

오가피 성분의 항돌연변이원성에 관한 연구

정 규 찬·백 석 환·남 경 수*

영남대학교 약학대학, *동경대학 약학부

(Received November 9, 1987)

Studies on the Antimutagenic Effect of *Acanthopanax sessiliflorum* Components

Kyu Charn Chung, Suk Hwan Baek and Kyung Soo Nam*

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 632, Korea and *University of Tokyo

Abstract—Effects of acanthopanax cortex extracts on glutathion S-transferase (GST), glutathion peroxidase (GSH-px) and superoxide dismutase (SOD) activities related to 7,12-dimethylbenz(a)anthracene(DMBA) metabolism and on DMBA-induced mutagenicity were investigated in this study. From the comparative study of three extracts, it was found that butanol extract was more potent than other extracts in increment of GST, GSH-px and SOD activities and in inhibitory effects of lipoperoxide formation of liver. Also ether and butanol extracts inhibited DMBA-induced mutagenicity, showing 33% to 36% of inhibition at maximum, when ether and butanol extracts were administered to rats *intraperitoneally*.

오갈피나무(*Acanthopanax sessiliflorum*)는 오갈피에 속하는 낙엽관목으로 근 및 수피를 간장 질환, 고혈압 등의 치료목적으로 이용되어져온 약용식물^{1,2)}로 알려져 있다.

본속식물의 연구는 Yook 등³⁾이 *A. sessiliflorum*의 근피에서 lignan 화합물을 분리하였고 Plouvier 등⁴⁾은 잎에서 acanthopanaxoside를 분리동정하였다. 또한 eleuthroside류가 Brekhman⁵⁾에 의해서 항피로작용과 항stress 작용이 있음이 보고된 이래로 단백질 합성 촉진⁶⁾, 간손상 회복⁷⁾ 등을 비롯하여 동물의 life span을 연장시키는 효과가 있다고 하였으며 항산화성 물질의 존재를 보고하였다.

한편, Kensler 등⁸⁾은 노화와 관련된 항산화성 물질에 의해서 GST활성이 증가되어 이로 인해 화학적 발암물질의 대사가 촉진된다고 보고하였다.

이에 저자들은 항산화성과 관련된 항돌연변이원성에 한국산 오가피가 어떠한 영향을 미치는지를 검토할 목적으로 DMBA⁹⁾로 돌연변이원성을 유발하여 DMBA 대사과정에 관여하는 인자인 GST¹⁰⁾ 및 항산화과정에 관여하는 인자인

SOD,¹¹⁾ GSH-px활성¹²⁾과 과산화지질 함량 변동을 상호 비교하였다.

실험 방법

시약—NADPH, NADP⁺, GSH-reductase, glucose-6-phosphate, bovine serum albumin, thiobarbituric acid, butylated hydroxy anisole (BHA)은 Sigma사에서, 7,12-DMBA는 동경화성사에서, GSH은 화광순약사에서 각각 구입하였으며 기타의 시약은 1급 이상의 것을 사용하였다.

시료의 조제—오가피를 조말로 하여 80°C에서 메탄올 추출물을 얻고 여기에 소량의 물을 가하여 수용액으로 한 후 40°C에서 에테르로 추출하여 수층과 에테르층으로 분리하였다. 다시 수층은 n-butanol로 추출하여 수층과 n-butanol층으로 나누어서 이 세 층을 감압, 농축, 건조하여 추출물을 얻었다.

실험동물—본 대학 동물사에서 사육한 20g 내외의 잡종 마우스와 200g내외의 S-D계 웅성 rat를 사용하였다. 마우스를 6군으로 나누어 에테

르 추출물은 2mg/kg, n-butanol 추출물은 80mg/kg, 물 추출물은 200mg/kg을 10일 동안 복강 주사하였으며 DMBA는 도살하기 24시간 전에 1mg/kg을 복강내로 주사하였다. 실험동물의 처치는 24시간 절식시킨 마우스를 단두 도살하여 간장을 적출하였으며 적출한 간 조직 1g당 3배량의 0.25M sucrose 용액을 가해 균질화하였다. 이 균질액을 105,000xg에서 1시간 동안 원심분리하여 cytosol분획을 효소 활성 측정용 시료로 사용하였다. 단백질량은 BSA를 표준용액으로 하여 Lowry등¹³⁾의 방법에 의하여 측정하였다.

GSH-S-transferase활성 측정—Habig등¹⁰⁾의 방법에 준하였다. K.P. buffer 0.1M(pH7.4) 일정량에 기질인 3,4-dichloronitrobenzene 1mM, GSH 5mM 및 효소원액을 가한 다음 25°C에서 10분간 반응시킨 후 10% trichloroacetic acid 용액을 가해 반응을 종료시켰다. 반응 생성물의 농도는 345nm에서 spectrophotometer로 측정하였으며 GSH S-transferase 활성은 1mg의 단백질이 1분당 생성시킨 thioether의 양을 n mole로서 나타내었다.

GSH peroxidase활성 측정—Lawrence등¹²⁾의 방법에 준해 GSH peroxidase활성을 측정하였다. K.P. buffer 50mM (pH7.0) 일정량에 GSH 1mM, NaN₃ 1mM, NADPH 0.2mM, GSH reductase E.U./ml, EDTA 1mM 및 기질인 H₂O₂ 0.25mM과 효소원액을 가해 25°C에서 5분간 반응시킨 다음 340nm에서 흡광도를 측정하였으며 효소활성은 1분간 1mg의 단백질이 산화시키는 NADPH의 양을 n mole로서 나타내었다.

Superoxide dismutase활성 측정—Marklund 등¹⁴⁾의 pyrogallol autooxidation방법에 준해 간장정액 50μl에 K.P. buffer 0.1M (pH7.0) 일정량을 넣어 37°C 수조에서 1분간 preincubation 한 후에 pyrogallol 0.1M을 가하고 혼합하여 420nm에서 흡광도를 측정하였다.

Lipid peroxide함량 측정—Mitsuda방법¹⁵⁾에 준하여 과산화지질 함량을 측정하였다. 마우스의 간을 적출한 다음 5배량의 K.P. buffer 50mM (pH7.0)을 가해 균질화하여 얻은 10% sodium dodecyl sulfate용액을 첨가하고 실온에서 30분간

방치한 다음 HCl 0.1M과 0.375% thiobarbituric acid용액을 가한다. 혼합액을 95°C에서 45분간 수욕중에서 반응시킨 후 냉각하여 n-butanol을 가해 red color의 thiobarbituric acid pigment를 n-butanol층으로 이행하여 532nm에서 흡광도를 측정하였다. 과산화지질 함량은 TBA value로 표시하였다.

Salmonella typhimurium TA 98에 의한 돌연변이원성 검출—Ames등¹⁶⁾의 방법에 준하여 건열 멸균된 cap test tube를 45°C의 항온수조에서 예열한 후 준비된 top agar를 2ml씩 나누어 담고 여기에 시료 0.1ml와 24시간 배양한 균액 0.1ml 및 각 균의 S-9 mixture를 가하여 잘 섞은 후 미리 준비된 Vogel-Bonner citrate medium E 배지¹⁷⁾위에 고루 퍼지게 한다음 48시간동안 배양하였다.

실험결과 및 고찰

GSH S-transferase활성에 미치는 영향—오가피 각 추출물을 마우스에 투여한 후 간 세포질에 존재하는 GST활성에 어떤 영향을 미치는지를 알아보았다. DMBA 투여로 간 GST활성은 대조군에 비해 8.3% 감소하였으나 butanol 추출물을 투여한 군에서 대조군 수준으로 회복되었다(Table I).

GSH peroxidase활성에 미치는 영향—오가피

Table I—Effect of Acanthopanax cortex extracts on liver GSH S-transferase activities in DMBA treated mouse.

treatments	Enzyme activities (nmole/min./mg protein)	Increase (%)
Control*	512.57±30.10*	—
DMBA	473.40±50.43	—
Ether ext.+DMBA	502.12±58.80	6.1
BuOH ext.+DMBA	522.11± 8.01	10.3
Water ext.+DMBA	478.50±41.78	1.1
0.5% BHA+DMBA	777.85±85.01	64.3

a Control animals were injected with 0.9% NaCl solution.

The assay procedure was described in the text.

* The values are mean±S.D. of three experiments

Table II—Effect of *Acanthopanax* cortex extracts on hepatic cytosolic GSH peroxidase activities in DMBA treated mouse.

Treatments	Enzyme activities (nmole/min./mg protein)	Increase (%)
Control	204.40±31.61	—
DMBA	185.75±25.00	—
Ether ext.+DMBA	198.47±16.30	6.8
BuOH ext.+DMBA	212.38±15.27	14.3
Water ext.+DMBA	184.98±18.54	-0.4
0.5% BHA+DMBA	270.93±19.74	45.9

The assay procedure was described in the text. The other conditions are the same as described in Table II.

Table III—Effect of *Acthopanax* cortex extracts on hepatic cytosolic superoxide dismutase activities in DMBA injected mouse.

Treatments	Enzyme activities (×10 ³) (50μl of 10% liver homogenate)	Inhibition/Control (%)
Control	18.84±1.11	—
DMBA	21.02±0.26	—
Ether ext.+DMBA	19.89±1.96	5.4
BuOH ext.+DMBA	18.48±0.52	12.1
Water ext.+DMBA	20.01±1.50	4.4
0.5% BHA+DMBA	14.98±1.55	28.8

The assay procedure was described in the text.

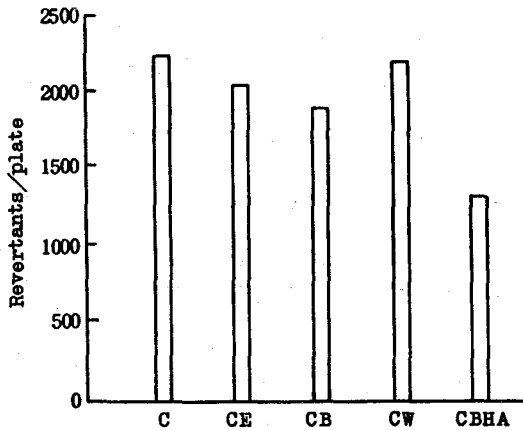


Fig. 1—Effect of *Acanthopanax* cortex extracts on DMBA mutagenicity.

The values are mean of 3 separate experiments.

C: DMBA, CE: DMBA and ether extract, CB: DMBA and butanol extract, CW: DMBA and water extract, CBHA: DMBA and BHA

추출물이 GSH-px활성에 미치는 영향은 에테르 추출물을 투여한 군에서는 DMBA투여군보다 6.8% 증가하였지만 유의성은 없었으며 butanol 추출물에서는 14.3% 그리고 BHA에서는 45.9% 증가하였다(Table II).

Superoxide dismutase활성에 미치는 영향—DMBA를 투여한 군에서는 대조군에 비해 11.7%의 SOD활성이 감소한 반면에 butanol 추출물을 투여한 군에서는 12.1% 증가하였다(Table III).

과산화지질 생성에 미치는 영향—실험동물에

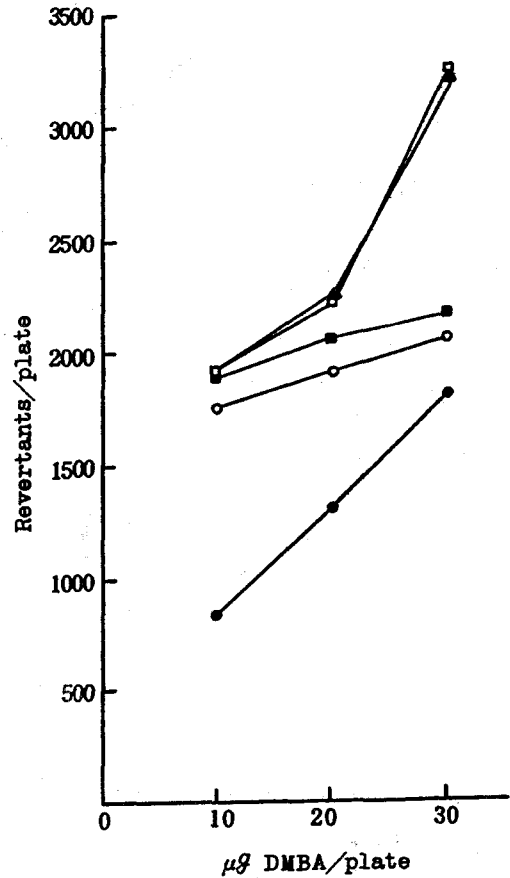


Fig. 2—Inhibition of DMBA mutagenicity by *Acanthopanax* cortex extracts.

DMBA and S-9 mixture were incorporated into the top agar with *S. typhimurium* strain TA 98.

Histidine revertants were scored after 48hr. of incubation.

▲: Control, ■: Ether extract, ○: BuOH extract, □: Water extract, ●: 0.5% BHA

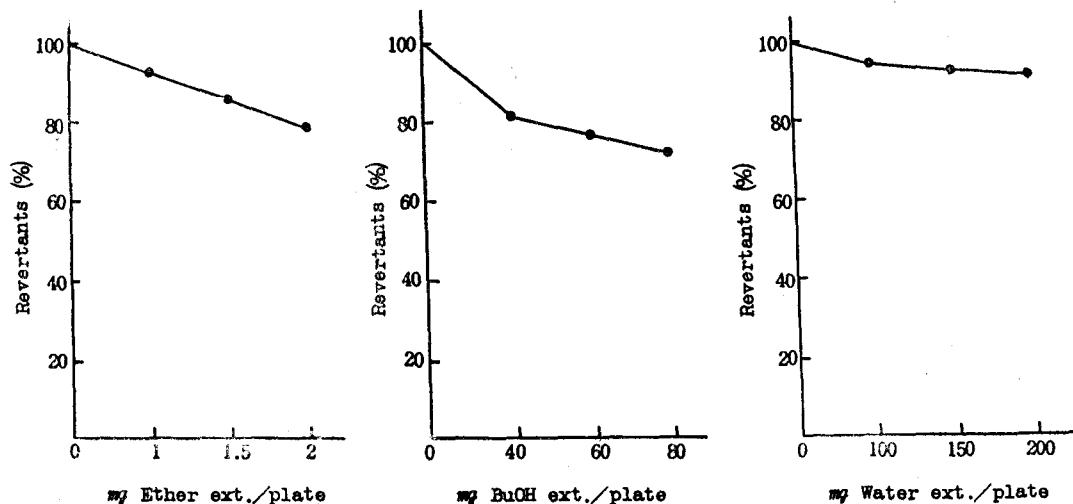


Fig. 3—Effects of *Acanthopanax cortex* extracts on DMBA mutagenicity. *Acanthopanax cortex* extracts, 20 μ g DMBA/plate and S-9 mixture were incorporated into top agar with *S. typhimurium* TA 98. Histidine revertants were scored after 48hr. of incubation. Percent of control was calculated by assuming that the number of revertants on plates containing no *Acanthopanax cortex* extracts and 20 μ g DMBA equaled 100.

Table IV—Inhibitory effect of *Acanthopanax cortex* extracts on DMBA induced lipid peroxidation in mouse.

Treatments (A532/gram, wet weight of liver)	TBA value	Inhibition ratio (%)
Control	34.33 \pm 3.10	—
DMBA	41.96 \pm 2.45	—
Ether ext.+DMBA	35.44 \pm 5.42	15.8
BuOH ext.+DMBA	34.50 \pm 0.96	17.8
Water ext.+DMBA	41.66 \pm 4.81	0.7
0.5% BHA+DMBA	26.20 \pm 1.47	37.6

The assay procedure was described in the text.

DMBA를 복강내 주사하여 유발되는 과산화지질 생성에 오가피 추출물이 어떠한 영향을 미치는지를 알아본 결과 에테르 추출물과 butanol 추출물을 각각 투여한 군에서 15.5%, 17.8%의 과산화지질 생성을 억제하였다(Table IV).

오가피 추출물이 DMBA의 돌연변이원성에 미치는 영향—오가피 추출물이 DMBA의 돌연변이원성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 Ames test를 행하였다. DMBA 농도를 plate

당 20 μ g으로 하여 대조군과 비교하였을때 butanol 투여군은 약 15.2%의 revertant수가 감소되었다(Fig. 1). 또한 DMBA의 농도 변화에 따른 revertant수에서는 butanol 추출물을 투여한 군에서 DMBA 농도가 plate당 20 μ g일때 15.2%, 30 μ g일때 36.1%까지 DMBA의 돌연변이가 억제되었다(Fig. 2).

한편, 시험관내에서 오가피 추출물의 농도 변화에 따른 DMBA의 돌연변이원성에 미치는 영향을 검토하였다. 에테르 추출물(1mg~2mg/plate), butanol 추출물(40mg~80mg/plate)의 농도를 변화시켰으며 대조군은 오가피 추출물을 첨가하지 않고 DMBA (20 μ g/plate)만 첨가했을 때 나타나는 revertant수를 100%로 환산하여 나타냈다. 대조군에 비해 butanol 추출물 농도가 plate당 40mg, 60mg, 80mg일때 각각 18.1%, 23.3%, 27.8%의 revertant수의 감소를 보였다(Fig. 3).

고찰

오가피 각 추출물을 실험동물에 투여하였을때

DMBA에 의해 억제되었던 GSH S-transferase와 GSH peroxidase 및 Superoxide dismutase의 활성이 butanol 추출물을 주사함으로써 대조군 수준으로 회복됨을 관찰할 수가 있었으며 과산화 지질의 생성도 대조군 수준으로 억제되었다.

DMBA는 그 자체가 돌연변이원성이거나 발암물질로 작용하는 것이 아니고 체내에서 대사되어 활성화 형태인 친전자 화합물로 전환되어 이것이 세포내 거대분자의 친핵부위에 공유결합하여 돌연변이 또는 암을 유발시키는 것⁹⁾으로 알려져 있다.

한편, 화학물질이 약물대사체를 통하여 산화되는 동안 발생하게 되는 superoxide anion radical (O_2^-)은 superoxide dismutase 및 GSH peroxidase에 의해 무독한 물질로 전환¹⁸⁾되지만 이 효소들의 활성이 억제되었을 경우에는 superoxide anion radical 및 hydroxy radical들이 세포막손상¹⁹⁾을 일으키는 원인이 되거나 노화²⁰⁾를 촉진시킨다고 알려져 있다.

이러한 점을 고려해 볼 때 오가피의 butanol 추출물중에 함유된 어떤 성분이 해독과정에 관여하는 효소의 활성을 증가시켜 줌으로서 생체를 독성물질로부터 보호해 줄 것으로 생각되어진다.

DMBA로 유발시킨 돌연변이원성에 대한 오가피 추출물의 영향을 검토하였을 때 유의성있게 돌연변이원성을 억제시켰으며 그 중에서 특히 butanol 추출물을 첨가한 실험에서 현저한 revertants수의 감소를 관찰할 수 있었다. 이와같은 성적은 오가피 추출물의 투여로 해독 효소들의 활성이 증가된 결과와 상호 비교 검토하였을 때 매우 흥미있는 것으로서 본 실험에서 오가피 추출물에 의한 *Salmonella typhimurium*의 돌연변이원성 억제는 DMBA의 대사과정에 관여하는 효소 활성 증가와 연관되어질 것으로 사료되어진다.

결 론

오가피 각 추출물을 실험동물에 투여하였을 때 DMBA에 의해 억제되었던 GSH S-transferase

와 GSH peroxidase 및 superoxide dismutase의 활성이 butanol 추출물을 주사한 군에서 대조군 수준으로 회복되었으며 과산화지질의 생성도 대조군 수준으로 억제되었다. 또한 DMBA로 유발시킨 돌연변이원성에 대한 영향을 검토하였을 때 butanol 추출물을 첨가한 실험에서 현저한 revertants수의 감소를 관찰할 수 있었다.

문 헌

- 1) 허 준, 동의보감 3, 740, 풍년사(1951).
- 2) 金在成, 原色天然物大事典(上), 260, 南山堂(1984).
- 3) Yook, C.S., Lee, D.H., Seo, Y.K. and Yu, K.S., *Kor. J. Pharmacogn.* 8, 31 (1977).
- 4) Plouvier, V. et al., *Acad. Sc. Paris ser. D* 264, 2835 (1971).
- 5) Brekhman, I.I. and Dardymov, I.V., *Lloydia* 32, 46 (1969).
- 6) Ro H.S. and Han B.H., 약학회지 21, 81 (1977).
- 7) 한덕룡의 「인삼과 오가피식물의 약리비교」(1977).
- 8) Kensler, T.W., Enger, P.A., Trush, M.A. and Mello, C.J., Groopman J.D.: Modification of aflatoxin B₁ binding to DNA by antioxidants. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 25, 129 (1984).
- 9) Weisburger, E.K., Mechanisms of chemical carcinogenesis. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 18, 395 (1978).
- 10) Habig, W.H., Pabst, M.T. and Jakoby, W.B., The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130 (1974).
- 11) Weisburger, R.A. and Fridovich, I., Superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 248, 3582 (1973).
- 12) Lawrence, R.A. and Burk, R.F., Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 952 (1976).
- 13) Lowry, O.H. and Rosebrough, W.J., Farr, A.L., Randall, R.J., Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 21, 965 (1949).
- 14) Marklund, S. and Marklund, G., *Eur J. Biochem.* 47, 469 (1974).
- 15) Mitsuda, H., Yasumoto, K., *J. Japan. Soc. Food and Nutrition* 19, 60 (1966).
- 16) Macann, J., Choi, E., Yamasaki, E. and Ames,

- B.N., Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 5135 (1975).
- 17) Vogel, J.K. and Bonner, D.M., Acetyl ornithinase of *E. coli*: Partial purification and some properties. *J. Biol. Chem.* **218**, 97 (1956).
- 18) Benson, A.M., Batzinger, R.P., Ou, S.Y.L., Bueeding, E., Cha, Y.N. and Talacay, P., Elevation of hepatic glutathione S-transferase activities and protection against mutagenic metabolites of benzo(a)pyrene by dietary antioxidants. *Cancer Res.* **25**, 4486 (1978).
- 19) Kappus, H., Overview of enzyme systems involved in bioreduction of drugs and in redox cycling. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 1 (1986).
- 20) Fridovich, I., The biology of oxygen radicals. *Science* **201**, 875 (1978). Yost, F.J. and Fridovich, I., Superoxide and hydrogen peroxide in oxygen damage. *Arch. Biochem. Biophys.* **175**, 514 (1976).
- 21) Kikugawa, K. Age pigment: Relationship between lipid peroxidation and formation of fluorescent pigments. *Eisei Kagaku* **30**, 333 (1984).