

## 씀바귀의 항돌연변이성 및 암세포 성장억제효과

김명조\*<sup>†</sup> · 김주성\* · 강원희\* · 정동명\*\*

\* 강원대학교 농업생명과학대학 식물응용과학부, \*\* 원광대학교 생체공학연구소

### Effect on Antimutagenic and Cancer cell growth inhibition of *Ixeris dentata* Nakai

Myong Jo Kim\*<sup>†</sup>, Ju Sung Kim\*, Won Hee Kang\*, and Dong Myong Jeong\*\*

\* Division of Applied Plant Science, College of Agriculture and Life Science, Kangwon National University Chunchon, Korea

\*\* Institute of Wonkwang Biomedical Eng. Research, wonkwang University Iksan, Korea

**ABSTRACT :** *Ixeris dentata* was used to extract the natural compounds with methanol and then the extracts were further fractionated using *n*-hexane, ethyl acetate, butanol and aqueous fraction. The methanol extract of *Ixeris dentata* had strong antimutagenic effect in Ames mutagenicity test. Among the extracts fractionated from the methanol extract, the butanol fraction exhibited the greatest antimutagenic effect suppressing the mutagenicity of *Salmonella typhimurium* TA100 with inhibition rate of 88.93%. Cancer cell lines include human lung carcinoma(A549), human breast adenocarcinoma(MCF-7) and human hepatocellular carcinoma(Hep3B). Hexane fraction showed the strongest effect against A549, MCF-7 and Hep3B at the same concentration compared to those of other fractions.

**Key words :** *Ixeris dentata*, antimutagenic, MNNG, 4NQO, B(a)P, *Salmonella typhimurium*, cytotoxic

## 서 론

식품에 존재하는 발암물질 및 돌연변이 유발성 물질의 유형에는 천연식품 자체에 존재하는 물질, 식품의 저장, 가공 및 조리에서 생성되는 물질과 살충제, 농약 또는 식품첨가물과 같은 화학물질의 세 범주가 있다(Sugimura & Sato, 1983). 현재 암치료에 이용되고 있는 요법들로는 화학요법, 방사선요법 및 외과적 수술 요법들이 있으며, 이들은 부작용이 강하고 생체방어에 중요한 역할을 담당하고 있는 lymph세포, 골수세포 등을 암세포보다 훨씬 강하게 파괴시켜 체내의 암세포 뿐만 아니라 다른 감염증에 대한 저항력까지 약화시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 이러한 합성약품의 부작용과 독성이 밝혀짐에 따라 천연물로부터 의약품개발을 위한 연구가 동식물에서 유래되는

생물학적 활성을 나타내는 천연물이 유용한 의약품으로서, 또는 약재를 합성할 수 있는 초기물질로서 찾으려는 노력이 계속되고 있다(Moon et al, 1998). Morita등(1978)과 Lai등(1980)이 채소류의 돌연변이 유발 억제 효과를 보고하였으며, Nataka등(1989)과 Meng등(1990)도 많은 약용식물의 추출물들이 3-amino-1-methyl-5H-pyrido-(4,3-b) indole(Trp-P-2)등의 돌연변이 물질들에 대하여 항돌연변이 효과를 가지고 있음을 보고하였다.

본 연구는 민간에서 진정, 최면, 해열, 조혈, 건위, 소화불량, 폐렴, 간염, 타박상, 중기 및 식욕 촉진 등에 사용되고 있으며 우리나라에서 봄철 흔히 생산되는 산채류의 일종인 국화과 여러해살이 풀인 썸바귀를 이용하여 항돌연변이성 및 암세포 성장 억제효과 실험을 실시하였기에 보고하고자 한다.

<sup>†</sup> Corresponding author (Phone) : Myong Jo Kim., 033-250-6410, E-mail : kimmjo@kangwon.ac.kr

Received May 10 2002 / Accepted May 31 2002

## 재료 및 방법

### 시료의 추출 및 분획

실험에 사용한 썸바귀(*Ixeris dentata* Nakai) 분말은 (주)천길로부터 받아서 본 실험에 이용하였다. 썸바귀 분말 1kg을 MeOH에 일주일씩 침적시켜 3회 반복 냉침 추출하여 메탄올 추출물(138.4g)을 얻었다. 메탄올 추출물을 증류수에 현탁시킨 후 *n*-hexane, EtOAc, BuOH 순으로 용매분획을 실시하였으며, 3반복하였다. 위에서 얻은 각 분획을 감압농축한 결과 핵산, 에칠아세테이트, 부탄올 및 물 분획물을 각각 58.3g, 3.7g, 12.5g, 62.3g씩 얻을 수 있었다.

### 항돌연변이 실험

#### 돌연변이 유발법

직접 돌연변이원인 4-nitroquinoline-1-oxide(4NQO), N'-methyl- N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)는 Sigma사(USA)로부터 구입하였고, 간접 돌연변이원인 benzo(a)pyrene(B(a)P) 그리고 기타시약은 일본 和光純藥 특급시약을 구입하였다. 이들 변이원 물질은 DMSO (Aldrich chemical Co., USA)에 녹여 실험에 사용하였다.

#### 항돌연변이 효과 실험

돌연변이원성 실험에 사용한 *Salmonella typhimurium*의 histidine 영양요구성 변이주는 TA98, TA100의 두 종류를 이용하여 Ames test를 개량한 preincubation Mutagenicity test(Matsushima et al, 1980)를 이용하였다. 썸바귀 분말 추출물 및 분획물을 미리 건열 멸균시킨 glass cap tube에 각각 50 $\mu$ l씩 가하고 여기에 미리 TA culture배지(Difco nutrient broth 0.8g+NaCl 0.5g+증류수 100ml)에서 하룻밤 배양된 균주 100 $\mu$ l를 가한 다음 0.2M sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 전체량이 700 $\mu$ l가 되도록 하였다. 이것을 37°C에서 30분간 예비 배양하였다. Histidine/biotin이 첨가된 45°C의 top agar를 2ml씩 각 tube에 붓고 3초간 vortex하고 minimal glucose agar plate상에 도말하고 평판 고화시켜 37°C에서 48시간 배양하여 생긴 복귀 돌연변이(his<sup>+</sup> revertant colony)수를 측정하여 돌연변이원성의 유무를 판정하였다.

항돌연변이 실험에 사용된 발암물질은 MNNG, 4NQO 및 B(a)P을 사용하였다. 미리 건열 멸균시킨 glass cap tube에 썸바귀 분말 추출물 및 분획물을 각각 50 $\mu$ l 첨가한 다음 대사 활성물질이 필요한 경우에는 본 실험실에서 제조한 S-9 mix를 250 $\mu$ l씩 각각 첨가하였다. 여기에 하룻밤 배양된 균주를 100 $\mu$ l씩 주입한 후, 0.2M sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 전체량이 700 $\mu$ l가 되도록 하였다. 이것을 20분간 preincubation한

다음 histidine/biotin이 첨가된 45°C의 top agar를 2ml씩 각 tube에 붓고 3초간 vortex하고 minimal glucose agar plate상에 도말하고 평판 고화시켜 37°C에서 48시간 배양하여 생긴 복귀 돌연변이(his<sup>+</sup> revertant colony)수를 측정하여 돌연변이원성의 유무를 판정하였다.

돌연변이 억제효과의 정도(Inhibition rate)는 아래의 식에 의하였다.

$$\text{Inhibition rate(\%)} = 100 \times \{(a-b)/(a-c)\}$$

여기서 a는 돌연변이원에 의해 유도된 복귀돌연변이의 수, b는 시료를 처리하였을 때의 복귀돌연변이의 수이며, c는 돌연변이원과 시료가 없을 경우의 자연 복귀 돌연변이의 수이다.

실험에 사용된 썸바귀 분말 추출물 및 분획물과 돌연변이 유발물질의 농도는 예비실험(Maron & Ames, 1983) (dose response 및 독성검사)을 통하여 결정하였다.

### 암세포 증식 억제 효과

#### 세포주 배양

본 실험에 이용된 세포주는 암세포로 폐암 세포주인 A549(lung carcinoma, human), 유방암 세포주인 MCF-7(breast adenocarcinoma, human), 간암 세포주인 Hep 3B (hepatocellular carcinoma, human), 정상세포로는 간세포주인 293(human embryo liver)을 Korea Cell Line Bank (KCLB)로부터 구입하여 실험실에서 배양하면서 실험에 사용하였다. A549, MCF-7 세포주는 RPMI(Gibco: Grand Island, NY) Medium 1640 복합배지(1l당 RPMI 1pack, NaHCO<sub>3</sub> 2g, Hepes 2g, gentamycin sulfate 0.057g, serum 10%(v/v), pH 7.0~7.2)를, Hep3B 세포주는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, 1l당 DMEM1pack, NaHCO<sub>3</sub> 2g, Hepes 2g, gentamycin sulfate 0.057g, serum 10%(v/v), pH 7.0~7.2)를, 그리고 293 세포주는 MEM (Minimum Essential Medium, 1l당 RPMI 1pack, NaHCO<sub>3</sub> 2g, Hepes 2g, gentamycin sulfate 0.057g, serum 10%(v/v), pH 7.0~7.2)를 이용하여 10% fetal bovine serum(Intergen, Purchase, NY)을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에 적응시켜 각각 배양시켰다.

#### SRB assay

SRB(Sulfo Rhodamine B) 분석법(Martin & Martin, 1997)은 세포 단백질 염색을 이용하여 세포 증식이나 독성을 측정하는 방법으로 10% fetal bovine serum 및 각각의 암세포주(A549, Hep3B, MCF-7)를 함유하는 RPMI 1640과 DMEM 배지를 5×10<sup>4</sup> cells/ml 농도로 100 $\mu$ l씩 각 well에 첨가한다. 24시간 동안 배양(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)시킨

후, 0.2M 이하의 DMSO로 녹인 시료를 0.125, 0.25, 0.375, 0.5mg/ml의 농도로 100 $\mu$ l씩 첨가하여 48시간 동안 다시 배양하였다. 그 후 상등액을 aspirator로 조심스럽게 제거하고 냉장 보관한 10%(w/v) trichloroacetic acid(TCA)를 100 $\mu$ l씩 첨가한 후 1시간 동안 4°C에서 방치한 후 증류수로 수회 헹구었다. 실온에서 건조 시킨 후 1%(v/v) acetic acid에 녹인 0.4%(w/v) SRB 용액 100 $\mu$ l를 첨가해 30분 동안 염색시켰다. 세포와 결합되지 않은 SRB 염색액은 1%(v/v) acetic acid 용액으로 수회 헹군 다음, 다시 건조 시킨 후 10mM Tris buffer(pH 10.5) 100 $\mu$ l로 세포와 결합되어 있는 염색제를 충분히 녹인 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

**통계분석**

실험에서 측정된 결과는 실험군당 평균(mean)과 표준편차(SEM)로 나타냈으며, 이들 데이터들은 SAS (Statistical Analysis System) program을 이용하여 분산분석을 한 후 Student's test 와 Duncan's multiple range test로서 분석하였다.

**결과 및 고찰**

**씀바귀 분말 추출물 및 분획물의 항돌연변이 효과**

본 실험에 사용한 썬바귀 분말에 대한 돌연변이원성 유무를 확인하기 위하여 현재 돌연변이원성 실험에 널리 이용되고 *S. typhimurium* TA98과 TA100을 사용하여 Ames test를 실시하였다. 각 균주에 대하여 썬바귀 분말 시료들이 독성을 나타내지 않는 범위에서 직접 돌연변이

원(MNNG, 4NQO)과 간접 돌연변이원(B(a)P)에 대하여 실험을 실시하였다.

Ames test 결과 음성대조군의 복귀 돌연변이 집락수는 TA98이 13 $\pm$ 3, TA100은 192 $\pm$ 8이었다. 각 시료 자체의 돌연변이원성을 실험한 결과, 집락수가 음성대조군에 비하여 농도 의존성을 나타내지 않으므로 돌연변이원성을 나타내지 않는 것으로 판단되었다(자료 미제시).

강력한 발암물질로써 직접 변이원으로 사용된 MNNG (0.4 $\mu$ g/plate)의 경우 *S. typhimurium* TA100 균주에서 시료농도 100 $\mu$ g/plate에서 메탄올 추출물이 84.51%로 가장 높은 억제효과가 나타났다. 또한, 부탄올 분획물, 에칠아세테이트 분획물에서도 80.89, 72.49%로 높은 억제효과를 보였다(Fig. 1). 4NQO(0.15  $\mu$ g/plate)에 대

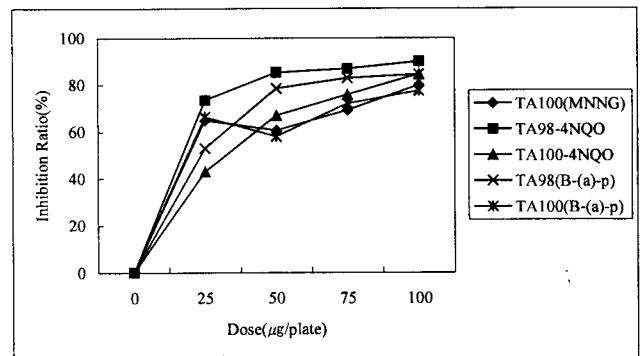


Fig. 1. The antimutagenic effects of each fraction of *Ixeris dentata* Nakai Powder extract against MNNG(0.4 $\mu$ g/plate) on *Salmonella typhimurium* TA100.

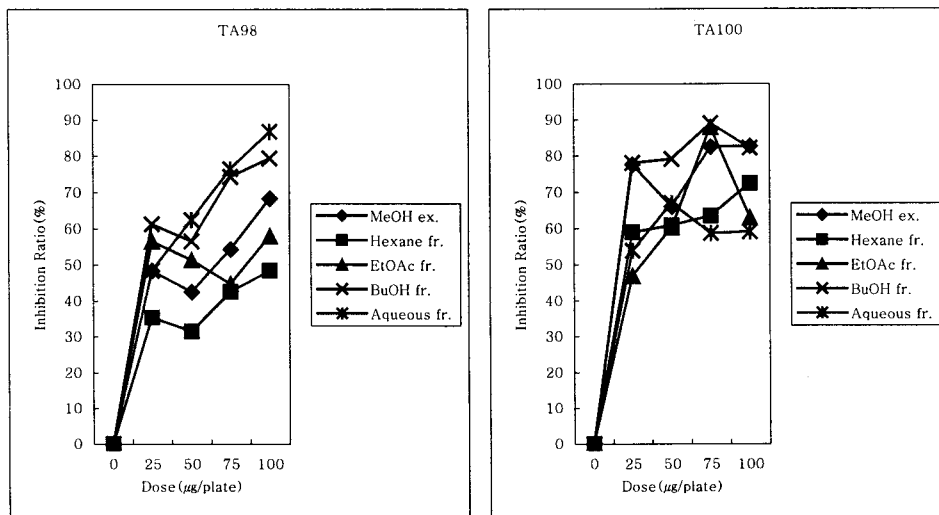


Fig. 2. The antimutagenic effects of each fraction of *Ixeris dentata* Nakai Powder extract against 4NQO(0.15 $\mu$ g/plate) on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100.

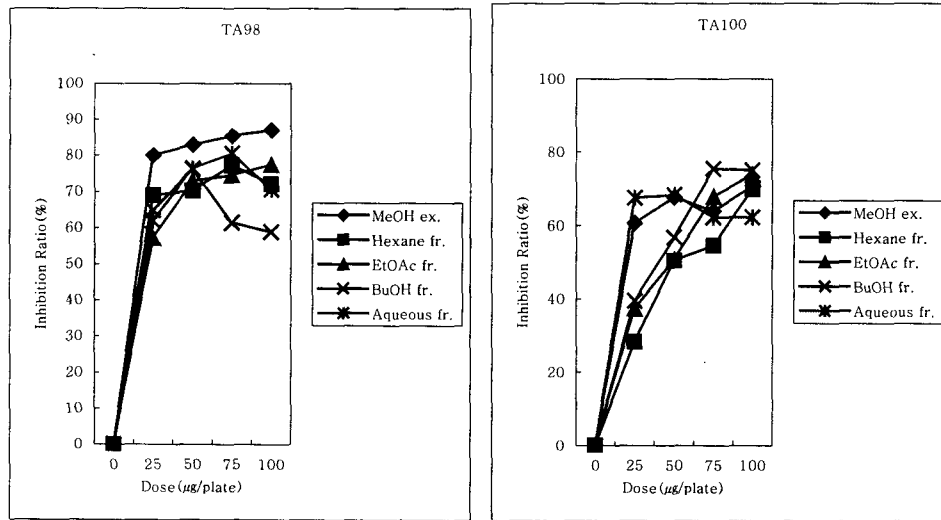


Fig. 3. The antimutagenic effects of each fraction of *Ixeris dentata* Nakai Powder extract against B(a)P(10µg/plate) on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100.

한 *S. typhimurium* TA98 균주에서 시료농도 100µg/plate에서는 물 분획물이 86.73%로 가장 높은 억제효과를 나타내었다. 또한, TA100 균주의 경우에서는 부탄올 분획물에서 88.93%로 가장 높은 억제 효과를 나타내었으며, 물 분획물을 제외한 모든 시료에서 70% 이상의 높은 억제효과를 나타내었다(Fig. 2).

간접변이원으로서 실제로 식품을 통해 흡수될 수 있는 polycyclic aromatic hydrocarbon인 B(a)P를 사용한 실험에서 TA98 균주에서는 메탄올 추출물이 86.98%로 가장 높은 억제효과를 보였으며, 모든 시료에서 70% 이상의 억제효과를 나타냈다. TA100 균주에서는 부탄올 분획물이 75.35%로 가장 높은 억제효과를 나타냈다(Fig. 3).

**씀바귀 분말 추출물 및 분말물의 암세포 증식 억제 효과**

암세포주(A549, Hep3B, MCF-7)에 대한 썸바귀 분말의 증식 억제효과를 알아보기 위하여 실험한 결과 Table 1과 같이 나타냈다. 폐암 세포주인 A549세포에서는 핵산 분획물(500µg/ml)이 87.91%로 가장 높은 억제효과를 나타내었으며, 에칠아세테이트 분획물(500µg/ml)에서도 86.23%의 억제효과를 나타내었다. 간암 세포주인 Hep3B에서는 핵산 분획물(375µg/ml)이 70.64%로 가장 높은 억제효과를 나타냈으며, 유방암 세포주인 MCF-7에서도 핵산 분획물(375µg/ml)이 82.89%로 가장 높은 억제효과를 보였다. Fig. 4는 정상 간세포주인 293에 대하여 시료농도에 따른 증식 억제효과를 나타낸 것으로 500µg/ml 시료 첨가시 암세포주에 대하여 대부분 60% 전후(물 분획물 제외)의 억제율을 보이는데 반해 293세포에 대해서는 24% 이하의 생육 억제율을 보였

Table 1. Growth inhibitory effects of *Ixeris dentata* Nakai Juice extract and fractions against the human cancer cell lines by SRB assay(unit : %<sup>†</sup>).

<i>I. dentata</i>	Dose (mg/ml)	A549	Hep3B	MCF-7
MeOH ex.	0.125	73.73±0.2 <sup>†</sup>	11.06±0.05	53.44±0.03
	0.25	79.05±0.16	42.04±0.32	52.07±0.04
	0.375	76.25±0.13	45.69±0.08	52.91±0.02
	0.5	83.07±0.13	45.76±0.06	47.46±0.03
Hexane fr.	0.125	78.29±0.16	34.12±0.07	59.59±0.03
	0.25	72.3 ±0.21	42.51±0.04	53.61±0.03
	0.375	81.86±0.14	52.86±0.01	57.86±0.01
	0.5	72.86±0.2	84.91±0.01	68.56±0.01
EtOAc fr.	0.125	79.11±0.16	18.53±0.07	50.21±0.15
	0.25	77.52±0.17	51.95±0.06	50.2±0.01
	0.375	86.5±0.03	61.48±0.05	57.8±0.04
	0.5	80.85±0.14	65.96±0.04	61.99±0.04
BuOH fr.	0.125	85.27±0.11	41.64±0.07	61.32±0.02
	0.25	78.86±0.16	53.32±0.01	54.73±0.02
	0.375	93.75±0.05	68.91±0.03	53.92±0.03
	0.5	89.01±0.01	71.54±0.02	51.05±0.05
Aqueous fr.	0.125	50.2±0.08	14.33±0.1	53.25±0.05
	0.25	52.18±0.05	13.89±0.11	60.7±0.03
	0.375	53.31±0.05	13.65±0.06	60.2±0.01
	0.5	61.5±0.04	26.02±0.07	51.05±0.01

<sup>†</sup> %=(OD540 of positive control- OD<sub>540</sub> of sample/ OD<sub>540</sub> of positive control) × 100.

<sup>†</sup> Mean value ±SD(n=3)

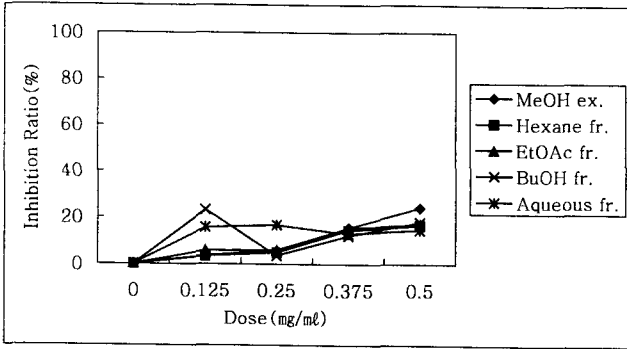


Fig. 4. Growth inhibitory effects of each fraction of *Ixeris dentata* Nakai Powder extract on human liver embryo 293.

다. 이는 암세포주에 대한 높은 억제 효과에 비해 정상 세포에 대해서는 비교적 낮은 증식 억제효과를 나타냄을 알 수 있었다.

선행 연구 결과를 기초로 하여 암세포주에 대한 증식 억제효과를 나타내는 물질을 분리 정제하여 그 구조를 밝히고, 동물실험을 통한 in vivo assay 확인 연구가 진행되어야만 썸바귀의 항암성을 명확히 밝힐 수 있을 것으로 사료된다.

### 적 요

각 균주에 대하여 썸바귀 분말 시료들이 독성을 나타내지 않는 범위에서 강력한 발암물질로써 직접 변이원으로 사용된 MNNG(0.4 $\mu$ g/plate)의 경우 *S. typhimurium* TA100 균주에서 시료농도 100 $\mu$ g/plate에서 메탄올 추출물이 84.51%로 가장 높은 억제효과가 나타났으며, 4NQO(0.15 $\mu$ g/plate)에 대한 *S. typhimurium* TA98 균주에서 시료농도 100 $\mu$ g/plate에서는 물 분획물이 86.73%로 가장 높은 억제효과를 나타내었다. 또한, TA100 균주의 경우에는 부탄올 분획물에서 88.93%로 가장 높은 억제효과를 나타내었다. 간접변이원인 B(a)P를 사용한 실험에서 TA98 균주에서는 메탄올 추출물이 86.98%로 가장 높은 억제효과를 보였으며, TA100 균주에서는 부탄올 분획물이 75.35%로 가장 높은 억제효과를 나타냈다.

암세포주(A549, Hep3B, MCF-7)에 대한 썸바귀 분말의 증식 억제효과를 알아보기 위하여 실험한 결과, 폐암 세포주인 A549세포에서는 hexan 분획물(500 $\mu$ g/ml)이 87.91%로 가장 높은 억제효과를 나타내었으며, 간암 세포

주인 Hep3B에서는 hexan 분획물(375 $\mu$ g/ml)이 70.64%로 가장 높은 억제효과를 나타냈다. 유방암 세포주인 MCF-7에서도 hexan 분획물(375 $\mu$ g/ml)이 82.89%로 가장 높은 억제효과를 보였으며, 인간 정상 간세포 293에 대해서는 24% 이하의 생육억제율을 보였다. 이는 암세포주에 대한 높은 억제효과에 비해 정상세포에 대해서는 비교적 낮은 증식 억제효과를 나타냄을 알 수 있었다.

### 감사의 글

본 연구는 2000년도 보건복지부의 보건의료기술연구개발사업(HMP-00-PT-04-0006)과 (주)천길바이오텍의 일부 지원에 의해서 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

### LITERATURE CITED

- Lai CH, Butler MN, Matney TS (1980) Antimutagenic activities of common vegetables and their chlorophyll content. *Mutat Res* 77 : 245.
- Maron DM, Ames BN (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res* 113 : 173-215.
- Martin A, Martin C (1997) Comparison of 5 microplate colorimetric assay for in vitro cytotoxicity testing and cell proliferation assays. *Cytotechnology* 11 : 49-54.
- Matsushima T, Sugimura T, Nagao M, Yahagi T, Shirai A, Sawamura M (1980) Factors modulating mutagenicity in microbial test. In Norphth. K.H. and Garner, R.C.(eds.), Short-terms for detecting carcinogens. Springer, Berlin. p. 273-285.
- Meng ZM, Sakai Y, Sato T, Nagase H, Kito H, Sato M, Mizuno M, Ono K, Nakane H, (1990) Antimutagenic activity by the medical plants in traditional Chinese medicines. *Shoyakaku Zasshi* 44 : 225.
- Moon JH, Ryu HS, Yang HS, Suh JS (1998) Antimutagenic and Anticancer Effects of Glycoprotein and Chondroitin Sulfates from Sea Cucumber (*Stichopus japonicus*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27(2) : 350-358.
- Morita K, Hara M, Kada T (1978) Studies on natural desmutagens : Screening for vegetable and fruit factors active in inactivation on mutagenic pyrolysis products from amino acids. *Agric Biol Chem* 42 : 1235.
- Natake M, Kanazawa K, Mizuno M, Ueno N, Kobayashi T, Denno GI, Minamoto S (1989) Herb water-extracts markedly suppress the mutagenicity of Trp-P-2. *Agric Biol Chem* 53 : 1423.
- SAS (1988) SAS USER' guide: Statistics. Ver. 6.03 Ed. SAS Institute Inc. Cary.
- Sugimura T, Sato S (1983) Mutagens-carcinogens in foods. *Cancer Res(Suppl)* 43 : 2415.