔으며 그 이후의 cell

lysis, electrophoresis, 형광염색 및 분석은 앞에 언급한 Choi 등의 방법과 동일하게 수행하였다. 겨우살이 추출물의 발암물질에 대한 DNA 손상억제정도를 측정하기 위해서는 tail 길이와 tail 내 DNA fragment의 농도를 수치화시킨 tail moment를 손상의 지표로 하였는데<sup>(36)</sup> 이는 tail moment의 수치가 증가할수록 그 손상의 정도가 증가함을 나타낸다.

한편 유기용매 분획의 항유전독성 효과를 측정하기 위해서, 건조된 유기용매 분획은 dimethylsulfoxide (DMSO)에 녹여 MNNG가 0.5~1 µg이 되도록 첨가된 HBSS 완충용액에 일정농도로 현탁시켰으며 이때 첨가된 DMSO의 농도는 1% 미만으로 하여 3T3 세포의 DNA 손상에 미칠 DMSO의 영향을 최소화하였다.

본 실험에 사용된 처리구들의 3T3 세포 생존율은 trypan blue exclusion test에 의해서 slide glass에 embedding하기 전에 측정하였다.

### 통계처리

겨우살이의 항유전독성 효과에 대한 유의성 검정을 위해서 Excel program(Microsoft, U.S.A.)의 t-test를 이용하였다.

## 결과 및 고찰

### 겨우살이 분획들의 세포독성 및 항유전독성 측정

본 실험에서는 겨우살이 추출물이 갖는 항유전독성 효과를 검색하기 위하여 겨우살이 조추출물을 분자량 크기에 따라서 14,000 이상 분획(I), 8,000~14,000 사이의 분획(II), 3,500~8,000 사이의 분획(III) 그리고 3,500 미만 분획(IV)으로 나누었다. 이중 분획 IV는 겨우살이 조추출물을 MWCO 3,500짜리 투석막으로 여과하여 얻어진 바깥 여액으로 그 회수율이 전체 겨우살이 조추출물의 약 85%를 차지하고 있는 저분자 분획이었으며, 분획 III는 그 안쪽의 투석액을 MWCO 8,000의 막에서 투석하여 얻어진 바깥쪽 여액이었다. 즉 분획 III는 분자량이 3,500~8,000의 범위로서 여기에는 분자량 5,000 정도로서 항종양 활성을 나타내는 것으로 알려져 있는 viscotoxin이 포함되어 있었으며, 분획 I은 MWCO 14,000의 막에서 투석하여 얻은 분자량 14,000 이상의 성분이 포함된 분획으로 여기에는 겨우살이의 주된 생리활성인 항종양 면역조절능을 나타내는 분자량 65,000 전후의 lectin이 존재하고 있다.

이들 각각의 분획에 대한 항유전독성을 검사하기에 앞서 세포독성을 우선 측정하였다. 그 결과, 분획 I, II, III는 모두 실험에 이용된 농도 이상에서 30 분간의 짧

**Table 1. Concentration limits of each fraction and their cytotoxicity for the measurement of antigenotoxicity on non-tumoral 3T3 cells**

Sample	Viability(%)	Tail moment
HBSS	96.1 ± 4.5	0.86 ± 0.32
MNNG	93.0 ± 3.8	8.70 ± 1.54
Fraction I(MW range over 14,000)		
0.5 mg	90.3 ± 4.0	7.08 ± 3.15
1.0 mg	86.5 ± 2.7*	7.23 ± 2.79
Fraction II(MW range 8,000~14,000)		
1.0 mg	94.5 ± 5.9	7.13 ± 2.76
2.5 mg	95.5 ± 4.2	7.03 ± 4.06
Fraction III(MW range 3,500~8,000)		
0.5 mg	94.5 ± 4.8	9.25 ± 2.66
1.0 mg	90.5 ± 3.6	9.61 ± 3.14
Fraction IV(MW range below 3,500)		
25.0 mg	97.3 ± 3.8	7.12 ± 1.12
50.0 mg	90.2 ± 3.8	5.85 ± 0.21**

\*p<0.05; \*\*p<0.01.

은 처리에 의해서도 심한 세포독성을 나타내어 항유전독성을 측정할 수가 없었다. 그러나 분획 IV의 경우에는 본 실험에 이용된 최고 분량인 50 mg에서도 세포독성이 없는 안전한 추출물이었다(Table 1). 다른 여러 연구자들의 보고에 의하면 겨우살이에는 세포독성을 나타내는 성분으로 lectin, viscotoxin 및 alkaloid 등이 존재하고 있으며 이 중 lectin이 가장 강한 세포독성을 지니고 있음이 알려져 있다<sup>(13,15,17)</sup>. 따라서 실험에 이용된 농도 이상에서 분획 I과 III의 세포독성효과는 아마도 이들 성분들의 작용에 의한 것으로 판단되었다. 특히 lectin과 viscotoxin은 면역증강 및 항종양 요법의 주된 성분으로써 현재 이용되고 있으나 강력한 세포독성을 나타내고 있기 때문에 이 성분들이 함유된 분획 I 및 III를 암 예방성 기능성 식품 소재로 이용하는 것은 그다지 바람직하지 않은 것으로 보인다. 이러한 문제를 극복하기 위해서는 겨우살이를 끓는 물에 우려내는 차나 탕재의 재료로 이용하는 것처럼 식품 소재로의 활용을 위해서는 lectin 단백질의 세포독성을 제거시키고 특정 성분의 활성을 상대적으로 드러나게 하거나<sup>(26)</sup> 본 실험에서처럼 투석이나 여과와 같은 방법을 이용하여 유효성분만을 분리하는 것도 가능할 것이다.

효능을 측정할 수 있는 최대 허용농도(세포독성이 나타나지 않는 최대 허용농도)에서 각 분획의 항유전독성을 측정하였을 때도 분자량 3,500 이하의 분획 IV만이 MNNG에 대한 DNA 손상억제효과를 나타내었으나 lectin 및 viscotoxin이 각각 포함된 분획 I 및 III

그리고 분획 II는 DNA 손상억제효과가 발견되지 않았다(Table 1). 한편, 겨우살이의 항변이원성에 관한 연구로 cyclophosphamide나 5-bromo-2-deoxyuridine를 처리한 인간의 임파구 세포에서 나타나는 염색분체 교환이상의 감소와<sup>(27-29)</sup> 외과적인 수술 후, 화학 및 방사선 요법과 같은 2차 치료를 받은 유방암 환자의 임파구에서 DNA 손상의 감소<sup>(30)</sup> 및 20-methylcholanthrene이 처리된 female albino mouse에서 겨우살이 발효 추출물에 의한 육종의 억제에 관한 보고<sup>(31)</sup>가 있으며 그러한 원인으로서 lectin에 의한 특정세포의 mitogenicity 유도능에 기인된 대사활성 촉진이 제기된 바 있다. 겨우살이 lectin은 T cell mitogen으로써 T 세포 증식 및 세포성 면역 유도를 촉진하는 특성을 가지고 있으며 phytohaemagglutinin(PHA)도 이 범주에 속한다. Andreoli 등<sup>(37)</sup>과 Kaminskas 등<sup>(38)</sup>에 따르면, 임파구 세포에 PHA의 처리는 DNA 복구활성에 관련된 효소의 활성유도촉진을 통해 benzene 대사산물과 oxygen radical에 의해 발생된 산화적인 DNA 손상을 더 효율적으로 복구시켰음이 발견되었다. 즉, 겨우살이 lectin과 같은 물질에 의해서 세포는 세포분열을 촉진하게 되고 세포내 대사 활성화를 통한 DNA 손상과 관련된 복구 기작을 작동시킬 수 있게 되는 것이다. 그러나 앞서의 결과와는 달리, 비록 *in vitro* 실험이었지만 lectin I이 포함된 분자량 14,000 이상의 분획 I은 실험에 이용된 농도에서 mouse embryo 기원의 비종양성 3T3 세포에 발암물질인 MNNG에 의한 DNA 손상을 전혀 감소시키지 못하였다. 이러한 결과는 본 연구에서 사용한 MNNG와 같은 S<sub>N</sub>1 type의 알킬화 발암물질인 N-methyl-nitrosourea(MNU)에 의한 DNA 알킬화 증가를 겨우살이 lectin I이 억제하지 못하였다는 Kunze 등의<sup>(39)</sup> 보고와 일치하는 것이었다. 따라서 PHA, concanavalin A(Con A)과 같이 겨우살이 lectin의 mitogenicity에 반응하는 임파구와 같은 특정 세포이외의 다른 계열의 세포에서 변이원에 의한 DNA 손상의 억제 및 복구촉진 그리고 후형질적 대사활성 변경의 최소화와 같은 특성을 갖는 화학적인 암예방에 대한 겨우살이 lectin의 활성은 보다 정제된 성분으로 앞으로 좀 더 상세히 연구되어야 그 특성의 규명이 이루어질 것으로 생각된다.

#### 겨우살이 저분자 분획에 의한 항유전독성 효과

겨우살이 분획 I, II 및 III의 결과와는 달리 분자량 3,500 이하 저분자 분획(IV)은 발암물질과 같이 섞여 즉시 세포에 처리하였을 때, MNNG를 단독 처리한 양성 대조구와 비교하여 점차 DNA 손상의 억제가 증가

**Fig. 1. Inhibitory effect of low molecular weight fraction on DNA damage induced by MNNG in non-tumoral 3T3 cells without(A) and with (B) pre-incubation for 30 min.**

하였으며 50 mg/mL 처리구에서 유의성 있는 DNA 손상억제효과가 있었다( $p < 0.01$ , Fig. 1A). 또한 보다 낮은 농도(10 mg/mL)의 겨우살이 저분자 분획을 MNNG와 30분간 전반응시키고 3T3 세포에 처리하였을 때에는 더 강한 효과를 얻을 수 있었다( $p < 0.01$ , Fig. 1B). 이는 전반응시간에 따라서 겨우살이의 직접적인 화학적 작용에 의한 MNNG 발암성의 불활성화에 그 원인이 있는 것으로 사료되었다. 본 연구에서 얻어진 겨우살이 저분자 분획의 항유전독성은 앞에서 언급한 lectin 이외의 다른 성분에서 발견된 새로운 결과로써 위암 발생과 관련된 발암물질인 MNNG를 겨우살이가 불활성화시키고 있음을 나타내는 것으로 현재 한국인에게 가장 많이 발생하고 있는 암이 위암인<sup>(40)</sup> 현실을 고려해 볼 때, 암예방성 드링크 소재로써 그 이용성이 높은 것으로 판단되었다. 기능성 식품소재로 천연식품 추출물의 이용측면에서도 겨우살이 추출물을 투석 및 여과와 같은 단일의 가공공정을 거쳐 생리활성을 나타내는 저분자 분획을 대량생산할 수 있을 것이며 이러한 분리공정에 의해서 멸균효과를 거둘 수도 있어 저장성의 문제도 해결할 수 있을 것이라 보여진다.

세포 생존율을 볼 때 50 mg/mL 까지의 겨우살이 저분자 분획의 농도에서 90% 이상이었음을 나타내었으나 그 이상의 농도에서는 세포의 생존율이 점차 감소되기 시작하였는데, 이는 현미경으로 관찰해본 결과 겨우살이 추출물 자체의 세포독성에 기인되는 것이 아니라 세포에 처리된 겨우살이 양의 증가로 인한 정상적인 막기능의 상실과 동반된 막붕괴가 원인이 된 세포의 죽음으로 추정되었다. 한편 Comet assay에서 DNA 손상의 척도인 tail moment의 증가를 나타낸 현

**Fig. 2. Inhibitory effect of heat-treated low molecular weight fraction on DNA damage induced by MNNG in non-tumoral 3T3 cells with 1hr pre-incubation.**

상은 DNA와 겨우살이 성분에 의한 직접적인 접촉증가에 의한 손상의 증가이거나 세포내 nucleosome의 degradation을 일으켜 2가 금속 양이온 의존형 endonuclease의 유출을 가져와 DNA 손상의 증대를 가져올 수 있는 것<sup>(41,42)</sup>으로 추측되었다.

#### 열처리된 겨우살이 저분자 분획의 항유전독성 효과

10 mg/mL의 열처리된 겨우살이 저분자 분획은 같은 농도의 열처리하지 않은 추출물의 항유전독성 활성보다 어느 정도는 그 효과가 떨어짐을 나타내었으나 3시간의 장기간 열처리에 의해서도 그 활성은 유의성이 있었다( $p < 0.05$ , Fig. 2). 이는 겨우살이의 chloroform 추출성분중의 하나인 alkaloid 등과 같은 열에 안정한 화합물<sup>(26)</sup>에 의해서 그 활성이 유지되고 있음을 나타내는 결과로 생각되며 동양에서처럼 보편적으로 차나 탕재의 재료로 겨우살이를 끓는 물에 우려내어 음용할 경우에 있어서 암예방 효과에 기여할 것으로 추측되었다. 그러나 겨우살이 저분자 분획을 고압 열처리하였을 때에는 MNNG의 DNA 손상을 미약하게나마 증가시키는 경향이 관찰되었다. 따라서 고압 열처리는 겨우살이가 갖는 항유전독성효과를 불활성화시키고 오히려 DNA 손상을 유도하는 물질을 생성할 수 있는 것으로 사료되었다.

#### 유기용매 분획의 항유전독성 효과

겨우살이 저분자 분획이 *in vitro*에서 나타내는 항유전독성 효과가 어떤 phase에서 존재하는지를 확인하기 위하여 겨우살이 저분자 분획을 chloroform 그리고 ethyl acetate 순으로 처리하여 각각의 추출물을 얻었으

**Fig. 3. Inhibitory effect of organic extracts from low molecular weight fraction on DNA damage induced by MNNG in non-tumoral 3T3 cells with 1hr pre-incubation.**

며 이들의 항유전독성을 검색하였다. 이들 처리구 중 chloroform 추출물을 2.5 mg 처리(1 시간동안 전배양) 하였을 때에만 실험 대조구인 10 mg의 겨우살이 저분자 분획(KM)의 활성과 비슷한 유의적인 효과를 나타낼 뿐( $p < 0.01$ ) 그 외의 chloroform 추출물 0.1 mg, ethyl acetate 추출물 0.12 mg 및 2.9 mg에서는 전혀 활성이 나타나지 않았다(Fig. 3). 한편, 유기용매 추출물들의 회수율을 환산하여 비교하였을 때, chloroform 추출물과 ethyl acetate 추출물의 평균 회수율은 각각 1.0%, 1.2%였다. 즉, chloroform 추출물 1 mg은 겨우살이 저분자 분획 100 mg에 해당되는 양으로 추정되었다. 따라서 유의적인 효과를 나타낸 chloroform 추출물 2.5 mg은 겨우살이 저분자 분획 약 250 mg에 해당되는 양이기 때문에 겨우살이 저분자 분획이 나타내는 전체 항유전독성 효과에 있어서 chloroform 추출성분이 차지하는 비율은 극히 미미하며 수용성 성분에 의한 활성이 주로 작용하고 있는 것으로 사료되었다.

#### Sephadex G-25 gel filtration chromatography

겨우살이 저분자 분획으로부터 활성 물질을 분리하기 위한 방법으로 분자량 1,000~5,000의 fractionation range를 갖는 Sephadex G-25 resins를 이용하였으며 이로부터 4 개의 분획을 얻었다(Fig. 4A). 이 중 G 4 분획의 항유전독성 효과는 양성대조구인 5 mg의 겨우살이 저분자 분획의 결과와 비교하였을 때, 가장 좋았음을 관찰하였으며(Fig. 4B) 이 분획이 Sephadex G-25 column에서 가장 늦게 용출되는 것을 고려할 때, 그 분자량은 1,000 미만인 것으로 추정되었다. 결국 항유전독성을 나타내는 겨우살이 성분중의 하나가 저분자 물질임을 확인 할 수 있었으며 계속해서 이 물질의 정

**Fig. 4. Sephadex G25 gel filtration chromatogram (A) of low molecular weight fraction and antigenotoxic effect (B) of pooled subfractions.**

제 및 동정에 대한 연구를 진행하고자 하고 있다.

## 요 약

본 연구에서는 Comet assay를 이용해서 차 및 전통 약재로 사용하고 있는 한국산 겨우살이의 항유전독성을 측정하고자 하였다. 겨우살이 조추출물을 분자량에 따라 14,000 이상 분획(I), 8,000~14,000의 분획(II), 3,500~8,000 분획(III) 그리고 3,500 이하 분획(IV)으로 분리하였다. 이중 분획 IV만이 비종양성 3T3 세포에서 농도에 따른 MNNG에 의한 DNA 손상을 감소시켰으며 겨우살이 lectin과 viscotoxin이 포함된 분획 I, III은 활성을 전혀 나타내지 않았다. 열처리에 의해서도 분획 IV는 시간이 지남에 따라서 활성이 약간 감소됨을 나타내었으나 여전히 유의적인 효과를 지니고 있었다. 겨우살이 분획 IV로부터 얻어진 유기용매 분획의 항유전독성 평가결과, 분획 IV의 항유전독성은 주로 수용성 물질에 의해 나타나는 것임을 알 수 있었다. Sephadex G-25 gel filtration chromatography에서, 겨우살이 분획 IV의 항유전독성에 기여하는 성분은 분자량 1,000 미만의 수용성 물질이었으며 이 저분자량

물질을 분리해내어 암 예방을 위한 기능성 식품소재로써 이용할 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 1998년 과학기술기초 중점연구 지원사업으로 "Comet assay를 이용한 전통발효 식품인 김치와 한국산 겨우살이의 항유전독성 연구" 결과의 일부이며 연구비를 지원해준 한국학술진흥재단에 깊이 감사드립니다.

## 문헌

1. Becker, H. Botany of European mistletoe. *Oncology* 43(suppl.1): 2-7 (1986)
2. Paine, L.K. and Harrison, H.C. Mistletoe: its role in horticulture and human life. *Hort. Technol.* 2: 324-330 (1992)
3. Kanner, L. Mistletoe, magic and medicine. *Bull. Hist. Med.* 7: 75-936 (1939)
4. Gill, L.S. and Hawksworth, F.G. The mistletoe: a literature review. U.S. Dept. Agr. Tech. Bull., 1242, US Government Printing Office, Washington, DC, USA (1961)
5. Huang, K.C. Section III, Cardiovascular system, pp. 89-91. In: *The pharmacology of Chinese Herbs*. Huang, K.C. (eds.). CRC Press, Boca Raton, FL, USA (1961)
6. Huelsen, H., Doser, C. and Mechelke, F. Differences in the *in vitro* effectiveness of preparations produced from mistletoes of various host trees. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 36: 433-436 (1986)
7. Doser, C., Doser, M., Huelsen, H. and Mechelke, F. Influence of carbohydrates on the cytotoxicity of an aqueous mistletoe drug and of purified mistletoe lectins tested on human T-leukemia cells. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 39: 647-651 (1989)
8. Khwaja, T.A., Dias, C.B. and Pentecost, S. Recent studies on the anticancer activities mistletoe(*Viscum album*) and its alkaloids. *Oncology* 43(suppl.1): 42-50 (1986)
9. Ribereau-Gayon, G., Jung, M.-L., Baudino, S., Salle, G. and Beck, J.-P. Effects of mistletoe(*Viscum album* L.) extract on cultured tumor cells. *Experientia* 42: 594-599 (1986a)
10. Ribereau-Gayon, G., Jung, M.-L., Di Scala, D. and Beck, J.-P. Comparison of the effects of fermented and unfermented mistletoe preparations on cultured tumor cells. *Oncology* 43(suppl.1): 35-41 (1986b)
11. Kuttan, G., Vasudevan, D.M. and Kuttan, R. Effect of a preparation from *Viscum album* on tumor development *in vitro* and in mice. *J. Ethnopharmacol.* 29: 35-41 (1990)
12. Hajto, T., Hostanska, K., Frei, K., Rordorf, C. and Gabius, H.J. Increased secretion of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to  $\beta$ -galactoside specific lectin from clinically applied mistletoe extract. *Cancer Res.* 50: 3322-3326 (1990)
13. Bocci, V. Mistletoe(*Viscum album*) lectins as cytokine inducers and immunoadjuvant in tumor therapy, a review. *J. Biol. Regul. Homeo. Agents* 7: 1-6 (1993)
14. Joller, P.W., Menrad, J.M., Schwarz, T., Pfueller, U., Parnham, M.J., Weyhenmeyer, R. and Lentzen, H. Stimulation of cytokine production via a special standardized mistletoe preparation in an *in vitro* human skin bioassay. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 46: 649-653 (1996)
15. Hajto, T., Hostanska, K. and Gabius, H.J. Modulatory potency of the  $\beta$ -galactoside-specific lectin from mistletoe extract(Iscador) on the host defense system *in vivo* in rabbits and patients. *Cancer Res.* 49: 4803-4808 (1989)
16. Schink, M. Mistletoe therapy for human cancer: the role of the natural killer cells. *Anti-Cancer Drugs* 8(suppl.): s47-s51 (1997)
17. Ribereau-Gayon, G., Dumont, S., Muller, C., Jung, M.L., Poindron, P. and Anton, R. Mistletoe lectins I, II and III induce the production of cytokines by cultured human monocytes. *Cancer Lett.* 109: 33-38 (1996)
18. Park, W.B. and Kim, H.S. Changes of lectin from *Viscum album coloratum* by fermentation with *Lactobacillus plantarum*: isolation and purification. *J. Pharm. Soc. Korea* 38: 687-695 (1994)
19. Yoon T.J., Yoo Y.C., Kang, T.B., Do, M.S., Suh, B.S., Azuma, L., and Kim, J.B. Immunological activities of Korean mistletoe extract(*Viscum album coloratum*: KM-110). *Korean J. Immunol.* 19: 571-581 (1997)
20. Yoon, T.J., Yoo, Y.C., Choi, O.B., Do, M.S., Kang, T.B., Lee, S.W., Azuma, I. and Kim, J.B. Inhibitory effect of Korean mistletoe extract on tumor angiogenesis and metastasis of haematogenous and non-haematogenous tumor cells in mice. *Cancer Lett.* 97: 83-91 (1995)
21. Park, W.B., Ju, Y.J. and Han S.K. Isolation and characterization of beta-galactoside specific lectin from Korean mistletoe(*Viscum album var. coloratum*) with lactose-BSA-sepharose 4B and changes of lectin conformation. *Arch. Pharm. Res.* 21: 429-435 (1998)
22. Lee, H.S., Kim Y.S., Kim, S.B., Choi, B.E., Woo, B.H. and Lee, K.C. Isolation and characterization of biologically active lectin from Korean mistletoe, *Viscum album var. coloratum*. *Cell Mol. Life Sci.* 55: 679-682 (1999)
23. Yoon T.J., Yoo Y.C., Kang, T.B., Shimazaki, K., Song, S.K., Lee, K.H., Kim, S.H., Park, C.H., Azuma, I. and Kim, J.B. Lectin isolated from Korean mistletoe(*Viscum album coloratum*) induce apoptosis in tumor cells. *Cancer Lett.* 136: 33-40 (1999)
24. Park, J.H., Hyun, C.K., Shin, H.K. and Yeo, I.H. Effects of heat treatment, sugar addition and fermentation on cytotoxicity of Korean mistletoe. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29: 362-368 (1997)
25. Park, J.H., Hyun, C.K. and Shin, H.K. Cytotoxicity of

- heat-treated Korean mistletoe. *Cancer Lett.* 126: 43-48 (1998)
26. Park, J.H., Hyun, C.K. and Shin, H.K. Cytotoxic effects of the components in heat-treated mistletoe(*Viscum album*). *Cancer Lett.* 139: 207-213 (1999)
  27. Buessing, A., Azhari, T., Ostendorp, H., Lehnert, A. and Schweizer, K. *Viscum album* L. extract reduce sister chromatid exchanges in cultured peripheral blood mononuclear cells. *Eur. J. Cancer* 30: 1835-1841 (1994)
  28. Buessing, A., Lehnert, A., Schink, M., Mertens, R. and Schweizer, K. Effect of *Viscum album* L. on rapidly proliferating amniotic fluid cells. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 45: 81-83 (1995a)
  29. Buessing, A., Regnery, A. and Schweizer K. Effects of *Viscum album* L. on cyclophosphamide-treated peripheral blood mononuclear cells *in vitro*: sister chromatid exchanges and activation, proliferation marker expression. *Cancer Lett.* 94: 199-205 (1995b)
  30. Kovacs, E., Hajto, T. and Hostanska, K. Improvement of DNA repair in lymphocytes of breast cancer patients treated with *Viscum album* extract(Iscador). *Eur. J. Cancer* 27: 1672-1676 (1991)
  31. Kuttan, G., Menon, L.G. and Kuttan, R. Prevention of 20-methylcholanthrene-induced sarcoma by a mistletoe extract, Iscador. *Carcinogenesis* 17: 1107-1109 (1996)
  32. Mengs, U., Clare, C. and Poiley, J.A. Genotoxicity testing of an aqueous mistletoe extract *in vitro*. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 47: 316-319 (1997)
  33. Ji, S.T., Park, J.H., Choi, O.B., Hyun, C.K. and Shin, H.K. Antigenotoxic effect of lactic acid bacteria *in vitro* in the primary colon cells of sprague-Dawley rat. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 19: 10-18 (1999)
  34. Choi, J.W., Park, J.H. Ji, S.T., Choi, O.B. and Shin H.K. Antigenotoxic effect of dominant bacteria isolates from Kimchi *in vitro*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31: 1071-1076 (1999)
  35. Mukhtar, H., Wang, Z.Y., Katiyar, S.K. and Agarwal, R. Tea components: antimutagenic and anticarcinogenic effects. *Prev. Med.* 21: 351-360 (1992)
  36. Hellman, B., Vaghof, H. and Bostroem, B. The concepts of tail moment and inertia in the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat. Res.* 336: 123-131 (1995)
  37. Andreoli, C., Leopardi, P. and Crebelli, R. Detection of DNA damage in human lymphocytes by alkaline single cell gel electrophoresis after exposure to benzene or benzene metabolites. *Mutat. Res.* 377: 95-104 (1997)
  38. Kaminskias, E. and Li, J.C. Repair of DNA damage induced by oxygen radicals in human non-proliferating and proliferating lymphocytes. *Mutat. Res.* 274: 103-110 (1992)
  39. Kunze, E., Schulz, H. and Gabius, H.J. Inability of galactoside-specific mistletoe lectin to inhibit N-methyl-N-nitrosourea-induced tumor development in the urinary bladder of rats and to mediate a local cellular immune response after long-term administration. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 124: 73-87 (1998)
  40. Ahn, Y.O. Diet and stomach cancers in Korea. *Int. J. Cancer* 10(suppl.): 7-9 (1997)
  41. Lei, Y. and Kwok, H.S. Micrococcal nuclease(endonuclease) digestion causes apoptosis and mitotic catastrophe with interphase chromosome condensation in human Chang liver cells. *Cell Death Differ.* 4: 796-805 (1997)
  42. Kaminskias, E. and Li, J.C. DNA fragmentation in permeabilized cells and nuclei. *Biochem. J.* 261: 17-21 (1989)

---

(1999년 11월 29일 접수)