

## 별불가사리의 항돌연변이 활성

함정혜 · 한영환 · 박창훈\* · 이동웅\*\*

동국대학교 생물학과, \*동국대학교 생화학과

(Received May 24, 1999)

### Antimutagenic Activity of *Asterina pectinifera*

Jung Hye Ham, Yeong Hwan Han, Chang Hun Park\* and Dong Ung Lee\*\*

Department of Biology and

\*Department of Biochemistry, Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea

**Abstract** — The antimutagenic activities of the total extract and several fractions of starfish, *Asterina pectinifera* (Asteriidae), were investigated *in vitro* by SOS chromotest with *Escherichia coli* PQ37 and Ames test with *Salmonella typhimurium* TA100. When various fractions was tested, the chloroform and butanol fractions showed low induction factors, which means both fractions increased antigenotoxicity against the base substitution mutagen MNNG. Even though higher antigenotoxic effect of the chloroform fraction, no effective result of Ames test was found in revertant formation of *S. typhimurium* TA100. The most effective antigenotoxic and antimutagenic fraction was a butanol one: i.e., When 0.5 mg/tube of butanol fraction was applied, the induction factor was 0.68. As the concentration of the fraction was increased, an induction factor was significantly reduced to 0.47. The 2.5 mg/tube of the fraction potently inhibited the formation of revertants of *S. typhimurium* TA100 by about 81%. There was no cytotoxic effect of butanol fraction against *S. typhimurium* TA100. This result might be useful for further study to search a possible anticancer agent from the starfish, *Asterina pectinifera*.

**Keywords** □ *Asterina pectinifera*, antimutagenic activity, SOS chromotest, ames test.

최근 천연물의 항돌연변이 활성에 대한 관심이 증가하면서 이에 관한 연구가 많이 보고되고 있다. 이 가운데 식용식물의 항변이활성<sup>1-4)</sup> 및 약용식물의 항변이활성<sup>5-7)</sup>에 관한 연구가 주로 이들의 추출물을 대상으로 검토되었으며 돌연변이 억제 성분으로는 flavonoid<sup>8-11)</sup>에 대한 연구가 대부분을 차지하고 있으나 기타 성분<sup>12)</sup>에 관한 보고도 있다. 발암과 돌연변이는 서로 밀접한 상관관계가 있는데 현재까지 알려진 발암물질의 85% 이상은 돌연변이원이며 비발암성물질의 경우에도 10% 이상이 돌연변이원으로 작용한다는 연구 결과도 있다.<sup>12)</sup> 지금까지 천연물로부터 항돌연변이 활성을 검색하기 위하여 개발된 여러 가지 방법중에서

Ames test<sup>13,14)</sup>가 가장 많이 사용되어 왔으며 항돌연변이 활성을 보다 정확히 측정하기 위하여 최근에는 SOS chromotest<sup>15)</sup>도 병행하여 사용되고 있다.

별불가사리(*Asterina pectinifera* Müller et Tro-schel, Asteriidae)는 극피동물에 속하는 특이한 무척추 해양천연물이며 그 활성성분으로서 steroid saponin<sup>16-18)</sup>과 sapogenin<sup>19,20)</sup>등이 분리되고 이들의 세포독성이 보고되었다. 그리고 최근에는 별불가사리의 락틴성분이 암세포 성장저해효과가 있음이 보고된 바 있다.<sup>21)</sup> 즉, 불가사리류의 항암활성에 대한 지금까지의 연구는 세포 독성 등 암세포 자체에 대한 억제활성을 본 것이다. 그러나 암이 돌연변이에 의하여 발생한다는 사실을 고려하여 정상세포가 돌연변이에 의해 암세포로 성장하는 과정을 차단하는 항돌연변이활성 시험법이 항암제 개발등에 적극 활용되어야 할 것이다.

# 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 0561-770-2224 (팩스) 0561-742-9833

이 연구에서는 현재 전혀 활용이 되지 않고 오히려 어장에 피해를 주는 것으로 취급받고 있는 별불가사리에서 Ames test와 SOS chromotest를 병행한 시험법을 사용하여 항돌연변이 활성을 가진 유용한 물질을 탐색함으로써 불가사리류의 응용 가능성을 탐색하고자 하였다.

### 실험방법

**실험재료** - 별불가사리(starfish; *Asterina pectinifera* Müller et Troschel, Asteroidea)는 동해안 갑포일대에서 살아있는 상태로 채집하여 즉시 실험에 사용하였다.

**시험균주** - 항돌연변이 실험에 사용된 시험균주는 *Salmonella typhimurium* TA100(*hisG46 rfa-uvrB*)으로 한국과학기술연구원 생명공학연구소 유전자은행으로부터 분양받아 사용하였다. SOS chromotest를 위하여 *Escherichia coli* PQ37(*sfIA::Mud(Ap lac)cts lac ΔU169 mal<sup>+</sup>, uvrA, galE galY, PhoC, rfa*)을 사용하였다.

**돌연변이유발물질/발암물질** - 돌연변이 유발물질로 사용한 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)는 Fluka사로부터 구입하여 증류수에 녹여 사용하였다.

**HPLC 분석조건** - 기기는 LC-10AD(Shimadzu)를 이용하였으며 Eclipse XDB-C18 (4.6×250, 5 μ) column을 사용하여 1.0 ml/min의 속도로 전개용매(물-acetonitrile, gradient)를 유출시키면서 UV 210 nm에서 검출하였다.

**활성분획의 제조 및 성분예지시험** - 먼저 마쇄한 별불가사리 300 g에 methanol 500 ml를 가하고 85~90 °C에서 가온하면서 2시간 추출한 다음, 여과하고 여액 중의 용매를 제거하여 총추출물을 제조하였다. 이 총추출물로부터 활성분획의 제조는 일반적인 분획제조방법에 따라 비극성용매에서 극성을 증가시키면서 순차 추출하였다. 즉, 수층에 소량의 물을 더 가하고 hexane, chloroform, butanol순서로 추출하여 각 용매 분획을 제조하였다. 용매별 수득량은 methanol 추출물 48.2 g, hexane 분획 7.6 g, chloroform분획 11.8 g, butanol분획 5.3 g 이었다.

**SOS chromotest에 의한 항돌연변이 활성 검색** - SOS chromotest는 Quillardet 등의 방법<sup>15)</sup>을 변형하여 수행하였다. 전 배양된 1.0 ml의 *E. coli* PQ37을

100 ml의 L medium에 접종하여 37°C에서 4시간 동안 진탕배양하였다(O.D.=0.8). 이 배양액 600 μl, 돌연변이원 30 μl, 각 fraction별로 준비된 시료 10 μl를 시험관에 넣어 SOS반응을 유도하였다. 37°C에서 2시간 동안 정치한 후, β-galactosidase와 alkaline phosphatase 효소 활성을 측정하였다. β-Galactosidase 효소 활성은 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, β-mercaptoethanol 2.7 ml, 증류수 1,000 ml, pH 7.0)을 넣어 37°C에서 5분간 정치하여 온도를 균일화시킨 다음, 0.6 ml의 o-nitrophenyl-β-galactoside 용액(ONPG 4.0 mg/ml in phosphate buffer(pH 7.0))을 첨가하여 10분간 발색반응을 유지하였다. 2.0 ml의 1.0 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>용액 첨가하여 반응을 정지시킨 후, 420 nm에서의 흡광도를 측정하였다. Alkaline phosphatase 효소활성은 B 완충액 대신에 P 완충액(조성: Tris·base 121 g, SDS 1.0 g, 증류수 1,000 ml, pH 8.8)을, ONPG용액 대신에 p-nitrophenyl phosphate 용액(PNPP 4.0 mg/ml)을 사용한 것 외에는 β-galactosidase 측정과 동일하게 수행하였다. 효소반응의 정지를 위하여 1.0 ml의 2.5M HCl를 첨가한 후 5분 반응을 정치하고, 1.0 ml의 2.0M Tris-HCl buffer를 첨가하였다. 각 효소의 활성은 「1000×A<sub>420</sub>/t」의 식을 사용하여 측정하였다. A<sub>420</sub>은 420 nm에서의 흡광도를, t는 반응시간(분)을 나타낸다. 효소활성비율(R)은 β-galactosidase 효소활성을 alkaline phosphatase 효소활성으로 나누어 계산하였으며, induction factor는 분획물이 첨가된 효소활성비율을 분획물이 첨가되지 않은 효소활성비율로 나누어 계산하였다.

**Ames test에 의한 항돌연변이 활성 검색** - Maron과 Ames의 방법<sup>14)</sup>을 변형하여 사용하였다. 24시간 전 배양된 *S. typhimurium* TA100 1.0 ml을 100 ml의 L medium에 접종하였다. 37°C에서 4시간 진탕배양한 후, 1/10로 희석하여 사용하였다. 멸균된 cap tube에 100 μl의 희석균주, 520 μl의 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4), 10 μl의 불가사리 분획 추출물, 10 μl의 MNNG 용액(1.0 mg)을 혼합하여 vortex한 후, 37°C에서 30분간 정치하였다. 45°C의 2.0 ml top agar와 0.2 ml의 trace histidine-biotin solution을 첨가하여 3초간 vortex한 후, 미리 제조된 20 ml의 minimal glucose agar plate 위에 골고루 도말하고 37°C에서 48시간 배양하였다. 한천평판배지(plate)당 복귀콜로니

**Table I** – Antimutagenicity of the fractions extracted from starfish *Asterina pectinifera*

Fraction	Enzyme activity (Unit)		R	Induction factor
	$\beta$ -galactosidase	Alkaline phosphatase		
Spontaneous	33.9 $\pm$ 1.9	18.3 $\pm$ 1.0	–	–
MNNG (control)	63.3 $\pm$ 0.2	18.4 $\pm$ 2.1	3.44	1.00
MeOH	56.5 $\pm$ 6.9	16.5 $\pm$ 0.9	3.42	0.99
BuOH	49.7 $\pm$ 4.6	21.3 $\pm$ 0.8	2.33	0.68
Chloroform	19.1 $\pm$ 0.5	17.3 $\pm$ 0.9	1.10	0.32
Hexane	62.8 $\pm$ 1.8	16.9 $\pm$ 0.6	3.71	1.08

수(revertant CFU/plate)를 측정하여 항돌연이원의 활성을 측정하였다. 분획첨가물에 의한 복귀변이억제율은 다음의 식에 의하여 계산하였다. 복귀변이억제율(%) =  $[1 - (\text{CFUsm} - \text{CFUsp}) / (\text{CFUmt} - \text{CFUsp})] \times 100$  (CFUsm; 돌연변이원과 분획 첨가시의 복귀변이 CFU, CFUmt; 돌연변이원 첨가시의 복귀변이 CFU, CFUsp; 자발적 복귀변이 CFU). Butanol fraction의 *S. typhimurium* TA100에 대한 세포독성(cytotoxicity)의 측정을 위하여, LB배지(tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g, D.W. 1 l)에 4시간동안 전배양한 *S. typhimurium* TA100을  $10^{-4}$ 배로 희석하였다. 희석 세균액 100  $\mu$ l를 농도별로 butanol fraction이 첨가된 LB한천배지(0~2.5 mg/tube) 위에 도말한 후 24시간 동안 배양하였다.

**실험결과 및 고찰**

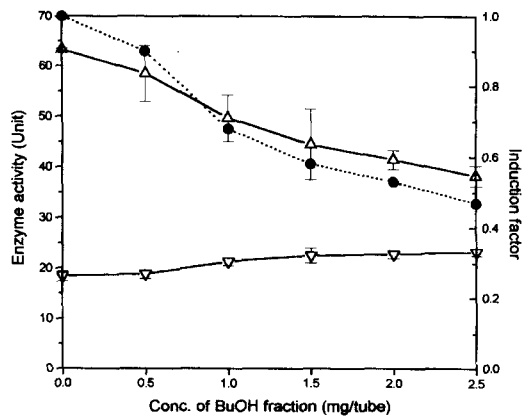
지금까지 불가사리의 항암활성에 대한 연구<sup>17-19)</sup>에서는 MTT(3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay법으로 *in vitro*에서 암세포에 대한 직접적인 세포독성을 관찰하였으며 정등<sup>21)</sup>은 별불가사리로부터 일반적으로 당과 결합하여 세포를 응집시키는 물질로 알려진 렉틴을 분리하여 3종의 암세포에 대한 세포응집효과를 관찰한 결과, 이 물질이 암세포를 응집시키는 암세포 성장저해 효과가 있음을 보고한 바 있다. 이 연구에서는 별불가사리의 항암활성에 대한 지금까지의 연구방법과는 달리 정상세포가 변이를 일으켜 암세포화되는 과정을 저해하는 항돌연변이 활성을 시험하였다. 먼저 조추출물에 항돌연변이 활성이 있음을 확인한 다음, 유효성분을 추적하기 위하여 여러 가지의 성분분획을 제조하여 이들의 활성을 비교, 검토하였다.

SOS chromotest 방법을 이용한 별불가사리의 성분분획에 대한 항돌연변이 효과는 chloroform분획과 butanol

분획에서 우수하였으나, methanol분획과 hexane분획에서는 없거나 매우 미흡한 정도이었다(Table I).

항돌연변이 효과가 가장 우수한 것으로 나타난 chloroform분획의 경우, 분획시료의 첨가에 따르는 흡광도의 저하로 항돌연변이 효과를 판명하는데에 문제점이 있었다. Table I의 결과를 근거로 butanol분획 및 chloroform분획의 항돌연변이 영향을 판명하기 위하여, 각 분획을 농도별로 첨가하여 induction factor를 지표로 항돌연변이 효과를 검정하였다. 그 결과, butanol분획의 농도를 증가시킴에 따라 induction factor는 감소한 것으로 나타났다(Fig. 1).

즉, 항돌연변이의 결과로 나타나는  $\beta$ -galactosidase의 효소활성은 감소하고 alkaline phosphatase 효소활성은 일정하게 나타나 butanol분획의 항돌연변이 효과는 우수하다고 판정되었다. 그러나 chloroform분획을 농도별로 첨가하였을 때는 induction factor는 낮게 나타났다으며 일정한 정도의 수치를 보여주었다(Fig. 2).



**Fig. 1** – Antimutagenic activity of the butanol fraction of starfish *Asterina pectinifera*. Values are mean  $\pm$  S.D. (n=3). - ● -: Induction factor. -  $\Delta$  -: Activity of  $\beta$ -galactosidase. -  $\nabla$  -: Activity of alkaline phosphatase.

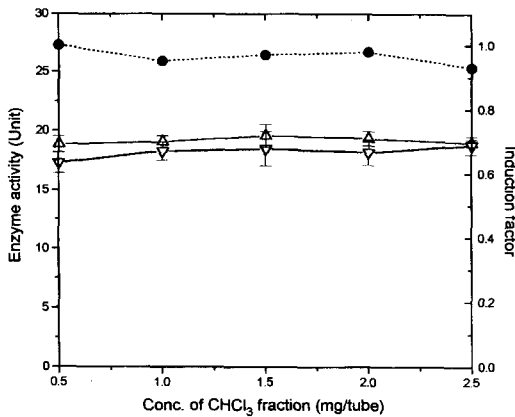


Fig. 2 - Antimutagenic activity of the chloroform fraction of starfish *Asterina pectinifera*. Values are mean ± S.D. (n=3). ● -: Induction factor. △ -: Activity of β-galactosidase. ▽ -: Activity of alkaline phosphatase.

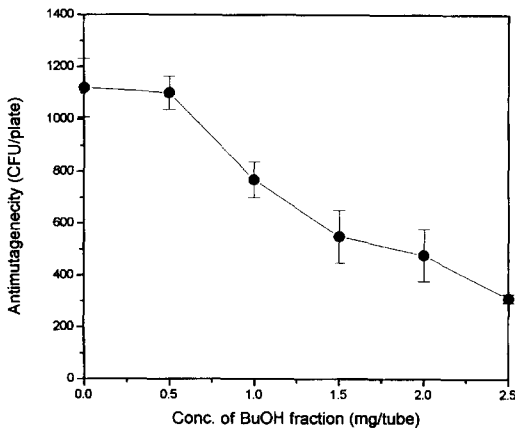


Fig. 3 - Inhibitory effect of the butanol fraction of starfish *Asterina pectinifera* on the formation of revertants of *S. typhimurium* TA100. Values are mean ± S.D. (n=3).

즉, β-galactosidase 및 alkaline phosphatase 효소의 활성도에 미치는 영향이 없거나 적은 것으로 보아 chloroform분획의 항돌연변이 효과는 미흡한 것으로 분석되었다.

다음으로 *S. typhimurium* TA100 균주의 복귀변이주(revertants) 형성에 butanol분획과 chloroform분획이 어떠한 영향을 미치는가를 확인하기 위하여 Ames test를 실시하였다. 분획의 첨가 농도별 SOS chromotest에서 chloroform분획은 항돌연변이 효과가 없음이 입증되었으나, 0.5 mg/tube 이하의 농도에서 induction factor가 감소할 수 있을 가능성도 배제할 수 없어 이 분획에 대한 Ames test를 추가로 실시하였다.

그 결과, chloroform분획의 복귀변이주에 대한 영향은 없는 것으로 관찰되었다. Butanol분획의 경우에는 농도별로 Ames test를 실시한 결과, 복귀변이주의 CFU/plate 수치는 감소하였다(Fig. 3). 즉, plate 당 2.5 mg의 butanol분획을 첨가하였을 때, 약 81%의 복귀주 형성 억제효과를 보여주었다. 이러한 결과는 butanol분획이 SOS chromotest에서와 같이 뚜렷한 항돌연변이 효과가 있음을 입증하는 결과이다. *S. typhimurium* TA100 균주에 대해 butanol 분획이 세포독성(cytotoxic)을 유발하여 생육을 억제하였는지에 대해 실험하였다. Butanol 분획 첨가시 대조군에 비하여 형성된 colony 수는 실험한 전범위의 농도에서 약간 증가함(평균, 3,859±109.9 CFU/plate)을 보여 주어 butanol 분획이 *S. typhimurium* TA100 균주에 대해 어떠한 정도의 세포독성도 나타나지 않음을 알 수 있었다.

### 감사의 말씀

이 연구는 1997년도 교육부 기초과학연구소 학술연구조성비(BSRI-97-3445)에 의해 수행되었기에 이에 감사드립니다. 아울러 *E. coli* PQ37을 분양하여 준 부산대학교 식품영양학과 박건영교수에게 감사드립니다.

### 문헌

- 1) 서정숙, 이용옥, 서난주, 장일무 : 식용식물의 항변이원성에 관한 연구. 생약학회지 **21**, 88 (1990).
- 2) 이성, 권동진, 유진영, 정동효 : 쑥 추출물의 항돌연변이 활성효과. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 105 (1996).
- 3) 김석중, 진재순, 김동만, 김길환 : 무릅의 돌연변이 억제 효과 및 그 특성. 한국식품과학회지 **24**, 193 (1992).
- 4) 함승시, 최근표, 최운순, 이상영 : 메틸 flavonoids의 항돌연변이원성 및 지질대사 조절기능에 관한 연구. 한국영양식품학회지 **23**, 698 (1994).
- 5) 김창민, 이경복 : 개느삼의 성분 및 생물활성에 관한 연구. 생약학회지 **21**, 137 (1990).
- 6) Sakai, Y., Nagase, H., Ose, Y., Sato, T., Yamada, A., Hibi, M. and Yamada, F.: Antimutagenicity of extracts from crude drugs in chinese medicines. *Mut. Res.* **174**, 1 (1986).
- 7) Kakinuma, K., Okada, Y., Ikegawa, N., Kada, T. and

- Nomota, M. : *J. Agri. Biol. Chem.* **48**, 1647 (1984).
- 8) Kim, H. K., Kim, K. H., Heo, M. Y. and Kim, H. P. : Effects of antimutagenic flavonoid, galangin, on benzo(a)pyrene metabolism in mice. *Kor. Biochem. J.* **24**, 141 (1991).
- 9) 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, p. 497 (1984).
- 10) Wattenberg, L. W. : Inhibition of neoplasia by dietary constituents. *Cancer Res.* **43**, 2448s (1983).
- 11) Huang, M. T., Wood, A. W., Newmark, H. L., Sayer, J. M., Yagi, H., Jerina, D. M. and Conney, A. H. : Inhibitory effect of 3-hydroxybenzo(a)pyrene on the mutagenicity and tumorigenicity of (+/-)-7 beta, 8 alpha-dihydroxy-9 alpha, 10 alpha-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene. *Cancer Res.* **46**, 558 (1986).
- 12) Nakamura, Y., Matsuo, T., Shimoi, K., Nakamura, Y. and Tomita, I. : S-methyl methane thiosulfonate, a new antimutagenic compound isolated from *Brassica oleracea* L. var. botrytis. *Biol. Pharm. Bull.* **16**, 207 (1993).
- 13) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. : Methods for detecting carcinogens and mutagens with *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* **31**, 347 (1975).
- 14) Maron, D. M. and Ames, B. N. : Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* **113**, 173 (1983).
- 15) Quillardet, P. and Hofnung, M. : The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutat. Res.* **147**, 65 (1985).
- 16) Kicha, A. A., Kalinovskt, A. I., Levina, E. V., Stonik, V. A. and Elyakov, G. B. : Asterosaponin P<sub>1</sub> from the starfish *Patiria pectinifera*. *Tetrahedron Lett.* **24**, 3893 (1983).
- 17) Dubois, M. -A., Higuchi, R., Koromi, T. and Sasaki, T. : Structures of two new oligoglycoside sulfates, pectinoside E and F, and biological activities of the six new pectinosides. *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, 845.
- 18) De Marino, S., Iorizzi, M., Palagiano, E., Zollo, F. and Roussakis, C. : Starfish saponins. 55. Isolation, structure elucidation, and biological activity of the steroid oligoglycosides from an antarctic starfish of the family Asteriidae. *J. Nat. Prod.* **61**, 1319 (1998).
- 19) Higuchi, R., Noguchi, Y., Koromi, T. and Sasaki, T. : <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy and biological activities of polyhydroxylated steroids from the starfish *Asterina pectinifera* Müller et Troschel. *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, 1185.
- 20) Noguchi, Y., Higuchi, R., Marubayashi, N. and Koromi, T. : Steroid oligoglycosides from the starfish *Asterina pectinifera* Müller et Troschel, I Structures of two new saponinins and two new oligoglycoside sulfates: pectinoside A and pectinoside B. *Liebigs Ann. Chem.* **1987**, 341.
- 21) 전경희, 박채수, 박원학, 최수정, 소명숙, 정시련 : 별불가사리 렉틴의 특성 및 암세포 성장저해 효과. *약학회지* **41**, 421 (1997).