J. Fd Hyg. Safety
Vol. 25, No. 3, pp. 215~219 (2010)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

섬오가피에 대한 항돌연변이원 시험

조명찬 · 홍창의[1] · 유수연*
대구한의대학교 한약재 약리학과, [1]영남대학교 약학과

Antimutagenic Study on *Acanthopanax Koreanum* Nakai

Myung-Chan Cho, Chang-Eui Hong[1], and Su-Yun Lyu*
Dept. of Herbal Medicinal Pharmacology, Daegu Haany University, 290 Yugok-dong Gyungsan, Gyeonsangbuk-do 712-715, Korea
[1]Dept. of Pharmacy, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea
(Received July 28, 2010/Revised August 10, 2010/Accepted August 16, 2010)

ABSTRACT - This study was undertaken to investigate the mutagenicity and antimutagenicity of *Acanthopanax koreanum* Nakai. Antimutagenic study on extract of *A. koreanum* was studied using the test with *Salmonella typhimurium* TA100, TA98. And mutagenicity study was studied using the test with *S. typhimurium* TA100, TA98, TA1535, TA1537 and *Escherichia coli* WP2 *uvr* A. *A. koreanum* was negative in Ames test with *S. typhimurium* and *E. coli* with or without S-9 mixture. Test substances of 5000 μg/μl, 2500 μg/μl and 600 μg/μl of *A. koreanum* extracts were chosen *via* toxicity test. Ames test was performed on positive control group, experimental group and negative control group in the presence of the metabolic activation system and metabolic non-activation system. As a result, there was no coherent increase and reverse mutation in all concentrations. Therefore, *A. koreanum* does not cause reverse mutation. In addition, *A. koreanum* showed strong antimutagenic activities in *S. typhimurim* TA100 and TA98. In conclusion, *A. koreanum* root may be an excellent antimutagenic agent.

Key words: Antimutagenic, *Acanthopanax koreanum*, *Salmonella typhimurium*, Ames test

섬오갈피 (*Acanthopanax koreanum* Nakai)는 오갈피나무속 (Eleutherococcus) 수종으로 두릅나무과 (Araliaceae)에 속하는 나무이다. 그리고 우리나라 제주도의 해발 1400 m 이하에서 자생하는 제주특산 수종으로 제주도산이라 하여 '탐라오갈피 (Tamraukogi)'라고도 부른다[1-2].

섬오갈피 (*A. koreanum* Nakai)의 뿌리, 줄기 그리고 잎의 주요성분으로는 lignans 배당체, flavonoid, diterpenoid 등이 있으며 그 중 뿌리에만 유독 acanthoic acid 성분이 대량으로 함유되어 있다는 연구가 보고되고 있다[3]. 그리고 한국에서 전통적으로 몸을 가볍게 하는 치료제로 쓰이고 있으며, obesity (비만), rheumatoid (류마티즘), diabetes mellitus (당뇨병), hepatitis (간염) 등의 병증에 쓰이는 것으로 밝혀졌으나, 섬오갈피의 열매는 생리학적 정보가 많이 나와 있지 않은 것이 실태이다[4].

1965년 Ovodv 등에 의해 가시오갈피의 뿌리에서 lignans 배당체인 eleutheroside A가 분리 보고된 이후 인체에 미치는 약리적 활성이 밝혀짐에 따라 항피로, 항스트레스, 중추신경 흥분, 대사촉진, 근육강화, 항암, 항염증, 해독작용 등 생체기관의 전반적인 기능 증대에 대한 연구 결과가 나오고 있다[5]. 또한, 항산화활성을 가지는 eleutheroside B 성분[6]이 가시오가피 (*Acanthopanax senticosus*)와 섬오갈피 (*A. koreanum* Nakai)에 존재한다는 연구 결과에 따라 여러 연구가 행하여지고 있다[7].

하지만 주름억제 효능 같은 피부 미용에 좋은 가시오갈피 (*A. senticosus*)에 대한 연구[8] 는 활발히 되는데 비해 국내 제주도에서만 자생하는 섬오갈피 (*A. koreanum* Nakai)는 뛰어난 효능에 비해 연구가 많이 이루어지지 않고 있는 실정이다.

본 시험은 이러한 섬오갈피 (*A. koreanum* Nakai) 뿌리의 효능과 약리적 성분을 토대로 복귀돌연변이 시험과 항돌연변이원 시험의 돌연변이원 억제를 살펴보았다.

재료 및 방법

시험 재료 및 균주

본 시험에 사용한 *Acanthopanax koreanum* Nakai의 뿌리추출물은 서울여자대학교 화학과 박원봉 교수에게 섬오

*Correspondence to: Su-Yun Lyu, Department of Herbal Medicinal Pharmacology Daegu Haany University, 290, Yugok-dong, Gyeongsan-si, Gyeongbuk 712-715, Korea
Tel: 82-53-819-1333, E-mail: address: lyu@dhu.ac.kr

갈피 뿌리 추출물 50 g을 제공받았다. 항돌연변이원 시험에 사용된 균주인 *S. typhimurium* 구조이동형 (frame shift) 변이균주인 TA98과 염기치환형 (base-pair substituent) 변이균주인 TA100[9], TA1535, *E. coli* WP2 *uvr* A은 한국 생명공학연구원 생명자원센터 (The Korea collection for type cultures, KCTC, Korea)에서 분양한 것을 제공 받았고, TA1537 균주는 Moltox (Boone, NC, USA)에서 분양 받았다. 그리고 돌연변이 유발원인 양성물질로 9-aminoacridine (9AA, Sigma, St. Louis, MO, USA), sodium azide (SA, Sigma)와 2-aminoanthracene (2-AA, Sigma)와 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) -acrylamide (AF-2, Wako, Japan)를 구입하였으며, 대사활성물질인 S9 (2 ml × 10, Wako) 과 S9-cofactor (9 ml × 10, Wako)를 구입하여 사용하였다.

5% S9 mix 조제

S9 mix는 S9 fraction (Wako) 과 cofactor (Wako) 로 5% 조제하였다. S9 mix 1 ml의 조성은 8 μmol $MgCl \cdot 6H_2O$, 33 μmol KCl, 5 μmol G-6-p, 4 μmol NADPH, 4 μmol NADH, 100 μmol sodium phosphate buffer (pH 7.4) 및 45 μl S9 fraction으로 하여 단백질 함량을 1.6 mg/ml가 되게 조제하였고 처리농도는 500 μl/plate로 하였다.

예비독성 시험

A. koreanum Nakai의 부위별 추출물을 항돌연변이원 시험에 사용되는 농도를 결정하기 위하여 예비독성 시험으로 형질 확인 및 최고농도결정 시험을 실시하였다. 형질확인 시험에서는 TA98과 TA100에 대한 균주를 확인하였다.

형질확인 및 최고농도결정 시험에서는 뿌리 추출물 50 mg/ml에 대한 농도를 5000 μg/plate, 2500 μg/plate, 1250 μg/plate, 625 μg/plate, 312 μg/plate, 150 μg/plate, 80 μg/plate의 8개 농도 중 3개 (최대, 중간, 최소) 농도로 결정하였다. 뿌리 추출물 50 mg/ml 중에서 0.1 ml를 dimethyl sulfoxide (DMSO, Generay biotech, Shanghai, China) 0.9 ml에 넣어 농도 5000 μg/plate을 조제 한 후 최대농도결정 시험을 시행하였다.

예비 양성물질 농도결정 시험

항돌연변이원 시험에 들어 갈 양성물질 농도 결정을 위해 예비 양성물질 농도 시험을 시행하였다. 양성물질 SA, AF-2, 2-AA 농도 3개를 각각 농도결정시험을 통해 각 2개의 농도로 결정하였으며 시험은 preincubation[10-11] 법에 준하여 시행하였다.

Ames Test

복귀돌연변이시험은 Ames test[10-11]에 준하여 incorpration[10-11] 법으로 다음과 같이 실시하였다. 돌연변이원성의 검사를 위해서 S9 mix 와 phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4, Sigma)을 사용하며, shaking incubator (37ºC, 201 rpm, Vision Scientifics Co Ltd, Korea) 8~12시간 배양된 *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 그리고 *E. coli* WP2 *uvr* A 과 −20ºC에 냉동 보관중인 *A. koreanum* Nakai의 뿌리 추출물을 5000 μg/plate, 2500 μg/plate, 600 μg/plate 농도로 시험하였다. 이 시험에 쓰인 *A. koreanum* Nakai의 뿌리 추출물의 농도는 위의 최고농도결정 시험을 통하여 농도 5000 μg/plate, 2500 μg/plate, 600 μg/plate로 결정하였다.

45ºC의 histidine/biotin top agar 2 ml씩을 5 ml tube에 넣고 water bath (48ºC, DAIHAN Scientific Co Ltd, Korea)에 보관한다. 그 다음에 S9 mix 또는 PBS을 500 μl씩 넣은 후 섬오갈피 뿌리를 농도 별로 100 μl씩 넣은 후 각각 3초 간 약하게 vortex하여 각각 *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 균주를 100 μl씩 넣고 손으로 shaking하여 glucose minimal agar plate (GM agar plate)에 도말한 후 incubator에 37ºC로 48시간 배양한 후 revertant 수를 계수한 것을 확인하였다. *E. coli*을 이용한 시험은 tryptophan top agar를 2 ml씩 분주하고 다음 시험은 동일하게 시행하였다.

항돌연변이원 시험

항돌연변이원 시험은 Ames test을 개량한 preincubation[11] 법으로 다음과 같이 실시하였다. 항돌연변이 원성의 검사를 위해서 S9 mix 와 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4, Sigma)을 사용한다. 그리고 master plate에서 배양시킨 균주 TA98, TA100를 nutrient broth에 접종 한 후, shaking incubator (37ºC, 201 rpm, Vision Scientifics Co Ltd.)에서 약 8~12시간 동안 배양된 균주 TA98, TA100 ($1\sim2 \times 10^8$ cells/ml)를 사용하였고 −20ºC에 냉동 보관중인 *A. koreanum* Nakai의 뿌리 추출물을 5000 μg/plate, 2500 μg/plate, 1250 μg/plate 농도로 시험[12]하였다.

15 ml tube에 *S. typhimurium* TA98, TA100 균주를 100 ml씩 넣은 후 시험물질 부위별 돌연변이 유발물질 50 μl과 양성물질 50 μl 씩 농도 별로 넣은 후 각 각 5% S9 mix 또는 PBS을 500 μl 씩 넣고 손으로 shaking한 후 shaking incubator에 20분 간 진탕배양 (37ºC, 201 rpm)한 후 45ºC의 water bath에 보관 중이던 histidine top agar 2 ml씩을 넣고 glucose minimal agar plate (GM agar plate)에 도말한 후 incubator에 37ºC로 48시간 배양한 후 revertant 수를 계수한 것을 확인하고 항돌연변이원성을 판정하였다. 돌연변이 억제효과는 다음의 inhibition rate[13]공식에 의했다.

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

a: 돌연변이원에 의해 유도된 복귀돌연변이 수
b: 시료를 처리하였을 때의 복귀돌연변이의 수
c: 돌연변이원과 시료가 없을 경우의 자연복귀돌연변이 수

결과 및 고찰

Ames test

S. typhimurium TA100, TA98, TA1537, TA1535 및 *E. coli* WP2 *uvr* A에 대한 Ames test 결과 Table 1에 나타나있다. 생육억제가 나타나지 않은 최고농도 5000 μg/plate, 중간농도 2500 μg/plate, 최소농도 600 μg/plate로 Ames test를 시행하였다.

Ames test 결과 Table 1과 같이 복귀돌연변이 집락군 수가 농도, 용량 의존적으로 증가하고 통계학적으로 1개 이상의 농도에서 재현성이 있는 증가를 나타낼 때 양성으로 판정하게 되나 집락군의 상승도 대사활성계의 유무와 상관없이 관찰되지 않아 결과는 음성을 판정하였다.

항돌연변이 시험

항돌연변이라 함은 돌연변이가 일어나는 것을 억제하는 것을 말한다. 하지만 돌연변이의 억제는 시험법, 변이원, 균농도 및 균의 종류에 따라 경향이 다르게 나타날 수 있음은 물론 억제의 유-무까지도 다르게 나타날 수 있기 때문에 3번의 시험을 걸쳐 결과를 도출하였다. 또한, 섬오갈피의 뿌리에서 나타나는 약용성분 중 항균, 항스트레스의 생리활성을 항돌연변이 시험을 통해 결과를 도출하였다.

섬오갈피 뿌리 추출물을 각각 5000 μg/plate, 2500 μg/plate, 1250 μg/plate 농도로 돌연변이원 억제효과를 시험하였고, 돌연변이원으로 양성물질 SA, AF-2, 2-AA를 사용하였다. 결과로 inhibition rate와 revertant 수를 계수한 것은 각각 Table 2과 Table 3에 나타나 있다.

S. typhimurium TA98에서 항돌연변이 효과는 2AA의 양성물질일 때 Table 2에 나타나 있는 거와 같이 농도 0.5 μg/plate 대사활성계 S-9을 넣었을 때 각 90%, 88%, 91%의 억제률의 높은 억제율을 보여주고 있고 1 μg/plate 대사활성계 S-9을 넣었을 때 각 76%, 80%, 85%의 높은 억제율을 보이고 있다. 반면 농도 0.01 μg/plate 비대사활계일 때 AF-2의 양성물질은 각 농도 별로 70%, 55%, 36%의 어느 정도의 억제율을 보여주고 있다.

S. typhimurium TA100에서 항돌연변이 효과는 Table 3와 같이 대사활성계가 포함된 2AA의 농도 1 μg/plate 양성물질 일 때 각 86%, 75%, 91%의 높은 억제율이 나타났다. SA의 양성물질 일 때는 각 농도 별로 1 μg/plate일 때 13%, 41%, 30%의 억제율인데 반해 0.5 μg/plate일 때 58%, 57%, 45%의 좀 더 높은 억제율을 보였다 ($p < 0.05$).

이런 결과를 통해 섬오갈피 뿌리의 돌연변이원이 억제의 탁월한 효과를 갖고 있다는 것을 시사하였으며 *S. typhimurium* TA100보다 *S. typhimurium* TA98에서 더 강한 항돌연변이 효과가 있는 것을 도출하였다. 하지만 TA100 2AA의 농도 1 μg/plate 양성물질 일 때는 높은 억제율을 보여주고 있다.

시험결과를 통해 섬오갈피 뿌리는 TA100에선 TA98보단 못한 억제효과가 나타났지만 어느정도의 억제율을 보였고 TA98에선 강한 억제율이 나타난 결과를 보았을 때 항돌연변이효과가 있다는 것은 앞에서 말했다시피 돌연변이원을 억제해준다는 의미이므로 뿌리를 이용한 항스트레스, 항균작용, 항진작용[14] 더 크게 나아가 항암작용에도 효능이 있다는 다른 연구논문[7]의 뒷받침을 해주는 근거로 유용하게 쓰이는 바람이다.

요 약

본 연구는 섬오갈피 뿌리 추출물을 이용하여 돌연변이

Table 1. Numbers of colonies in TA98, TA100, TA1535, TA1537, and *E. coli* when treated with *A. koreanum* Nakai root extracts

Metabolic activation system	Test substance	Conc. (μg/plate)	Number of colonies (Mean ± SD)				
			TA100	TA98	TA1537	TA1535	WP2 *uvr*A
S9 Mix (-)	DMSO	100 μg/plate	109 ± 13	10 ± 1	11 ± 2	9 ± 3	14 ± 1
		5000	99 ± 11	12 ± 1	13 ± 1	6 ± 2	12 ± 2
	AKN	2500	123 ± 15	14 ± 2	11 ± 1	11 ± 1	14 ± 2
		600	112 ± 12	12 ± 1	14 ± 2	15 ± 2	17 ± 1
	SA		765 ± 37			420 ± 18	
	9-AA				271 ± 12		
	AF-2			210 ± 15			547 ± 21
S9 Mix (+)	DMSO	100 μg/plate	113 ± 8	18 ± 2	6 ± 1	10 ± 1	19 ± 1
		5000	119 ± 5	13 ± 1	9 ± 1	9 ± 1	19 ± 2
	AKN	2500	73 ± 6	13 ± 1	4 ± 1	10 ± 2	18 ± 1
		600	107 ± 11	14 ± 1	8 ± 1	11 ± 1	18 ± 2
	2-AA		523 ± 25	340 ± 17	408 ± 19	225 ± 17	626 ± 13

AKN: *Acanthopanax koreanum* Nakai, SA: sodium azide, 9-AA: 9-aminoacridine, AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)-acrylamide, 2-AA: 2-aminoanthracene Reported as mean ± SD of two independent replicates.

Table 2. Numbers of revertant colonies and inhibation rate on *A. koreanum* root extract with TA98, with or without S-9 mixture

Metabolic activation system	Test substance (μg/plate)	Part	Conc. (μg/plate)	Number of colonies (Mean ± SD)	Inhibition rate (%)
Type culture strain				TA98	Inhibition rate (%)
S9 Mix (-)	PBS	-	100 μg/plate	18 ± 4	-
	AF-2(0.01)	Root	5000	252 ± 14*	49
			2500	201 ± 15*	60
			1250	94 ± 8*	83
	AF-2(0.0025)	root	5000	43 ± 10*	76
			2500	70 ± 17*	49
			1250	94 ± 8*	36
	PC(0.01)	-	-	473 ± 14	-
	PC(0.0025)	-	-	119 ± 17	-
S9 Mix (+)	PBS	-	100 μg/plate	22 ± 2	-
	2-AA(1.0)	Root	5000	329 ± 12*	76
			2500	285 ± 35*	80
			1250	220 ± 14*	85
	2-AA(0.5)	root	5000	64 ± 18*	90
			2500	76 ± 11*	88
			1250	60 ± 7*	91
	PC(1.5)		-	1309 ± 75	-
	PC(0.5)		-	472 ± 19	-

PC: positive control, AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)-acrylamide, 2-AA: 2-aminoanthracene Reported as mean ± SD of two independent replicates.
*Significant difference in comparison with positive control at $p < 0.05$ (unpaired student's *t*-test).

Table 3. Numbers of revertant colonies and inhibation rate on *A. koreanum* root extract with TA100, with or without S-9 mixture

Metabolic activation system	Test substance (μg/plate)	Part	Conc. (μg/plate)	Number of colonies (Mean ± SD)	Inhibition rate (%)
Type culture strain				TA100	Inhibition rate (%)
S9 Mix (-)	PBS	-	100 μg/plate	210 ± 2	
	SA(1)	Root	5000	568 ± 4	12
			2500	449 ± 4*	41
			1250	496 ± 15	30
	SA(0.5)	Root	5000	343 ± 3*	58
			2500	346 ± 7*	57
			1250	384 ± 4*	45
	PC(1)	-	-	617 ± 28	-
	PC(0.5)	-	-	325 ± 17	-
S9 Mix (+)	2-AA(1.0)	Root	5000	246 ± 4*	86
			2500	282 ± 2*	75
			1250	230 ± 7*	91
	2-AA(0.5)	Root	5000	243 ± 13*	79
			2500	256 ± 10*	73
			1250	141 ± 4*	81
	PC(1)	-	-	617 ± 17	-
	PC(0.5)	-	-	525 ± 12	-

PC: positive control, SA: sodium azide, 2-AA: 2-aminoanthracene.
Reported as mean ± SD of two independent replicates.
*Significant difference in comparison with positive control at $p < 0.05$ (unpaired student's *t*-test).

유발을 관찰하기 위해 *S. typhimurium* TA100, TA98, TA1535, TA1537과 *E. coli* WP2 *uvr* A를 이용해 Ames test을 하였고 또한 *S. typhimurium* TA100, TA98을 이용한 항돌연변이원 억제 시험을 시행하였다. Ames test에 필요한 시험물

질들은 최고농도 결정을 통해 5000 μg/plate, 2500 μg/plate, 600 μg/plate의 시험물질을 양성대조군, 실험군, 음성대조군을 비대사활성계와 대사활성계로 나누어 시험을 시행하였다. 시험 결과 모든 농도에서는 집락군의 일관성 있는 증가는 보이지 않았고 이 점으로 미루어 보아 복귀돌연변이는 일어나지 않았고 음성으로 판정하였다. 항돌연변이원 시험에서는 양성물질의 농도결정과 시험물질의 최고농도 결을 통해 양성대조군, 실험군, 음성대조군을 비대사활성계와 대사활성계로 시험을 하였고 시험결과 *S. typhimurium* TA100, TA98 두 균주 돌연변이 억제를 보였으며 TA98에서 더 높은 억제율을 보였다. 시험결과로 섬오갈피의 뿌리는 항돌연변이 억제효과에 탁월한 효과가 있음을 시사하였다.

참고문헌

1. Han, J.K., Chang, K.S. and Nam, K.C.: Growth of seedling and germination characteristics of *Acanthopanax koreanum* Nakai. *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **11**, 46-52 (2003).
2. 임병선, 이점숙, 김하송: 지리산오갈피와 섬오갈피의 생육특성 및 자생지 식생조사. 한국자원식물학회지, **12**, 125-132 (1999).
3. Lim, J.H., Lee, S.H., Jun, B.S., Yang, Y.T. and Koh, J.S.: Changes in major constituents by soaking of *Acanthopanax koreanum* with spirit solution. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem*., **48**, 166-172 (2005).
4. Yang, E.J., Moon, J.Y., Lee, J.S., Koh, J.S., Lee, N.H. and Hyun, C.G.: *Acanthopanax koreanum* fruit waste inhibits lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and prostaglandin E2 in RAW 264.7 macrophages. *J. Biomed. Biotechnol.*, **2010**, 715-739 (2010).
5. 박소영: 약이 되는 나무: 섬오갈피나무. 산림조합중앙회, 산림 통권474호, pp. 112-114 (2005).
6. 이상은, 손동욱, 윤여필, 이상윤, 이범종, 이상현: 산화적 스트레스에 대한 섬오갈피 메탄올 추출물의 보호 효과. 생약학회지, **37**, 16-20 (2006).
7. Lee, S.H., Kang, S.S., Cho, S.H., Ryu, S.N. and Lee, B.J.: Determination of eleutherosides B and E in various parts of *Acanthopanax* Species. *Kor. J. Pharmacogn.*, **36**, 70-74 (2005).
8. Park, K.J., Park, S.H. and Kim, J.K.: Anti-wrinkle activity of *Acanthopanax senticosus* extract in ultraviolet B (UVB)-induced photoaging. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **39**, 42-46 (2010).
9. Lee, J.Y. and Ahn, M.S.: Mutagenicity of thermally oxidized soybean oil. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **32**, 1213-1220 (2000).
10. Ames, B., McCann, J. and Yamasaki, E.: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **31**, 347-364 (1975).
11. Maron, D. and Ames, B.: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **113**, 173-215 (1983).
12. Gomes-Carneiro, M.R., Dias, D.M., De-Oliveira, A.C. and Paumgartten, F.J.: Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of alpha-bisabolol in the *Salmonella*/microsome assay. *Mutat. Res.*, **585**, 105-112 (2005).
13. Choi, Y.H., Kim, E.Y., Park, K.Y, Rhee, S.H. and Lee, W.H.: Antimutagenic effects of the juice and boiling water extract of *Houttuynia cordata* Thunb. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **23**, 916-921 (1994).
14. 한덕룡, 김창종, 김정희: *Acanthopanax koreanum* Nakai의 약효성분에 대한 연구. 약학회지, **29**, 357-361 (1985).