

뽕나무 추출물의 유전독성 및 돌연변이원성

진효주* · 이현용* · 김종대* · 허문영** · 이진하*†

*강원대학교 바이오산업공학부, **강원대학교 약학대학

Genotoxicity and Mutagenicity of the Extracts of *Morus alba* L.

Hyou Ju Jin*, Hyeon Yong Lee*, Jong Dai Kim*, Moon Young Heo**, and Jin Ha Lee*†

*School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chunchon 200-701 Korea.

**College of Pharmacy, Kangwon National University, Chunchon 200-701 Korea.

ABSTRACT : This study was carried out to investigate the genotoxicity in comet and *in vitro* micronucleus assay and mutagenicity in Ames test of the extracts from leaves and stem of *Morus alba* L. The samples showed a very weak cytotoxicity on the NIH/3T3 cells by SRB assay. The cell viability of the extracts and fractions from leaves and stems of *Morus alba* L. was 80% over at 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and that of the chloroform fractions from leaves and stems showed lower than others. The genotoxicity at 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of 100% EtOH and water extracts on the NIH/3T3 cells in comet assay was about 40% compared to positive control, and most fractions from 100% EtOH extract of the leaves showed stronger genotoxicity than that of fractions from the stem. The genotoxicity with S-9 mix *in vitro* micronucleus assay of the 100% EtOH and water extracts from *Morus alba* L. did not indicate any significant difference as compared with control group. The cytokinesis-binucleated cells were showed in the hexan, chloroform, ethylacetate and butanol fractions from the extract of the leaves without S-9, and sample with S-9 showed CB cells in the chloroform fraction from the leaves. In the Ames test, the water and 100% ethanol extracts of *Morus alba* L. did not have a strong mutagenicity in TA98 and TA100, but the fractions of organic solvents of the ethanol extract had 10~26% of mutagenicity on the TA100 strain.

Key word : *Morus alba* L., cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity, comet, micronucleus assay, Ames test

서 언

뽕나무는 전국에 재식하며 일본, 만주, 중국, 몽골 등 동아시아에 널리 분포한다. 잎을 상업이라고 하며, 거풍, 청열, 명목의 효능이 있고, 풍온발연, 두통, 목적, 구갈을 치료하는데 예로부터 이용되어 오고 있는 것으로 전해진다. 뽕의 잎에는 flavonoid 성분인 rutin, quercetin, isoquercetin, moracetin이, 뿌리껍질에는 coumarine계 성분인 umbelliferone, scopoletin, flavonoid 성분인 morusin, mullberrin, mullberochromene, cyclomullberrin등이 함유되어있다 (배기환, 2000). 어린가지는 상지라고 하여 긴 원기둥 모양을 나타내며 그 길이는 다양하고 지름은 0.5~1 cm이다. 뽕나무는 풍으로 인한 소양증과 건조, 각기 풍기, 사지 경련, 숨이 막히는 증상을 치료하고 음식을 소화하며, 소변이 잘 나오게 하는 약리효과를 가지고 있다 (배기환, 2000). 주요성분으로는 tannin, 유리 sucrose, fructose, stachyose, glucose, maltose, raffinose, arabinose, xylose를 함유하며, flavonoid성분인 mulberrin, cyclomulberrin, mulber-

rochromene, cyclomulberochromene이 함유되어있다 (Kim *et al.*, 1998). Asano는 뽕나무 잎으로부터 N-containing sugars 분리·동정하였으며 (Asano, 1994), Basnet *et al.* (1993)은 뽕잎으로부터 ethyl acetate, butanol 분획에서 혈당강화 활성을 가진 물질이 2-aryl-bezofuran 유도체임을 확인하였고, Lee *et al.* (1995)은 뽕잎의 water-soluble 분획에서 혈당강화 활성물질인 acarbose와 마찬가지로 탄수화물의 소화와 관여하는 효소인 α -glucohydrolase 억제작용에 기인한다고 보고하였다. 최근 Kim *et al.* (1998)은 뽕잎 추출물이 흰쥐와 건강한 성인의 혈청지질에 미치는 영향, 뽕나무 수용성 추출물의 항산화 활성 및 쥐를 이용한 여러 가지 생리 활성에 대하여 보고하였다. 뽕나무 잎과 줄기는 위와 같은 기능을 하지만 한국식품의약품안전청의 식품 공전중 식품원료에 제시된 식용근기 및 안전성이 입증되지 않은 동·식물 원료 중 산뽕나무 (*Morus bombycis*; 줄기, 가지, 수피)가 포함되어 있다 (한국식품의약품안전청, 2000). 뽕나무 부위별 독성에 관한 충분한 연구 결과가 부족하여 본 연구에서는 뽕나무 잎과 줄기의 ethanol과 물 추

†Corresponding author: (Phone) +82-33-250-6454 (E-mail) jinhalee@kangwon.ac.kr

Received July 22, 2005 / Accepted December 30, 2005

출몰과 유기용매 등에 의한 5가지 분획물을 얻어서 그 시료들의 single cell gel electrophoresis (SCGE, comet assay)를 이용한 DNA 산화 손상에 대한 유전독성 (Singh *et al.*, 1988; Papazisis *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2003)과 *in vitro* micronucleus assay (Schmid, 1975; Fenech *et al.*, 1985; Fenech, 1997; Fenech, 2000)를 이용한 유전독성, Ames test (Ames *et al.*, 1973; McCann *et al.*, 1975; Shinohara *et al.*, 1980)를 이용한 돌연변이 유발성을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 재료 및 시료 조제

본 실험에 사용한 뽕나무 (*Morus alba* L.)는 강원도 인제 지역등 산간에서 직접 채취하여 뽕나무 잎, 줄기를 깨끗이 세척하고 실온에서 충분히 건조하여 추출 수용의 향상을 위해 잘게 분쇄한 후, 수직 환류 냉각기가 부착된 추출 flask에 시료중량 200 g에 대하여 10배의 100% ethanol (EtOH)과 증류수를 사용하여 12시간씩 3회 반복 추출하였다. 세포배양용 배지인 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS)은 Hyclone사로부터 구입하였고, hepes buffer, trypsin-EDTA는 Gibco사에서, normal melting agarose, low melting agarose, ethidium bromide, tris (base), sulforhodamine B (SRB)는 Sigma사에서, 그 외 추출용매인 ethanol, hexane, chloroform, ethylacetate (EtOAC), butanol(BuOH) 등의 연구용 시약과 유기용매는 시판 특급시약을 사용하였다. 시료조제는 처음 증류수 및 100% EtOH로 추출하여 단순 1차 추출물을 얻은 다음 EtOH 농축물을 EtOAC, BuOH, chloroform, hexane 및 물 층으로 다시 분별 분획을 행하고, 각각의 용액을 감압 농축시켜 용매를 제거한 분획물을 얻어 시료로 사용하였다.

2. 유전독성평가

1) Comet Assay에 의한 유전독성

NIH/3T3 cell (mouse embryo fibroblast)을 10% FBS 함유 DMEM 배지중에 37.5°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하여 comet assay 시험을 실시했다. 양성 대조군으로 H₂O₂ (1×10⁻³M)를 사용하였다. NIH/3T3 cell 5×10⁴개를 6-well plate 의 각 well 중에 넣고, 24시간 후에 시료를 각 농도별로 첨가하여 24시간동안 CO₂ incubation에서 배양하였다. 그 후, 새로운 배지로 교환하여 1시간 후에 trypsin-EDTA를 0.5 ml가 하여 세포를 모은다. 여기에 PBS (without Cl⁻, Mg²⁺)를 동량 가하고 1000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상층액을 버리고 각 well에 0.5%-low melting point agarose (LMPA)를 200 ml 가하고 적절히 혼합시킨다. 이 액 50 ml를 0.65%-normal melting point agarose 100 ml로 미리 입힌 slide (fully frosted) 위에 떨어뜨린 후 cover slide를 덮었다. 상온에서 20

분간 굳힌 뒤, cover slide를 제거하고 그 위에 다시 0.5%-LMPA 100 ml 떨어뜨린 후 cover slide로 덮고 상온에서 다시 30분간 굳혔다. Cover slide를 제거한 후, lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA-Na₂, 10 mM Tris, pH 10, 10% DMSO, 1% Triton X-100)에 담근 후에 빛을 차단한 채로 1시간 동안 lysis 시킨다. 그 후 electrophoresis buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA-Na₂, pH 13)에 담고 역시 빛을 차단한 채로 30분간 정치시킨 후 electrophoresis apparatus에 slide를 양극쪽으로 연결하여 25 V, 300 mA에서 15분간 electrophoresis 한다. Slide를 꺼내어 10분씩 3번 0.4 M Tris (pH 7.5)중에서 중화시킨다. Tray에 걸어 충분히 건조시킨 후 ethidium bromide (2 µg/ml; 증류수에 용해)를 30 µl 씩 각각에 떨어뜨려 염색한 후 515-560 nm의 excitation filter와 590 nm의 barrier filter를 이용하여 형광현미경으로 관찰한다. 현미경을 관찰한 결과는 DNA 손상정도에 대한 Olive Tail Moment (OTM) 값을 구하기 위하여 image analyzer인 KOMET 3.1 (Kinetic Imaging, England)을 사용하여 분석한다 (Singh *et al.*, 1988; Papazisis *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2003a). 모든 시료들의 NIH/3T3 cell 대한 DNA damage를 image analyzer인 KOMET 3.1을 사용하여 OTM 값으로 나타냈다.

2) *In vitro* micronucleus assay를 이용한 NIH/3T3 세포에 대한 유전독성 측정

유전독성의 조사는 comet assay이외에 다른 방법인 *in vitro* micronucleus (MN) assay를 이용하여 뽕나무 시료들을 조사하였다. Micronucleus assay는 *in vivo* 방법도 있으나 실험의 실행의 수단을 동물을 사용하지 아니하고 *in vitro*에서 수행하는 간편성이 장점인 방법이다. 이 방법도 동물세포에 대한 유전독성의 통일성을 확보하기 위하여 comet assay에서와 같이 NIH/3T3 세포를 사용하였으며 시료의 농도도 역시 comet assay에서의 NIH/3T3 세포에 대한 DNA damage로 측정된 결과를 바탕으로 수행하였다. NIH/3T3 cell는 10% FBS를 함유한 DMEM 배지에 넣고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 5×10⁴ cells/ml의 농도로 NIH/3T3 세포를 6 well plate 의 각 well에 분주하여 2일간 배양한 후, cytochalasin B (0.8 µg/ml; DMSO에 용해)와 여러 가지 농도별로 조제한 시료를 함께 첨가하여 24시간 배양하였다. 각 well에서 배양액을 제거하고 75 mM KCl 2 ml를 가하여 2분 30초간 세포를 팽윤시킨 다음, 고정액 (methanol:acetic acid, 1:19)으로 10분 간격으로 2회 고정시킨 후에 공기 건조시켜 세포표본을 만들었다. 이 세포 표본에 3% giemsa 용액으로 15분간 염색하고 건조한 후 광학현미경으로 400배에서 관찰하였다 (Schmid, 1975; Fenech *et al.*, 1985; Fenech, 1997; Fenech, 2000).

3). Ames-test를 이용한 돌연변이성

뽕나무에 대한 돌연변이 유발성 실험은 *S. typhimurium*의

변이주인 TA98과 TA100을 이용하여 Ames test를 개량한 preincubation법 (Yahagi, 1975)으로 실시하였으며, 대사 활성물질로서 S-9 mix를 첨가한 실험구와 첨가하지 않은 실험구를 비교하였다. 건열 멸균시킨 glass cap tube에 각각의 농도별로 100 µl 씩을 가하고 여기에 전 배양시킨 *S. typhimurium* 배양균액을 100 µl 씩을 가한 다음 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)로 전체량이 700 µl 가 되도록 한다. 이것을 37°C에서 20분간 진탕 배양한 다음 histidine/biotin이 첨가된 top agar (45°C)를 2 ml 씩 가하여 잘 혼합 후에 미리 조제해 놓은 minimal glucose agar plate상에 도말하고 평판 37°C 배양기에서 48시간 배양하여 생긴 복귀돌연변이 (*his*⁺ revertants colony) 수를 측정하여 시료들의 돌연변이원성의 유무를 판정한다 (Ames *et al.*, 1973; McCann *et al.*, 1975; Yahagi, 1975; Shinohara *et al.*, 1980).

3. 통계처리

모든 실험과정은 3번 반복하여 수행하고 유의성 검정을 하기 위하여 Microsoft 사의 Excel Program을 이용하여 t-test를 행하였다.

결과 및 고찰

1. SRB assay에 의한 NIH/3T3 세포에 대한 세포독성

세포 독성을 나타내지 않는 시료의 농도 범위를 조사하여 다음단계의 실험을 수행하기 위하여 NIH/3T3 세포에 대한 각 시료들의 세포독성을 조사하였다 (Table 1). 뽕나무 추출물 및 각 분획물을 250, 500, 1000, 2000 µg/ml 의 농도로 NIH/3T3 세포에 처리하여 배양한 후 SRB assay를 실행하였다 (Lee *et al.*, 2003a and b). NIH/3T3 세포를 선택하여 세포 독성을 조사한 이유는 이 세포를 이용하여 각 시료의 comet 및 in

Table 1. Cell viability of the 100% EtOH and Water extracts and each fraction from *Morus alba* L. on NIH/3T3 using SRB assay

<Leaves>			<Stem>		
Sample	Concentration (µg/ml)	Cell viability (%)	Sample	Concentration (µg/ml)	Cell viability (%)
100% EtOH ex.	250	92.2	100% EtOH ex.	250	96.9
	500	83.2		500	94.7
	1000	64.8*		1000	83.8
	2000	46.1*		2000	70.4
Water ex.	250	98.2	Water ex.	250	94.9
	500	85.6		500	91.3
	1000	69.8		1000	87.8
	2000	52.9*		2000	79.6
Hexane fr.	250	99.2	Hexane fr.	250	96.3
	500	91.1		500	81.6
	1000	81.9		1000	75.5
	2000	49.8*		2000	48.7*
Chloroform fr.	250	98.6	Chloroform fr.	250	96.8
	500	88.8		500	80.8
	1000	58.7*		1000	69.7*
	2000	32.3*		2000	40.4*
Ethylacetate fr.	250	97.1	Ethylacetate fr.	250	90.9
	500	84.3		500	88.3
	1000	72.7		1000	79.9
	2000	59.6*		2000	54.3*
Butanol fr.	250	94.6	Butanol fr.	250	90.8
	500	86.8		500	86.9
	1000	70.6		1000	75.1
	2000	47.9*		2000	65.1*
Aqueous fr.	250	91.4	Aqueous fr.	250	97.2
	500	80.1		500	88.7
	1000	78.3		1000	75.5
	2000	70.4		2000	74.6

* This marks showed a strong cytotoxicity (below 70%) in the data.

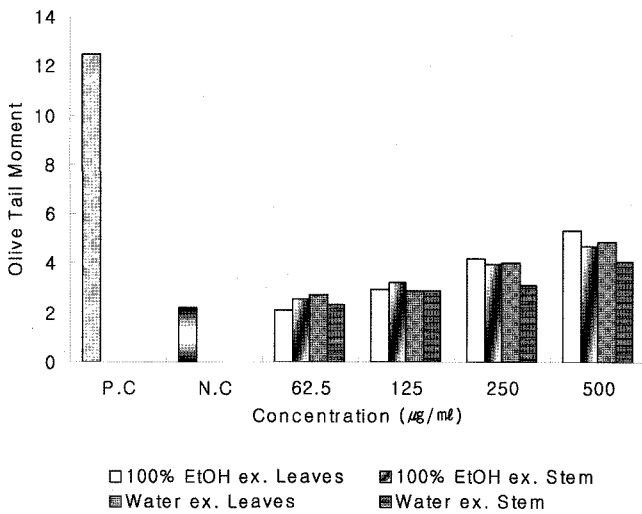


Fig. 1. DNA damage of the extracts from *Morus alba* L. leaves and stem on the NIH/3T3 cells by comet assay.

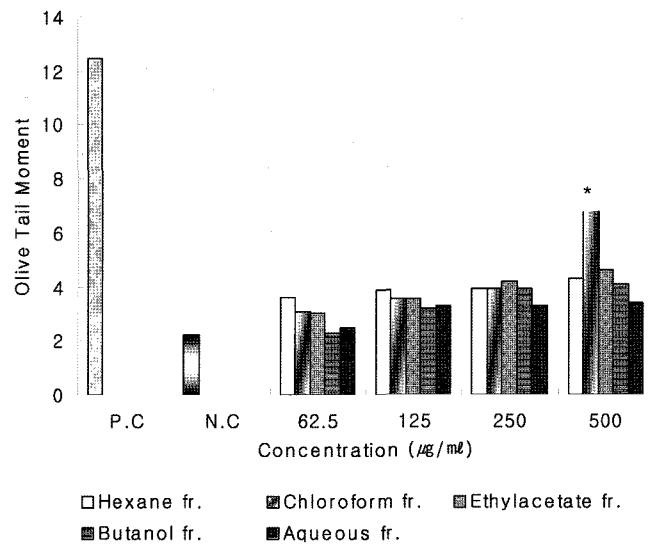


Fig. 3. DNA damage of the each fraction of 100% EtOH extracts from *Morus alba* L. stem on the NIH/3T3 cells by comet assay.

*This marks showed the high values of OTM in each concentration.

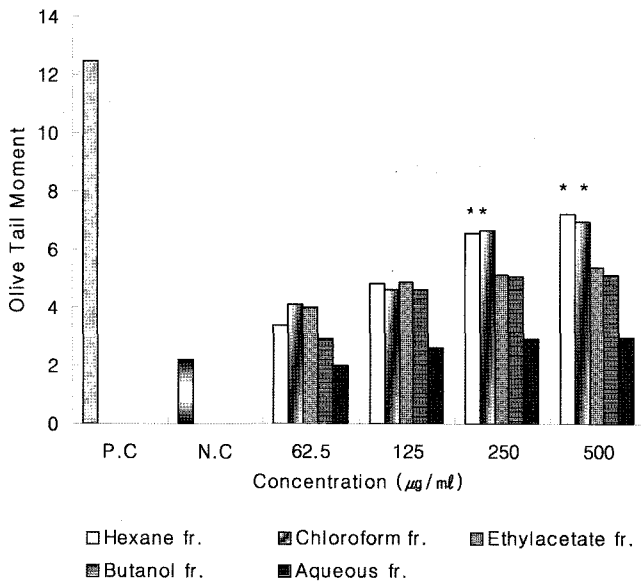


Fig. 2. DNA damage of the each fraction of 100% EtOH extracts from *Morus alba* L. leaves on the NIH/3T3 cells by comet assay.

*This marks showed the high values of OTM in each concentration.

in vitro micronucleus assay를 실행할 목적으로 이 세포에 대한 독성을 조사 하였다. 대부분의 시료들은 500 µg/ml 를 첨가한 조건에서 80% 이상의 생존율을 나타내어 세포 독성을 보이지 않았으나 그 이상의 처리 농도인 1,000와 2,000 µg/ml 에서는 뽕잎의 hexane 분획물, chloroform 분획물, EtOAc 분획물에서 각각 70%와 60% 정도의 독성을 나타내었고, 뽕나무 줄기의 시료인 경우는 뽕잎의 시료 보다 더 낮은 생존율을 보였다.

2. SCGE를 이용한 유전독성

각 시료들의 NIH/3T3 세포 DNA에 대한 damage 정도를 측정하기 위하여 SCGE 실험을 실시하였다. 이 실험은 세포 level에서 각각의 세포에 대한 손상정도를 쉽게 볼 수 있고 정량 할 수 있다. 양성 대조구는 세포에 손상을 주는 H₂O₂ (10⁻²M)를 이용하였고, 음성대조는 DMSO (0.5 mg/ml)를 사용 하였다. NIH/3T3 세포에 대한 각 시료들의 SRB assay에서 세포 독성을 나타내지 않는 500 µg/ml 이하의 농도에서 실험을 수행하였다. Fig. 1은 NIH/3T3 cell에 대한 뽕잎과 뽕나무 줄기의 단순 알콜 추출물 및 물 추출물을 첨가한 경우에 나타난 DNA damage로서 재료의 각 농도별 손상 정도는 농도 의 존적으로 손상정도가 증가하였으며 재료나 추출 용매에 따른 특이한 점은 보이지 않았다. 미리 수행한 SRB assay에서 80% 정도의 생존율을 보였던 최고 농도인 500 µg/ml를 comet assay에 같은 농도를 첨가하여도 역시 DNA 손상 정도가 양성 대조구의 결과와 비교하여 약 1/3 정도인 40% 정도의 손상을 보였다.

Fig. 2는 뽕나무 잎의 EtOH 추출물을 여러 가지 용매로 분획하여 얻은 각 분획물을 이용하여 comet assay에서 유전독성을 조사한 것으로 수용성 분획물은 음성 대조와 비슷한 아주 미약하고 농도에도 그다지 영향을 받지 않는 결과를 보였다. 250 µg/ml 의 hexan 분획물은 양성 대조와 비교하여 약 50% 정도의 DNA damage 활성이 있어서 다른 분획물보다 유전독성이 강한 성분들이 함유된 것을 알 수 있었고, EtOAc 및 BuOH 분획물에서도 다소 강한 손상 정도가 나타났다. 한편 Fig. 3에 보인 뽕나무 줄기의 EtOH 추출물에서 얻은 분획물

Table 2. Micronucleus frequencies in NIH/3T3 cells for the assessment of *in vitro* genotoxicity on 100% EtOH and water extracts from *Morus alba L*

Test material	Concentration ($\mu\text{g}/\text{m}\ell$)	Experiments ²⁾	
		CB Cells with MN/1000	
		(-S-9)	(+S-9)
Negative control ¹⁾		26 \pm 2	22 \pm 3
100% ethanol ex. leaves	62.5	20 \pm 6	19 \pm 3
	125	26 \pm 3	24 \pm 3
	250	23 \pm 2	24 \pm 3
	500	28 \pm 3	23 \pm 5
100% ethanol ex. stem	62.5	23 \pm 4	25 \pm 2*
	125	19 \pm 1	24 \pm 5
	250	28 \pm 4	24 \pm 1
	500	29 \pm 3	24 \pm 3
Water ex. leaves	62.5	22 \pm 3	24 \pm 4
	125	29 \pm 1	21 \pm 3
	250	23 \pm 2	24 \pm 2
	500	30 \pm 2	25 \pm 3*
Water ex. stem	62.5	24 \pm 1	24 \pm 3
	125	23 \pm 2	23 \pm 3
	250	27 \pm 2	21 \pm 4
	500	26 \pm 3	25 \pm 3*

1) DMSO

2) Each value represents the mean \pm S.D. of triplicate plates ($p < 0.05$).

* This marks showed a high genotoxicity in the data.

This fractions were fractionated from 100% EtOH extracts of the leaves.

중에서 500 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ 의 chloroform 분획물이 양성 대조와 비교하여 가장 강한 약 50%의 DNA damage를 보였으나 다른 분획물은 그 정도까지는 강하지 않은 유전독성을 보였다. 그러나 수용성 분획물은 Fig. 2에 보인 뽕잎의 수용성 분획물보다는 다소 강하였고 다른 분획물들은 뽕잎의 분획물보다는 대체로 약한 농도 의존적인 손상 정도가 증가 하였다.

3. *In vitro* micronucleus assay를 이용한 유전독성 평가

MN assay에 사용한 각 시료의 농도는 comet assay에서와 같이 SRB assay에서 확인한 결과에 따라 80% 이상의 생존율을 나타낸 농도인 시료농도 500 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ 를 최고 농도로 실험하였다. Table 2는 뽕나무의 잎과 줄기의 100% EtOH 및 증류수 추출물을 이용하여 NIH/3T3 세포에 대한 유전독성을 *in vitro* MN assay로 조사한 결과이다. 음성 대조구의 경우 1,000개의 두개의 핵으로 분화중인 세포들 중에 형성된 소핵은 각각 28.67 \pm 2.08개 (2.8 \pm 0.2), 23.00 \pm 4.00개 (2.3 \pm 0.4)로서 문헌 (Wakata *et al.*, 1987; Erexson *et al.*, 1987; Catena, *et al.*, 1994)에 나타난 수준이었고, 양성 대조구에 의

Table 3. MN frequencies in NIH/3T3 cells for the assessment of *in vitro* genotoxicity on each fraction from *Morus alba L*. leaves

Test material	Concentration ($\mu\text{g}/\text{m}\ell$)	Experiments ²⁾	
		CB Cells with MN/1000	
		(-S-9)	(+S-9)
Negative control ¹⁾		26 \pm 2	22 \pm 3
Hexane fr.	62.5	22 \pm 3	20 \pm 3
	125	24 \pm 2	22 \pm 1
	250	25 \pm 2	23 \pm 3
	500	42 \pm 3*	23 \pm 2
Chloroform fr.	62.5	23 \pm 4	24 \pm 2
	125	25 \pm 1	22 \pm 3
	250	47 \pm 2*	21 \pm 1
	500	55 \pm 3*	28 \pm 3*
Ethyl acetate fr.	62.5	18 \pm 3	21 \pm 2
	125	23 \pm 1	20 \pm 3
	250	23 \pm 2	23 \pm 2
	500	29 \pm 2*	25 \pm 3
Butanol fr.	62.5	24 \pm 1	24 \pm 3
	125	23 \pm 2	23 \pm 3
	250	28 \pm 2*	22 \pm 4
	500	27 \pm 3	25 \pm 3
Aqueous fr.	62.5	21 \pm 1	22 \pm 3
	125	23 \pm 2	21 \pm 3
	250	24 \pm 2	22 \pm 4
	500	25 \pm 3	23 \pm 3

1) DMSO

2) Each value represents the mean \pm S.D. of triplicate plates ($p < 0.05$).

* This marks showed a high genotoxicity in the data.

This fractions were fractionated from 100% EtOH extracts of the leaves.

해 소핵 수가 약 4배 이상 현저히 증가하여 본 실험이 적합하게 행하여 졌음을 알 수 있었다.

뽕나무의 줄기나 잎의 초기 추출물인 100% EtOH의 물 추출물은 MN의 조사에서 특별한 현상이 관찰되지 않았으며 대사활성 물질인 S-9 Mix를 혼합하여 실험한 경우에도 cytokinesis-binucleated (CB) 작용에 의하여 생성된 세포의 수는 큰 차이가 없었다. Table 3은 뽕나무 잎의 EtOH 추출물로부터 재 분획한 분획물들의 MN을 조사한 결과를 보인 것으로, hexan 및 chloroform 분획물의 500 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ 의 농도에서 S-9 Mix를 혼합하지 않은 실험에서 MN의 출현빈도가 대조군의 약 2배 정도 나타났으나 다른 분획물에서는 MN이 거의 보이지 않았다. 또한 S-9 Mix를 첨가한 모든 실험에서도 특이한 변화가 관찰되지 않았다. Table 4는 뽕나무의 줄기의 EtOH 추출물로부터 얻은 분획물들의 MN 실험 결과를 보인 것이다. 이 연구에서는 500 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ 의 농도의 hexan, chloroform 및

Table 4. Micronucleus frequencies in NIH/3T3 cells for the assessment of *in vitro* genotoxicity on each fraction from *Morus alba L.* stem

Test material	Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Experiments ²⁾	
		CB Cells with MN/1000	
		(-S-9)	(+S-9)
Negative control ¹⁾		26 \pm 2	22 \pm 3
Hexane fr.	62.5	20 \pm 6	19 \pm 3
	125	26 \pm 3	24 \pm 3
	250	23 \pm 2	24 \pm 3
	500	30 \pm 3	23 \pm 5
Chloroform fr.	62.5	23 \pm 4	25 \pm 2
	125	26 \pm 1	24 \pm 5
	250	38 \pm 2*	24 \pm 1
	500	59 \pm 3*	24 \pm 3
Ethyl acetate fr.	62.5	22 \pm 3	24 \pm 4
	125	29 \pm 1	21 \pm 3
	250	23 \pm 2	24 \pm 2
	500	30 \pm 2*	25 \pm 3*
Butanol fr.	62.5	24 \pm 1	24 \pm 3
	125	23 \pm 2	23 \pm 3
	250	27 \pm 2	21 \pm 4
	500	26 \pm 3	25 \pm 3*
Aqueous fr.	62.5	24 \pm 1	24 \pm 3
	125	23 \pm 2	23 \pm 3
	250	27 \pm 2	21 \pm 4
	500	26 \pm 3	25 \pm 3*

1) DMSO

2) Each value represents the mean \pm S.D. of triplicate plates ($p < 0.05$).

* This marks showed a high genotoxicity in the data.

This fractions were fractionated from 100% EtOH extracts of the leaves.

EtOAc 분획물에서 MN의 증가가 관찰 되었고, 그중 chloroform 분획물을 첨가한 경우에 더 많은 MN의 출현을 보였다.

4. 추출물 및 각 분획물의 돌연변이원성

뽕 잎에서 얻은 시료들의 *S. typhimurium* TA98과 TA100을 이용한 Ames test의 preincubation 법으로 행한 결과를 Table 5에 나타내었다. 모든 시료의 2.5 mg/ml까지의 농도를 첨가하였을 경우 TA98에 대하여 chloroform과 BuOH 분획물에서는 매우 약한 돌연변이 현상이 관찰되었고 이 실험에서 최고 농도인 5 mg/ml을 첨가하였을 경우는 hexan 분획물에서 약한 돌연변이 현상이, chloroform과 BuOH 분획물에서는 hexan에서 보다 좀더 강한 돌연변이 유발 현상이 관찰되었다. 그러나 그 돌연변이 정도는 약한 수준으로 frame shift 돌연변이에 대한 작용은 매우 약하였다고 평가할 수 있다. 뽕잎에서

Table 5. Mutagenicity of 100% EtOH and water extracts and each fraction of the EtOH extract from *Morus alba L.* leaves on *S. typhimurium* TA98 and TA100

Test material	Concentration (mg/ml)	His+ revertants/plate ¹⁾			
		TA98		TA100	
		(-S-9)	(+S-9)	(-S-9)	(+S-9)
Spontaneous		22 \pm 2	24 \pm 1	180 \pm 3	185 \pm 1
100% EtOH Ex.	0.625	22 \pm 2	21 \pm 2	182 \pm 1	185 \pm 1
	1.25	23 \pm 3	25 \pm 1	185 \pm 2	200 \pm 2
	2.5	28 \pm 2	33 \pm 1	252 \pm 3*	241 \pm 3*
	5	33 \pm 1*	35 \pm 2*	388 \pm 4*	390 \pm 1*
Water Ex.	0.625	22 \pm 1	20 \pm 1	185 \pm 1	181 \pm 2
	1.25	22 \pm 3	21 \pm 2	186 \pm 2	185 \pm 2
	2.5	29 \pm 3	31 \pm 2*	211 \pm 6*	206 \pm 3*
	5	37 \pm 2*	34 \pm 2*	371 \pm 4*	309 \pm 3*
Hexane fr.	0.625	20 \pm 1	21 \pm 2	181 \pm 2	178 \pm 2
	1.25	22 \pm 1	22 \pm 2	180 \pm 1	176 \pm 2
	2.5	24 \pm 2	26 \pm 2	180 \pm 3	177 \pm 1
	5	33 \pm 2*	35 \pm 2*	178 \pm 3	181 \pm 2
Chloroform fr.	0.625	20 \pm 1	20 \pm 3	180 \pm 1	174 \pm 1
	1.25	22 \pm 4	24 \pm 1	179 \pm 3	177 \pm 2
	2.5	30 \pm 2*	33 \pm 1*	182 \pm 3	180 \pm 3
	5	47 \pm 2*	37 \pm 2*	181 \pm 2	181 \pm 2
Ethyl acetate fr.	0.625	19 \pm 2	20 \pm 2	179 \pm 2	181 \pm 2
	1.25	20 \pm 4	22 \pm 3	200 \pm 1	214 \pm 1*
	2.5	29 \pm 1	33 \pm 2*	217 \pm 2*	226 \pm 1*
	5	32 \pm 1*	32 \pm 3*	234 \pm 1*	259 \pm 2*
Butanol fr.	0.625	19 \pm 2	20 \pm 1	171 \pm 2	177 \pm 2
	1.25	20 \pm 3	21 \pm 1	182 \pm 3	179 \pm 1
	2.5	33 \pm 3*	35 \pm 2*	188 \pm 2	187 \pm 2
	5	38 \pm 2*	41 \pm 2*	200 \pm 3*	223 \pm 1*
Aqueous fr.	0.625	20 \pm 1	21 \pm 2	177 \pm 2	177 \pm 1
	1.25	20 \pm 1	22 \pm 1	176 \pm 2	176 \pm 2
	2.5	22 \pm 2	25 \pm 1	179 \pm 4	179 \pm 1
	5	23 \pm 2	24 \pm 2	180 \pm 4	178 \pm 3

1) Each value represents the mean \pm S.D. of triplicate plates ($p < 0.05$).

*This marks indicated a higher mutagenic frequency than spontaneous values.

얻은 시료를 0.625, 1.25, 2.5, 5 mg/ml의 농도로 각각 TA100에 첨가하였을 경우 1.25 mg/ml 수준의 농도에서는 EtOH 추출물과 물 추출물, chloroform 및 BuOH 분획물은 돌연변이 현상이 거의 없으며 매우 약했으나 2.5 mg/ml의 농도에서는 물 추출물과 EtOH 추출물은 약한 돌연변이가 나타났고, EtOAc 분획물은 다소 강한 돌연변이 현상이 관찰 되었다. 그러나 수용성 분획물은 어떤 농도에서도 전혀 돌연변이 현상이 나타나지 않았다. 이 결과에서 뽕잎의 시료들은 TA98과 TA100에 대하여 서로 변이를 일으키는 성분들이 각각 다른

Table 6. Mutagenicity of 100% EtOH and water extracts and each fraction of the EtOH extract from *Morus alba* L. stem on *S. typhimurium* TA98 and TA100

Test material	Concentration (mg/ml)	His+ revertants/plate ¹⁾			
		TA98		TA100	
		(- S-9)	(+ S-9)	(- S-9)	(+ S-9)
Spontaneous		22 ± 2	24 ± 1	180 ± 3	185 ± 1
100% EtOH Ex.	0.625	21 ± 1	19 ± 3	180 ± 2	188 ± 2
	1.25	24 ± 2	24 ± 2	188 ± 2	198 ± 2
	2.5	39 ± 2*	38 ± 3*	251 ± 3*	236 ± 1*
	5	47 ± 1*	45 ± 1*	397 ± 1*	394 ± 18
Water Ex.	0.625	20 ± 1	19 ± 2	177 ± 2	170 ± 1
	1.25	24 ± 2	22 ± 2	178 ± 2	175 ± 3
	2.5	28 ± 3	27 ± 1	224 ± 3*	231 ± 4*
	5	44 ± 1*	40 ± 2*	354 ± 2*	366 ± 2*
Hexane fr.	0.625	19 ± 2	20 ± 2	188 ± 1	184 ± 2
	1.25	22 ± 3	26 ± 1	198 ± 2	200 ± 2*
	2.5	35 ± 3*	38 ± 2*	209 ± 2*	212 ± 3*
	5	39 ± 3*	40 ± 3*	254 ± 2*	262 ± 1*
Chloroform fr.	0.625	20 ± 1	21 ± 2	180 ± 2	182 ± 2
	1.25	21 ± 2	24 ± 3	200 ± 2*	208 ± 3*
	2.5	44 ± 3*	40 ± 2*	268 ± 2*	273 ± 2*
	5	59 ± 3*	65 ± 3*	342 ± 1*	321 ± 1*
Ethylacetate fr.	0.625	20 ± 4	21 ± 1	182 ± 1	184 ± 2
	1.25	20 ± 2	21 ± 2	190 ± 2	190 ± 1
	2.5	22 ± 3	26 ± 2	184 ± 5	188 ± 2
	5	25 ± 1	25 ± 4	235 ± 2*	253 ± 1*
Butanol fr.	0.625	21 ± 2	20 ± 1	181 ± 2	184 ± 2
	1.25	20 ± 3	21 ± 3	188 ± 2	195 ± 3
	2.5	29 ± 2	33 ± 2*	203 ± 2*	208 ± 1*
	5	30 ± 3*	35 ± 2*	250 ± 2*	259 ± 2*
Aqueous fr.	0.625	20 ± 1	21 ± 2	180 ± 2	174 ± 2
	1.25	20 ± 2	21 ± 2	181 ± 1	177 ± 2
	2.5	22 ± 1	24 ± 2	179 ± 2	181 ± 2
	5	23 ± 2	25 ± 1	180 ± 3	184 ± 1

¹⁾ Each value represents the mean ± S.D. of triplicate plates (p < 0.05).
*This marks indicated a higher mutagenic frequency than spontaneous values.

분획물 또는 추출물에 함유 되어 있는 것을 알 수 있었고 대체적으로는 EtOAc 분획물중에 돌연변이 유발성에 관련된 성분이 많이 함유 되어 있음을 시사하였다.

Table 6는 뽕나무 줄기로부터 조제한 시료의 Ames test strain에 대한 돌연변이 유발성에 대한 결과를 보인 것이다. TA98에 대한 시료들의 돌연변이 유발성은 수용성 및 EtOAc 분획물은 전혀 돌연변이 유발성이 관찰되지 않았으나 시료 농도 2.5 mg/ml 에서 돌연변이 현상을 보인 것은 EtOH 추출물, hexan 및 chloroform 분획물들이 약 40%의 복귀변이 콜로니가 대조구보다 많이 관찰되어 약한 돌연변이 유발성이 확인되

었다. 물 추출물과 BuOH 분획물은 5 mg/ml 의 농도에서 40 % 정도의 돌연변이 유발성이 각각 확인되었다. TA100에 대한 각 시료들 중에서 유일하게 수용성 분획물은 전혀 돌연변이가 나타나지 않았으며 이것은 TA98에서 돌연변이 유발성이 없었던 결과와 같이 수용성 분획은 무독한 성분들을 함유한 것으로 사료된다. 그러나 시료들의 2.5 mg/ml의 농도에서 EtOH 추출물, 물 추출물, hexan 및 BuOH 분획물이 각각 10% 정도의 많은 콜로니가 관찰되어 약한 돌연변이 유발성이 있음이 확인되었고, EtOAc 분획물은 5 mg/ml의 높은 농도에서 약 26 % 정도의 돌연변이 유발성을 보였다. 이러한 결과로부터 뽕나무를 재료로 한 식품 등의 제품을 제조할 경우 독성이 약한 추출물 및 분획물의 구분에 도움이 될 것으로 사료된다.

적 요

강원도 산지의 뽕나무의 잎, 줄기, 뿌리를 건조하여 100% EtOH와 물로 추출하여 얻은 추출물 및 EtOH 추출물로부터 용매별 분획물들을 NIH/3T3에 대한 세포독성, comet assay를 이용한 DNA damage 손상으로부터 유전 독성, *in vitro* micronucleus assay를 이용한 유전독성, Ames test를 이용한 돌연변이 유발을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 각 시료들의 NIH/3T3에 대한 세포독성은 0.5 mg/ml 농도에서 약 80%의 생육활성을 나타냈다.

2) 뽕나무 잎의 1차 추출물 들은 comet assay에서 양성 대조구 대비 약 40% 정도의 유전독성을 보였다. 뽕잎의 EtOH 추출물에서 분획한 분획물 시료중 수용성 분획은 거의 독성이 나타나지 않았으나, hexan의 0.25 mg/ml 농도의 분획물이 약 50% 정도를 보였으며 다른 시료들은 이 보다 약한 독성을 보였다. 또한 뽕나무 줄기의 분획물 시료들 중에서 0.5 mg/ml 농도의 chloroform 분획물이 양성 대조구 대비 가장 강한 50%의 유전독성을 보인것 외에 다른 시료들은 그 보다 약한 독성을 보였다.

3) *In vitro* micronucleus assay 를 이용한 유전독성은 재료의 1 차 추출물은 거의 유전독성이 나타나지 않았고 EtOH 추출물의 재분획물인 시료중에서 0.5 mg/ml 의 농도의 hexan 및 chloroform 분획물은 MN의 발생 빈도가 음성대조구에 비하여 약 2배의 증가로 나타났다. 또 뽕나무 줄기의 분획물 시료들에서 0.5 mg/ml 의 hexan, chloroform 및 EtOAc 분획물에서 MN이 관찰 되었으나 그중 chloroform 분획물 시료에서 더 많은 MN 발생을 보였다.

4) Ames test를 이용한 돌연변이 실험결과 뽕나무 잎 1차 추출물들은 0.25 mg/ml의 농도에서 TA98에 대하여 거의 돌연변이 현상이 없었고, EtOH 추출물로부터 재 분획한 BuOH 및 chloroform 분획물에서는 강한 돌연변이 현상이, 또 5 mg/ml 의 hexan 분획물에서는 더욱 강한 돌연변이 현상이 관찰되었다. TA100 strain에 대하여는 각 재료의 1차 추출물이나 분획

들의 낮은 농도 (1.25 mg/ml)에서는 돌연변이 현상이 매우 약하거나 거의 없었고, 0.25 mg/ml의 1차 추출물들에서는 매우 약한 돌연변이가 나타났으나 이들의 EtOAc 분획물은 다소 강한 돌연변이 유발성이 관찰되었다. 그러나 수용성 분획물은 두 균주에 대하여 전혀 돌연변이 유발성을 보이지 않았다.

5) 뽕나무 줄기로부터 조제한 시료중 수용성 분획물과 EtOAc 분획물은 TA98에서 전혀 돌연변이 유발성이 없었으나 0.25 mg/ml의 농도의 물 추출물, EtOH 추출물, hexan 및 chloroform 분획물들이 약 40% 증가한 복귀변이 콜로니가 관찰되었고, 이보다 농도를 증가시킨 물 추출물 및 BuOH 분획물에서도 같은 수준의 복귀변이 콜로니가 관찰된 결과로부터 돌연변이 유발성이 있음이 확인되었다.

TA100에 대하여 뽕나무 줄기의 수용성 분획물은 전혀 돌연변이가 나타나지 않았고, 0.25 mg/ml의 물 추출물, EtOH 추출물, hexan 및 BuOH 분획물들이 약 10% 증가한 약한 돌연변이가 관찰되었다. 그러나 농도를 5 mg/ml로 한 EtOAc 분획물은 26%의 돌연변이 유발성을 보였다.

이상의 결과로부터 뽕나무를 이용한 식품 제품생산을 고려할 때 추출물들의 제조와 선택을 가름하는 자료로서의 활용이 기대되며 앞으로 *in vivo* test 등 더욱 연구할 필요가 있을 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 2003년도 강원대학교 학술연구조성비 (해외파견)와 2004년도 산업기술자원부의 지역협력사업 (한림대 실버생물산업기술연구센터)의 연구비의 지원에 의하여 얻은 결과이므로 이에 감사를 드립니다. 이 연구의 일부는 강원대학교 공동실험실습관 기자재를 이용하여 수행되었음에 대하여 감사를 드립니다.

LITERATURE CITED

- Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD (1973) Carcinogens are mutagen a sample test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 70(8):2281-2285.
- Andrew C, Maria D, Michael F, Martina S, Helena P, Susan D, Laurence F, Mihalix P, Katarina R, Nicholas V (1997) Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation and applications, Environmental and Molecular Mutagenesis, 30:139-146.
- Asano N, Tomioka E, Kizu H, Matsui K (1994) Sugars with nitrogen in the ring isolated from the *Morus bombycis*, Carbohydr. Res, 253, 235-245.
- Basnet P, Kodota S, Terashima S, Shimizu M, Namba T (1993) Two new 2-arylbenzofuran derivatives from hypoglycemic activity-bearing fractions of *Morus insignis*. Chem. Pharm. Bull, 41:1238-1243.
- Catena C, Conti D, Vilani P, Nastasi R, Archilei R, Righi, E (1994) Micronuclei and 3AB index in human and canine lymphocytes after *in vitro* X-irradiation. Mutation Res., 312:1-8.
- Cha JY, Kim HJ, Cho YS (2000) Effects of water-soluble extracts from leaves of *Morus alba L* and *Cudrania tricuspidata* on the lipid peroxidation in Tissues of rats. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 29:531-536.
- Erexson GL, Kligerman AD (1987) A modified mouse peripheral blood lymphocyte culture system for cytogenetic analysis. Environ. Mol. Mutagen., 10:377.
- Fenech M, Morley AA (1985) Measurement of micronuclei in lymphocytes. Mutation Research, 147:29-36.
- Fenech, M (1997) The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. Mutation Research, 392:11-18.
- Fenech M (2000) The *in vitro* micronucleus technique. Mutation Research 455:81-95.
- Jeong CH, Joo OS, Shim KW (2002), Chemical components and Physiological Activities of Young Mulberry(*Morus alba*) Stem. Korean J. of Food Preservation. 9(2):228-233.
- Kim HJ, Cha JY, Choi ML, Cho YS (2000) Antioxidative Activities by water-soluble extracts of *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata*. J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol., 43:148-152.
- Kim SY, Lee WC, Kim AJ, Kim SK (1998) Antihyperlipidemic effects of methanol extracts from Mullberry leaves in cholesterol-induced hyperlipidemia rats. J. Kor. Soc. Food Sci. Nurt., 27: 1217-1222.
- Kim L, O'Neill DW(1996) Analysis of SCGE using laser scanning microscopy., Mutation Res., 319:129-134.
- Lee JS, Choi MH, Jung SH (1995) Blood glucose-lowering effects of *Mori Folium*. Yakhak Hoeji, 39:367-372.
- Lee SJ, Lee MK, Choi GP, Kim NY, Roh SK, Heo MY, Kim JD, Lee HY, Lee JH (2003a) Inhibitory Effect of Korean Mistletoes on the Oxidative DNA Damage. Korean J. Medicinal Crop Sci.: 11(2):89-96.
- Lee SJ, Lee MK, Choi GP, Yu CY, Roh SK, Kim JD, Lee HY, Lee JH (2003b) Growth Enhancement and Cytotoxicity of Korean Mistletoe fractions on Human Cell Lines. Korean J. Medicinal Crop Sci.: 11(1):62-70.
- McCann J, Choi E, Yamasaki E, Ames BN (1975) Detection of carcinogens as mutagens in the salmonella/microsome test Assay of 300 chemicals. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S. 72(12): 5135-5139.
- Narendra PS, Raymond RT, Ralph ES, Edward LS (1991) Microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides, Mutation Res. 252:289-296.
- Papazisis KT, Geromichalos GD, Dimitriadis KA, Kortsaris AH (1997) Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay, J. of Immunological Methods, 208(2):151-158.
- Schmid W (1975) The micronucleus test. Mutation Research, 31: 9-15.
- Singh NP (1996) Microgel Electrophoresis of DNA from individual Cells., Plenum Press, New york.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research. 175:184-191.

Wakata A, Sasaki MS (1987) Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in cultured Chinese hamster cells : comparison with types and rates of chromosome aberrations.

Mutation Res., 190:51-57.

한국식품의약품안전청 (2000), 독성시험 표준작업지침서
배기환 (2000) 한국의 약용식물. 교학사, p. 73.