J. Fd Hyg. Safety
Vol. 24, No. 1, pp. 46~49 (2009)

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

N-methyl-*N*-nitro-*N*'-*nitro*soguanidine의 변이원성에 대한 결명자 물 추출물의 항돌연변이 효과

안병용*
전북대학교 한약자원학과

Desmutagenic Effect of Water Extract from *Cassia tora* L. on the Mutagenicity of *N*-methyl-*N*-nitro-*N*'-*nitro*soguanidinein in *E. coli* PQ37

Byung-Yong Ahn*
Department of Oriental Medicine Resources, Chonbuk National University
(Received November 5, 2008/Revised January 3, 2009/Accepted February 26, 2009)

ABSTRACT - The desmutagenic activity of the water extract of *Cassia tora* L on the mutagenicity induced by 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) and *N*-methyl-*N*-nitro-*N'-nitro*soguani-dine (MNNG) was studied using the SOS Chromotest with *Escherichia coli* PQ37. The inhibition rates of water extract of *Cassia tora* L. at concentration of 100 μg/assay were 27.5% and 40% against 4-NQO and MNNG. The water extract of *Cassia tora* L. was separated into methanol soluble and methanol insoluble parts. The methanol soluble part exhibited higher inhibition effects than the methanol insoluble part against the mutagenic activities of 4-NQO and MNNG. Step-wise fractionation of methanol soluble part was done to obtain methanol, ethyl acetate and water fractions. Among these fractions, water fraction had the strongest inhibitory effects of 23.0 and 19.0% against mutagenicities of MNNG and 4NQO, repectively. The results clearly indicated that the water fraction showed much stronger antimutagenicity against MNNG than 4NQO. The inhibition rates of aqueous fraction of methanol-soluble from water extracted *Cassia tora* L. at concentrations of 1.0 10, 100 and 250 μg/assay were 8.0%, 12.0%, 25.5% and 43.0%, respectively. The water fraction showed the inhibitory effects with dose response against the mutagenic activities induced by MNNG.

Key words: *Cassia tora* L., 4-NQO, MNNG, SOS Chromotest, desmutagenic activity.

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[1]. 따라서 많은 연구자들은 fiber, cinnamaldehyde, coumarin, epigalocateching gallate, 및 tannic acid과 같은 돌연변이 억제물질을 채소, 과일 및 생약재로부터 동정하고 있다[2-4].

생약재를 대상으로, 항돌연변이원성을 탐색한 결과, 마늘[5], 생강[6], 계피[7], 파고지[8], 숙지황[9] 과 같이 전통적으로 식용되어온 생약재로 부터 많은 항돌연변이원성 허브가 보고되어지고 있다.

또한 활성물질을 분리하여 그의 작용기작에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있으며 대표적인 예로써 Ohta 등은 cinnamaldehyde[10]와 vanillin[11]의 항돌연변이 효과의 작용메카니즘을 밝힌 바 있다.

필자들은 bacterial mutation assay를 이용하여 4-NQO, MNNG, MMC의 변이원성에 대한 돌연변이원성 억제효과를 95종 생약재 열수 추출물에 대하여 검색하였으며,[12] 그 결과 4-NQO와 MNNG의 변이원에 의해 유도된 변이원성을 공통적으로 억제하는 결명자를 발견하였다. 따라서 본 연구에서는 결명자의 활성 물질을 분리하여 그의 작용기작에 관한 연구를 수행하기 위한 전 단계로써, 결명자 물 추출물의 활성 분획물을 이용하여 변이원의 억제효과를 비교조사한 후 용량적 억제효과를 확인하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에 사용한 결명자는 완주군 삼례읍 소재한 한약

*Correspondence to: Byung-Yong Ahn, Department of Oriental Medicine Resources, Chonbuk National University, Iksan, 570-749, Republic of Korea
Tel:82-63-850-0743, Fax: 82-63-850-0741
E-mail: ahn2002@chonbuk.ac.kr

방에서 기증받아 사용하였다. 4-Nitroquinoline 1-oxide (4-NQO), *N*-methyl-*N*-nitro-*N'*-nitrosoguanidine (MNNG)는 Fluka (Switzerland) 회사로 부터 구입하여 사용하였다.

시험 균주

SOS Chromotest의 기본 균주인 *Escherichia coli* PQ37 [*sfiA*::Mud(Ap *lac*)*cts lac*⊿U169 *mal*$^+$ *uvrA galE galY* PhoC *rfa*]은 P. Quillardet 박사 (Pasteur 연구소, France)로 부터 제공 받아 각각의 유전형질을 확인한 후 사용하였다.

추출 및 용매분획

감압건조된 시료에 10배(w/v)량의 증류수를 가하여 수욕상에서 환류냉각하면서 2회 추출한 후 여과 및 동결건조하여 물 추출물로 사용하였다. 물 추출물을 메탄올 가용성 및 불용성 분획물로 분리한 후 농축, 동결건조 하였다. 메탄올 가용성 분획물을 증류수에 녹인 후 에틸아세테이트, 부탄올, 물층으로 순차 용매분획을 실시하였으며 수용성 분획물은 멸균된 2차 멸균수에, 에틸 아세테이트와 부탄올 분획물은 dimethylsulfoxide (DMSO)에 용해하여 사용하였다.

돌연변이원성 억제시험

SOS Chromotest는 Quillardet와 Hofnung의 방법[13]에 준하여 수행하였으며, 변이원 및 균의 최적 농도를 각각 설정하였다. L 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 진탕배양 하였다. 각각의 멸균 시험관에 10배(v/v) 희석된 균 배양액 0.6 m*l*를 분취하고, 여기에 각 농도의 변이원 및 시료 10 m*l*를 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 m*l*의 L 배지를 현탁시킨 균 부유액 0.2 m*l*를 취하여 각각의 효소 활성을 측정하였다. b-galactosidase는 415 nm, alkaline phosphatase는 400 nm에서 OD를 측정하였으며, 활성 단위는 흡광도 ￥1,000/반응시간(분)으로 계산하였다. Ratio(R)값은 b-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 $[(IF_o\text{-}IF_s\ /IF_o) \times 100]$으로 계산하였고, 변이원만을 첨가한 양성 대조구의 IF 값은 IF_o, 시료 첨가구의 IF 값은 IF_s로 나타내었다.

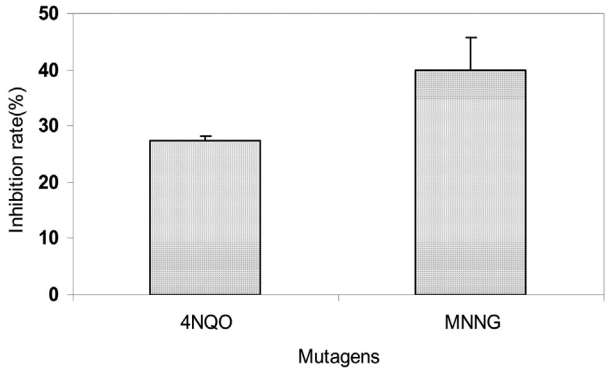

Fig. 1. Inhibitory effects of hot water-extracted *Cassia tora* L. on mutagenicity of direct mutagens in *E. coli* PQ37. The concentration of test sample was 100 μg/assay.

결과 및 고찰

물 추출물의 돌연변이원성 억제효과

4NQO와 MNNG에 대한 결명자 물 추출물의 돌연변이원성 억제효과를 조사하였다 (Fig. 1). 결명자 물 추출물은 4NQO의 변이원성에 대하여 27.5%, MNNG의 변이원성에 대하여 40%의 억제 효과를 나타내었다. 변이원성을 나타내는 변이원의 기작은 각각 다르며, 대표적인 예로써 4NQO는 세균내 효소계에 의해 친핵성인 nitrenium ion으로 활성화되면 이러한 활성체는 푸린염기와 결합하여 DNA bulky를 형성함으로써 복제포오크 지연을 일으킨다[14]. 반면 MNNG는 methyl diazonium hydroxide로 대사되여 carbonium ion(CH_3^+)이 친핵체 중앙에 결합하여 염기의 알킬화를 유발한다[15]. 알킬화된 염기는 직접적인 mispairing이나, single strand break을 일으켜 돌연변이가 유발된다. MNNG는 복제포오크의 DNA의 뒤틀림을 야기하지 않으므로 4NQO와는 다른 양식에 의해 DNA의 손상을 일으킨다. 그러므로 결명자 물 추추물에 함유된 활성물질은 DNA adducts를 일으키는 변이원에 의한 돌연변이원성보다는 직접적인 mispairing 또는 DNA strand break을 일으키는 변이원성에 대한 억제효과가 강한 것으로 해석된다.

따라서 결명자 물 추출물의 활성성분의 극성을 파악하기 위하여 결명자 물 추출물을 메탄올 불용성 및 가용성 분획으로 분리하여 각각의 분획물의 돌연변이원성 억제효과를 비교하였다(Table 1). 100 μg/assay 농도에서, 4NQO에 대한 결명자 물 추출물의 메탄올 불용성 및 메탄올 가용성에 돌연변이 억제효과는 각각 20%(메탄올 불용성) 및 31%(메탄올 가용성)로 나타났으며 MNNG에 대한 돌연변이 억제효과는 30%(메탄올 불용성) 및 46%(메탄올 가용성)로 나타났다. 결명자 물 추출물의 메탄올 가용성 부분은 메탄올 불용성 부분보다 억제효과가 높게 나타났다. 또한 변이원에 대한 특이성은 MNNG에 대한 돌연변이 억제효과가 4NQO에 비교하여 강하게 나타났는데 이러한 결과는 물 추출물의 돌연변이원성 억제효과에서와 동일하게 나타났다.

Table 1. Inhibitory effects of methanol-soluble and methanol-insoluble parts *Cassia tora* L. on mutagenicity of direct mutagens in *E. coli* PQ37.

Mutagen	Experiment	β-gal[1] (unit)	Ap[2] (unit)	Induction factor	Inhibition rate(%)
4-NQO	negative control	2.0	19.87	1.00	
	positive control	13.29	20.90	6.31±0.12[3]	
	methanol insoluble	11.67	22.60	5.13	19.0 (20.0±0.5)[4]
	methanol soluble	12.47	28.6	4.33	31.0 (30.0±0.5)
MNNG	negative control	2.33	23.47	1.00	
	positive control	8.40	22.0	3.83±0.01	
	methanol insoluble	6.53	26.66	2.63	22.0 (30.0±4.00)
	methanol soluble	5.06	29.0	1.87	44.0 (46.0±2.00)

[1]β-Galactosidase activity(units).
[2]Alkaline phosphtase activity(units).
[3]Mean ± S.D of 2 dependent assays.
[4]Mean ± S.D of 3 independent experimentes.
The concentration of test sample was 100 μg/assay.

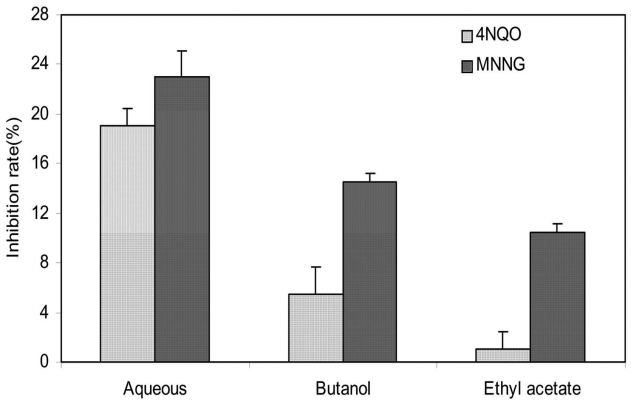

Fig. 2. Inhibitory effects of solvent fractions of methanol-soluble part from hot water-extracted *Cassia tora* L. on mutagenicity of direct mutagens in *E. coli* PQ37. The concentration of test sample was 100 μg/assay.

Table 2. Inhibitory effects of aqueous fraction of methanol-soluble from water extracted *Cassia tora* L. on mutagenicity of MNNG in *E. coli* PQ37.

Concentration (μg)	β-gal[1] (unit)	Ap[2] (unit)	Induction factor	Inhibition rate(%)
negative control	2.33	38.8	1.00	
positive control	8.06	36.26	3.69±0.05[3]	
1.0	7.47	37.20	3.33	8.0 (8.0±0.0)[4]
10	6.80	35.87	3.15	13.0 (12.0±1.0)
100	6.46	38.67	2.78	24.0 (25.5±1.5)
250	4.66	36.33	2.13	41.0 (43.0±3.0)

[1]β-Galactosidase activity(units).
[2]Alkaline phosphtase activity(units).
[3]Mean ± S.D of 2 dependent assays.
[4]Mean ± S.D of 3 independent experimentes.

용매분획물의 돌연변이원성 억제효과

돌연변이원성이 확인된 결명자 물 추출물의 메탄올 수용성 분획물에 함유된 돌연변이원성을 분리하고자 메탄올 가용성 부분을 에틸아세테트, 부탄올과 물을 사용하여 순차적으로 분획한 다음 각 분획물들의 돌연변이원성에 대한 억제효과를 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 100 μg/assay 농도에서, 4NQO에 대한 에틸아세테트, 부탄올과 물 분획물의 돌연변이 억제효과는 각각 1.0%(에텔아세테이트 분획), 5.50%(부탄올 분획) 및 19.0%(물 분획)로 나타났으며, MNNG에 대한 돌연변이 억제효과는 10.5%(에텔아세테이트 분획), 14.5(부탄올분획) 및 23.0%(물 분획)로 나타났다. 결명자 물 추출물의 용매 분획물은 분획전과 비교하여 항돌연변이원성이 저하됨을 알 수 있었으며, 4NQO와 MNNG의 돌연변이원성에 대한 항돌연변이 성분은 물 분획에 함유됨을 알 수 있었다. 따라서 결명자 열수추출물의 메탄올 가용성물로부터 용매분획한 물 분획물의 농도를 assay당 1.0, 10, 100 및 250 μg으로 증가시켰을 경우, 항돌연변이 효과는 각각 8.0%, 12.0%, 25.5% 및 43.0%로 나타났다. 이러한 결과로부터, 결명자 물 분획물은 MNNG의 변이원성에 대하여 용량 의존적 억제효과를 나타냄을 확인하였다. Wu 등[16]은 간접변이원인 benzo[a]pyrene의 변이원성에 대한 결명자의 억제성분으로 chrysophanol, emodin과 rhein을 밝혔으며, emodin은 86%의 항돌연변이원성을 보고하였다. Su 등[17]은 *E. coli* PQ37에서 1-nitropyrene에 대한 돌연변원성에 대하여 emodin은 10.0 μg/assay에서 57%의 억제효과를 보고한 바 있다.

본 연구에서는 단일 성분을 분리 동정하지는 못하였지

만 활성분획이 수용성 분획임을 감안하면 Wu 등[16] 및 Su 등[17]이 보고한 성분에 당이 결합된 배당체의 구조일 것으로 추정해 본다. MNNG의 변이원성에 대한 물 분획물의 용량반응의 억제 활성을 시험한 결과(Table 2) 뚜렷한 용량 반응의 억제 활성을 나타내었다. 결명자 물 추출물의 메탄올 가용성 부분의 물 분획물의 경우, 돌연변이 유도를 나타내는 β-galactosidase unit가 감소된 반면 구성 효소인 alkaline phosphatase의 unit는 감소하지 않았다. 구성효소인 alkaline phosphatase의 unit가 유지되는 결과는 돌연변이원성 억제효과가 균수의 감소 및 균의 활력 저하에서 기인된 결과가 아닌, 돌연변이 억제효과에 의한 것임을 확인 할 수 있었다.

결명자 물 추추물에는 MNNG의 변이원성에 대한 항돌연변이원성이 뛰어난 성분이 수용성 임을 확인하였으므로 이에 적합한 분리 시스템을 이용하여 활성성분의 분리 동정이 수행되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO)와 *N*-methyl-*N*-nitro-*N'*-*nitr*osoguanidinein (MNNG) 에 의해 유도된 돌연변이원성에 대한 결명자 물 추출물의 억제효과를 *E. coli* PQ37 이용한 SOS Chromotest법으로 검색하였다. 100 μg/assay 농도에서 4-NQO와 MNNG의 변이원성에 대한 결명자 물 추출물의 변이원성 억제 효과는 27.5 및 40%로 나타났다. 결명자 물 추출물을 메탄올 가용성 부분과 메탄올 불용성 부분으로 분리하여 4-NQO와 MNNG의 변이원성에 대한 억제효과를 검색한 결과 메탄올 가용성 부분이 더 강한 효과를 나타내었다.

따라서 결명자 메탄올 가용성 부분을 에틸아세테이트, 부탄올 그리고 물로 각각 분획하여, 4-NQO 및 MNNG에 대한 돌연변이 억제효과를 검색한 결과 물 분획물은 각각 19.0, 및 23.0% 억제효과로 가장 강하게 나타내었으며, MNNG의 변이원성에 대한 억제효가가 4-NQO의 변이원성에 대한 억제효과보다 더 강하게 나타남을 확인하였다. 결명자 열수추출물의 메탄올 가용성부분의 물 분획물의 농도를 assay당 1.0, 10, 100 및 250 μg으로 증가시켰을 경우, 항돌연변이 효과는 각각 8.0%, 12.0%, 25.5% 및 43.0%로 나타났다. 이러한 결과로부터, 결명자 물 분획물은 MNNG의 변이원성에 대하여 용량 의존적 억제효과를 나타냄을 확인하였다.

참고문헌

1. Hayatsu, H., Arimoto, S. and Negishi, T.: Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Res*. **202**, 429-446 (1989).
2. Kata, T., Morita K. and Inoue, T.: Anti-mutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. *Mutation Res.* **53**, 351-219 (1981).
3. Waters, M. D., Brady, A. L., Stack, H. F. and Brockman, H. E.: Antimutagenicity profiles for some compounds. *Mutation Res.* **238**, 59-64 (1990).
4. Ho, C., Lee, C. Y. and Huang, M.: Phenolic compounds in food and their effects on health, I. *Analysis, Ocurrence & Chemistry, American Chemical Society*, 1~7 (1992).
5. Zhang, Y. S., Chen, X. R. and Yu, Y. N.: Antimutagenic effect of garlic(*Allium sativum* L.) on 4NQO-induced mutagenesis in *Escherichia coli* WP2. *Mutation Res.* **227**, 215-219 (1989).
6. Nakamura, H., and Yamamoto, T.: Mutagen and antimutagen in ginger, *Zingiber officinale. Mutation Res.* **103**, 119-126 (1982).
7. Kakinuma, K., Koike, J., Kotani K., Ikekawa, N., Kada, T. and Nomoto, M.: Cinnamaldehyde: identification of antimutagen from a crude drug, Cinnamonmi cortex. *Agric. Biol. Chem.* **48**, 1905-1906 (1984).
8. Wall, M. E., Wani, M. C., Manikumar, G., Hughes, T. J Taylor, H., Mcgivney, R. and Waner, J.: Plant antimutagenic agents, 3. coumarins. *J. Nat. Prod.* **51**, 866-873 (1988).
9. Ahn, B. Y: Antimutagenic Effect and Mechanism of *Rehmannia glutinosa* (Gaertner) Liboschitz Water Extracts. Ph. D. Thesis, Wonkwang University, Korea. (1996)
10. Ohta, T., Watanabe, K., Moriya, M. and Shirasu, Y.: Antimutagenic effects of cinnamaldehyde on chemical mutagenesis in *E. coli*. *Mutation Res.* **107**, 219-227 (1988).
11. Ohta, T., Watanabe, M., Shirasu, Y. and Inoue, T.: Post-replication repair and recombination in *uvrA umuC* strains of *Escherichia coli* are enhanced by vanillin, an antimutagenic compound. *Mutation Res.* **201**, 107-112 (1982).
12. Song, G. S., Ahn, B. Y., Maeng, I. K., Kwon, Y. J., Han, S. B. and Choi, D. S.: Antimutagenicity screening of water extracts from chinese herbs with SOS Chromotest with several direct mutagens. *Foods and Biotech.* **6**, 214-218 (1997).
13. Quillardet, P. and Hofnung, M.:The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutation Res.* **147**, 65-78 (1985).
14. Ohta, T., Watanabe, K., Moriya, M. and Shirasu, Y.: Antimutagenic effects of cinnamaldehyde on chemical mutagenesis in *E. coli, Mut. Res.* **107**, 219-227 (1983).
15. Gichner, T. and Veleminsky, J.: Mechanisms of inhibition of N-nitroso compounds-induced mutagenicity, *Mut. Res*. **202**, 325-334 (1988).
16. Su, H Y, Cherng, S H, Chen, C C and Lee, H.: Emodin inhibits the mutagenicity and DNA adducts induced by 1-nitropyrene. *Mutation Res.* **329**, 205-212 (1995).
17. Chi, C. H., Hsieh, C. L., Song, T. Y. and Yen, G. C:. Inhibitory Effects of *Cassia tora* L. on Benzo[*a*]pyrene-Mediated DNA Damage toward HepG2 Cells. *J. Agir. Chem.* **49**, 2579-2586 (2001).