

Benzo(a)pyrene의 돌연변이원성에 대한 유기게르마늄(GE-132)의 항돌연변이 효과

이효민* · 정 용* · 정기화 · 김재완 · 권순경
덕성여자대학교 약학대학, *연세대학교 환경공해연구소
(Received October 15, 1992)

Antimutagenic Effect of Organic Germanium(GE-132) on the Mutagenicity of Benzo(a)pyrene

Hyo Min Lee*, Yong Chung*, Ki Wha Jung,
Jae Wan Kim and Sun Kyung Kwon
College of Pharmacy, Duksung Woman's University, Seoul 132-714, Korea
The Institute for Environmental Research, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

Abstract—This study was initiated to investigate the effective action and mechanism of GE-132 (Carboxyethylgermanium sesquioxide) on benzo(a)pyrene, which have strong carcinogenicity and mutagenicity. To confirm desmutagenic effect (inhibition of metabolic processes of benzo(a)pyrene with S9 Mix or inactivation of the mutagenicity of benzo(a)pyrene metabolites) and antimutagenic effect (inhibition of gene-expression of reverted genes) of GE-132 against benzo(a)pyrene using with *Salmonella typhimurium* TA98 Ames test was performed. The revertants in desmutagenicity test were decreased significantly in the combined groups of benzo(a)pyrene and GE-132 than benzo(a)pyrene only, without inhibition the metabolism of benzo(a)pyrene by S9 Mix. The ideal combined groups of benzo(a)pyrene and GE-132 were 10 μ M and 10 mg, 20 μ M and 20 mg, 100 μ M and 30 mg, respectively. Then, the revertants in antimutagenicity test, which was studied the direct action of GE-132 on the induction of revertant cells by *Salmonella typhimurium* TA98 and activated benzo(a)pyrene were decreased significantly in the treated groups of GE-132 than no treated groups. The number of revertants of *Salmonella typhimurium* TA98 were reduced with increasing amounts of GE-132. From the above results, it was found that GE-132 inactivated the mutagenic metabolites of benzo(a)pyrene without inhibition of the enzyme action in the S9 Mix, and GE-132 showed antimutagenic effect which have inhibitory action of reverted gene expression.

Keywords □ GE-132, benzo(a)pyrene, desmutagenicity, antimutagenicity.

Benzo(a)pyrene(이하 BAP로 표기)은 실험적 발암 및 돌연변이 유발물질로 쓰여지는 대표적인 화학물질이며 석탄, 타르, 담배연기, 검댕, 석유 등과 같은 환경부산물로도 다양하게 발생하고, 대기와 같은 환경중에 포함되므로서 환경성 오염물질로 작용하여 인체에 노출될 기회를 증가시키고 있다.^{1,2)}

BAP는 인체에 유력한 발암물질로 분류되며 다수의

실험동물에서 다양한 노출경로를 통해 폐, 피부, 위장부위에 종양을 유발시키는 것으로 알려져 있고, 그 기전은 BAP의 최종 대사체인 diol epoxide의 구조-활성상관관계(bay region-carcinogenic activity)로 인하여 diol epoxide가 DNA와 반응하게 되고 DNA변성 및 염기쌍 분열을 초래한다.³⁾ 이와 같은 이유로 BAP는 미생물을 포함하여 포유동물세포에 강한 돌연변이원성을 나타내게 된다.

DNA와 diol epoxide와의 구체적인 반응위치를 살

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

펴보면 일반적으로 diol epoxide의 C-10 위치와 guanine의 아미노 그룹 N-2 위치가 반응하는 것으로 알려져 있으나, 이외에도 guanine N-7, uracil residue (RNA), adenine 등과도 반응하게 된다.^{4,5)}

Kakefuda와 Yamamoto^{6,7)}는 diol epoxide에 의한 염기(base) 변화에 두 가지 형태가 있다고 하였는데 하나는 diol epoxide가 adenine과 반응하였을 때 DNA sequence의 local unwinding으로 인한 DNA변성 및 염기쌍 분열을 초래할 수 있다는 것과 다른 하나는 guanine과 반응하였을 때 2차적인 구조변화를 유발시킬 수 있다는 것이다.

한편, 게르마늄은 전자공학분야에서 쓰여지던 금속이었으나 최근에 organometallic compound의 형태로 혹은 organic chelating agents로 합성되어 의학의 치료영역에 널리 적용되고 있다.

GE-132는 1967년 Asai Germanium Research Institute에서 Oikawa와 Kakimoto⁸⁾에 의해 유기염제인 carboxyethylgermanium sesquioxide [$O_3(GeCH_2COOH)_2$]로 합성되어 GE-132로 불려지게 되었으며 다년간의 연구결과 광범위한 치료작용을 지니고 있는 것으로 밝혀지고 있다.

Kumano 등⁹⁾은 *in vivo* 및 *in vitro* 실험에서 GE-132의 항종양효과를 보고하면서 이것이 GE-132의 interferon 생성에 기인한다고 하였으며⁷⁾ 그 이후에도 Ishida 등¹⁰⁾은 마우스의 종양을 대상으로 GE-132가 interferon-inducing agent임을 확인한 바 있고, Satoh와 Iwaguchi¹¹⁾에 의해서도 마우스 종양에 대해 GE-132가 세포독성 없이 항종양효과에 의한 생명연장을 나타낸다고 보고된 바 있다.

이와 같은 GE-132의 항종양효과 이외에도 항돌연변이 작용에 대한 결과도 알려지고 있어 Mochizuki와 Kada의 연구결과에 의하면 *Escherichia coli*의 B/r up trp⁻ strain에서 γ -ray에 의해 유도된 돌연변이활성을 GE-132가 현저하게 감소시켰다고 보고하면서 GE-132가 DNA합성 과정의 fidelity를 증진시키므로 γ -ray에 의한 DNA-replicating enzyme들의 error-proneness에 길항할 것이라고 하였다.¹²⁾ 이와 같은 연구결과는 radiation mutagenesis에 길항하는 GE-132의 작용기전 연구에 또 다른 측면에서의 흥미를 불러 일으키는 것이었다.

이 밖에도 GE-132의 알려진 생물학적 작용으로는 Natural killer(NK)세포의 활성화와 macrophages, T-

suppressor cell의 활성화를 포함하는 면역강화작용 등이 있고¹³⁻¹⁵⁾ 바이러스 감염의 치료와 류마치스성 질환 및 노인성 골다공증의 치료에 효과가 있다고 보고되고 있으며,¹⁶⁻¹⁹⁾ 세포의 산소공급을 증가시키는 작용과 세포손상을 유발하는 free radical의 제거, 해열, 진통작용 그리고 중금속 해독작용 등이 알려지고 있다.²⁰⁻²⁶⁾

본 연구에서는 최근 광범위하게 병리적 작용을 해소 또는 감소시켜 의학의 영역에서 활용되고 있으며 또한 radiation에 의한 돌연변이활성을 저해하는 것으로 알려지고 있는 유기게르마늄이 BAP의 돌연변이원성에 미치는 영향을 *Salmonella typhimurium*을 이용한 Ames시험법²⁷⁾을 응용하여 규명하고자 하였다.

실험방법

시약—Benzo(a)pyrene(BAP)은 Sigma사 제품을 유기용매 dimethylsulfoxide(DMSO, Merck제)에 용해시켜 사용하였으며, 유기게르마늄(carboxyethylgermanium sesquioxide : GE-132, Mitsuwasa pure chemical Co.)은 4차 증류수에 용해시켜 사용하였다.

균주배양 nutrient broth는 oxoid nutrient broth No. 2를 사용하였고, petri plate용 agar와 nutrient broth는 Difco제를 사용하였으며, 균주확인용 sensi disc는 Becton dickson제 ampicillin disc와 blank disc를 사용하였으며, crystal violet은 Merck제를 사용하였다.

Ammonium sodium hydrophosphate(4hydrate), sodium phosphate(monobasic), sodium phosphate(dibasic, 12hydrate), sodium sulfate, potassium chlorid(이상 Wako pure chemical industries), magnesium sulfate(7hydrate), citric acid(이상 Yakuri pure chemical Co.) dextrose, NaCl(이상 Junsei), L-Histidine HCl, ampicillin 3H₂O(Sigma), D-biotin(Fluka AG) 등은 시판 특급품을 사용하였다.

S9조제시 사용한 polychlorinated biphenyl(KC-400, Sigma)은 olive oil(Sigma)에 녹여 사용하였으며, S9 Mix 제조시 필요한 cofactor는 일본 오리엔탈 효모공업주식회사 제품을 사용하였다.

Gas chromatography(이하, GC로 표기)로 BAP 측정시 사용한 유기용매 ethylacetate는 Merck제를 사용하였다.

Table I—Operating condition of gas chromatography for detecting of benzo(a)pyrene

Gas chromatography	Condition
Model	Shimadzu GC-7AG with CLH-702 capillary column holder and injection system
Column	Capillary CBP-1.25 m, I.D-0.25 mm
Injector temperature	300°C
Initial temperature	200°C, 2 min
Final temperature	280°C, 8 min
Temperature program	16°C/min
Detector temperature	300°C
Detector	FID (flame ionization detector)
Carrier gas	nitrogen
Make-up gas	nitrogen 30 ml/min
Air pressure	0.5 kg/cm ²
Hydrogen pressure	0.6 kg/cm ²
Range	10
Attenuation	2
Injection volume	2 µl

사용기기—화학천칭은 Ainsworth, 진탕배양기, heating block 및 시험관 혼합기는 제일과학산업주식회사 제품을 사용하였고, clean bench는 대주엔지니어링 제품을 사용하였다.

냉동원심분리기는 Beckman(L5-75B), homogenizer는 Wheaton overhead stirrer를 사용하였고, 배양기는 Fisher Isotemp를 사용하였다. GC는 Shimadzu GC-7AG에 CLH-702 capillary column holder와 injection system을 부착하여 사용하였고, 실온 원심분리기는 한일산업사 제품(HA-12)을 사용하였다.

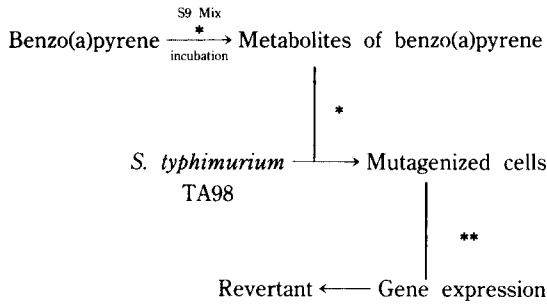
BAP와 GE-132의 직접반응 여부 관찰—실험관 내에서 2 mM BAP 0.1 ml와 GE-132 100 µg/ml, 1 mg/ml, 10 mg/ml, 100 mg/ml, 각각을 0.1 ml씩 10 ml 원심분리시험관에 넣어 잘 혼합한 뒤 37°C에서 30분간 배양하고 2 ml의 ethylacetate로 2번씩 BAP을 추출하여 GC로 정량하였다. 이 측정결과를 37°C에서 30분간 배양하지 않고 실온에서 방치한 경우와 비교하므로 GE-132가 배양조건에 따라 BAP에 직접 반응하는지의 영향여부를 관찰하였다. Ethylacetate로 추출시 유입된 수분은 sodium sulfate anhydride로 제거하였으며, GC정량시 ethylacetate 분획을 vial로 옮겨 모두 증발시킨 후 측정직전에 ethylacetate 1 ml로 다시 mass up하여 capping후 GC 분석하였으며 실험횟수는 3회로 하였고, BAP의 GC 분석조건은 Table I에 표시되어 있다.

BAP의 대사에 미치는 GE-132의 영향—시험관 내에서 BAP를 대사시키는 S9 Mix의 효소활성에 미치는 GE-132의 영향을 관찰하기 위하여 2 mM BAP 0.1 ml와 GE-132 100 µg/ml, 1 mg/ml, 10 mg/ml, 100 mg/ml 각각을 0.1 ml씩 그리고 S9 Mix 0.5 ml씩을 10 ml 원심분리 시험관에 넣어 잘 혼합한 뒤 37°C에서 30분간 배양하고 2 ml의 ethylacetate로 2번씩 BAP를 추출하여 Table I과 같은 조건에서 GC로 BAP를 정량하였다. 이 측정결과를 37°C에서 30분간 배양하지 않고 실온에서 방치한 경우와 비교하므로 GE-132가 BAP의 대사에 미치는 영향을 관찰하였다. 실험횟수는 3회로 하였다.

Ames 시험법—BAP와 GE-132를 대상으로 한 Ames 돌연변이 실험을 Fig. 1과 같이 demutagenicity test와 antimutagenicity test로 구분하여 실시하였고 모두 각각 4회씩 실시하였다.

사용 균주는 frame shift type 돌연변이검증에 쓰여지는 *Salmonella typhimurium* TA98을 Berlin Freie 대학으로부터 제공받아 실험에 사용하였다. 그리고 실험전에 균주들은 반드시 histidine 요구성, rfa, uvr-B 돌연변이와 R factor에 대한 유전형질을 확인하였다.

S9와 S9 Mix 그리고 Minimal glucose agar plate와 Top agar의 제조는 Ames 등²⁷⁾의 방법에 따라 제조하였다.



*Action site of desmutagen
 **Action site of antimutagen

Fig. 1—Principle of studies on the mechanisms of GE-132 effect against benzo(a)pyrene mutagenicity. Desmutagenic effect: The inhibition effect on the enzyme activities in S9 Mix or the inactivation of the active mutagenic metabolites of benzo(a)pyrene. Antimutagenic effect: Direct action on the gene expression of mutagenized cells.

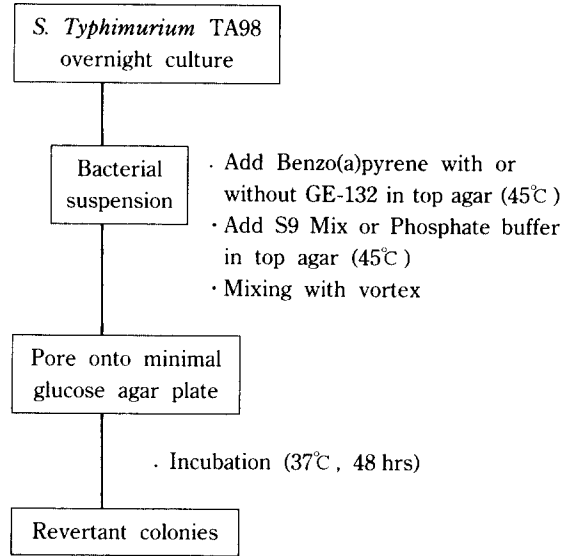
BAP는 DMSO에 녹여 농도가 2 µM, 10 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM, 1 mM이 되도록 각각 조제하여 0.1 ml를 취하여 시험용액으로 하였으며, GE-132는 4차 증류수에 녹여 시험용액 0.1 ml를 취했을 때 농도가 10 µg, 100 µg, 1 mg, 10 mg, 20 mg, 30 mg이 되도록 조절하였다. 이 농도들은 다양한 예비실험을 통하여 채택한 농도들이다. BAP 시험용액은 실험전 4°C 암소에서, GE-132는 4°C 에서 무균상태로 보관하였다.

Desmutagenicity test—Ames 등²⁷⁾의 방법에 따라 실시하였다.

균주현탁액 0.1 ml를 45°C 로 유지시킨 top agar (agar 0.6%, sodium chloride 0.5%의 멸균용액과 L-histidine, D-biotine 0.5 mM 멸균용액을 10 : 1로 혼합)에 넣고 시험관 혼합기로 혼합한 후 이 혼합액을 minimal glucose agar plate에 부어 골고루 퍼지게 한 다음 37°C 에서 48시간 배양하여 revertant colony 수를 계측하였다(Scheme 1).

Antimutagenicity test—Ames 등²⁷⁾의 방법을 수정한 Sakai 등²⁸⁾의 방법에 따라 실시하였다.

균주현탁액 5 ml와 1 mM BAP 1 ml 그리고 S9 Mix 5 ml를 20 ml 원심분리 시험관에 넣어 잘 혼합시킨 후 37°C 진탕배양기에서 60분간 배양시켜 4500 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 침전된 균주를 0°C 인



Counting of revertant colonies/plate

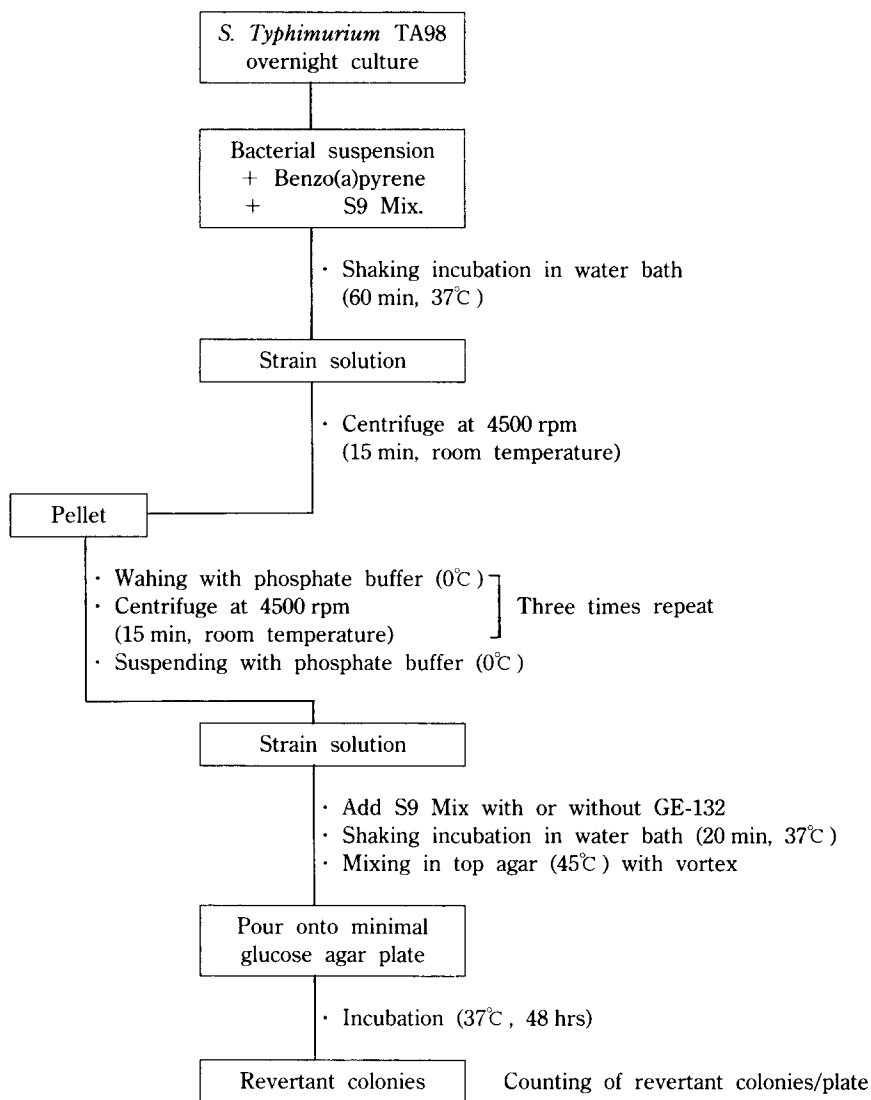
Scheme 1—Procedure for the desmutagenicity test of benzo(a)pyrene and GE-132 using Ames *et al.* method.

산완충용액으로 3번 세척한 후 다시 5 ml의 인산완충용액으로 균질화하여 antimutagenicity test에 사용하였다.

위와 같은 방법으로 얻은 균주현탁액 0.1 ml와 GE-132 용액을 농도별로 0.1 ml씩 혼합하고 S9 Mix도 0.5 ml 첨가하여 37°C 에서 20분간 진탕배양한 후 45°C 로 유지시킨 top agar에 넣고 시험관 혼합기로 혼합한 후 이 혼합액을 minimal glucose agar plate에 부어 골고루 퍼지게 한 다음 37°C 에서 48시간 배양하여 revertant colony 수를 계산하였다(Scheme 2).

위의 실험에 병행하여 cell survivors에 미치는 GE-132의 영향을 알아보기 위하여 BAP로 처리하기 전의 균주현탁액을 10⁶배로 희석한 뒤 0.1 ml를 취하여 GE-132 용액을 농도별로 0.1 ml씩 혼합하고 S9 Mix도 0.5 ml 첨가하여 45°C 로 유지시킨 top agar에 넣고 시험관에서 혼합한 후 이 혼합액을 nutrient agar plate에 부어 위와 동일하게 37°C 에서 48시간 배양하여 surviving cell의 수를 세었다.

BAP의 돌연변이원성에 대한 GE-132의 저해율 계산—BAP와 GE-132를 대상으로 Desmutagenicity test와 Antimutagenicity test를 실시한 후 얻어진 per-



Scheme 2—Procedure for the antimutagenicity test of benzo(a)pyrene and GE-132 using Sakai *et al.*, method (modified Ames test).

cent inhibition의 계산은 Ong 등²⁹⁾의 방법에 따라 다음과 같이 계산하였다.

Percent inhibition

$$= \left[1 - \frac{\text{Number of mutants per plate in the presence of GE-132} - \text{Number of spontaneous mutants per plate}}{\text{Number of mutants per plate in the absence of GE-132} - \text{Number of spontaneous mutant per plate}} \right] \times 100$$

통계학적 검정—Ames 시험법을 실시하여 얻어진 실험결과의 통계학적 검정은 모두 실험군의 차이를 검정하는 비모수 통계방법인 Mann-Whitney U test를 이용하여 검정하였다.

실험결과

BAP와 GE-132의 직접반응 여부 확인—일정 농

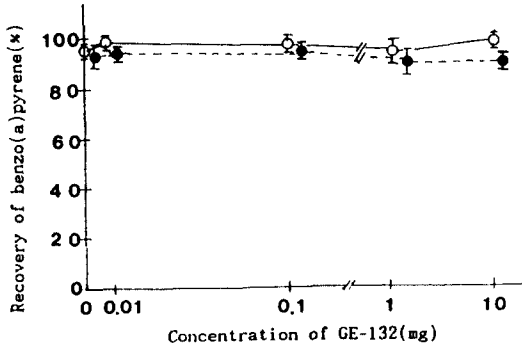


Fig. 2—Influence of GE-132 on the recovery of benzo(a)pyrene with or without incubation. Each value represents the mean \pm SD. (n=3). (—●—) with incubation, (—○—) without incubation.

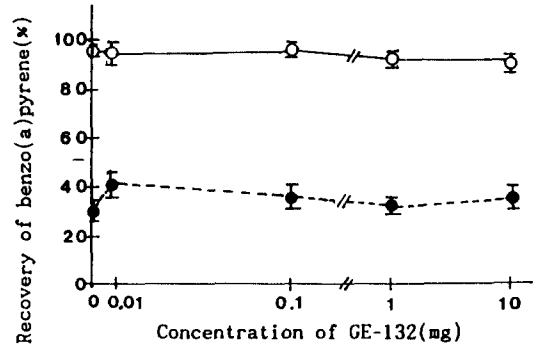


Fig. 3—Influence of GE-132 on the metabolism of benzo(a)pyrene by S9 Mix with or without incubation. Each value represents the mean \pm SD. (n=3). (—●—) with incubation, (—○—) without incubation.

도의 BAP와 여러 농도의 GE-132를 혼합하여 배양한 후 배양하지 않았을 때와 BAP 회수율을 비교한 결과 Fig. 2와 같이 배양하지 않았을 경우의 BAP 회수율(90~94%)과 배양하였을 경우의 BAP 회수율(85~91%)에 유의한 차이가 없어 BAP와 GE-132가 서로 반응하지 않는 것을 확인하였다.

BAP의 대사에 미치는 GE-132의 영향—BAP를 대사시키는 S9 Mix의 효소활성에 미치는 GE-132의 영향을 관찰하기 위하여 여러 농도의 BAP와 GE-132를 혼합하여 S9 Mix와 함께 배양한 후 BAP의 회수율을 배양하지 않았을 때의 BAP 회수율과 비교하므로 조건에 따른 BAP 대사정도를 관찰하였다. 그 결과 배양했을 때의 BAP 회수율(30~41%)과 배양하지 않았을 때의 회수율(92~96%)에 유의한 차이가 있었고, 또한 동일한 배양조건에서 GE-132를 투여하지 않았을 경우와 투여한 경우의 BAP 회수율간에 유의한 차이가 없었다. BAP이 GE-132 10 mg과 함께 배양되었을 때의 BAP의 회수율은 약 35% 정도였다 (Fig. 3).

이와 같은 결과로 GE-132가 S9 Mix에 의한 BAP 대사를 저해하지 않는 것을 알 수 있었다.

BAP 돌연변이활성의 용량-반응관계—*Salmonella typhimurium* TA98에서 관찰된 BAP의 투여량에 따른 돌연변이활성도는 Fig. 4와 같았다.

BAP 2~10 μ M에서 S9 Mix 첨가시 관찰된 plate당 revertants의 평균수는 39~167 revertants의 범위였

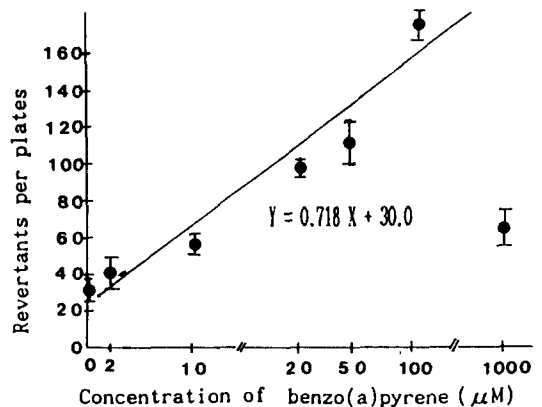


Fig. 4—Dose-response relationship for mutagenesis in *S. typhimurium* TA98 induced by benzo(a)pyrene with S9 Mix. Each value represents the mean \pm SD.

으며, GE-132 10 μ g~30 mg에서 관찰된 평균수는 15~21 revertants범위 었다.

BAP의 투여량을 증가시키에 따라 대조군에 비하여 revertants의 수가 현저하게 증가하였고, BAP 20 μ M 이후부터의 revertants는 대조군과 통계학적으로 유의한 차이가 있었으며, BAP 1 mM에서는 오히려 감소하였다.

독립변수를 BAP 투여량으로 하고 종속변수를 revertants로 하였을 때의 직선회귀방정식은 $Y=0.718$

Table II—Demutagenic activities of GE-132 against mutagenicity induced by benzo(a)pyrene in *S. typhimurium* TA98 with S9 Mix.

Concentration of Benzo(a)pyrene ($\mu\text{M}/\text{plate}$)	Revertants/plate (percent inhibition)					
	0 ^a	1 ^a	5 ^a	10 ^a	20 ^a	30 ^a
—	32 ± 6 ^b	19 ± 5	16 ± 2	17 ± 4	21 ± 5	16 ± 3
10	56 ± 5	37 ± 7 (79%)	41 ± 9 (63%)	31 ± 12* (100%)	NT	NT
20	99 ± 4	87 ± 5 (18%)	70 ± 9 (43%)	59 ± 3* (60%)	17 ± 4* (100%)	NT
50	112 ± 10	99 ± 4 (16%)	74 ± 4 (48%)	65 ± 6* (59%)	52 ± 3* (75%)	NT
100	167 ± 4	129 ± 2* (28%)	120 ± 7* (35%)	107 ± 8* (44%)	24 ± 3*** (100%)	16 ± 5*** (100%)
1000	66 ± 8	NT	NT	72 ± 13	59 ± 6	81 ± 15

Each value represents the mean ± SD.

*p < 0.05, **p < 0.001 compared with benzo(a)pyrene only group.

^aConcentration of GE-132 (mg/plate).

^bNumber of spontaneous mutant per plate.

^cNt, not tested.

X-30.3이었다. GE-132의 경우는 GE-132 10 μg ~30 mg 전 범위에서의 S9 혼합액 첨가 유무와 관련없이 revertants 수가 대조군과 유사하여 통계학적 유의한 차이가 없었으며, BAP의 경우도 S9 Mix을 첨가하지 않았을 때의 revertants 평균수가 3~12 revertants로 무의미 하였다.

Desmutagenicity test—*S. typhimurium* TA98을 대상으로 BAP의 돌연변이원성에 대한 GE-132의 desmutagenicity를 관찰한 결과 GE-132를 병용하였을 때 BAP의 돌연변이활성이 10~100%까지 저해되었다.

BAP 단독투여군에 비하여 50% 이상의 저해율을 나타낸 실험군들은 BAP 10 μM 와 GE-132 1 mg, 5 mg, 10 mg, BAP 20 μM 와 GE-132 10 mg, 20 mg, BAP 50 μM 과 GE-132 10 mg, 20 mg, BAP 100 μM 와 GE-132 20 mg, 30 mg 등의 병용투여군들이었으며 이들은 모두 BAP 단독투여군에 비해 통계학적으로 낮은 돌연변이활성을 나타내었다(Table II).

BAP 1 mM 이상의 농도에서는 GE-132와의 상호작용을 관찰할 수 없었으며, direct mutagenicity를 관찰하고자 -S9 상태에서 관찰한 plate 당 revertants 수는 전 실험군 모두 그 평균치가 6~14 revertants의 범위였고 모든 실험군간에 유의성을 찾아볼 수

없었다.

Antimutagenicity test—*S. typhimurium* culture solution(1~2 × 10⁹ cell) 5 ml에 1 mM BAP(200 μM BAP/1 ml strain) 1 ml를 투여하여 S9 Mix와 함께 실험관 내에서 배양시킨 후 얻은 mutagenized cellos을 대상으로 GE-132 5 mg, 10 mg, 20 mg 및 30 mg을 각각 병용하여 GE-132를 병용하지 않은 경우와 돌연변이활성도를 비교하였다.

GE-132를 투여하지 않은 경우의 평균치인 1265 revertants/plate에 비하여, GE-132 10 mg 이상의 농도에서 유의하게 낮은 revertants 수를 보여 GE-132 10 mg, 20 mg, 30 mg에서 평균 revertants는 각각 976 revertants/plate, 471 revertants/plate, 85 revertants/plate였으며, percent inhibition은 GE-132 10 mg, 20 mg, 30 mg에서 각각 25%, 69%, 100%였다(Fig. 5).

BAP의 돌연변이활성에 대한 GE-132의 용량-반응관계—BAP에 의한 돌연변이활성을 저해하는 GE-132의 저해율로부터 Fig. 6과 같은 용량-반응곡선을 구할 수 있었다.

BAP 10~100 μM 을 대상으로 GE-132 1~30 mg의 병용투여결과 얻어진 16~100% 범위의 저해율을 각각의 용량-반응관계를 기준으로 살펴본 결과 Y = 2.33X + 13.59와 같은 직선회귀방정식을 얻었다.

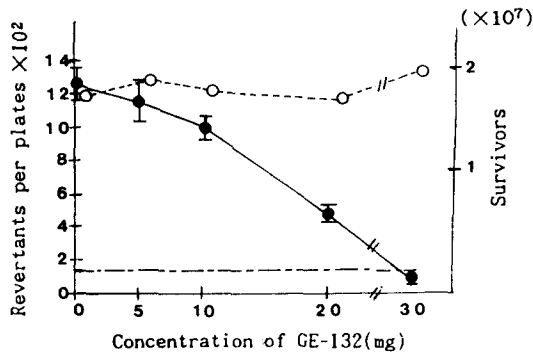


Fig. 5—Antimitagenic effect of GE-132 on the mutagenicity induced by benzo(a)pyrene in *S. typhimurium* TA98 with S9 Mix. Each value represents mean \pm SD.

Continuous line (●—●), revertant colonies : one dotted broken line (---), spontaneous revertants : broken line (○—○), survival.

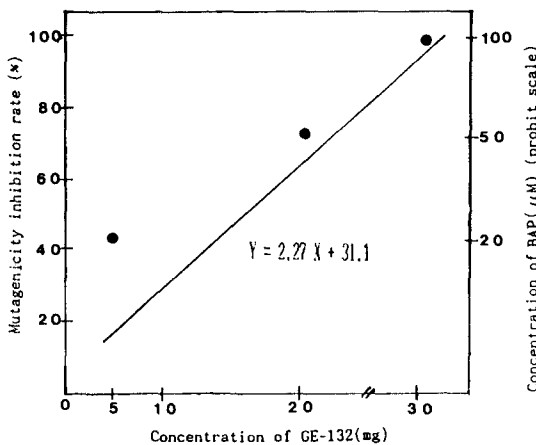


Fig. 6—Dose-response relationship of GE-132 for benzo(a)pyrene mutagenicity.

고 찰

BAP에 기인한 돌연변이원성과 발암성간에는 유사점이 존재하는데 이에 부수되는 가정으로는 BAP의 친전자 대사체가 Mixed Function Oxidases system의 작용에 의해 BAP로부터 발생한다는 것이다. 이들 활성 중간체들은 돌연변이 또는 발암성을 일으키기 위해 DNA 또는 중요한 세포의 거대분자와 결합할 능력을 지니게 되는데 여기서 발암성은 BAP에 의해

영향을 받은 세포의 유전정보에 변화를 나타낸다는 개념으로 돌연변이원성과 발암성 사이에 상관관계가 존재함을 의미하게 된다. 따라서 BAP의 돌연변이원성에 대한 조사는 잠재적인 발암성을 예측하고, 어떤 system에서의 악성종양 발생기전을 규명하여 BAP에 의해 부과되는 인간건강의 잠재적 위험을 예측할 수 있게 된다.³⁰⁻³²⁾

이러한 의미에서 실험관내 및 생체내에서 BAP를 대상으로 실시하게 되는 BAP의 독성효과를 어떤 독성물질이 저해할 수만 있다면 예방 및 치료적인 측면에서 커다란 의미를 지닌다고 할 수 있다.

지금까지 알려진 바 있는 BAP의 발암 및 돌연변이원성을 저해하거나 길항하는 것으로 알려진 최근의 보고들을 간추려보면 다음과 같다.

1979년 Wattenberg³³⁾는 BAP을 포함하는 다환 방향족 탄화수소류에 의해 유도된 종양이 phenol이나 indoles 혹은 flavones을 함유하는 식물들에 의해 저해된다고 보고하였으며, Lai³⁴⁾는 채소류의 추출물에서 얻은 chlorophyllin이 BAP의 돌연변이활성을 저해한다고 하였다. Vitamine A에 의한 BAP의 항돌연변이원성이 Calle와 Sullivan³⁵⁾에 의해 보고되었고, 1985년 Terwel 등³⁶⁾은 BAP에 대한 riboflavin의 항돌연변이 작용을 밝혔다.

Chinese medicines을 대상으로 한 항돌연변이 작용과 관련된 연구들도 다수 존재하고 있어, 1986년 Sakai 등³⁷⁾은 BAP에 의한 돌연변이활성이 *Paeniae radix*, *Bupleuri radix*, *Hoelen* 및 *Glycyrrhizae radix* 등의 추출물에 의해 현저하게 길항된다고 하였으며, 또한 이들 4종의 추출물의 작용이 각각 다른 형태의 항돌연변이작용을 보였다고 하였다.

이와 관련되어 1990년 Sakai 등²⁸⁾은 BAP에 길항하는 Peony root 추출물의 항돌연변이 작용이 S9 Mix의 효소작용을 저해하여 BAP 대사를 방해하고 또한 BAP 대사체의 돌연변이활성을 불활성화 시키는 것이라고 그 기전을 보고하였으며, Sato 등³⁸⁾은 grass-wrack pondweed(*Potamogeton oxyphyllus* Miquel), curled pondweed(*Potamogeton crispus* L.) 및 smartweed(*Polygonum hydropiper* L.)의 수추출물을 대상으로 BAP에 대한 항돌연변이 작용기전을 밝혔는데 이들 추출물들이 고분자 화합물이고, 점액성이며, 열에 강하고, 물에 잘 용해되는 공통적인 성질을 지녔으며, 이들의 주 작용은 BAP을 강하게 흡착하는데서

기인한다고 하였다. 이것은 이미 밝혀진 Chinese medicine들의 작용기전보다 더 진전된 연구결과로 평가되고 있다.

이 밖에도 BAP의 돌연변이원성에 대한 저해 혹은 길항물질을 찾고자 하는 연구는 새로 합성된 신물질이나 고대로부터 사용되어온 식품 등을 대상으로 끊임없이 계속되고 있다.

게르마늄을 대상으로 한 돌연변이원성 물질에 대한 연구결과들을 살펴보면 1984년 Kada 등³⁹⁾은 germanium oxide가 Trp-p-2(3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole)의 돌연변이활성에 길항한다고 보고하였다. Trp-p-2는 amino acids와 proteins으로부터 유도되는 frameshift pyrolysate 돌연변이원성 물질로 알려지고 있으며⁴⁰⁾ 이에 대한 germanium oxide의 작용이 error-prone DNA repair를 통해서 Trp-p-2의 돌연변이활성을 촉진하는 요소인, plasmid PKM 101에 비존재적으로 작용하기 때문이라고 하였다.

이 연구결과에서는 germanium oxide가 세포내에서 SOS repair function에서 나타나는 errors에 길항할지도 모른다고 하였으며, 또한 Trp-p-2 이외에도 frameshift type의 돌연변이원성 물질에 대해 유용하게 작용할지도 모른다고 시사하고 있다.

1982년 Mochizuki와 Kada⁴²⁾는 γ -ray-irradiated *E. coli*에서 유도된 돌연변이에 대해 GE-132의 길항작용을 보고하면서 γ -ray에 의해 형성된 reverted genes의 gene-expression을 GE-132가 저해할지도 모른다고 하였는데, 구체적인 가설은 γ -ray가 recA와 lexA genes에 돌연변이를 유발하므로 DNA polymerase III가 돌연변이가 표현에 영향을 미치는 주요요소일 것이고 따라서 γ -ray의 돌연변이활성에 대한 GE-132의 작용은 DNA합성 과정의 fidelity를 증진시키므로 DNA-replicating enzyme들의 error-proneness에 길항하는 것이라고 하였다.

이상과 같은 연구결과들과 관련되어 본 연구결과를 고찰하여 보면 Ames desmutagenicity test와 antimutagenicity test에서 모두 GE-132가 돌연변이원성을 유의하게 저해하는 것을 알 수 있었다. Desmutagenicity test에서 나타난 GE-132의 효과는 2가지로 생각해 볼 수 있을 것이다. 즉 하나는 GE-132가 S9 Mix의 enzyme system에 영향을 미쳐 BAP의 대사를 저해하는 것과, 다른 하나는 GE-132가 BAP 대사체의 돌연변이활성을 저해하는데서 오는 효과일 것이다.

그러나 본 실험에서는 BAP의 대사에 미치는 GE-132의 영향을 관찰한 결과 GE-132는 BAP의 대사를 저해하지 않았으므로 BAP의 돌연변이원성에 대한 GE-132의 저해작용은 BAP 대사체의 돌연변이활성도를 불활성화 시킴에 기인하는 것임을 예측할 수 있다.

Antimutagenicity test에서 관찰된 GE-132의 작용은 BAP에 의해 형성된 mutagenized cell에 대한 작용임을 고려하여 볼때 reverted His⁺ genes의 gene expression에 대해 GE-132가 길항하기 때문인 것으로 생각되어 진다.

BAP는 그 대사체인 diol epoxide가 DNA구조의 adenine 혹은 guanine과 반응하여 DNA sequence의 변성 및 염기쌍 분열을 일으키는 것으로 알려지고 있다.^{6,7)}

이와 같은 염기배열의 손상은 그 정도가 강해지면 세포는 사멸하게되나 그 정도가 적당하게 되면 손상의 세포는 아미노산 배열이 혼란된 DNA에 의해 단백질이 합성되어 세포의 기능이 변화하게 된다. 그러나 잘못된 DNA배열은 DNA합성 과정에서 여러 가지 DNA repair system에 의해 자연적으로 수정되거나 혹은 앞서 서술한 바 있는 여러 가지 항돌연변이 작용을 지닌 물질들에 의해 관련 enzyme들의(endonuclease, DNA glycosylase, AP endonuclease, DNA polymerase, DNA ligase)의 fidelity를 증진시키므로 소멸되어 지기도 한다.⁴¹⁾

이러한 관점에서 볼 때 GE-132는 손상된 DNA의 gene expression을 저해하는 위와 관련된 작용을 지니고 있는 것으로 예측되나, Ames 시험법과 같이 미생물을 이용한 실험에서는 BAP 대사체에 대한 GE-132의 구체적인 작용이나 세포내에서의 생리학적 기능 등을 정확하게 규명할 수 없는 점이 하나의 제한점이 된다.

이처럼 본 연구에서 GE-132의 작용기전을 세밀하게 관찰할 수는 없었으나 세포외에서는 GE-132가 BAP의 대사체인 epoxide체의 돌연변이활성도에 영향을 미치는 것으로 예측할 수 있으며, 세포내에서는 reverted gene의 gene expression을 저해한다고 할 수 있다.

이와 관련된 연구가 더욱 진전되어 BAP 대사체에 대한 GE-132의 작용이 규명된다면 이미 알려진 바 있는 GE-132의 항종양효과와 interferon생성 등의 작용에 덧붙여 더욱 더 뚜렷한 작용기전을 확인할 수

있을 것으로 여겨진다.

Interferon은 다양한 작용이 알려지고 있다. Stasio와 Taylor⁴²⁾에 의하면 interferon이 herpes simplex virus의 gene transcription을 저해한다고 하였으며, Paez 등⁴³⁾은 정상적인 DNA replication을 차단하는 바이러스의 작용에 interferon이 길항한다고 하였다.

이와 같은 연구결과들은 GE-132의 작용이 interferon 작용과 무관하지 않다는 것을 강조하고 있는 내용들이지만 Ames 시험법상에서 관찰된 GE-132의 작용이 *S. typhimurium* TA98 균주에서의 interferon 유도과 관련이 있는지의 여부는 더욱 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

결 론

발암성 및 돌연변이원성 물질로 알려진 BAP을 대상으로 최근 항종양효과를 비롯하여 광범위하게 질병의 치료에 응용되고 있는 유기염제 GE-132(carboxyethylgermanium sesquioxide)의 DNA 손상저해 효과의 항돌연변이 작용 및 그 작용기전의 일부를 규명하고자 발암원 및 돌연변이원을 검색하는 실험 방법인 Ames 시험법을 실시하였다.

Ames 시험법에서는 *Salmonella typhimurium* TA 98을 사용하여 desmutagenicity test와 antimutagenicity test를 구분하여 실시하여 GE-132가 BAP의 대사를 저해하는지의 여부와 BAP 대사체의 돌연변이 활성도에 미치는 영향을 관찰하였으며, 또한 BAP에 의해 이의 영향을 받은 mutagenized cell의 reverted His⁺ gene의 gene expression에 미치는 GE-132의 작용을 관찰하였다.

Desmutagenicity test에서 GE-132는 BAP의 대사 저해 없이 돌연변이활성을 억제하였으며, 가장 유의한 효과를 나타낸 BAP와 GE-132의 농도조합은 각각 10 μM과 10 mg, 20 μM과 20 mg, 100 μM과 30 mg이었다.

BAP에 의한 변화된 reverted cells에 대한 GE-132의 직접작용 여부를 확인하기 위한 antimutagenicity test에서도 GE-132 투여로 돌연변이활성도가 유의하게 억제되었다.

이상의 결과로부터 BAP에 대해 GE-132는 S9 Mix의 효소작용을 저해하지 않고 BAP 대사체의 돌연변이활성도를 불활성화 시켜 억제하는 것을 알 수 있었으며, 또한 BAP에 의해 변화된 reverted cells의

gene expression에 길항하는 항돌연변이 작용을 확인할 수 있었다.

문 헌

- 1) Phillips, P. H.: Fifty years of benzo(a)pyrene, *Nature*, **303**, 468-472 (1983).
- 2) Hoffmann, D., Hecht, S. S. and Wynder, E. I.: Tumor promoters and cocarcinogens in tobacco carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.*, **50**, 247-257 (1983).
- 3) Lehr, R. E. and Jerima, D. M.: Relationships of quantum mechanical calculation, relative mutagenicity of benzo(a)anthracene diol epoxides, and "Bay Region" concept of aromatic hydrocarbon carcinogenicity. *J. Toxicol. Environ. Health*, **2**, 1259-1265 (1977).
- 4) Frenkel, K., Grunberger, D., Boublick, M. and Weinstein, I. B.: Conformation of dinucleoside monophosphates modified with benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol 9,10-epoxide as measured by circular dichroism. *Biochemistry*, **17**, 1278-1282 (1978).
- 5) Osborne, M. R., Harvey, R. G. and Brookes, P.: The reaction of trans-7,8-dihydroxy-anti-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene with DNA involves attack at the N⁷-position of guanine moieties. *Chem. Biol. Interact.*, **20**, 123-130 (1978).
- 6) Kakefuda, T. and Yamamoto, H.: Modification of DNA by the benzo(a)pyrene metabolic diol-epoxide γ-7, t-8-dihydroxy-t-9,10-oxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **75**, 415-419 (1978).
- 7) Kakefuda, T. and Yamamoto, H.: Modification of DNA by benzo(a)pyrene diol epoxide I. In: Polycyclic Hydrocarbons and Cancer, edited by H. V. Gelboin and P. O. P. Tso, New York, *Academic*, **2**, 293-304 (1978).
- 8) Oikawa, H. and Kakimoto, N.: Proceedings of the 21st Annual Meeting of Japan Chemical Society, 1946 (1968).
- 9) Kumano, N., Nakai, Y., Ishilawa, T., Koinumaru, S., Suzuki, S., Kikumoto, T. and Konno, K.: Effects of carboxyethylgermanium sesquioxide on the methyl cholanthrene-induced tumorigenesis in mice.

- Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ.*, 3-4(Japanese), **25**, 89-95 (1978).
- 10) Ishida, N., Suzuki, F. and Hayashi, Y.: Antitumor effects of organogermanium compound (GE-132) in mouse tumors. Proc Jpn. Cancer Assoc. II, Annual Meeting 193-201 (1979).
 - 11) Satoh, H. and Iwaguchi, T.: Antitumor activity of new novel organo-germanium compound, GE-132, cancer and chemotherapy Publishers, Japan, 79-83 (1979).
 - 12) Mochizuki, H. and Kada, T.: Antimutagenic effect of GE-132 on γ -ray-induced mutation in *Escherichia coli* B/r WP² trp⁻. *Int. J. Radiat. Biol.*, **42**(6), 653-659 (1982).
 - 13) Suzuki, F., Brutkiewicz, R. R. and Pollard, R. B.: Importance of T-cell and macrophages in the antitumor activity of carboxyethylgermanium sesquioxide (GE-132). *Anticancer Res.*, **5**(5), 479-483 (1985).
 - 14) Aso, H., Suzuki, F., Yamaguchi, T., Hayashi, Y., Ebina, T. and Ishida, N.: Induction of interferon and activation of NK cells and macrophages in mice by oral administration of GE-132, and organic germanium compound. *Microbiol-Immunol.*, **29**(1), 65-74 (1985).
 - 15) Suzuki, F., Brutkiewicz, R. R. and Pollard, R. B.: Cooperation of lymphokine(s) and macrophages in expression of antitumor activity of carboxyethylgermanium sesquioxide (GE-132). *Anticancer- Res.*, **62**(2), 177-182 (1986).
 - 16) DiMartino, M. J.: Antiarthritic and immunoregulatory activity of spirogermanium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **236**(1), 103-110 (1986).
 - 17) Aso, H., Suzuki, F., Ebina, T. and Ishida, N.: Antiviral activity of carboxyethylgermanium sesquioxide (GE-132) in mice infected with influenza virus. *J. Biol. Respose Mod.*, **8**(2), 180-189 (1989).
 - 18) Mizushima, M., Satoh, H. and Miyao, K.: Some pharmacological and clinical aspects of a novel organic germanium compound GE-132. In : 1st Int. Conf. on Germanium. Hanover, Oct. 1984. Lekin & Samochowiec, eds. Semmelweis-Verlag (1985).
 - 19) Suzuki, F. and Pollard, R. B.: Prevention of suppressed interferon gamma production in thermally injured compound, GE-132. *J. Interferon Res.*, **4**(2), 223-233 (1984).
 - 20) Komuro, T., Kaimoto, N., Katayama, T. and Hazato, T.: Inhibitory effects of GE-132 (carboxyethylgermanium sesquioxide) derivatives on enkephalin-degrading enzymes. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **8**, 379-386 (1986).
 - 21) Levine, S. A. and Kidd, P. M.: Oxygen-nutrition for super health. *J. Orthomol. Medicine.*, **1**(3), 145-148 (1986).
 - 22) Hachisu, M., Takahashi, H., Koeda, T. and Sekizawa, Y.: Analgesic effect of novel organogermanium compound, GE-132. *J. Pharmacobiodyn.*, **6**(11), 814-820 (1983).
 - 23) Liem, S. H.: The influence of sanumgerman on the oxygen partial pressure of the oxygen multistep process. In : 1st Int. Conf. on Germanium. Hanover, Oct. 1984. Lekin & Samochowies, eds, Semmelweis-Verlag (1985).
 - 24) Lee, H. M. and Chung, Y.: Effect of organic germanium on metallothionein induction in liver and kidney of cadmium and mercury intoxicated rats. *Yakhak Hoeji*, **35**(2), 99-110 (1991).
 - 25) Harisch, G.: Glutathione and glutathion-dependent enzymes of the rat liver after different doses of Sanumgerman. In : 1st Int. Conf. on Germanium. Hanover, Oct. 1984. Lekin & Samochowiec, eds, Semmelweis-Verlag (1985).
 - 26) Walker, C. M., Moody, D. J., Stites, D. P. and Levy, J. A.: CD8 lymphocytes can control HIV infection *in vitro* by suppressing virus replication. *Science*, **234**, 1563-1566 (1986).
 - 27) Ames, B. N., McCann, J. and Yamaski, E.: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella, mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **31**, 347-364 (1975).
 - 28) Sakai, Y., Nagase, H., Ose, Y., Kito, H., Sato, T., Kawai, M. and Mizuno, M.: Inhibitory action of peony root extract on the mutagenicity of benzo(a) pyrene. *Mutat. Res.*, **244**, 129-134 (1990).
 - 29) Ong, T., Whong, W. Z., Stewart, J. D. and Brockman, H. E.: Chlorophyllin : A potent antimutagen against environmental and dietary complex mixture. *Mutat. Res.*, **173**, 111-115 (1986).
 - 30) Feldman, G., Remsen, J., Shinohara, K. and Cerutti,

- P.: Excisability and persistence of benzo(a)pyrene DNA adducts in epitheloid human lung cells. *Nature*, London, **274**, 796-798 (1978).
- 31) McCann, J. and Ames, B. N.: Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test : assay of 300 chemical : discussion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **73**, 950-954 (1976).
- 32) Sugimura, T., Sato, S., Nagao, M., Yahagi, T., Maatsushima, T., Seino, Y., Takeuchi, M. and Kawach, T.: Overlapping of carcinogens and mutagens. In : *Fundamentals in Cancer Prevention*, edited by Margee, P. N. *et al.* Tokyo : Univ. of Tokyo Press, 191-215 (1976).
- 33) Wattenberg, L. W.: Naturally occurring inhibitors of chemical carcinogenesis, in : Miller, E. C. *et al.* (eds.), *Naturally occurring carcinogens-mutagens and modulators of carcinogenesis*, Japan, Sci. Soc. Press, Tokyo, 315-329 (1979).
- 34) Lai, C. N.: Chlorophyll : the active factor ion wheat sprout extract inhibiting the metabolic activation of carcinogens *in vitro*. *Natr. Cancer*, **1**, 19-21 (1979).
- 35) Calle, L. M. and Sullivan, P. D.: Screening of antioxidants and other compounds for antimutagenic properties towards benzo(a)pyrene-induced mutagenicity in strain TA98 of *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res.*, **101**, 99-114 (1982).
- 36) Terwel, L. and Van der Hoefer, J. C.M.: Antimutagenic activity of some naturally occurring compounds towards cigarette-smoke condensate and benzo(a)pyrene in the Salmonella/microsome assay. *Mutat. Res.*, **152**, 1-4 (1985).
- 37) Sakai, Y., Nagase, H., Ose, Y., Sato, T., Yamada, A., Hibi, M. and Yamada, F.: Antimutagenicity of extracts from crude drugs in Chinese medicines. *Mutat. Res.*, **174**, 1-4 (1986).
- 38) Sato, T., Ose, Y., Nagase, H. and Kito, H.: Mechanism of antimutagenicity of aquatic plant extracts against benzo(a)pyrene in the Salmonella assay. *Mutat. Res.*, **241**, 283-290 (1990).
- 39) Kada, T., Mochizuk, H. and Miyao, K.: Antimutagenic effects of germanium oxide on Trp-p-2-induced frameshift mutation in *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA1538. *Mutat. Res.*, **125**, 145-151 (1985).
- 40) Nagao, M. Y., Takahashi, Y., Yahagi, T., Sugimura, T., Takeda, K., Shudo, K. and Okamoto, T.: Mutagenicities of γ -carboline derivatives related to potent mutagens found in tryptophan pyrolysates. *Carcinogenesis*, **1**, 451-454 (1980).
- 41) Friedberg, E. C.: DNA repair, Freeman, W. H. and Co. New York (1985).
- 42) Pe Stasio, P. R. and Taylor, M. W.: Specific effect of interferon on the herpes simplex virus type 1 tranactivation event. *J. Virol.*, **64**(6), 2588-2593 (1990).
- 43) Paez, E., Garcia, F. and Gil, F. C.: Interferon cures cells lytically and persistently infected with african swine fever virus *in vitro*. *Arch. Virol.*, **112**(1-2), 115-127 (1990).