

## 영경귀 추출물의 항산화성, 항돌연변이원성 및 항암활성 효과

이희경\* · 김주성\* · 김나영\*\* · 박상언\*\*\* · 김명조\* · 유창연\*†

\* 강원대학교 농업생명과학대학 식물응용과학부, \*\* 경희대학교 식품영양학과, \*\*\* 캐나다 캘거리대학

## Antioxidant, Antimutagenicity and Anticancer Activities of Extracts from *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* KITAMURA

Hui Kyoung Lee\*, Ju Sung Kim\*, Na Young Kim\*\*, Myong Jo Kim\*  
Sang Un Park\*\*\* and Chang Yeon Yu\*†

\* Division of Applied Plant Science, College of Agriculture and Life Science, Kangwon National University Chunchon 200-701, Korea

\*\* Department of Food and Nutrition, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

\*\*\* Department of Biological Sciences, University of Calgary, Alberta T2N 1N4, Canada

**ABSTRACT :** *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* were extracted with methanol and then fractionated with n-hexane, EtOAc and BuOH to get active fractions. And their antioxidant and antimicrobial activities in each fraction were determined. Ethyl acetate and butanol fraction of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* showed strong antioxidant activities, but hexane fraction did not show any activities. But in the antimicrobial test, Ethyl acetate fraction showed strong antimicrobial activities except to *Aspergillus awamori*, *Asperigillus niger*. Especially, Ethyl acetate fraction showed the strongest activities against *Bacillus subtilis*. And aqueous fraction showed the strongest activities against *Cladosporium herbarum*, *Hypocrea nigricans*. This study was performed to determine the antimutagenic and cytotoxic effect of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* methanol extract on *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 and cancer cell lines using Ames test and cytotoxicity assay, respectively. Cancer cell lines include human lung carcinoma(A549), human breast adenocarcinoma(MCF-7) and human hepatocellular carcinoma (Hep3B). Futher fractionations with hexane, ethyl acetate, butanol and water from methanol extract of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* were performed to obtain effective fraction, methanol extract showed 60.14% inhibitory effect on the mutagenesis induced by MNNG against TA100, while 77% and 72.5% inhibition was observed on the mutagenesis induced by 4NQO against TA98 and TA100, respectively. and methanol extract showed 82.25% and 73.7% inhibitory effect on the mutagenesis induced by Trp-P-1 against TA98 and TA100, respectively. methanol extract showed the strongest effect against A549, MCF-7 and Hep3B at the same concentration compared to those of other fration.

**Key words :** *Cirsium japonicum* var. *ussuriense*, antimutagenic, MNNG, 4NQO, Trp-P-1, *Salmonella typhimurium*,

### 서 언

일상생활에서 섭취하고 있는 각종 식품으로부터 생체내에서 어떠한 유해성과 부작용이 적을 것으로 생각되어지

는 약리성분을 찾으려는 노력이 계속되고 있다. 또한 일반 채소류를 포함하여 식용 및 약용으로 쓰이는 야생 식물자원들로부터 약리성분을 찾으려는 연구가 활발히 진행되고 있는 추세이다.

† Corresponding author(phone): 033-250-6411, E-mail : cyyu@kangwon.ac.kr

Received 11 January 2003 / Accepted 19 February 2003

영경귀는 국화과에 속하는 다년생 초본으로 한국에는 13종 6변종 1품종이 산야에 자생하고 있다. 한방에서는 지상부 또는 지하부를 대계라 하여 약용으로 이용해 왔다. 즉 지상부는 개화기에 베고, 뿌리는 가을철에 채취하여 말려서 경혈, 지혈, 소종의 효능으로 토혈, 혈뇨, 대하, 간염, 고혈압 등의 치료(강소신의학원, 1985; 허, 1976; 주, 1987; 송, 1989; Ishida et al., 1987; 곽, 1987)에 사용한다. 영경귀의 잎에는 톱니와 더불어 가시가 있으나, 흔히 봄에 돌아오는 비교적 가시가 연한 어린잎과 부드러운 줄기는 살짝 데쳐서 나물이나 국으로 이용한다(최, 1987). 줄기는 껍질을 벗겨내어 튀김, 무침, 볶음, 데침 등으로 요리하며 특유의 향미가 있고 촉감이 좋아 차로도 사용하는 식물이다(윤등, 1988). *Cirsium*속 식물에 관한 성분 연구는 Phenol 화합물(Yun & Chang, 1978; Park et al., 1994; Lee & Park, 1984; Do et al., 1994; Harborne, 1967; Shelyuto et al., 1972; Park et al., 1994)등이 보고되었으며, 영경귀에 들어있는 silymarin은 flavolignan으로서 간장보호작용(Rauen & Schriewer, 1971; Mourelle et al., 1989)과 알코올 유도지질 산화의 예방(Ingelman-sundberg et al., 1988) 및 알코올성 간경화(Ferenci et al., 1989)등에 대한 보호효과가 있다고 보고되어졌다.

따라서 우리나라 산야에서 존재하며 예부터 식용으로 이용되고 있는 산채류인 영경귀의 생리활성 기능 탐색 작업의 일환으로 영경귀 부위별 추출물과 그 분획물을 대상으로 항산화 활성, 항미생물 활성, 직접 및 간접 변이원에 대한 항돌연변이 효과 및 암세포 증식 억제 효과를 검토하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

실험에 사용한 영경귀(*Cirsium japonicum* var. *ussuriense*)는 전남 고흥 야산에서 채취하여 실험에 이용하였다. 영경귀를 부위별로 세분화한 후 MeOH에 일주일간 침적시켜 3회 반복 냉침 추출하여 각각의 메탄올 추출물을 얻었다. 메탄올 추출물을 증류수에 현탁시킨 후 *n*-hexane, EtOAc, BuOH 순으로 용매분획을 실시하였으며, 3 반복하였다. 위에서 얻은 각 분획을 감압농축하여 hexan, 에칠 아세테이트, 부탄올 및 물 분획물을 각각 얻었다. *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100은 미국 캘리포니아 대학의 Ames 교수로부터 제공받아 사용하였다. 폐암 세포주인 A549(lung carcinoma, human), 유방암 세포주인 MCF-7(breast adenocarcinoma, human), 간암 세포주인 Hep3B (hepatocellular carcinoma, human), 인간

유래의 정상 간세포주인 293(human embryo liver)을 Korea Cell Line Bank (KCLB)로부터 구입하여 실험실에서 배양하면서 실험에 사용하였다.

돌연변이 유발원으로는 직접 돌연변이원인 4-nitroquinoline-1-oxide(4NQO), N<sup>o</sup>-methyl-N<sup>o</sup>-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)는 Sigma사(USA)로부터 구입하였고, 간접 돌연변이원인 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido-(4,3-b)indole(Trp-P-1) 그리고 기타시약은 일본 和光純藥 특급시약을 구입하였다. 이들 변이원 물질은 DMSO(Aldrich chemical Co., USA)에 녹여 실험에 사용하였다.

### 생리활성 실험

#### 1) DPPH free radical 소거법에 의한 항산화활성

자유 라디칼 (Free radical)인 1,1-디페닐-2-피크릴하이드라질(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl, DPPH)을 사용한 항산화활성 측정방법 (Xing et al., 1996; Choi et al., 1993)을 이용하였다. 유리 시험관에 4ml의 메탄올을 넣고 시료 화합물을 농도별 (1.5~30 $\mu$ l)로 첨가한 다음 상기 DPPH (0.15mM) 용액을 1ml 첨가하여 실온에서 30분간 반응시키고 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 RC<sub>50</sub>( $\mu$ g/ml)은 화합물을 첨가하지 않은 대조군의 값을 50% 감소시키는 화합물의 농도를 나타냈으며, 기존의 항산화제인  $\alpha$ -tocopherol 및 BHA와 비교하였다.

#### 2) 항미생물 활성 실험

항미생물 활성을 조사하기 위하여 Kobayasi 등의 포자 발아시험 방법(Kobayasi et al., 1996)에 따라 조사하였다. 세균에 대한 항균 시험은 피검균으로 *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*를 이용하였으며, 효모에 대한 항균 시험에서는 피검균으로 *Candida albicans*, *Pichia jadinii*를 이용하였다. 피검균을 PDB배지 10ml를 넣은 직경 25mm 시험관에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 진탕 배양(rpm 100 정도)하여 얻은 배양액을 PDB 배지에 100배로 희석하여 항균 시험에 사용하였다. 시료를 96 well micro assay plate의 제 1번구에 넣고 조제된 균체 현탁액을 분주하여 2배씩 희석하여 사용하였다. 이것을 27 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 암조건에서 배양하면서 세균의 증식을 육안으로 관찰하였다. 항균 활성은 세균의 생육을 억제하는 최저농도(MIC<sub>50</sub>: minimum inhibitory concentration)를 측정하였다(Kim et al., 1997).

또한, 곰팡이에 대한 포자발아 억제 시험은 피검균으로 *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, *Hypocrea nigricans*, *Penicillium citrinum*, *Trichoderma virens*등을 사용하였다. 곰팡이 배양용

PDB Slant에 곰팡이 포자발아 저해시험용 배지(glucose 0.2%, yeast extract 0.1%,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0.37%, citric acid 0.1%) 2ml를 첨가하여 유리봉으로 상기 곰팡이 포자를 분리시키고 이를 다시 gauze로 여과하였다. 그 여과액을 얻어 현미경으로 관찰하면서  $1 \times 10^6$ 의 포자가 관찰될 때까지 희석한 후 96 well micro assay plate에 100 $\mu\text{l}$ 씩 분주하였다. 각각의 시료를 1000ppm에서 8ppm 정도까지 serial 2-fold dilution method로 제조하여 30 $^\circ\text{C}$ 에서 암배양하면서 24시간이 경과한 다음 현미경으로 포자발아가 저해되는 최저활성농도(MIC)를 측정하였다.

### 3) Ames test를 이용한 mutagenicity test

돌연변이원성 실험에 사용한 *Salmonella typhimurium*의 histidine 영양요구성 변이주는 TA98, TA100의 두 종류를 이용하여 Ames test를 개량한 preincubation Mutagenicity test(Matsushima et al., 1980)를 이용하였다. 영경귀 뿌리 추출물 및 분획물을 미리 건열 멸균시킨 glass cap tube에 각각 50 $\mu\text{l}$ 씩 가하고 여기에 미리 TA culture배지(Difco nutrient broth 0.8g+NaCl 0.5g+증류수 100ml)에서 하룻밤 배양된 균주 100 $\mu\text{l}$ 를 가한 다음 0.2M sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 전체량이 700 $\mu\text{l}$ 가 되도록 하였다. 이것을 37 $^\circ\text{C}$ 에서 30분간 예비배양하였다. Histidine/biotin이 첨가된 45 $^\circ\text{C}$ 의 top agar를 2ml씩 각 tube에 붓고 3초간 vortex하고 minimal glucose agar plate상에 도말하고 평판 고화시켜 37 $^\circ\text{C}$ 에서 48시간 배양하여 생긴 복귀 돌연변이(his+ revertant colony)수를 측정하여 돌연변이원성의 유무를 판정하였다.

항돌연변이 실험에 사용된 발암물질은 MNNG, 4NQO 및 Trp-P-1을 사용하였다. 미리 건열 멸균시킨 glass cap tube에 영경귀 뿌리 추출물 및 분획물을 각각 50 $\mu\text{l}$  첨가한 다음 대사 활성물질이 필요한 경우에는 실험실에서 제조한 S-9 mix를 250 $\mu\text{l}$ 씩 각각 첨가하였다. 여기에 하룻밤 배양된 균주를 100 $\mu\text{l}$ 씩 주입한 후, 0.2M sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 전체량이 700 $\mu\text{l}$ 가 되도록 하였다. 이것을 20분간 예비배양한 다음 histidine/biotin이 첨가된 45 $^\circ\text{C}$ 의 top agar를 2ml씩 각 tube에 붓고 3초간 vortex하고 minimal glucose agar plate상에 도말하고 평판 고화시켜 37 $^\circ\text{C}$ 에서 48시간 배양하여 생긴 복귀 돌연변이(his+ revertant colony)수를 측정하여 돌연변이원성의 유무를 판정하였다.

돌연변이 억제효과의 정도(Inhibition rate)는 아래의 식에 의하였다.

$$\text{Inhibition rate(\%)} = 100 \times \frac{(a-b)}{(a-c)}$$

여기서 a는 돌연변이원에 의해 유도된 복귀돌연변이의

수, b는 시료를 처리하였을 때의 복귀돌연변이의 수이며, c는 돌연변이원과 시료가 없을 경우의 자연복귀돌연변이의 수이다.

한편 실험에 사용된 영경귀 뿌리 추출물 및 분획물과 돌연변이 유발물질의 농도는 예비실험(Maron & Ames, 1983) (dose reponse 및 독성검사)을 통하여 결정하였다.

### 4) 암세포 증식 억제 효과

#### 세포주 배양

A549, MCF-7 세포주는 RPMI(Gibco; Grand Island, NY) Medium 1640 복합배지(1 $\ell$  당 RPMI 1pack,  $\text{NaHCO}_3$  2g, HEPES 2g, gentamycin sulfate 0.057g, serum 10%(v/v), pH 7.0~7.2)를, Hep3B 세포주는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, 1 $\ell$  당 DMEM1pack,  $\text{NaHCO}_3$  2g, HEPES 2g, gentamycin sulfate 0.057g, serum 10%(v/v), pH 7.0~7.2)를, 그리고 293 세포주는 MEM(Minimum Essential Medium, 1 $\ell$  당 RPMI 1pack,  $\text{NaHCO}_3$  2g, HEPES 2g, gentamycin sulfate 0.057g, serum 10%(v/v), pH 7.0~7.2)를 이용하여 10% fetal bovine serum(Intergen, Purchase, NY)을 첨가하여 37 $^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 에 적응시켜 각각 배양시켰다.

#### SRB assay

SRB(Sulfo Rhodamine B) 분석법(Martin & Martin, 1997)은 세포 단백질 염색을 이용하여 세포 증식이나 독성을 측정하는 방법으로 10% fetal bovine serum 및 각각의 암세포주(A549, Hep3B, MCF-7)를 함유하는 RPMI 1640과 DMEM 배지를  $5 \times 10^4$  cells/ml 농도로 100 $\mu\text{l}$ 씩 각 well에 첨가한다. 24시간 동안 배양(37 $^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ )시킨 후, 0.2M 이하의 DMSO로 녹인 시료를 0.125, 0.25, 0.375, 0.5mg/ml의 농도로 100 $\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 48시간 동안 다시 배양하였다. 그 후 상등액을 aspirator로 조심스럽게 제거하고 냉장보관한 10%(w/v) trichloroacetic acid(TCA)를 100 $\mu\text{l}$ 씩 첨가한 후 1시간 동안 4 $^\circ\text{C}$ 에서 방치한 후 증류수로 수회 헹구었다. 실온에서 건조시킨 후 1%(v/v) acetic acid에 녹인 0.4%(w/v) SRB 용액 100 $\mu\text{l}$ 를 첨가해 30분 동안 염색시켰다. 세포와 결합되지 않은 SRB 염색액은 1%(v/v) acetic acid 용액으로 수회 헹군 다음, 다시 건조시킨 후 10mM Tris buffer(pH 10.5) 100 $\mu\text{l}$ 로 세포와 결합되어 있는 염색제를 충분히 녹인 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 통계분석

실험에서 측정된 결과는 실험군당 평균(mean)와 표준편차(SEM)로 나타냈으며, 이들 데이터들은 SAS(Statistical

Analysis System) program을 이용하여 분산분석을 한 후 Student's test 와 Duncan's multiple range test로 분석하였다.

### 결과 및 고찰

#### 1) 엉겅퀴 부위별 추출 수율

엉겅퀴를 뿌리, 줄기 그리고 잎 부위로 세분화한 후, 메탄올에 72시간 동안 침지시켜 두었다가 추출액을 40℃ 이하의 중탕에서 감압농축하여 엉겅퀴 뿌리, 줄기 잎 조 추출물을 각각 17.6, 7.1 그리고 18.4g을 얻었다. 얻어진 추출물을 다시 용매 극성을 이용하여 분획하여 Table 1 과 같은 결과를 얻었다. 뿌리 및 잎 추출물은 10% 정도의 수율을 보였으나 줄기 추출물은 2.8%의 낮은 수율을 보였다. 이 결과는 비록 줄기 추출물이 다른 부위에 비해 극히 낮은 수율을 보였지만 다른 부위에서의 결과는 이미 보고(Lee et al, 2002)에서 유기용매(에탄올)에서 추출할 경우 8.96%의 수율을 얻었다는 보고와 유사하였다.

**Table 1.** Yield of MeOH extracts of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense*

Extracts and Fractions	extracts (g)	Dry weight (g)	Yield (%)
Roots	MeOH ex.	17.6	191.9
	Hexane fr.	2.05	
	EtoAc fr.	0.38	
	BuOH fr.	1.72	
	H <sub>2</sub> O fr.	13.45	
Stems	MeOH ex.	7.1	252.9
	Hexane fr.	2.8	
	EtoAc fr.	0.75	
	BuOH fr.	0.61	
	H <sub>2</sub> O fr.	2.58	
Leaves	MeOH ex.	18.4	162.5
	Hexane fr.	5.7	
	EtoAc fr.	1.1	
	BuOH fr.	3.5	
	H <sub>2</sub> O fr.	8.1	

#### 2) DPPH free radical 소거법에 의한 항산화활성 효과

항산화활성 실험을 시행한 결과(Table. 2)를 보면 부위별 ethyl acetate 분획물과 butanol분획물에서 강한 항산화 활성을 보였으며, 특히 뿌리의 ethyl acetate 분획물(RC<sub>50</sub>:11 $\mu$ g/ml)과 butanol 분획물(RC<sub>50</sub>:14 $\mu$ g/ml), 잎의 butanol 분획물(RC<sub>50</sub>:15 $\mu$ g/ml)에서 대조구인  $\alpha$ -

tocopherol(RC<sub>50</sub>:12 $\mu$ g/ml)이나 BHA(RC<sub>50</sub>:14 $\mu$ g/ml)정도의 항산화활성을 보였다. 또한 잎의 ethyl acetate 분획물(RC<sub>50</sub>:26 $\mu$ g/ml)과 물 분획물(RC<sub>50</sub>:28 $\mu$ g/ml)에서도 우수한 항산화 활성을 보였다. 그러나 대체적으로 줄기부위에서는 항산화 활성이 약하게 나타났다.

**Table 2.** DPPH free radical scavenging activity of extracts from *Cirsium japonicum* var. *ussuriense*

Extracts and Fractions	Antioxidative activity (RC <sub>50</sub> † : $\mu$ g/ml)	
Roots	MeOH extract	26
	Hexane fraction	175
	EtoAc Layer	11
	BuOH Layer	14
	H <sub>2</sub> O layer	93
Stems	MeOH extract	122
	Hexane fraction	>200
	EtoAc Layer	80
	BuOH Layer	80
	H <sub>2</sub> O layer	200
Leaves	MeOH extract	21
	Hexane fraction	140
	EtoAc Layer	26
	BuOH Layer	15
	H <sub>2</sub> O layer	28
	$\alpha$ -tocopherol	12
	BHA	14

† Amount required for 50% reduction of DPPH after 30 min

#### 3) 항미생물 활성 효과

곰팡이에 대한 포자발아 억제시험(Table 3)은 기관지 천식, allergy성 기관지염을 일으키는 *Aspergillus*속 *awamori*와 *niger*, 냉동 식용고기에 흑반을 유발시키는 *Cladosporium herbarum*, 흑부병을 일으키는 *Hypocrea nigricans*, 부패 유발균인 *Penicillium citrinum*과 *Trichoderma virens*를 사용하였는데, 전반적으로 물 분획물에서 우수한 활성을 나타냈다. *Aspergillus*속 곰팡이에 대한 활성을 보면 뿌리 및 줄기 시료에서는 물 분획에서 대조구인 *cyclohexamide*와 유사하거나 우수한 활성을 보였으나 잎 시료에서는 ethyl acetate 분획에서 약한 활성을 나타냈다. *Cladosporium herbarum*과 *Hypocrea nigricans*에서는 모든 시료에서 우수한 활성을 나타냈으며, 특히 물 분획물에서 대조구보다 우수한 활성을 보였다. *Penicillium citrinum*에서는 부위별 독특한 활성을 나

타내었다. 뿌리에서는 다소 비슷한 활성을 보였으나 줄기에서는 hexane과 물 분획물에서 우수하게 나타났으며 잎에서는 ethyl acetate 분획물에서 우수하게 나타났다. *Trichoderma virens*에서는 대체적으로 물 분획물에서 우수한 활성을 보였으며, 특히 잎에서는 hexane 분획물에서 우수한 활성을 보였다.

Yeasts에 대한 실험에서는 사람에게 칸디다증(candidiasis)을 일으키는 *Candida albicans*와 *Pichia jadinii*를 사용하였다. *Candida albicans*와 *Pichia jadinii*에서는 모두 ethyl acetate 분획물에서 대조구와 유사한 활성을 나타냈다.

박테리아에 대한 항균시험은 Gram positive bacteria로는 패혈증, 화농성질환을 일으키는 *Bacillus cereus*, 고초

균인 *Bacillus subtilis*, 화농성질환 병원균이며 식중독 원인균인 *Staphylococcus aureus*를 gram negative bacteria로는 식품오염의 지표균인 *Escherichia coli*, 식중독 미생물인 *Salmonella typhimurium*, 세균성 폐염을 일으키는 *Klebsiella pneumonia*를 사용하였다. *Bacillus cereus*에 대한 항균실험에서는 ethyl acetate 분획물에서 활성을 나타냈으며, *Bacillus subtilis*의 경우 ethyl acetate 분획물에서 대조구와 유사한 활성을 보였으며 뿌리 시료에서는 MeOH 추출물과 hexane 분획물에서도 우수한 활성을 보였다. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* 및 *Klebsiella pneumonia*에서는 ethyl acetate 분획물에서 활성을 나타냈다.

**Table 3.** Antimicrobial activities of the extracts from *Cirsium japonicum* var. *ussuriense*

Extracts and Fractions	MIC*(µg/ml)														
	Fungi strain						Bacteria strain						Yeast strain		
	A.a	A.n	C.h	H.n	P.c	T.v	B.c	B.s	E.c	K.p	S.a	S.t	C.a	P.j	
Roots	MeOH ex.	>1000	1000	250	32	250	500	500	8	250	1000	1000	250	250	250
	Hexane fr.	>1000	1000	32	8	250	250	125	8	1000	500	1000	1000	500	125
	EtoAc fr.	>1000	1000	32	63	125	250	250	8	125	500	250	125	125	250
	BuOH fr.	>1000	1000	63	32	125	32	500	125	500	500	250	250	500	250
	H2O fr.	250	8	8	8	125	8	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	500	250
Stems	MeOH ex.	500	1000	125	125	250	250	250	32	125	500	500	250	250	250
	Hexane fr.	1000	1000	250	63	63	500	1000	125	1000	1000	1000	>1000	>1000	1000
	EtoAc fr.	500	1000	32	63	125	125	63	16	8	500	125	125	125	125
	BuOH fr.	1000	500	250	16	125	125	1000	125	125	500	1000	250	500	250
	H2O fr.	250	250	8	16	63	8	1000	1000	>1000	>1000	1000	>1000	250	>1000
Leaves	MeOH ex.	>1000	1000	250	63	125	125	1000	250	250	500	1000	125	125	250
	Hexane fr.	500	1000	125	32	1000	16	>1000	500	250	500	1000	1000	1000	>1000
	EtoAc fr.	500	250	63	63	63	125	125	8	16	250	250	125	125	125
	BuOH fr.	500	500	125	32	125	125	1000	250	63	500	>1000	125	500	250
	H2O fr.	1000	1000	32	8	1000	63	125	250	500	>1000	1000	1000	1000	>1000
Tetracycline								8	8	63	32	8	8	500	250
Cyclohexamide	250	250	63	63	125	63									

Fungi : Spore germination test                      Bacteria : Dilution method  
 A.a: *Aspergillus awamori*,                      A.n: *Aspergillus niger*                      C.h.: *Cladosporium herbarum*,                      H.n: *Hypocrea nigricans*  
 P.c: *Penicillium citrinum*                      T.v: *Trichoderma virens*                      B.c.: *Bacillus cereus*                      B.s.: *Bacillus subtilis*,  
 E.c.: *Escherichia coli*                      K.p: *Klebsiella pneumoniae*                      S.a: *Staphylococcus aureus*                      S.t: *Salmonella typhimurium*  
 C.a: *Candida albicans*                      P.j: *Pichia jadinii*

\*The MIC values against bacteria and fungi were determined by the serial 2-fold dilution method. The growth of the bacteria was evaluated by the degree of turbidity of the culture with the naked eye, and the sporegermination of fungi was examined under a microscope.

4) 항돌연변이 효과

본 실험에 사용한 엉겅퀴 뿌리 추출물 및 분획물에 대한 돌연변이원성 유무를 확인하기 위하여 실험에 널리 이용되고 있는 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100을 사용하여 Ames test를 실시하였다.

천연물에는 변이원 및 항돌연변이원을 포함한 여러가지 성분이 혼재되어 있을 수 있어 엉겅퀴 뿌리 추출물과 그 분획물 자체의 돌연변이원성 유무를 확인한 결과, 자료는 나타내지 않았지만 시료농도의 증가에 따른 his<sup>+</sup> revertant colony수의 증감이 없는 것으로 보아 시료 자체에 의한 돌연변이원성은 존재하지 않았다.

강력한 발암물질로써 직접 변이원으로 사용된 MNNG (0.4 $\mu$ g/plate)의 경우 *S. typhimurium* TA100 균주에서 시료농도 1000 $\mu$ g/plate에서 핵산 분획물이 88.18%로 가장 높은 억제효과가 나타났다. 또한, 시료농도 1000 $\mu$ g/plate에서 에칠아세테이트, 부탄올 분획물에서도 75, 71.03%로 높은 억제효과를 보였다(Fig. 1). 4NQO(0.15 $\mu$ g/plate)에 대한 *S. typhimurium* TA98과 TA100 균주 실험결과는 다음과 같았다. TA98 균주에서 시료농도 1000 $\mu$ g/plate에서는 엉겅퀴 뿌리 추출물 및 에칠아세테이트 분획물이 77, 75.8%의 억제효과를 나타냈으며, TA100 균주에서도 엉겅퀴 뿌리 추출물 및 에칠아세테이트 분획물이 72.5, 74.3%의 억제효과를 나타냈다(Fig. 2).

아미노산 가열분해물인 Trp-P-1(0.15 $\mu$ g/plate)을 사용한 *S. typhimurium* TA98 균주에서는 시료농도 1000 $\mu$ g/plate에서 물 분획물을 제외한 모든 시료에서 60% 이상의 높은 억제효과를 나타냈으며 엉겅퀴 뿌리 추출물 (1000 $\mu$ g/plate)에서 82.25%의 가장 높은 억제효과를 보였다. 또한, TA100 균주의 경우, 시료농도 1000 $\mu$ g/plate에서 부탄올 분획물에서 77.75%의 가장 높은 억제효과를 보였다(Fig. 3).

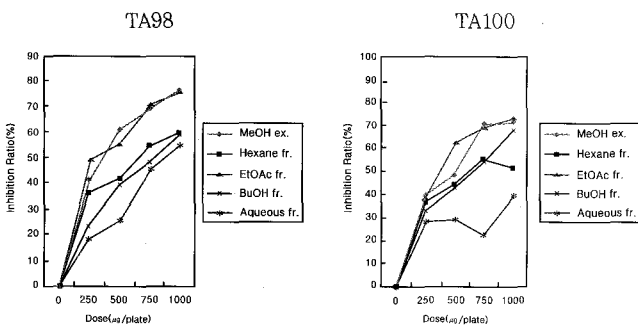


Fig. 1. The antimutagenic effects of each fraction of *Cirsium japonicum* var. ussuriense Root extract against MNNG(0.4 $\mu$ g/plate) on *Salmonella typhimurium* TA100.

TA100

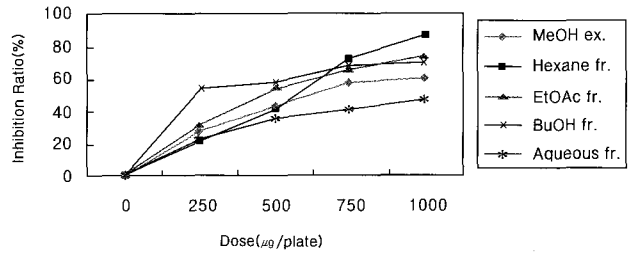


Fig. 2. The antimutagenic effects of each fraction of *Cirsium japonicum* var. ussuriense Root extract against 4NQO(0.15 $\mu$ g/plate) on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100.

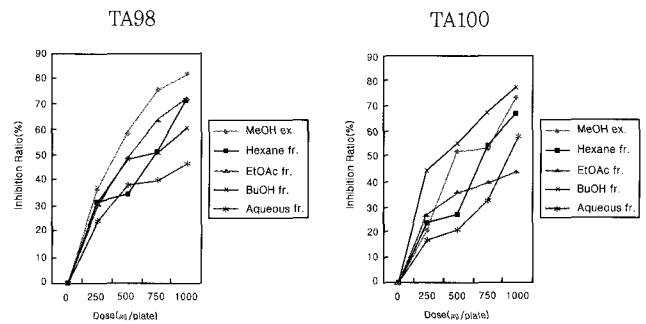


Fig. 3. The antimutagenic effects of each fraction of *Cirsium japonicum* var. ussuriense Root extract against Trp-P-1(0.15 $\mu$ g/plate) on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100.

위 실험의 결과로 미루어 보아 엉겅퀴 뿌리 추출물 및 분획물의 항돌연변이 효과를 나타내는 성분은 핵산에 잘 용해되는 지용성의 것과 부탄올이나 물에 잘 용해되는 수용성 물질이 함께 존재하면서 활성을 나타내는 것으로 사료된다.

5) 엉겅퀴 뿌리 추출물 및 분획물의 세포독성

Fischer et al은 세포독성은 비특이적 방어기전으로서 암세포에 직접적으로 손상을 줄 뿐만 아니라 동물 생체 내 림프구나 대식세포와 같은 표적세포에 대하여 세포독성효과를 나타내는 작동세포를 자극함으로써 그 세포독성효과를 향진시킨다고 보고하였다.

엉겅퀴 뿌리 추출물 및 분획물의 세포독성을 규명하기 위하여 암세포주(A549, Hep3B, MCF-7)를 이용하였다. 엉겅퀴 뿌리 추출물 및 용매 극성을 이용한 분획물을 대상으로 암세포주에 대한 세포독성을 실험한 결과(Table 4), 폐

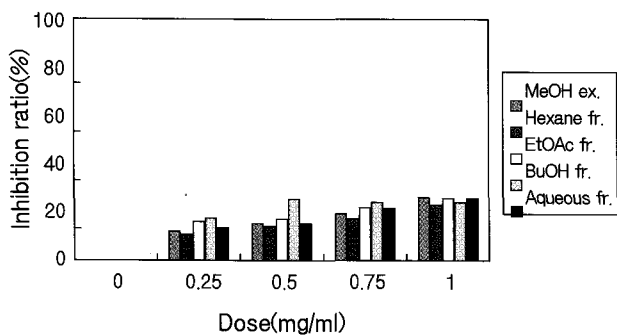
**Table 4.** Growth inhibitory effects of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* Root extract and fractions against the human cancer cell lines by SRB assay

(unit: %<sup>†</sup>).

C.japonicum	Dose(mg/ml)	A549	Hep3B	MCF-7
MeOH ex.	0.25	39.01±0.18 <sup>‡</sup>	43.9±0.08	54.3±0.26
	0.5	55.72±0.03	49.5±0.04	66.4±0.27
	0.75	61.62±0.07	65.9±0.08	68±0.27
	1	70.75±0.07	75.5±0.05	83.3±0.06
Hexane fr.	0.25	43±0.11	59.4±0.2	45.1±0.08
	0.5	49.82±0.39	61.9±0.02	54±0.02
	0.75	54.72±0.21	65.8±0.12	61.4±0.06
	1	65.26±0.21	66.5±0.04	60.7±0.1
EtOAc fr.	0.25	31.67±0.05	49.1±0.26	48.2±0.1
	0.5	45.71±0.15	49.8±0.07	61.2±0.24
	0.75	55.71±0.08	51.8±0.17	69.1±0.1
	1	65.72±0.06	54.5±0.1	64.5±0.26
BuOH fr.	0.25	46.3±0.43	40.5±0.05	43.87±0.04
	0.5	54.76±0.15	48.1±0.15	55.97±0.09
	0.75	57.49±0.9	50.8±0.04	63.09±0.09
	1	66.32±0.11	56.1±0.08	67.29±0.07
Aqueous fr.	0.25	48.68±0.12	43.7±0.2	58.3±0.29
	0.5	55.09±0.07	43.5±0.29	61.1±0.24
	0.75	63.9±0.21	59.6±0.15	69.1±0.2
	1	68.44±0.12	57.1±0.16	64.5±0.26

<sup>†</sup>%=(OD540 of positive control- OD540 of sample/ OD540 of positive control)×100.

<sup>‡</sup>Mean value±SD(n=3)



**Fig. 4.** Growth inhibitory effects of each fraction of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* Root extract on human liver embryo, 293.

암세포주인 A549세포에서 메탄올 추출물이 70.75%의 억제효과를 나타내었고, 간암세포주인 Hep3B에서도 메탄올 추출물이 75.5%의 억제효과를 나타내었다. 또한, 유방암 세포주인 MCF-7에서도 메탄올 추출물이 83.3%의

억제효과를 나타내었다. 인간유래의 정상 간세포 293에 대한 시료농도에 따른 세포독성효과는 1000µg/ml 시료 첨가시 암세포에 대하여 대부분 60% 전후의 억제율을 보이는데 반해 293에 대해서는 25% 이하의 생육억제율을 보였다. 이는 암세포에 대한 높은 억제효과에 비해 정상세포에 대해서는 비교적 낮은 독성효과를 나타냄을 알 수 있었다.

따라서, 이러한 영정귀의 효과에 대한 정확한 정보를 얻기 위해서는 시료들의 정확한 성분분석과 다양한 변이원 및 암세포주와 여러 검출계에 의한 부가적인 검사가 요구되어진다.

## 적 요

영정귀 부위별 메탄올 추출 수율을 구한 결과 뿌리 및 잎 추출물은 10% 정도의 수율을 보였으나 줄기 추출물은 2.8%의 낮은 수율을 보였다.

항산화활성 실험 결과 부위별 ethyl acetate 분획물과

butanol분획물에서 강한 항산화 활성을 보였으며, 특히 뿌리의 ethyl acetate 분획물(RC<sub>50</sub>:11 $\mu$ g/ml)과 butanol 분획물(RC<sub>50</sub>:14 $\mu$ g/ml), 잎의 butanol 분획물(RC<sub>50</sub>:15 $\mu$ g/ml)에서 대조구인  $\alpha$ -tocopherol(RC<sub>50</sub>:12 $\mu$ g/ml)이나 BHA(RC<sub>50</sub>:14 $\mu$ g/ml)정도의 항산화활성을 보였다.

곰팡이에 대한 포자발아 억제시험에서는 전반적으로 물 분획물에서 우수한 활성을 나타냈다. Yeasts에 대한 실험에서는 ethyl acetate 분획물에서 대조구와 유사한 활성을 나타냈다. 박테리아에 대한 항균시험은 역시 ethyl acetate 분획물에서 활성을 나타냈다.

Ames test결과 MNNG(0.4 $\mu$ g/plate)의 경우 *S. typhimurium* TA100 균주에서 시료농도 1000 $\mu$ g/plate에서 핵산 분획물이 88.18%로 가장 높은 억제효과가 나타났다. 4NQO(0.15 $\mu$ g/plate)에 대한 *S. typhimurium* TA98 균주에서 시료농도 1000 $\mu$ g/plate에서는 엉겅퀴 뿌리 추출물 및 에칠아세테이트 분획물이 77, 75.8%의 억제효과를 나타냈으며, TA100 균주에서도 엉겅퀴 뿌리 추출물 및 에칠아세테이트 분획물이 72.5, 74.3%의 억제효과를 나타냈다. Trp-P-1(0.15 $\mu$ g/plate)을 사용한 *S. typhimurium* TA98 균주에서는 시료농도 1000 $\mu$ g/plate에서 엉겅퀴 뿌리 추출물(1000 $\mu$ g/plate)에서 82.25%의 가장 높은 억제효과를 보였으며, TA100 균주의 경우, 시료농도 1000 $\mu$ g/plate에서 부탄올 분획물에서 77.75%의 가장 높은 억제효과를 보였다.

엉겅퀴 뿌리 추출물 및 용매 극성을 이용한 분획물을 대상으로 암세포주에 대한 증식 억제 효과를 실험한 결과, A549, Hep3B, MCF-7 세포주에서 메탄올 추출물이 가장 우수한 억제효과를 나타내었으며 인간유래의 정상 간세포 293에 대하여 시료농도에 따른 세포독성 효과는 1000 $\mu$ g/ml 시료 첨가시 암세포에 대하여 대부분 60% 전후의 억제율을 보이는데 반해 293에 대해서는 25% 이하의 생육억제율을 보였다. 이는 암세포에 대한 높은 억제효과에 비해 정상세포에 대해서는 비교적 낮은 독성효과를 나타냄을 알 수 있었다.

## 사 사

본 연구는 농촌진흥청 Biogreen21 연구비 지원에 의하여 이루어진 것으로 감사를 표한다.

## LITERATURE CITED

- Choi JS, Park JH, Kim HG, Young HS, Mun SI (1993) Screening for antioxidant activity of plants and marine algae and its active principles from *Prunus daviana*. *Kor. J. Pharmacology*, 24: 299-303.
- Do JC, Jung KY, Son KH (1994) Isolation of Pectolinarin from the aerial Parts of *Cirsium nipponicum*. *Kor. J. Pharmacogn.* 25(1): 73-75.
- Ferenci P, Dragosics B, Dittrich H, Frand H, Benda L, Lochs H, Meryn S, Base W, Schneider B (1989) Randomized controlled trial of silymarin treatment in patients with cirrhosis of the liver. *J.Hepatol.*, 9: 105.
- Fischer SM, Leyton LJ, Lee ML, Locnislar M, Belury MA, Maldve RE (1992) Differential effects of dietary linoleic acid on mouse skin-tumor promotion and mammary carcinogenesis. *Cancer Res.*,(Suppl),52:2049-2056.
- Harborne JB (1967) comparative Biochemistry of the flavonoids, Academic Press, London.
- Im SS, Park JC (1997) Isolation of Flavone Glycoside from *Cirsium japonicum* var *ussuriense* and Biological Activity on the Cardiovascular System. *Kor. J. Nur. Soci.*, 26(2): 242-247.
- Ingelman-sundberg M, Johansson I, Penttil K, Glaumann H, Lindros KO (1988) Centrilobular expression of ethanolinducible cytochrome P450(IIEI) in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 157: 55.
- Ishida H, Umino T, Tsuji K, Kosuge T (1987) Studies on antihemorrhagic substance in Herbs classified as hemostatics in Chinese medicine. VII. On the antihemorrhagic principle in *cirsium japonicum* DC. *Chem.Pharm.Bull.*,35: 861.
- Kang IJ, Ham SS, Chung CK, Lee SY, Oh DH, Choi KP, Do JJ (1997) Development of Fermented Soysauce Using *Cirsium setidens* Nakai and Comfrey. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 26(6): 1152-1158.
- Kim MJ, Hyun JO (1997) Genetic Variation in Urushiol Components of *Rhus verniciflua* Stokes. *Kor. J. Breed.*, 29(1): 115-123.
- Kobayasi A, Kim MJ, Kawaz K (1995) Conversion and secretion of phenolic compounds by wheat plant and their antimicrobial activities. *15th Asian-Pacific Weed Science Society Conference. Japan.* 1(B): 846-851.
- Lee BC, Jin SH, Cho KJ, Kim DS, Ryu BH (1997) Antioxidative Effect of Silymarin Purified from *Silybum Marianum* on Modification of Human Low Density Lipoprotein. *J. Fd Hyg. Safety.* 12(1): 1-8.
- Lee BC, Jeong YK, Ryu BH (1997) Antioxidative Effect of Silymarin and Silybin Purified from *Silybum marianum* on Oxidation of Human Low Density Lipoprotein by Macrophages. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25(3): 286-292.
- Lee MK, Moon HC, Lee JH, Kim JD, Yu CY, Lee HY (2002) Screening of immune enhancing activities in medicinal herbs, *Compositae*. *Korean J. Crop Sci.*, 10(1): 51-57.
- Lee YC, Park YH (1984) Chemical Studies on *Cirsium* Species (V). Chemical Constituents of the Roots of *Cirsium xanthocanthum*. *Kor. J. Pharmacogn.* 15(2): 74-77.
- Lim SS, Lee JH (1997) Effect of *Artemisia Princeps* Var



영경귀 추출물의 항산화성, 항돌연변이원성 및 항암활성 효과

- Orientalis and *Cirsium Japonicum* Var Ussuriense on Serum Lipid of Hyperlipidemic Rat. *Kor. J. Nur. Soci.*, 30(1): 12-18.
- Lim SS, Kim MH, Lee JH** (1997) Effect of *Artemisia Princeps* var Orientalis and *Cirsium Japonicum* var Ussuriense on Liver Function, Body Lipid, and Bile Acid of Hyperlipidemic Rat. *Kor. J. Nur. Soci.*, 30(7): 797-802.
- Mourelle M, Murrel P, Favari L, Franco T** (1989) Prevention of CCl<sub>4</sub>-induced cirrhosis by silymarin *Fund. Clin. Pharmacol.*, 3: 183.
- Park JC, Yu YB, Im SS, Lee JH** (1994) Isolation of Flavone Glycoside from the Herb of *Cirsium japonicum* var. ussuriense. *Kor. J. Pharmacogn.* 25(1): 96-97.
- Rauen HM, Schriewer H** (1971) Die antihepatotoxische Wirkung von Silymarin bei experimentellen Leberschangenungen der Ratte durch Tetrachlorkohlenstoff, D-Galaktosamin und allylalkohol., *Arzneimittelforsch.* 21: 1194
- Shelyuto VL, Glyzin VI, Bubon NT** (1972) *Knim. Prim. Soedin.*, 8 :118 (1972), *Chem. Abstr.*, 77 :85580
- Xiong Q, Kadota S, Tadada T, Namba T** (1996) Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. *Biol. Pharm. Bull.*, 19: 1580-1585.
- Yun HS, Chang IM** (1978) Separation and identification of Cirsimarín from *Cirsium Pendulum* Fisch. *Kor. J. Pharmacogn.* 9(3): 145-147.
- 강소신의학원** : 중약대사전. 소화판, 동경, 1646(1985)
- 곽중환** : 고려 영경귀의 형태 및 성분에 관한 연구. 성균관 대학교 대학원 (1987)
- 송주택** : 한국식물대보감(하권). 한국자원식품연구소, 제 1권, 284(1989)
- 윤병국, 장준근, 전길신** : 산야초 여행. 석오출판사, 32(1988)
- 주영승** : 한국산 국화과 식물에 대한 본초학적 연구. 원광대학교 대학원(1987)
- 최영진** : 산나물의 재배와 이용법. 오성출판사, 337(1987)
- 허준** : 국택 증보 동의보감. 납산당. 75,156,362,1197(1976)