

# 치암중초약의 돌연변이유발 및 돌연변이유발 억제효과

전남대학교 의과대학 미생물학교실

이 현 철

= Abstract =

## Mutagenicity of Chinese Herbal Anti-cancer Drugs and Their Antimutagenic Activity to Base-pair Substitution Mutagen

Hyun Chul Lee

Department of Microbiology, Chonnam National University Medical School, Kwang Ju 500, Korea

Ten species of herbae, which have been used to treat cancers in Chinese medicine, were tested to investigate their mutagenicity or antimutagenicity in *S. typhimurium* TA97, TA98, TA100, TA1535, and TA1538.

*Scolopendra centipede* was weakly active in reversion of the frameshift mutation in *S. typhimurium* TA97 strain and the base-pair substitution in TA100 and TA1535 strains.

Other herbae such as *Coix lachryma*, *Dianthus superbus*, *Tricanthoshe kirilowii*, *Eupatorium formosanum*, *Lithospermum erythrorhizon*, *Arisaema japonicum*, *Curcuma zedoaria*, *Helicteres angustifolia*, and *Euonymus sieboldianus* did not show any of the mutagenic potential, regardless of the metabolic activation with rat hepatic microsomal fraction.

*Dianthus superbus*, *Eupatorium formosanum*, and *Euonymus sieboldianus* exhibited suppressive activities on microbial mutagenesis of N-methyl-N'-nitrosoguanidine, a base-pair substitution mutagen, in TA1535 and TA100 tester strains. The antimutagenic activities of *Dianthus superbus* and *Euonymus sieboldianus* appeared to be dose-dependant.

**Key Words:** Mutagenicity, Chinese herbal anti-cancer drugs, Ames test.

### 서 론

암은 현대의학의 가장 큰 난제중 하나이며, 이의 정복에 과학기술을 총동원하다시피 하고 있다. 암 원인에 대해서 여러 가지 주장들이 있고, 아직 확실하지 않으나 계환경인자들이 주로 관여한다고 하며<sup>1-3)</sup>, 이들 돌연변이 유발인자들이 인체의 DNA에 손상을 주어 암, 선천성유전질환, 심장질환 및 노쇠등을 일으킨다고 보고되고 있다<sup>4)</sup>.

발암물질들은 거의 대부분이 돌연변이 유발인자이고<sup>5,7)</sup>, 발암성과 돌연변이 유발성 사이에 높은 상관관계가 있다고 밝혀짐에 따라<sup>1,6-8)</sup> 발암물질의 검색을 위해 막대한 비용과 시간이 요하는 동물암시험 대신 돌연변이유발 검색방법을 널리 사용하고 있으며<sup>9-12)</sup>, 이에 따라 오랫동안 이용하여 왔던 모발염색약<sup>1,14)</sup>, 특정식품<sup>15)</sup>, 방부제<sup>16)</sup>, 방충제, 항생

제<sup>17)</sup>, 항암제<sup>18,19)</sup> 등의 상당수가 매년 발암물질목록에 추가되고 있다. 특히 암의 치료를 위해 사용하는 항암제들은 면역을 억제시킬뿐만 아니라, 돌연변이유발능까지 갖고 있는 것이 많아 이차적인 암의 발생빈도를 높인다고 한다<sup>18,19)</sup>. 그러나 한방에서 쓰이고 있는 암치료제에 대해서는 변이유발능유무 및 변이유발억제 여부에 관한 보고는 거의 없다.

본 연구에서는 한방에서 암치료제<sup>20)</sup>로 쓰이고 있는 10종의 치암중초약을 공시하면서 Ames의 Salmonella/microsome mutagenicity test를<sup>6,21,22)</sup> 이용하여, 돌연변이유발능과 변이유발억제 여부를 함께 시험, 관찰하였다.

### 실험재료 및 방법

공시균

실험 표준균주로는 미국 California대학(Berkeley)

**Table 1.** Genotype of the testes strains<sup>a)</sup> used for mutagen testing<sup>b), c), d)</sup>

Histidine mutation			Additional markers		
<i>His</i> O1242 <i>His</i> D6610	<i>His</i> D3052	<i>His</i> G46	LPS <sup>b)</sup>	Repair	R-factor <sup>d)</sup>
	TA1538	TA1535	rfa	△ <i>uvrB</i> <sup>c)</sup>	-
TA97	TA98	TA100	rfa	△ <i>uvrB</i>	+

<sup>a)</sup> All strains were originally derived from *S. typhimurium* LT-2.

<sup>b)</sup> Deep rough character by removing lipopolysaccharide barrier down to the ketodeoxyoctanoate lipid core; increased mutagen penetration.

<sup>c)</sup> Deletion of the ultraviolet-repair B gene.

<sup>d)</sup> Plasmid pKM101(increases error-prone DNA repair).

**Table 2.** Antibacterial activity of test herbae

Drug	Organism															
	TA97				TA1538				TA100				TA1535			
	2*	4	8	16	2	4	8	16	2	4	8	16	2	4	8	16
<i>C. lachryma</i>	+**	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. centipede</i>	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>D. superbus</i>	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+
<i>T. kirilowii</i>	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. formosanum</i>	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>L. erythrorhizon</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>A. japonicum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. zedoaria</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>H. angustifolia</i>	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. sieboldianus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

The experiment was performed by broth dilution method.

\*Dilution of stock solution of drugs.

\*\*+, growth of bacteria; -, no growth of bacteria.

Ames 교수로부터 분양받은 *Salmonella typhimurium*의 변이주인 TA97, TA98, TA100, TA1535 및 TA1538로서 분양 즉시 Ames방법에 따라<sup>a), b), c)</sup> histidine과 biotin 요구성, crystal violet 감수성, 자외선 감수성, spontaneous reversion rate, 그리고 ampicillin 내성 등을 확인하였으며, 각 균주들의 유전자형은 제 1표와 같았다.

#### 배 지

보통배지로는 Difco nutrient broth가 돌연변이 유발성이 있다는 보고<sup>22)</sup>에 따라 이러한 변이유발성이 없다고 알려진 Oxoid nutrient broth No. 2(Oxoid LTD., England)<sup>23)</sup>를 대체 사용하였고, minimal glucose agar(Vogel-Bonner medium E<sup>24)</sup>에 1.5% Difco agar와 2% glucose첨가)와 top agar(0.6% Difco agar와 0.5% NaCl 혼합)를 공시하였는데 이때 top agar는 멸균한 후 사용직전에 top agar 100ml 당 0.5mM L-histidine·HCl-0.5mM D-biotin

10ml를 혼합하였다. 모든 배지의 제조에는 10Mohm 이상의 deionized water(Millipore)를 사용하였다.

#### 약 물

L-histidine·HCl(Wako Pure Chemical)과 D-biotin(Hayashi Chemical)은 top agar제조에 사용하였고, "S-9" 혼합물 제조를 위하여는 polychlorinated biphenyl(Arochlor 1254, Analabs)과 glucose-6-phosphate(Sigma Co.), NADP(Sigma Co.)를 공시하였으며, 돌연변이 유발인자로 N-methyl-N'-nitro-N'-nitrosoguanidine(MNNG, 반정화학)과 4-nitroquinoline-N-oxide(NQO, 반정화학)등 이었는데, MNNG와 NQO는 dimethylsulfoxide(DMSO)에 용해하여 사용하였다.

#### "S-9" 혼합물 제조

Czygan등<sup>25)</sup>의 방법과 같이 실험 5일전 corn oil에 200mg/ml농도로 희석한 Arochlor 1254를 500

**Table 3.** Effect of test herbae on the growth of tester strain, TA1535, on agar plate

Drug	Colony-forming unit
None, control	66
<i>C. lachryma</i>	75
<i>S. centipede</i>	64
<i>D. superbus</i>	58
<i>T. kirilowii</i>	67
<i>E. formosanum</i>	64
<i>L. erythrhizon</i>	49
<i>A. japonicum</i>	71
<i>C. zedoaria</i>	71
<i>H. angustifolia</i>	73
<i>E. sieboldianus</i>	60

Note; 0.1ml of test drug was added to the tube which contained 2ml of semisolid-Oxoid nutrient agar and tester strain, TA1535. Then it was poured on minimal glucose agar plate and incubated overnight. Each value was average of two plates.

mg/kg의 양으로 Sprague Dawley rat의 복강내에 주입하고 Garner등<sup>21)</sup>의 방법에 따라 rat에서 적출된 간을 0.15M KCl용액으로 세척후 무게의 3배로 희석하여 Potter Elvehjem homogenizer로 마쇄한 다음 9,000g로 10분간 원침(8,700rpm in SS-34 head of Sorval RC-5B)하여 상청액을 "S-9 fraction"으로 하였고, 단위 ml당 S-9 fraction(0.1ml), MgCl<sub>2</sub>(8 $\mu$ moles), KCl(33 $\mu$ moles), glucose-6-phosphate(5 $\mu$ moles) 및 NADP(4 $\mu$ moles)와 sodium phosphate(100 $\mu$ moles, pH 7.4)를 각각 혼합하며, "S-9 혼합물"(이하 S-9)로 하였다. 이때 모든 조작은 0°C~4°C에서 시행하였고, 고압증기멸균이 불가능한 실험재료는 membrane filter(Gelman, 0.22 $\mu$ m pore size)로 여과하여 사용하였다.

#### 치중암초약의 처리

암치료제로 알려진<sup>22)</sup> 의이인(*Coix lachryma*), 오공(*Scolopendra centipede*), 구맥근(*Dianthus superbus*), 천화분(*Tricanthoshse kirilowii*), 산택란(*Eupatorium formosanum*), 자초근(*Lithospermum erythrorhizon*), 천남성(*Arisaema japonicum*), 아술(*Curcuma zedoaria*), 산지마(*Helicteres angustifolia*)와 귀전우(*Euonymus sieboldianus*)를 공시하였는데 각 시료 2gm씩을 deionized water에 넣고 끓는 물에서 5시간 동안 가열하고 여과한 후 최종 5ml가 되도록 농축하였고, 고압증기멸균 후 이들을 각 시료의 원액으로 하였다.

#### 시료의 황균작용

각 시료를 시험판 희석법에 의하여 Oxoid nutri-

**Table 4.** Mutagenic activities of herbae on *S. typhimurium* tester strains

Drug	Tester strain			
	TA 97	TA 1538	TA 100	TA 1535
<i>C. lachryma</i>	-*	-	±	±
<i>S. centipede</i>	+	±	+	+
<i>D. superbus</i>	-	-	-	-
<i>T. kirilowii</i>	-	-	-	-
<i>E. formosanum</i>	-	-	-	-
<i>L. erythrorhizon</i>	±	-	-	-
<i>A. japonicum</i>	-	-	±	-
<i>C. zedoaria</i>	-	-	-	-
<i>H. angustifolia</i>	-	-	-	-
<i>E. sieboldianus</i>	±	-	-	-

The assays were performed as described in mutagenesis assays on plates using S-9 mixture.

\*Number of revertant colonies per plate(spontaneous revertants subtracted): ± indicated less than 30; +, 30-300 revertant colonies per plate. Assay plates were incubated for two days at 37°C and then scored.

ent broth로 2배계단 희석한 다음 일주야 배양한 각 표준균액을 일정량씩 접종하고 37°C, 24시간 배양하여 균번식 여부를 판독하였다.

#### 돌연변이 유발시험

Ames 방법<sup>23)</sup>에 따라 45°C용액상태로 유지된 top agar 2ml에 시험표준균액 0.1ml와 검사시료 0.1ml 및 S-9 0.5ml를 차례로 혼합하고 minimal-glucose agar에 증충시킨 후 37°C세균배양기에서 48시간 배양한 다음 histidine revertant 집락수를 산정하여 판정하였다. 동시에 표준변이 유발인자를 이용한 양성대조시험과 시료를 넣지않은 음성대조시험을 함께 실시하였다.

#### Spot 시험

Ames 방법<sup>23)</sup>과 같이 minimal -glucose agar에 각 표준균액 0.1ml와 S-9 0.5ml를 혼합한 top agar를 증충하여 응고시킨 다음 0.01ml의 각 시료를 함유한 disk를 냉동진공건조 후 조심스럽게 놓고 48시간 배양하여 disk 주변의 histidine revertant 집락수를 산정하여 판정하였다.

#### 돌연변이 유발억제시험

돌연변이 유발시험과 같이 실시하면서 각 농도의 시료와 함께 각 농도의 표준변이 유발인자를 함께 투여하여, 시료를 넣지않고 표준변이 유발인자만 투여한 양성대조군과 시료와 변이유발 인자를 모두 투여하지 않은 음성대조군을 상호 비교하여 판정하였다.

**Table 5.** Reversion properties of tester strains by MNNG

Mutagen	Amount spotted	"S-9"*	TA1535	TA100	TA97	TA98	TA1538
MNNG**	10 μg	-	+++***	+++	±	-	-
MNNG	10 μg	+	+++	+++	±	-	±

\*"S-9" mixture: composed of S-9 fraction(0.1ml), glucose-6-phosphate(5μ moles), NADP(4μmoles), KCl(33μmoles), MgCl<sub>2</sub>(8μmoles), and sodium phosphate(100μmoles, pH 7.4).

\*\*Dissolved in dimethylsulfoxide.

\*\*\*Number of revertant colonies in the spot test: ± indicated less than 30; ++, >100; +++, over 500 revertant colonies.

**Table 6.** Effect of test herbae against the mutagenicity of MNNG on *S. typhimurium* tester strains

Drug*	Tester strain	
	TA1535	TA100
MNNG alone**		
10 μg/plate	743±32***	868±47
<i>C. lachryma</i>	772±42	886±53
<i>S. cantipede</i>	868±26	893±58
<i>D. superbis</i>	378±19(431)	347±28
<i>T. kirilowii</i>	762±34	835±46
<i>E. formosanum</i>	133±13(117)	129±27
<i>L. erythrorhizon</i>	627±42	753±51
<i>A. japonicum</i>	772±36	856±54
<i>C. zedoaria</i>	727±35	813±38
<i>H. angustifolia</i>	738±49	832±38
<i>E. sieboldianus</i>	102±13(122)	147±17

\*0.1ml of test drug was added to the tube which contained 2ml of melted top agar, 0.1ml of cultured tester strain, and 10 μg of MNNG without S-9 Mix. In a few seconds, the contents were poured on minimal glucose agar plates and incubated for 48 hours.

\*\*Dissolved in dimethylsulfoxide.

\*\*\*Number of revertant colonies per plate. The results represent mean± standard deviation from four experiments with duplicate plates per each sample. Number of revertant colonies tested with pH-corrected sample to pH 7.0 in parentheses.

### 실험 성적

#### 치암중초약의 항균작용

각 시험균주에 대한 각 시료의 항균실험 결과를 제 2 표에 표시하였다. 의이인, 천남성, 아술, 및 귀전우는 2배 희석액에서도 모든 시험균이 증식하였고, 구맥근과 자초근의 최저억제 희석배수가 8배 이어서 공시 치암중초약중 항균력이 가장 강하였다. 이들이 돌연변이 유발시험 및 돌연변이 유발억

제 시험에서 생균수에 직접 미치는 영향을 관찰하기 위하여 top agar 와 동량의 반고체 nutrient agar 에 각 시료 0.1ml 와 일정량의 TA1535 균액을 혼합하여 minimal glucose agar plate 에 중층배양한 결과 제 3 표에서와 같이 자초근 외에는 거의 생균수에 영향을 미치지 않았다.

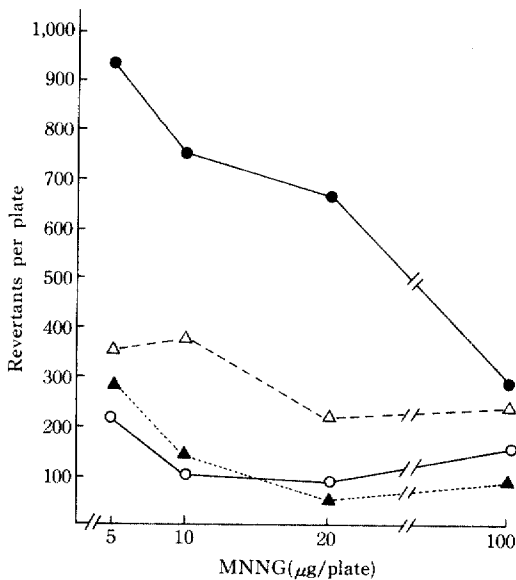
#### 치암중초약의 돌연변이 유발능

Frameshift mutagen 을 검색하는 TA97 과 TA1538, 그리고 염기치환형 변이유발인자를 검색하는 TA100 및 TA1535 변이주들에 대한 각 시료들의 변이유발능유무를 실험하였던 바 오공이 염기치환형 변이유발능과 frameshift 형 변이유발능을 약하게 나타내었고, 그의 시료에서는 돌연변이 유발능이 없었다(제 4 표).

#### 치암중초약이 염기치환형 돌연변이에 미치는 영향

먼저 표준변이유발인자인 MNNG 가 염기치환형 변이유발 인자임을 확인하였다. 즉 염기치환형 변이유발인자를 검색하는 TA1535 및 TA100 균주와 frameshift mutagen 을 검색하는 TA98, TA97, TA1538 균주 각각에 MNNG 10 μg 을 함유한 disk 를 사용하여 spot test 를 시행한 결과 제 5 표에서 보는 바와 같이 MNNG 는 TA1535 와 TA100 에서 현저한 변이유발능을 나타내어 염기치환형 돌연변이 유발인자임을 알 수 있었고, "S-9" 투여 여부가 성적에 영향은 미치지 않음을 미루어 보아 MNNG 가 직접 작용하는 변이유발인자임을 암시하고 있다.

각 시료가 MNNG 의 염기치환형 돌연변이 유발에 미치는 효과는 revertant 집락수로서 조사하였던 바 제 6 표에 표시된 바와 같이 평판당 10 μg 의 MNNG 에 의해서 유발된 histidine revertant 집락수는 구맥근과 산택란 및 귀전우를 첨가한 실험군들에서 대조군에 비해 상당히 감소하였고, 이 감소율은 산택란과 귀전우에서 더욱 현저하였다. 그런데 이 시료들이 약산성이어서 이 산도가 미치는 영향을 배제하기 위해, 중성으로 교정한 후 동일실험



**Fig. 1.** Effect of test herbae on the mutagenicity of MNNG as a function of dose to *Salmonella typhimurium* TA1535 tester strain.

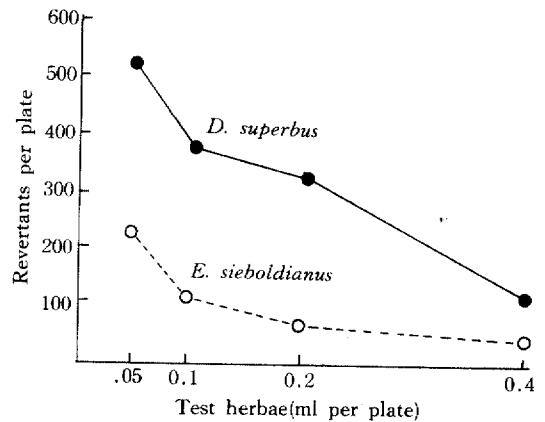
Symbols: Revertant colonies by MNNG on TA 1535, ●-●; MNNG with 0.1ml of *D. superbus*, △-△; MNNG with 0.1ml of *E. formosanum*, ▲-▲; MNNG with 0.1ml of *E. sieboldianus*, ○-○.

을 하였으나, 그 성적은 비슷하였다(제 6표).

MNNG양의 변화에 따른 histidine revertant 집락수의 변화와 이때 변이유발억제 효과가 있는 구맥균, 산택란 및 귀전우가 이에 미치는 영향을 각각 실험하고 그 결과를 제 1 도표에 표시하였다. MNNG로 유발된 변이집락수는 MNNG투여량의 증가에 따라 오히려 감소하였으며, 이들 치암중초약이 변이유발을 억제하는 효과는 MNNG농도 변화에 따라 다양하였고, 특히 100µg MNNG와 각 시료를 함께 투여시 그 대조군을 기준으로 볼 때 변이균집락수의 감소가 적었다. 또 구맥균과 귀전우의 투여량을 각각 변화시키면서 이들이 일정량의 MNNG(10µg/plate)가 돌연변이 유발에 미치는 영향을 관찰하였다. 제 2도표에서 보는 바와 같이 구맥균과 귀전우의 투여량의 증가에 따라 점차 변이균집락의 출현율이 감소하였다.

## 고 찰

돌연변이 유발성과 발암성은 상관관계가 높다고 알려져고<sup>1, 6-8)</sup>, 발암성여부를 검색하는 animal carcinogenicity test가 막대한 비용과 시간을 요하므로<sup>1, 27)</sup> 매년 새로이 합성되는 수 많은 화합물과 생



**Fig. 2.** Effect of test herbae as a function of dose on the mutagenicity of MNNG(10µg per plate) to *Salmonella typhimurium* TA1535 tester strain.

활주변 화합물들을 조사하기는 힘들다. 그러므로 보다 경제적이고 간편한 short-term assay로서 돌연변이 유발검색법을 널리 사용하고 있으며<sup>9-13)</sup>, 이중 Ames 등<sup>5, 9, 20)</sup>에 의해서 개발된 Salmonella/microsome mutagenicity test는 genetic defect에 의해 histidine 합성효소가 결핍된 histidine-requiring mutant가 변이유발인자에 의해 back-mutation되는 것을 이용한 것으로 감수성이 높고 조작이 용이할 뿐 아니라 Arochlor 1254 투여로 제조된 rat liver의 microsome 분획을 이용하여 direct-acting mutagen과 indirect-acting mutagen을 함께 검색할 수 있고 그 기전을 염기치환형 돌연변이와 frameshift형 돌연변이로 구별할 수가 있는 장점이 있다<sup>20, 28, 29)</sup>. 즉 his-G46의 missense mutation으로 된 변이균주인 TA 100과 TA1535는 염기치환형 변이유발인자에 의해 반전되고 his D3052에 frameshift형 변이를 일으키는 TA98 및 TA1538균주와 his D6610에 frameshift형 변이된 TA97균주는 frameshift형 변이유발인자에 의해서 반전된다(제 1 표 참조). 본 방법으로 검색된 변이유발물질중 약 90%가 발암물질로 판명되었고, 비발암물질의 87%가 비변이유발인자로 밝혀졌다<sup>6-8)</sup>.

본 실험에서는 상기 Ames방법에 따라 한방에서 암 치료에 사용하고 있는 치암제들의 돌연변이 유발능과 돌연변이 유발억제능을 시험하므로써 이 약물들의 암치료에 있어서 유전학적 근거의 일면을 추구하기 위하여 시도하였다. 현대의학에서 암의 치료에 외과적수술, 방사선요법 및 면역요법과 함께 사용하는 항암제는 그 종류와 작용기전이 다양하며, 최근 들어 새로운 약품의 개발과 진보된 치료법으로 날로 좋은 결과를 얻고 있으나, 한편 이들은 개체의 면역을 억제시킬 뿐만 아니라<sup>30)</sup>, 이들 상당수에서

돌연변이 유발능을 보이며<sup>6,7)</sup>, 또 동물실험에서 암 발생율을 높인다고 보고되어 있다<sup>16, 19, 21)</sup>. 즉 alkylating agent인 nitrogen mustard<sup>22)</sup>, chlorambucil<sup>19)</sup>, cytoxan<sup>16)</sup> 등은 설치류에서 pulmonary tumor, leukemia, lymphoma 등을 일으키고, antimetabolite인 imuran<sup>16)</sup>, 6-mercaptopurine<sup>23)</sup> 등은 lymphoma를 야기시킨다고 하며, 항생제인 mitomycin C<sup>19)</sup>와 actinomycin D<sup>19)</sup>, adriamycin<sup>16)</sup> 등은 hepatoma, squamous cell carcinoma와 adenocarcinoma를 각각 일으킨다고 보고하였다. 본 실험에서 공시한 10종의 치암중초약중 오공만이 약한 돌연변이 유발능을 나타내었고, 그 외의 약제에서는 전혀 나타나지 않았는데(제 4 표), 이들 한약제들의 작용기전, 구성성분, 치료효과의 통계학적 분석자료들을 수집, 비교할 수는 없지만 관계서적에서 언급한 치료효과를 인정할 때 이들의 치암작용은 직접 또는 간접으로 DNA에 독성을 가하거나 돌연변이를 야기시킨 것에 기인한 것은 아닐 것으로는 추측되었으나 본 실험만으로는 그 원인을 알 수가 없고 다만 한방요법으로 복용되는 이들 약제들이 일부 항암제처럼 강한 돌연변이 유발능이 없다는 점은 다행이었다. 또 오공에서 변이유발능을 갖는 성분이 무엇인지 알 수 없지만 thin-layer chromatography로 이용한 Salmonella assay<sup>44)</sup>를 시도한다면 분리할 수 있을 것으로 추측되었다.

MNNG는 DNA의 화학구조를 변화시킴으로써 돌연변이를 일으키는 alkylating agent의 일종으로서 주로 replication fork에 작용하여 G-C→A-T transition을 잘 일으키며, liver microsomal enzyme에 의한 metabolic activation이 필요하지 않는 direct-acting mutagen으로서 제 5 표에서도 S-9투여에 영향을 받지 않음을 관찰할 수 있었다. 또 TA1535와 TA100 변이균주에서 현저한 변이유발능을 나타낼을 미루어 보아 염기치환형 변이유발인자임을 확인할 수 있었다. 또 제 6 표에서 구맥근, 산택란과 귀전우등이 이 MNNG에 의해 TA100과 TA1535 변이균주로부터 나타나는 histidine revertant 집락수를 상당히 감소시켰는데, 이 감소를 초래할 수 있는 가능성은 공시약물의 시험균에 대한 살균효과로 인한 감소이거나 돌연변이 유발억제 효과로 인한 revertant 수의 감소의 결과일 것으로 사료되나, 제 2 표와 제 3 표의 결과를 참고하면 전자의 가능성은 배제할 수 있을 것 같으며, 따라서 상기 세 약제들이 돌연변이 유발억제효능이 있음을 추측할 수 있을 것이다.

발암물질들의 돌연변이 유발이나 암유발에 억제효과를 나타내는 화합물로는 vitamin A<sup>24)</sup>, vitamin

C<sup>25)</sup>, vitamin E<sup>1)</sup>, chlorophyll<sup>46)</sup>, selenium<sup>41)</sup>, butylated hydroxyanisole<sup>27)</sup>, ethoxyquin<sup>27)</sup>, disulfiram<sup>42)</sup>, benzyl isothiocyanate<sup>33)</sup> 및 cysteamine-HCl<sup>43)</sup> 등 상당수가 보고되고 있고, 이들의 화학구조가 다양하고 natural product가 많으며, 특히 식물의 구성성분에서 많이 검출되는 점으로 보아 그 외에도 더 많은 종류가 있을 것으로 추측하고 있다<sup>27)</sup>.

제 1 그림에서 다량의 MNNG(100 $\mu$ g/plate)를 투여하면 오히려 revertant 집락수가 현저히 감소하였는데, 이는 McCam 등<sup>27)</sup>이 지적한대로 균에 대한 변이유발인자의 독성이 강하여 DNA 손상이 심하면 세균의 성장을 저해하여 revertant 집락수가 오히려 감소하게 되나, 독성기준보다 훨씬 약한 농도에서는 변이유발능이 잘 나타난다고 보고하였는데, plate 당 100 $\mu$ g의 MNNG량은 TA1535 변이균주에 강한 독성을 나타내어 이로 인한 revertant 집락수가 감소되었으리라 추측된다.

Mortelmans 등<sup>44)</sup> 및 MacPhee 등<sup>45)</sup>은 R-인자가 *Salmonella typhimurium*에 전달되면 error-prone DNA repair를 증가시켜, mutagen 검색에 있어서 감수성을 높인다고 하였는데, 제 6 표를 참조하면 TA100으로부터 나타나는 revertant 집락수는 TA1535로부터 나타나는 그것들에 비해 대체로 증가함을 볼 수 있었다.

## · 결 론

*Salmonella typhimurium* 변이균주중 염기치환형 mutagen을 검색하는 TA100, TA1535와 frameshift mutagen을 검색하기 위한 TA97, TA98 및 TA1538 변이균주들을 시험균으로 하고, Arochlor 1254를 투여한 rat liver로부터 제조된 "S-9"를 사용하여, Ames의 *Salmonella*/microsome mutagenicity test에 따라 한방에서 암치료에 쓰이는 10종의 치암중초약을 공시하여 이들의 돌연변이 유발능과 돌연변이 억제효과를 실험, 관찰하였다.

각각 2g씩 deionized water에 넣고 5ml의 수용액으로 가온농축시킨 치암중초약들의 시험균주들에 대한 최저 억제희석배수는 1:8이하이었으며, 자초근을 제외한 모든 시료는 돌연변이 유발시험중생균수의 변화에 영향을 주지 않았다.

오공은 TA97, TA100, TA1535에서 약한 돌연변이 유발능을 나타내었고, 그외의 치암중초약인 의이인, 구맥근, 천화분, 산택란, 자초근, 천남성, 아술, 산지마, 귀전우등은 변이유발 효과가 없었다. 구맥근, 산택란과 귀전우는 염기치환형 돌연변이 유발인자인 N-methyl-N'-nitro-N'-nitrosoguanidine

(MNNG)에 의해 일어나는 TA100과 TA1535 변이 균주의 돌연변이 유발을 상당히 억제하였고, 이는 귀전우와 산택란에서 보다 강하였으며, 구맥근과 귀전우의 돌연변이 유발억제효과는 투여량의 증가에 따라 점차 증가하였다.

#### 참 고 문 헌

- 1) Ames BN: Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science*, **204**:587, 1979.
- 2) Weisburger JH, Cohn LA and Wynder EL: On the etiology and metabolic epidemiology of the main human cancers. In *Origins of Human Cancer*, Hiatt, HH, Watson, JD, eds. pp. 567-602. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1977.
- 3) Higginson J: Importance of environmental factors in cancer. *INSERM*, **52**:15, 1976.
- 4) Burnet FM: Intrinsic mutagenesis: A Genetic Approach to Aging. Medical and Technical Publishing, Lancaster, England, 1974.
- 5) Ames BN, Durston WE, Yamasaki E and Lee FD: Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **70**:2281, 1973.
- 6) McCann J, Choi E, Yamasaki E, and Ames BN: Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **72**:5135, 1975.
- 7) McCann J and Ames BN: Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals: Discussion. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **73**:950, 1976.
- 8) McCann J and Ames BN: The Salmonella/microsome mutagenicity test: Predictive value for animal carcinogenicity. In *Origins of Human Cancer*, Hiatt HH, Watson JD and Winsten JA, eds. pp. 1431-1450. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1977.
- 9) Ames BN, McCann J and Yamasaki E: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Res.*, **31**:347, 1975.
- 10) Conner TH, Meyne J, Molina L and Logator MS: A combined testing protocol approach for mutagenicity testing. *Mutation Res.*, **64**:19, 1979.
- 11) Green MHL and Muriel WJ: Mutagen testing using TRP<sup>+</sup> reversion in *Escherichia coli*. *Mutation Res.*, **38**:3, 1976.
- 12) Davies PJ, Evans WE and Parry JM: Mitotic recombination induced by chemical and physical agents in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Res.*, **29**:301, 1975.
- 13) Schmid W: The micronucleus test. *Mutation Res.*, **31**:9, 1975.
- 14) Ames BN, Kammen HO and Yamasaki E: Hair dyes are mutagenic: Identification of a variety of mutagenic ingredients. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **72**:2423, 1975.
- 15) Park SC, Kim SW and Lee KY: A study on mutagenicity of Korean taste marine foods and mutagenic suppressive activity of ascorbate. *Kor. J. Biochem.*, **12**:45, 1980.
- 16) Ohta T, Moriya M, Kaneda Y, Watanabe K, Miyazawa T, Sugiyama F and Shirasu Y: Mutagenicity screening of food additives in the microbial system. *Mutation Res.*, **77**:21, 1980.
- 17) Mitchel ID, Dixon PA, Gilbert PJ and White DJ: Mutagenicity of antibiotics in microbial assays. *Mutation Res.*, **79**:91, 1980.
- 18) Adamson RH and Sieber SM: Antineoplastic agents as potential carcinogens. In *Origins of Human Cancer*, Hiatt, HH, Watson, JD and Winsten, JA, eds. pp. 429~443. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1977.
- 19) Weisburger JH, Griswold DP, Prejean JD, Casey AE, Wood HB and Weisburger EK: The carcinogenic properties of some of the principal drugs used in clinical cancer chemotherapy. *Cancer Res.*, **52**:1, 1975.
- 20) Ames BN, Lee FD and Durston WE: An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **70**:782, 1973.
- 21) McCann J, Spingarn NE, Kobori J and Ames BN: Detection of carcinogens as mutagens: Bacterial tester strains with R factor plasmids. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **72**:979, 1975.
- 22) Maron D, Katzenellenbogen J and Ames BN:

- Compatibility of organic solvents with the Salmonella microsome test. *Mutation Res.*, **88** : 343, 1981.
- 23) Vogel HJ and Bonner DM: Acetylornithinase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties. *J. Biol. Chem.*, **218**:97, 1956.
  - 24) Czygan P, Greim H, Garro AJ, Hutterer F, Schaffner F, Popper H, Rosenthal P and Cooper DY: Microsomal metabolism of dimethylnitrosamine and the cytochrome P-450 dependency of its activation to a mutagen. *Cancer Res.*, **33** :2983, 1973.
  - 25) Garner RC, Miller EC and Miller JA Liver microsomal metabolism of aflatoxin  $\beta_1$  to a reactive derivative toxic to *Salmonella typhimurium* TA1530. *Cancer Res.*, **32** :2058, 1972.
  - 26) 止淺輯: 治癌中草藥. East Asia Book Agency, Hong Kong, 1975.
  - 27) Saffiotti U: Identifying and defining chemical carcinogens. In *Origins of Human Cancer*, Hiatt HH, Watson JD and Winsten JA eds. pp. 1311-1326. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1977.
  - 28) Levin DE, Yamasaki E and Ames BN: A new *Salmonella* tester strain, TA97, for the detection of frameshift mutagens: A run of cytosines as a mutational hot-spot. *Mutation Res.*, **94** :315, 1982.
  - 29) Ames, BN, Gurney EG, Miller JA and Bartsch H: Carcinogens as frameshift mutagens: Metabolites and derivatives of 2-acetylaminofluorene and other aromatic amine carcinogens. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **69** :3128, 1972.
  - 30) Schein PS and Winokur SH: Immunosuppressive and cytotoxic chemotherapy: Long term complications. *Ann. Intern. Med.*, **82**:84, 1975.
  - 31) Plenn I: Tumor incidence in human allograft recipients. *Transplant. Proc.*, **11** :1047, 1979.
  - 32) Shimkin, MB, Weisburger JH, Weisburger E K, Gubareff N and Suntzeff V: Bioassay of 29 alkylating chemicals by the pulmonary-tumor response in strain A mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **36** :915, 1966.
  - 33) Shimkin MB: Pulmonary-tumor induction in mice with chemical agents used in the clinical management of lymphomas. *Cancer*, **7** : 410, 1954.
  - 34) Krueger GRF, Malmgren RA and Berard C W: Malignant lymphomas and plasmacytosis in mice under prolonged immunosuppression and persistent antigenic stimulation. *Transplantation*, **11** :138, 1971.
  - 35) Doell RG, de V St Cyr C and Grabar P: Immune reactivity prior to development of thymic lymphoma in C57 Bl mice. *Int. J. Cancer*, **2** :103, 1967.
  - 36) Bertazzoli C, Chieli T and Solcia E: Different incidence of breast carcinoma or fibroadenomas in daunomycin or adriamycin treated rats. *Experientia*, **288** :1242, 1973.
  - 37) Wattenberg LW, Lam LKT, Speier JL, Loub WD and Borchert P: Inhibitors of chemical carcinogenesis. In *Origins of Human Cancer*, Hiatt HH, Watson JD and Winsten JA eds. pp. 785-799. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1977.
  - 38) Sporn MB, Dunlop NM, Newton DL and Smith JM: Prevention of epithelial cancer by vitamin A and its synthetic analogs(retinoids). *Fed. Proc.*, **35** :1332, 1976.
  - 39) Guttenplan JB: Inhibition by L-ascorbate of bacterial mutagenesis induced by two N-nitrosocompounds. *Nature(London)*, **268** :368, 1977.
  - 40) Lai CN, Butler MA and Matney TS: Antimutagenic activities of common vegetables and their chlorophyll content. *Mutation Res.* **77** : 245, 1980.
  - 41) Shamberger RJ: Relationship of selenium to cancer. I. Inhibitory effect of selenium on carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.*, **44** : 931, 1970.
  - 42) Wattenberg LW: Inhibition of carcinogenic and toxic effects of polycyclic hydrocarbons by several sulfur-containing compounds. *J.Natl. Cancer Inst.*, **52** :1583, 1974.
  - 43) Marquardt H, Sapozink M and Zedeck M: Inhibition by cysteamine-HCl of oncogenesis induced by 7, 12-dimethylbenz ( $\alpha$ ) anthracene without affecting toxicity. *Cancer Res.*, **34** : 3387, 1974.
  - 44) Bjoerseth A, Eidsa, G, Gether J, Landmark L and Moeller M: Detection of mutagens in complex samples by the *Salmonella* assay applied directly on thinlayer chromatography



plates. *Science*, **215**:87, 1982.

- 45) Mortelmans KE and Stocker BAD: Ultraviolet light protection, enhancement of ultraviolet light mutagenesis, and mutator effect of plasmid R46 in *Salmonella typhimurium*. *J. Bac-*

*teriol.*, **128**:271, 1976.

- 46) MacPhee DG: Effect of a R factor on resistance of *Salmonella typhimurium* to radiation and chemical treatment. *Mutation Res.*, **14**:450, 1972.