

송화 메탄올 추출물의 항산화적 항돌연변이 효과

박정섭 · 안병용* · †최동성

우석대학교 생명공학부, 익산대학 생명과학과*

Antimutagenic and Antioxidative Effects of Methanol Extract of Pine Pollen

Jeong-Seob Park, Byung-Young Ahn* and †Dong-Seong Choi

Division of Bioscience and Biotechnology, Woosuk University

Department of Life Science, Iksan College *

Abstract

This study was performed to investigate the antimutagenic and antioxidative activities of pine pollen with respect to the microbial mutation induced by various mutagens such as 1-NP, daunomycin, 2-NF, MNNG, NaN₃, 4NQO, 4-NOPD, AFB₁, Trp-P-1, 2-AF and oxidative mutagens such as *t*-BOOH, H₂O₂. Pine pollen, originally extracted with hexane, was reextracted with 70% methanol. The results obtained using the methanol extract, in terms of the antimutagenicity observed in relation to ten kinds of mutagens, showed that it exhibited 17.8, 82.2 and 80.9% inhibitory effects against daunomycin, AFB₁, and Trp-P-1, respectively, in *Salmonella typhimurium* TA98 and a 72.3% inhibitory effect against AFB₁ in *S. typhimurium* TA100. In terms of the antimutagenicity exhibited in relation to *t*-BOOH, a 72.3% inhibitory effect was observed, but no antimutagenicity was observed in relation to the other mutagens and strains. The methanol extract was further fractionated by chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol. In *S. typhimurium* TA98, the chloroform(150 µg/plate) fraction showed strong antimutagenic effects of 55.6%, 93.7% and 93.5%, while the ethyl acetate(100 µg/plate) fraction showed 11.4%, 74.3% and 85.2% in relation to the mutagenicity induced by daunomycin, AFB₁ and Trp-P-1, respectively. In *S. typhimurium* TA100, the chloroform and ethyl acetate fractions showed antimutagenic effects of 95.1% and 62.5%, respectively, on the mutagenicity induced by AFB₁. In *S. typhimurium* TA102, the chloroform fraction showed an antimutagenic effect of 93.6% on the mutagenicity induced by *t*-BOOH.

Key words : pine pollen, antimutagenicity, antioxidative, mutagens.

서 론

세포의 유전정보를 보유하고 있는 DNA는 세포 외부의 각종 유해인자와 세포 대사과정 중에 발생하는 활성산소 등으로부터 지속적인 공격을 받는다. 이렇게 생성된 DNA 손상은 세포내에 존재하는 수 종류의

DNA 수복계에 의해 복구되어진다. 그러나 DNA 수복계가 제대로 작동하지 않거나 DNA 손상과 수복 사이에 불균형이 발생하면 손상된 DNA는 세포의 사멸을 초래하거나 돌연변이를 유발하여 암¹⁾, 당뇨병 및 치매^{2,3)}와 같은 질환을 일으키게 된다. 이러한 유전자 돌연변이 관련 질환의 발병률은 산업이 발달하고 고령화

본 연구는 우석대학교 한방재활연구센터의 연구비 지원에 의해 수행되었음.

† Corresponding author : Dong-Seong Choi, Division of Bioscience and Biotechnology, Woosuk University, Samrye, Jeonbuk 565-701, Korea.

Tel : 063-290-1430, Fax : 063-290-1429, E-mail : dschoi@woosuk.ac.kr

가 진행될수록 증가하게 된다. 이는 산업이 발달됨에 따라 증가하는 환경 유전독성물질과 나이가 들어갈수록 세포 대사과정에서 발생하는 산화물에 대한 유전자의 노출 빈도가 증가되고 유전자 손상을 복구시키는 DNA 수복 활성도가 감소되어, 결과적으로 유전자 손상 및 돌연변이 축적이 증가하기 때문이라고 생각되고 있다.

암 발생의 70%는 환경요인에 의해 발생하며, 개시 단계의 돌연변이는 발암과 83% 이상의 높은 상관성을 나타내므로 돌연변이원은 발암원으로 인식되어지고 있고⁴⁾ 치매와 DNA 손상이 상관관계가 있다는 것이 알려져 있기 때문에, 각종 유전독성물질에 의해 발생하는 돌연변이를 효과적으로 억제할 수만 있다면 암과 치매를 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 생각된다.

소나무의 꽃가루인 송화분(pollen pini)은 맛이 달고 따뜻하며 거풍작용, 항염증작용 및 지혈작용 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다⁵⁾. 한방에서는 대장염, 감기, 두통, 외상 출혈, 염증, 습진 및 피부염의 치료에 사용되고 있으며 식품재료로서는 송엽과 함께 송화다식이나 송화주 제조에 이용되고 있다⁶⁾. 송화분에 관한 연구로서는 구성성분의 분석⁷⁾, 클로로포름 및 사염화탄소로 유발한 래트의 간장해에 대한 해독효과^{8,9)}, 고지방 식이의 래트에서 지질과 콜레스테롤의 감소 효과¹⁰⁾와 알러지 유발¹¹⁾ 등이 보고되었다. 이와 같이 송화분에 대한 연구는 성분분석이나 간장해 치료, 고지혈증 예방, 알러지 유발 등에 대하여 보고되었으나 활성산소 중에 대한 항산화 및 변이원에 대한 항돌연변이원성의 효능에 대해서는 보고되지 않고 있다. 따라서 건강기능식품을 개발하기 위한 기초자료를 얻기 위하여 Ames test를 이용하여 10 종류의 직·간접 돌연변이원과 산화물질인 *t*-과산화부틸(*t*-BOOH)과 H₂O₂에 의해 유도된 돌연변이에 대한 억제효과를 평가하였다.

재료 및 방법

1. 재료 및 시약

송화분은 (주)기림상사에서 수입한 북한산 송화분을 사용하였으며, 돌연변이원인 4-nitroquinoline *N*-oxide(4NQO), 2-aminofluorene(2-AF), aflatoxin B₁ (AF B₁), 3-amino-1,4-dimethyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-1), daunomycin, H₂O₂, *tert*-butyl hydroperoxide(*t*-BOOH), NADP(β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate), D-glucose-6-phosphate, β -naphthoflavone, phenobarbi-

tal, dimethyl sulfoxide(DMSO) 등은 Sigma사, *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG)는 Fluka사, sodium azide(NaN₃)는 Junsei chemical사, 4-nitro-1,2-phenylene-diamine(4-NOPD), 2-nitrofluorene(2-NF), 1-nitropyrene (1-NP)은 Aldrich Chem. Co.의 제품을 구입하였다. 또한 균주 배양을 위한 배지로서 nutrient broth는 Oxoid 제품을, D-glucose, potassium phosphate dibasic, citric acid, sodium ammonium phosphate는 Sigma 제품을, magnesium sulfate는 Wako Pure Chemical 제품을 사용하였으며, 기타 시약은 1급 이상의 제품을 사용하였다. 그리고 실험용 래트(male, Sprague Dawley)는 대한실험동물(대전)로부터 구입하여 사용하였다.

Salmonella typhimurium TA98(*hisD3052*)과 TA100(*hisG46*)은 한국생명공학연구원 유전자 은행으로부터 분양을 받았으며, *S. typhimurium* TA102(*hisG8476*)와 TA104(*hisG428*)는 B. N. Ames 박사(California 대학, U.S.A)로부터 분양을 받아 각각의 유전형질을 확인한 후 사용하였다.

2. 시료의 추출 및 분획

송화분은 5배량의 *n*-헥산으로 2회 환류추출한 후 잔사에 5배량의 70% 메탄올을 첨가하여 40°C에서 12시간씩 3회 진탕 추출한 다음 filter paper No.2 (Toyo)여과지로 여과하였다. 이 여과액을 4°C에서 12시간 냉각한 다음 여과하고, 그 여과액을 감압 농축하여 추출용매를 제거한 다음 동결건조하였다. 이 동결건조한 시료를 물에 용해한 다음 용매의 극성에 따라 순차적으로 클로로포름, 에틸아세테이트, *n*-부탄올 및 물로 분획하고 감압농축하여 동결건조하였다. -20°C에 보관하면서 DMSO에 녹여 실험에 사용하였다.

3. S9 분획 조제

S9 분획의 조제는 Ong 등의 방법¹²⁾에 따라서 조제하였으며, 실험용 동물로는 200±10 g의 7주령된 래트(male, Sprague Dawley)를, 유도물질로는 phenobarbital과 β -naphthoflavone을 사용하였다. 조제된 S9 분획은 Nunc tube에 1 mL씩 분주하여 -70°C에 보관하면서 사용하였다. S9 mix는 Ames 등의 방법¹³⁾에 따라 조제하였다.

4. 균생육 억제효과 실험

균생육에 미치는 송화분 추출물의 효과는 Jang 등의 방법¹⁴⁾에 따라 수행하였다. *S. typhimurium* TA98, TA100, TA102과 TA104를 각각 Oxoid nutrient broth No.2(5 g per liter)에 하룻밤 배양하여 ADS=70(1~2×

10^9 CFU/mL)으로 맞춘 다음, 이 배양액을 1/15 sodium phosphate buffer(pH 7.2)로 10^7 배 희석하였다. 이 희석액 100 μ L, 0.1 M sodium phosphate buffer 0.55 mL(pH 7.0)과 각 농도별 시료 50 μ L를 혼합하여 37°C에서 210 rpm으로 20분간 진탕 배양하였다. 이를 top agar [agar 6 g, NaCl 5 g per liter (45°C)] 2 mL를 첨가하여 혼합한 후, VBNM[agar 15 g, 증류수 920 mL, 50×VB salt 20 ml, 40% glucose 10 mL, Oxoid nutrient broth No. 2 (25 g per liter) 50 mL] 평판배지 상에 도포하여 37°C에서 12시간 배양한 후 계수하였다.

5. 돌연변이 억제효과 실험

돌연변이 억제효과 실험은 Ames test를 개량한 preincubation 방법¹³⁾으로 실시하였다. 미리 멸균시킨 시험관에 각 농도의 변이원 50 μ L, 0.5% S9 mix 0.5 mL 혹은 0.1 M sodium phosphate buffer 0.5 mL, 각 농도의 송화 추출물 50 μ L, Oxoid nutrient broth No.2에 하루밤 배양시킨 균 배양액($1 \sim 2 \times 10^9$ CFU/mL, OD=0.4) 100 μ L를 혼합하고, 37°C에서 210 rpm으로 20분간 진탕 배양하였다. 배양액에 미리 준비해 둔 0.5 mM histidine과 biotin을 함유한 top agar 2 mL를 혼합한 후 minimal glucose agar plate[agar 15 g, 멸균수 930 mL, 50 × VB salt 20 mL, 40% glucose 50 mL] 상에 도포, 평판 고화시킨 다음, 37°C에서 48시간 배양하여 발생한 복귀 돌연변이주(his+ revertant colony)의 수를 계수하여 돌연변이 억제정도를 판정하였다. 돌연변이 억제효과(억제율)는 $[M-S_1/(M-S_0) \times 100]$ 으로 계산하였고, 돌연변이원만을 첨가하였을 때 복귀 돌연변이주의 수를 M, 자연 복귀 돌연변이주의 수를 S_0 , 돌연변이원과 시료를 첨가했을 때의 복귀 돌연변이주의 수를 S_1 으로 나타내었다. 각각의 실험은 duplicate로 2회 반복 실험하였다.

결과 및 고찰

1. 균 생육에 대한 송화 추출물의 한계농도

시료의 항균력¹⁵⁾에 의한 균수의 감소나 세포분열 속도의 감소는 항돌연변이의 활성에 있어서 매우 큰 위양성의 결과를 나타낼 수 있다. 특히 다른 식물 또는 균류를 포함한 각종 미생물에 직·간접적으로 해를 주는 알레로파시 작용¹⁶⁾은 세균시험계에서 균주를 사멸시키거나, 세포분열을 감소시켜 복귀돌연변이주의 수를 감소시킬 수가 있다. 이러한 결과는 돌연변이 억제효과를 나타내는 것으로 오인될 수 있다. 이러한 위양성의 결과를 배제하기 위하여 송화분 추출액을 일

정한 농도로 증가시켜 *S. typhimurium* TA98, TA100, TA102와 TA104에 대한 생육억제를 검토하였다. 그 결과 70% 메탄올 추출물에서는 2.0 mg/plate, 클로로포름 분획물은 180 μ g/plate, 에틸아세테이트 분획물은 120 μ g/plate와 부탄올 분획물에서는 230 μ g/plate, 물 분획물에서는 2.0 mg/plate 이상에서 생육억제가 나타나기 시작하였으며, *S. typhimurium* TA98과 TA100에서 생육저해를 나타내는 농도는 큰 차이를 보이지 않았다. *S. typhimurium* TA102와 TA104에 대한 균생육의 한계농도는 *S. typhimurium* TA98, TA100과 유사한 경향을 보였으며, 클로로포름 분획물에서만 150 μ g/plate 이상에서 생육 억제를 나타내었다.

2. 송화 메탄올추출물의 돌연변이 억제효과

S. typhimurium TA98과 TA100의 균주를 이용하여 직접변이원인 1-NP, daunomycin, 2-NF, MNNG, NaN₃, 4NQO, 4-NOPD, 간접변이원인 AFB₁, Trp-P-1, 2-AF에 대한 송화 70% 메탄올 추출물(1.0 mg/plate)의 항돌연변이 효과를 평가하였다(Table 1). 7종의 직접변이원 중 daunomycin에서만 *S. typhimurium* TA98에서 17.9%의 돌연변이 억제효과를 나타내었고, 3종의 간접변이원 중 AFB₁은 *S. typhimurium* TA98과 TA100에서 82.2%와 72.3%의 돌연변이 억제효과를 나타내었으며 Trp-P-1은 *S. typhimurium* TA98에서 80.9%의 돌연변이 억제효과를 나타내었다.

직접변이원인 daunomycin은 DNA 사이에 직접적으로 삽입되어 틀변경(frameshift)을 일으키는 것으로 알려져 있으며¹⁷⁾, 세균시험계에서는 틀변경을 일으키는 *S. typhimurium* TA98에 대해서 돌연변이를 일으킨다. 간접변이원인 AFB₁은 *Aspergillus flavus*가 생산하는 곰팡이 독으로 DNA와 결합하여 간암을 유발하는 강력한 발암물질¹⁸⁾로 틀변경 돌연변이주인 *S. typhimurium* TA98과 염기쌍치환 돌연변이주인 *S. typhimurium* TA100에서 강한 돌연변이를 일으킨다. Trp-P-1은 불고기 중에 생성되는 대표적 헤테로사이클릭아민으로 CYP 1A에 의해 활성화되며, 활성화된 Trp-P-1은 DNA와 공유결합하여 틀변경 돌연변이를 일으킨다¹⁹⁾. 그러므로 송화 메탄올 추출물은 틀변경 및 염기쌍치환 돌연변이에 대한 돌연변이 억제효과를 나타내는 것으로 판단되었다.

3. 송화 용매분획물의 돌연변이 억제효과

동결건조한 송화 70% 메탄올 추출물을 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물로 순차적으로 분획하여 각각 7.7, 1.2, 9.8 및 81.3% 수율의 분획물을 얻었다.

클로로포름 분획물은 150 µg/plate, 에틸아세테이트 분획물은 100 µg/plate, 부탄올 분획물은 200 µg/plate, 물 분획물은 1.0 mg/plate의 농도로 돌연변이 억제효과를 검색하였으며, 그 결과는 Table 2와 같다.

Daunomycin에 의해 유도된 돌연변이에 대해서는 *S. typhimurium* TA98에서 클로로포름 분획물은 58.6%의 억제효과를 나타내었고, 에틸아세테이트 분획물은 11.4%, 부탄올 분획물은 6.8%의 낮은 억제효과를 나타내었다. AFB₁에 의해 유도된 돌연변이에 대해서는 *S. typhimurium* TA98에서 클로로포름 분획물은 89.7%, 에틸아세테이트 분획물은 75.6%의 억제효과를 나

타내었고, *S. typhimurium* TA100에서 클로로포름 분획물은 93.4%, 에틸아세테이트 분획물은 61.4%의 돌연변이 억제효과를 나타내었으며, 부탄올분획물은 *S. typhimurium* TA98과 TA100 모두에서 10.9%의 낮은 억제효과를 나타내었다. 또한 Trp-P-1에 의해 유도된 돌연변이에 대해서는 *S. typhimurium* TA98에서 클로로포름 분획물은 88.2%, 에틸아세테이트 분획물은 87.4%의 높은 억제효과를 나타내었다. 이러한 결과로부터 송화 분획물 중 주로 클로로포름 분획물과 에틸아세테이트 분획물에 돌연변이 억제물질이 함유되어 있음을 알 수 있었다.

Table 1. Antimutagenic effects of 70% methanol extract of pine pollen against different mutagens in *S. typhimurium* TA98 and TA100

Mutagens	Conc. (µg/plate)	5% S9	Inhibition rate(%)	
			<i>S. typhimurium</i> TA98	<i>S. typhimurium</i> TA100
1-NP	1.0	-	2.3±1.7	3.6±2.9
Daunomycin	1.0	-	17.9±2.3	NI
2-NF	5.0	-	3.1±1.1	1.4±0.8
MNNG	0.4	-	NI ¹⁾	3.9±1.4
NaN ₃	0.5	-	NI	0.4±2.0
4NQO	0.5	-	NI	2.5±2.4
4-NOPD	10.0	-	3.7±2.8	1.8±1.9
AFB ₁	0.6	+	82.2±1.2	72.3±2.1
Trp-P-1	0.4	+	80.9±1.5	NI
2-AF	1.0	+	1.7±3.9	0.8±4.2

¹⁾ No induction.

Concentration of methanol extract of pine pollen of is 1.0 mg/plate.

Table 2. Antimutagenic effects of solvent fractions of pine pollen in *S. typhimurium* TA98 and TA100

Mutagens	Strain	Fraction(concentration)			
		CHCl ₃ ^{a)} (150 µg/plate)	EtOAc ^{b)} (100 µg/plate)	BuOH ^{c)} (200 µg/plate)	Aqueous ^{d)} (1.0 mg/plate)
Daunomycin	TA98	58.6±0.7	11.4±3.1	6.8±0.2	- 3.4±1.6
AFB ₁	TA98	89.7±2.6	75.6±2.1	10.9±0.2	- 3.8±1.5
	TA100	93.4±1.4	61.4±1.1	5.4±1.8	- 1.6±0.3
Trp-P-1	TA98	88.2±1.3	87.4±1.9	- 5.6±2.4	4.6±2.9

^{a)}chloroform, ^{b)}ethyl acetate, ^{c)}n-butanol, ^{d)}water.

Daunomycin(1.0 µg), AFB₁(0.6 µg) and Trp-P-1(0.4 µg) were added to the plate, respectively.

Values are means±standard deviation(n=4, 2 plates× 2 times).

항돌연변이원성을 나타낸 클로로포름 분획물과 에틸아세테이트 분획물을 각각 1~150 $\mu\text{g}/\text{plate}$, 1~100 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 농도로 첨가하여 농도 증가에 따른 돌연변이 억제효과를 평가하였다(Fig. 1). 클로로포름 분획물의 경우, *S. typhimurium* TA98에서 daunomycin에 유도된 돌연변이에 대한 억제율은 0.3~55.6%, AFB₁에 의해 유도된 돌연변이에 대한 억제율은 *S. typhimurium* TA98에서 5.5~93.7%, *S. typhimurium* TA100에서는 0.2~95.1% 이었다. 또한 TA98에서 Trp-P-1에 의해 유도된 돌연변이에 대한 억제율은 12.4~93.5% 이었다. 에틸아세테이트분획물의 경우, AFB₁에 의해 유도된 돌연변이에 대한 억제율은 *S. typhimurium* TA98에서는 9.3~74.3%, *S. typhimurium* TA100에서는 0.2~62.5% 이었다. 또한 *S. typhimurium* TA98에서 Trp-P-1에 의해 유도된 돌연변이에 대한 억제율은 18.4~85.2% 이었다. 이상과 같은 결과로부터 송화분의 클로로포름 및

에틸아세테이트 분획물은 daunomycin, AFB₁, Trp-P-1에 의해 유도된 돌연변이에 대해서 각각 용량 의존적으로 억제함을 알 수 있었다.

4. 송화 추출물의 항산화적 항돌연변이효과

H₂O₂와 *t*-BOOH로 부터 발생된 프리라디칼은 *S. typhimurium* TA102와 TA104에서 DNA손상을 일으켜 돌연변이를 유발시키는데, 이러한 세균 시험계를 이용하면 손쉽게 항산화물질을 검색할 수 있다. *S. typhimurium* TA102와 TA104 균주를 이용하여 H₂O₂와 *t*-BOOH에 의해 각각 유도된 산화적 돌연변이에 대한 송화 70% 메탄추출물과 그의 용매분획물의 억제효과를 검토한 결과 Table 3과 같은 결과를 얻었다. 송화 70% 메탄을 추출물(1.0 mg/plate)은 *S. typhimurium* TA102의 *t*-BOOH 처리구에서만 16.3%의 돌연변이 억제효과를 나타내었고, *S. typhimurium* TA102나 TA104의 H₂O₂ 처리구나 *S. typhimurium* TA104의 *t*-BOOH 처리구에서는 돌연변이 억제효과를 나타내지 않았다. *S. typhimurium* TA102에서 *t*-BOOH에 유도된 돌연변이 대해 용매 분획물 중 클로로포름 분획물(120 $\mu\text{g}/\text{plate}$)은 94.8%의 돌연변이 억제효과를 나타내었고, 에틸아세테이트 분획물(100 $\mu\text{g}/\text{plate}$), 부탄올 분획물(200 $\mu\text{g}/\text{plate}$)과 물 분획물(1.0 mg/plate)에서는 10% 이하의 낮은 돌연변이 억제효과를 나타내었다. 이러한 결과는 산화적 돌연변이에 대한 억제효과를 나타내는 유효성분의 대부분이 클로로포름 분획물에 용해되어 있음을 시사하는 것이다.

용매 분획물 중 돌연변이 억제효과를 나타낸 클로로포름 분획물의 농도변화에 따른 돌연변이 억제효과를 보기 위하여 클로로포름 분획물의 농도를 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 에서 120 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 로 점차 증가 시켜 돌연변이 억제효과를 비교하였으며, 그 결과는 Fig. 2와 같다. 클로로포름 분획물의 농도가 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 일 때 돌연변이 억제율은 19.7%, 30 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 일 때 38.4%, 60 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 일 때 71.9%, 90 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 일 때 86.1%, 120 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 일 때 93.6%로 농도 증가에 따라 돌연변이 억제를 또한 농도 의존적으로 증가하였다.

이러한 결과들은 송화분 메탄을 추출물의 클로로포름 분획물 중에 활성산소종을 상쇄시키는 항산화적 항돌연변이원성이 강한 성분들이 함유되어 있을 것으로 예상되므로 차후 활성물질의 분리·동정에 관한 연구가 수행되어야 할 것으로 사료되는 바이다. Hartman 등²⁰⁾은 천연에 존재하는 항돌연변이원 중 우리가 섭취하는 식품 중에 존재하는 항산화제는 산화적 손상을 방지하는 보호제로서 중요하다고 강조한 바 있

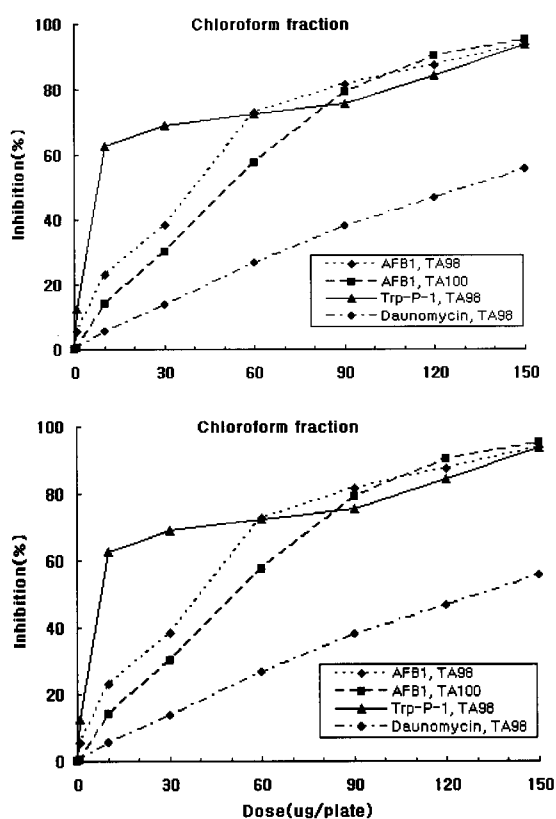


Fig. 1. Dose-dependently antimutagenic effects of chloroform and ethyl acetate fraction of pine pollen on the mutagenicity of daunomycin and Trp-P-1 in *S. typhimurium* TA98, AFB₁ in *S. typhimurium* TA98 and TA100.

Daunomycin(1.0 μg), AFB₁(0.6 μg), and Trp-P-1 (0.4 μg) were added to the plate.

Table 3. Antioxidative antimutagenicity of 70% methanol extract and solvent fractions of pine pollen in *S. typhimurium* TA102 and TA104

Strains	<i>S. typhimurium</i> TA 102		<i>S. typhimurium</i> TA104	
	<i>t</i> -BOOH ^{a)} (2.0 mM)	H ₂ O ₂ ^{b)} (100 mM)	<i>t</i> -BOOH (0.2 mM)	H ₂ O ₂ (20 mM)
70% MeOH	16.3±2.1	-4.9±2.8	-0.7±1.2	1.2±2.4
CH ₃ Cl fraction	94.8±1.6	-	-	-
EtOAc fraction	-4.1±1.9	-	-	-
BuOH fraction	-2.9±2.4	-	-	-
Aqueous fraction	-1.0±0.6	-	-	-

^{a)} *tert*-butyl hydroperoxide, ^{b)} hydroperoxide

Concentrations of 70% methanol extract of pine pollen, CHCl₃ fraction, EtOAc fraction, BuOH fraction, and aqueous fraction are 1.0 mg, 120 µg, 100 µg, 200 µg, and 1.0 mg per plate, respectively. Values are means ± standard deviation (n=4, 2 plates × 2 times). - is not detected.

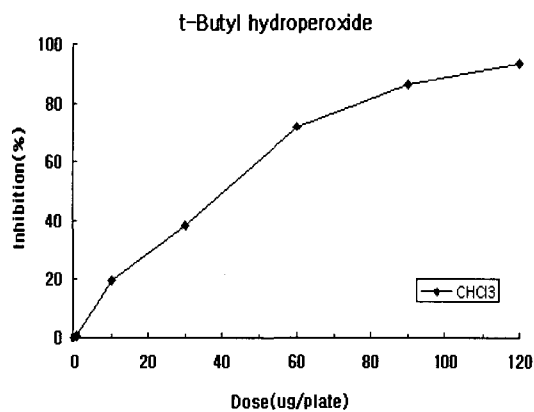


Fig. 2. Dose-dependently antioxidative antimutagenicity of CHCl₃ fraction of pine pollen on the mutagenicity of *t*-BOOH in *S. typhimurium* TA102.

tert-Butyl hydroperoxide (2.0mM) was added to 50 µL.

다. 세포내에서 프리 라디칼은 방사선 흡수, 체내의 정상 대사 과정에서의 산화반응과 같은 내적인 요소, CCl₄, *t*-BOOH 등의 독성 화학물질이나 알콜 음용과 같은 외적인 요소 등에 의한 체내 효소적 대사과정 중에서 생성될 수 있는데²¹⁾, 한 등⁸⁾은 송화분에서 분리한 분자량 30,000~67,000 dalton의 조단백질이 CCl₄ 투여 시 발생하는 프리라디칼에 의해 유도된 간장장애에 효과가 있다는 보고를 한 바 있으나, 송화분에서 항산화효과는 비극성에서 강하게 나타났으므로 단백질 성분에 의한 가능성은 배제되었다. 또한 flavonoid 성분도 산화적 손상을 방지하는 것으로 알려져 있는데²²⁾, Teizo 등²³⁾에 의해 송화 중에 flavonoid 성분이 함유되

어 있음이 보고되어 있어 이러한 성분이 항산화적 항돌연변이 효과에 관여했을 것으로 추정된다.

요 약

직·간접 변이원과 산화적 돌연변이원에 대한 송화분 추출물의 항돌연변이원성에 대하여 Ames test로 조사하였다. 메탄올 추출물을 이용하여, 10종의 돌연변이에 대한 돌연변이 억제효과를 검색한 결과 *S. typhimurium* TA98에서는 daunomycin, AFB₁과 Trp-P-1의 변이원성에 대해서만 각각 17.8, 82.2, 80.9%의 돌연변이 억제효과를, *S. typhimurium* TA100에서는 AFB₁의 변이원성에 대해서만 72.3%의 돌연변이 억제효과를 나타내었으며, *S. typhimurium* TA102, 104에서 *t*-과산화부틸과 H₂O₂의 돌연변이원성에 대한 메탄올 추출물의 돌연변이 억제 효과는 *t*-과산화부틸을 돌연변이원으로 한 *S. typhimurium* TA102에서 16.3%의 억제효과를 선택적으로 나타내었다. 따라서 메탄올 추출물을 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 순으로 순차용매 분리한 다음, 이 분획물에 대한 항돌연변이원성을 검색하였다. 그 결과 *S. typhimurium* TA98에서 daunomycin, AFB₁과 Trp-P-1에 대해서 클로로포름 분획물은 각각 55.6, 93.7, 93.5%, 에틸아세테이트 분획물은 각각 11.4, 74.3, 85.2%, 부탄올 분획물에서는 10.9, -5.6, 6.8%, 물 분획물은 각각 -3.4, -3.8, 4.6%의 돌연변이 억제효과를 나타내었다. *S. typhimurium* TA100에서는 AFB₁에 대해 클로로포름 분획물과 에틸아세테이트 분획물이 각각 95.1, 62.5%의 억제효과를 나타내었으며,

S. typhimurium TA102에서는 *t*-과산화부틸에 의해 유도된 산화적 돌연변이에 대해 클로로포름 분획물이 93.6%로 매우 강한 억제효과를 나타내었으며, 기타 분획물에서는 매우 낮은 억제효과를 나타내었다.

참고문헌

- Friedberg, E.C. : DNA damage and repair, *Nature*, **421**, 436~440(2003)
- Eizirik, D.L., Spencer, P. and Kisby, G.E. : Potential role of environmental genotoxins agents in diabetes mellitus and neurodegenerative diseases, *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 1585~1591(1996)
- De La Monte, S.M., Ganju, N., Feroz, N., Luong, T., Banerjee, K., Cannon, J. and Wands, J.R. : Oxygen free radical injury is sufficient to cause some Alzheimer-type molecular abnormalities in human CNS neuronal cells, *J. Alzheimer Dis.*, **2**, 261~281(2000)
- Mohn, G.R. : Bacterial systems for carcinogenicity testing, *Mutation Res.*, **87**, 191~210(1981)
- 임록재 : 조식약용식물지 III, 농업출판사, 평양, p.184~186(1998)
- 허준 : 동의보감, 남산당, 서울, p.242(1979)
- 김혜자 : 적송화분과 리기다 송화분의 성분조성에 관한 연구 : 일반성분, 무기질, 중금속, 비타민, 유기산 함량, *한국영양식량학회지*, **21**, 201~206(1992)
- 한준표, 여지영 : 송화분의 단백질과 단백질 분획의 분리 및 사염화탄소를 투여한 흰쥐의 혈청에 미치는 효과, *대구효성카톨릭대학교 연구논문집*, **52**, 45~53(1996)
- 하은주, 이해경, 한준표 : Chloroform 투여 흰쥐의 혈청 및 간장에 미치는 송화분의 영향, *효성응과집*, **1**, 69~76(1991)
- Lee, Y. J., Park, M. H., Hwang, S. W., Bae, M. J. and Han, J. P. : Effect of pine pollen on serum and liver lipids in rats on a fed high fat diet, *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **23**, 192~197(1994)
- Hosen, H. : Allergy to pine pollen, *Ann. Allergy*, **64**, 480~486(1990)
- Ong, T.M., Mukhtar, M., Wolf, C.R. and Zeiger, E. : Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, **4**, 55~60(1980)
- Ames, B.N. and Maron, D.M. Revised methods for the *S. typhimurium* mutagenicity test, *Mutation Res.*, **113**, 173~215(1983)
- Jang, G.H., Aha, B.Y., Kwon, Y.J. and Choi, D.S. : Antimutagenic Effect of Resveratrol on Trp P-1 in *Salmonella typhimurium* TA98, *Korean J. Food & Nutr.*, **14**, 329~332(2001)
- Ahn, B.Y., Kim, D.G. and Choi, D.S. : Antimutagenic effect of Tanshen(*Salvia miltiorrhiza* Bung), *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 197~202(1999)
- Muller, C. H. : Allelopathy as a factor in ecological process, *Vegetatio*, **18**, 348~357(1969)
- Chaires, J.B., Fox, K.R., Herrera, J.E., Britt, M. and Waring, M.J. : Site and sequence specificity of the daunomycin-DNA interaction, *Biochemistry*, **26**, 8227~8236(1987)
- Cry, R.G., Essigmann, J.M., Reinhold, V.N. and Wogn, G.N. : Identification of the principal aflatoxin B₁-DNA adduct formed *in vivo* in rat liver, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1745~1749(1981)
- Hashimoto, Y., Shudo, K. and Okamoto, T. : Activation of a mutagen, 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole. Identification of amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole and its reaction with DNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **96**, 355~362(1980)
- Hartman, P.E. and Shankel, D.M. : Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules, *Environ. Mol. Mutagen.*, **15**, 145~182(1990)
- 문진영 : 작약 약침액이 *tert*-butyl hydroperoxide로 유도된 흰쥐 배양 간세포의 지질과 산화 반응 및 항산화효소 활성에 미치는 영향, *대한침구학회지*, **17**, 176~187(2000)
- Caragay, A.B. : Cancer-preventive foods and ingredients, *Food Technology*, **46**, 65~68(1992)
- 勝又悌三, 中村修樹, 斗ヶ澤宣久 : 花粉の生化学的研究 XII. 花粉のフラボノイド化合物について, *岩手大學部報告*, **12**, 21~28(1974)

(2003년 10월 10일 접수)