

# 皂角刺의 抗突然變異 및 抗酸化 活性에 관한 研究

이신규, 신정인, 서운교, 정지천

동국대학교 한의과대학 내과학교실

## A Study on Activities of Antioxidant and Antimutagenicity of the Extracts from *Gleditsia sinensis*

Shin-Kyu Lee, Jeong-In Shin, Un-Kyo Seo, Ji-Cheon Jeong

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Against the mutagen MNNG and NOPD with SOS chromotest, the antigenotoxic activity of MeOH-soluble extract was much more effective than that of the water-soluble one. When the extract was added to the certain concentration, the antigenotoxic activity was enhanced. Against the mutagen NOPD with Ames test, the antimutagenic activity of MeOH-soluble extract was better than that of the water-soluble one. The 60.4% of the inhibition ratio for the revertant colony-forming unit was shown at 5 mg of MeOH-soluble extract per plate.

Antimutagenicity test with SOS chromotest and Ames test were performed using water-soluble and MeOH-soluble extracts from of *Gleditsia sinensis*. The antioxidant activity of MeOH-soluble extract with the NBT method was higher than that of the water-soluble one.

**Key Word :** MNNG and NOPD, antimutagenic activity, *Gleditsia sinensis*, antioxidant activity

### I. 緒 論

최근 천연물의 抗突然變異 활성에 대한 관심이 증가하면서 이에 관한 연구가 많이 보고되고 있다. 이 가운데 무즙, 쑥, 메밀 등과 같은 식용 및 약용식물<sup>1,4</sup>의 항변이활성<sup>5,7</sup>에 관한 연구가 주로 검토되었으며 들연변이 억제 성분으로는 flavonoid<sup>8-11</sup> 성분이 대부분이고 기타성분에 대한 보고<sup>12</sup>도 있다.

癌과 突然變異는 서로 밀접한 상관관계가 있는데 현재까지 알려진 발암물질의 85% 이상은 突然變異源이며 비발암성물질의 경우에도 10% 이하가 突然變異源으로 작용한다는 연구결과도 있다.<sup>12</sup>

지금까지 천연물로부터 抗突然變異 활성을 검색하기 위하여 개발된 여러 가지 방법 중에서 Ames test<sup>13,14</sup>가 가장 많이 사용되어 왔으며 抗突然變異 활성을 보다 정확히 측정하기 위하여 최근에는 SOS chromotest<sup>15</sup>도 병행되어 사용하고 있다.

또한 인간을 포함하는 모든 생물의 호기적 에너지 대사과정중의 산소가 體內酵素系, 還元代謝, 化學藥品, 公害物質, 光化學反應 등의 각종 물리적, 화학적 요인 등에 의하여 superoxide radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, singlet oxygen와 같은 반응성이 매우 큰 활성산소(active oxygen)로 전환되어 생체에 치명적인 산소독성을 일으키

는데<sup>16-17</sup> 세포구성 성분들인 지질, 단백질, 당, DNA 등에 대하여 비선택적, 비가역적인 파괴작용을 함으로써 癌을 비롯한 腦卒中, 파킨슨병 등의 腦疾患과 心腸疾患, 虛血, 動脈硬化, 消化器疾患, 炎症, 류마티스, 自己免疫疾患 등의 각종 질병 및 노화를 일으키는 것으로 알려져 있다.<sup>18-20</sup>

皂角刺는 콩과(Leguminosae)에 속하는 皂角樹(*Gleditsia sinensis* Lam.)의 莖枝의 銳利한 가시로서 消腫排膿, 祛風殺蟲 및 敗毒抗癌 등의 효능이 있어서 肺癌, 肝癌, 乳房癌, 子宮癌, 食道癌 등에 광범위하게 응용하고 있으며,<sup>21-26</sup> 이에 대한 實驗研究로는 常<sup>27-28</sup> 등이 mouse의 Sarcoma-180에 대해서 억제 작용이 있다고 하였으며, 朴<sup>29</sup>은 cyclooxygenase의 活性 抑制效果와 抗炎症作用이 强하다고 보고하였다.

이에 저자는 皂角刺의 열수 추출물과 메탄을 추출물을 제조하여 抗突然變異 및 抗酸化 활성을 시험하여 유의성이 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實驗 材料 및 方法

### 1. 材料

#### 1) 藥材

皂角刺(*Gleditsia sinensis* Lam.)는 동국대학교 부속 한방병원에서 구입하여 정선하고 細切하여 사용하였다.

#### 2) 細菌 및 試藥

##### ① 公試 菌株

抗突然變異 實驗에 사용된 菌株는 *Salmonella typhimurium* TA100(*his* G46 *rfa-uvrB*)으로 한국과학기술연구원 생명공학연구소 유전자은행으로부터 分讓받아 사용하였다. SOS chromotest를 위하여 사용한 *Escherichia coli* PQ37 (*sfIA::Mud(Ap lac)cts lac Δ* U169 *mat<sup>r</sup>, uvrA, galE galY, PhoC, rfa*)는 동국대학교 자연과학대학 생물학과 미생물실험실로부터 공급받아 사용하였다.

Ames test를 利用한 皂角刺의 antimutagenicity 실험은 營養源으로 아미노산 histidine을 生合成할 수 없어 最小寒天培地에서 스스로 生長할 수 없는 *S. typhimurium* TA100 細菌 菌株를 이용하였다. 각 突然變異源에 의하여 생성되는 復歸變異株 colony 수를 결정하여, 皂角刺 각 抽出物이 어느 정도 突然變異를 억제하여 復歸 變異株의 출현을 억제하는가의 방법을 活用하여 수행하였다.

##### ② 試藥

突然變異源으로 사용된 4-nitro-1,2-phenylenediamine(NOPD)와 *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine(MNNG)는 Fluka사로부터 구입

하였으며 蒸溜水에 녹여 사용하였다.  $\beta$ -galactosidase, alkaline phosphatase, EDTA, cyanide, ascorbic acid, *o*-nitrophenyl- $\beta$ -galactoside, *p*-nitrophenyl phosphate, sodium dodecyl sulfate,  $\beta$ -mercaptoethanol, nitrobenzene tetrazolium과 緩衝溶液에 필요한 試藥은 Sigma사 제품을, 배지제조에 필요한 試藥은 Difco사 제품을 구입하여 사용하였다.

#### 3) 機器 및 裝置

皂角刺의 열수 및 메탄을 抽出物의 製造를 위하여 Eyla社의 Rotary evaporator(NE-1S) 減壓濃縮機를 이용하여 농축하였고, Ilsin社의 Bondiro(FD 5505)을 이용하여 동결건조하였다. 배지의 製造, 滅菌, 培養, 角刺의 추출을 위하여 사용한 기기는 국산제작기기를 사용하였다.

抗酸化 및 抗突然變異能의 측정을 위하여 分光光度計(UV-160A spectrophotometer)는 日本 Shimadzu사 제품을 사용하였다.

## 2. 方法

### 1) 열수 및 메탄을 皂角刺 抽出物 檢液의 製造

乾燥重量 100g에 蒸溜水 300~900 ml를 첨가하여 121°C 重湯器에서 3시간 동안 重湯, 抽出하였다. 重湯液을 여과한 후, 減壓濃縮機에서 濾液이 50 ml이 되도록 농축하였다. 凍結乾燥(-50°C, 9 mm Torr)한 후, 乾燥粉末을 얻어 試藥로 사용하였다. 메탄을 抽出物의 製造는 메탄을 용매로 condenser가 부착된 soxhlet을 사용하여 추출한 조건 이외에는 열수 抽出物의 製造 방법과 같았다.

### 2) 皂角刺 抽出物의 antigenotoxicity 활성 측정

사용한 SOS chromotest는 Quillardet 등의 방법<sup>15</sup>을 변형하여 수행하였다.

#### ① 公試 菌株의 培養

前 培養된 1.0 ml의 *E. coli* PQ37을 100 ml의 LB medium(조성; bacto yeast extract 0.5%, bacto tryptone 1.0%, NaCl 1.0%)에 접종하여 37°C에서 4시간 동안 660 nm에서의 濁도가 0.8~0.9에 이르도록 진탕배양하였다.

#### ② Antigenotoxicity 활성의 측정

시험관에 배양된 *E. coli* PQ37 배양액 600  $\mu$ l, 각 突然變異源(1.0 mg/ml) 30  $\mu$ l, 열수 및 메탄을 추출물(10 mg/ml)을 0, 100, 300, 500  $\mu$ l를 첨가한 후 SOS 반응을 유도하였다. 37°C에서 2시간 동안 定置한 후,  $\beta$ -galactosidase와 alkaline phosphatase 효소 활성을 측정하였다.

#### · $\beta$ -galactosidase 효소 활성

$\beta$ -galactosidase 효소 활성은 2.7 ml의 B 완충액(조성; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 16.1 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5.5 g, KCl 0.75 g, MgSO<sub>4</sub> 0.25 g, SDS 1.0 g,  $\beta$ -mercaptoethanol 2.7 ml, 증류수 1,000 ml, pH 7.0)을 넣어 37°C에서 10분간 정치하여 온도를 균일화시킨 다음, 0.6 ml의 *o*-nitrophenyl- $\beta$ -galactoside 용액(ONPG 4.0 mg/ml in phosphate buffer (pH 7.4))을 첨가하여 10분간 發色反應을 유지하였다. 2.0 ml의 2.0 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액을 첨가하여 반응을 정지시킨 후, 420 nm에서의 吸光度를 측정하였다.

#### · Alkaline phosphatase 효소 활성

Alkaline phosphatase 효소 활성은 B 완충액 대신에 P 완충액(조성: Tris base 121 g, SDS 1.0 g, 증류수 1,000 ml, pH 8.8)을 ONPG 용액 대신에 *p*-nitrophenyl phosphate 용액(PNPP

4.0 mg/ml)을 사용한 것 이외에는 β-galactosidase 효소 활성의 측정과 동일한 방법으로 수행하였다. 효소반응의 정지를 위하여 1.0 ml의 2.5 M HCl를 첨가한 다음 10분 동안 定置하고, 1.0 ml의 2.0 M Tris-HCl buffer를 첨가하였다.

· 효소 활성의 결정

각 효소의 활성(unit)은 반응이 종료된 후 측정된 420 nm에서의 吸光度에 1000을 곱한 후 반응시간으로 나눈 값을 1 unit로 정의하였다.

· R 및 induction factor(IF)의 결정

Ratio(R)값은 β-galactosidase unit를 alkaline phosphatase unit로 나눈 값으로 정의하였다.

SOS 반응의 유도 정도를 나타내는 誘導指數(induction factor; IF)는 추출물 시료를 첨가한 시험구의 각 濃度別 R 값(Rc)을 抽出物 試料가 첨가되지 않은 R 값(Ro)으로 나눈 값으로 정의하였다.

3) 皂角刺 抽出物의 Ames test에 의한 抗突然變異 活性的 측정

突然變異源 NOPD를 이용하여 Maron과 Ames의 방법<sup>13)</sup>을 변형하여 사용하였다.

① 公試 菌株의 배양

24시간 전 배양된 *S. typhimurium* TA100 1.0 ml을 100 ml의 LB medium에 접종하였다. 37℃에서 4시간 진탕배양한 후, 1/10로 희석하여 사용하였다.

② 抗突然變異(antimutagenicity) 活性的 측정

멸균된 cap tube에 희석된 100 μl의 菌株液, 520 μl의 0.2 M phosphate buffer(pH 7.4), 각각 0, 100, 300, 500 μl의 열수 및 메탄을 皂角刺 抽出物(10

mg/ml), 50 μl의 突然變異源 溶液(1.0 mg/ml)을 혼합한 다음, vortex하여 37℃에서 30분간 定置하였다(Table 2). 이 혼합액에 200 μl의 HB 용액을 첨가한 후 3초간 vortex하였다. 이 혼합한 용액에 45℃의 2.0 ml TA를 첨가하였다. 上記의 방법으로 제조된 최종 혼합액을 미리 제조된 20 ml의 MGA에 골고루 도말하였다. 도말된 한천배지를 37℃에서 48시간 배양한 다음 출현하는 復歸 colony수(revertant CFU/plate)를 측정하였다. 皂角刺 抽出物에 의하여 억제된 突然變異-誘發-抑制率(IRR, %)은 Table 1의 식에 의하여 구하였다.

4) 皂角刺 抽出物의 公試 細菌에 대한 細胞毒性(cytotoxicity) 實驗

실험에 사용된 *S. typhimurium* TA100 및 *E. coli* PQ37에 대한 열수 및 메탄을 추출물의 細胞毒性(cytotoxicity)을 측정하였다. LB medium에 4시간 동안 前 배양한 *S. typhimurium* TA100을 10-4배로 희석하였다. 각 추

출물이 濃度別로 첨가된 LB agar plate(0~2.5 mg/tube)에 희석된 細菌液 100 μl를 도말하여 24시간 동안 배양하였다.

5) 皂角刺 抽出物의 抗酸化 活性

抗酸化 活性的 측정은 Winterbourn의 NBT법<sup>30)</sup>을 변형하여 사용하였다.

· 抗酸化 活性的 측정

1.0 ml photo-cell에 870 μl의 40 mM Tri-HCl(pH 7.5) buffer, 66 μl의 EDTA/cyanide, 33 μl의 NBT를 혼합하였다. 혼합액에 33 μl의 각 皂角刺 抽出물(1.0 mg/ml)을 넣은 다음 3회 흔들어서 주었다. 혼합액에 일정한 光源(백열등(110V, 60W), L = 22 cm, 4,400 lux)를 照射하였다. 항산화 활성도는 光照射 후 光酸化(photo-activation)에 기인하는 活性酸素에 의한 色度變化를 560 nm에서 1분 간격으로 6분간 측정하였다. 光酸化 活性도는 1분당 吸光度의 증가량으로 결정하였다.

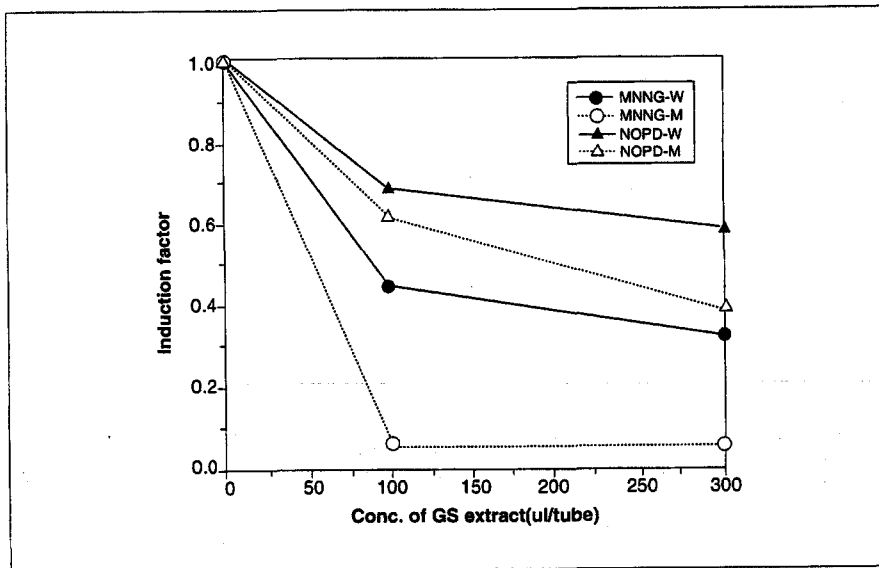
· 試料의 抗酸化 活性度(antioxidant

Table 1. Calculation of enzyme activities and factors for antioxidation and antimutagenesis.

Test	Enzyme activity and calculation
Antioxidation	<b>Unit = (blank/sample) · 1</b> * blank = rate of AOA with D.W. * sample = rate of AOA with sample
SOS	Activity of β-galactosidase and alkaline phosphatase <b>1 unit = 1,000 x A420/t</b> * A420 = absorbance at 420 nm after reaction * t = reaction time (min)
chromo	<b>Ratio(R) = unit of G/unit of AP</b> * G = β-galactosidase activity * AP = alkaline phosphatase activity
Anti-mutagenesis	<b>Induction factor (IF) = Rc/Ro</b> * Rc = R at various conc. of sample * Ro = R at no sample
Ames test	<b>Inhibition ratio of revertant (IRR)</b> <b>= [1-(CFU<sub>sm</sub>-CFU<sub>sp</sub>)/(CFU<sub>mt</sub>-CFU<sub>sp</sub>)] x 100 (%)</b> * CFU <sub>sm</sub> = revertant CFU w/sample+mutagen * CFU <sub>mt</sub> = revertant CFU w/mutagen * CFU <sub>sp</sub> = spontaneous revertant CFU

**Table 2.** Composition of media and solutions for antimutagenic Ames test.

Medium and solution	Composition
Trace histidine-biotin solution(HB sol'n)	d-biotin 30.9 mg, L-histidine 24.0 mg, D.W. 250 ml.
Top agar(TA)	NaCl 5 g, agar 6 g, D.W. 1,000 ml.
Minimal glucose agar plate(MGA)	* 50X VB solution 20 ml, 40% glucose 50 ml, agar 15 g, D.W. 930 ml.
* 50X Vogel-Bonner medium E (VB)	MgSO <sub>4</sub> 10 g, citric acid 100 g, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 500 g, Na(NH <sub>4</sub> )PO <sub>4</sub> 175 g, D.W. 670 ml.



**Fig. 1.** Induction factor of the water-soluble and MeOH-soluble extracts from *Gleditsia sinensis* against the mutagens, MNNG and NOPD.

**Table 3.** Activities of  $\beta$ -galactosidase and alkaline phosphatase for antigenotoxicity of mutagen (MNNG) with the water-soluble extract of *Gleditsia sinensis*.

Conc. of extract ( $\mu$ l/tube)	Unit of color effect	$\beta$ -Galactosidase(Unit)		Alkaline phosphatase(Unit)	
		Activity measured	Activity calculated	Activity measured	Activity calculated
0	0	12.61 $\pm$ 0.40	12.61	7.72 $\pm$ 0.23	7.72
100	7.5	15.52 $\pm$ 0.49	8.02	18.71 $\pm$ 0.39	11.21
300	20.4	23.08 $\pm$ 1.73	2.68	25.54 $\pm$ 2.27	5.14
500	33.9	34.83 $\pm$ 1.23	0.9	35.27 $\pm$ 3.51	1.37

**Table 4.** Activities of  $\beta$ -galactosidase and alkaline phosphatase for antigenotoxicity of mutagen (MNNG) with the MeOH-soluble extract of *Gleditsia sinensis*.

Conc. of extract ( $\mu$ l/tube)	Unit of color effect	$\beta$ -Galactosidase(Unit)		Alkaline phosphatase(Unit)	
		Activity measured	Activity calculated	Activity measured	Activity calculated
0	0	15.71 $\pm$ 1.20	15.71	8.11 $\pm$ 0.99	8.11
100	27.9	29.38 $\pm$ 1.48	1.48	33.69 $\pm$ 0.35	5.79
300	62.8	66.25 $\pm$ 3.45	3.45	94.18 $\pm$ 4.47	31.38
500	77.1	105.7 $\pm$ 3.01	28.60	132.5 $\pm$ 2.95	55.40

activity, AOA)의 결정

試料의 抗酸化 活性度(unit)는 증류수가 첨가된 대조구(blank)의 항산화 활성도를 sample이 첨가되었을 때의 항산화 활성도(sample)로 나눈 값에서 1을 뺀 값으로 결정하였다. 기존에 抗酸化 活性이 우수한 것으로 알려진 ascorbic acid(vitamin C)를 사용하여, 열수 및 메탄올 皂角刺 抽出物의 抗酸化 活性도와 비교하였다.

### III. 實驗 成績

#### 1. 皂角刺 抽出物의 抗突然變異 效果

##### 1) SOS chromatotest를 이용한 antigenotoxicity 실험

SOS chromatotest를 이용한 조각자의 antigenotoxicity 실험은 420nm 파장에서  $\beta$ -galactosidase 및 alkaline phosphatase 酵素 活性의 측정시 皂角刺 粗抽出物이 갖고 있는 색도가 精製된 시약과 달리 추출물의 첨가비를 만큼 증가하는 경향이 나타났다. 酵素活性의 결과에 영향을 주는 색도增加(color effect)를 배제하기 위하여 각 추출물의 첨가 비율에 해당하는 색도의 測定值를 배제한 다음 각 酵素의 효소 활성을 결정하였다.

突然變異源 MNNG에 대한 반응 tube 당 100  $\mu$ l의 皂角刺 抽出物이 첨가되었을 때, 抗突然變異 효능은 메탄올 추출물의 경우 induction factor(IF)가 0.06으로 열수 抽出物의 0.44와 비교시 메탄올 추출물의 抗突然變異 효능이 더 우수하였다(Fig. 1, Table 3, 4). 皂角刺 抽出物의 농도를 100  $\mu$ l, 300  $\mu$ l, 500  $\mu$ l로 증가하여 첨가하였을 경우, 열수 및 메탄올 抽出物에서의 抗突然變異 활성은 모두 증가하였다.

突然變異源 NOPD에 대한 반응 tube 당 100  $\mu$ l의 皂角刺 抽出物이 첨가되었을 때, 抗突然變異 효능은 메탄을 抽出物의 경우 induction factor(IF)가 0.61로 열수 抽出物의 0.68과 비교시 메탄을 抽出物의 抗突然變異 效能이 더 우수하였다(Fig. 1, Table 5, 6). 皂角刺 抽出物의 농도를 100  $\mu$ l, 300  $\mu$ l로 증가하여 첨가하였을 경우, 열수 및 메탄을 抽出物에서의 抗突然變異 活性은 모두 증가하였다. 두 突然變異源에 대하여 모두 메탄을 抽出物에서의 抗突然變異 活性이 우수하였다.

2) Ames test를 이용한 antimutagenicity 실험

皂角刺의 열수 및 메탄을 抽出物을 사용하여 復歸變異株의 생성을 측정할 결과, 最小寒天培地 平板 당 출현한 colony의 수는 첨가한 抽出物의 농도에 비례하여 감소함을 보여주었다(Fig. 2, Table 7). 각 500  $\mu$ l의 抽出物이 첨가되었을 때의 復歸變異株 抑制率은 열수 抽出物의 경우 약 38.7%, 메탄을 抽出物의 경우 약 60.4%로 나타나 메탄을 抽出物의 抗突然變異 活性이 더 우수하였다.

3) 抽出物의 細胞毒性 實驗

사용한 皂角刺 각 抽出物의 *E. coli* PQ37 菌株과 *S. typhimurium* TA100 菌株에 대한 細胞毒性을 수행하였다. 각 菌株을 한천배지상에 도말한 다음, 각 濃度別 조각자의 열수 및 메탄을 추출물을 적신 여과지를 배지 위에 배양한 결과, 시험한 두 抽出物의 어떠한 농도에서도 시험한 細菌 菌株에 대해 細胞毒性이 없었다(Fig. 3).

Table 5. Activities of  $\beta$ -galactosidase and alkaline phosphatase for antigenotoxicity of mutagen (NOPD) with the water-soluble extract of *Gleditsia sinensis*.

Conc. of extract ( $\mu$ l/tube)	Unit of color effect	$\beta$ -Galactosidase(Unit)		Alkaline phosphatase(Unit)	
		Activity measured	Activity calculated	Activity measured	Activity calculated
0	21.2	30.91 $\pm$ 1.80	9.71	27.80 $\pm$ 2.07	6.70
100	28.3	44.33 $\pm$ 1.91	16.03	44.67 $\pm$ 2.68	16.37
300	42.4	69.37 $\pm$ 3.24	26.97	75.23 $\pm$ 1.36	32.83
500	58.2	92.77 $\pm$ 4.00	34.57	102.7 $\pm$ 1.75	44.50

Table 6. Activities of  $\beta$ -galactosidase and alkaline phosphatase for antigenotoxicity of mutagen (NOPD) with the MeOH-soluble extract of *Gleditsia sinensis*.

Conc. of extract ( $\mu$ l/tube)	Unit of color effect	$\beta$ -Galactosidase(Unit)		Alkaline phosphatase(Unit)	
		Activity measured	Activity calculated	Activity measured	Activity calculated
0	21.2	31.50 $\pm$ 2.33	10.30	28.07 $\pm$ 2.00	6.86
100	30.5	51.40 $\pm$ 5.96	20.90	53.47 $\pm$ 1.37	22.97
300	58.5	81.42 $\pm$ 1.57	22.92	95.94 $\pm$ 3.58	37.44
500	61.1	113.7 $\pm$ 3.87	52.60	121.8 $\pm$ 7.80	60.70

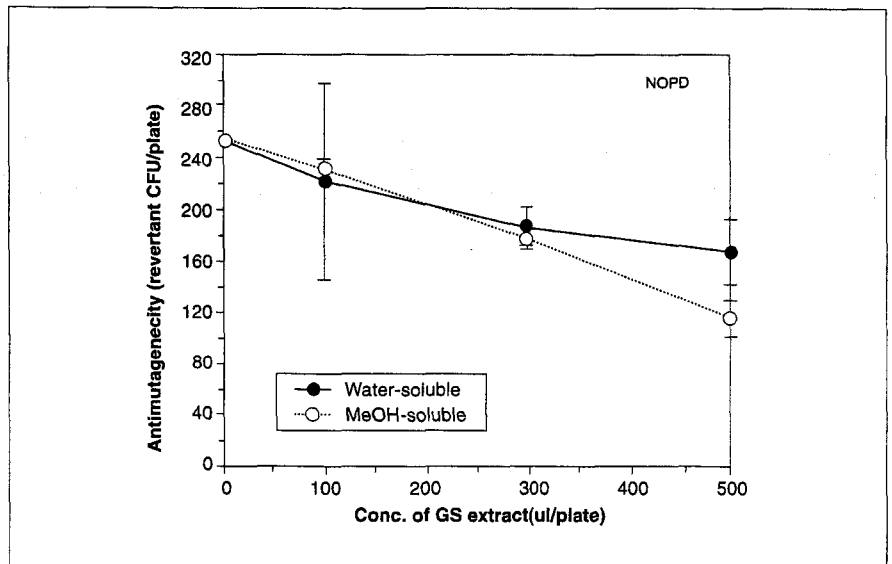


Fig. 2. Antimutagenicity of the water-soluble and MeOH-soluble extracts from *Gleditsia sinensis* against the mutagen NOPD.

Table 7. Activities of antimutagenicity of extract of *Gleditsia sinensis* against NOPD after 48 hr.

Conc. of extract ( $\mu$ l/tube)	Antimutagenicity			
	Water-soluble extract		MeOH-soluble extract	
	Revertant (CFU/plate)	Inhibition ratio (%)	Revertant (CFU/plate)	Inhibition ratio (%)
Spontaneous	23 $\pm$ 2	-	23 $\pm$ 2	-
0	253 $\pm$ 33	0	253 $\pm$ 33	0
100	222 $\pm$ 76	13.5	230 $\pm$ 18	10.0
300	184 $\pm$ 17	30.0	176 $\pm$ 16	33.5
500	164 $\pm$ 24	38.7	114 $\pm$ 14	60.4

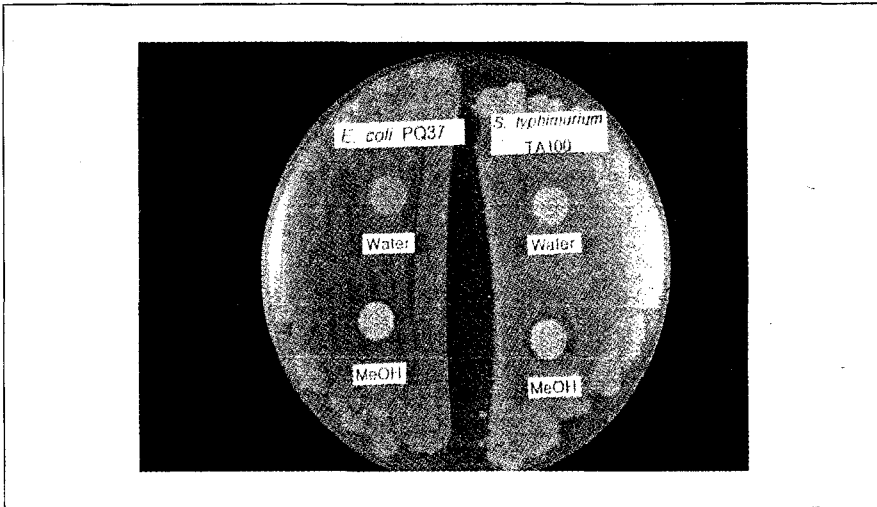


Fig. 3. No cytotoxicity of the water-soluble and MeOH-soluble extracts from *Gleditsia sinensis* for *E. coli* PQ37 and *S. typhimurium* TA100.

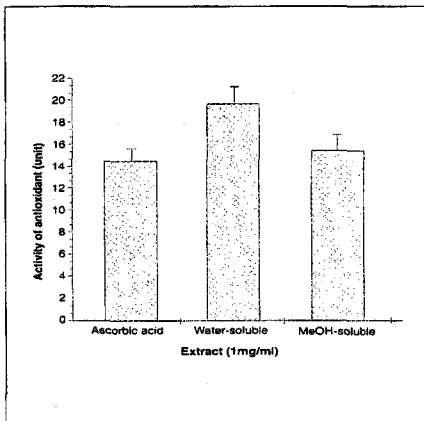


Fig. 4. Antioxidant activity of the water-soluble and MeOH-soluble extracts from *Gleditsia sinensis*.

## 2. 皂角刺 抽出物の 抗酸化 效果

皂角刺의 각 1.0 mg/ml 농도의 열수 및 메탄을 抽出物の 抗酸化 活性을 NBT 법을 사용하여, 대조군으로 1.0 mg/ml의 ascorbic acid 抗酸化 活性을 측정하여 비교하였다. 실험 결과 열수 皂角刺 抽出物の 抗酸化 活性(unit = 19.66)이 메탄을 抽出物の 抗酸化 活性(unit = 15.38)에 비교하여 더 우수하였다(Fig. 4). 각 抽出物の 抗酸化 活性은 대조군으로 사용된 동일한 농도의 ascorbic acid에 비교하여 메탄을 抽出物の 경우 유사하였

으나, 열수 抽出物の 경우 약 1.35배 더 우수하였다.

## IV. 考 察

突然變異는 크게 點突然變異(point mutation)와 染色體突然變異(chromosomal mutation)로 나뉘어지는데 이러한 것은 회복이 되지 않았거나 혹은 부정확하게 회복되어 생긴 결과로 나타나는 것으로 노화과정에서 주로 발생하며 突然變異를 일으키는 물질을 突然變異源(mutagen)이라고 부르는데 대표적으로 방사선과 화학물질이 있다.<sup>31</sup> 특히 突然變異는 腫瘍과 밀접한 상관관계가 있으며 현재까지 알려진 發癌物質의 85% 이상은 突然變異源이고 非發癌性物質의 경우에도 10% 이하가 突然變異源으로 작용한다는 연구결과도 있듯이 突然變異와 腫瘍은 밀접한 관계가 있다.<sup>13</sup>

생체세포는 유전자작용에 의해서 몸의 각기 부위에서 그 형태를 유지하며 조직기능을 완수하고 있지만 어느 조직의 성분세포가 원래 질서를 혼란시켜 이상하게 증식(proliferation)된 경우를 腫瘍이라 칭한다. 이러한 腫瘍의 몇가지

인자는 크게 유전자작용과 관련된 내인자와 발암물질과 같은 외부자극에 증식을 시작하는 것 그리고 특별히 구별이 불가능한 것도 많다. 腫瘍細胞가 미분화인 것일수록 악성도가 높다고 하는데 이것은 세포의 성숙을 완수치 못한 채로 증식되기 때문으로 조직으로서 질서를 유지하지 못하기 때문이다.<sup>32-33</sup>

腫瘍과 관련이 있는 韓醫學의 病因으로는 《靈樞, 百病始生篇》과 <癰疽篇><sup>34</sup>에서 寒, 熱과 같은 外邪의 侵襲과 關聯이 있다고 하였으며 《諸病源候論》<sup>35</sup>에서는 陰陽不和, 臟腑虛弱하여 外邪를 받아 發生한다고 하여 內傷과 外邪를 같이 언급하였다. 이후 《景岳全書》<sup>36</sup>에서는 腫瘍의 原因을 七情, 勞倦, 飲食, 方術 등과 關聯이 있는 것으로 보았고 現代中醫書<sup>37-38</sup>에서는 正虛邪實, 氣滯血瘀, 臟腑失調, 痰濕結聚, 熱毒內結 등으로 보고 있으며 治法으로는 扶正培本, 理氣活血, 活血祛瘀, 清熱解毒, 軟堅散結, 化痰去濕, 以毒攻毒, 養陰清熱, 健脾益腎 등의 治療法이 사용되고 있다.

우리기 학설은 생체가 생명현상을 지속하기 위하여 산소를 이용한 호흡반응이 이루어지는 동안 체내에서 산화반응의 부산물로 생겨난 oxygen free radical(활성산소)이 老化나 癌을 유발할 뿐만 아니라 腦卒中, 心腸疾患, 炎症, 自己免疫疾患 등을 유발하는 것을 의미한다.<sup>39</sup>

인체에는 이러한 활성산소를 분해하는 효소를 가지고 있는데 이러한 효소에는 superoxide radical(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)를 분해하는 SOD, hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)를 분해하는 catalase와 glutathione peroxidase 등이 있으며 이 외에도 toco-pherol, Vitamin C, glutathione 등이 있다.<sup>40-44</sup>

天丁, 皂鍼 그리고 皂刺 등의 異名을 가진 皂角刺는 氣溫, 味辛하고, 脾, 胃, 大

腸經으로 入하며 用量은 湯煎으로는 9-30g, 散劑는 0.54-9g 정도로 사용한다<sup>21</sup>.  
 26. 현재까지 皂角刺에 관한 보고로는 朴은<sup>29</sup> 皂角刺 saponin과 皂角刺 抽出物을 대상으로 실험하여 消炎作用이 우수하다고 하였으며 腫瘍에 관한 보고로는 常<sup>22</sup> 과 錢<sup>25</sup>이 *in vivo* 실험에서 mouse의 Sarcoma-180의 抑制作用이 있다고 하였고 朴<sup>45</sup>은 그러한 효능이 T 임파구 및 NK 세포의 수를 증가시켜 抗癌作用을 한다고 하였다.

본 실험에서도 皂角刺의 증류수 추출물과 메탄을 추출물이 抗突然變異 효과가 있는지 알아보기 위하여 皂角刺를 사용한 突然變異源에 대한 抗突然變異活性은 SOS chromotest를 이용한 antigenotoxicity 시험과 Ames의 방법을 이용한 antimutagenicity 시험을 수행하였다.

MNNG 突然變異源에 대한 抗突然變異效能은 메탄을 抽出物의 경우 열수 抽出物과 비교시 메탄을 추출물의 抗突然變異 효능이 더욱 우수하였다. 皂角刺 抽出物의 농도를 증가하여 첨가하였을 경우, 열수 및 메탄을 추출물에서의 抗突然變異 활성은 모두 증가하였다. NOPD 突然變異源에 대한 SOS chromotest 결과 抗突然變異 효능은 메탄을 추출물의 경우 열수 抽出物과 비교시 메탄을 抽出物의 抗突然變異 효능이 더욱 우수하였다. 皂角刺 抽出物의 농도를 증가하여 첨가하였을 경우, 열수 및 메탄을 抽出物에서의 抗突然變異 활성은 모두 증가하였다. 두 突然變異源에 대하여 모두 메탄을 抽出物에서의 抗突然變異 활성이 우수하였다. Ames test를 이용한 抗突然變異이 활성의 復歸 變異株 抑制率은 메탄을 抽出物의 抗突然變異活性이 우수함을 입증하였다.

사용한 皂角刺 각 抽出物의 *E. coli*

PQ37 菌株과 *S. typhimurium* TA100 菌株에 대한 細胞毒性을 수행하였으나, 시험한 두 抽出物의 어떠한 농도에서도 시험한 細菌 菌株에 대해 細胞毒性이 없었다. 이 결과는 皂角刺의 각 抽出物의 抗突然變異에 대한 활성이 細胞毒性에 의하여 유발되지 않았음을 입증하였다.

皂角刺를 이용하여 抗酸化 활성을 측정한 결과, 대조군인 Ascorbic acid에 비하여 열수 및 메탄을 抽出物 모두 다 우수하였으며, 열수 抽出物의 抗酸化活性이 메탄을 추출물의 抗酸化 활성에 비교하여 더 우수하였다.

본 실험의 결과 皂角刺 抽出物의 抗酸化 및 抗突然變異에 대한 약리효능은 매우 우수하였으며 향후 皂角刺 抽出物의 抗癌抑制 작용의 관명을 위하여 分離·精製된 추출물을 사용하여 癌細胞가 유도된 생쥐를 이용한 *in vivo* 실험이 필요할 것으로 사료된다.

## V. 結 論

皂角刺의 열수 및 메탄을 抽出物을 製造하여 SOS chromotest 및 Ames법을 이용한 抗突然變異 활성 및 NBT법을 이용한 抗酸化 활성을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. SOS chromotest법을 이용한 MNNG와 NOPD에 대한 抗突然變異活性은 열수 및 메탄을 抽出物에서 농도 의존적으로 증가되었으며, 메탄을 추출물에서 월등히 우수하였다.

2. 皂角刺의 Ames법을 이용한 突然變異源 NOPD에 대한 抗突然變異 활성을 측정하였을 때, 메탄을 抽出物이 열수 抽出物보다 우수한 효능을 보여주었다. 반응 tube 당 500  $\mu$ l의 메탄을 抽出物(5 mg/plate)이 첨가되었을 때의 突然變異 抑制率은 60.4%이었다.

3. 皂角刺의 抗酸化 활성은 열수 抽出物이 메탄을 抽出物에 비하여 우수하였다. 열수 抽出物의 抗酸化 활성은 대조군으로 사용된 ascorbic acid에 비하여 우수한 결과를 나타내었다.

## VI. 參考文獻

1. 서정숙 외. 식용식물의 항변이원성에 관한 연구. 생약학회지 1990;21:88
2. 이성 외. 쑥 추출물의 抗突然變異 활성효과. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol 1996;24:105-110.
3. 김석중 외. 무즙의 들연변이 억제효과 및 그 특성. 한국식품과학회지 1992;24:193-198.
4. 함승시 외. 메밀 flavonoids의 항돌연변이원성 및 지질대사 조절기능에 관한 연구. 한국영양식품학회지 1994;23:698-703.
5. 김창민 외. 개너삼의 성분 및 생물활성에 관한 연구. 생약학회지 1990;21:137.
6. Sakai, Y. et al. Antimutagenicity of extracts from crude drugs in chinese medicines. Mut. Res 1986;174:1
7. Kakinuma K. J. Agri. Biol. Chem 1984;48:1647
8. Kim, H.K. et al. Effects of antimutagenic flavonoid, galangin on benzo(a)pyrene metabolism in mice. Kor. Biochem. J 1991;24:141
9. MacGregor, J.T. Genetic and carcinogenic effects of plant flavonoids. In Nutritional and toxicological aspects of food safety (Friedman, M. ed.). New York:Plenum Pub;1994:497
10. Wattenberg, L.W. Inhibition of neoplasia by dietary constituents. Cancer Res 1983; 43:2448
11. Huang, M.T. Inhibitory effect of 3-hydroxybenzo(a)pyrene on the mutagenicity and tumorigenicity of  $\pm$ -7  $\beta$ , 8- $\alpha$ -dihydroxy-9- $\alpha$ , 10  $\alpha$ -epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene. Cancer Res 1986;46:558
12. Nakamura, Y. et al. S-methyl methane thiosulfonate, a new antimutagenic compound isolated from *Brassica oleracea* L. var. botrytis. Biol. Pharm.

- Bull* 1993;16:207
13. Ames, B.N. Methods for detecting carcinogen and mutagens with *Salmonella/mammalian-microsome* mutagenicity test. *Mutat. Res* 1975;31: 347-364.
  14. Maron, D.M. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mut. Res* 1983;113:173-215.
  15. Quillardet, P. et al. The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins. procedures. *Mut. Res* 1985;147:65-78.
  16. Fridovich, I. Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys* 1986;247:1-11.
  17. Sawyer, D.T. et al. How super is superoxide? *Acc. Chem. Res* 1981; 14:393
  18. McBride, T.J. et al. Mutagenic spectrum resulting from DNA damage by oxygen radicals. *Biochemistry* 1991; 30:207-213.
  19. Adelson, R. et al. Oxidative damage to DNA: Relating to species metabolic and life span. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1988;85:2706-2708.
  20. Frei, B. et al. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988;85:9748-9752.
  21. 康秉秀 外. 本草學. 서울:永林社;1991, 440-441.
  22. 盛展能. 抗癌治驗本草. 重慶出版社;1994,362-363.
  23. 錢伯文. 腫瘤的辨證施治. 上海科學技術出版社;1980,235-236.
  24. 上海中醫學院. 中草藥學. 商務印書館香港分館;1985,406
  25. 錢伯文. 抗癌中藥的臨床效用. 上海翻譯出版社;1987,149-150.
  26. 李岩. 腫瘤臨證備要. 人民衛生出版社;1983,18
  27. 常敏毅. 抗癌本草. 湖南科學技術出版社;1987,169-170.
  28. 洪性範. 臨床抗癌中草藥. 成輔社;1990,162-163.
  29. 朴涌基. 角刺의 消炎作用에 대한 實驗的 研究. 東國大學校大學院博士學位論文;1995.
  30. Winterbourn, C. C. et al. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J. Lab. Clin. Med* 1975; 85:337
  31. 이광응 외. 생명과학의 이해. 을유문화사 1996;136-142.
  32. Yoghitoshi, Yawara. 내과진단학., 제일 의학사 1994;8-9.
  33. 서울대학교 의과대학. 중앙학. 서울대학교 출판부 1994;1-3,43-82,137-138.
  34. 郭鶴春 編著. 黃帝內經靈樞校注語譯. 天津科學技術出版社 1989;386-387,439,555.
  35. 巢元方. 巢氏諸病源候論. 大星文化社 1992;147,149-150,222.
  36. 張介賓. 景岳全書 雜證模選讀. 重慶大學出版社;88,90,94-95,101.
  37. 李家庚 外. 中醫腫瘤防治大全. 北京科學技術文獻出版社 1994;45-47,608-609.
  38. 郁仁存. 中醫腫瘤學(上). 北京科學出版社 1983;2,12-15.
  39. 해리슨내과학 편찬위원회. 해리슨내과학 (한글판). 정담출판사 1997;32-34.
  40. Cutler, R. G. Antioxidants, aging and londevity. *Free Radicals in Biology. Academic Press* 1984;Vo1:371-424.
  41. Fridovich, I. Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys* 1986;247:1-11.
  42. McBride, T.J., B.D. Preston, and L.A. Loeb. Mutagenic spectrum resulting from DNA damage by oxygen radicals. *Biochemistry*;1991;30:207-213.
  43. Adelson, R., L. Saul, and B.N. Ames. Oxidative damage to DNA: Relating to species metabolic and life span. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988;85:2706-2708.
  44. 이상진. 흰쥐의 세균성 복막염에서 항산화제의 보호효과. 대한소화기병학회지;1991; 23(4):959-963.
  45. 朴涌基 外. 皂角刺의 抗癌作用에 대한 實驗的 研究. 大韓本草學會誌 1997;12(1):53-60.