

현미 추출물이 Mitomycin C로 유발된 CHL 세포의 염색체 이상에 미치는 영향

전향숙 · 김인호 · 김현정

한국식품개발연구원 쌀이용연구센터

Effect of Brown Rice Extract on Mitomycin C-Induced Chromosome Aberration in Cultured CHL Cells

Hyang-Sook Chun, In-Ho Kim and Hyun-Jung Kim

Rice Utilization Research Center, Korea Food Research Institute

Abstract

The effect of brown rice extract on mitomycin C(MMC)-induced chromosome aberration was examined in cultured Chinese hamster lung(CHL) cells, after induction of chromosome aberration and mitotic index in CHL cells cultured with MMC were observed. There were no significant differences between mitotic indices of CHL cells treated with DMSO, and MMC and brown rice extract. The frequency of chromosome aberration showed dose-dependent relationship in CHL cells treated with 0.2~3.0 µg/assay of MMC. But chromosome aberrations could not be assayed due to cytotoxicity of MMC when its concentrations were above 3.0 µg/assay. Chromatid type, especially gap and break, of chromosome aberration were most frequently observed. When CHL cells treated with 2.0 µg/assay of MMC and brown rice extracts of concentration ranging 0.75~10.0 mg/assay were incubated, frequencies of chromosome aberration induced by MMC were significantly decreased at above concentrations($p < 0.01, p < 0.05$). As concentration of brown rice extract was increased, frequencies of chromosome aberration was decreased 7~30% in some irregularity.

Key words: brown rice extract, mitomycin C-induced chromosome aberration, CHL cells

서 론

암의 발생 메커니즘은 정확하게 밝혀지지 않고 있으나, initiation, promotion, progression의 세 단계를 거쳐 발생하는 것으로 알려져 있으며, 발암의 initiation은 전자 친화성 발암 인자(initiator)가 생체내에서 대사적으로 활성화되어 유전자의 해산에 비가역적으로 결합함으로써 정상세포의 DNA 염기 배열 순서를 변화시켜 신생물 전구세포(prenecoplastic cell)를 형성하는 돌연변이 현상으로 설명된다. 촉진인자(promoter)는 발암인자와 독립적으로 세포막의 receptor를 매개로 유전정보의 발현 및 분화에 가역적으로 관여하여 전구세포를 신생물세포(neoplastic cell)로 전환시키며 그 세포가 종식하는 과정에서 양성과 악성이 결정되고, 종양(tumor)이 암(cancer)으로 변화되는 전이를 거친 후 전파되는데⁽¹⁾, 발암 환경 중 30% 이상을 제공하는 식품이⁽²⁾ 관여하는 단계는 initiation과 promotion이다. 그 가운데서도 식품은 생명

유지와 더불어 지속적으로 섭취되므로 잠재적 종양세포의 전이나 전파의 촉진을 억제하는 의약품과는 달리 initiation단계 부터 영향을 미친다. 암의 initiation단계에서 발생되는 돌연변이는 발암과 83% 이상의 높은 상관성을 나타내므로 변이원은 발암원으로 인식되고 있어 돌연변이 현상을 구명하는 것은 암 해석의 기초가 된다⁽³⁾. 또한 발암과 돌연변이 현상을 예방함에 있어 그 기초가 되는 것은 DNA의 회복에 있으므로 DNA의 회복과정에 관여하는 식품 유래 물질의 발견은 항암 기작을 유추할 수 있는 근거가 된다고 볼 수 있겠다.

물리적, 화학적 인자의 돌연변이원성 여부를 판정하기 위한 시험은 세균의 유전자 및 포유동물 세포의 염색체를 이용하는 시험판내 시험법(*in vitro* assay system)과 설치류를 활용한 소해시험, 우성치사법, 초파리를 대상으로 한 반성열성 치사법 및 포유동물 골수세포의 유전학적 시험 등의 생체 시험법(*in vivo* assay system)으로 분류되며⁽⁴⁾, 나라마다 화학물질, 식품 첨가물 및 의약품에 대하여 기본항목과 그 시험결과 양성으로 의심될 경우 시행하는 추가시험으로 나누어 변이원성 판정의 기준으로 삼고 있다. 우리나라(보사부)와 유럽(OECD)은 기본 항목으로 시험판내 시험법을, 추가항목으로 생체 시험

Corresponding author: Hyang-Sook Chun, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-Dong, Bundang-Ku, Songnam-Si, Kyonggi-Do 463-420, Korea

법을 채택하고 있으며, 일본(후생성)과 미국(FDA)은 기본항목으로 시험관내 시험법 외에도 소핵시험, *in vivo* DNA 부정기 합성 등의 생체시험 항목을, 추가항목으로는 소핵시험 등 생체시험을 재시행하거나 포유동물세포 형질변환 등의 시험을 요구하고 있다⁽⁵⁾.

돌연변이를 억제하는 생리활성 물질의 검색시는 신속성과 간편성을 지닌 미생물의 유전자 돌연변이를 이용한 *Salmonella typhimurium* reversion assay⁽⁶⁾, SOS chromatotest⁽⁷⁾, spore rec-assay⁽⁸⁾와 포유동물 배양세포의 염색체 이상을 관찰하는 자매염색체 교환(sister chromatid exchange)⁽⁹⁾ 및 염색체 이상 시험(chromosome aberration test)⁽¹⁰⁾ 등의 시험관내 시험법이 기본항목으로 광범위하게 사용되고 있다. 그러나 실제적으로 돌연변이 억제 활성은 시험법에 따라 억제율의 차이는 물론 활성 유무까지 차이가 날 수 있다. 특히 식품을 포함한 전연물은 여러가지 성분이 혼재되어 활성의 검색이 오류가 발생되기 쉽다. 식품의 성분 가운데 돌연변이를 억제하는 활성 물질이 존재할 경우, 원칙적으로는 모든 돌연변이 원성 시험에서 활성이 측정되어야 하며 돌연변이원성 시험과 마찬가지로 적어도 서로 다른 시험계를 사용하는 시험법에서 돌연변이 억제 활성이 일관되게 측정되어야 결과를 인정하고 해석할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 *Salmonella typhimurium* reversion assay⁽⁶⁾, SOS chromatotest⁽⁷⁾, spore rec-assay⁽⁸⁾ 등의 미생물계 시험법을 이용하여 쌀 추출물의 돌연변이 억제효과를 살펴본 전보⁽¹¹⁾에 이어 고등진핵세포계 시험법인 염색체 이상시험을 이용하여 현미 추출물의 돌연변이 억제 효과를 측정하여 활성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

쌀은 농촌진흥청 작물시험장에서 재배된 1991년도 산장려품종으로서 일반계의 일품벼를 주로 사용하였다. 돌연변이원으로서 mitomycin C(MMC)는 Sigma Chemical Co.(U.S.A.)로부터 구입하였으며, 기타 모든 시약은 특급품 이상을 사용하였다.

현미 추출물의 조제

벼를 제현기(Satake rice machine, Japan)를 이용하여 왕겨를 분리시켜 현미를 만들고 분쇄기(cyclotec 1903 sample mill, Sweden)를 이용하여 60메쉬로 분쇄한 후 메탄올을 현미 중량의 10배(w/v)로 넣고 rotary shaker를 이용하여 25°C에서 회전속도 200 rpm으로 하룻밤 추출하였다. 이 추출물을 여과지(Toyo No. 4)로 여과한 후 감압농축한 다음 dimethyl sulfoxide(DMSO)로 고형물을 회석하여 4°C에 보관하면서 돌연변이 억제시험에 사용하였다.

사용세포 및 배양방법

염색체 이상에 사용한 Chinese hamster lung fibroblast(CHL-11)는 일본국립위생시험소에서 분양받았으며, 10% fetal bovine serum과 100 µg/ml의 penicillin 및 100 U/ml의 streptomycin을 포함시킨 Eagle's minimal essential 배지(Gibco)를 사용하여, 포화습도하에서 5% CO₂를 공급하는 37°C의 배양기에서 배양하였다.

염색체 이상 시험⁽¹²⁾

CHL세포를 60 mm의 petri dish에 2×10⁴/5 ml 되도록 퍼종하여 3일간 배양한 후, 각각 일품벼의 현미 methanol 추출물(0.75~10.0 mg/assay)과 양성 대조 물질을 함유하는 배양액으로 교환하여 22시간 동안 배양하였다. 각 petri dish에 colcemid(Sigma)를 1 µM 되도록 처리한 후, 2시간 동안 배양하여 총검체 처리 시간이 24시간이 되도록 하였다. 0.05% trypsin-EDTA(Gibco)를 처리하여 세포를 수집한 다음 15 ml 원심분리관에 세포를 모아 37°C의 0.075 M KCl 10 ml에 잘 혼탁시킨 후 37°C 수조에 15분간 방치하였다. 고정액(methanol : acetic acid=3:1, v/v)을 0.5 ml 가하여 전고정을 실시하고, 원심분리로 세포를 수거하여 고정액 5 ml를 3회 교환하여 고정시킨 후 공기 진조법으로 슬라이드 표본을 제작하여 leukostat I용액으로 4분, leukostat II(Fischer)로 4분간 염색하여 현미경(Olympus BH-2, Japan)으로 관찰하였다. 양성대조군으로는 MMC(0.2-5.0 µg/assay)를, 음성대조군으로는 DMSO를 사용하였다.

염색체 이상 유무는 한 시험당 100개의 세포분열 중 기상을 현미경 하에서 판독하여 관찰하였으며, 세포분열 지수(mitotic index)는 현미경 400배 시야에서 1,000개의 세포를 세어 이중 분열중인 세포수를 백분율로 표시하였다. 염색체 이상은 염색체(chromosome) 또는 염색분체(chromatid)에 나타나는 갭(gap), 절단(breakage) 및 교환(exchange)으로 분류하여 관찰하였다.

통계처리

실험결과는 각 분석항목에 따라 Mean±SD를 구하였으며, 대조군과 처리군간의 유의성은 5% 수준에서 Student's t-test로 검정하였다. 모든 통계분석은 SAS 프로그램을 사용하여 personal computer로 처리하였다.

결과 및 고찰

현미 추출물이 CHL세포의 세포분열지수에 미치는 영향

현미 추출물이 CHL세포의 세포분열에 미치는 영향을 살펴본 결과는 Table 1과 같다. MMC를 단독으로 투여한 것은 DMSO나 현미 추출물을 같이 투여한 것보다 세포분열지수(mitotic index)가 낮은 경향을 나타내었으나 통계적으로 유의적인 차이는 없었다($p>0.05$). 또한 현미 추출물 농도에 따른 차이도 나타나지 않아 현미 추출물은 CHL세포의 세포분열에 영향을 미치지 않는 것으로 판단되었다.

Table 1. The mitotic index of CHL cells treated with dimethyl sulfoxide(DMSO), mitomycin C(MMC) and various concentrations of brown rice extract

Test materials	Mitotic index(%) ¹⁾
DMSO(25 µl/assay)	11.5± 0.89
MMC(2 µg/assay)	10.4± 1.15 ^{NS}
MMC + brown rice extract	
0.75 mg/assay	11.1± 1.80 ^{NS²⁾}
1.25 mg/assay	12.0± 0.87 ^{NS}
2.50 mg/assay	11.8± 1.01 ^{NS}
5.00 mg/assay	11.8± 0.45 ^{NS}
10.00 mg/assay	10.8± 1.31 ^{NS}

¹⁾No. of metaphasic cell/1000 cells×100

²⁾Not significant, as compared negative control(using Student's t-test).

MMC에 의한 염색체 이상

CHL 세포를 대상으로 MMC의 농도를 0.2~5.0 µg/assay(0.04~1.0 µg/ml)로 하여 염색체 이상 빈도를 살펴본 것은 Fig. 1과 같으며, 주요 염색체 이상 형태를 살펴본 것은 Fig. 2와 같다. 0.2 µg/assay에서 3.0 µg/assay까지 MMC의 농도가 증가함에 따라 염색체 이상의 빈도가 점차 증가하는 경향을 나타내었으며 MMC의 농도가 3.0 µg/assay 보다 높았을 경우에는 MMC에 의한 세포독성으로 염색체 이상 분석을 할 수 없었다. MMC에 의한 염색체 이상은 주로 염색분체형의 갭 및 절단과 같은 결실(deletion)이 많이 관찰되었으며, 극소수로 염색체형의 염색체 교환이 관찰되었다. 이와 같이 극소수로 출연하는 염색체형의 교환(exchange)은 MMC에 의해 생긴 이상이라기 보다 세포가 가지는 고유의 수준으로 판단되었다.

강력한 항암제이며 항생제인 MMC는 임상적으로 위암, 채장암, 경부암, 방광암 및 유방암의 치료에 사용되는 약품이면서 발암 및 돌연변이를 유발하는 것으로 보고되고 있다^[13]. 일반적으로 DNA에 손상을 주는 물질은 DNA와의 반응에서 4개의 염기중 한가지에 선택성을 나타내는 것으로 알려져 있는데 MMC는 guanine의 N² 위치에 대단히 선택적으로 결합한다^[14~16]. Borowy-borowsky 등^[17]은 시험관내에서 MMC의 cross-link 형성에는 CG-CG sequence가 필수적이라고 보고하였다.

돌연변이원은 전리방사선이나 bleomycin계에 속하는 항생제 및 각종 제한효소 등과 같이 세포주기의 어떤 시기에서도 DNA 손상을 일으켜 염색체 이상을 유발하는 물질과 UV나 alkylating agent와 같은 화학적 돌연변이 원들은 DNA 합성기에만 의존적으로 염색체 이상을 유발하는 것으로 나누어 지는데 후자의 경우는 주로 염색분체형의 이상을 나타내는 것으로 알려져 있다. 즉 MMC와 같은 화학적 변이원에 노출되었을 때는 바로 DNA의 두가닥 이중 파열(double strand breakage)을 일으키지 않고 외가닥 파열을 일으킨 다음 endogeneous nuclease 등의 역할로 이중 파열(double strand brea-

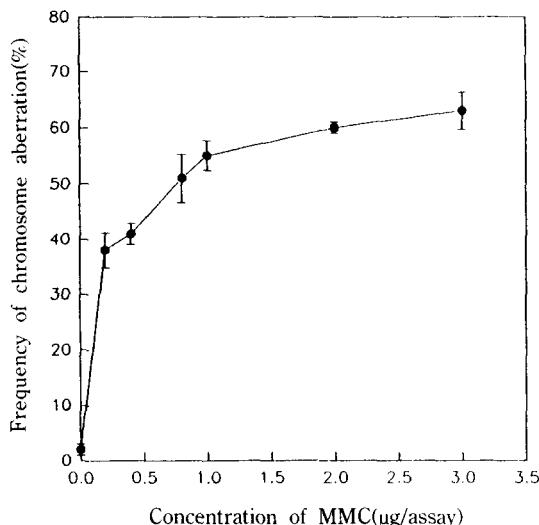


Fig. 1. Frequencies of chromosome aberration in CHL cells treated with mitomycin C at various concentrations

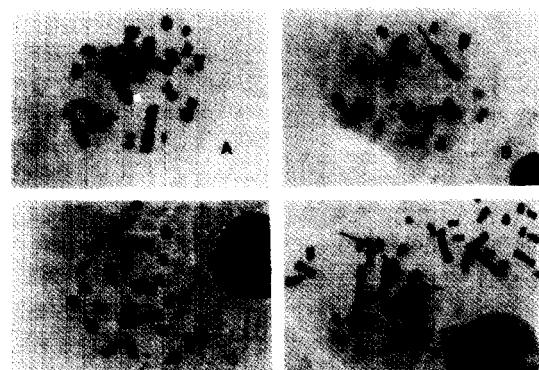


Fig. 2. Photomicrographs of different types of chromosomal aberration in CHL cells treated with mitomycin C

A: Control(DMSO treated), B: Chromatid gap and chromatid breakage, C: Chromatid exchange, D: Chromatid breakage and chromatid exchange

kage)로 유도되며 DNA가 복제됨에 따라 세포주기의 다음 중기(metaphase)에서 염색분체형의 염색체 이상을 일으킨다^[18,19]. 따라서 본 연구에서 MMC의 염색체 이상 형태가 염색분체형의 이상이 많이 관찰된 것은 이와 같은 기전에 의해 나타난 결과라고 사료된다.

현미 추출물이 MMC에 의한 염색체 이상에 미치는 영향

세포를 변이원 MMC 2 µg/assay(0.4 µg/ml)으로 처리하여 염색체 이상을 유도한 결과 염색체형 갭, 절단 및 교환의 빈도수 5, 3, 1개와 비교하여 염색분체의 경우 그 빈도수는 27, 6, 18로 높았으며, 정상세포는 43으로

Table 2. Effect of brown rice extract on the chromosome aberration induced by mitomycin C

Test materials	Frequencies of aberrant cells(No.)						Total aberration/ counted cell(%)	Normal cells (No.)	Total cells (No.)			
	Chromatid			Chromosome								
	gap	brk ^③	exch ^④	gap	brk	exch						
Negative control ^①	2						2.0	98	100			
Positive control ^②	27	6	18	5	3	1	60.0	43	100			
MMC + Brown rice extract												
0.75 mg/assay	22	4	15	5	4	0	50.0 ^⑤	52	100			
1.25 mg/assay	27	2	16	6	3	1	56.0 ^⑤	50	100			
2.50 mg/assay	19	3	14	4	2	0	42.0 ^⑥	59	100			
5.00 mg/assay	28	2	14	5	2	0	51.0 ^⑤	51	100			
10.00 mg/assay	22	2	11	4	2	0	50.0 ^⑤	54	100			

^①DMSO was used as a negative control.^②MMC(2 µg/assay) was used as a positive control.^③brk; breakage^④exch; exchange^⑤P<0.01, as compared with positive control(using Student's t-test).^⑥P<0.05, as compared with positive control(using Student's t-test).

관찰되었다. 쌀 추출물을 0.75~10.0 mg/assay의 농도로 투여하였을 경우 각 농도에서 유의적으로 MMC에 의한 염색체 이상빈도를 감소시키는 것으로 나타났다($p<0.05$, $p<0.01$). 현미 추출물의 농도 증가에 따라서는 다소 불규칙 하였으나 7~30%로 염색체 이상 유발빈도(%)가 감소하였다.

현미의 성분 가운데 돌연변이를 억제하는 활성 물질이 존재할 경우 원칙적으로 모든 돌연변이 억제 시험에서 활성이 측정되어야 하며 적어도 서로 다른 시험계를 사용하는 시험에서 공통적으로 활성이 측정되어야 결과를 인정하고 해석할 수 있다. 실제적으로 식품을 포함한 천연물을 대상으로 돌연변이 억제활성을 측정할 때, 시험법에 따라, 변이원에 따라 억제활성의 차이는 물론 활성 유무까지 차이가 날 수 있다. 이에 관한 예로서 단백질 함량이 높으며 단백분해효소가 작용하여 발효되는 장류의 경우는 histidine 등 아미노산 함량이 높아 histidine auxotroph를 이용한 *S. typhimurium* reversal assay로 시험할 경우 돌연변이 억제 활성 물질이 존재하여도 histidine^① reversal을 나타내어 억제활성을 감소시키거나 변이원성을 나타낼 수 있다. 이러한 경우 histidine에 영향을 받지 않는 시험법을 사용하여야 항변이 활성이 정확히 판정되며 활성성분의 안정성, 구조 등을 조사할 수가 있다. 대부분의 돌연변이 억제 시험에 대상시료에 대하여 한 가지 시험계로 조사하여 활성 유무를 판정하고 있으므로 시료의 특성에 따라 억제활성의 측정에 오류가 발생할 수 있다고 생각된다.

이상과 같은 점을 고려하여 저자들은 현미 methanol 추출물의 돌연변이 억제활성을 *S. typhimurium* reversal assay, SOS chromotest 및 spore rec-assay 등 미생물의 point mutation을 이용하여 DNA repair system에

의한 균주의 reversion, SOS 유도반응에 의한 효소의 기질 분해반응 및 포자의 치사활성 차이 등의 여러가지 미생물계 돌연변이 시험법으로 측정하여 일관된 돌연변이 억제활성을 확인하였다. 또한 본 연구에서도 포유동물 세포의 chromosome effect를 이용한 염색체 이상 시험에 의해 현미 메탄올 추출물의 돌연변이 억제활성을 측정한 결과, 미생물계 시험법의 결과와 비교할 때 억제활성이 다소 감소하기는 하였으나 돌연변이 억제 활성을 나타내어 세포계 시험법에서도 돌연변이 억제활성이 있는 것을 확인할 수 있었다.

요 약

포유동물 세포인 CHL세포를 대상으로 MMC를 농도별로 투여하여 세포분열지수 및 염색체 이상 유발 및 그 양반응관계를 관찰하고 현미 추출물이 MMC에 의한 염색체 이상 빈도에 미치는 영향을 살펴보았다.

1. 대조군인 DMSO처리구에 비해 MMC 및 현미 추출물 투여에 의해 CHL세포의 세포분열 지수는 차이가 나타나지 않았다.

2. CHL 세포를 대상으로 MMC의 농도를 0.2~5.0 µg/assay(0.04~1.0 µg/ml)로 하여 염색체 이상 빈도를 살펴본 결과, 0.2 µg/assay에서 3.0 µg/assay까지 MMC의 농도가 증가함에 따라 염색체 이상의 빈도가 점차 증가하는 경향을 나타내었으며, MMC의 농도가 3.0 µg/assay 보다 높았을 경우에는 MMC에 의한 세포독성으로 염색체 이상 분석을 할 수 없었다. MMC에 의한 염색체 이상은 염색분체형의 갭과 절단이 많이 관찰되었다.

3. 세포를 변이원 MMC 2 µg/assay(0.4 µg/ml)와 현미 추출물을 0.75~10.0 mg/assay의 농도로 투여하였을 경

우 각 농도에서 유의적으로 MMC에 의한 염색체 이상 빈도를 감소시키는 것으로 나타났으며($p<0.01$, $p<0.05$), 현미 추출물의 농도 증가에 따라서는 염색체 이상을 나타내는 세포수가 다소 불규칙하였으나 7~30%로 감소하는 경향이었다.

문 헌

1. Swenson, D.H. and Kadlubar, F.F.: Properties of chemical carcinogens in relation to their mechanisms of action, In *Microbial Testers*, Felkner, I.C.(Ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, p.4 (1981)
2. Hathcock, J.N.: Mutagens in cooked foods, In *Nutritional Toxicology*, Vol.II, Academic Press, Inc., Orlando, p.157 (1987)
3. Ames, B.N., Kamm, H.O. and Yamasaki, E.: Hair dyes are mutagenic, In Identification of variety of mutagenic ingredients. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 72, 2423 (1975)
4. Venitt, S. and Parry, J.M.: Background to Mutagenicity testing. In *Mutagenicity testing a practical approach*, Rickwood, D. and Hames, B.D.(Ed.), IRL Press, Washington, DC., p.1 (1984)
5. Organization for Economic Co-operation and Development: OECD guidelines for testing of chemicals. ISBN 92-64-12221-4 (1981)
6. Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E.: Methods for detection carcinogens and mutagens with *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mut. Res.*, 31, 347 (1975)
7. Quillardet, P., Huisman, O., D'Ari, R. and Hofnung, M.: SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79, 59 (1982)
8. Kada, T., Tutikawa, K. and Sadaie, Y.: *In vitro* and host-mediated recombination assay procedures for screening chemical mutagens, and phloxine, a mutagenic red dye detected. *Mut. Res.*, 16, 165 (1972)
9. Wolff, S.: Sister chromatid exchange. *Ann. Rev. Genet.*, 11, 183 (1977)
10. Preston, R.J.: The effect of cytosine arabinoside on the frequency of X-ray-induced chromosome aberration in normal human lymphocytes. *Mut. Res.*, 69, 71 (1980)
11. 전향숙, 김인호, 김영진, 김길환: 현미 추출물의 돌연변이 억제효과. *한국식품과학회지*, 26, 188 (1993)
12. Shamberger, R.J., Baughan, S.L., Kalchert, S.L., Willis, C.E. and Hoffman, G.C.: Carcinogen-induced chromosomal breakage decreased by antioxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 70, 1461 (1973)
13. Doll, R.C., Weiss, R.B. and Issell, B.F.: Mitomycin; Ten years after approval for marketing. *J. Clin. Oncol.*, 3, 276 (1985)
14. Tomasz, M., Chowdary, C., Lipman, R., Shimotakahara, S., Veiro, D., Walker, V. and Verdine, G.L.: Reaction of DNA with chemically or enzymatically activated mitomycin C. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83, 6702 (1986)
15. Tomasz, M., Lipman, R., Chowdary, C., Pawlak, J., Verdine, G.L. and Nakanishi, K.: Isolation and structure of covalent cross-link adduct between mitomycin C and DNA. *Science*, 235, 1204 (1987)
16. Tomasz, M., Lipman, R., McGuinness, B.F. and Nakanishi, K.: Isolation and characterization of major adduct between mitomycin C and DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 5892 (1988)
17. Borowy-Borowski, H., Lipman, R. and Tomasz, M.: Recognition between mitomycin C and specific DNA sequences for cross-link formation. *Biochemistry*, 26, 2999 (1990)
18. Morgan, W.F., Chung, H.W., Phillips, J.W. and Winegar, R.A.: Restriction endonucleases do not induce sister-chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells. *Mut. Res.*, 226, 203 (1989)
19. Moquet, J.E., Lloyd, D.C., Prosser, J.S. and Edwards, A.A.: Sister chromatid exchanges induced by mitomycin C after exposure of human lymphocytes in G_0 to a low dose of X-radiation. *Mut. Res.*, 176, 143 (1987)

(1995년 9월 11일 접수)