

참취뿌리 에탄올추출물의 유전독성 억제효과

함승시* · 황보현주 · 최승필 · 이의용 · 조미애 · 이득식
강원대학교 바이오산업공학부

Suppressive Effects of Ethanol Extract of *Aster scaber* Root on Genotoxicity

Seung-Shi Ham*, Hyun-Ju Hwangbo, Cheng-Bi Cui, Eui-Yong Lee,
Mi-Ae Cho and Deuk-Sik Lee
School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University

Abstract

This study was investigated the antigenotoxic effects of *Aster scaber* Thunb root extract on the mutagenesis induced by benzo(α)pyrene(B(α)P). The treatment with B(α)P at 150 mg/kg significantly increased the incidence of MNPCE(p<0.05). The amount of 50, 100, 150 and 200 mg/kg of ethanol extract from *Aster scaber* were administered to animals immediately after injection of B(α)P. Significant reductions(p<0.05) with 24.5, 22.6, 59.8 and 79.4%, respectively, were observed in the frequencies of MNPCE compared to positive control. When the fractions of hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol and water from ethanol extract were treated with concentration of 10 mg/kg, the suppression rates of the MNPCE were 3.9, 35.3, 40.2, 11.8 and 49.0%, respectively. And also, the strong suppression rate of the MNPCE treated with above five fractions in the concentration of 80 mg/kg showed 78.4, 65.7, 75.5, 68.6 and 77.5%, respectively, compared to positive control. These results indicate that the five fractions in the concentration of 80 mg/kg from *Aster scaber* ethanol extract have a strong modulatory effect on B(α)P induced the MNPCE.

Key words : antigenotoxic effect, MNPCE, suppression rate, *Aster scaber*.

I. 서론

참취(*Aster scaber* Thunb)는 국화과에 속하는 다년초로 백운초, 백산국, 동풍, 나물채 및 암취 등의 별명이 있으며 생약명으로는 동풍채라고 한다. 어린순은 나물이나 쌈으로 이용하고 성숙한 참취는 두통,

현기증, 해소, 이뇨 및 방광염에 사용하며 비타민 A 함량이 3,504 IU로 비교적 많이 함유되어 있다^{1,2)}. 참취에는 전 아미노산이 665.7 mg% 함유되어 있으며 음식에서 자연건조시킨 참취를 개미취, 곰취, 수리취와 함께 관능검사한 결과, 취나물 중 전체적인 기호도에서 참취가 가장 우수한 것으로 나타났다^{3,4)}. 또한, 참취는 색소 선호도와 chlorophyll의 열안정성 실험

험 결과 썩과 취나물의 한 종류인 곰취보다 훨씬 높아 식품의 천연 착색료로도 주목받고 있다⁴⁾. 최근 환경인자가 가지는 유전독성의 문제가 큰 관심사로 등장하여 일상적으로 쉽게 접촉하는 식품의 유전독성에 관한 연구가 많은 주목을 받게 되었다⁵⁾. 참취의 섭취는 고지혈증의 치료나 예방에 효과가 있으며 그 열수추출물도 지질대사를 개선시키는 것으로 나타났다⁶⁾. 또한 참취추출물은 혈중 콜레스테롤, 특히 low density lipoprotein(LDL)의 농도를 저하시킴으로서 혈관수축과 이완반응 및 혈관내피세포의 변화를 지연시키는 것으로 보고되어 있다⁷⁾. 이와 같이 참취뿌리에 관해서는 여러 가지의 생리효과가 있는 것으로 보고되고 있으며 그에 대한 결과가 주목을 받고 있다. 본 실험에서는 *in vivo*의 한 방법으로서 Schmid의 방법⁸⁾에 의해 염색체 이상 유발원(clastogen)의 투여에 따른 마우스의 골수세포(bone marrow cell)에서의 소핵생성과 참취뿌리 추출물의 투여에 따른 소핵생성 억제율로서 참취뿌리 추출물의 생리활성 기능으로서의 유전독성 억제효과를 검토하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

참취는 홍천 현리에서 채취하였으며 benzo(a)pyrene [B(a)P]은 일본 和光純藥 특급시약용, fetal bovine serum(FBS)는 Gibco사의 것을 사용하였으며 Giemsa stain solution(Gürr 66)은 British Drug House(BDH)사의 제품을 사용하였다.

2. 실험방법

1) 시료의 조제

참취를 깨끗이 수세한 후 특히, 뿌리부분만 따로 취하여 열풍건조기를 사용하여 40°C에서 건조시킨 것을 분쇄하여 추출플라스크에 일정량을 넣은 다음 시료중량의 10배의 70% 에탄올을 첨가하고 8시간 동안 80°C에서 3회 추출한 후, 감압여과 장치에서 뜨거운 상태로 여과한 후 감압농축기를 사용하여 추출용매를 제거한 후 동결건조하였다.

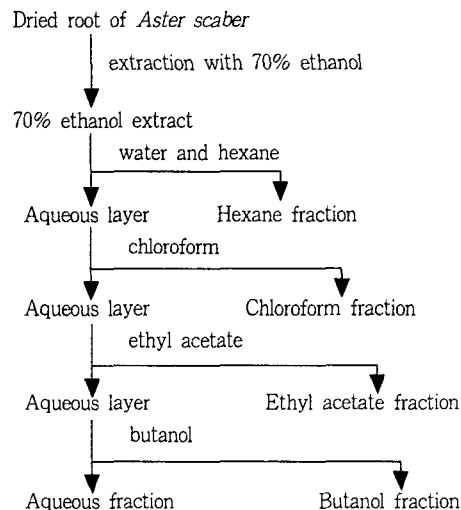


Fig. 1. Scheme of fraction of the ethanol extracts of Aster scaber root.

에탄올 추출물은 Fig. 1과 같이 다시 극성이 다른 용매들로 순차 용매 분획을 실시하였다. 즉, 사용한 용매중 극성이 가장 낮은 hexane과 시료 그리고 물을 먼저 10 : 1 : 9의 비율로 혼합하여 분획하는 과정을 3번 반복한 후 감압농축 후 동결건조하여 hexane 분획물로 하였다. 얻어진 잔여물은 다시 클로로포름, 에틸 아세테이트 및 부탄올 순으로 분획을 실시하여 감압농축한 후 각각을 동결건조하여 분획물을 얻었으며 마지막에 남은 수층은 위와 같은 방법으로 감압농축하여 동결건조시켜 각각의 분획물을 얻었다.

2) 소핵실험

(1) 실험 동물의 사육조건

명진실험동물센터(주)에서 구입한 4주령의 ICR male mouse(25±2.5 g)를 구입하여 강원대학교 동물 사육실에서 일주일간 적응시켜 각각의 실험군당 7마리를 사용하였다. 동물 사육실 실험조건은 온도 21~26°C, 습도 45~55%로 유지시켰으며, 조명은 오전 9시에 자동점등, 오후 9시에 자동 소등하여 12시간 간격으로 조명을 조절하였다. 사료는 삼양유지사료(주)의 마우스용 배합사료(조단백질 22.1%, 조지방 3.5%, 조섬유 5.0%, 회분 8.0%, 칼슘 0.6%, 인

0.4%)를 사용하였고, 물은 증류수를 공급하였으며 사료와 물을 자유롭게 먹도록 하였다.

(2) 투여방법 및 검체제작

① B(α)P 투여농도에 따른 유전독성

소핵유발물질로 B(α)P를 사용하였으며 mouse당 투여량은 0.2 ml(25 g 기준)가 되도록 50, 100, 150, 200 mg/kg 용량으로 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해하여 투여직전에 측정된 체중에 따라 산출하여 1 ml 용량의 일회용 주사기를 사용하여 복강투여하였다. 복강투여 후 36시간 사육한 다음 각각 도살하여 대퇴골을 적출하여 골수세포에 형성된 소핵을 검경하여 B(α)P 자체의 용량반응관계(dose response)를 구하였다.

② 참취 뿌리 에탄올추출물의 B(α)P 소핵생성에 대한 억제효과

B(α)P 유전독성에 대한 참취뿌리 추출물의 억제효과를 규명하기 위하여 에탄올 추출물 10, 20, 40 및 80 mg/kg을 같은 시각에 경구투여하였다. 그 후 36시간동안 사육한 후 도살하여 대퇴골의 골수세포에 형성된 소핵을 검경한 후 각각 투여군의 가장 높은 억제농도를 관찰하였다.

③ 참취뿌리 분획물의 B(α)P의 소핵생성에 대한 유전독성 억제효과

B(α)P 유전독성에 대한 참취뿌리 분획물의 억제효과를 파악하기 위하여 참취뿌리 물, 에틸아세테이트, 클로로포름, 헥산 및 부탄올 분획물을 5, 10, 20 및 40 mg/kg의 농도로 B(α)P 투여와 같은 시각에 경구투여하였다. 그 후 36시간을 사육시켜 도살하여 대퇴골의 골수에 형성된 소핵을 검경하여 각 투여군의 가장 높은 억제 농도를 관찰하였다.

④ 골수채취 및 검체 제작

B(α)P과 시료를 투여한 mouse는 Schmid 원법⁸⁾에 따라 경추탈구(cervical dislocation)하여 도살한 후 대퇴골을 적출하였다. 적출한 대퇴골은 근육들을 깨끗하게 제거한 다음 가위로 양쪽을 자른 후 0.2 ml

의 fetal calf serum(GIBCO)을 주사기를 이용하여 대퇴골강에 반복 주입하여, 씻겨나온 골수세포 현탁액을 microcentrifuge tube에 넣어 1,000 rpm으로 5분간 원심분리한 후 골수세포를 분리하고 serum은 버렸다. 분리된 골수세포는 다시 소량의 serum을 가해 흔들어 현탁시켰다. 골수세포 현탁액 소량을 pasteur pipette으로 취하여 미리 세척하여 건조시킨 slide glass상에 cover glass를 이용하여 도말한 후 풍건하였다. 건조된 slide glass는 메탄올로 10분간 고정하고, pH 6.8의 Sorensen buffer(1/15M KH₂PO₄ + 1/15M Na₂HPO₄)에 희석하여 조제한 5% Giemsa (Gurr 66)염색 시약으로 30분간 염색하였다. 증류수로 수회 세척하여 건조한 후 현미경으로 검경($\times 1000$)하였다. 검경은 mouse 한 마리당 1000개의 다염색체 적혈구(polychromatic erythrocyte : PCE)중 소핵을 가진 소핵다염색체적혈구(micronucleated polychromatic erythrocyte : MNPCE)의 생성빈도(%)를 구하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. B(a)P 투여농도에 따른 유전독성과 실험농도의 결정

B(α)P의 투여농도에 따른 소핵생성 효과는 각 실험군당 50, 100, 150 및 200 mg/kg의 농도로 투여하였으며, negative control로는 B(α)P의 용매가 되는 0.2 M DMSO를 일정량 투여했을 경우에 나타나는 소핵생성빈도를 Table 1에 나타내었다. 농도가 증

Table 1. Micronucleus polychromatic erythrocytes (MNPCE) induction rate of benzo(α)pyrene in bone marrow cells of ICR male mice

Dosage(mg/kg)	Mean \pm S.D.
0 ¹⁾	1.4 \pm 0.4 ²⁾
50	6.6 \pm 0.6 ^b
100	9.2 \pm 0.6 ^c
150	10.4 \pm 0.9 ^c

¹⁾ Negative control.

²⁾ Values with different letters in the same column are significantly different by multiple range test (P<0.05).

가함에 따라 소핵생성 유도율이 증가하였으며 B(α)P의 농도를 200 mg/kg로 투여한 결과 가장 높은 소핵생성 효과를 나타내었으나 mouse의 상태측정에 있어서 다른 군에 비해 좋지 않은 건강상태를 나타내었으므로 건강상태를 유지하면서 가장 많은 소핵생성율을 보이는 150 mg/kg으로 투여농도를 실험농도로 결정하였다. 이 결과에서 150 mg/kg에서의 소핵생성빈도는 대조군에서는 1.4 ± 0.6 의 소핵생성빈도를 나타내었는데 반해, positive control이 10.4 ± 0.9 ($P < 0.05$)을 나타내어 positive control이 약 8배 정도의 높은 소핵생성빈도를 나타내었다.

2. 참취뿌리 에탄올추출물의 투여농도에 따른 소핵생성 억제효과

참취뿌리 에탄올추출물을 50, 100, 150 및 200 mg/kg로 투여한 경우 B(α)P(150 mg/kg)의 소핵생성 억제효과를 검토한 결과를 Table 2에 나타낸 바와 같이, 각각 7.7 ± 0.6 , 7.9 ± 0.6 , 4.1 ± 0.5 그리고 2.1 ± 0.2 로서 양성대조군의 소핵생성빈도인 10.2 ± 0.6 에 비해서 각각 24.5, 22.6, 59.8 그리고 79.4%의 소핵생성 억제효과를 나타내었다($P < 0.05$). 함 등⁹⁾에 의하면 같은 나물취의 일종인 곰취 에탄올 추출물과 메탄올 추출물에서의 소핵생성 억제율은 20, 40, 60 및 80 mg/kg의 처리에서 각각 12.0, 35.3, 58.8 및 60.0%와 15.5, 32.7, 50.8 및 57.9%로 에탄올 추출물이 다소 높은 유전독성 억제효과를 나타내었음을 보

Table 2. Suppression of benzo(α)pyrene(150 mg/kg) induced micronucleated polychromatic erythrocyte by single treatment of the root of *Aster scaber* ethanol extracts in bone marrow cells of ICR male mice.

Dosage(mg/kg)	Mean \pm S.D	Suppression(%)
Negative control	1.4 ± 0.4	
Positive control	$10.2 \pm 0.6^{a,1)}$	
50	7.7 ± 0.6^b	24.5
100	7.9 ± 0.6^b	22.6
150	4.1 ± 0.5^c	59.8
200	2.1 ± 0.2^d	79.4

¹⁾Values with different letters in the same column are significantly different by multiple range test ($P < 0.05$).

고하였다. 따라서 취나물 중 참취나 곰취는 유전독성 억제효과에 있어서 유의적으로 효과가 있는 것이 시사되었다. 또한, 함 등¹⁰⁾의 목이와 석이버섯 메탄올 추출물에 대한 유전독성 억제연구에서 B(α)P투여에 따른 자체용량 반응관계에서도 비슷한 소핵생성 빈도를 나타내었으며, 목이와 석이버섯 메탄올 추출물의 유전독성 억제율은 시료농도 20 및 50 mg/kg을 multiple 투여시(1일 1회 5일간), 목이버섯 추출물이 각각 54.2%와 52.1%, 석이버섯 추출물의 경우 56.3%와 54.2%의 억제율을 나타내어 본 실험의 single 투여보다 multiple 투여가 소핵생성 억제효과가 다소 높은 것을 알 수 있었다.

3. 참취뿌리 분획물들의 투여농도에 따른 소핵생성 억제효과

참취뿌리 에탄올 추출물의 용매 극성에 따른 순차적인 분획물에 대한 실험결과를 Fig. 2, 3, 4, 5, 6에 나타내었으며, hexan, chloroform, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물분획물이 가장 낮은 시료농도인 10 mg/kg의 투여군에서 각각 9.8 ± 0.5 , 6.6 ± 0.2 , 6.1 ± 0.3 , 9.0 ± 0.6 및 5.2 ± 0.3 의 소핵생성빈도를 보였다. 이는 Table 2의 positive control군에 비해 각각 3.9, 35.3, 40.2, 11.8 및 49.0%의 소핵생성 억제율을 나타낸 것이었다. 가장 높은 시료농도인 80 mg/kg의 투여군에서는 각각 2.2 ± 0.1 , 3.5 ± 0.4 , 2.5 ± 0.5 , 3.2 ± 0.2 그리고 2.3 ± 0.2 의 소핵생성빈도를 보였으며, positive control군에 비해 각각 78.4, 65.7, 75.5, 68.6 그리고 77.5%의 소핵생성 억제율을 나타내었다. 이러한 결과는 최근 조¹¹⁾의 감마선 처리된 약초류에 대한 유전독성 안정성평가 연구에서 배양 CHO세포를 이용한 소핵실험에서 B(α)P 투여에 의한 소핵생성빈도는 본 실험과 비슷한 수준을 나타내고 있었다. 또한 김 등¹²⁾의 보고에서도 동충하초 추출물중 hexan 분획물이 가장 높은 소핵생성 억제효과가 있다고 보고하고 있으나, 이들 천연물의 생리활성 성분은 비극성 용매인 hexan 추출물 중에 강한 생리활성 성분이 존재하고 있는 것으로 추정되어 매우 흥미 있는 결과를 나타내었다. 이상에서와 같이 여러 분획물을 가지고 소핵실험을 행한 결과, hexan 분획물이 80 mg/kg 투여시 78.4%의 소핵생성 억제를 나타내어 가장 높

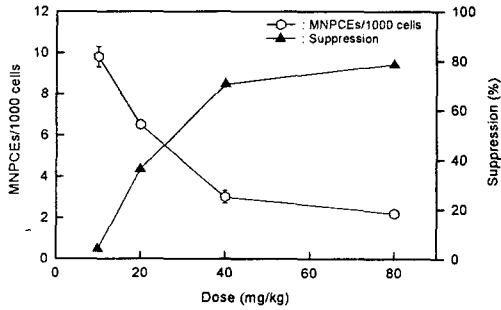


Fig. 2. Suppression of B(a)P(150 mg/kg) induced micro-nucleated polychromatic erythrocyte (MNPCE) by single treatment of hexane fraction from *Aster scaber* root ethanol extract in bone marrow cells of ICR male mice.

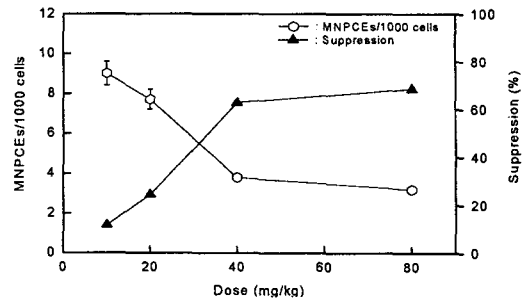


Fig. 5. Suppression of B(a)P(150 mg/kg) induced micro-nucleated polychromatic erythrocyte (MNPCE) by single treatment of butanol fraction from *Aster scaber* root ethanol extract in bone marrow cells of ICR male mice.

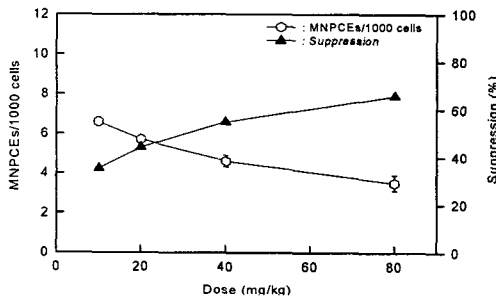


Fig. 3. Suppression of B(a)P(150 mg/kg) induced micro-nucleated polychromatic erythrocyte (MNPCE) by single treatment of chloroform from *Aster scaber* root ethanol extract in bone marrow cells of ICR male mice.

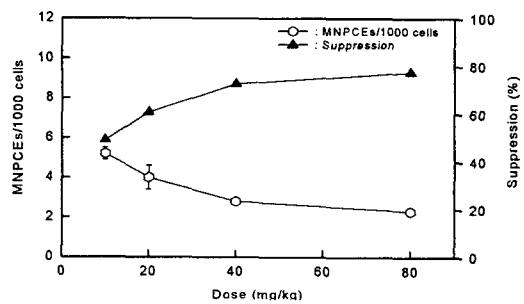


Fig. 6. Suppression of B(a)P(150 mg/kg) induced micro-nucleated polychromatic erythrocyte (MNPCE) by single treatment of water fraction from *Aster scaber* root ethanol extract in bone marrow cells of ICR male mice.

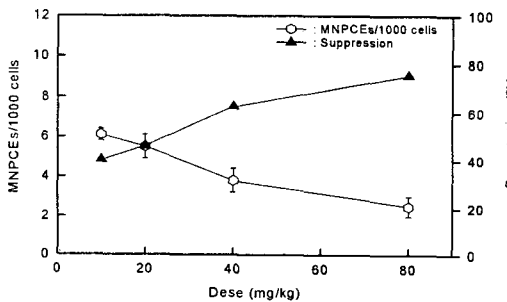


Fig. 4. Suppression of B(a)P(150 mg/kg) induced micro-nucleated polychromatic erythrocyte (MNPCE) by single treatment of ethyl acetate fraction from *Aster scaber* root ethanol extract in bone marrow cells of ICR male mice.

은 수치를 나타내었다. 다음에 물분획물이 77.5%, 에틸아세테이트 75.5% 순으로 높은 억제율을 보였다. 향후 참취뿌리의 생리활성이 강한 hexan, 물, 에틸아세테이트 분획물로 부터 단일물질의 분리 동정 및 그 성분의 생리활성을 검정할 필요가 있으며 이에 대한 연구가 수반되어야 할 것으로 사료된다.

IV. 요약

염색체 이상유발물질인 benzo(a)pyrene(B(a)P)을 마우스에 50, 100, 그리고 150 mg/kg으로 투여한 경우의 소핵생성은 각각 6.6 ± 0.6 , 9.2 ± 0.6 그리고 10.4 ± 0.9 로서 농도증가에 비례적으로 증가하였으며,

대조군에서는 1.4 ± 0.4 의 소핵생성을 나타내었다. B (α)P을 150 mg/kg과 참취뿌리 에탄올 추출물을 각각 50, 100, 150 그리고 200 mg/kg으로 동시에 투여한 경우 각각 24.50, 22.55, 59.80 그리고 79.41%의 소핵생성 억제효과를 나타내었다. 참취뿌리 용매분획물 실험에서는 핵산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물분획물이 시료농도인 10 mg/kg의 투여군에서 양성대조군에 비해 각각 3.9, 35.3, 40.2, 11.8 및 49.0%의 소핵생성 억제율을 나타내었다. 시료농도 80 mg/kg의 투여군에서는 양성대조군에 비해 각각 78.4, 65.7, 75.5, 68.6 그리고 77.5%의 소핵생성 억제율을 나타내었다. 참취뿌리 에탄올추출물의 용매분획물은 80 mg/kg의 투여농도에서 비교적 높게 소핵생성 억제율이 나타났다.

V. 문 헌

1. 임응규, 박석근, 류종원, 사동민, 이미순, 임규옥: 자원식물학, 도서출판 서일 P. 317, 1996.
2. 정미숙, 이미순: 참취에서 추출한 엽록소의 안정성, 덕성여대 논문집 제27집, 1996.
3. 김용두, 양원모: 산채의 성분에 관한 연구, 한국영양식량학회지, 15(3), 10~13, 1986.
4. 문해영: 개미취, 참취, 곰취 및 수리취의 아미노산 패턴, 덕성여자대학교 석사학위논문, 1988.
5. Wynder, E. L. and Gori, G. B.: Contribution of environment to cancer medicine, J. Natl. Cancer Inst., 58, 826~832, 1977.
6. Lim, S. S. and Lee, J. H.: A study on the chemical composition and hypocholesterolaemic effect of *Aster scaber* and *Ixeris dentata*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 26(1), 123~129, 1997.
7. Lim, S. S. and Lee, J. H.: Effect of *Aster scaber* and *Ixeris dentata* on contractility and vasodilation of cardiovascular and endothelial cell in hyperlipidemic rat. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 26(2), 300~307, 1997.
8. W. Schmid: The micronucleus test, Mutation Research, 31, 10~15, 1975.
9. 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* extracts, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 27(4), 745~750, 1998.
10. Ham, S. S., Kim, D. H., Choi, K. P. and Lee, D. S.: Antimutagenotoxic effects of methyl alcohol extracts from *Auricularia mesenterica* and *Gyrophora esculenta*, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 27(1), 57~62, 1997.
11. Jo, S. K.: Genotoxicological safety of the gamma-irradiated medicinal herbs in the micronucleus test using CHO cells *In vitro*, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 26(5), 952~957, 1997.
12. Kim, M. N., Cui, C. B., Lee, D. S. and Ham, S. S.: Cytotoxicity and antigenotoxicity effects of *Cordyceps militaris* extracts, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 30(5), 921~927, 2001.