

³²P-Postlabelling 방법의 응용 : Azo색소 및 Flavonoid화합물에 의해 유도되는 DNA Adduct의 검출에 관한 연구

김재현* · 박창원 · 박정식 · 홍연탁 · 김호정 · 이주한 · 이현수 · 이동권¹

국립보건안전연구원 독성부, ¹성균관대학교 약학대학

Application of the ³²P-Postlabelling Technique : A Study on Detection of DNA Adduct Induced by Azo Dyes and Flavonoid Compounds

Jae-Hyun KIM*, Chang-Won PARK, Jung-Sik PARK, Youn-Tack HONG, Hyo Jung KIM,
Joo-Han LEE, Heon-Soo LEE and Dong-Kwon RHEE¹

Department of Toxicology, National Institute of Safety Research, 5 Nokbundong, Eunpyungku, Seoul, Korea

¹College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon, Korea

(Received February 9, 1993; accepted March 15, 1993)

Abstract—DNA adducts induced by putative chemical related to carcinogenesis were detected and determined by ³²P-Postlabelling assay after exposure of 4 compounds comprising two azo dyes (amaranth, new cocchine) and two flavonoid compounds (rutin, quercetin) to ICR mouse. DNA was isolated from mouse liver and digested enzymatically to deoxyribonucleoside 3'-monophosphate. The postincubation of DNA digests with nuclease P1 before ³²P-labelling enhanced the technique's sensitivity. Nuclease P1 cleaves deoxyribonucleoside 3'-monophosphates of normal nucleotides to deoxyribonucleosides which do not serve as substrates for polynucleotide kinase, while most of adducts were found to be totally or partially resistant to the 3'-dephosphorylating action of nuclease P1. The adducted deoxyribonucleoside 3'-monophosphate was converted to 5'-³²P-labelled deoxynucleoside 3',5'-bisphosphate by T4 polynucleotide kinase. The nucleotides were separated by anion-exchange thin layer chromatography(TLC) on polyethyleneimine cellulose by 4-dimensional or 2-dimensional TLC then detected by autoradiography. The results show that DNA adducts were detected in liver DNA of ICR mouse after administration of amaranth and quercetin by 2-dimensional and/or 4-dimensional TLC.

Keywords □ ³²P-postlabelling, amaranth, new cocchine, rutin, quercetin, DNA adduct.

화학물질에 의해 유도되는 DNA 손상은 DNA adduct 형성(Ames, 1979), strand breakage(Petzoid 등, 1978), gene 재조합(Lavi, 1982) 및 gene amplification(Cairns, 1981) 등이 있으며, 그중 DNA adduct형성은 발암성의 유발단계(initiation stage)와 밀접한 관계를 가지고 있을 뿐만아니라(Watson, 1981), 발암성에 필요조건이므로 DNA adduct 검출이 발암성을 측정하는데 중요한 역할을 한다(Poirier 등, 1991). 대부분의 장기 및 단기 발암원 검색 시험법(long-term and short-term carcinogen screening test)에서는 발암원에 의해 유도된 adduct의 양을 측정함으로써 발암원에 어느정도 노출되었는지를

평가하는 기준으로 삼았으나 *in vivo*에서 형성되는 adduct의 양은 매우 적기 때문에 더 민감도가 높은 방법이 요구되어 왔다. 이러한 목적으로 사용되는 방법으로 방사성 동위원소로 표지된 화학물질의 사용, 특정 anti-adduct항체의 사용, ³²P-postlabelling 방법 등이 있으며(Venitt 등, 1986), 그중에도 ³²P-postlabelling은 시험물질에 대한 정확한 구조를 알 수 없어도 DNA adduct를 분리, 검출할 수 있고 민감도가 매우 높아 발암원 검색방법 중 단기 시험법으로 가장 적당하다고 보고하여 이 방법을 이용한 DNA adduct검출의 중요함을 강조하였다(Randerath 등, 1981).

³²P-postlabelling방법 중 개발초기 단계의 기본적인 방법을 간단히 소개하면 다음과 같다. 표적기관으로 추

* To whom correspondence should be addressed.

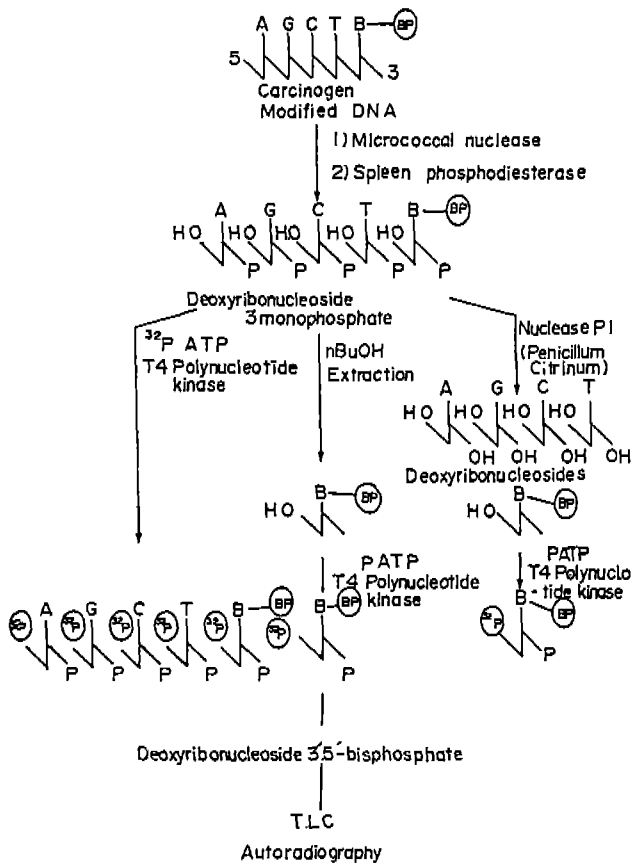


Fig. 1. ³²P-Postlabelling methods for DNA adduct detection. (A) standard procedure, (B) butanol extraction enhancement, (C) nuclease P₁ enhancement.

정되는 곳에서 DNA를 분리한 후 효소처리하여 nucleotide수준(deoxyribonucleoside 3'-monophosphate)으로 가수분해시키고 [γ -³²P]ATP와 T₄-polynucleotide kinase를 처리하여 ³²P로 labelling시켜(Deoxyribonucleoside 3', 5'-bisphosphate) Thin Layer Chromatography(TLC)로 adduct를 검출하는 것이다(Fig. 1 참조). 그러나 상기 기본방법(standard procedure)에서 점차 민감도를 향상시키기 위한 노력이 계속진행되어 몇가지 새로운 방법 시도 되었다. 특정 전개용매를 이용하여 adduct nucleotide로부터 정상적인 nucleotide를 제거하는 4차원 전개방법을 사용한 방법과 tetrabutyl ammonium chloride의 존재하에서 n-butanol로 adduct nucleotide를 이행시켜 정상적인 nucleotide를 제거하는 방법으로 민감도를 향상시켰으며(Gupta 등, 1982 ; Randerath 등, 1985 ; Gupta, 1985), nuclease P₁를 처리하여 정상적인 nucleotide를 분해시켜 ³²P 표지를 저해하게 함으로써 autoradiography시 adduct에 의한 분해능을 좋게하여 민감도를 향상시켰다(Fig. 1 참조)(Reddy 등, 1986 ; Reddy 등, 1987). 또한 최근 흡연이나 직업적으로 발암원에 노출된 사람의 노출 정도를 평가하는데 ³²P-postlabel-

ling방법을 직접 적용하여 *in vivo*에서 극히 소량 형성된 DNA adduct도 검출가능하며 인간에게도 직접 적용될 수 있음을 밝혔다(Philips 등, 1988 ; Philips 등, 1988).

Amaranth는 1970년에 처음 발암성이 보고(Andrianova, 1970)된 이래로 최근까지도 발암성과의 관계가 명확히 입증되지 않은 상태이다. *In vitro* 실험에서 amaranth의 첨가로 세포수준에서 발암성을 측정하여 본 결과, 발암과 관련된 것으로 추정되는 hydrocarbon hydroxylase 및 guanylate cyclase의 활성도가 약 2배 정도가 증가함을 보고하여(Rochat 등, 1983), 발암성 관계에 대해 효소학적 측정법으로 입증하였으나, amaranth를 장기간 투여하였을 때 어떠한 발암효과도 발생하지 않았다는 상반된 보고를 하였다(Clode 등, 1983). 이와같이 amaranth는 우리나라를 포함한 몇 나라에서 사용되에도 발암과의 관계가 명확히 밝혀진 보고가 없어 식품첨가물로서의 안전성여부에 대한 심도깊은 연구의 수행이 요구된다. 더우기 amaranth와 new coccine을 포함한 대부분의 azo색소가 장내세균총에 의해 DNA와 반응성이 있는 방향족아민(aromatic amine)으로 환원된다는 보고(Chung, 1983)로 미루어 DNA adduct형성가능성이 더욱 초점이 되고 있다. 한편 flavonoid계 생약성분인 rutin과 quercetin도 발암과 관계가 아직 명확히 밝혀지지 않은 성분들로서 azoxymethanol에 의해 유도되는 결장종양 모델에서 항암효과가 있으며(Deschmer 등, 1991) hamster를 이용한 발암성 시험에서는 유효성있는 발암효과가 인정되지 않아 발암과의 관계는 무관하다는 보고가 있다(Morino 등, 1982). 그러나 rutin과 quercetin은 flavonoid계열 생약성분 20가지 중 변이원성을 갖는 대표적인 물질이라는 상반된 결과를 보고하였다(Kodansha, 1987).

따라서 본 실험에서는 Kim 등(Kim 등, 1991)이 사용한 nuclease P₁을 이용한 2차원 전개방법과 이를 개선하여 민감도를 향상시킨 4차원 전개 방법을 이용하여 amaranth나 new coccine 등의 azo색소 및 rutin, quercetin 등의 flavonoid계 생약성분의 DNA adduct형성여부를 측정함으로써 발암성과의 관계를 규명하고 식품첨가물 및 약품으로써의 안전성을 확보하는데 그 목적이 있다.

실험방법

실험동물 및 사육조건

실험동물은 국립보건안전연구원에서 사육한 생후 5주령의 건강 상태가 양호한 ICR계 웅성 mouse(33±2g)를 실험에 사용하였으며 동물에 검체를 투여하기 전에 12시간 동안 절식시키고 물은 자유롭게 섭취시켰다. 사육 조건은 온도 23±1℃, 상대습도 55±5%, 명암교대 12시간(조명시간 06 : 00~18 : 00)을 유지했다.

검체 및 시약

Amaranth, New coccine, Rutin, Quercetin, Proteinase K, Ribonuclease A, Micrococcal nuclease, Spleen phos-

phodiesterase, T4 polynucleotide kinase, Nuclease P1, Potato apyrase는 Sigma Co.로부터 구입하였으며, [γ - 32 P]ATP(3000 Ci/mmol)는 Amersham Co.로부터 구입하였다. 또한 기타 시약은 특급(G.R.)을 실험에 사용하였다.

검체의 제조와 투여

Amaranth의 new coccine은 주사용 증류수에 녹여 1.5 g/kg의 용량으로, 4일간 경구투여하고, rutin은 1% CMC(carboxymethylcellulose)용액에 현탁하여 1g/kg용량으로, quercetin도 1% CMC용액에 현탁하여 30 mg/kg용량으로 각각 4일간 경구투여하였으며, 대조군은 1% CMC용액을 4일간 경구투여하고 양성대조군으로 사용한 aflatoxin B1은 3000g/kg로, benzo(a)pyrene은 500 mg/kg의 용량으로 각각 1회 투여하였다. 이 검체의 투여량은 LD₅₀(반수치사량)치를 확인하고 투여기간동안 치사하지 않을 정도의 양을 설정하여 투여하였다.

조직으로부터 DNA 분리정제

'Ausubel' 등의 방법(1987)을 변형하여 다음과 같이 DNA를 정제하였다. 장기를 적출 즉시 액체질소에 동결하여 저장한 후 사용시 0°C에서 조직을 녹이고 0.3g을 취하여, 0°C digestion buffer(100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, 25 mM EDTA, 0.5% sodium dodecyl sulfate, 0.1 mg/ml proteinase K : pH 8.0)를 3.6 ml씩 가하고 균질화하였다. 이 용액을 50°C 수욕상에서 12~18시간동안 100 rpm으로 진탕하였다. 여기에 동용량의 phenol : chloroform : isoamylalcohol(25 : 24 : 1 ; v/v) 혼합액(Maniatis 등, 1989)을 가하고 5분간 진탕한 후 3000 rpm에서 1시간동안 원심분리하여 수층인 상등액만 취하고 동량의 chloroform을 가하여 2회 반복, 세척하였다. 상층을 취하여 1/2용량의 7.5 M ammonium acetate와 2배 용량의 100% ethanol(ice-cold)을 넣은 후 천천히 혼합하고 3000 rpm에서 5분간 원심분리하여 핵산물질을 침전시킨 후 상등액을 버리고 30분간 감압건조하여 1 ml의 TE buffer(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA : pH 8.0)에 녹였다.

조직 1g당 0.5 mg ribonuclease A(RNase A)를 넣고 37°C에서 30분간 incubation한 다음 phenol-chloroform-isoamylalcohol혼합액을 다시 가하여 단백질인 ribonuclease A를 제거한 후 세척하여 수층(상층)을 얻었다. 이 상층에 최종농도가 0.1 M이 되도록 1 M NaCl 용액을 넣고 2배 용량의 100% ethanol(ice-cold)을 넣어 혼합한 후 -20°C에서 1시간 방치하였다. 3000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 버리고 백색 침전물(DNA)을 30분간 감압 건조하였다. 건조된 DNA를 TE buffer에 녹여 총용량을 3 ml로 만든 후 3g의 CsCl을 넣는다. 증류수에 10 mg/ml ethidium bromide를 0.24 ml씩 넣고 섞은 후 굴절률이 1.3860이 되도록 모두 맞추는 다음 100,000 rpm으로 4시간 원심분리한 후 UV를 쬐어 관찰되는 형광색의 DNA band를 취하였다. 그후 물에 포화시킨 동량의 butanol을 넣고 교반하여 상층을 제거하는 방법을 반복하여

ethidium bromide를 제거하였다. 또한 과량의 CsCl을 제거하기 위하여 4°C에서 멸균한 TE buffer로 투석(dialysis)하여 얻어진 DNA를 30분간 감압건조하여 1 ml의 TE buffer에 녹인 후 260 nm에서 흡광도(O.D)를 측정하여 DNA를 정량하고 0.7% agarose gel 전기영동을 시행하여 DNA의 순도를 측정하였다.(전기영동한 결과는 나타내지 않았다.)

DNA의 정량

TE buffer에 녹인 DNA용액을 260 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도가 1인 경우를 50 μ g/ml로 환산하였다.

32 P-postlabelling에 의한 분석(Reddy 등, 1986)

DNA digestion : 10 μ g에 해당하는 DNA용액에 20 mM sodium succinate, 10 mM CaCl₂(pH 7.6) 용액 10 μ l를 혼합한 후 micrococcal nuclease(0.67 unit/1 μ l 20 mM sodium succinate, 10 mM CaCl₂ : pH 7.8) 1 μ l 및 spleen phosphodiesterase(0.015 unit/1 μ l 20 mM sodium succinate, 10 mM CaCl₂ : pH 7.8) 1 μ l를 가하여 다시 잘 혼합하여 37°C 수욕상에서 3시간 동안 incubation하였다.

Nuclease P1 처리 : 위 용액에 0.25 M sodium acetate (pH 5.0)용액 3.0 μ l 및 0.3 mM ZnCl₂ 용액 1.8 μ l를 가하여 잘 흔들어 준 다음 nuclease P1(5 μ g/1 μ l 0.25 M sodium acetate, 0.3 mM ZnCl₂) 1.2 μ l를 가하여 다시 잘 혼합하여 37°C에서 40분간 incubation하였다. incubation

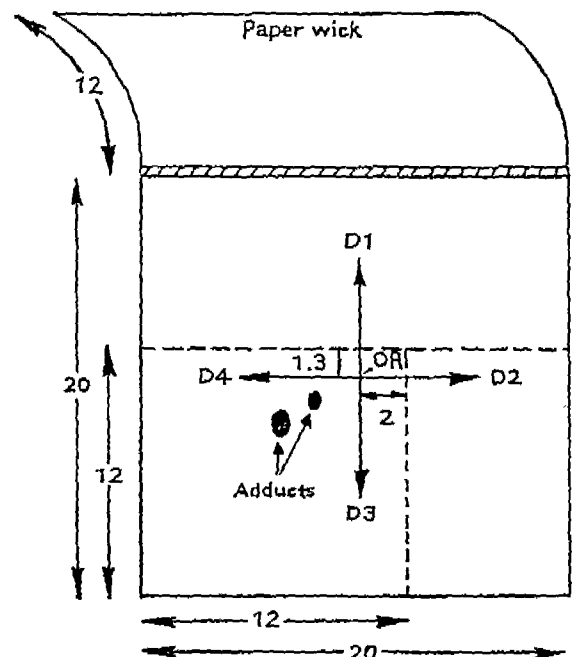


Fig. 2. Diagram of 4-D PEI-cellulose T.L.C. for the separation of 32 P-labelled DNA adducts. The labelled DNA digest was applied close to the center of thin layer, at the point marked OR. A whatman 1 wick was attached to the top of the sheet.

후 0.5 M tris base용액 2.4 μl를 가하였다.

³²P-postlabelling : Nuclease P1으로 처리한 용액에 2.4 μl의 L buffer(200 mM Bicine-NaOH, 100 mM MgCl₂, 100 mM Dithiothreitol, 10 mM Spermidine : pH 7.6)에 2.0 μl의 (γ-³²P)ATP(10 μci/μl), 0.5 μl의 T₄ polynucleotide kinase(10 unit/1 μl 0.25 M sodium acetate : pH 5.0)과 1.1 μl의 멸균증류수를 가하였다. 이것을 37°C 에서 30분간 incubation한 후 potato apyrase 1 unit/μl용액 1.76 μl를 가하여 37°C 에서 30분간 incubation하였다.

2D-TLC(two dimensional thin layer chromatography) 로 분리 : 반응액전체(28.2 μl)를 PEI(polyethyleneimine) cellulose sheet의 왼쪽 가장자리에 모세관으로 점적한 후 1 M ammonium acetate(pH 3.5)로 전개(D1)한 후 10 분간 100% methanol에서 salt를 제거한 다음 상온에서 건조하였다. 이 PEI cellulose를 포화된 ammonium sulfate(pH 3.5)로 다시 전개(D2)한 후 상온에서 건조하였다.

4D-TLC(four dimensional thin layer chromatography) 로 분리(Gupta 등, 1982) : 반응액 전체를 PEI cellulose sheet의 중간부분에 Fig. 2와 같이 모세관으로 점적한 후 상단부에 Whatman No. 1 paper를 붙이고 1.1 M lithium chloride(pH 6.0)로 전개(D1)하여 paper를 포함한 상단부를 절단한 다음 5분씩 2회 탈이온수에 담그어 전개 용매를 제거하고 더운 공기로 건조하였다. 이 PEI cellulose를 2.5 M ammonium formate(pH 3.5)로 다시전개(D2) 후 상단부를 절단, 제거하여 탈이온수에 5분간 담그어 두었다가 상온에서 건조하였다. 그 후 3.0 M lithium formate/8M urea(pH 3.5)에 전개(D3)한 다음 위와같은 방법으로 2회 세척해 건조시킨 후 마지막으로 0.8 M lithium chloride/0.5 M tris-HCl/8 M urea(pH 8.0)에 전개(D4)하고 탈이온수에 5분간 담그어 두었다가 상온에서 건조하였다.

Autoradiography : 건조된 PEI cellulose sheet위에 X-

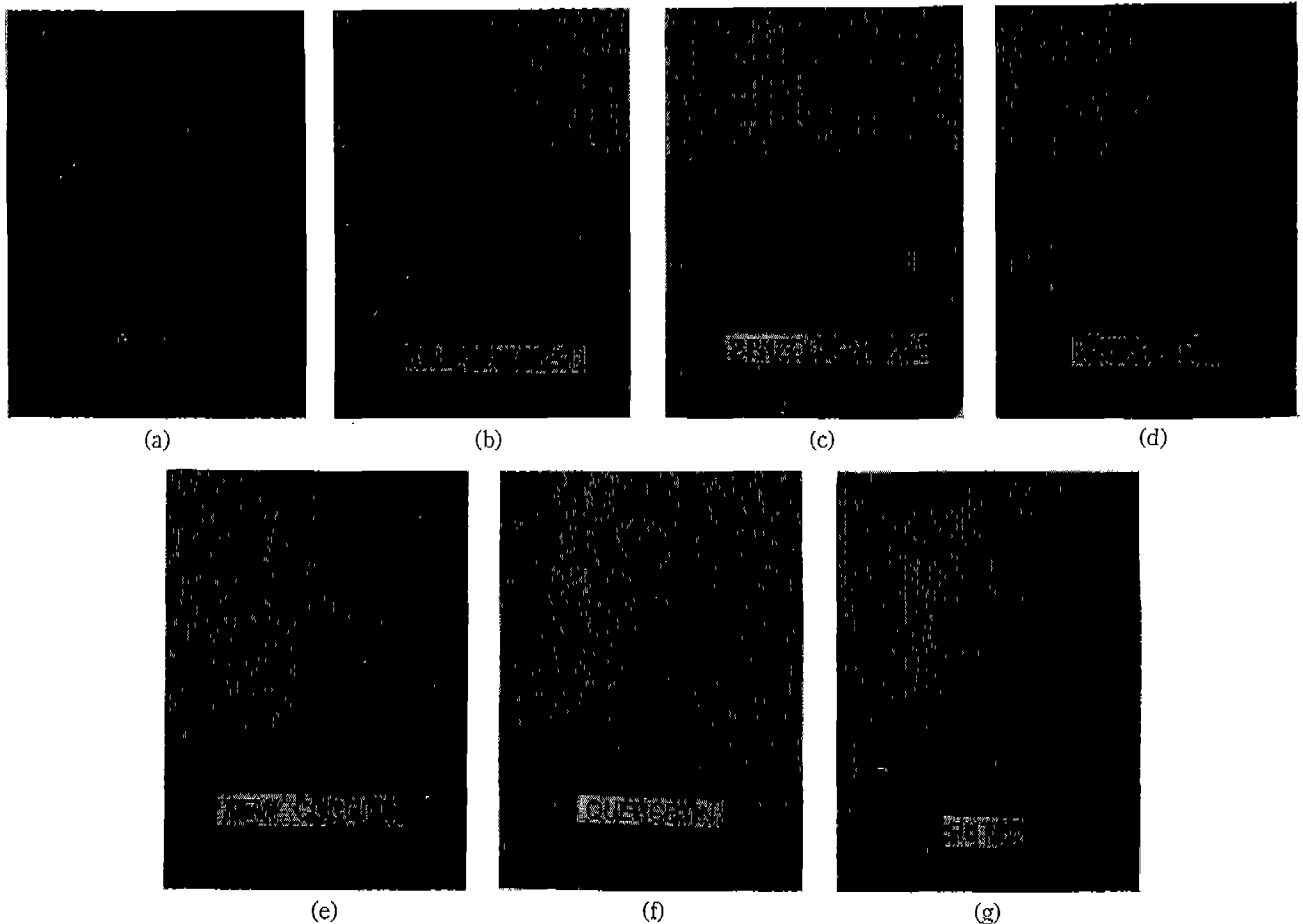


Fig. 3. Autoradiogram of ³²P-labeled nucleotides DNA with no treatment (panel a), positive control DNA treated with Aflatoxin B1, Benzo(a)pyrene(panel b,c), and DNA treated with amaranth, new coccine, quercetin and rutin (panel d-g) by 4-dimensional TLC. Normal nucleotides and ³²Pi were removed by development was in 1.1 M LiCl(D₁) and 2.5 M ammonium formate, pH 3.5(D₂), while the adducts were retained at or close to origin. Labelled adducts were finally resolved by development in 3 M lithium formate, 7 M urea, pH 3.5(D₃), followed by developed in 0.8 M lithium chloride, 0.5 M Tris-HCl, 7 M urea, pH 8.0(D₄). The closed circle into autoradiograph film is origin. The adduct spot induced by each agent is circled.

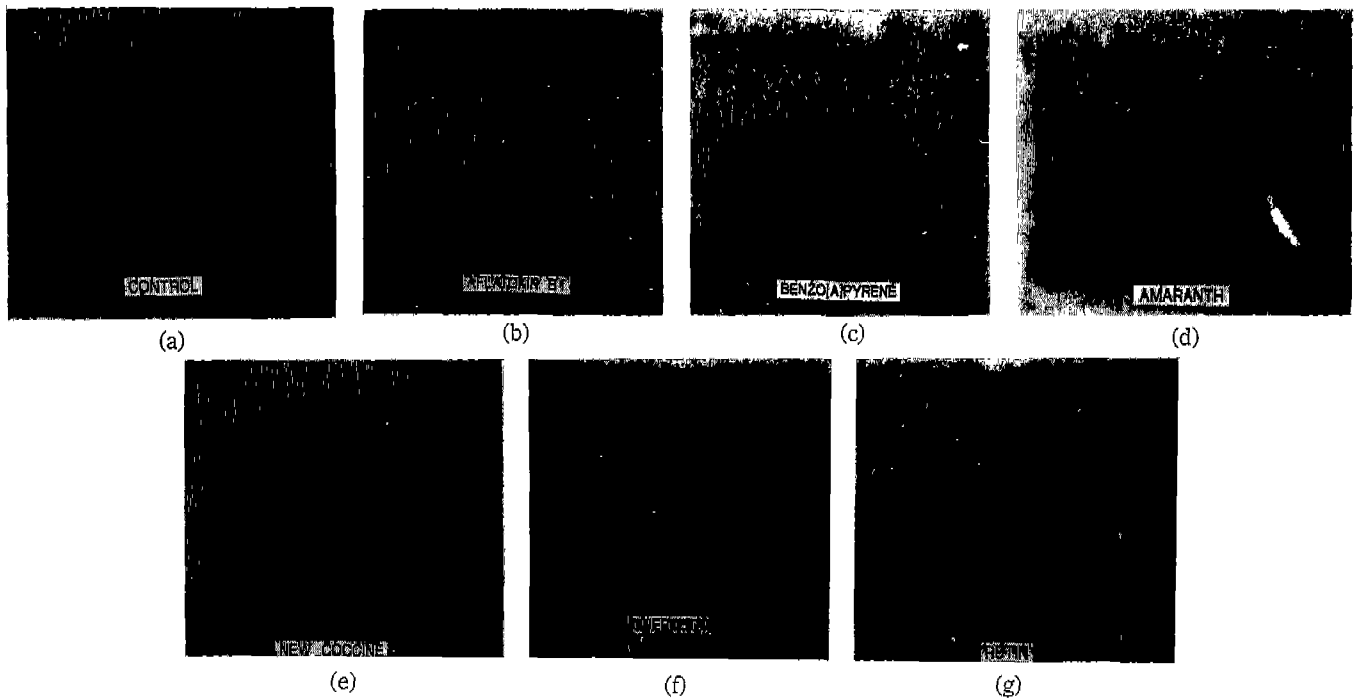


Fig. 4. Autoradiogram of ^{32}P -labeled nucleotides DNA with no treatment (panel a), positive control DNA treated with Aflatoxin B_1 , Benzo(a)pyrene (panel b,c), and DNA treated with amaranth, new coccine, quercetin and rutin (panel d-g) by 2-dimensional TLC. Solvent of development was in 1 M ammonium acetate, pH 3.5(D_1) and saturated ammonium sulfate, pH 3.5(D_2). The closed circle into autoradiograph film is origin. The adduct spot induced by each agent is circled.

ray film을 얹고 12시간 정도 상온에 방치한 다음 암실에서 현상 하였다. 즉, X-ray developer에서 5분간 전개하고 흐르는 물에 1분간 방치하여 약액을 씻어낸 후 rapid fixer에서 다시 5분간 전개하고 15분간 흐르는 물로 세척하여 autoradiography 필름을 얻었다.

실험결과

Azo색소인 amaranth와 new coccine은 1.5g/kg, flavonoid생약성분인 quercetin과 rutin은 각각 30 mg/kg, 1 g/kg의 높은 용량으로 마우스에 4일간 투여한 후 이들에 의한 DNA adduct 형성여부를 ^{32}P -postlabelling방법으로 관찰하였으며 그 결과는 다음과 같다.

4차원 전개방법을 이용한 ^{32}P -postlabelling방법의 경우는 정상적인 nucleotide를 PEI(polyethyleneimine) TLC 상에서 전개용매를 이용하여 제거시켰기 때문에 1% CMC를 투여한 음성대조군에서는 어떠한 spot도 발견되지 않았다. 그러나 양성대조군(aflatoxin B_1 , benzo[a]pyrene)에서는 adduct로 보이는 많은 spot들이 관찰되어 이들에 의한 DNA adduct형성이 확인되었다. 반면 본 실험에서 DNA adduct를 검색하기 위해 사용된 물질중 amaranth만이 adduct로 보이는 spot이 확인되었을 뿐 new coccine, rutin, quercetin에 의한 adduct검출은 보이지 않았다(Fig. 3).

2차원 전개방법을 이용한 ^{32}P -postlabelling방법의 경우 음성대조군에서 정상적인 nucleotide로 보이는 여러개의 spot이 관찰되었으며, 양성대조군으로 사용된 aflatoxin B_1 과 benzo[a]pyrene의 투여군에서는 음성대조군에는 존재하지 않는 adduct로 추정되는 spot이 각각 1개씩 관찰되었다. 또한 본 실험에서 사용한 물질 중 amaranth와 quercetin이 각각 음성대조군에 없는 spot이 관찰되어 adduct를 형성함을 추정해 볼 수 있었다(Fig. 4).

고찰

특정 화학물질에 의해 형성된 DNA adduct는 종양의 진행단계 중 유발단계(initiation stage)에 영향을 미치는 인자 중 하나로써 in vivo 및 in vitro실험에서 DNA adduct의 형성비율이 증가함에 따라 종양발생율도 증가하며, adduct의 수복(repair)능력의 저하로 종양발생에 대한 위험성을 증가시킨다(Randerath 등, 1983). 그러므로 adduct의 양과 수를 검출함은 발암정도를 평가하는 지표로 삼을 수 있으며 새로운 화학물질의 출현에 따른 발암원 검색법으로 ^{32}P -postlabelling과 같은 DNA adduct검출시험법이 활용가능할 것으로 생각된다. 이에대해 근거문헌으로써 arylamine류, azo화합물, nitroaromatic, polycyclic aromatic hydrocarbon류 및 methylating관련 물질 28가지를 ^{32}P -postlabelling방법으로 검색하였을 때

DNA adduct의 구조와는 무관하게 검색할 수 있음을 보고하였으며(Reddy 등, 1984), 그후에도 benzo[a]pyrene, 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, dibenzo[c,g]carbazole, 4-aminophenyl, safrole 및 mitomycin C와 같은 다양한 발암원에 의해 형성되는 aromatic 혹은 bulky non-aromatic DNA adduct를 검출하는데 응용할 수 있음을 보고하였다(Reddy 등, 1986).

또한 본실험에서 사용된 방법은 민감도를 높이기 위하여 nuclease P1의 사용과 4차원전개방법을 병용한 ³²P-postlabelling을 이용함으로써, autoradiography시 분해능을 향상시켜 보다 나은 조건을 설정하기 위한 실험이 처음으로 시도되었다. 또한 본 연구팀이 선행한 mitomycin C, malotilate 및 malotilate유도체에 의해 생성된 DNA adduct 검출에 이용된 방법(nuclease P1의 사용과 2차원전개방법을 병용한 ³²P-postlabelling방법; Kim 등, 1991)을 병용사용함으로써 두 실험법 사이의 차이에 대해서도 비교해 볼 수 있다.

Azo 색소

Azo 색소는 의류, 인쇄, 화장품, 약물 및 식품 생산과정에서 광범위하게 사용되는 물질로써, 그중 amaranth는 1970년 이전에는 발암성과의 관계에 대하여 보고된 바 없으나 1970년 이 물질이 고용량에서 발암성이 있음(Andrianova, 1970)이 밝혀져 러시아를 포함한 나라에서 사용이 중지 되었으나 그후에도 우리나라를 포함한 몇 나라에서는 계속 사용하고 있다. 그후 계속되는 연구에서 많은 azo화합물들이 장내 세균총에 의해 azo결합이 깨어지면서 aromatic amine으로 환원될 수 있음을 추정하고, 여러 azo색소의 mutagenesis와 carcinogenesis와의 관계를 실험하여 azo색소의 섭취로 인한 발암화의 가능성에 대해 제시한 바 있으며(Chung, 1983), 또한 화학물질 발암화와 관련된 arylhydrocarbon hydroxylase와 guanylate cyclase의 두 효소가 amaranth에 의해 2배 정도나 증가됨을 관찰하고(Rochat 등, 1983), 이 azo색소가 세포수준에서 발암원으로 작용가능함을 추정하였다. 한편 azo화합물인 congo red 및 Evan's blue를 마우스의 피부에 적용하여 피부로부터 분리한 DNA를 ³²P-postlabelling방법에 의해 adduct를 검출한 결과 adduct spot이 한두개가 발생하여 azo화합물에 의한 adduct형성이 상기 방법으로도 검출가능함을 보고하였다(Reddy 등, 1984).

본 실험에서는 azo색소 중 amaranth 및 new coccine을 투여한 ICR계 마우스로부터 적출한 간에서 DNA를 추출하여 ³²P-postlabelling방법으로 DNA adduct의 형성여부를 측정된 결과, 정상적인 DNA를 분리 제거하는 4차원전개방법에서는 amaranth에 의한 DNA-adduct가 검출되었으며(Fig. 3), 정상적인 DNA도 함께 검출되는 2차원전개방법에서도 대조군과 다른 한개의 adduct spot이 관찰되어 adduct형성이 재확인되었다(Fig. 4).

반면 new coccine투여에 의한 DNA adduct형성은 본

실험에서는 확인되지 않았으나 다른 전개조건 및 방법을 모색하여 new coccine이 DNA adduct를 형성하는지 여부를 재검토 하는 것이 바람직 할 것으로 사료되며, 더불어 본 실험에서 DNA adduct형성이 확인된 amaranth의 경우도 다양한 전개조건을 개선, 적용하여 DNA adduct형성여부를 재확인하여 구체적인 증거를 확보하는 것 또한 앞으로 진행되어야 할 연구 방향이라 생각한다. 또한 본 실험에서 사용한 azo색소의 양은 과량(6g/kg/4 days)의 시료를 단시간에 걸쳐 투여한 것이므로 보통 우리가 소량씩 장기간 노출되는 azo색소의 사용에 대해서는 인체적용이 가능한 방법으로 실험이 진행되어야 하며 또한 DNA adduct의 형성과 repair기전과의 관계 등 심도깊은 연구도 규명해야할 과제라고 사료된다.

Flavonoid 화합물

Rutin과 quercetin은 발암성이 확인된 반면(Maltz 등, 1981; Tang 등, 1992) 오히려 항암효과 및 변이원성이 억제된다는 보고 등(Deschner 등, 1991; Francis 등, 1989) 이 성분에 대한 발암성관계가 확립되지 않아 구체적인 연구가 진행되어야 할 물질들로서 우선 발암과의 관계를 정립하는 것이 우선일 것으로 사료된다. 본 실험에서는 Flavonoid계 생약성분은 ³²P-postlabelling방법으로 DNA adduct의 형성여부를 관찰하여 본 결과 정상적인 DNA를 분리 제거하는 4차원전개방법에서는 DNA adduct가 검출되지 않았지만(Fig. 3), 정상적인 DNA도 함께 검출되는 2차원전개방법에서는 quercetin투여군에서 대조군과 다른 한개의 spot이 관찰되어 DNA adduct형성이 확인되었다(Fig. 4).

이상과 같은 결과로 본 실험에서는, azo색소 및 flavonoid계 생약류 성분에 관한 발암성이 보고된 이래로 발암성과의 관계가 명확하게 입증되지 않은 amaranth와 quercetin이 DNA adduct를 형성할 가능성이 있는 것으로 확인되었다. 그러나 quercetin투여군의 경우 2차원전개방법에서는 DNA adduct가 확인된 반면 4차원전개방법에서는 확인되지 않은 것으로 미루어보아 4차원전개방법에서는 D₁ 및 D₂ 전개에 의해 DNA adduct까지 제거되었을 것으로 추정되며 이에 adduct의 물리화학적 성질 및 전개용매 등의 성질을 정확히 파악하여 더 나은 분석조건의 설정이 필요할 것으로 사료된다.

감사의 말씀

이 논문이 완성되기까지 수고하여 주신 국립보건안전연구원 일반독성과의 전 직원께 감사를 드립니다.

참고문헌

- Ames, B.N. (1979). Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science* **204**, 587-593.
Andrianova, M.M. (1970). Carcinogenous properties of red

- food pigment-amaranth, 5x purple and 4R purple. *Vop. Pit. tan.* **29**, 61-65.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1987). Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley & Sons.* section 2.2.1-2.2.3.
- Cairns, J. (1981). The origin of human cancers. *Nature* **289**, 353-357.
- Chung, K.T. (1983). The significance of azo-reduction in the mutagenesis and carcinogenesis of azo dyes. *Mutation Research* **114**, 269-281.
- Clode, S.A., Hooson, J., Grant, D. and Butler, W.H. (1987). Long-term toxicity study of amaranth in rats using animals exposed in utero. *Food Chem. Toxicol.* **25**, 937-946.
- Deschner, E.E., Ruperto, J., Wong, G., Newmark, H.L. (1991). Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis* **12**, 1193-1196.
- Francis, A.R., Shetty, T.K., Bhattacharya, R.K. (1989). Modulating effect of plant flavonoids on the mutagenicity of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Carcinogenesis* **10**, 1953-1955.
- Gupta, R.C. (1985). Enhanced sensitivity of ³²P-postlabelling analysis of aromatic carcinogen. *Cancer Res.* **45**, 5656-5662.
- Gupta, R.C., Reddy, M.V. and Randerath, K. (1982). ³²P-postlabelling analysis of non-radioactive aromatic carcinogen-DNA adduct. *Carcinogenesis* **3**, 1081-1092.
- Kim, J.H., Park, J.S., Hong, Y.T., Park, C.W., Lee, J.H., Lee, H.S. and Rhee, D.K. (1991). Detection of DNA damage by ³²P-Postlabelling(I). *The Report of National Institute of Safety Research Republic of Korea* **4**, 155-170.
- Kodansha, I.H. (1987). *Naturally Occurring Carcinogens of Plant Origin.* Tokyo. 53-62.
- Lavi, S. (1982). Carcinogen mediated amplification of specific DNA sequence. *J. Cell. Biochem.* **18**, 149-156.
- Maltz, M.L., MacGregor, J.T. (1981). Activity of the plant flavonol quercetin in the mouse lymphoma L 15178y TK⁺/- mutation DNA single-strand break and Balb/C 3T3 chemical transformation assays. *Mutat. Res.* **88**, 317-324.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1989). *Molecular Cloning.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Morino, K., Matsukara, N., Kawachi, T., Ohgaki, H., Sugimura, T. and Hirono, I. (1982). Carcinogenicity test of quercetin and rutin in golden hamsters by oral administration. *Carcinogenesis* **3**, 93-97.
- Petzold, G.L. and Swenberg, J.A. (1978). Detection of DNA damage induced in vivo following exposure of rats to carcinogen. *Cancer Res.* **38**, 1589-1594.
- Philips, D.H., Hemminki, K., Alhonen, A., Hewer, A. and Grover, P.H. (1988). Monitoring occupational exposure to carcinogen. *Mutation Research* **20**, 4531.
- Philips, D.H., Hewer, A., Martin, C.N., Garner, R.C. and King, M.M. (1988). Correlation of DNA adduct level in human lung with cigarette smoking. *Nature* **336**, 790.
- Poirier, M.C. and Weston, A. (1991). DNA adduct determination in human. *Prog. Clin. Biol. Res.* **372**, 205-218.
- Randerath, E., Agrawal, H.P., Reddy, M.V. and Randerath, K. (1983). Highly Persistent polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adduct in mouse skin: Detection by ³²P-postlabelling analysis. *Cancer Letters* **20**, 109-114.
- Randerath, K., Randerath, E., Agrawal, H.P., Gupta, R.C., Schurdak, M.E. and Reddy, M.V. (1985). Postlabelling methods for carcinogen-DNA adduct analysis. *Environmental Health Perspectives* **62**, 57-65.
- Randerath, K., Reddy, M.V. and Gupta, R.C. (1981). ³²P-labelling test for DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 6126-6129.
- Reddy, M.V. and Randerath, K. (1986). Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of ³²P-postlabelling test for structurally diverse DNA adducts. *Carcinogenesis* **7**, 1543-1551.
- Reddy, M.V. and Randerath, K. (1987). ³²P-postlabelling assay for carcinogen-DNA adducts: Nuclease P1-mediated enhancement of its sensitivity and application. *Environmental Health Perspectives* **76**, 41-47.
- Reddy, M.V., Gupta, R.C., Randerath, E. and Randerath, K. (1984). ³²P-Postlabeling test for covalent DNA binding of chemicals in vivo: application to a variety of aromatic carcinogens and methylation. *Carcinogenesis* **5**, 231-243.
- Rochat, M.H. and Vesely, D.L. (1983). Red dye No.2 and the red pigment carmine enhance aryl hydrocarbon hydroxylase and guanylate cyclase activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **111**, 409-414.
- Tang, W. and Eisenbrand, G. (1992). *Chinese Drugs of Plant Origin.* Springer-Verlag 948-952.
- Venitt, S., Bartsch, H., Becking G., Fuchs, R.P.P., Hofnung, M., Malaveille, C.M., Matsushima, T., Pegg, A.E., Rajewsky, M.R., Roberfroid, M., Rosenkranz, H.S. and Willians, G.M. (1986). *Long-term and Short-term Assays for Carcinogens A Critical Appraisal.* 1st. ed., IARC Scientific Publications. 129-142.
- Watson, W.P. (1981). Post-radiolabelling for detecting DNA damage. *Mutagenesis* **2**, 319-331.