

## 葛花의 抗突然變異 活性에 관한 研究

정영재, 김미랑, 서운교, 정지천  
동국대학교 한의과대학 내과학교실

### A Study on Antimutagenic activities of from *Puerariae Flos* Extracts

Young-Jae Jeong, Mi-Rang Kim, Woon-Gyo Seo, Ji-Cheon Jeong

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Antigenotoxicity test (SOS chromotest), antimutagenicity test (Ames test), and antioxidant test (NBT method and xanthine-xanthine oxidase method) were carried out using water-soluble and methanolic extracts from *Puerariae Flos*. Against the mutagens MNNG and NQO, antigenotoxic activity of methanolic extracts were much more effective than that of water-soluble ones. When the methanolic extract was added to the certain concentration (100  $\mu$ l/tube), antigenotoxic activity against the mutagen MNNG was enhanced. Contrary to the water-soluble extract, the methanolic extract showed high antigenotoxicity against the mutagen NQO with increment of the extract. Against the mutagen MNNG with Ames test, antimutagenic activity of the methanolic extract at 300  $\mu$ l/tube was 96% as an inhibition ratio of revertant forming CFU/plate. The antioxidant activity of water-soluble extract was comparatively higher than that of the methanolic one.

**Key Words:** SOS chromotest, Ames test, NBT method and xanthine-xanthine oxidase method, *Puerariae Flos*, MNNG, NQO

### 1. 緒 論

腫瘍은 생체내 정상세포가 발암물질 등의 환경적 요인과 유전적 요인, 만성자극 및 突然變異 등에 의하여 암세포화되고 이러한 세포의 조절기능 상실로 증식함으로써 발생하는데 현재까지 알려진 발암물질의 85% 이상은 突然變異原이고 비발암성물질의 경우에도 10% 이하가 突然變異原으로 작용한다는 연구결과<sup>1</sup>가 있다. 그래서 최근 腫瘍에 대한 연구가 진행되는 것과 맞추어 抗突然變異 활성에 대한 관심과 보고도 증가하면서 이에 관한 연구가 많이 보

고되고 있다. 이 가운데 특히 천연물 중 무즙, 쑥, 메밀 등과 같은 식용 및 약용 식물<sup>2-5</sup>의 抗突然變異 활성<sup>6-8</sup>에 관한 연구가 주로 검토되었다.

정상세포의 손상에 의한 종양의 발생과 상관관계를 가지는 또 다른 인자로 생체에 치명적인 산소독성을 일으키는 활성산소(active oxygen)가 있는데 에너지 대사과정 중의 산소가 體內 酵素系, 還元代謝, 化學藥品, 公害物質, 光化學反應 등의 각종 물리적, 화학적 要因 등에 의하여 전환되어 발생한다<sup>13,14</sup>. 이러한 활성산소는 세포구성 성분들인 지질, 단백질, 당, DNA 등을 파괴하기 때문에 세포의 손상과 過酸化脂質의 생성을 유도하여 인체의 면역기능과 관련된 자가면역질환, 炎症 및 腫瘍 등의 발생과 관련이 있다<sup>15-17</sup>. 따라서 보다 효과적인 종양의 치료를 위하여 抗突然變異 및 抗酸化 작용을 가진

· 접수: 2004년 3월 2일 · 채택: 2004년 3월 10일  
· 교신저자: 서운교, 서울시 강남구 논현동 37-21 동국대  
강남한방병원  
(Tel. 031-710-3751, 3770 Fax. 031-710-3780  
E-Mail: high418@hanmail.net)

한약재에 대한 연구가 필요하다고 여겨진다.

腫瘍과 관련된 韓方 病證으로는 積聚, 癭瘤, 癥瘕, 痰癖, 反胃, 石瘕, 石癰, 乳癌 등<sup>18-27</sup>이 있고 治法으로는 益氣健脾, 滋陰補血, 養陰生津, 溫補脾腎 등의 扶正法과 活血化瘀, 清利濕熱, 化痰散結, 通絡止痛 등의 祛邪法, 그리고 두 가지 방법을 동시에 이용한 扶正祛邪法이 사용되고 있다<sup>28,29</sup>.

葛花는 콩과에 속한 多年生 藤木인 칩 *Pueraria thunbergiana* BENTH의 꽃을 건조한 것으로 性味가 甘平하고 解酒毒, 醒胃止渴하는 작용으로 酒色過度로 인한 胃氣損傷과 腸風下血 등<sup>30-32</sup>에 주로 이용되지만 清熱解毒 등의 효능이 있어 抗腫瘍 및 抗突然變異 효과 등이 있을 것으로 사료된다. 실험연구에 의하면 혈중 ethanol 농도를 감소시키는 등 알코올 대사에 관련된 작용이<sup>33,34</sup> 대부분이며, 이<sup>35</sup> 등이 葛花에서 분리한 isoflavone의 抗酸化 및 세포보호 효과에 대하여 보고하였으나 抗突然變異 효과에 대한 연구는 보이지 않았다.

이에 저자는 葛花의 열수 추출물과 메탄을 추출물을 제조하여 抗突然變異 및 抗酸化 활성을 실험하여 유의성이 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實驗 材料 및 方法

### 1. 材料

#### 1) 藥材

葛花(*Puerariae Flos*)는 동국대학교 부속 한방병원에서 건조된 약재를 入手하여 사용하였다.

#### 2) 細菌 및 試藥

##### (1) 公試 菌株

抗突然變異 實驗의 SOS chromotest를 위하여 사용한 *Escherichia coli* PQ37(*sfiA::Mud(Ap lac)cts lacΔU169 mal<sup>+</sup>, uvrA, galE galY, PhoC, rfa*) 菌株는 동국대학교 자연과학대학 생물학과 미생물실험실로부터 入手하여 사용하였다. Antimutagenicity 실험을 위하여 사용한 *Salmonella typhimurium* TA1538(*hisG46 rfa-uvrB*) 菌株는 한국과학기술원

구원 생명공학연구소 유전자은행으로부터 分讓받아 사용하였다.

#### (2) 試藥

突然變異原으로 사용된 4-nitroquinoline N-oxide (NQO)와 *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG)는 Fluka社에서 購入하였으며 蒸溜水에 녹여 사용하였다.  $\beta$ -galactosidase, alkaline phosphatase, EDTA, cyanide, ascorbic acid, o-nitrophenyl- $\beta$ -galactoside, p-nitrophenyl phosphate, sodium dodecyl sulfate (SDS),  $\beta$ -mercaptoethanol, xanthine, xanthine oxidase, nitrobenzene tetrazolium (NBT)과 緩衝溶液에 必要한 試藥은 Sigma社에서, 培地 製造에 必要한 試藥은 Difco社에서 購入하여 使用하였다.

#### 3) 機器 및 裝置

葛花의 열수 및 메탄을 추출물의 製造를 위하여 Eyla社의 rotary evaporator(NE-1S) 減壓濃縮機를 利用하여 濃縮하였고, Ilsin社의 Bondiro(FD 5505)를 利用하여 凍結乾燥하였다. 培地의 製造, 滅菌, 培養, 葛花의 抽出을 위하여 使用한 器機는 國產製作器機를 使用하였다.

細菌의 生長, 抗突然變異 및 抗酸化 效能의 測定시 濁度 및 吸光度의 測定을 위하여 日本 Shimadzu社의 分光光度計(UV-160A spectrophotometer)를 使用하였다.

### 2. 方法

#### 1) 葛花의 열수 및 메탄을 추출물의 製造

一般試驗法에 따라 葛花의 乾燥重量 100 g에 蒸溜水 300~900 ml를 添加하여 121℃ 重湯器에서 3시간 동안 重湯, 水溶性 抽出物을 製造하였다. 重湯液을 濾過한 후, 減壓濃縮機에서 濾液이 50 ml이 되도록 濃縮하였다. -20℃에서 24시간 凍結한 후, 減壓乾燥(-50℃, 9 mmTorr)하여 乾燥粉末을 얻어 試料로 使用하였다.

메탄을 抽出物의 製造는 메탄올을 溶媒로 condenser가 附着된 soxhlet을 使用하여 抽出한 條件 이외에는 水溶性 抽出物의 製造 方法과 같았다 (Scheme 1).

2) 葛花 추출물의 antigenotoxicity 活性 測定  
 사용한 SOS chromotest는 Quillardet 등의 방법<sup>36</sup>  
 을 변형하여 수행하였다(Scheme 2).

(1) 公試 菌株의 培養

前 培養된 1.0 ml의 *E. coli* PQ37을 100 ml의 LB medium(조성; bacto yeast extract 0.5%, bacto tryptone 1.0%, NaCl 1.0%)에 接種하여 37°C에서 4 시간 동안 660 nm에서의 濁도가 0.8~0.9에 이르도록 진탕배양하였다.

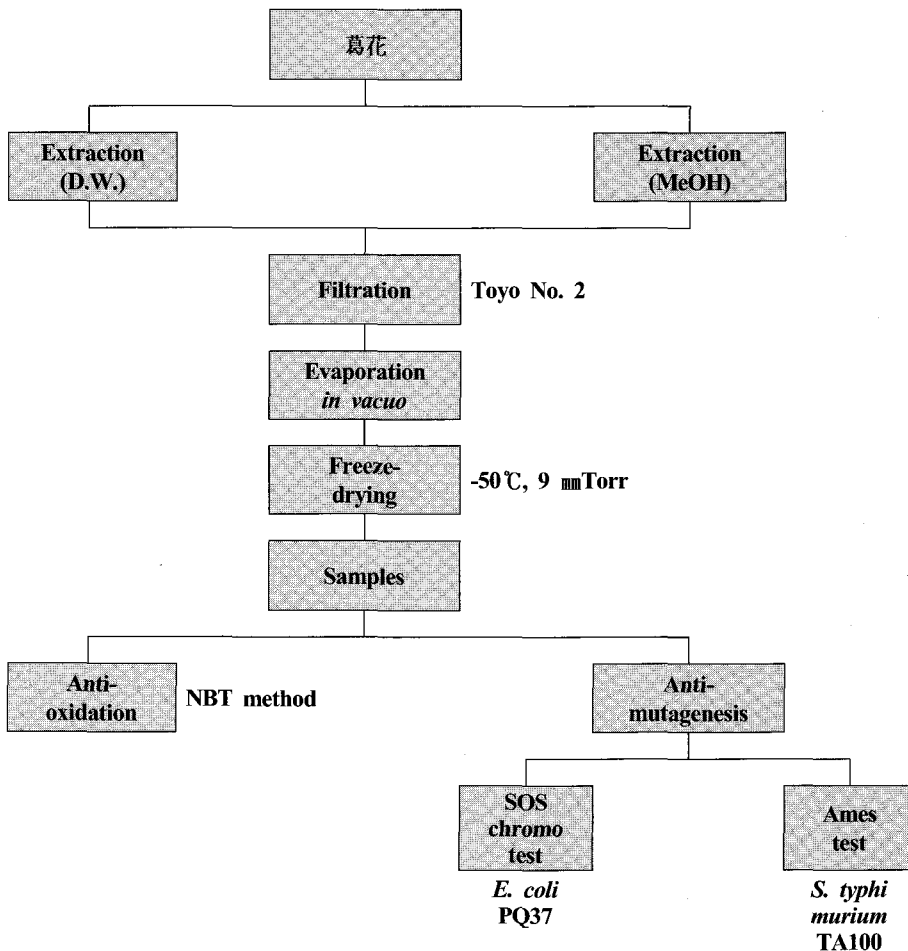
(2) Antigenotoxicity 活性的의 測定

試驗管에 培養된 *E. coli* PQ37 배양액 600  $\mu$ l, 各

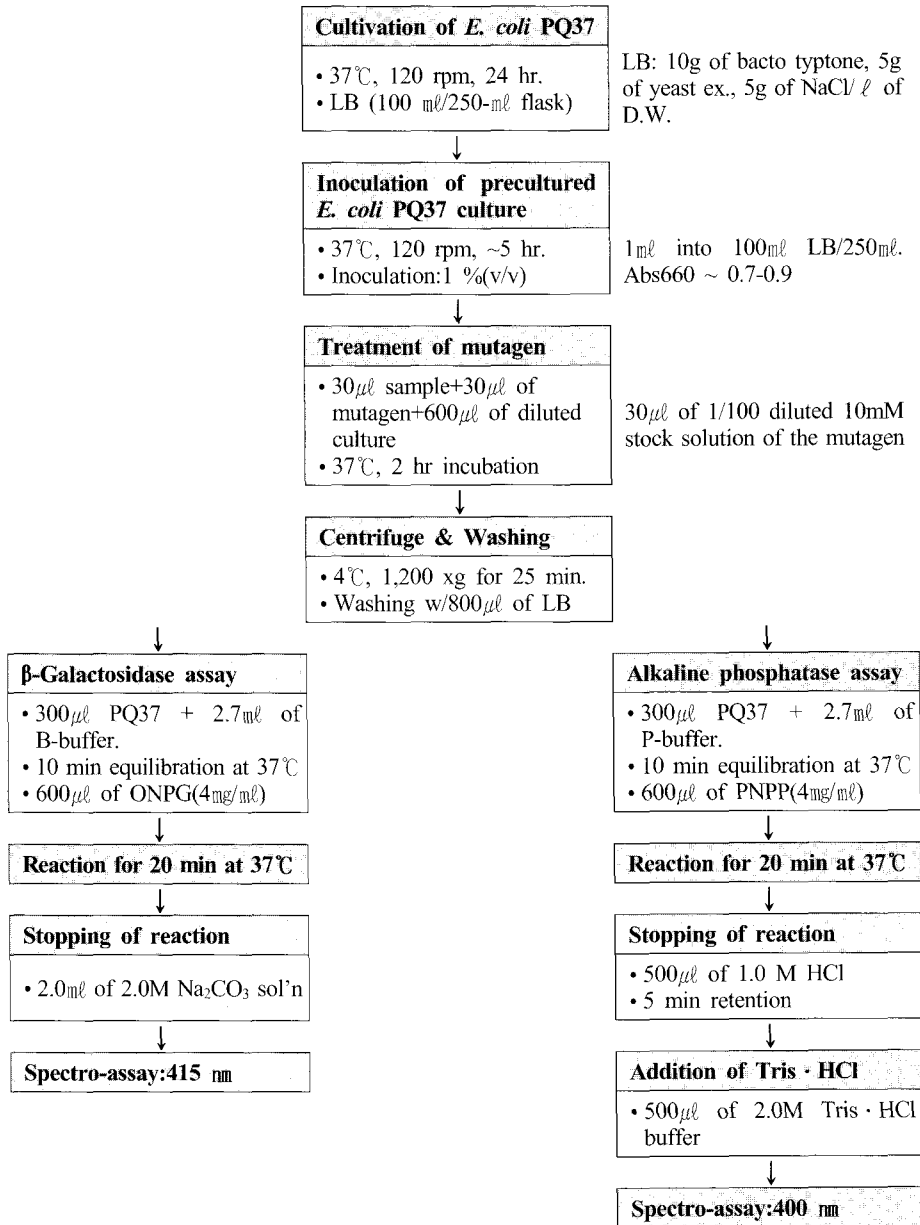
突然變異原(1.0 mM) 30  $\mu$ l, 열수 및 메탄올 추출물 (10 mg/ml)을 0, 50, 100, 300, 500  $\mu$ l를 添加한 후 SOS 反應을 誘導하였다. 37°C에서 2시간 동안 定置한 후, 시료에 의한 색도 영향을 배제하기 위해 원심분리 후, 상등액을 제거하고, 배지를 이용해 세척하여  $\beta$ -galactosidase와 alkaline phosphatase 酵素 活性를 測定하였다.

$\beta$ -galactosidase 酵素 活性은 2.7 ml의 B 완충액 (조성; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 16.1 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5.5 g, KCl 0.75 g, MgSO<sub>4</sub> 0.25 g, SDS 1.0 g,  $\beta$ -mercaptoethanol 2.7 ml, 증류수 1,000 ml, pH 7.0)을 넣어 37°C에서

Scheme 1. Experimental scheme for the preparation of sample and for the tests of antioxidation and antimutagenicity of *Puerariae Flos*.



Scheme 2. SOS chromotest for antigenotoxicity of *E. coli* PQ37.



10분간 정치하여 온도를 均一化시킨 다음, 0.6 ml의 o-nitrophenyl-β-galactoside 용액(ONPG 4.0 mg/ml in phosphate buffer (pH 7.4))을添加하여 20분간 發色反應을 維持하였다. 2.0 ml의 2.0 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액을

添加하여 反應을 停止시킨 후, 415 nm에서의 吸光度를 測定하였다.

Alkaline phosphatase 酵素 活性은 B 緩衝液 대신 에 P 緩衝液(組成: Tris · base 121 g, SDS 1.0 g, 증

류수 1,000 ml, pH 8.8)을 ONPG 溶液 대신에 p-nitrophenyl phosphate 溶液(PNPP 4.0 mg/ml)을 사용한 것 이 외에는  $\beta$ -galactosidase 효소 활성의 측정과 同一한 방법으로 수행하였다. 酵素反應의 停止를 위하여 1.0 ml의 2.5 M HCl를 添加한 다음 10분 동안 定置하고, 1.0 ml의 2.0 M Tris-HCl buffer를 添加하였다.

각 酵素의 活性(unit)은 反應이 終了된 후 측정 한 415 nm에서의 吸光度에 1000을 곱한 후 反應時間(20 초)으로 나눈 값을 1 unit로 定議하였다 (Table 1).

Ratio(R)값은  $\beta$ -galactosidase unit를 'alkaline phosphatase unit'로 나눈 값으로 定議하였으며, SOS 反應의 誘導 程度를 나타내는 誘導指數(induction factor; IF)는 추출물 시료를 添加한 시험구의 각 濃度別 R 값(Rc)을 추출물 試料가 添加되지 않은 R 값(Ro)으로 나눈 값으로 定議하였다(Table 1).

### 3) 葛花 추출물의 Ames test에 의한 抗突然變異 活性의 測定

Maron과 Ames의 方法<sup>37</sup>을 變形하여 使用하였다.

#### (1) 公試 菌株의 培養

24시간 前 배양된 *S. typhimurium* TA1538 1.0 ml을 100 ml의 LB medium에 接種하였다. 37°C에서 4시간 진탕배양한 후, 1/10로 稀釋하여 使用하였다.

#### (2) 抗突然變異(antimutagenicity) 活性의 測定 (Table 1)

멸균된 cap tube에 稀釋된 100  $\mu$ l의 菌株液, 520  $\mu$ l의 0.2 M phosphate buffer(pH 7.4), 각각 0, 100, 300  $\mu$ l의 水溶性 및 메탄올 葛花 추출물(10 mg/ml), 50  $\mu$ l의 突然變異原 溶液(1.0 mg/ml)을 混合한 다음, vortex하여 37°C에서 30분간 定置하였다. 이 혼합액에 200  $\mu$ l의 HB 용액을 添加한 후 3초간 vortex하였다. 이 混合한 溶液에 45°C의 2.0 ml soft agar를 添加하였다. 上記의 方法으로 製造된 最終 混合液을 미리 제조된 20 ml의 AMA에 골고루 塗抹하였다. 塗抹된 한천배지를 37°C에서 48시간 배양한 다음 出現하는 復歸 콜로니수(revertant CFU/plate)를 測定하였다. 葛花 추출물에 의하여 抑制된 突然變異-

誘發-抑制率(IRR, %)은 Table 2의 식에 의하여 구하였다.

### 4) 葛花 추출물의 公試 細菌에 대한 細胞毒性 (cytotoxicity) 實驗

實驗에 使用된 *E. coli* PQ37 및 *S. typhimurium* TA1538에 대한 열수 및 메탄올 추출물의 細胞毒性 (cytotoxicity)을 測定하였다. LB medium에 4시간 동안 前 培養한 *E. coli* PQ37과 *S. typhimurium* TA1538을 接種한 후, 24시간 동안 배양하여 분광 광도계의 660 nm 파장에서 탁도를 측정하여 추출물이 각 세균의 生長을 억제하는지 측정하였다. 병행하여 전배양된 각 세균을 10<sup>-4</sup>배로 稀釋하여 각 추출물의 濃度別로 添加된 LB agar plate(0~2.5 mg /tube)에 희석하였다. 細菌液 100  $\mu$ l를 塗抹하여 24시간 동안 培養하여 生育抑制 阻止環의 유무로 세균의 生長억제 여부를 判定하였다.

### 5) 葛花 추출물의 抗酸化 活性

抗酸化 活性의 測定은 Winterbourn의 NBT법<sup>38</sup>과 xanthine-xanthine oxidase법<sup>39</sup>을 變形하여 使用하였다.

#### (1) NBT법을 이용한 抗酸化 活性의 測定

1.0 ml photo-cell에 870  $\mu$ l의 40 mM Tri-HCl(pH 7.5) buffer, 66  $\mu$ l의 EDTA/cyanide, 33  $\mu$ l의 NBT를 混合하였다. 混合液에 33  $\mu$ l의 각 葛花 추출물 (1.0 mg/ml)을 넣은 다음 3회 흔들어 주었다. 혼합액에 一定한 光源(白熱燈(110V, 60W), L = 22 cm, 4,400 lux)를 照射하였다. 항산화 活性度는 光照射 후, 光酸化(photo-activation)에 起因하는 活性酸素에 의한 色度變化를 560 nm에서 1분 간격으로 6분간 測定하였다. 光酸化 活性度는 1분당 吸光度의 增加 量으로 決定하였다.

#### (2) Xanthine-xanthine oxidase법을 이용한 抗酸化 活性의 測定

1.0 ml photo-cell에 xanthine(1.0 mM) 0.2 ml, buffer(potassium phosphate buffer, 50 mM, pH 7.8) 1.0 ml 및 detector로서 0.2 ml NBT(1.0 mM), 試料를 대신해 증류수(대조구용)를 넣은 후, xanthine oxidase 20  $\mu$ l를 넣어 흔들어 섞은 다음

spectrophotometer로 530 nm에서 시간에 따른 광흡수도 변화를 기록하였다. 같은 방법으로 시료에 의한 광흡수도 변화를 기록하였다.

(3) 試料의 抗酸化 活性度(antioxidant activity, AOA)의 決定

試料의 抗酸化 活性度(unit)는 蒸溜水가 添加된 대조구(blank)의 항산화 활성도를 sample이 添加되었을 때의 항산화 활성도(sample)로 나눈 값에서 1을 뺀 값으로 決定하였다. 既存에 抗酸化 活性이 優秀한 것으로 알려진 ascorbic acid(vitamin C) 및 α

-tocopherol(vitamin E)를 사용하여, 葛花의 열수 및 메탄올 추출물의 抗酸化 活性도와 比較하였다 (Table 1).

III. 實驗 結果

1. 葛花 추출물의 抗突然變異 效果

葛花의 열수 및 메탄올 추출물의 돌연변이원 MNNG 및 NQO에 대한 抗突然變異 活性을 SOS chromotest를 利用한 antigenotoxicity 試驗과 Ames

Table 1. Calculation of enzyme activities and factors for antioxidation and antimutagenesis.

Test	Enzyme activity and calculation
Antioxidation	Unit = (blank/sample) - 1 * blank = rate of AOA with D.W. * sample = rate of AOA with sample
Anti-mutagenesis	Activity of β-galactosidase and alkaline phosphatase 1 unit = 1,000 x A420/t * A420 = absorbance at 420 nm after reaction * t = reaction time (min) Ratio(R) = unit of G/unit of AP * G = β-galactosidase activity * AP = alkaline phosphatase activity Induction factor (IF) = Rc/Ro * Rc = R at various conc. of sample * Ro = R at no sample
SOS chromotest	
Ames test	Inhibition ratio of revertant (IRR) = [1-(CFU <sub>sm</sub> -CFU <sub>sp</sub> )/(CFU <sub>mt</sub> -CFU <sub>sp</sub> )] x 100 (%) * CFU <sub>sm</sub> = revertant CFU w/sample+mutagen * CFU <sub>mt</sub> = revertant CFU w/mutagen * CFU <sub>sp</sub> = spontaneous revertant CFU

Table 2. Composition of media and solutions for antimutagenic Ames test.

Medium and solution	Composition
Trace histidine-biotin solution(HB sol'n)	d-biotin 30.9 mg, L-histidine 24.0 mg, D.W. 250 ml.
Top agar(TA)	NaCl 5 g, agar 6 g, D.W. 1,000 ml.
Minimal glucose agar plate(MGA)	* 50X VB solution 20 ml, 40% glucose 50 ml, agar 15 g, D.W. 930 ml.
* 50X Vogel-Bonner medium E (VB)	MgSO <sub>4</sub> 10 g, citric acid 100 g, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 500 g, Na(NH <sub>4</sub> )PO <sub>4</sub> 175 g, D.W. 670 ml.

의 方法을 利用한 antimutagenicity 試驗을 隨行하였다.

1) SOS chromotest를 利用한 antigenotoxicity 實驗  
SOS chromotest를 利用한 葛花의 antigenotoxicity 實驗은 突然變異原 MNNG에 대한 反應 tube 당 100  $\mu$ l의 葛花 추출물을 添加하였을 때, 抗突然變異 效能은 메탄올 추출물의 경우 induction factor(IF)가 1.09으로 열수 추출물의 1.92과 비교시 메탄올 추출물의 抗突然變異 效能이 현저히 優秀하였다(Fig. 1, 2).

葛花 추출물의 농도를 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 300  $\mu$ l, 500  $\mu$ l로 增加하여 添加하였을 경우, MNNG에 대

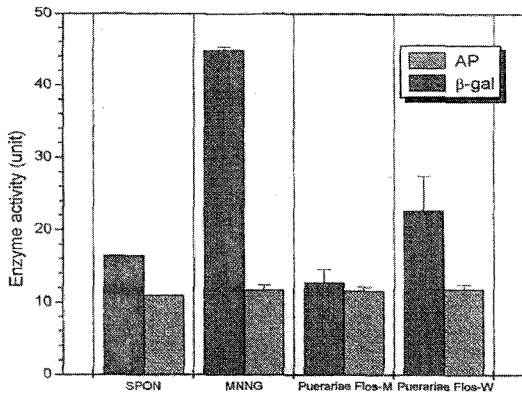


Fig. 1. Enzyme activity of  $\beta$ -galactosidase and alkaline phosphatase against the mutagen, MNNG.

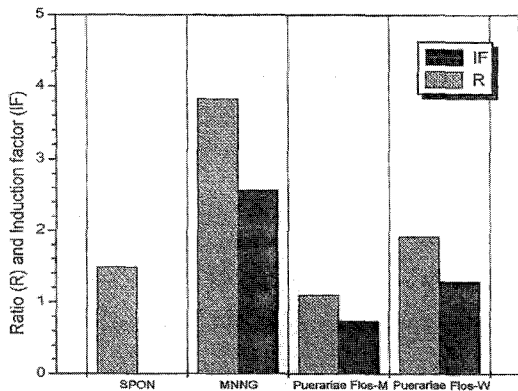


Fig. 2. Ratio of enzymes and induction factor of Puerariae Flos against the mutagen, MNNG.

한 열수 및 메탄올 추출물의 抗突然變異 活性은 100  $\mu$ l 첨가시까지 두 추출물 모두 增加하였으나, 500  $\mu$ l까지 농도를 첨가하였을 경우 열수 추출물에서 抗突然變異 活性이 증가하였다(Fig. 3, 4).

突然變異原 NQO에 대한 反應 tube 당 100  $\mu$ l의 葛花 추출물이 添加되었을 때, 抗突然變異 效能은 메탄올 추출물의 경우 induction factor(IF)가 0.85로 열수 추출물의 4.91과 비교시 메탄올 추출물의 抗突然變異 效能이 현저히 優秀하였다(Fig. 5, 6).

葛花 추출물의 농도를 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 300  $\mu$ l, 500  $\mu$ l로 增加하여 添加하였을 경우, NQO에 대한 메탄올 추출물의 抗突然變異 活性은 모두 增

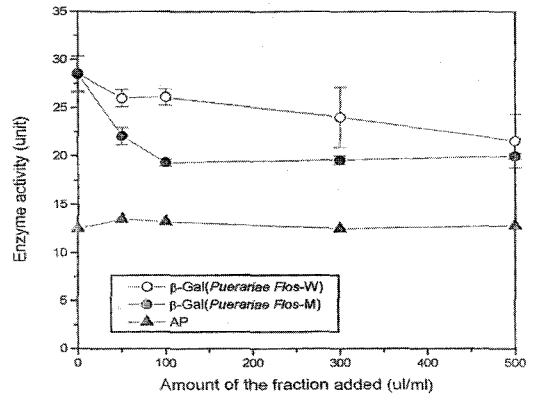


Fig. 3. Effect of concentration of Puerariae Flos extract on enzyme activities against mutagens, MNNG.

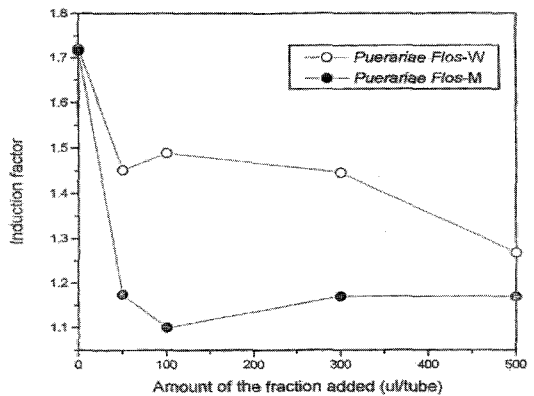


Fig. 4. Effect of concentration of Puerariae Flos extract on induction factor against mutagens, MNNG.

加하였으나, 열수 추출물의 抗突然變異 活性은 증가하지 않았다(Fig. 7, 8).

MNNG 및 NQO의 두 突然變異原에 대해 모두 메탄올 추출물에서의 抗突然變異 活性이 열수 추출물에 비교하여 현저하게 優秀하였다.

使用한 葛花 各 추출물의 *E. coli* PQ37 菌株에 대한 細胞毒性을 隨行하였다. 菌株을 葛花의 열수 및 메탄올 추출물(농도: 2.5 mg/ml)을 LB broth에 접종하여 배양 시간대별 성장 곡선을 측정하였고, 寒天平板培地 상에 균주를 塗抹한 다음, 葛花의 열수 및 메탄올 추출물을 적신 濾過紙를 平板培地 위에

位置하여 培養하는 방법으로 각 균의 생장에 미치는 영향을 시험한 결과 열수 및 메탄올 두 추출물의 세포독성은 나타나지 않았다(Fig. 9).

2) Ames test를 이용한 antimutagenicity 實驗

Ames test를 利用한 葛花의 antimutagenicity 實驗은 營養原으로 아미노산 histidine을 生成할 수 없어 最小寒天培地에서 스스로 生長할 수 없는 *S. typhimurium* TA1538 細菌 菌株을 利用하였다. 突然變異原에 의하여 生成되는 復歸變異株 colony 수를 決定하여, 葛花 各 추출물이 어느 정도 突然變異를 抑制하여 復歸 變異株의 出現을 抑制하는가의

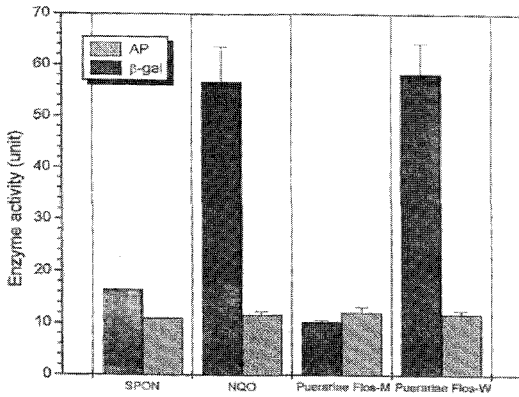


Fig. 5. Enzyme activity of β-galactosidase and alkaline phosphatase against the mutagen, NQO.

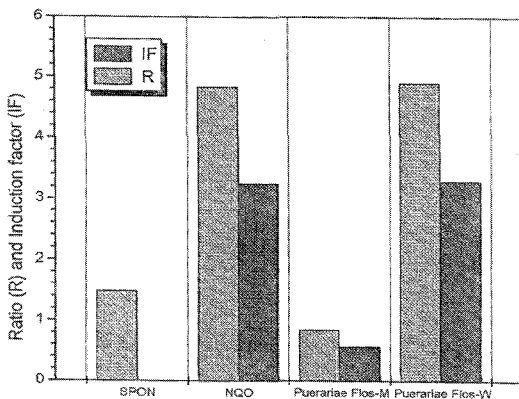


Fig. 6. Ratio of enzymes and induction factor of Puerariae Flos against the mutagen, NQO.

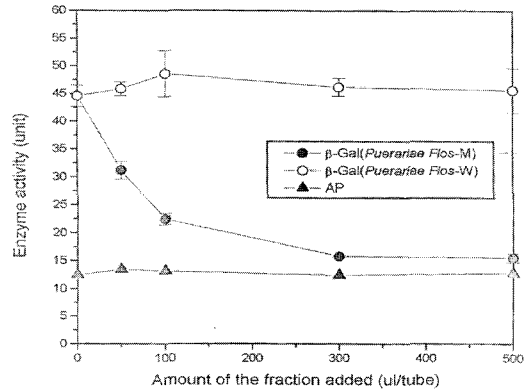


Fig. 7. Effect of concentration of Puerariae Flos extract on enzyme activities against the mutagen, NQO.

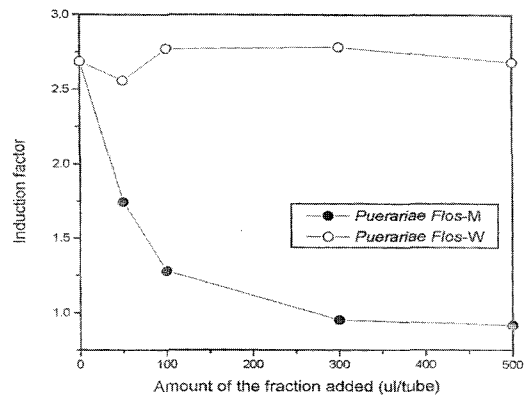


Fig. 8. Effect of concentration of Puerariae Flos extract on induction factor against the mutagen, NQO.



方法을 活用하여 隨行하였다.

葛花의 媒탄을 추출물을 使用하여 復歸變異株의 生成率을 測定한 結果, 最小寒天培地 平板 當 出現한 colony의 수는 添加한 추출물의 濃度에 比例하여 減少함을 보여주었다(Fig. 10). 各 300  $\mu$ l의 추출물이 添加되었을 때의 復歸 變異株 抑制率은 媒탄을 추출물의 경우 約 96%의 抗突然變異 活性을 보였다.

使用한 葛花 추출물의 *S. typhimurium* TA1538 菌株에 對한 細胞毒性을 隨行하였다. 葛花의 열수 및 媒탄을 추출물(농도: 25 mg/ml)이 첨가된 LB broth에 균주를 接種하여 배양 시간대별 성장 곡선

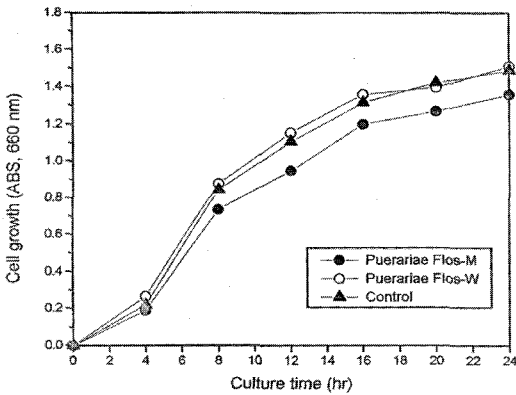


Fig. 9. Effect of *Puerariae Flos* extract on cell growth of *E. coli* PQ37.

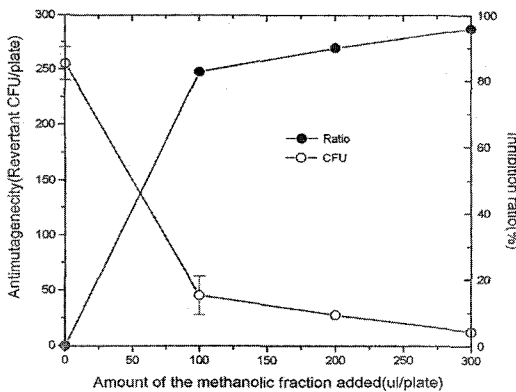


Fig. 10. Inhibitory effect of *Puerariae Flos* extract on the formation of revertants in *S. typhimurium* TA1538.

을 측정하였고, 寒天平板培地 상에 균주를 塗抹한 다음, 葛花의 열수 및 媒탄을 추출물을 적신 濾過紙를 平板培地 위에 位置하여 培養한 結果 各 균의 生장에 시험한 두 추출물이 세포독성을 나타내지 않았다. 시험한 두 추출물의 어떠한 濃度에서도 시험한 細菌 菌株에 對해 細胞毒性이 없었다(Fig. 11). 이 結果는 葛花의 各 추출물의 抗突然變異에 對한 活性이 細胞毒性에 依하여 誘發되지 않았음을 立證 하였다.

## 2. 葛花 추출물의 抗酸化 效果

葛花 各 10 mg/ml 濃度의 열수 및 媒탄을 추출물

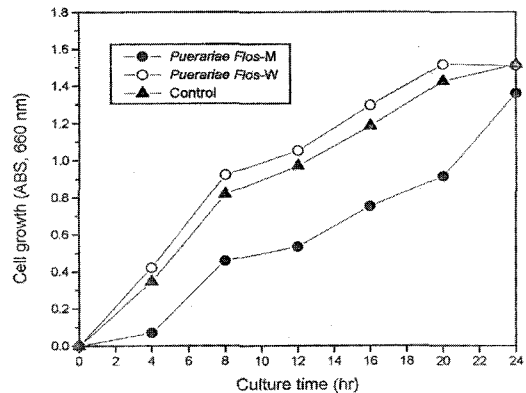


Fig. 11. Effect of *Puerariae Flos* extract on cell growth of *S. typhimurium* TA1538.

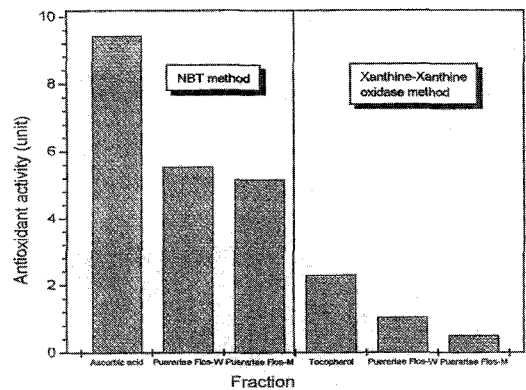


Fig. 12. Antioxidant activity of the fractions from *Puerariae Flos*.

의 抗酸化 活性을 NBT법 및 xanthine-xanthine oxidase법을 사용하여 測定하였다. 10 mg/ml의 ascorbic acid 및  $\alpha$ -tocopherol을 대조군으로 比較하였다. 實驗 結果 NBT법에 의한 抗酸化 活性은 열수 추출물의 抗酸化 活性(unit = 5.55)이 메탄올 추출물의 抗酸化 活性(unit = 5.17)과 比較하였을 때 더 優秀하였다. Xanthine-xanthine oxidase법에 의한 抗酸化 活性은 열수 추출물의 抗酸化 活性(unit = 1.05)이 메탄올 추출물의 抗酸化 活性(unit = 0.51)에 比較하여 더 優秀하였다(Fig. 12). 각 추출물의 抗酸化 活性은 對照群으로 使用된 同一한 濃度의 ascorbic acid 및  $\alpha$ -tocopherol에 比較하여 낮은 活性을 보여주었다.

#### IV. 考 察

突然變異는 크게 點突然變異(point mutation)와 染色體突然變異(chromosomal mutation)로 나뉘어지는데 이러한 것은 회복이 되지 않았거나 혹은 부정확하게 회복되어 생김 결과로 나타나는 것으로 노화과정에서 주로 발생한다. 이러한 突然變異는 자연선택이 작용할 수 있는 다양성을 제공하여 진화의 근거가 되기도 하지만 개체에 해가되거나 정상조직을 파괴하는 腫瘍이 되기도 한다. 突然變異를 일으키는 물질을 突然變異原(mutagen)이라 하며 그 유발원으로는 대표적으로 방사선과 화학물질이 있다. 특히 突然變異는 腫瘍과 밀접한 상관관계가 있으며 현재까지 알려진 發癌物質의 85% 이상은 突然變異原이고 非發癌性物質의 경우에도 10% 이하가 突然變異源으로 작용한다는 연구결과도 있듯이 突然變異와 腫瘍은 밀접한 관계가 있다<sup>40,41</sup>.

이렇게 어느 조직의 성분세포가 원래 질서를 혼란시켜 이상하게 증식(proliferation)된 腫瘍 중 腫瘍細胞가 미분화인 것일수록 악성도가 높다고 하지만 이것은 細胞의 성숙을 완수치 못한 채로 增殖되기 때문으로 組織으로서 질서를 유지하지 못하기 때문이다. 이러한 腫瘍의 몇 가지 인자는 크게 유전자작용과 관련된 내인자와 발암물질과 같은 외부자극에

증식을 시작하는 것이 있지만 특별히 구별이 불가능한 것도 많다<sup>42,43</sup>.

腫瘍과 관련이 있는 韓醫學的 病因으로 內經<sup>23</sup>에서는 寒, 熱과 같은 外邪의 侵襲과 關聯이 있다고 하였으며《諸病源候論》<sup>18</sup>에서는 陰陽不和, 臟腑虛弱한데 外邪를 받아 發生한다고 하여 內傷과 外邪를 같이 언급하였다. 이후 《景岳全書》<sup>26</sup>에서는 腫瘍의 原因을 七情, 勞倦, 飲食, 方術 등과 關聯이 있는 것으로 보았고 現代中醫書<sup>44-46</sup>에서는 正虛邪實, 氣滯血瘀, 臟腑失調, 痰濕結聚, 熱毒內結 등을 病因으로 보고 있으며 扶正培本, 理氣活血, 活血祛瘀, 清熱解毒, 軟堅散結, 化痰祛濕, 以毒攻毒, 養陰清熱, 健脾益腎 등의 治療法이 사용되고 있다.

호기성 생물은 각종 스트레스를 받으면 생체내에서의 산소는  $O_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH$  등의 반응성이 높은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 변한다. 활성산소는 이러한 분자 혹은 원자의 최 외각 전자궤도에 부대전자를 가진 불안정한 화합물을 총칭하여 말하는 것으로 이들은 세포막분해, 단백질분해, DNA 합성억제, 돌연변이 등에 심각한 생리적·유전적 장애를 유발하여 老化는 물론 癌을 비롯하여 腦卒中, 파킨슨병 등의 뇌질환과 심장질환, 허혈, 동맥경화, 피부질환, 소화기질환, 염증, 류마티스, 자가면역질환 등의 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다<sup>47,48</sup>.

한편, 화학적으로 添加하는 變異原 物質의 作用기작에 따라, 直接突然變異原(directly acting mutagen)과 間接突然變異原(indirectly acting mutagen)으로 구분된다. 일반적으로 直接突然變異原은 니트로소구아니딘으로 대표되는 알킬화제와 같이 화학적 反應性이 풍부하여 대사 活性化를 필요로 하지 않는 화합물이다. 대표적인 화합물로서 methylmethanesulfonate(MNS), ethylmethanesulfonate(EMS), N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG), sodium azide( $NaN_3$ ) 등이 있다. 間接突然變異原은 그 자신 反應性이 없어 突然變異를 일으키지 않지만, 대사에 의해 反應性이 있는 變異原으로 변환되는 화합물이다. 따라서 間接突然變異原은 突然變異

原으로 作用하기 위해서 대사활성 단계를 꼭 거쳐야 된다. 대부분 기작은 밝혀져 있지 않지만 benzopyrene의 경우 소포체막에 붙어 있는 시토크롬 P<sub>450</sub>에 의해서 活性化되는데, 시토크롬 P<sub>450</sub>에 의해서 酸化되는 과정에서 1단계와 2단계의 대사산물을 발생시키며 이들은 直接突然變異原으로써 작용을 하게 된다.

따라서 直接突然變異에 의해 誘發되는 突然變異의 抑制作用은 直接的으로 突然變異原에 作用하여 突然變異原을 不活性化 시키거나 또는 回復에 관련된 다른 酵素活性을 誘發시켜 作用하게 된다. 그리고 間接突然變異原에 의해 誘發되는 突然變異를 抑制하는 作用은 1,2차 대사산물을 생성하는 酵素를 抑制하거나 생성되는 조건을 變化시킴으로써 대사산물생성을 抑制하여 突然變異를 抑制하게 된다.

본 실험에 사용한 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)와 4-nitroquinoline N-oxide(NQO)의 경우, 突然變異를 일으키는데 있어 化學的 反應性이 풍부하여 대사활성화가 필요하지 않는 直接突然變異原이며, 염기치환(base substitution)작용으로 착오염기쌍을 惹起시켜 염기 轉移를 일으킨다(AT→GC, GC→AT; transition mutation).

葛花는 주성분으로 전분 10-15%, 많은 종류의 flavonoid와 irisolidone, irisolidone-7-o-glucoside 등을 함유하고 있으며 일반적으로 解酒毒하는 효능이 많이 알려져 주로 알코올 분해에 대한 보고<sup>34,35</sup>가 많지만 특히, 葛花의 비당체인 글리시테인과 텍토리게닌, 그리고 구조에서 유사성을 보이는 게니스테인과의 抗酸化 및 세포보호활성을 비교하여 텍토리게닌은 유리기 소거, 지질과산화억제 및 세포보호작용 모두 뚜렷한 抗酸化作用을 가진다는 보고<sup>33</sup>도 있었다.

본 실험에서도 葛花의 열수 추출물과 메탄올 추출물의 抗突然變異 및 抗酸化 效果를 측정한 결과, 葛花의 메탄올 추출물의 抗突然變異 活性이 열수 추출물에 비교하여 더 우수하였다.

葛花 추출물의 突然變異原 MNNG에 대한 抗突然變異 活性은 메탄올 추출물에서 우수하였으며, 葛

花 추출물의 濃度を 증가시켰을 경우, 메탄올 추출물과 열수 추출물의 抗突然變異 活性은 모두 증가되었다.

突然變異原 NQO에 대한 抗突然變異 活性은 메탄올 추출물에서 매우 우수하였으며, 열수 추출물의 活性은 매우 낮았다. 葛花 추출물의 濃度を 증가시켰을 경우, 메탄올 추출물에서의 抗突然變異 活性은 증가하였다.

Ames test를 이용한 抗突然變異이 活性의 復歸 變異株 抑制率은 突然變異原 NQO에 대해 메탄올 추출물의 抗突然變異 活性이 매우 우수하였다. 사용한 葛花 각 추출물의 *E. coli* PQ37 菌株과 *S. typhimurium* TA1538 菌株에 대한 細胞毒性 실험한 결과, 시험한 각 추출물 모두에서 細胞毒性이 없었다. 이 결과는 葛花의 각 추출물의 抗突然變異에 대한 活性이 細胞毒性에 의하여 誘發되지 않았음을 입증하였다.

葛花의 抗酸化 活性은 열수 추출물의 抗酸化 活性이 메탄올 추출물의 抗酸化 活性에 比하여 우수하였으며, 메탄올 추출물의 抗酸化 活性은 對照群으로 사용된 ascorbic acid 및 α-tocopherol에 比해서 活性이 낮게 나타났다.

본 실험의 결과 葛花 추출물의 抗突然變異 및 抗酸化에 대한 藥理效能은 유의성이 있었으며, 특히 메탄올 추출물을 사용하였을 때 우수하였다. 추후 葛花 추출물에서 藥理作用이 우수한 성분의 分離·精製·分析 實驗을 隨行하여야 할 것으로 판단된다.

#### IV. 結 論

葛花의 抗突然變異 活性을 검토하고자 SOS chromotest 및 Ames법을 利用하여 抗突然變異 活性을 측정하고, NBT법과 xathine-xanthine oxidase법으로 抗酸化 活性을 측정하였다.

葛花의 突然變異原 MNNG에 대한 antigenotoxic SOS chromotest에서 메탄올 추출물이 열수 추출물보다 抗突然變異 活性이 더 우수하였다. 메탄올 추출물의 첨가 농도를 증가시켰을 경우, 100 μl/tube

농도까지 抗突然變異 활성이 현저하게 증가하였다. 葛花 추출물의 突然變異原 NQO에 대한 抗突然變異 활성은 메탄올 추출물에서 매우 우수하였으며, 열수 추출물의 활성은 낮았다. 葛花 추출물의 濃度를 300  $\mu$ l/tube로 증가시켰을 경우, 메탄올 추출물에서의 抗突然變異 활성 또한 현저하게 증가하였다.

突然變異原으로 MNNG를 使用하여 antimutagenic Ames test 방법으로 葛花의 抗突然變異 활성을 測定하였을 때, 메탄올 추출물이 열수 추출물에 비하여 우수한 효능을 나타내었다. 反應 tube 당 300 $\mu$ l의 메탄올 추출물이 添加되었을 때의 突然變異 抑制率은 96%이었다.

葛花의 抗酸化 活性은 열수 추출물이 메탄올 추출물에 비하여 우수하였으며, 對照群으로 使用된 ascorbic acid 및  $\alpha$ -tocopherol에 비해서 낮게 나타났다.

### 參考文獻

1. Nakamura, Y. et al. S-methyl methane thiosulfonate, a new antimutagenic compound isolated from *Brassica oleracea* L. var. *botrytis*, *Biol. Pharm. Bull.* 1993;16:207.
2. 서정숙 외. 식용식물의 항변이원성에 관한 연구, *생약학회지* 1990;21:88.
3. 이성 외. 쑥 추출물의 抗突然變異 활성효과, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1996; 24:105-110.
4. 김석중 외. 무즙의 돌연변이 억제효과 및 그 특성, *한국식품과학회지* 1992;24:193-198.
5. 함승시 외. 메틸 flavonoids의 항돌연변이원성 및 지질대사 조절기능에 관한 연구, *한국영양식량학회지* 1994;23:698-703.
6. 김창민 외. 개너삼의 성분 및 생물활성에 관한 연구, *생약학회지* 1990;21:137.
7. Sakai, Y. et al. Antimutagenicity of extracts from crude drugs in chinese medicines, *Mut. Res.* 1986;174:1.
8. Kakinuma K. *J. Agri. Biol. Chem.* 1984;48: 1647.
9. Kim, H.K. et al. Effects of antimutagenic flavonoid, galangin on benzo(a)pyrene metabolism in mice, *Kor. Biochem. J.* 1991;24:141.
10. MacGregor, J.T. Genetic and carcinogenic effects of plant flavonoids. In *Nutritional and toxicological aspects of food safety* (Friedman, M. ed.), Plenum Pub., New York; 1994, p.497.
11. Wattenberg, L.W. Inhibition of neoplasia by dietary constituents, *Cancer Res.* 1983;43:2448.
12. Huang, M.T. Inhibitory effect of 3-hydroxybenzo(a)pyrene on the mutagenicity and tumorigenicity of  $\pm 7 \beta$ , 8- $\alpha$ -dihydroxy-9- $\alpha$ , 10  $\alpha$ -epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene, *Cancer Res.* 1986;46:558.
13. Quillardet, P. et al. The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures, *Mut. Res.* 1985;147:65-78.
14. Fridovich, I. Biological effects of the superoxide radical, *Arch. Biochem. Biophys.* 1986;247:1-11.
15. McBride, T.J. et al. Mutagenic spectrum resulting from DNA damage by oxygen radicals, *Biochemistry* 1991;30:207-213.
16. Adelson, R. et al. Oxidative damage to DNA: Relating to species metabolic and life span, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988;85:2706-2708.
17. Frei, B. et al. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988;85:9748-9752.
18. 巢元方. 巢氏諸病源候論. 大星文化社; 1992, p.147, 222, pp.149-150.
19. 康明吉. 濟衆新編. 杏林書院; 1975, p.181.
20. 趙佶 外. 聖濟總錄. 人民衛生出版社; 1995, p.866, 887, 889, 902, 1460, 1464, 1467, pp.893-894.

21. 陳實功. 外科正宗. 人民衛生出版社; 1983, p.93, 121, 123.
22. 李克光 主編. 金匱要略. 人民衛生出版社; 1989, p. 316.
23. 郭霽春. 黃帝內經靈樞校注語譯. 天津科學技術出版社; 1989, pp. 386-387, p.439, 555.
24. 劉嘉湘. 實用中醫腫瘤手冊. 上海科技教育出版社; 1996, pp.1-2.
25. 楊寶印. 癌症的中藥治療. 河北科學技術出版社; 1992, pp.4-6.
26. 張介賓. 景岳全書 雜證模選讀. 重慶大學出版社; 1988, p.88, 90, 101, pp.94-95.
27. 賈堃. 癌瘤防治研究. 成輔社; 1984, p.25, pp.27-29.
28. 郁仁存. 中醫腫瘤學(上). 科學出版社; 1991, pp.65-72.
29. 郁仁存 外. 腫瘤研究. 上海科學技術出版社; 1991, pp.95-133, 156-157.
30. 陸昌洙 外. 漢藥의 藥理·成分·臨床應用. 癸丑文化社; 1984, p.340.
31. 上海中醫學院 編著. 中草藥學. 商務印書館香港分館; 1987, pp.54-55.
32. 李時珍. 本草綱目. 重慶大學出版社; 1995, pp.142-143.
33. 김석훈 外. 갈화(Puerariae flos) 추출물이 Rat 혈중 Ethanol 농도에 미치는 영향, 한국농화학회지 1995;38(6):549-553.
34. 김성훈 外. 갈화(葛花) 추출물이 실험 동물의 알코올 대사에 미치는 영향, '95 심포지움 및 학술 발표, 한국농화학회, 1995, p.212.
35. 이경태 外. 갈화에서 분리한 이소플라본의 항산화 및 세포보호효과, 약학회지 1998;43(6):736-742.
36. Quillardet, P. and M. Hofnung. The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures, *Mut. Res.* 1985; 147:65-78.
37. Maron, D.M. and B.N. Ames. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mut. Res.* 1983;113:173-215.
38. Winterbourn, C.C., R.E. Hawkins, M. Brian, and R.W. Carrell. The estimation of red cell superoxide dismutase activity, *J. Lab. Clin. Med.* 1975;85:337.
39. PUNCHARD, N. A and F. J. Kelly. Free Radicals : a practical approach, PAS, 1996.
40. 이광웅 外. 생명과학의 이해. 을유문화사; 1996, pp.136-142.
41. Ames, B.N. : Methods for detecting carcinogens and mutagens with Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutat. Res.* 1975;31:347-364.
42. Yoghitoshi, Yawara. 내과진단학. 제일의학사; 1994, pp.8-9.
43. 서울대학교 의과대학. 중앙학. 서울대학교 출판부; 1994, pp.1-3, 43-82, 137-138.
- 44.李家庚 外. 中醫腫瘤防治大全. 北京科學技術文獻出版社; 1994, pp.45-47, 608-609.
45. 李岩 編. 腫瘤臨證備要. 人民衛生出版社; 1983, p.2, pp.5-6.
46. 錢伯文. 腫瘤的辨證施治. 上海科技出版社; 1989, p.12, 48, pp.50-53, 55-59, 61-62.
47. 양덕조 外. 자리공(Phytolacca esculenta van Houtte) 모상근배양에서 항산화효소의 활성화에 미치는 광의 영향, 식물조직배양학회지 1995; 22(2):71-76.
48. 장문석 外. 다양한 식물배양 세포주에서 catalase 활성과 다른 항산화효소 활성의 비교, 식물조직배양학회지 1996;23(3):157-160.