N-methyl-*N*-nitro-*N'*-nitrosoguanidine의 변이원성에 대한 빈랑 물 추출물의 돌연변이 억제효과

오위걸 · 안병용[†]

전북대학교 한약자원학과

Desmutagenic Effect of Water Extract from *Areca catechu* L. on the Mutagenicity of *N*-Methyl-*N*-Nitro-*N'*-Nitrosoguanidine in *E. coli* PQ37

Wei Jie Wu and Byung Yong Ahn[†]

Department of Oriental Medicine Resources, Chonbuk National University, Iksan 570-752, Korea.

ABSTRACT : The desmutagenic activity of the water extract of *Areca catechu* L. on the mutagenicity induced by aflatoxin B₁ (AFB₁), *N*-methyl-*N*-nitro-*N'*-nitrosoguanidine (MNNG), mitomycin C (MMC) and 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) was studied by using the SOS Chromotest with *Escherichia coli* PQ37. The inhibition rates of water extract of *Areca catechu* L. at concentration of 100 µg/assay were 41.0%, 47%, 46%, and 32% against AFB₁, MNNG, MMC and 4-NQO, respectively. The water extract of *Areca catechu* L. was separated into methanol soluble and methanol insoluble parts. The methanol insoluble part exhibited higher inhibition effect than the methanol soluble part against the mutagenic activities of MNNG. Step-wise fractionation of methanol insoluble part was done to obtain methanol, ethyl acetate and water fractions. Among these fractions, water fraction had the strongest inhibitory effect of 45.0% against mutagenicities of MNNG. The inhibition rates of aqueous fraction of methanol-insoluble from water extracted *Areca catechu* L. at concentrations of 1.61, 16.13, 161.29 and 322.58 µg/mL were 12.0%, 24.0%, 47.5% and 62.0%, respectively. The water fraction showed the inhibitory effects with dose response against the mutagenic activity induced by MNNG.

Key Words : *Areca catechu* L. MNNG, SOS Chromotest, Desmutagenic Activity

서 언

환경 중에 함유된 극소수의 돌연변이원성 물질은 발암성과 높은 상관성을 가진 반면, 항돌연변이원성 물질은 질병은 물론 유전독성에 의해 유도되는 돌연변이를 차단하여 암의 예방에 기여하므로 그 중요성이 강조되고 있다 (Hayatsu *et al.*, 1989). 또한 암 발생의 개시단계와 돌연변이는 83% 이상의 높은 상관성을 나타내므로 (Hathcock, 1987) 암을 예방하는 가장 중요한 방법은 환경이나 식품 중에 존재하는 발암성 인자를 조기 발견하여 효과적으로 차단하는 것이며, 항돌연변이원성 물질이나 항암물질을 섭취하는 것도 암이나 유전 질병을 예방하는 효과적인 방안으로 제안되고 있다 (Ferguson, 1994). 따라서 많은 연구자들은 fiber, cinnamaldehyde 및 tannic acid와 같은 돌연변이 억제물질을 채소, 과일 및 생약재로부터 동정하고 있다 (Kata *et al.*, 1981; Waters *et al.*, 1990; Ho *et al.*, 1992). 또한 활성물질을 분리하여 그의 작용기작에 관

한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 대표적인 예로써 Ohta 등 (Ohta *et al.*, 1983)은 cinnamaldehyde와 vanillin (Ohta *et al.*, 1982)의 항돌연변이 효과의 작용 메커니즘을 밝힌 바 있다. 동양권에서 생약은 오랫동안 질병의 예방, 치료 및 수명연장을 위해 사용되어 왔으며, 이러한 생체기능 조절 성분이 함유된 생약재로부터 항산화성 또는 항돌연변이원성 물질을 탐색하려는 연구가 많이 진행되어 왔다. 국내산 생약재를 대상으로 항돌연변이원성을 탐색한 결과, 단삼 (Ahn, 1999), 결명자 (Ahn, 2009), 숙지황 (Ahn, 1998)과 같이 전통적으로 식용되어온 생약재로 부터 항돌연변이원성을 보고하고 있다. 또한 bacterial mutation assay를 이용하여 4-NQO, MNNG, MMC, H₂O₂ 및 aflatoxin B₁ (AFB₁)과 B(a)P에 대한 항돌연변이원성 인자를 탐색하기 위하여 95종 생약재의 열수 추출물을 bacterial mutation assay를 이용하여 체계적으로 검색한 결과 (Song *et al.*, 1997a,b; Ahn *et al.*, 1998). 4-NQO, MNNG, MMC, H₂O₂ 및 과 B(a)P의 변이원에 의해 유도된

[†]Corresponding author: (Phone) +82-63-850-0743 (E-mail) ahn2002@jbnu.ac.kr

Received 2011 September 7 / 1st Revised 2011 December 22 / 2nd Revised 2012 January 31 / Accepted 2012 February 2

변이원성을 공통적으로 억제하는 빈랑을 발견하였다. 따라서 본 연구에서는 빈랑 (*Areca catechu* L.)의 활성 물질을 분리하여 그의 작용기작에 관한 연구를 수행하기 위한 전 단계로써, 빈랑 물 추출물의 활성 분획물을 이용하여 변이원의 억제 효과를 비교조사한 후 용량적 억제효과를 확인하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 재료 및 시약

본 실험에 사용한 빈랑 (*Areca catechu* L.)은 완주군 삼례읍 소재한 한약방에서 기증받아 사용하였다. Aflatoxin B₁ (AFB₁), *N*-methyl-*N*-nitro-*N'*-nitrosoguanidine (MNNG), mitomycin C (MMC) and 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO), *o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG) 및 *p*-nitrophenyl phosphate disodium (PNPP)는 시그마회사 (St. Louis, MO, USA)로 부터 구입하여 사용하였다.

2. 시험균주

SOS Chromotest의 기본 균주인 *Escherichia coli* PQ37 [*sfiA*: Mud (Ap *lac*)*cts lacΔU169 mal⁺ uvrA galE galY* PhoC *rfa*]은 P. Quillardet 박사 (Pasteur 연구소, France)로 부터 1994년도에 제공 받아 각각의 유전형질을 확인한 후 사용하였다.

3. 추출 및 용매분획

감압 건조된 시료에 10배 (w/v)량의 증류수를 가하여 수욕 상에서 환류냉각 (20°C)하면서 2회 추출한 후 여과 및 동결건조하여 물 추출물로 사용하였다. 동결건조한 물 추출물에 메탄올을 가하여 진탕한 후 여과 (Whatman No. 2)하여 메탄올 가용성, 불용성 (여과박)으로 분리하였다. 메탄올 가용성 분획물을 회전감압하여 농축하여 (50°C) 용매를 완전히 제거하였고, 불용성 분획물은 증류수에 용해한 후 동결건조하여 사용하였다. 메탄올 가용성 분획물을 다시 용매의 극성에 따라 분획하였다. 즉, 메탄올 가용성 분획물을 10배 (w/v)량의 물에 분산시킨 후 동량의 에틸아세테이트를 가하고 2회씩 추출하여 에틸아세테이트 분획을 얻었다. 같은 방법으로 남아있는 수층을 부탄올로 추출 농축하여 부탄올 분획물과 수용성 분획물을 얻었다. 수용성 분획물은 멸균된 2차 멸균수에, 에틸 아세테이트와 부탄올 분획물은 dimethylsulfoxide (DMSO)에 용해하여 사용하였다.

4. 돌연변이원성 억제시험

SOS Chromotest는 Quillardet와 Hofnung의 방법 (Quillardet and Hofnung, 1985)에 준하여 수행하였으며, 변이원 및 균의

최적 농도를 각각 설정하였다. Lamp 배지 (bacto tryptone 10 g, bacto yeast extract 5 g, NaCl 6 g/L)에 하룻밤 배양된 배양액을 2% (v/v)가 되도록 접종하여 37°C에서 2시간 진탕 배양 하였다. 각각의 멸균 시험관에 10배 (v/v) 희석된 균 배양액 0.6 mL를 분취하고, 여기에 각 농도의 변이원 및 시료 10 μL를 혼합한 다음, 37°C에서 2시간 배양하였다. 생약 시료의 색소로 인한 효소반응 측정의 간섭을 방지하기 위하여 배양액을 4°C에서 25분간 원심분리 (1,200 × g)하여 상등액을 제거한 후 잔사에 0.6 mL의 Lamp 배지를 현탁시킨 균 부유액 0.2 mL를 취하여 각각의 효소 활성을 측정하였다. β-galactosidase는 415 nm, alkaline phosphatase는 400 nm 에서 흡광도 (O.D.)를 측정하였으며, 활성 단위는 흡광도 × 1,000/반응시간 (분)으로 계산하였다. Ratio (R)값은 β-galactosidase unit/alkaline phosphatase unit로 계산하였고, SOS 반응의 유도정도를 나타내는 유도지수 (Induction Factor; IF)는 R(C)/R(0)로 나타내었다. R(C)는 변이원 또는 변이원과 시료를 같이 첨가한 시험구의 R 값이며, R(0)은 변이원과 시료를 첨가하지 않았을 때의 R 값으로 1로 정하였다. 돌연변이 억제효과는 $[(IF_0 - IF_s) / IF_0] \times 100$ 으로 계산하였고, 변이원만을 첨가한 양성 대조구의 IF 값은 IF₀, 시료 첨가구의 IF 값은 IF_s로 나타내었다 (Su *et al.*, 1995). 모든 실험은 3 시료를 분석한 값의 평균값을 나타내었다.

결과 및 고찰

1. 물 추출물의 돌연변이원성 억제효과

빈랑 물 추출물의 돌연변이 억제효과를 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO), *N*-methyl-*N*-nitro-*N'*-nitrosoguanidine (MNNG), mitomycin C (MMC) 및 aflatoxin B₁ (AFB₁)의 변이원성에 대하여 SOS Chromotest로 조사 한 결과는 Fig. 1과 같다.

Fig. 1. Inhibitory effects of hot water-extracted *Areca catechu* L. on mutagenicity of mutagens in *E. coli* PQ37 at 161.29 μg/mL.

Table 1. Inhibitory effects of methanol-soluble and methanol-insoluble parts of *Areca catechu* L. on mutagenicity of MNNG in *E. coli* PQ37 at 161.29 $\mu\text{g/mL}$.

Mutagen	Experiment	$\beta\text{-gal}^*$ (unit)	Ap ^{**} (unit)	Induction factor	Inhibition rate(%)
MNNG	Negative control	2.33	2.40	1.00	
	Positive control	8.40	22.0	3.84 $\pm$ 0.05 ^{***}	
	Methanol insoluble	9.0	32.6	2.04	47.0 $\pm$ 0.5
	Methanol soluble	4.60	31.3	2.77	28.0 $\pm$ 0.5

* β -Galactosidase activity (units), **Alkaline phosphatase activity (units), ***Mean $\pm$ S.D of 3 dependent assays.

빈랑의 물 추출물은 4NQO의 변이원성에 대하여 32.0%, MNNG의 변이원성에 대하여 47.0%, MMC의 변이원성에 대하여 46.0%, AFB₁의 변이원성에 대하여 41.0%의 억제 효과를 나타내었다. 변이원성을 나타내는 변이원의 기작은 각각 다르나 MNNG는 methyl diazonium hydroxide로 대사되어 carbonium ion (CH_3^+)이 친핵체 중앙에 결합하여 염기의 알킬화를 유발하며 (Gicher *et al.*, 1988) 알킬화된 염기는 직접적인 mispairing이나 single strand break을 일으켜 돌연변이를 유발한다 (Quillardet and Hofnung, 1987). 따라서 빈랑 물 추출물에 함유된 활성물질은 DNA adducts를 일으키는 변이원에 의한 돌연변이원성보다는 직접적인 mispairing 또는 DNA strand break을 일으키는 과정에서 변이원성을 차단하거나 세포내 돌연변이를 차단하는 효능이 가장 강한 것으로 사료되는 바이다.

따라서 빈랑 물 추출물의 활성성분의 극성을 파악하기 위하여 빈랑 물 추출물을 메탄올 불용성 및 가용성 분획으로 분리하여 각각의 분획물의 돌연변이원성 억제효과를 비교하였다 (Table 1). 100 $\mu\text{g/assay}$ (620 μL) 농도에서, MNNG에 대한 빈랑 물 추출물의 메탄올 불용성 및 메탄올 가용성에 돌연변이 억제효과는 각각 47.0% (메탄올 불용성) 및 28.0 (메탄올 가용성)로 메탄올 불용성 분획이 유의적으로 높은 항돌연변이 효과를 나타내었으며 이러한 결과는 빈랑 물 추출물의 활성성분이 수용성임을 확인 할 수 있었다.

2. 용매분획물의 돌연변이원성 억제효과

돌연변이원성이 확인된 빈랑 물 추출물의 메탄올 불용성 분획물에 함유된 돌연변이원성의 물질을 분리하고자 메탄올 불용성 부분을 에틸아세테트, 부탄올과 물을 사용하여 순차적으로 분획한 다음 각 분획물들의 돌연변이원성에 대한 억제효과를 조사한 결과 물 분획은 46%, 부탄올 분획은 20.5%, 에틸아세테이트는 15.4%의 억제효과를 나타내었다 (Fig. 2). 이러한 결과는 빈랑 물 추출물의 활성물질의 극성이 매우 높은 물질로 해석되는 바이다.

빈랑 열수추출물의 메탄올 불용성물질로부터 용매분획한 물 분획물의 농도를 assay (620 μL)당 1.0, 10, 100 및 250 μg 으로 증가시켰을 경우, 항돌연변이 효과는 각각 12.0%, 24.0%,

Fig. 2. Inhibitory effects of solvent fractions of methanol-insoluble part from hot water-extracted *Areca catechu* L. on mutagenicity of MNNG in *E. coli* PQ37 at 161.29 $\mu\text{g/mL}$.

47.5% 및 62.0%로 나타났다. 이러한 결과로부터, 빈랑 물 분획물은 MNNG의 변이원성에 대하여 용량 의존적 억제효과를 나타냄을 확인하였다. SOS Chromotest를 이용한 돌연변이 억제시험은 시험균주를 유전독성물질과 함께 일정 시간 배양한 후 β -galactosidase 활성의 억제 정도를 측정하고 있는데 lag phase의 연장이나 균수의 감소로 인해 β -galactosidase unit가 감소되어 위양성의 돌연변이 억제효과를 나타낼 수도 있다 (Quillardet and Hofnung, 1985). 그러나 열수추출물의 메탄올 불용성물질로부터 용매분획한 물 분획물의 농도가 증가 될수록 구성 효소인 alkaline phosphatase의 unit가 증가된 결과는 용매분획한 물 분획물의 돌연변이 원성 억제효과가 균수의 감소 및 균의 활력 저 하에서 기인된 결과가 아닌 돌연변이 억제효과에 의한 것임을 확인할 수 있었다 (Table 2).

메탄올로 추출한 빈랑의 용매분획물 중 n-hexane 분획물을 제외한 각 분획물이 장내 유해세균에 대한 강한 항균효과 (Lee *et al.*, 1998)를, Kristina 등 (1989)은 빈랑 물 추출물의 세포독성 및 유전독성을, Van 등 (1994)은 빈랑 열수추출물의 조직세포의 생육 저해와 독성을 보고한 바 있다.

빈랑의 항돌연변이 효과에 대한 연구 결과가 없어서 유효성분의 극성을 비교 할 수는 없으나 연구 결과와 본 실험결과를

Table 2. The dose-response effects of aqueous fraction of methanol-insoluble from hot water extracted *Areca catechu* L. on mutagenicity of MNNG in *E. coli* PQ37.

Concentration (μ g)	β -gal [*] (unit)	Ap ^{**} (unit)	Induction factor	Inhibition rate (%)
Negative control	2.33	23.46	1.00	
Positive control	8.40	22.0	3.84 $\pm$ 0.05 ^{***}	
1.0	7.80	23.33	3.36	12.0 $\pm$ 0.5 ^c
10	6.80	23.53	2.90	24.0 $\pm$ 1.5
100	5.20	25.53	2.05	47.0 $\pm$ 0.5
200	7.0	31.3	1.48	62.0 $\pm$ 3.0

^{*} β -Galactosidase activity (units), ^{**}Alkaline phosphatase activity (units), ^{***}Mean $\pm$ S.D of 3 dependent assays.

종합해 볼 때 빈랑의 물 추출물에 함유된 강한 항균성 물질은 극성이 매우 높은 물질은 아닐 가능성이 크다고 해석 할 수 있다.

이상의 실험결과로부터 빈랑 물 추출물에는 MNNG로부터 유도된 돌연변이원성에 대한 항돌연변이원성이 뛰어난 수용성 활성 물질이 함유되어 있음을 확인하였으므로 이에 적합한 분리 시스템을 이용하여 활성성분의 분리 동정이 수행되어야 할 것으로 사료된다.

LITERATURE CITED

- Ahn BY, Kim DG and Choi DS.** (1999). Antimutagenic effect of Tanshen (*Salvia miltiorrhiza* Bunge). Korean Journal of Microbiology and Biotechnology. 27:197-202.
- Ahn BY, Maeng IK and Choi DS.** (1998). The inhibitory effects of medicinal plants on the mutagenicity of hydrogen peroxide. Journal of Woosuk University (HRDEC). 3:13-22.
- Ahn BY, Lee KS, Maeng IK, Song GS and Choi DS.** (1998). Bio-antimutagenic effect of water extract from *Rehmannia glutinosa* Liboschitz in SOS Chromotest. Korean Journal of Food Science and Technology. 30:439-445.
- Ahn BY.** (2009). Desmutagenic effect of water extract from *Cassia tora* L. on the mutagenicity of N-methyl-N-nitro-N'-nitrosoguanidine in *E. coli* PQ37. Journal of Food Hygiene and Safety. 24:46-49.
- Ferguson LR.** (1994). Antimutagen as cancer chemopreventive agents in the diet. Mutation Research. 307:395-410.
- Gichner T and Veleminsky J.** (1988). Mechanisms of inhibition of N-nitroso compounds-induced mutagenicity. Mutation Research. 202:325-334.
- Hathcock JN.** (1987). Mutagens in cooked foods, Nutritional toxicology. Vol. II, Academic Press Inc. Orlando, USA. p. 57.
- Hayatsu H, Arimoto S and Negishi T.** (1989). Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Mutation Research. 202: 429-446.
- Ho CT, Lee CY and Huang MT.** (1992). Phenolic compounds in food and their effects on health. American Chemical Society Symposium. 506:102-117.
- Kata T, Morita K and Inoue T.** (1981). Anti-mutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. Mutation Research. 53:351-219.
- Kristina S, Yun L, Jagadeesan N, Helmut B, Kristina A and Roland CG.** (1989). Cytotoxic and genotoxic effects of Areca-related compounds in cultured human buccal epithelial cells. Cancer Research. 48:5294-5298
- Lee KS, Kim SH, Chun SH, Park SS and Shin YS.** (1998). Antimicrobial activity of *Areca catechu* L. extract of against intestinal pathogens. Korean Journal of Food and Nutrition. 11:36-40.
- Ohta T, Watanabe K, Moriya M and Shirasu Y.** (1983). Antimutagenic effects of cinnamaldehyde on chemical mutagenesis in *Escherichia coli*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 107:219-227.
- Ohta T, Watanabe M, Shirasu Y and Inoue T.** (1982). Post-replication repair and recombination in *uvrA umuC* strains of *Escherichia coli* are enhanced by vanillin, an antimutagenic compound. Mutation Research. 201:107-112.
- Quillardet P and Hofnung M.** (1985). The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: Procedures. Mutation Research. 147:65-78.
- Quillardet P and Hofnung M.** (1987). Induction of the SOS system in a dam-3 mutant: a diagnostic strain for chemicals causing DNA mismatches. Mutation Research. 177:17-26.
- Song GS, Ahn BY, Lee KS, Maeng IK and Choi DS.** (1997a). Effect of hot water extracts from medicinal plants on the mutagenicity of indirect mutagens. Korean Journal of Food Science and Technology. 29:1288-1294.
- Song GS, Ahn BY, Maeng IK, Kwon YJ, Han SB and Choi DS.** (1997b). Antimutagenicity screening of water extracts from chinese herb with SOS Chromotest with several direct mutagens. Food and Biotechnology. 6:214-218.
- Su HY, Chong SH, Chen CC and Lee H.** (1995). Emodin inhibits the mutagenicity and DNA adducts induced by 1-nitropyrene. Mutation Research. 329:205-212.
- Van W CW, Oliver A, De Miranda CM, Van der Bijl P and Grobler-Rabie AF.** (1994). Observations on the effect of areca nut extracts on oral fibroblast proliferation. Oral Pathology & Medicine. 23:145-148.
- Waters MD, Brady AL, Stack HF and Brockman HE.** (1990). Antimutagenicity profiles for some compounds. Mutation Research. 238:59-64.