

Benzo(a)pyrene의 변이원성에 대한 인진쑥 물 추출물의 항돌연변이 효과

안 병 용 · 황 호 선 · ¹백 승 화 · ²곽 준 수 · ³최 등 성 · †한 중 현
원광대학교 한의학전문대학원, ¹충북과학대학 식품생명과학과, ²진안 약초시험장, ³우석대학교 생명공학부
(접수 : 2000. 6. 20., 게재승인 : 2000. 8. 21.)

Desmutagenic Effect of Water Extract from *Artemisia capillaris* THUNB on the Mutagenicity of Benzo(a)pyrene

Byung-Yong Ahn, Ho-Sun Hwang, Seung-Hwa Baek¹, Jun-Soo Kwak², Dong-Seong Choi³, and Jong-Hyon Han†
Professional Graduated School of Oriental Medicine, Wonkwang University

¹Department of Food Science and Biotechnology, Chungbuk Provincial University of Science & Technology

²Jhinan Experiment Station of Medicinal Plants

³Division of Bioscience and Biotechnology, Woosuk University

(Received : 2000. 6. 20., Accepted : 2000. 8. 21.)

The antimutagenic activity of the extract of *Artemisia capillaris* THUNB on the mutagenicity induced by benzo(a)pyrene [B(a)P] in the presense of S9 mixture was studied using bacterial mutagenic assay system. Samples harvested in summer and autumn were extracted using ethanol and hot water. Among these extracts, the water extract of summer sample had the strongest inhibitory effect against the mutagenicity of B(a)P. The water extract of *Artemisia capillaris* THUNB was separated again into ethanol soluble and insoluble parts. The ethanol insoluble part(EI) of water extract exhibited higher inhibition effects than the ethanol soluble part against the mutagenic activity of B(a)P. EI showed dose-dependent activity on the mutagenicity of B(a)P in SOS Chromotest and Ames test. The 50% inhibition concentrations(IC₅₀) of EI were 200 µg/assay, 600 µg/plate and 800 µg/plate in *E. coli* PQ37, *S. typhimurium* TA100 and TA98, respectively. EI showed desmutagenic effect, but had no effect on the DNA repair system for B(a)P-induced mutagenesis.

HPLC analysis showed that the formation of aflatoxin M1 by cytochrome P-450 1A1 known as playing an impotant role on B(a)P-induced mutagenicity was highly inhibited by EI. Therefore, we encluded that B(a)P-induced mutagenicity can be reduced possibly due to the interference of EI with cytochrome P-450 1A1-dependent bioactivation.

Key Words : *Artemisia capillaris* THUNB, bactrial mutagenic system, desmutagenic effect, cytochrome P-450 1A1

서 론

암 발생의 80%가 환경요인에 의해서 발생하며 그 중에서도 식품의 섭취 패턴과 흡연이 그 원인의 대부분을 차지하고 있다. 식생활 패턴의 변화와 날로 심해지는 환경오염 및 흡연인구의 증가로 인하여 암의 발생빈도는 전 세계적으로도 증가추세에 있다. Benzo(a)pyrene [B(a)P]은 유기 화합물의 불연소물이나, 담배연기(1), 오염된 대기(2), 또는 숯불구이한 육류(3), 훈제식품(4), 커피 (5)등과 같이 고온 조리시 지방 및 단백질의 탄화에 의해 생성되어지며, 체내로 들어오면 cyto-

chrome P-450 효소계에 의하여 7, 8-diol체로 산화된 후 diepoxide로 재산화되어 폐, 위암 및 피부종양을 발생시킨다(6).

항돌연변이원성 물질은 질병은 물론 유전독성물질에 의해 유도되는 돌연변이를 차단하여 암의 예방적 해석에 기여하므로(7) 그 중요성이 강조되고 있다. 따라서 간접변이원인 B(a)P의 조기 차단이나 대사 억제제의 개발을 위한 연구의 필요성은 절실히 요구된다 할 수 있다.

인진쑥은 (*Artemisia capillaris* THUNB)은 간암, 간경변, 황달 등 주로 간 질환의 치료에 사용되고 있으며, 민간에서도 간장질환의 치료에 널리 응용되고 있어 이에 관한 연구들이(8, 9) 주로 이루어져 왔으나, 위·폐암을 유발시키는 B(a)P에 관한 연구는 거의 찾아볼 수가 없다. 그러나 필자들은 bacterial mutation assay system을 이용한 본 연구에서 처음으로 인진쑥이 B(a)P의 변이원성에 대한 돌연변이원성 억제효과가 뛰어난 것을 발견하였다.

† Corresponding Author : Professional Graduated School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk 570-749, Korea

Tel : 82-63-850-6842, Fax : 82-63-852-0011

E-mail : gernie@wonms.wonkwang.ac.kr

본 연구에서는 기능성 음료의 개발을 위한 인진쑥의 기초 자료로 활용하고자 음용에 적용 가능한 에탄올과 물을 이용하여 초여름과 가을에 수확한 인진쑥 시료를 추출하여 이들에 대한 B(a)P의 항돌연변이원성을 검색하고자 하였다. 또한 활성이 인정된 분획물에 대한 세포내·외의 항돌연변이원성과 폐암 발생에 중요한 역할을 하는 cytochrome P-450 1A1(10)의 억제능을 규명하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에 사용한 인진쑥은 진안군 소재 마이산 인진쑥 가공 공장에서 초여름 (단오 무렵)과 가을 (10월 중순)에 수확한 시료를 기증받아 121°C로 1시간 스팀한 후 건조물을 파쇄하여 사용하였다. 변이원인 benzo(a)pyrene과 cytochrome P450 1A1 유도물질인 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)은 Sigma (USA)사 제품을, S9 분획은 Aroclor 1254로 유도된 제품 (ICN pharmaceutical, Inc.)을 구입하여 사용하였다. 시험균주인 *Escherichia coli* PQ37은 Quillardet 박사 (Pasteur 연구소, France)로 부터 *Salmonella typhimurium* TA98, 100은 원광대학교 약학대학에서 기증받아 사용하였다. HPLC용 column은 ultrasphere ODSC-18 reversed-phase column (Beckman)을 사용하였다.

추출 및 분획

물 추출물은 각각의 시료에 6배 (w/v)량의 증류수를 가하여 83(±5)°C에서 4시간 동안 약탕기에서 추출하였고, 에탄올 추출물은 6배 (w/v)량의 에탄올을 가하여 45°C에서 12시간 정치하여 2회 추출한 후 여과, 감압농축 및 동결건조 하여 각각의 시료로 사용하였다. 물 추출물을 100% 에탄올에 가용성 및 불용성 분획물 (침전물)로 분리한 후 감압농축 및 동결 건조하였다.

SOS Chromotest

SOS Chromotest는 Quillardet와 Hofnung의 방법(11)에 준하여 수행하였다. 즉 L 배지에 5×10^8 CFU/mL 농도로 배양된 종배양액을 2 % (v/v)가 되도록 접종하여 37°C에서 약 2시간 진탕배양 (5×10^6 CFU/mL) 하였다. 3% S9 mix에 0.1배 (v/v)량의 균을 첨가하여 0.6 mL의 균 회색액을 분취하고 여기에 10 µL의 변이원과 10 µL의 시료를 혼합한 다음, 37°C에서 210 rpm으로 2시간 배양하였다. 이 때 첨가된 B(a)의 사용량은 변이원의 용량반응을 실시하여 최적의 농도 (2.5 µg/assay)를 설정한 후 사용하였다.

시료 색소로 인한 흡수 스펙트럼 영향을 차단하기 위하여 배양액을 4°C에서 3,500 rpm으로 2분간 원심분리하여 상정액을 제거한 후 잔사에 0.6 mL의 L medium을 현탁시켰다. 이 현탁액 0.2 mL를 취하여 Quillardet와 Hofnung(11)의 방법과 동일하게 각각의 효소 활성을 측정하였다. 활성 단위는 흡광도 $\times 1,000$ /반응시간(분)으로 나타냈으며, R(Ratio)값은 β -galactosidase unit/alkaline phosphatase unit로 계산하였고 R(0)값을 1로 정하였다. 유도지수 (induction factor, IF)는 SOS 유전자의 유도정도를 나타내며, R(C)/R(0)로 계산하였고

R(C)은 변이원 및 변이원과 시료를 첨가한 시험구의 ratio 값이다. R(0)은 변이원을 첨가하지 않는 농도의 ratio 값이며, 음성 대조구의 IF 값은 1로 정하였다. 시료의 돌연변이 억제 효과는 $[(IF_0 - IF_s) / IF_0 \times 100]$ 으로 산출하였고 여기서 IF₀는 양성대조구의 IF, IF_s는 시험물질의 IF 값이다.

Ames test

Ames test는 pre-incubation(12)법을 이용하였다. 돌연변이 억제 효과는 $[(M - S_1) / (M - S_0) \times 100]$ 으로 계산하였고, 돌연변이원만 존재한 경우의 복귀 돌연변이 수는 M, 자연복귀 돌연변이 수는 S₀, 돌연변이원과 시료를 첨가하였을 경우의 복귀 돌연변이수는 S₁로 나타내었다.

세포내 항돌연변이원성 시험

Sato 등의 방법(13)을 이용하여 세포내 항돌연변이 효과를 조사하였다. 즉 멸균된 cap tube에 L 배지로 10배 (v/v) 희석된 본배양액 0.6 mL와 10 µL의 변이원을 혼합하여, 37°C에서 210 rpm으로 20분 동안 pre-incubation하여 DNA 손상을 유도한 후, 5 mL의 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.2) 용액으로 4°C에서 4,500 \times g로 20분간 원심 분리하여 세척하였다. 그런 다음 50 µg/assay의 시료와 0.6 mL의 L 배지를 첨가하여 동일한 조건에서 100분간 배양하였다. 배양종료 후 효소활성 측정과 세포내 항돌연변이원성 산출은 돌연변이원성 억제시험법과 동일하게 실시 하였다.

AFM₁ 농도 측정

P450 1A1에 의한 AFM₁ 형성능은 AFB₁ 대사 활성을 측정하는 Oh(14)의 방법과 동일하게 측정하였으며 P450 1A1의 유도를 위해 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)로 유도된 쥐의 마이크로솜을 이용하였다(15). 사용된 column은 ultrasphere ODSC-18 reversed-phase column(Beckman, 5 µm, 4.6 \times 250 mm)이었고, 용출 용매는 20 mM ammonium acetate (pH 4.0)인 용매 A와 acetonitrile : methanol : H₂O를 4.5 : 4.5 : 1.0의 비율로 혼합된 용매 B로 이루어졌으며 용매 용출 속도는 1.5 mL/min이었다. 그리고 AFB₁의 대사물질은 흡광도 360nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

시료별 돌연변이원성 억제효과

여름과 가을에 수확한 인진쑥 100 g으로부터 물 추출물은 각각 16.0 g, 18.2 g, 에탄올 추출물은 7.6 g, 9.6 g을 얻었다. 추출 수율은 일반적으로 가을에 수확한 시료에서 약간 증가하였으나 물 추출물의 경우 수확시기에 따른 큰 차이는 보이지 않았다. 이들 시료를 이용하여 B(a)P에 대한 돌연변이원성 억제효과를 SOS Chromotest로 살펴본 결과 여름에 수확한 물 추출물의 억제효과가 가장 높았다(Figure 1). 그러나 가을에 수확한 시료는 미약한 활성을 나타냈다. 이러한 결과는 물로 추출된 수증 식물로부터 B(a)P에 대한 항돌연변이원성을 검색한 결과 내열성인 수용성 분획에서 변이원성 억제 효과가 강하였으며, 클로로필은 중요한 역할을 하지 못한다는 Sato 등(16)의 연구 결과와 유의성이 있었다. 클로로필이

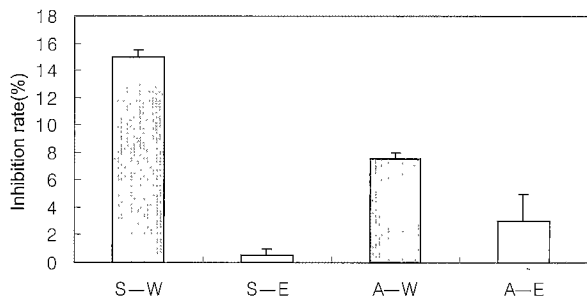


Figure 1. Inhibitory effects of extracts of *Artemisia capillaris* THUNB on the mutagenicity of benzo(a)pyrene in *E. coli* PQ37. S-W(E) : hot water(E; ethanol) extract of injinsuk harvested in spring. A-W(E) : hot water(E; ethanol) extract of injinsuk harvested in autumn. The concentration of each samples was 25 $\mu\text{g}/\text{assay}$.

다량 유출된 것으로 예상되는 진한 녹색의 에탄올 추출물(봄, 가을)의 억제효과는 매우 미약하였다. 에탄올 추출물을 dimethylsulfoxide (DMSO)에 용해하여 사용하였으며, 그 결과 대조구의 IF값이 4.44로, 물추출물의 대조구의 IF 5.30에 비하여 다소 감소하였다. 이러한 결과는 DMSO에 의해 S9 mix에 함유된 활성효소가 약간 저해된 것으로 추측되나 이러한 영향에 의하여 에탄올 추출물의 억제 효과가 크게 낮아졌을 가능성은 배제된 것으로 해석된다. 따라서 B(a)P에 대한 돌연변이원성 억제효과를 나타내는 인진쑥의 활성물질은 최종 대사산물이 아닌 여름 전후에 생성되는 중간 대사산물일 가능성이 높다. Kiso 등(17)은 간 보호효과 성분인 dimethyleculetine의 함량이 9월 중순경의 인진쑥에서 가장 높았으나 7, 8월에는 전혀 함유되지 않았다고 보고 하였는데, 봄에서부터 가을에 걸쳐 장기간의 수확기간을 갖는 인진쑥의 경우, 재배 기간에 따라 대사산물의 함량이 큰 차이를 나타내므로 수확 시기별 생리 활성 검정시험이 선행되어야 할 것으로 판단되었다.

분획물의 돌연변이원성 억제효과

여름에 수확한 시료의 물 추출물을 에탄올 가용성 분획과 불용성 분획으로 분획한 결과 물 추출물 중량에 대하여 각각 93.0% 및 7.0%의 수율을 나타내었다. B(a)P에 대한 대하여 각 분획물의 돌연변이원성 억제효과에 조사한 결과, 25 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 의 농도에서 불용성 분획은 18.5%의 억제활성을 나타낸 반면 에탄올 가용성 분획은 5.50%의 억제활성을 나타내며 불용성 분획물에서 돌연변이원성 억제효과가 강하게 나타났다 (Table 1). 수용성 분획물 중 에탄올 불용성 분획은 약한 검

정색으로 쓴맛을 전혀 느낄 수 없었으나 노란색을 나타내는 에탄올 가용성 분획은 쓴맛이 매우 강하였다. 또한 추출물 및 스틱과정에서 가을에 수확한 시료의 경우 쓴맛이 매우 강한 반면 여름에 수확한 시료에서는 쓴맛이 약하였다. 또한 쓴맛이 약한 봄의 시료와 쓴맛이 없는 불용성 분획에서 상대적으로 강한 돌연변이원성 억제효과를 나타낸 결과들은 쓴맛과 돌연변이원성 억제효과와는 상관성이 없음을 뒷받침해 주며, 인진쑥 물 추출물의 쓴맛 성분은 에탄올에 완전히 용해되는 것으로 나타났다. 지방간의 치료로 응용되는 인진쑥 추출물은 쓴맛으로 인하여 기호성에 적합하지 않은 단점을 지니고 있다. 이러한 단점을 개선할 수 있는 방안으로서 추출물을 농축한 후 에탄올을 첨가하여 불용화된 침전물을 회수하여 사용하는 방법이 필자들의 연구로부터 제시되어졌다.

Lee(9)는 간기능 시스템에서 간보호 성분을 인진 다당체로 밝혔다. 본 연구에서도 에탄올에 침전되는 다당체를 분리코저 시도하였으나 추출물의 농축액에 2~3배량의 에탄올을 첨가하여 냉장보관 후 여과하는 방법으로는 활성성분이 뚜렷하게 분리되지 않아 100% 에탄올을 사용하였다. 가을에 수확한 시료를 고온 (121 $^{\circ}\text{C}$)으로 4시간 동안 추출한 추출물을 1/3 용량으로 농축하여 냉장 보관 할 경우 레진으로 추측되는 불용물이 다량 침전됨과 동시에 에탄올에 가용되는 성분의 수율도 21.7%로 증가됨을 관찰하였다. 활성성분은 물에 잘 용해되는 성분 중에서도 에탄올에 침전되는 극성이 강한 당단백이나, 다당체 및 그 이외의 성분으로 예측되므로, 적합한 추출온도는 100 $^{\circ}\text{C}$ 이하로 사료된다. 앞으로 추출온도와, 추출 시간에 따른 연구도 선행되어야 할 것으로 생각된다.

돌연변이 억제효과가 확인된 불용성 분획의 용량반응(dose-response) 활성 관계를 SOS Chromotest로 시험한 결과는 Figure 2와 같다. 불용성 분획의 농도를 assay당 12.5, 25, 50, 100, 200 μg 으로 증가시켰을 때 각각 12.5%, 18.5%, 38%, 46%, 51.5%의 억제효과를 나타내었다. 100 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 농도가 지는 B(a)P로 유도된 돌연변이원성 억제효과가 뚜렷하게 증가되었으며, 50%의 저해농도(IC₅₀)를 나타낸 200 μg 이상의 농도에서는 억제효과가 거의 증가되지 않았다. 또한 변이원성 억제 효과와 동반하여 alkaline phosphatase 활성이 일정한 결과로부터 억제효과가 에탄올에 불용성인 성분에 의한 균수의 증가로 인한 위양성의 결과일 가능성이 배제되었고 세포 독성도 없음이 시사되었다.

SOS Chromotest는 histidine의 영향을 받지 않으므로 생약재 시료의 추출과정에서 혼재할 수 있는 histidine의 제거가

Table 1. Inhibitory effects of ethanol soluble and insoluble part isolated from water extract of *Artemisia capillaris* THUNB on the mutagenicity of benzo(a)pyrene in *E. coli* PQ37.

| Partitions | β -gal (unit) | AP (unit) | Ratio | I.F | Inhibition rate(%) |
|------------------------|---------------------|-----------|-------|-------------------------------|------------------------------|
| Negative control | 2.00 | 25.46 | 0.07 | 1.00 | |
| Positive control | 10.03 | 25.53 | 0.43 | 5.42 \pm 0.07 ¹⁾ | |
| Ethanol insoluble part | 8.50 | 24.36 | 0.35 | 4.41 | 18.5 \pm 0.5 ²⁾ |
| Ethanol soluble part | 9.80 | 24.33 | 0.40 | 5.13 | 5.50 \pm 0.5 |

¹⁾The I.F values of positive control are significantly different (p<0.01).

²⁾Values are mean \pm S.D of 3 dependent experiments.

The concentration of each samples was 25 $\mu\text{g}/\text{assay}$.

Ratio; β -gal.(units)/AP(units), I.F; induction factor.

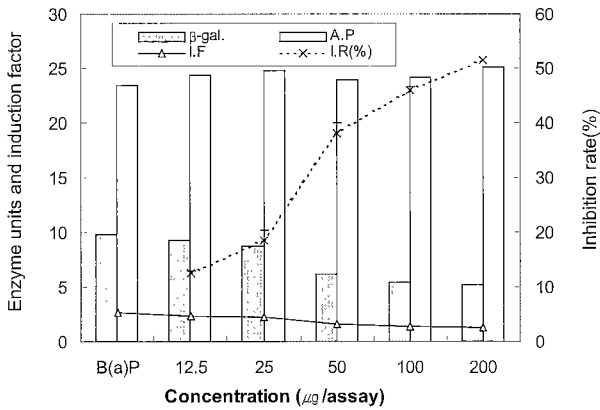


Figure 2. Inhibitory effects of ethanol insoluble part isolated from water extract of *Artemisia capillaris* THUNB on the mutagenicity of benzo(a)pyrene in *E. coli* PQ37.

Table 2. Inhibitory effects of ethanol insoluble part isolated from water extract of *Artemisia capillaris* THUNB on the mutagenicity of benzo(a)pyrene in *S. typhimurium* TA100.

| Concentration(µg/assay) | Revertants | Inhibition rate(%) |
|-------------------------|------------------------|--------------------|
| 0 | 769 ± 27 ¹⁾ | |
| 100 | 610 ± 9.0 | 23 |
| 200 | 552 ± 27.0 | 32 |
| 400 | 472 ± 6.0 | 43 |
| 600 | 430 ± 10.0 | 50 |

¹⁾Each value represents mean ± S.D. of triplicate plates. The average number of spontaneous revertants are 86 ± 1.0. The concentration of mutagen is 7.5 µg/plate.

Table 3. Inhibitory effects of ethanol insoluble part isolated from water extract of *Artemisia capillaris* THUNB on the mutagenicity of benzo(a)pyrene in *S. typhimurium* TA98.

| Concentration (µg/assay) | Revertants | Inhibition rate(%) |
|--------------------------|-------------------------|--------------------|
| 0 | 243 ± 3.0 ¹⁾ | 0 |
| 100 | 229 ± 20.0 | 6 |
| 200 | 198 ± 9.0 | 20 |
| 400 | 170 ± 4.0 | 33 |
| 800 | 150 ± 10.0 | 52 |

¹⁾Each value represents mean ± S.D. of triplicate plates. The average number of spontaneous revertants are 20 ± 1.0. The concentration of mutagen is 7.5 µg/plate

요구되지 않으나, 선택적으로 β-galactosidase를 억제하거나 ONPG을 분해, 또는 RecA 효소를 불활성화 하여 위양성 효과를 나타낼 수도 있다. 돌연변이 활성은 시험법, 변이원 및 균 농도, 균 종에 따라 억제율의 차이는 물론 활성 유, 무까지도 다르게 나타날 수 있다. 그러나 서로 다른 시험계에서 돌연변이 억제활성이 일관되게 측정되어야 결과를 인정하고 해석할 수 있다. 따라서 SOS Chromotest를 이용한 1차 검색의 결과를 *Salmonella typhimurium* (TA98, 100) reversion 시험계에서 확인하였다. 용량에 따른 억제효과가 SOS Chromotest와 동일하게 공통된 억제 효과를 나타내었으며 (Table 2, 3), 50%의 저해농도 (IC₅₀)는 *S. typhimurium* TA98, 100에서 각

각 800, 600 µg/plate로 나타났다. 단 IC₅₀의 차이는 base substitution 돌연변이를 일으키는 *S. typhimurium* TA100 균주에서 frame shift 돌연변이를 일으키는 *S. typhimurium* TA98 보다 B(a)P의 돌연변이율이 높기 때문에 보다 낮은 농도에서 상대적으로 억제율이 저하된 것으로 사료된다.

세포내 항돌연변이 효과

돌연변이 억제물질은 작용방식에 따라 세포외 항돌연변이 물질 (desmutagen)과 세포내 항돌연변이 물질 (bio-antimutagen)로 구분되는데, 세포내 항돌연변이원성은 변이원의 억제작용기구를 규명할 목적으로 이용된다(18). 간접변이원의 경우, cytochrome P450에 의한 대사활성화로 산화되어져 변이원으로 작용하므로 세포외 항돌연변이원성의 작용기구가 매우 다양하다. 즉 대사활성 효소를 저해하여 변이원을 억제하거나 대사활성화된 최종 돌연변이원 (ultimate mutagen)에 직접 작용해서 불활성화시키는 인자도 세포외 항돌연변이 물질에 포함된다. 그러므로 간접변이원에 대한 항돌연변이원성은 세포내 및 세포외에서 변이원의 작용을 불활성화 시키는 작용 이외에도 변이원에 대한 cytochrome P450의 산화를 억제하는 영향을 고려해야 한다.

에탄올 불용성 분획물의 용량 반응결과 50 µg/assay 농도에서 SOS Chromotest로 변이원성 억제시험을 수행하였다. 세포외 및 세포내 항돌연변이 효과가 각각 37.0%, 2.0%로 나타난 결과에서 인진숙의 항돌연변이 효과는 desmutagenic effect임을 알 수 있었다. 변이원과 S9 mix를 pre-incubation (20 min) 후 원심 세척하여 인진 시료를 첨가하는 세포내 항돌연변이 시험에서 억제활성을 나타내지 못한 결과는 세포 분열의 과정에서 돌연변이가 고정화되는 것을 억제하거나, 이미 DNA에 손상이 일어난 경우에 세포외 DNA 수복 및 복제과정에서 변이원의 발생 빈도를 억제하지 못함을 시사한다. 따라서 B(a)P-dependent cytochrome P-450 효소를 억제하는 cofactor로 작용하였을 것으로 예상되어 B(a)P의 대사물을 측정하려고 하였으나, B(a)P로부터 대사되는 산화물을 정확히 분리할 수 있는 분석 방법을 구축하지 못해 간접적으로 AFM₁의 형성능을 측정하였다.

AFM₁ 형성 억제 효과

Cytochrome P450 계에 의해 대사되어지는 B(a)P의 산화물들은 대부분 소수성이나 cytochrome P450 1A1 효소에 의해 대사되어진 B(a)P diol-epoxide 산화체는 가장 강한 친전자성으로 DNA 결합물을 강하게 형성시킨다(19). 또한 B(a)P은 사람 간세포의 cytochrome P450 1A1에 의해 7,8-diol, 9,10-epoxide 및 3-hydroxy-B(a)P 산화물로 대사됨으로(10) 이들의 생성을 억제하는 물질의 탐색은 B(a)P과 같이 오염된 대기나, 특히 담배연기에 많은 polycyclic aromatic hydrocarbon들에 의해 발생하는 발암성을 억제 할 것이다. Cytochrome P450 1A1에 의해 산화되어지는 AFM₁(20)의 형성능을 측정하여 간접적인 해석을 시도하였다.

Figure 3에서의 같이 AFB₁ 산화산물 중 AFM₁의 peak가 큰 결과는(A) cytochrome P450 효소중 P450 1A1 효소가 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)로 유도시킨 쥐의 간세포에서 다량 생성되었음을 보여주고 있으며, 대조군 A와

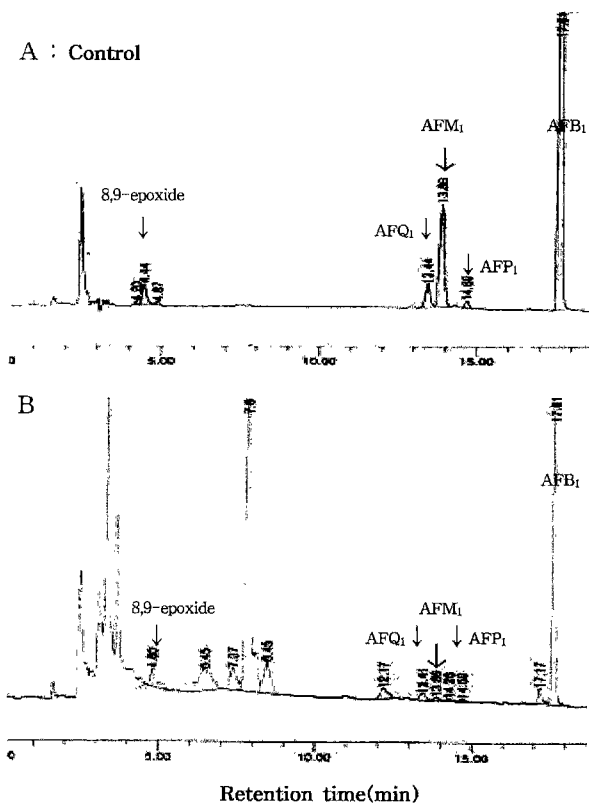


Figure 3. Oxidation products of AFB₁ formed by rat liver microsomes induced-2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. Rat liver microsomes were incubated with AFB₁ and NADP-generating in presence of ethanol insoluble part isolated from water extract of *Artemisia capillaris* THUNB. The concentration of sample was 50 µg/assay.

비교하여 에탄올 불용성 분획을 첨가하여 반응시킨 실험구 B에서는 AFM₁이 거의 생성되지 않았다. 이 결과로부터 P450 1A1 효소의 활성에 인진쑥 물 추출물이 저해작용을 나타낸 것이 시사되었고, B(a)P에 대한 인진쑥 물추출물의 desmutagenic effect는 cytochrome P450 1A1 의해 ultimate mutagenic metabolites로 활성화는 것을 차단하는 것으로 추측된다. 앞으로 인진쑥 물 추출물이 B(a)P의 산화물 중 cytochrome P450 1A1 효소에 의해 대사되어지는 산화체들을 선택적으로 억제하는지를 해석하고, 그 후 동물실험이 이루어져야 할 것으로 생각되며, 현재 이에 관한 연구를 진행중에 있다.

요 약

여름과 가을에 수확한 인진쑥을 열수 및 에탄올로 추출하여 B(a)P의 변이원성에 대한 억제효과를 SOS Chromotest로 시험한 결과 여름에 수확한 시료의 물 추출물에서 강한 억제효과를 나타내었다. 따라서 에탄올 가용성 분획과 불용성 분획으로 분리하였으며 분획별 돌연변이 억제효과는 불용성 분획에서 더 높게 나타났다. 불용성 분획은 SOS Chromotest와 Ames test에서 정확한 용량-존속성 억제효과를 나타내었고, 50% 돌연변이 억제농도 (IC₅₀)는 *E. coli* PQ37에 대하여는 200 µg/assay, *S. typhimurium* TA98에 대하여는 800 µg/plate TA100에서는 600 µg/plate이었다. 그러나 세포내·외 항돌연

변이 효과를 비교한 결과 세포내 항돌연변이 효과는 나타나지 않았다. 따라서 인진쑥 물 추출물의 돌연변이 억제효과는 desmutagenic effect에 의한 것으로 확인되었다. HPLC를 사용하여, B(a)P의 변이원성에 주된 효소인 cytochrome P-450 1A1에 의해 대사되어지는 aflatoxin M₁ 농도를 측정 한 결과 AFM₁의 형성이 크게 감소되었다. B(a)P의 변이원성에 대한 인진쑥 물추출물의 항돌연변이 효과는 아마도 B(a)P를 ultimate mutagen으로 대사시키는 cytochrome P-450 1A1 효소계를 저해하여 나타나는 것으로 해석된다.

감 사

본 연구는 1999년도 교육부 BK21 연구비로 이루어졌으며, 연구비 지원에 감사드립니다. *E. coli* PQ 37를 제공해 준 P. Quillardet박사 (Pasteur 연구소, France)와 *S. typhimurium* TA98, 100을 제공해 준 이병훈 교수(원광대학교 약학대학), 인진쑥을 제공해 준 마이산 인진쑥 박준호 사장에게 감사를 드립니다.

REFERENCES

1. Miller, E. C. (1978), Some current perspectives on chemical carcinogenesis in human and experimental animals, *Cancer Res.*, **38**, 1479-1496.
2. Marye, A. F. and W. S. Stuart (1976), Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particulated matter by high pressure liquid chromatography coupled with fluorescence techniques, *Anal. Chem.*, **48**, 992-998.
3. Lijinsky, W. and P. Shubik (1964), Benzo(a)pyrene and other polynuclear hydrocarbons in charcoal broiled meats, *Science*, **145**, 53-55.
4. Malanoski, A. J. and E. I. Greenfield (1968), Survey of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food, *JAOC.*, **51**, 114-121.
5. Masamori, K. and W. C. Hueper (1960), Polycyclic aromatic hydrocarbons in roasted coffee, *J. Natl. Cancer Inst.*, **24**, 463-469.
6. Wattenberg, L. W. and J. C. Leong (1970), Inhibition of the carcinogenic action of benzo(a)pyrene by flavone, *Cancer Res.*, **30**, 1922-1925.
7. Kuroda, Y. and T. Inoue (1988), Antimutagenesis by factors affecting DNA repair in bacteria. *Mutation Res.*, **202**, 387-391.
8. Song, K. W. (1996), The phytochemical study of polysaccharide fraction from *Artemisia* species. *M. S. Thesis*, Sungkyunkwan University, Seoul, Korea.
9. Lee, S. B. (1996), Hepatoprotective effect of polyccharide fraction from *Artemisia iwayomogi* in rat. *Ph.D. Dissertation*, Sungkyunkwan University, Seoul, Korea.
10. Jacquet, M., Lambert, E., E. Baudoux, M. Muller, P. Kremers and J. Gielen (1996), Correlation between P450 CYP1A1 inducibility, Msp I genotype and lung cancer incidence. *European J. Cancer*, **32**, 1701-1706.
11. Quillardet, P. and M. Hofnung (1985), The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutation Res.*, **147**, 65-78.
12. Maron, D. M. and B. N Ames (1983), Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res.*, **113**,

- 173-215.
13. Sato, T., K. Chikuzawa, H. Yamamori, Y. Ose, H. Nagase and H. Kito (1991), Evaluation of SOS Chromotest for the detection of antimutagens. *Environ Mol. Mutagenesis*, **17**, 258-263.
 14. Oh, H. S. (1996), Studies on the reaction mechanism of cytochrome P450 3A4. *Ph.D. Dissertation*, Wonkwang University, Iksan, Korea.
 15. Santostefano, M. J., D. G. Ross, U. Savas, C. R. Jefcoate and L. S. Birnbaum (1997), Differential time-course and dose-response relationships of TCDD-induced CYP1B1, CYP1A1, and CYP1A2 proteins in rats. *Biochem. Biophys Res. Com.*, **233**, 20-24.
 16. Sato, T, Y., Ose, H. Nagase and H. Kito (1990), Mechanism of antimutagenicity of aquatic plant extracts against benzo(a)pyrene in salmonella assay. *Mutation Res.*, **241**, 283-290.
 17. Kiso, Y., S., Ogasawara, K. Hirota, N. Watanabe, Y. Oshima and C. Konno (1984), Antihepatotoxic principles of *Artemisa capillaris* Buds. *Planta Medica*, **Feb**, 81-85.
 18. Kuroda, Y. and T. Inoue (1998) Antimutagenesis by factors affecting DNA repair in bacteria, *Mutation Res.*, **202**, 387-391.
 19. Bauer, E., Z. Guo, Y. F. Ueng, C. Bell, D. Zeldin and F. P. Guengerich (1995) Oxidation of benzo(a)pyrene by recombinant human cytochrome P450 enzymes. *Chem. Res. Toxicol.*, **8**, 136-142.
 20. Colley, P. J. and G. E. Neul (1981), A comparison of the effects of pretreatment with phenobarbitone and 3-methylcholanthrene at the metabolism of AFB₁ by rat. *Chem. Biol. Interact.*, **35**, 145-157.