

방사선과 EMS에 대한 썸바귀 추출물의 방어 효과

Protective Effects of Extracts from *Ixeris dentata* against Radiation and EMS

우현정, 이병헌, 김진규
한국원자력연구소
대전광역시 유성구 덕진동 150

김지향
한양대학교
서울특별시 성동구 행당동 17

요 약

썸바귀 (*Ixeris dentata*)는 국화과에 속하는 여러해살이식물로 우리나라 자생종이다. 민간에서는 뿌리를 포함한 모든 부분을 약재로 사용하였으며 진정, 최면, 해열, 조혈, 건위, 소화불량, 폐렴, 간염, 타박상 등의 효과가 있다고 알려져 있다. 본 연구에서는 썸바귀의 부위별, 용매별 추출을 통해 방사선 및 EMS에 대한 방어효과를 확인하였다. 3주령의 미성숙 흰쥐를 이용하여 몸무게의 변화와 조직 무게의 차이를 비교한 결과 무처리군과 처리군 간의 몸무게는 유의한 차이를 보이지 않았지만 EMS 처리군의 경우 처리 후 12시간 뒤의 몸무게는 모두 감소하는 경향을 보였다. 그 감소율은 대조군에서 가장 크게 보였으며 잎 열수 추출물 처리군이 가장 작은 감소율을 나타내었다. 조직 무게의 경우 간, 정소, 신장의 경우 큰 유의성을 보이지 않았으나 면역 기관인 비장의 경우 EMS 처리군에서 20 % 이상의 감소를 보였다. 방사선과 EMS 처리 시 생체 내의 DNA 손상 정도를 알아보기 위한 comet assay를 실험 결과, 방사선 처리와 EMS처리 시 모두 추출물이 우수한 방어 효과를 나타냄을 알 수 있었고 두 경우 모두 썸바귀 잎의 에탄올 추출물 처리군에서 가장 우수한 방어 효과를 보였다. 특히 유전 독성 물질인 EMS의 경우 이미 잘 알려진 항산화제인 BHT와 tocopherol보다도 더 뛰어난 방어 효과를 보여주어 썸바귀 추출물의 항돌연변이 물질로서의 개발의 가능성을 제시하였다.

Abstract

The whole plant of *Ixeris dentata*, a typical oriental herb, has been used for treatment of pneumonia, contusion, tumor and hepatitis. It also has been used for treatment of allergic diseases as a folk therapy in Korea. *I. dentata* is known to have aliphatics, triterpenoids and sesquiterpene glycosides in its composition. The present study was designed to explore *in vivo* the protective effects from water- and ethanol-extracts of *I. dentata* on radiation- and EMS-induced damage. For the *in vivo* studies, male Balb/c mice (3 week-old) received *po* administration during 2 weeks before irradiation and EMS treatment. The rate of increase in the body weight showed no significant difference between the treatment groups and the control. But the body weight of EMS treated group showed a decrease 12 hours after EMS treatment. In the *in vivo* comet assays for genotoxicity in mouse lymphocytes, the control group showed that more DNA breakage occurred in the irradiation and EMS treated groups than the extract-treated groups. Especially, the water extracts from the leaves had an excellent protective activity compared with the others.

1. 서론

최근 우리가 일상적으로 섭취하거나 민간요법에서 경험적으로 쓰고 있는 식품들의 효과에 대한 관심이 증가하는 가운데 일반 채소류를 포함하여 식용 및 약용으로 쓰이는 야생 식물자원들을 이용한 의약품 및 건강보조식품을 개발하려는 노력이 계속되고 있다. 특히 야생채소나 민간에서 약으로 쓰이는 식물들에 대한 항돌연변이 및 항암 효과에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 식물에 존재하는 항암성분으로 β -carotene과 vitamin C 등의 비타민류와 cysteine, dietary fiber류, polyphenol류, peroxidase 등과 chlorophyll 및 chlorophyllin 등의 색소류들 등이 보고 되고 있다¹⁾.

씀바귀 (*Ixeris dentata*)는 국화과에 속하는 여러해살이식물로 한국, 중국, 일본에 분포하며 이른 봄에 뿌리와 어린순을 나물로 사용한다. 주로 산과 들에 자생하고 높이는 30 cm 전후로 자라며 꽃은 5-7월에 노랑색으로 1.5 cm 정도 크기로 핀다. 줄기나 잎을 자르면 흰 즙이 나오며 민간에서는 일찍이 뿌리를 포함한 모든 부분을 약재로 사용하였으며

진정, 최면, 해열, 조혈, 건위, 소화불량, 폐렴, 간염, 타박상 등의 효과가 있다고 알려져 있다. 밝혀진 성분으로는 aliphatics, triterpenoids, sesquiterpene glycoside 등이 있다²⁾.

씀바귀에 대한 효능 연구로는 여러 종양 세포주를 이용한 돌연변이 억제 및 종양세포 성장저해 효과, 고지혈증 흰쥐모델에서 심혈관 수축과 이완 및 혈관내피세포에 미치는 씀바귀 영향을 연구하여 심장 순환기계 질환과 예방 효과 등이 있다³⁾. 또한 당뇨쥐의 혈당을 감소시키고 혈액의 triglyceride와 총 cholesterol의 수준을 감소시키는 지방 저하 효과를 가지며 주성분으로는 cynaroside (luteolin 7-O- β -D-glucoside)가 보고된 바 있다⁴⁾.

이에 본 연구에서는 자생종인 씀바귀의 열수 추출 및 에탄올 추출을 통해 방사선과 EMS (ethyl methanesulfonate)에 의해 유발되는 손상에 대한 생체 방어 효과를 알아보고자 한다.

2. 재료 및 방법

식물 재료

본 실험에서 사용한 씀바귀는 (주)천길에서 제공받아 사용하였으며 뿌리부분과 잎부분으로 구분하여 추출을 실시하였다. 각 건분 100 g을 10배에 해당하는 증류수와 70 % 에탄올로 현탁시켜 열수 추출의 경우 95 °C에서, 에탄올 추출의 경우 24 °C에서 3시간씩 추출하였다. 추출 후 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액을 취하였으며 잔사를 이용하여 2회 더 반복하였다. 추출액은 감압농축 후 동결건조 하였으며 -80°C의 초저온고에서 보관하였다⁵⁾.

실험동물과 처리

미성숙 수컷 흰쥐(Balb/c)를 대한바이오링크에서 구입하여 실험동물로 이용하였다. 한국 원자력연구소 내의 사육실에서 고형사료와 물을 충분히 공급한 상태로 10/14시간 (명/암)의 조명조건 하에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

양성 대조군으로 합성 항산화제인 Butylated Hydroxytoluene (BHT)와 tocopherol을 사용하였다. 각각의 추출물과 tocopherol은 5 % DMSO (in saline)로, BHT는 옥수수유를 이용하여 1 g/ kg body weight의 농도로 녹여 하루에 두 번씩 복강주사 하였다. 2주간 처리 후 감마선 및 EMS (ethyl methanesulfonate)에 노출시켰다. 방사선 처리군의 경우, 조사선량은 Kim et al.에 의해 설정된 선량-반응식을 기준으로 단기간 내에 손상이 확인된 선량을 조사하였다⁶⁾. ⁶⁰Co 선원의 강도는 약 1.5×10¹⁴ Bq, 선량율은 1282.6768 rad/hour 이며, 총 6.5 Gy를 조사하였다. EMS 처리군은 도살 12시간 전 300 mg/kg body weight의 농도로 saline에 녹여 복강주사 하였다⁷⁾. 방사선 처리군은 조사 직후에, EMS 처리군은 12시간 후에 도살하여 체중 및 기관의 무게를 측정과 comet assay를 실시하였다.

Comet Assay

comet assay (single cell gel electrophoresis assay)는 P. Grover et al.의 방법을 변형하여 실시하였다⁸⁾. 처리 물질이 아닌 시험 과정에서의 DNA 손상을 최소화하기 위해 모든 과정은 어두운 조명 하에서 이루어 졌다. 채취한 혈액 100 μ l와 1 % LMP (low melting point agarose) 100 μ l를 혼합한 후 전날 pre-coating해 놓은 slide glass에 떨어 뜨린 후 cover glass를 덮어 전체적으로 퍼지게 한다. 4°C에서 20분간 굳힌 후 다시 200 μ l의 0.5 % LMP로 한 층을 덧입혀 4°C에서 굳힌다. 만들어진 slide는 4°C lysing solution [2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris (pH 10), 1% sodium sarcosinate, 사용 직전에 1 % Triton X-100과 10% DMSO를 혼합]에 담가 1시간 동안 cell lysis를 시킨다. 차가운 물로 slide에 남은 용액을 제거한 후 4°C Electrophoresis buffer (300 mM NaOH and 1 mM, EDTA pH 13) 에서 15분간 unwinding 시킨 후 26 V, 300 mA에서 40분간 전기영동을 한다. 전기영동이 끝난 slide는 물로 씻어 준 후 400 mM Tris buffer (pH7.5)에서 15분간 중성화과정을 시행하며 3회 반복한다. 50 μ l EtBr (20 μ l/ml)로 염색하여 CCD camera (Hitachi Denshi, Ltd., Japan)가 부착된 형광현미경 (Olympus fluorescence microscope, Japan)에서 200배율로 검경하고, Komet ver. 4.0 image analysis (Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, UK)를 이용하여 이미지를 분석하였다. 한 slide 당 50개의 핵을 관찰하여 통계분석 하였다.

3. 결과 및 고찰

체중 변화 및 조직 무게

미성숙 수컷 흰쥐에 추출물과 양성 대조군인 BHT와 tocopherol을 2주간 복강 주사 하였다. 우선 방사선 조사와 EMS처리를 하기 전 몸무게 변화를 측정하였다 (Table 1). 무처리군의 몸무게 증가율이 가장 높아 136.6 %를 나타내었고 잎의 열수 추출물이 가장 낮은 122.2 %의 증가율을 나타내었다. 무처리군에 비해 대부분의 처리군의 몸무게가 낮은 증가율을 보였는데 이는 처리하는 과정에서의 스트레스에 의한 것으로 사료되며 처리군 사이의 차이는 개체간의 차이로 보여 진다. 그러나 EMS 처리군의 경우 처리 후 12시간 뒤의 몸무게는 모두 감소하는 경향을 보였다 (Figure 1). 그 변화는 대조군이 2.5 g으로 가장 많은 감소를 보였으며 양성 대조군인 tocopherol 2.1 g, 뿌리의 에탄올 추출물 1.5, 뿌리의 열수 추출물 1.3 g, BHT와 잎 열수추출물 1.1 g, 잎 에탄올 추출물 0.7 g 순으로 감소율이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 이는 유전 독성 물질인 EMS에 대한 씬바귀 추출물의 생체 방어 효과를 보여준다.

조직 무게의 경우 방사선 처리군은 처리 직후, EMS 처리군은 처리 후 12시간 후 도살하여 측정하였다 (Table 2). 간, 정소, 신장의 경우 큰 유의성을 보이지 않았으나 면역 기관인 비장의 경우 EMS 처리군에서 20 % 이상의 감소를 보였다.

Comet Assay

방사선과 EMS 처리 시 생체 내의 DNA 손상 정도를 알아보기 위하여 comet assay를 실시하였다. 전기영동 후 olive tail moment 값을 이용하여 DNA의 손상 정도를 비교하였다. olive tail moment은 얻어진 혜성모양의 DNA 상으로부터 측정된 head, tail 그리고 절단된 DNA 조각의 형광염색 밀도 등을 감안한 값으로 단순 측정된 tail length만을 사용할 경우 실제 DNA 분자 상에 유발된 손상이 지나치게 확대 해석 될 수 있는 단점을 보완할 수 있다⁹⁾.

측정 결과 방사선 처리군의 경우 대조군의 olive tail moment 값이 7.246으로 가장 DNA 손상 정도가 컸으며 tocopherol 6.856, 잎 열수 추출물 6.071, BHT 6.003, 뿌리 열수 추출물 5.711, 뿌리 에탄올 추출물 5.660의 순이었으며 잎의 에탄올 추출물 처리군의 DNA 손상 정도가 가장 작아 5.445 값을 나타내었다. 이와 같은 결과는 썬바귀 추출물이 양성 대조군과 비교하여 우수한 방사선 방어 효과가 있음을 보여준다. EMS 처리군의 경우는 더욱 뛰어난 방어 효과를 보여주었는데, 대조군의 olive tail moment 값이 13.102 인데 반해 BHT 7.148, tocopherol 6.749, 잎 열수 추출물 6.999, 잎 에탄올 추출물 5.487, 뿌리 열수 추출물 5.920, 뿌리 에탄올 추출물 6.335의 값을 나타내었다. 특히 잎의 에탄올 추출물의 경우 방사선과 EMS 처리에서 모두 우수한 방어 효과를 보여주었다 (Figure 2).

방사선과 EMS에 대한 썬바귀 추출물의 생체 방어 효과를 알아본 결과 이미 알려져 있는 항산화제인 BHT, tocopherol과 비교하여 우수한 효과를 보여주었다. 특히 유전 독성 물질인 EMS에 대해 뛰어난 방어 효과를 보여주어 썬바귀 추출물의 항돌연변이 물질로서의 개발의 가능성을 제시하였다.

Table 1. The effect of extracts of *I. dentata* on the relative body weight gain of mouse

	Con.	tocopherol	BHT	<i>I. dentata</i> leaf		<i>I. dentata</i> root	
				H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH
Con.	141.2 %	119.2 %	126.1 %	133.6 %	128.9 %	127.6 %	136.1 %
EMS	135.5 %	135.8 %	114.7 %	139.1 %	123.8 %	124.2 %	122.9 %
Radiation	133.1 %	125.6 %	130.8 %	117.6 %	114.1 %	119.4 %	127.9 %
Average	136.6 %	126.9 %	123.8 %	130.1 %	122.2 %	123.7 %	129.0 %

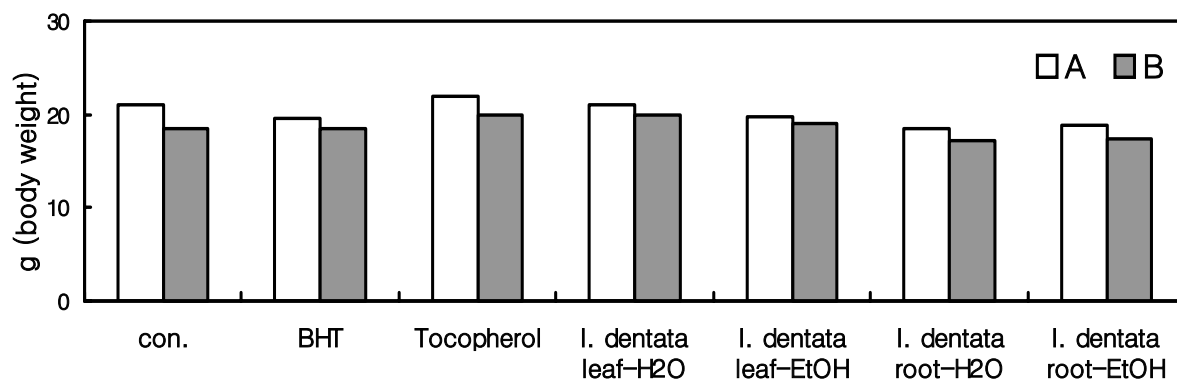


Figure 1. The relative body weight gain of EMS treated group 12 hours after EMS treatment; A, before EMS treatment; B, 12 hours after EMS treatment

Table 2. The effect of the extracts of *I. dentata* on the organ to body weight ratio

group	treatment	liver	testis	kidney	spleen
con.	con.	5.71	0.344	0.693	0.329
	BHT	7.09	0.416	0.709	0.452
	tocopherol	5.52	0.342	0.744	0.372
	<i>I. dentata</i> leaf-H ₂ O	7.00	0.369	0.741	0.596
	<i>I. dentata</i> leaf-EtOH	5.96	0.362	0.802	0.396
	<i>I. dentata</i> root-H ₂ O	6.65	0.407	0.660	0.572
	<i>I. dentata</i> root-EtOH	6.10	0.384	0.744	0.479
	radiation	con.	5.74	0.349	0.694
BHT		6.90	0.382	0.649	0.329
tocopherol		5.95	0.342	0.740	0.345
<i>I. dentata</i> leaf-H ₂ O		6.56	0.390	0.797	0.497
<i>I. dentata</i> leaf-EtOH		6.08	0.398	0.817	0.409
<i>I. dentata</i> root-H ₂ O		5.98	0.359	0.746	0.545
<i>I. dentata</i> root-EtOH		6.33	0.350	0.820	0.396
EMS		con.	5.86	0.389	0.678
	BHT	6.67	0.314	0.704	0.387
	tocopherol	5.92	0.408	0.775	0.277
	<i>I. dentata</i> leaf-H ₂ O	6.45	0.387	0.837	0.326
	<i>I. dentata</i> leaf-EtOH	6.48	0.419	0.928	0.272
	<i>I. dentata</i> root-H ₂ O	6.39	0.352	0.807	0.387
	<i>I. dentata</i> root-EtOH	6.14	0.372	0.747	0.359

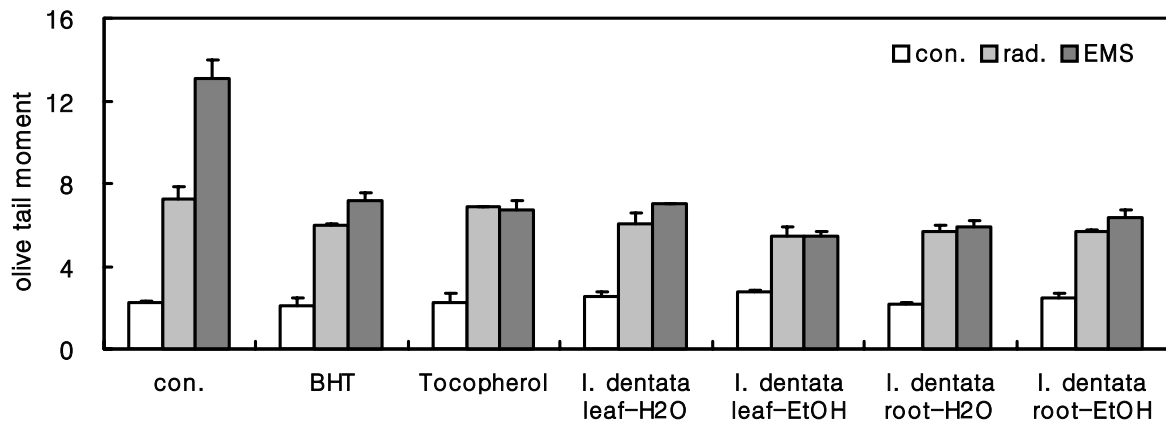


Figure 2. The *in vivo* genotoxicity assays of water and ethanol extracts of *I. dentata* and detection of anti-mutagenic effects against irradiation and EMS using comet assay of mouse lymphocytes; olive tail moment = (tail mean-head mean) * tail % DNA/100

4. 참고 문헌

1. S.H Kim, Inhibitory effects of *Ixeris Dentata* on the mutagenicity of aflatoxin B, N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine and the growth of MG-63 human osteosarcoma cell, J Korean Soc Food Nutr 24(2), 305 (1995).
2. M. J. Kim, J. S. Kim, D. M. Jeong, S. S. Ham and C. Y. Yu, Effect of antioxidant, antimutagenicity and anticancer of root extract from *Ixeris dentata* Nakai. Korean J. Medicinal Crop Sci. 10, 3 (2002).
3. M. J. Kim, J. S. Kim, W. H. Kang and D. M. Jeong, Effect on antimutagenic and cancer cell growth inhibition of *Ixeris dentata* Nakai. Korean J. Medicinal Crop Sci. 10, 3 (2002).
4. S. S. Lim and J. h. Lee, A study on the chemical composition and hypcholesterolaemic effect of *Aster scaber* and *Ixeris dentata*, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 26, 1 (1997).
5. D. Bendjeddou, K. Lalaoui and D. Satta, Imminostimulationg activity of the hot

water-soluble polysaccharide extracts of *Anacyclus pyrethrum*, *Alpinia galanga* and *Citrullus colocynthis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 88 (2003).

6. J. K. Kim, C.J. Lee, K.W. Song, Y.D. Yoon, Effects of follicle stimulating hormone on γ -ray irradiated immature mouse ovarian follicles. *J Korean Asso Radiat Prot* 23, 89 (1998).

7. S. W. Chiu, Z. M. Wang, T. M. Leung and d. Moore, Nutritional value of ganoderma extract and assessment of its genotoxicity and antigenotoxicity using comet assays of mouse lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 38 (2000).

8. P. Grover, B. S. Banu, K. D. Devi and S. Begum, In vivo genotoxic effects of mercuric chloride in rat peripheral blood leucocytes using comet assay. *Toxicology*, 167 (2001).

9. D. Anderson, T. W. Yu, B. J. Philips and P. Schmezer, The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay. *Mutation Research*, 307 (1994)