

N-Methyl-N-Nitrosourea 유도 자매염색분체교환생성과 DNA메틸화에 대한 Galangin의 억제효과

손수정¹ · 김정환² · 김영진² · 허인희³ · 허문영^{2*}

¹국립보건안전연구원, ²강원대학교 약학대학, ³중앙대학교 약학대학

(Received January 3, 1995)

Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea Induced Sister Chromatid Exchange and DNA Methylation by Galangin

Soo Jung Sohn¹, Jung Han Kim², Young Jin Kim², In Hoe Huh³ and Moon Young Heo^{2*}

¹Division of Genetic Toxicology, National Institute of Safty Research, Seoul 122-020, Korea

²College of Pharmacy, Kangweon National University, Chuncheon 200-701, Korea

³College of Pharmacy, Chungang University, Seoul 156-756, Korea

Abstract—In order to evaluate the suppressive effects of galangin on the DNA damage induced by N-methyl-N-nitrosourea(MNU), *in vitro* sister chromatid exchange(SCE) test using Chinese Hamster ovary(CHO) cells was performed. Also the determinations of [³H] MNU-induced total DNA binding and methylated DNA were performed to find out the mechanism of action by galangin. MNU-induced SCEs were significantly decreased by simultaneous and pretreatment of galangin when S-9 mix was added only. In post-treatment, however, the MNU-induced SCEs were not decreased when S-9 mix was added or not. [³H] MNU-induced total DNA binding was significantly inhibited by the treatment of galangin in calf thymus DNA and CHO cells. HPLC analysis of DNA hydrolysates shows that galangin caused a dose-dependant decrease in calf thymus DNA, but not significant decrease in CHO cells. These results suggest that the inhibition of galangin on the MNU-induced SCEs is due to the decrease of DNA binding and methylation with MNU. Therefore, galangin may be useful as a chemopreventive agent of alkylating agents.

Keywords □ N-methyl-N-nitrosourea, Sister Chromatid exchange, DNA methylation, Galangin

최근 돌연변이와 염색체 손상 및 발암의 억제제를 천연물로부터 찾아내는 연구가 많이 이루어지고 있는데, 이는 이들 생리활성천연물들이 암의 예방제로서의 가능성이 높기 때문이다.¹⁻⁵ 본인 등은 그동안 여러 연구를 통해서 flavonoid화합물 중 galangin을 비롯한 morin, fisetin, quercetin, flavonol 및 kaempferol 등 flavonol유도체들의 유전독성 억제효과가 비교적 컸음을 보고한 바 있다.⁶⁻⁸ 특히, 이들 천연물질 중 galangin은 benzo(a)pyrene[B(a)P]과 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)를 비롯한 여러가지 발암물질들의 유전독성(염색체이상, 자매염색분체교환, 소핵생성 등)을 강하게 억제시켰

다. Galangin은 B(a)P와 같은 2차 발암물질에 대하여 대사활성화를 억제하는 등의 기전으로 활성분태형의 생성감소와 함께 DNA결합을 저해하는 기전으로 소핵생성 등의 유전독성을 억제하였다.⁹

이에 본 연구에서는 galangin의 유전독성억제기전 규명의 일환으로 1차발암물질인 N-methyl-N-nitrosourea(MNU)에 대한 유전독성억제효과 및 작용기전을 연구하였다. MNU와 같은 N-nitroso화합물들은 쉽게 가수분해되어 1-alkane diazotic acid를 생성하고, 이어서 alkyl diazonium ion으로 분해되어 DNA alkylation을 하게 된다. 이때 생성되는 DNA 부가체들은 자매염색분체교환과 같은 DNA손상에 의한 돌연변이와 발암에 깊은 관련이 있다고 잘 알려져 있다.¹⁰

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

본 연구에서는 DNA손상을 지표로 하는 변이원성 시험인 자매염색분체교환시험으로서 galangin의 유전독성억제활성을 검정하고, DNA 메틸화제의 DNA손상을 규명할 수 있는 DNA binding과 methylated DNA 분석을 통하여 작용기전을 연구하였기에 이에 보고하는 바이다.

실험방법

시약 및 재료—Galangin은 Aldrich사에서 구입하여 HPLC로 순도(99.9% 이상)를 확인하고 사용하였으며, N-methyl-N-nitrosourea(MNU)와 mitomycin C(MMC) 등 기타 시약들은 Sigma사에서 구입하였다. [³H] N-nitro-N-nitrosourea (1.7 Ci/mmol; 1 Ci=62.9 GBq)은 Du Pont사로 부터 구입하여 사용하였다. 한편 O⁶-methylguanine은 한림대 화학과 전종갑 교수가 합성한 것을 사용하였다. FBS 등 세포배양에 필요한 시약들은 GIBCO사에서 구입하여 사용하였다.

사용세포 및 배양방법—Chinese Hamster Ovary 세포는 국립보건안전연구원에서 분양받아 사용하였다. 배양액은 Ham's F12 nutrient medium에 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin(100X)을 첨가하여 사용하였으며 포화습도하에서 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. S-9은 상법에 따라 조제한 것을 강원대학교 식품공학과 함승시 교수로 부터 얻어 사용하였으며, S-9 mix의 조제는 시험개시직전에 S-9mix는 S-9분획 1.48 ml, 0.4 mM MgCl₂ 및 1.65 mM KCl용액 0.144 ml, 1M glucose-6-phosphate 0.018ml, 0.1M NADP 0.144 ml, 0.2M phosphate buffer(pH7.4) 1.8 ml, 멸균증류수 1.43 ml를 첨가하여 제조하였다.

자매염색분체교환시험방법—CHO cell 10⁶개를 culture flask(25 cm²)에 넣고, 배양 3일째에 MNU를 10⁻⁴M을 최고농도로 하여 공비10으로 4단계의 농도를 각각 처리한 다음 6시간 후 5-bromo-2-deoxyuridine(BrdU) 10 μM을 가했다. MNU처리 후 27시간 30분이 경과 되었을 때 colcemid를 2시간 30분 처리하고 일정시간이 경과한 후에 세포를 수집하여 염색체표본 슬라이드를 제작하였다. 본 시험에서는 galangin처리시 S-9 mix를 넣지않은 직접법과 S-9 mix를 넣어 대사활성화를 유도시킨 대사활성화법에서 galangin의 동시투여(simultaneous treatment), 전투여(pre-treatment) 및 후투여(post-treatment)방법으로

나누어 실험하였다.

동시투여는 배양 3일째에 MNU 10⁻⁴M과 galangin 0, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵M을 각각 동시 처리하고 6시간 동안 배양하였다. 배지를 교환해준 후 BrdU를 처리하고, 24시간 더 배양후 염색체표본을 제작하였다. S-9 mix를 이용한 대사활성화법에서는 2% FBS를 포함한 F12배지에 MNU 10⁻⁵M 및 galangin 0, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵M을 각각 처리하고, S-9 mix를 1시간 또는 2시간 동시처리하였다. S-9 mix처리 후 F12 배지로 세척하고, 10% FBS F12배지에서 MNU투여 부터 6시간째 BrdU처리한 후 염색체표본을 제작하였다. 전투여는 배양 3일째 galangin 0, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵M을 6시간 동안 처리하고 배지를 갈아준 후 MNU 10⁻⁴M을 처리하였다. MNU 투여부터 6시간째에 BrdU를 처리하고 30시간이 지난 후 염색체표본을 제작하였다. 대사활성화법에서는 2% FBS F12배지에서 galangin과 함께 S-9 mix를 1시간 또는 2시간 처리한 후 F12 배지로 세척, 10% FBS F12배지에서 MNU 10⁻⁴M을 6시간 동안 처리한 후 BrdU를 처리하고 염색체표본을 제작하였다.

후투여는 배양 3일째 MNU 10⁻⁴M을 6시간 동안 처리한 후, 배지로 세척하고 galangin 0, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵M을 다시 6시간 동안 처리하였다. 다음 BrdU를 가하고 24시간 더 배양한 후 염색체표본을 배양하였다. 대사활성화법에서는 MNU 10⁻⁵M을 6시간 동안 처리한 후 F12 배지로 세척하고 2% FBS F12배지에서 galangin 0, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵M과 S-9 mix를 1시간 또는 2시간 처리하고 배지로 세척하였다. 다음 10% FBS F12배지에서 다시 6시간 배양 후 BrdU를 처리하고 30시간 더 배양한 후 염색체표본을 제작하였다.

염색체 표본제작방법—검체처리가 완료된 후 배지 3 ml는 pipette을 이용하여 제거하고, 바닥에 붙어 자란 세포를 15 ml 원심분리 튜브에 옮겨 담는다. 0.075M KCl용액을 넣어 37°C에서 10분간 배양한 후, 0.5 ml fixer(acetic acid : methanol=1 : 3)를 넣고 1,500 rpm에서 7분간 원심분리하였다. 배지를 완전히 제거한 후, fixer를 10 ml 넣고 잘 현탁시킨 후 1,500 rpm에서 다시 7분간 원심분리하고, 상기과정을 2회 반복 하였다. 60% acetic acid용액에 잠겨 냉장실에 보관된 깨끗한 슬라이드 글라스에 소량의 fixer로 현탁된 세포를 40 cm 높이에서 슬라이드당 2방울씩 곁

치지 않도록 떨어뜨려 염색체표본을 제작하였다. 염색은 Perry와 Wolff에 의해 개발된 FPG염색법¹¹⁾을 이용하여 알루미늄 호일로 차광된 염색용기에 0.13% Hoechst 33258 용액을 넣고 30분간 냉장보관한 후 슬라이드를 증류수로 5회 정도 조심스럽게 세척하였다. MacIlvain's 완충용액(0.25M Na₂HPO₄ : 0.1M citric acid = 36 : 1)으로 세척한 후, 용액 3~4 방울로 기포가 생기지 않도록 cover slip을 덮어 52°C로 예열된 slide warmer위에 올려놓고, black light를 30분간 폭로시켰다. MacIlvain's 완충용액에 담구어 cover slip을 제거하고 증류수로 수회 충분히 세척한 후, 완전히 건조시켜 10% Giemsa로 10분 염색하고 증류수로 세척하였다. 현미경으로 spreading이 잘된 metaphase 25개 세포를 선택하여 관찰하고, cell kinetic을 보기위해 200개의 1차, 2차, 3차 분열세포를 계수하여 replicative index(RI)를 구하였다.

Calf thymus DNA 및 CHO cell 처리—Calf thymus DNA 100 µg에 [³H]-MNU 10 Ci, MNU 2.5 × 10⁻⁶ M, Tris/HCl(pH 7.4), galangin을 0, 5 × 10⁻³, 5 × 10⁻⁴, 5 × 10⁻⁵ M을 가하여 37°C incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양후 2M Na(Ac)₂ : EtOH(1 : 50) 4.5 ml을 가하여 3,000 rpm에서 원심분리하고, DNA pellet에 95% EtOH 4.5 ml을 가하여 세척하고 원심분리하는 과정을 2회 반복하였다. DNA pellet은 N₂-gas중에서 건조하였다.

한편, CHO cell은 80 cm² culture flask에 10⁴ 세포를 seeding하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 후에 검체를 부여하였다. [³H]-MNU 20 µCi, MNU 2.5 × 10⁻⁶ M과 galangin 0, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ M로 총 10 ml이 되게 한 후, 35시간 동안 배양하였다. 배양후 flask로 부터 세포들을 원심분리관에 모으고, 3,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 세포들을 침전시켰다. 50 mM EDTA/0.1M NaCl 1 ml를 가해 녹인 후, lysis buffer 1 ml과 proteinase K 50 µl를 가해 3분간 vortex로 현탁시킨 다음 70°C에서 1시간 배양하고 Tris-saturated phenol과 IAC(CHCl₃ : isoamylalcohol = 24 : 1), 5M NaClO₄를 가하여 3분간 vortex로 현탁하고 1시간 동안 진탕하였다. 0°C 이하의 조건에서 3,000 rpm으로 30분간 원심분리하고 계면현탁성분 및 하층을 제거하였다. 다시 IAC 1 ml를 넣고, 0°C 이하에서 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 하층을 제거하는 과정을 2회 반복하고, 2M Na

(Ac)₂ : EtOH(1 : 50) 3 ml을 가하여 DNA를 육안으로 확인하였다. Deep freezer에서 10분간 빙결 후, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 DNA를 침전시키고 빙냉한 95% EtOH로 세척하고, 70% EtOH로 세척한 후 DNA pellet을 N₂-gas중에서 건조시켰다.

Total DNA binding 정량—N₂ gas로 건조시킨 DNA pellet을 50 mM EDTA/0.1M NaCl 100 µl로 녹인 후 DNA용액으로 하였으며, 이 용액 10 µl를 증류수 2.99 ml과 섞어 260 nm에서 UV 측정하여 DNA 양을 계산하였다. 이 DNA용액 10 µl를 cocktail 5 ml가 들어있는 glass vial에 넣고 현탁한 후 liquid scintillation counter로 측정하였다.

Methylated DNA 정량—50 mM EDTA/0.1M NaCl 100 µl에 녹아 있는 DNA 80 µl를 1N-HCl 50 µl를 가하고, 70°C에서 1시간 배양하여 가수분해시켰다. 2N-NaOH 20 µl를 가하여 중화시킨 후, 총량이 150 µl가 된 검체를 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액 80 µl를 취하고 혼합 표준액 16 µl를 가해 검액으로 하였다.

HPLC분석¹²⁾은 standard base들인 adenine, 1-methyladenine, guanine, 7-methylguanine(7-meG), O⁶-methylguanine(O⁶-meG), cytosine, thymine들과 용해시키는데 사용한 methanol, DMSO, free MNU들을 injection하여 peak를 확인 및 분리한 다음, 모두 합쳐 각각 20 µg/ml이 되게 표준액으로 제조하였다. 검체 20 µl를 injection하여 7-meG와 O⁶-meG의 용출액을 받아 cocktail과 혼합한 후, LSC로 측정하였다. HPLC column은 Shimadzu C-18을 사용하였고, mobile phase는 10% citrate buffer(pH 3.8)를 사용하였다. 유속은 1 ml/min, 검출기의 흡광도는 254 nm로 하였다.

결 과

MNU 처리농도에 따른 자매염색분체교환생성—MNU유도 자매염색분체 교환생성에 미치는 galangin의 효과를 검증하기전에 CHO세포에 있어서 MNU에 의한 자매염색분체교환 생성효과를 시험하였다. Fig. 1에 나타난 것처럼 MNU를 0, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ M 처리하였을 때 용량-반응관계를 나타내었으며 유의성있는 증가는 10⁻⁵ M부터 나타났다. 한편, 세포독성을 간접지표로 하는 replicative index

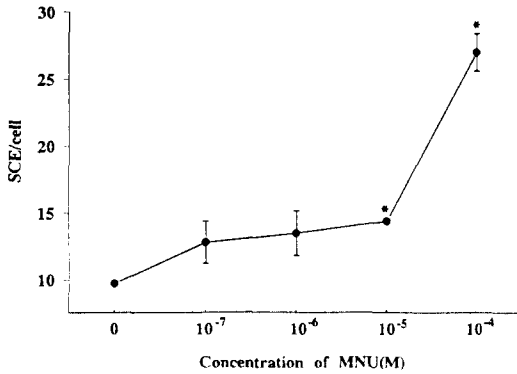


Fig. 1—Effect of MNU on the induction of SCE in the culture of CHO cells. * means significantly different from the control group at $p < 0.05$. Each bars represent mean \pm SE.

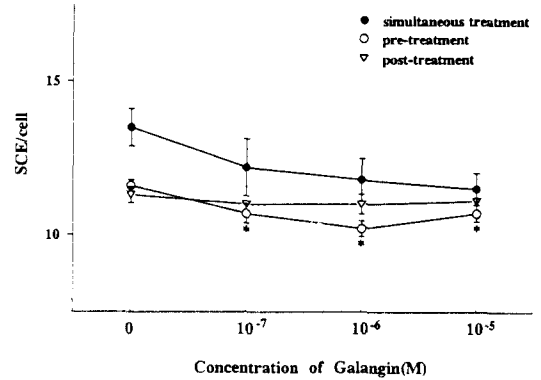


Fig. 3—Effect of galangin with S-9 mix for 1 hour on the induction of SCE in the culture of CHO cells treated with MNU(10^{-5} M). * means significantly different from the control group at $p < 0.05$. Each bars represent mean \pm SE.

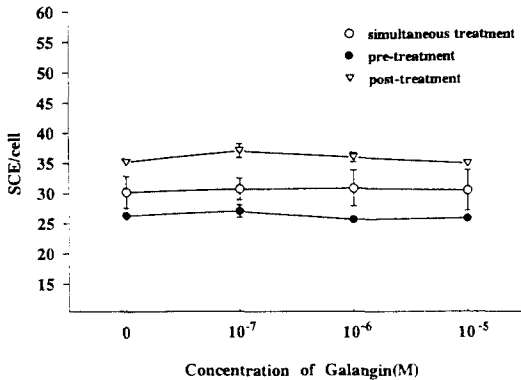


Fig. 2—Effect of galangin without S-9 mix on the induction of SCE in the culture of CHO cells treated with MNU(10^{-4} M). Each bars represent mean \pm SE.

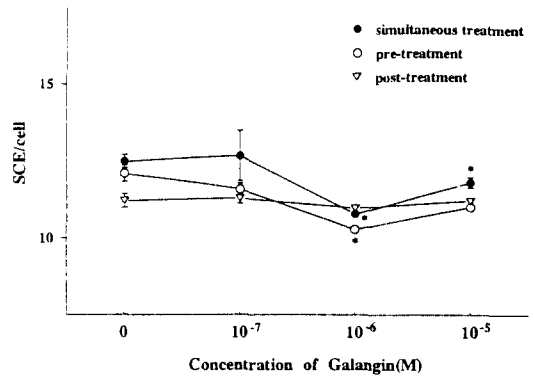


Fig. 4—Effect of galangin with S-9 mix for 2 hour on the induction of SCE in the culture of CHO cells treated with MNU(10^{-5} M). * means significantly different from the control group at $p < 0.05$. Each bars represent mean \pm SE.

(RI)는 전 처리농도에 걸쳐서 용매대조군(2.01)보다 다소 낮은 1.89~1.97의 범위를 나타냈으나 유의성 있는 차이를 나타내지는 않았다. 따라서 추후 galangin의 효과를 검증하기 위한 양성대조물질, MNU의 처리농도를 10^{-5} 및 10^{-4} M을 각각 사용하였다.

Galangin의 자매염색분체 교환생성 억제효과—

Fig. 2에서 나타난 것처럼 MNU 10^{-4} M에서 galangin을 0, 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M의 농도로 MNU와 동시투여, 전투여 및 후투여했을 때 전혀 억제효과가 나타나지 않았다. 그러나 Fig. 3과 Fig. 4에 나타난 것처럼 MNU 10^{-5} M농도에서 S-9 mix와 함께 galangin을 0, 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M의 농도로 1시간, 또는 2시간 동안 가해서

galangin을 대사활성화시켰을 때는 유의성있는 억제 효과가 나타났다. Galangin을 MNU와 함께 동시투여 시에는 S-9 mix 1시간 처리시 약간의 억제경향을 나타내었으나 유의성은 없었다. S-9 mix 2시간 처리 시에는 ANOVA검정에서 $p=0.06$ 의 용량의존적 억제 효과를 나타내었고, 10^{-6} M과 10^{-5} M에는 Student's t-test에서 각각 $p < 0.05$ 의 유의성있는 억제효과를 나타내었다.

전투여 시에는 ANOVA검정에서 S-9 mix 1시간 처리시 $p < 0.05$ 의 유의성있는 농도의존적 억제효과, S-9

Table I—Suppressive effect of galangin on the total binding of [³H]-MNU in the calf thymus DNA and CHO cells

Treatment		dpm/mg of DNA(mean ± S.E.)
[³ H]-MNU(μCi)	Galangin(M)	
Calf thymus DNA ¹		
0	0	19.1 ± 5.7
10	0	656.4 ± 107.5 ^a
10	5 × 10 ⁻⁵	672.6 ± 135.4 ^a
10	5 × 10 ⁻⁴	546.6 ± 238.8 ^a
10	5 × 10 ⁻³	358.1 ± 62.6 ^{a*}
CHO cells ²		
0	0	22.3 ± 5.8
20	0	291.9 ± 56.0 ^b
20	10 ⁻⁶	86.8 ± 23.5 ^{b*}
20	10 ⁻⁵	75.8 ± 13.9 ^{b*}
20	10 ⁻⁴	30.7 ± 3.9 ^{b*}

¹DNA was incubated with MNU(2.5 × 10⁻⁶M) and [³H]-MNU(10 μCi) with galangin for 24h at 37°C in Tris buffer(pH 7.4).

²CHO cells were incubated with MNU(10⁻⁴M) and [³H]-MNU(20 μCi) with galangin for 35h at 37°C in 10% FBS F12 medium.

Significantly different from the control group at *p<0.05(Student' t-test)

^aSignificant dose-dependent decrease(p<0.05; Analysis of Variance).

^bSignificant dose-dependant decrease(p<0.01; Analysis of Variance).

mix 2시간 처리시 p<0.01 의 유의성있는 농도의존적 억제효과를 나타내었다. 한편, Student's t-test에서 S-9 mix 1시간 처리시 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵M의 농도에서 각각 p<0.05의 유의성있는 억제효과, S-9 mix 2시간 처리시 10⁻⁶M에서 p<0.05의 유의성 있는 억제효과를 나타내었다.

한편, 후투여시에는 S-9 mix 1시간 처리시 및 S-9 mix 2시간 처리시 모든 처리농도에서 억제효과가 전혀 나타나지 않았다.

MNU에 의한 DNA binding 및 methylated DNA 생성에 미치는 galangin의 효과—Table I에서 나타난 것처럼 calf thymus DNA에 MNU 2.5 × 10⁻⁶M과 [³H]-MNU 10 μCi 및 galangin을 0, 5 × 10⁻⁵, 5 × 10⁻⁴, 5 × 10⁻³M 농도로 처리하였을 때 DNA와 [³H]-MNU의 binding이 ANOVA 검정에서 p<0.05의 농도의존적 억제경향을 나타내었다. 한편, Student's t-test에서 5 × 10⁻³M의 농도에서 p<0.05의 유의성 있는 억제효과(47%)를 나타내었다.

한편 CHO세포에 MNU 10⁻⁴M과 [³H]-MNU 20 μCi 및 galangin을 0, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴M 농도로

처리하였을 때 CHO cell DNA와 [³H]-MNU의 binding이 ANOVA 검정에서 p<0.01의 농도의존적 억제경향을 나타내었다. 한편, Student's t-test에서 모든 처리농도에서 p<0.05의 유의성있는 억제효과를 나타내었으며 10⁻⁶, 10⁻⁵ 및 10⁻⁴M에서 각각 77%, 80% 및 97%의 큰 억제율을 나타내었다.

또한, Table II에서 나타난 것처럼 calf thymus DNA에 MNU 2.5 × 10⁻⁶M 및 [³H]-MNU 10 μCi와 galangin 0, 5 × 10⁻⁵, 5 × 10⁻⁴, 5 × 10⁻³M로 처리하였을 때 7-methylguanine생성이 ANOVA 검정에서 p<0.05의 농도의존적인 억제경향을 나타내었고, Student's t-test에서는 5 × 10⁻³M에서 p<0.05의 유의성 있는 억제효과를 나타내었다. O⁶-methylguanine생성도 ANOVA 검정에서 p<0.05의 농도의존적인 억제경향이 나타났으며, Student's t-test에서는 전투여농도에서 p<0.05의 유의성있는 억제효과를 나타내었다. 그러나 CHO 세포에 MNU 10⁻⁴M 및 [³H]-MNU 50 μCi 및 galangin 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴M 처리시는 일부 농도에서 감소경향이 나타났으나 유의성 있는 결과가 나타나지 않았다.

Table II—Suppressive effect of galangin on the DNA methylation of [³H]-MNU in the calf thymus DNA and CHO cells.

Treatment [³ H]-MNU(μ Ci)	Galangin(M)	dpm/μg of DNA(mean± SE)	
		7-Methylguanine Mean± SE	O ⁶ -Methylguanine Mean± SE
Calf thymus DNA ¹			
0	0	22.7± 2.1	31.5 ± 5.9
10	0	552.4± 50.8 ^a	65.6 ± 9.9 ^b
10	5×10 ⁻⁵	689.6± 85.0 ^a	71.2 ± 8.3 ^b
10	5×10 ⁻⁴	322.1± 25.7 ^{a*}	41.1 ± 5.8 ^b
10	5×10 ⁻³	263.3± 16.6 ^{Ab,**}	31.8 ± 5.1 ^{b*}
CHO cells ²			
0	0	2.8± 1.8	3.8 ± 2.9
50	0	4.9± 1.5	3.8 ± 2.4
50	10 ⁻⁶	3.8± 2.7	2.0 ± 1.3
50	10 ⁻⁵	9.5± 1.6	7.3 ± 3.1
50	10 ⁻⁴	3.8± 0.8	3.2 ± 0.7

¹DNA was incubated with MNU(2.5×10⁻⁶M) and [³H]-MNU(10 μCi) with galangin for 24h at 37°C in Tris buffer (pH 7.4).

²CHO cells were incubated with MNU(10⁻⁴M) and [³H]-MNU(50 μCi) with galangin for 35h at 37°C in 10% FBS F12 medium.

Significantly different from the control group at *p<0.05 and **p<0.01 (Student's t-test)

^{ab}Significant dose-dependent decrease(p<0.01; Analysis of Variance).

고 찰

일반적으로 flavonoid 화합물은 유전독성을 나타내지 않으며 발암작용을 가지고 있지 않다고 알려져 있다. 또한 일부 연구자들에 의해서 항돌연변이, 항발암 촉진작용, 및 발암예방작용활성들이 보고되고 있다.¹³⁻¹⁶⁾ 특히 flavonoid 들은 식품중에 널리 분포하고 있기 때문에 이들의 생리활성을 연구하는 것은 매우 중요한 일이다.

Galangin은 flavonoid 중 flavonol계열의 물질로서 Wall 등은 2-amino anthracene에 의해 유도된 Salmonella typhimurium TA98의 변이원성에 대하여 97%의 억제효과를 나타내었다고 보고한 바 있다.¹⁷⁾

소핵시험을 이용한 유전독성억제실험에서 비교적 큰 활성을 보이는 flavonoid는 Galangin과 같은 2,3 이종결합과 3,5,7-trihydroxyl기를 갖는 polyhydroxy flavonoid 화합물들이었다. 이같은 유전독성억제효과는 galangin투여시 B(a)P의 대사활성화가 감소되고 활성분태산물들의 DNA binding을 저해함으로써 나타나는 것으로 판명되었다.⁸⁾

한편, Galangin은 대사활성화가 필요없는 1차 발암물질인 MNNG에 의한 소핵생성도 감소시켰다. 이

러한 alkylating agent에 대한 유전독성억제효과는 calf thymus DNA를 이용한 실험에서 Galangin이 DNA의 메틸화를 저해하는 기전으로 나타나는 것으로 판단되었다.

Galangin은 mitomycin과 같은 DNA cross-linking agent에 의한 소핵생성에도 억제효과를 나타내었다. 특히 동시투여나 사후투여보다 사전투여시에 소핵생성억제효과가 컸으며, 사전연속투여시에는 낮은 용량에서도 효과가 컸다.¹⁸⁾ 이러한 저용량 사전연속투여에 의한 유전독성억제효과들은 B(a)P나 MNNG에 대해서도 잘 나타났다.

또한, Galangin은 마우스 spleen lymphocyte에서 bleomycin에 유도된 염색체 이상에도 억제효과를 나타내었다.¹⁹⁾ 염색체 이상시험은 세포분열과정에서 염색체의 절단, 교환, 전좌 등을 일으키는 유전독성 물질들을 검출하는 시험으로서 염색체이상의 양성물질들은 발암성과도 밀접한 관련이 있는 물질이다. Galangin은 *in vivo*, 또는 *in vitro*에서 투여하였을 때 방사선효과를 갖고 있는 강력한 유전독성물질인 bleomycin에 대하여 보호작용이 나타났다. Bleomycin에 의해 야기되는 DNA strand break, lipid peroxidation 등의 독성은 free radical생성을 통해서

일어난다. 따라서 bleomycin에 대한 galangin의 유전독성억제효과는 free radical scavenging mechanism에 의해 일어난다고 판단되었다.

본 연구에서는 1차발암물질인 MNU에 의한 SCE 생성에 미치는 galangin의 효과를 검정한 결과 *in vitro* CHO cell culture에서 S-9mix를 첨가하지 않고 배양하였을 때 galangin은 전혀 억제효과를 나타내지 않았으나, galangin을 S-9mix와 함께 일정시간 처리한 후 배양하였을 때에는 MNU에 의한 SCE생성을 유의성 있게 억제하였다. 또한 galangin을 MNU와 함께 투여했거나, 미리 투여했을 때 억제효과를 나타내었고, MNU 처리후 galangin을 투여했을 때는 억제효과가 나타나지 않았다. 현재 antimutagenesis 및 anticarcinogenesis의 작용기전으로서 독성물질 및 그 대사산물들의 1) 표적기관으로의 도달 및 반응차단, 2) 라디칼 등의 포착제거, 3) 전암세포의 promotion 억제, 4) DNA repair 기능향진 등이 제시되고 있는데,²⁰⁾ 이러한 결과는 galangin이 MNU에 의한 SCE생성을 억제하는 것은 galangin의 대사활성화 된 대사물에 의해서 일어나며 DNA repair enzyme의 modulation이라기보다는 MNU에서 유래되는 alkylating ion과의 작용, 또는 DNA와 MNU와의 작용방지를 통해서 이같은 억제효과가 나타나는 것으로 보인다.

한편, calf thymus DNA를 이용한 total binding 실험에서는 galangin이 MNU에 의한 DNA binding을 저해하고 있는 것으로 나타났으며, 이로 인해 7-methyl guanine과 O⁶-methyl guanine의 생성도 감소되었다. 이러한 현상은 CHO 세포를 이용한 total binding실험에서도 억제경향을 나타내었는 바 이러한 억제효과들은 galangin이 DNA보호작용을 하므로써 SCE생성을 억제하는 것과 직접 관련이 있을 것으로 추정되며, 추후 DNA binding 실험에서도 S-9mix의 사용에 따른 galangin의 DNA binding과 methylated DNA생성억제에 미치는 영향을 비교연구 할 필요가 있다고 보여진다. 그러나 CHO 세포에서의 DNA중 7-methyl guanine과 O⁶-methyl guanine은 [³H]-MNU 50 µCi를 가해도 잘 검출되지 않았다. 따라서 isotope의 첨가량을 높이거나 가수분해 등의 전처리에 대한 검토가 필요하다고 보여진다.

이상을 요약하면, galangin은 MNU에 의한 SCE생성을 억제시켰으며, 이러한 억제효과는 MNU에 의

한 DNA 손상을 저해하는 기전으로 나타나는 것으로 보인다. 따라서 galangin은 alkylating agent에 의한 유전독성억제제로서 작용할 수 있는 생리활성물질로 판단된다.

감사의 말씀

이 논문은 1993년도 한국학술진흥재단의 공모과제연구비에 의하여 연구되었음을 밝히며 이에 감사하는 바이다. 또한, 실험에 물심양면의 협조를 해주신 서울대학교 약학대학 정진호 교수님에게 사의를 표하는 바이다.

문헌

- 1) Kuroda, Y.: Antimutagenesis studies in Japan, Antimutagenesis and Anticarcinogenesis mechanism II. *Basic life science* **52**, 1-22 (1990).
- 2) Ishii, R., Yoshikawa, H., Minakata, H., Komura, N., and Kada, T.: Specificity of bio-antimutagens in the plant kingdom, *Agric. Biol. Chem.* **48**, 2587-2591 (1984).
- 3) Mitscher, L. A., Drake, S., Gollapudi, S. R., Harris, J. A., and Shankel, D. M.: Isolation and identification of higher plant agents active in Antimutagenic assay systems: *Glycyrrhiza glabra*. In *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis mechanisms*, Shankel, D.M., Hartman, P.E., Kada, T., and Hollaender, A., eds. Plenum Press, New York, pp. 153-165 (1986).
- 4) Shankel, D. M., Hartman, P. E., Kada, T., and Hollaender, A., eds.: *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms*, Plenum Press, New York (1986).
- 5) Wall, M. E., Wani, M. C., Hughes, T. J., and Taylor, H.: Plant antimutagenic agents. 1. General bioassay and isolation procedures. *J. Nat. Prod.* **51**, 866-873 (1988).
- 6) Heo, M. Y., Kwon, C. H., Sohn, D. H., Lee, S. J., Kim, S. W., Kim, J. H., and Au, W. W.: Effects of flavonol derivatives on the micronuclei formation by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and the enhancement of bleomycin-induced chromosome aberration by N-methyl-N'-nitro-N-nitroso guani-

- dine, *Arch. Pharm. Res.* **16**(3), 196-204 (1993).
- 7) Lee, S. J., Kwon, C. H., Kim, K. H., Sohn, D. H., Heo, M. Y., and Au, W. W.: Anticlastogenic effects of galangin against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced micronuclei in bone-marrow cells of C57BL/6 mice, *J. Applied Pharmacology* **2**, 183-187 (1993).
 - 8) Heo, M. Y., YU, K. S., Kim, K. H., Kim, H. P., and Au, W. W.: Anticlastogenic effect of flavonoid against mutagen-induced micronuclei in mice, *Mutation Res.* **284**, 243-249 (1992).
 - 9) Kim, H. K., Kim, K. H., Heo, M. Y., and Kim, H. P.: Effects of antimutagenic flavonoid, galangin, on the benzo(a)pyrene metabolism in mice, *Korean Biochem. J.* **24**(2), 141-147 (1991).
 - 10) Schoenthal, R.: Carcinogenicity of N-methyl-N'-methyl-N-nitroso guanidine, *Cancer Res.* **30**, 455-465 (1966).
 - 11) Wolff, S.: Measurement of sister chromatid exchange in mammalian cells, in: Hanawalt, P. C. and Friedberg, E. C.: DNA repair. *A laboratory manual of research procedure*, Marcel Dekker. New York, pp. 575-586 (1981).
 - 12) Dixt, R. and Gold, B.: Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea-induced mutagenicity and DNA methylation by ellagic acid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 8039-8043 (1986).
 - 13) Alldrick, A. J., Flynn, J., and Rowland, I. R.: Effects of plant derived flavonoids and polyphenolic acids on the activity of mutagens from cooked food, *Mutation. Res.* **163**, 225-232 (1986).
 - 14) Birt, D. F., Walker, B., Tibbels, M. G., and Bresnick, E.: Antimutagenesis and antipromotion by apigenin, rolinetin and indol 3-carbinol, *Carcinogenesis* **7**, 959-963 (1986).
 - 15) Alldrick, A. J., Lake, B. G., and Rowland, I.R.: Modification of *in vivo* hetero-cyclic amine genotoxicity by dietary flavonoids, *Carcinogenesis* **10**, 365-370 (1989).
 - 16) Chang, R. L., Mou-tuan Hung, Wood, A. W., Ching-Quo Woang, Newmark, H. L., Yagi, H., Sayer, J. M., Jerina, D. M., and Conney, A. H.: Effect of ellagic acid and hydroxylated flavonoids on the tumorigenicity of benzo(a)pyrene and (\pm)-7 β , 8 α -dihydroxy-9 α , 10 α -epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene on mouse skin and in the newborn mouse, *Carcinogenesis* **6**, 1127-1133 (1985).
 - 17) Wall, M. E., Wani, M. C., Manikumar, G., Abraham, P., Taylor, H., Hughes, T. J., Warner, J., and McGivney, R.: Plant antimutagenic agents. 2. Flavonoids, *J. Nat. Prod.* **51**, 1084-1091 (1988).
 - 18) Heo, M. Y.: Anticlastogenic effect of galangin against mitomycin C-induced micronucleated reticulocytes in mouse pheripheral blood, *Arch. Pharm. Res.* submitted (1994).
 - 19) Heo, M. Y., Lee, S. J., Kwon, C. H., Kim, S. W., Sohn, D. H., and Au, W. W.: Anticlastogenic effects of galangin against bleomycin-induced chromosomal aberrations in mouse spleen lymphocytes, *Mutation Res.* **311**, 225-229 (1994).
 - 20) Flora, S. and Ramel, C.: Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Classification and overview, *Mutation Res.* **202**, 285-296 (1988).