

## 산마늘 추출물의 항돌연변이원성 및 세포독성 효과

함승시<sup>†</sup> · 최승필 · 최형택<sup>1</sup> · 이득식<sup>2</sup>

강원대학교 바이오산업공학부, <sup>1</sup>(주)신원에프아이, <sup>2</sup>동해대학교 외식산업학과

### Antimutagenic and Cytotoxic Effects of *Allium victorialis* Extracts

Seung-Shi Ham<sup>†</sup>, Cheng-Bi Cui, Hyung-Taek Choi<sup>1</sup> and Deuk-Sik Lee<sup>2</sup>

School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chuncheon, Kangwon-do 200-701, Korea

<sup>1</sup>Shin Won Food Industry Co., LTD. Hwasung, Kyunggi-do 445-940, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Service Industry, Dong Hae University, Dong Hae 240-713, Korea

#### Abstract

This study was carried out to determine the antimutagenic and anticancer effects of *Allium victorialis* using Ames test and cytotoxicity. *Allium victorialis* extracted with ethanol and then further fractionated to chloroform, ethyl acetate and water. The inhibition rate of ethanol extract (200 µg/plate) of *Allium victorialis* in the *Salmonella typhimurium* TA100 strain showed 88.2% against the mutagenesis induced by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine(MNNG). The suppression ratio against 4-nitroquinoline-1-oxide(4NQO) in the *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 strains showed 76.4% and 83.0%, respectively. The cytotoxicity effects of *Allium victorialis* extract against the cell lines with human lung carcinoma (A549), human breast adenocarcinoma (MCF-7) and human gastric cacinoma (KATOIII) were inhibited with the increase of extract concentration. The treatment of 0.5 µg/plate *Allium victorialis* of ethanol extract showed strong cytotoxicities of 74.2%, 71.3% and 67.4% against A549, MCF-7 and KATOIII, respectively.

Key words : *Allium victorialis*, antimutagenicity, cytotoxicity

## 서 론

식생활의 서구화와 지질의 과잉섭취, 복잡한 사회생활에 따른 스트레스는 각종 질환, 특히 성인병의 증가를 가져오게 되었다. 산업화와 더불어 변이원성 물질과 접촉할 가능성이 증가 되었을 뿐만 아니라 식생활 환경이 복잡하고 다양해짐에 따라 암을 위시한 성인병의 발병율이 높아지고 있다. 그러나 현대의 의학수준에서는 모든 질병을 제거하지 못하므로 식생활을 개선하여 예방하도록 권장하고 있고 그 중 산채의 경우, 지금까지는 경험적으로 전통식품의 소재로 단순히 이용되어져 왔으나 이들의 생리활성 기능이 밝혀지면서 유용 산채류의 수요가 증가하고 있는 실정이다.

산마늘(*Allium victorialis*)은 백합과(Liliaceae)에 속하는 다년생 초본식물로서 인경은 장난형으로 뚜렷한 망상섬유 세포로 덮여 있고 길이는 4-7 cm로 갈색을 띤다. 잎은 넓고 2-3매가 나며 길이 20-30 cm, 폭은 3-10 cm로 타원형이고 양끝

이 좁다. 우리나라에서는 지리산, 설악산 및 울릉도의 숲속이나 북부지방에 자생하며 잎과 인경은 산나물로 이용되고 있다(1). 민간에서는 전초를 비타민 결핍증에 사용하거나 위장병, 특히, 위염, 신경쇠약, 심장병 등에도 사용하여 왔으며 (2) 대체로 마늘과 같은 용도로 쓰인다. Nishimura 등(3)은 산마늘 추출물을 주성분으로 하여 벌꿀과 과당 등을 첨가하여 건강음료를 연구하였다. 그리고 기능성 물질 분석(4,5), 생육환경과 영양평가(6), 콜레스테롤 저하 활성 및 항동맥경화 효과(7,8), 간보호 및 항당뇨 효과 등(9)에 대한 연구가 보고되고 있다.

산마늘은 식물분류학적으로나 생약학적 용도면에서 마늘과 상당히 유사함에도 불구하고 그 식물의 형태가 현저히 다른 것이 특이하다(4). 산마늘에 대한 연구는 아직 초기단계이나 산나물로서의 중요성이 인식되고 있는 실정이므로 본 연구에서는 산나물에 대한 항돌연변이원성 및 세포독성에 대한 생리활성 효과에 관한 연구결과를 얻었기에 그 결과를 보고하고자 한다.

<sup>†</sup> Corresponding author. E-mail : Hamss@kangwon.ac.kr, Phone : 82-33-250-6453, Fax : 82-33-250-6453

## 재료 및 방법

### 재 료

본 실험에 사용한 산마늘은 강원도 평창군 근교에서 자생하는 것을 2003년 3월에 채취하였으며, 전초를 동결건조하여 분쇄한 후 -30℃ 냉동고에 보관하면서 시료로 사용하였다.

### 시약

직접 돌연변이원(direct mutagen)으로서 *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine(MNNG), 4-nitroquinoline-1-oxide(4NQO), glucose-6-phosphate은 미국 Sigma 회사로부터 구입하였다. 세포배양에 필요한 배지로 RPMI 1640과 Hepes buffer, Fetal bovine serum(FBS), Trypsin-EDTA는 Gibco사(U.S.A.)로부터 구입하였다. 본 실험에 이용된 인간 폐암세포 A549(Lung carcinoma, Human), 인간의 유방암세포 MCF-7(Breast adenocarcinoma, Human) 및 인간 위암세포 KATO III(Gastric carcinoma, Human)는 Korea Cell Line Bank(KCLB)로부터 구입하여 본 실험실에서 배양하면서 실험에 사용하였다. 그 외 추출 용매인 에탄올, 클로로포름, 에틸아세테이트 등은 특급시약을 사용하였다.

### 시료의 추출 및 분획

동결건조된 시료를 시료중량으로 10배의 70% 에탄올을 첨가하고 70℃에서 8시간씩 3회 추출하였으며, 감압여과장치에서 뜨거운 상태로 여과하여 4℃ 냉장실에 24시간 방치 후 감압농축기를 사용하여 추출용매를 제거한 후 동결건조기를 이용하여 건조시켰다. 70% 에탄올로 추출물을 용매의 극성에 따라 분별분리를 행하여 클로로포름, 에틸아세테이트 및 물층으로 극성의 차이에 의해 세가지 분획으로 조제하였다(Fig. 1). 분리된 각각의 용매 분획물은 70℃에서 감압농축 후 동결건조하여 분획물을 얻었다.

### 돌연변이원성 실험

산마늘 추출물의 돌연변이원성 실험은 *S. typhimurium*의 변이주인 TA98과 TA100을 이용하여 Ames test를 개량한 preincubation법(10)으로 실시하였다. 건열멸균시킨 glass cap tube에 각각의 시료를 50 µg/plate씩 가하고 여기에 전배양시킨 배양균액 100 µL를 가한 다음 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 전체량이 700 µL가 되도록 하였다. 이것을 37℃에서 20분간 진탕배양한 다음 histidine/biotin이 첨가된 top agar(45℃)를 2 mL씩 가하여 잘 혼합한 후 미리 조제해 놓은 minimal glucose agar plate상에 도말하고 평판고정화시켜 37℃에서 48시간 배양하여 생긴 복귀돌연변이(his+ revertant colony)수를 측정하여 돌연변이원성의 유무를 판정하였다.

### 항돌연변이원성 실험

Ames test를 개량한 preincubation법에 따라 항돌연변이원성 실험을 실시하였고, 실험에 사용한 변이원물질은 MNNG 및 4NQO이다. 건열멸균시킨 glass cap tube에 시료의 추출물을 각각 50 µL씩 첨가하고 이어서 변이원 물질을 각각 50 µL씩 첨가하였다. 여기에 전배양시킨 균액을 100 µL씩 주입한 후에 0.2 M sodium phosphate buffer를 가하여 최종부피가 700 µL가 되도록 하였다. 이것을 37℃에서 20분간 진탕 배양한 다음 상기의 돌연변이원성 실험과 같은 방법으로 실험하여 생성된 복귀돌연변이 수를 측정하여 항돌연변이성 유무를 판정하였다. 산마늘 추출물과 변이원 물질의 농도는 예비실험을 통하여 결정하였으며, 항돌연변이활성은 변이원 물질의 활성에 대한 시료의 억제율(inhibition, %)로 나타내었다.

### 세포독성 실험

SRB[sulforhodamine B] assay는 세포 단백질 염색을 이용하여 세포 증식이나 독성을 측정하는 방법(11)으로 10%의 fetal bovine serum과 각각의 세포들인 인간 폐암세포(A549), 인간 유방암세포(MCF-7)는 RPMI 1640 배지를  $5 \times 10^4$  cell/mL 농도로 100 µL씩 각 well에 첨가하여 하루 동안 배양(37℃, 5% CO<sub>2</sub>)시킨 후 PBS에 녹인 추출물들을 각각 0.125, 0.25, 0.375, 0.5 mg/mL씩 첨가하여 다시 48시간 배양시켰다. 그 후 상등액을 aspirator로 조심스럽게 제거하고 차가운 10% TCA (4℃) 용액을 50 µL씩 첨가하여 세포들을 well 바닥에 고정시켰다. 한 시간 동안 4℃에서 배양시킨 후, TCA와 배지들을 제거하기 위하여 증류수로 다섯번 행구었다. Plate를 건조시키고 여기에 1% acetic acid에 녹인 0.4% SRB를 첨가해서 30분 동안 염색시킨 후 결합하지 않은 SRB염색액을 제거하기 위해 1% acetic acid 용액으로 네 번 세척하였다. 건조기에서 건조된 plate는 10 mM Tris buffer 100 µL로 염색제를 충분히 녹인 후 540 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하였다.

MTT[3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) assay는 세포의 생육 및 분화를 측정하는 방법(12)으로서, 이 실험은 살아 있는 세포의 미토콘드리아 내의 dehydrogenase가 황색 수용성 물질인 MTT에 의해 dark blue formazan을 생성해내는 점을 기초로 한다. 인간 위암세포(KATO III)세포와 10% fetal bovine serum을 함유한 RPMI 1640배지를  $5 \times 10^4$  cell/mL 농도로 각각의 well에 100 µL씩 첨가하여 24시간 동안 배양(37℃, 5% CO<sub>2</sub>)시킨 후 각각의 시료를 0.125, 0.250, 0.375, 0.5 mg/mL의 농도로 100 µL씩 첨가하여 48시간동안 다시 배양하였다. 여기에 MTT(5µg/µL)용액을 20 µL씩 첨가하여 4시간 동안 배양시켜 formazan을 형성시킨 후 조심스럽게 aspirator로 상등액을 제거시켰다. 그리고 DMSO(dimethyl sulfoxide) 150 µL를 첨가하여 formazan을 녹인 후 540 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를

측정하였다.

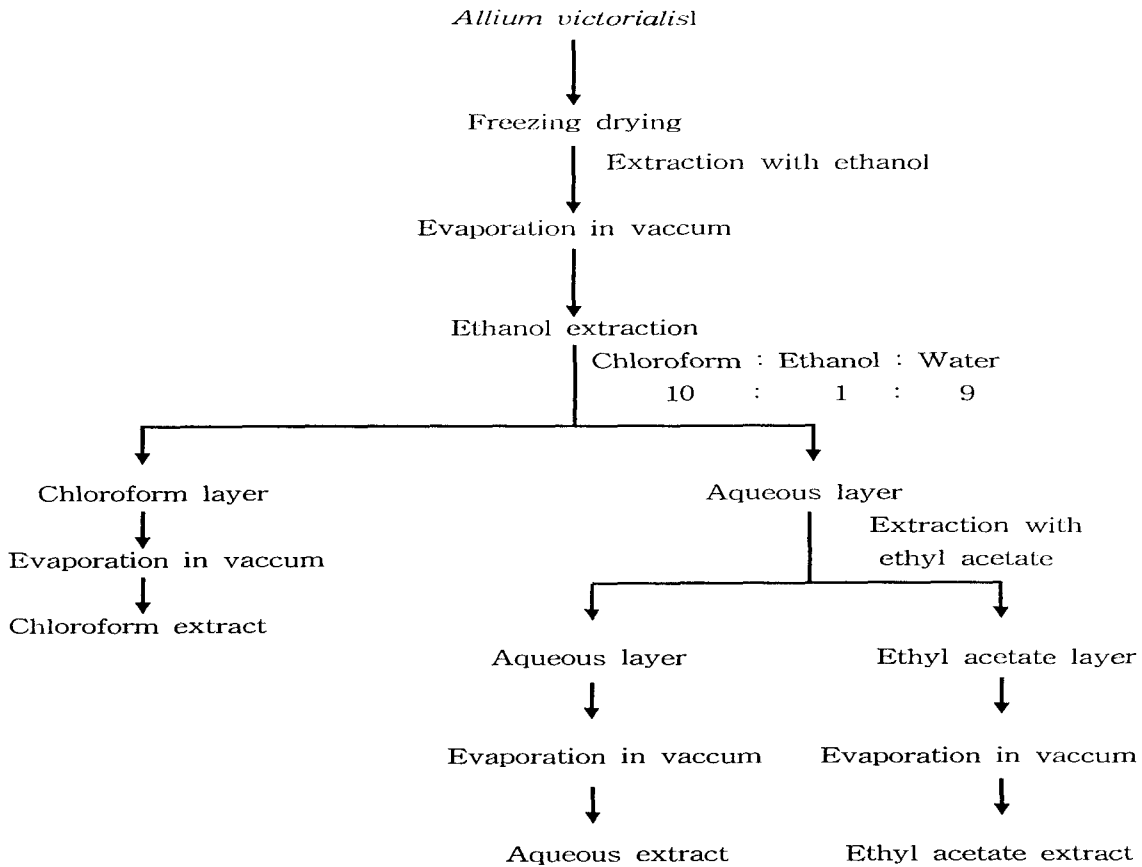


Fig. 1. Scheme of extraction and fractionation of *Allium victorialis*.

### 결과 및 고찰

#### Ames test를 이용한 돌연변이원성 및 항돌연변이원성

*S. typhimurium* TA98과 TA100을 이용한 Ames test를 행한 결과 음성대조군의 복귀 돌연변이 집락수는 TA98이 15±3 그리고 TA100은 145±4 이었다. 산마늘 에탄올 추출물을 50, 100, 150, 200 µg/plate의 여러 농도를 첨가하여 실험한 결과, 집락수가 음성대조군에 비하여 농도 변화에 따른 집락수의 큰 변화를 나타내지 않으므로 산마늘 추출물은 돌연변이원성을 나타내지 않은 것으로 판단되었다(Table 1).

산마늘 에탄올 추출물의 돌연변이원성 억제작용을 검토하기 위하여 Ames test에서 양성반응을 나타내며, 물질 그 자체로서 돌연변이를 유발하는 직접 변이원물질로 MNNG 그리고 4NQO를 사용하여 각각의 농도에 따른 돌연변이원성 억제 효과를 검토하였다. 실험한 결과(Fig. 2) 산마늘 에탄올 추출물에서 *S. typhimurium* TA100균주에 대하여 직접변이원인 MNNG(0.4 µg/plate)의 변이원 물질에 대하여 농도 의존적

Table 1. Mutagenicity of *Allium victorialis* 75% ethanol extract in *S. typhimurium* TA98 and TA100

Dose (µg/plate)	His <sup>+</sup> revertants/plate <sup>1)</sup>	
	TA98	TA100
Spontaneous	15±3	145±4
50	14±2	161±3
100	16±2	153±4
150	13±4	145±6
200	15±3	139±7

<sup>1)</sup> Each value represents the mean±S.D. of three plates.

으로 억제율이 증가하였으며, 200 µg/plate의 농도를 첨가하였을 때 에탄올 추출물에서 88.2%의 비교적 높은 돌연변이원성 효과를 나타내었다. 또한, 변이원물질인 4NQO의 경우, *S. typhimurium* TA 98과 TA 100균주에서 산마늘 에탄올 추출물이 최고농도인 200 µg/plate에서 각각 76.4%와 83.0%의 항돌연변이원성을 나타내었다.

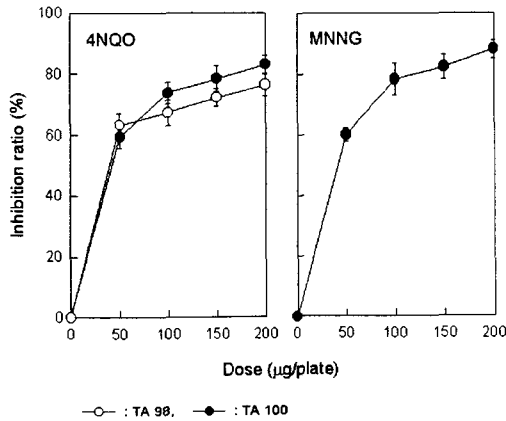


Fig. 2. Antimutagenic effects of *Allium uictorialis* ethanol extracts against 4NQO(0.5 µg/plate) and MNNG(0.4 µg/plate) in *S. typhimurium* TA 98 and TA 100.

본 연구결과에 의하면 산마늘 에탄올 추출물의 항돌연변이 억제효과는 변이원의 종류에 따라 다른 효과를 나타내었으며 이는 수리취 추출물의 항돌연변이 억제효과는 변이원의 종류에 따라 다양하게 나타내었다는 보고(13)와 일치하였다. 또한 시료농도의 증가에 따라 억제율도 증가하여 추출물의 첨가량과 억제율 간에 확실한 용량-반응관계를 나타내었다. 이와 같은 현상은 두릅, 들미나리, 쑥의 경우에도 비슷한 결과를 나타내었으며, 이들 산채류는 용량-반응관계가 전형적인 포화관계를 나타내었다(14,15).

산마늘 추출물의 인간 암세포 성장억제효과

암 유발 초기단계에서 돌연변이가 매우 중요한 작용을 하고 대부분의 발암물질이 돌연변이원이라는 공통점은 항돌연변이원성을 나타내는 물질이 항암활성을 가질 수 있다는 것을 의미한다. 따라서 본 실험에서는 각종 암세포에 대한 세포독성을 규명하기 위해 암세포로 A549, MCF-7, KATO III를 이용하여 산마늘 에탄올 추출물과 분획물에 대하여 SRB assay 및 MTT assay를 행하였다.

Fig. 3은 산마늘 에탄올 추출물과 각 분획물이 인간의 폐암세포인 A549에 대한 저해효과를 나타낸 결과이다. A549에 대하여 농도의 증가에 따라 농도 의존적으로 암세포 성장 저해효과도 증가하였으며, 시료농도 0.5 mg/mL에서 A549에서 에탄올 추출물, 클로로포름 분획물, 에틸아세테이트 분획물 및 물 분획물에서 각각 74.2%, 64.7%, 50.6% 그리고 35.7%의 억제효과를 나타내었다. Ham 등(16)은 폐암세포 A549에서 더위지기 에탄올 추출물 50 µg/plate에서 89.4%의 높은 암세포 성장 억제효과를 나타내었고, 생즙의 경우도 80.2%의 비교적 높은 암세포 성장 억제 효과를 나타내었으나 물 추출물의 경우는 35%의 낮은 사멸효과를 나타내었다고 보고한바 있다. 이는 본 실험결과와 비슷한 결과를 나타

내었는데 다소 차이를 나타내는 것은 시료의 차이 및 시료 농도에 기인한 것으로 사료된다.

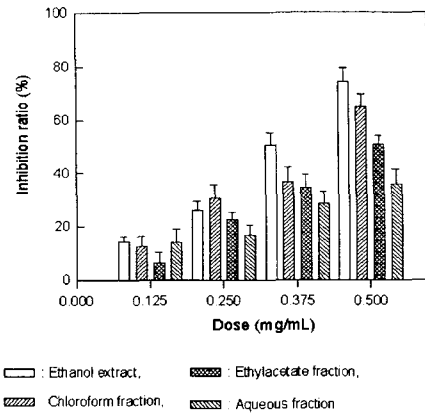


Fig. 3. Growth inhibitory effects of each fraction from the ethanol extract of *Allium uictorialis* on human lung carcinoma(A549).

산마늘의 에탄올 추출물과 분획물에 대하여 인간의 유방암세포인 MCF-7에 대한 암세포 성장 억제효과를 나타낸 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 실험결과 에탄올 추출물이 시료농도 50 µg/plate에서 71.3%로 다른 시료보다 높은 암세포 성장 억제 효과를 나타내었다.

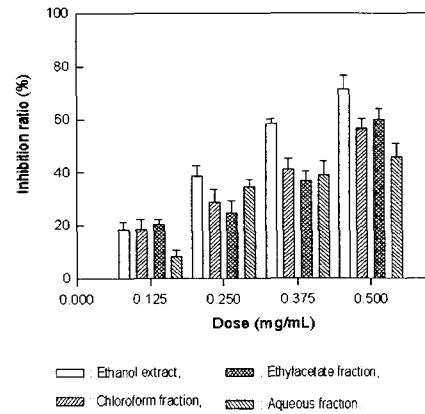


Fig. 4. Growth inhibitory effects of each fraction from the ethanol extract of *Allium uictorialis* on human breast adenocarcinoma(MCF-7).

인간의 위암세포인 KATOIII의 경우도(Fig. 5) 각 시료 모두에서 시료의 농도의 증가에 따라 암세포 성장억제 효과도 농도 의존적으로 증가하였으며, 에탄올 추출물, 각 분획물들인 클로로포름, 에틸아세테이트 그리고 물 분획물에서는 시료농도 50 µg/plate에서 각각 67.4%, 58.7%, 60.4% 그리고 50.9%의 암세포 성장 억제 효과를 나타내었다.

Im(17)의 연구에서는 마늘에서 활성물질로 분리된 linolate는 Ames 실험계, SOS 실험계 및 Rec 실험계 모두에서 항돌연변이원성이 확인되었으며, 인체 대장암, 위암, 골육암세포

의 성장을 억제하는 활성을 나타내었다. 이는 본 실험에서 나타낸 각종 암세포에 대한 억제 활성을 나타낸다는 결과와 비슷한 결과를 나타낸 것은 산마늘과 마늘이 성분과 기능이 많은 유사성을 갖고 있음을 시사한다.

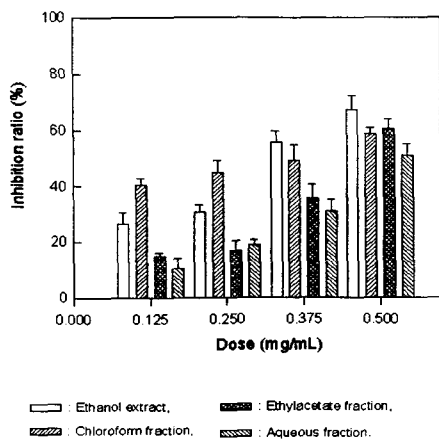


Fig. 5. Growth inhibitory effects of each fraction from the ethanol extract of *Allium victorialis* on human gastric carcinoma(KATOIII).

특히, 본 연구에서는 산마늘의 에탄올 추출물이 다른 분획물보다 더 높은 암세포 성장 억제효과를 나타내었는데 이는 마늘을 항암제와 함께 병용하였을 때 항암제의 단독치치보다 암세포에 대한 세포독성 효과가 증가 되며, 마늘의 어느 한가지 성분뿐만 아니라 여러 성분들이 복합적으로 상호작용을 함으로써 상승효과를 나타낸다는 보고(18)와 일치하는 결과를 얻었다.

본 실험결과를 지금까지의 산마늘에 대한 연구와 마찬가지로 실험실상의 결과이므로 이러한 실험을 바탕으로 앞으로 산마늘의 생리활성에 대한 보다 구체적인 연구와 기능성 식품으로서 산마늘을 산업화하기 위한 계속적인 생리학적 효능 검증이 필요할 것으로 사료된다.

### 요 약

산마늘 에탄올 추출물과 각종 유기용매 분획물에 대하여 항돌연변이원성과 세포독성을 검토하였다. 시료자체는 돌연변이원성이 없는 것으로 나타났다. 직접 변이원인 MNNG에 대한 항돌연변이 효과에서 *S. typhimurium* TA100 균주에 대해 산마늘 에탄올 추출물(200 µg/plate)에서 88.2%의 억제효과를 나타내었다. 동일 시료 농도에서 4NQO에 대해서는 *S. typhimurium* TA98과 TA100 두 균주 모두에서 각각 76.4%와 83.0%의 비교적 높은 억제효과를 나타내었다. 암세포 성장 억제 효과를 검토한 실험에서는 에탄올 추출물이 다른 분획물보다 높은 억제활성을 나타내었다. 시료농도의 증가와 함

께 억제활성도 증가하는 경향을 나타내었으며 시료농도 50 µg/plate에서 A549가 74.2%, MCF-7이 71.3% 그리고 KATO III에 대하여 67.4%의 암세포 성장억제효과를 나타내었다.

### 감사의 글

이 논문은 2003년도 강원대학교 연구년교수 연구비에 의하여 연구되었으며 이에 감사를 드립니다.

### 참고문헌

1. 이창복 (1982) 대한식물도감. 향문사, p.203
2. 문관심 (1988) 약초의 성분과 이용. 평양, 과학백과사전출판사, p.671
3. Nishimura, H.K., Fujiwara, J., Mizutani, J. and Obata, Y. (1971) Volatile flavor components of caucas. J. Agr. Food. Chem., 19, 992-994
4. Lim, S.C., Park, H.J., Yun, S.Y., Lee M.S., Kim, W.B. and Jung, W.T. (1996) Structures of flavonoids and furostanol glycosides isolated from the bulbs of *Allium victorialis* L. J. Kor. Soc. Hort. Sci., 37, 675-679
5. Park, H.J., Kim, W.B. Yoo, K.O. and Jung, W.T. (1998) Chemical analysis on biological active substances among habitats of *Allium victorialis* for a high income crop. Kor. J. Plant. Res., 11, 51-60
6. Choi, S.T., Lee, J.T. and Park, W.C. (1993) Growth environment and nutritional evaluation of native *Allium victorialis* var. *Platyphyllum* in Ulung island. J. Kor. Agric. Chem. Soc., 36, 502-509
7. Lee, S.S., Moon, S.H., Lee, H.J., Choi, D.H. and Cho, M.H. (2004) Cholesterol inhibitor activities of kaempferol and quercetin isolated form *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. Mokchae Konghak., 32, 17-27
8. Kim, T.G., Kim, S.H., Kang, S.Y., Jung, K.K., Choi, D.H., Park, Y.B., Ryu, J.H. and Han, H.M. (2000) Antiatherogenic effect of the extract of *Allium victorialis* on the experimental atherosclerosis in the rabbit and transgenic mouse. Kor. J. Pharmacol., 31, 149-156
9. Choi, J.W., Lee, K.T., Kim, W.B., Park, K.G., Jung, H.J. and Park, H.J. (2003) Pharmacological effects of the *Allium victorialis* var. *Platyphyllum* extract on the rats induced by streptozotocin, poloxamer-407, CCl4 and D-Galactosaminen. Kor. J. Pharmacol., 34, 149-156
10. Yahagi, T., Nagao, M., Seino, Y., Matsushima, T., Sugimura,

- T. and Okada, M. (1997) Mutagenicities of N-nitrosoamines on Salmonella. *Mutation Res.*, 48, 121-130
11. Scudiero, D.A., Shoemaker, R.H., Paul, K.D., Monks, A., Tiemey, S., Nofziger, T.H., Currens, M.J., Seniff, D. and Boyd, M.R. (1988) Evaluation of a soluble tetrazolium /formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.*, 48, 4827-4836
  12. Martin, A. and Martin, C. (1997) Comparision of 5 microplate colorimetric assay for in vitro cytotoxicity testing and cell proliferation assays. *Cytotechnology*, 11, 49-54
  13. Ham, S.S., Han, H.S., Choi, K.P. and Oh, D.H. (1997) Inhibitory effects of synurus deltoides extracts on the mutagenesis induced by various mutagens. *J. Kor. Soc. Food Nutr.*, 26, 528-533
  14. Han, K.S., Ham, S.S., Jeong, E.H. and Lee, H.K. (1992) Antimutagenic effects of the edible mountain herb juices against Trp-P-1 and 2-AF. *Kor. J. Food Hygiene*, 7, 161-168
  15. Han, K.S., Jeong, E.H., Ham, S.S., Shim, T.H., Lee, T.S. and Lee, H.K. (1993) Antimutagenicity of small water dropwort juice on the microbial mutagenicity induced by 2-aminofluorene. *Kor. J. Food Hygiene*, 8, 225-230
  16. Ham, S.S., Chung, C.K., Lee, J.H., Choi, K.P., Jung, S.W. and Kim, E.J. (1998) Antimutagenicity and cytotoxicity of Artemisia iwayomogi kitamura extracts. *J. Kor. Soc. Food Nutr.*, 27, 157-162
  17. Im, S.Y. (1994) Antimutation and anti-tumor effect of linoleic acid. M.S. Thesis, Pusan national University
  18. 지은정, 정갑용, 강미경 (1999) 한국인이 식품으로 사용하는 생리적 농도에서의 마늘의 항암효과. *전북의대논문집*, 23, 1-10

---

(접수 2004년 4월 1일, 채택 2004년 6월 2일)