

## Ames 실험계 및 SOS Chromotest에서 Linolenic acid의 돌연변이유발 억제효과

임선영 · 이숙희 · 박건영<sup>†</sup>

부산대학교 식품영양학과

### Inhibitory Effect of Linolenic Acid on the Mutagens-Induced Mutagenicities in Ames Assay System and SOS Chromotest

Sun-Young Lim, Sook-Hee Rhee and Kun-Young Park

Dept. of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

#### Abstract

To determine whether the omega 3 family, linolenic acid(LnA) is effective to inhibit carcinogens/mutagens-induced mutagenesis, we employed the Ames test using *Salmonella typhimurium* strain of TA100 and the SOS chromotest using *Escherichia coli* PQ37 strain. The inhibitory effect of LnA shown in the Ames assaying system was 95%, 78% and 73% when the mutagenicities were mediated by AFB<sub>1</sub>, MNNG and 4-NQO, respectively. LnA shows a strong antimutagenic activity against indirect mutagen of AFB<sub>1</sub>, whereas the same concentration of LnA exhibited weaker inhibitory effects on the direct mutagen of MNNG and 4-NQO than that of AFB<sub>1</sub>. However, LnA reduced more than 80% of SOS responses induced by MNNG and 4-NQO when the adding concentration increased to 5%. We conclude that LnA contains *in vitro* antimutagenic properties and that this finding warrants further investigation both *in vitro* and *in vivo* to assess its possible chemotherapeutic potential.

*Key words* : Linolenic and, Ames test, SOS chromotest

#### 서 론

Linolenic acid (LnA)는  $\omega$ -3 지방산으로 구조식상 첫번째 이중결합이 존재하는 위치가 메틸기로 부터 3번째에 있는 불포화 지방산을 말한다. 이  $\omega$ -3 지방산은 필수 지방산이며 일부 식물성 지방, 즉 들깨유(60%), 아마인유(55~66%), 호박유(0~15%), 대두유(7~9%) 그리고 특히 어류와 갑각류에 많이 포함되어 있다.<sup>1)</sup> 체내에서 이 Linolenic acid는 6-desaturase에 의해 eicosapentanoic acid로 전환되고 다시 docohexanoic acid와 prostaglandin 3 series (PG3)로 전환된다. 한편 이들 PG3는 암세포와 산소를 좋아하지 않는 혐기적 미생물의 성장을 저해시킨다.<sup>1)</sup>

현재까지의 식이 성분의 변화와 암과 관계를 조사하는 연구 결과에 따르면 영양소들의 섭취량이 많은 부위의 발암과정에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 밝혀져 왔으며, 영양소 중 식이지방의 양은 여러 부위의 발암 과정에 중요한 인자로 대두되고 있다. 즉 지방질의 과다 섭취와 각종 암, 특히 피부암,<sup>2)</sup> 유방암,<sup>3, 4)</sup> 대장암,<sup>5, 6)</sup> 폐암,<sup>7, 8)</sup> 췌장암,<sup>9, 10)</sup> 등의 발생과의 관계를 조사한 결과에서 보면 지방이 총 섭취 열량의 40~45%가 되는 경우, 20% 정도인 경우와 비교할 때 유방암, 췌장암, 대장암의 발생율은 약 4~8배 정도의 증가를 보인다고 하였다.<sup>3)</sup> 고지방식이 암예방에 절대로 불리한 것도 중요한 사실이지만 식이 지방의 종류 또한 문제가 된다. 초기 연구에서는 불포화 지방산이 포화

<sup>†</sup> Corresponding author

지방산보다 암을 더 촉진시키는 것으로 알려졌었지만 그후 연구 결과를 보면 문제는 그리 단순하지는 않다는 사실이 밝혀지고 있다.

최근에 관심의 대상이 되는 한 분야의 연구는 생선기름 즉  $\omega$ -3 지방산 함량이 높은 지방질에 관한 연구이다.  $\omega$ -3 지방산 5.9g%, 11.8g%, 17.6g%를 옥수수 기름과 혼합한 총지방 함량 23.5g%의 고지방 식이군과 옥수수유 23.5g% 식이군간의 암발생 정도를 비교해 본 결과  $\omega$ -3 지방산을 혼합한 식이군에서 45~46%의 암발생(종양 숫자)의 감소를 볼 수 있었다.<sup>11)</sup> Braden 등<sup>12)</sup>은  $\alpha$ -linolenic acid를 함유한 어유를 처리한 군이 투여하지 않은 대조군과 비교하여 유방암의 발생이 현저하게 적었다고 보고했다. Masao 등<sup>13)</sup>은  $\alpha$ -linolenic acid가 풍부한 들깨유 식이군이 유방암, 대장암, 신장암을 크게 저해시킴을 관찰, 보고한 바 있다.

저지방 실험군의 경우에서도 5% linolenic acid 식이군과 비교할 때 4.7%의 eicosapentaenoic acid (EPA)+0.3% linolenic acid 식이군이 약 80%의 발암 감소를 보였다.<sup>14)</sup> 또한 EPA 급이는 대장 정상세포 및 대장암 세포들의 PGE2 생성을 감소시켰다.<sup>15)</sup> 하지만 linolenic acid와 같은  $\omega$ -3 지방산들의 어떠한 기작을 통하여 암의 발생을 감소시키는지에 대한 기작적 연구는 거의 연구되지 못하고 있는 실정이다. 최<sup>16)</sup>는  $\omega$ -3 지방산이 풍부한 식이군이 PKC 활성화의 전체적인 감소 및 cytosolic PKC의 membrane-associated PKC로의 이동 감소 등을 관찰할 수 있다고 보고했다.

본 연구에서는 Ames test와 SOS chromotest 실험계를 이용하여 linolenic acid의 여러 발암물질/돌연변이물질에 의한 돌연변이유발에 미치는 저해효과를 검토하여, LnA의 암예방 가능성에 대한 기초자료를 제공하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험에 사용된 Linolenic acid 시료

Linolenic acid는 미국의 Sigma사로부터 구입하였으며, dimethyl sulfoxide (DMSO)에 일정 농도로 희석하여 사용하였다.

### 돌연변이유발물질/발암물질

Aflatoxin B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>)은 미국 Sigma사에서 구입하였고, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)와 4-nit-

roquinoline-1-oxide(4-NQO)는 미국의Aldrich 사로부터 구입하여서, AFB<sub>1</sub>은 DMSO에, MNNG는 증류수에, 4-NQO는 95% ethanol에 녹여서 실험에 사용하였다.

### Ames mutagenicity test를 이용한 돌연변이유발 억제 실험

Ames 실험방법<sup>17)</sup> 및 박 등<sup>18)</sup>의 방법에 따라서 *Salmonella typhimurium* TA100 균주를 사용하여 항돌연변이 실험을 행하였다. 균주는 정기적으로 histidine 요구성, deep rough(*rfa*) 돌연변이, *uvrB* 돌연변이와 R factor 등의 유전형질을 확인한 후 실험 균주로 사용하였다. 돌연변이 유발물질인 AFB<sub>1</sub>을 활성형으로 만들기 위하여 체중이 약 200g이 되는 Sprague-Dawley rat(male)를 이용하여 S9 mixture를 조제<sup>17)</sup>하여 첨가하였다. S9 mixture는 쥐의 간으로부터 얻은 S9 fraction 10%에 MgCl<sub>2</sub>-KCl salt 2%, 1M glucose-6-phosphate 0.5%, 1M nicotine adenine dinucleotide phosphate (NADP) 4%, 0.2M phosphate buffer (pH 7.4) 및 멸균수를 혼합하여 조제하였다.

항돌연변이 실험은 Maron과 Ames<sup>17)</sup>와 박 등<sup>18)</sup>의 방법에 따라 preincubation mutagenicity test를 이용하여 행하였다. 즉, S9 mix. 0.5ml, 하룻밤 배양된 균주( $1 \sim 2 \times 10^9$  cells/ml) 0.1ml, 돌연변이 유발물질 50 $\mu$ l 및 여러 농도의 시료 50 $\mu$ l를 ice bath에 담긴 cap tube에 넣어 가볍게 vortex하고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 예비배양하였다. 45 $^{\circ}$ C의 top agar 2ml씩을 각 tube에 붓고 3초간 vortex하여 minimal glucose agar plate에 도말하고 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양한 후 revertant 숫자를 계수하였다.

### SOS chromotest에 의한 돌연변이유발 억제 실험

Frame shift mutation과 point mutation을 동시에 측정할 수 있는 이 실험계에서는 Quillard 등<sup>19)</sup>의 방법을 이용하였다.

냉동 보관된 *E. coli* PQ37균액 50 $\mu$ l를 5ml L 배양액에 접종하고 37 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 진탕배양한 후 이를 다시 5ml L medium에 접종하고 37 $^{\circ}$ C에서 A<sub>660</sub> 측정치가 0.3~0.4에 이를 때까지 2시간 정도 진탕배양하였다. 얻어진 균액은 L medium에 1/10로 희석하여 각 농도별로 준비된 시료 (linolenic acid)와 돌연변이원을 혼합한 시료 20 $\mu$ l를 미리 분주하여 둔 96 well plate의 각 well에 100 $\mu$ l씩 분주하고

90분간 37°C에서 진탕하여 SOS 반응을 유도하였다. 그후 한쪽에는 β-galactosidase(β-G)의 활성 측정을 위하여 ONPG 100μℓ, 다른 쪽에는 alkaline phosphatase(A-P)의 활성 측정을 위해 PNPP 100μℓ를 첨가하였다. 발색 시간(t)은 20분으로 하였으며 β-G는 1.5M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100μℓ로 A-P는 1M HCl 50μℓ로서 효소에 의한 발색 반응을 정지시키고 5분 후 A-P쪽에 50μℓ의 2M tris buffer를 첨가하여 HCl을 중화하고 분광 광도계로 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 O.D. 420nm 측정치는 Miller의 공식<sup>20)</sup>에 의해 enzyme unit(Eu) 값을 구하였다.

$$Eu = (1000 \times A_{420}) / t$$

### 결과 및 고찰

본 연구에서는 Ames 실험계 및 SOS Chromotest에서 ω-3 지방산인 linolenic acid(LnA)의 돌연변이유발 억제효과를 검토하였다. 발암원으로 사용된 aflatoxin B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>)은 *Aspergillus flavus*에 의해 생성되는 2차 대사산물로서 잠재적인 hepatotoxin이고 대사활성을 요구하는 간접변이원이며, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)와 4-nitroquinoline-1-oxide(4-NQO)은 DNA 정보 발현에 이상을 일으키는 직접 돌연변이원이다.

LnA의 AFB<sub>1</sub>에 대한 항돌연변이 효과는 Table 1에 나타난 바와 같다. LnA 첨가농도 0.1%, 0.5%, 1%에서 각 40%, 73%, 89%의 저해 효과를 나타내었고 5% 농도에서는

Table 1. Effect of linolenic acid(LnA) on the mutagenicity of aflatoxin B<sub>1</sub>, (AFB<sub>1</sub>, 1μg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100.

Treatment	Concentration (%)	Revertant/plate	Inhibition (%)
Spontaneous Control(AFB <sub>1</sub> )		102 ± 13	
		1017 ± 67	
AFB <sub>1</sub> + LnA	0.01	748 ± 22	26
	0.1	655 ± 13	40
	0.5	378 ± 21	73
	1.0	209 ± 1	89
	5.0	151 ± 5	95

95%의 저해효과를 관찰 할 수 있었다. 직접 돌연변이원인 MNNG와 4-NQO를 사용하여 TA100균주에 대한 LnA의 항돌연변이성 실험을 한 결과 간접 돌연변이원인 AFB<sub>1</sub>에 비해 직접 돌연변이원인 MNNG 및 4-NQO에 대해서도 다소 항돌연변이 효과가 떨어졌지만, 역시 LnA의 돌연변이 억제효과를 살펴 볼 수 있었다.

MNNG의 경우 0.01%의 LnA 첨가시 53%의 돌연변이유발 저해효과를 나타내었고 LnA 첨가농도가 증가할수록 그 저해효과도 커져서 1.0%, 5.0% 첨가시 77%, 78%의 저해효과를 나타내었다(Table 2). 4-NQO에 대해서도 LnA의 항돌연변이 효과가 농도에 의존적이었으며 LnA를 0.5%, 1.0% 그리고 5% 첨가시 각각 63%, 67%, 73%의 돌연변이유발 억제효과를 보였다(Table 3).

Reddg<sup>21)</sup>은 AOM으로 유도된 결장암 발생율을 linolenic

Table 2. Effect of linolenic acid(LnA) on the mutagenicity of N-methyl-N'-nitrosoguanidine (MNNG, 0.45μg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA 100.

Treatment	Concentration (%)	Revertant/plate	Inhibition (%)
Spontaneous Control(MNNG)		93 ± 12	
		810 ± 32	
MNNG + LnA	0.01	431 ± 58	53
	0.1	390 ± 22	59
	0.5	317 ± 52	69
	1.0	257 ± 36	77
	5.0	249 ± 35	78

Table 3. Effect of linolenic acid(LnA) on the mutagenicity of 4-nitro-quinoline-1-oxide(4-NQO, 0.15μg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA 100.

Treatment	Concentration (%)	Revertant/plate	Inhibition (%)
Spontaneous Control(4-NQO)		102 ± 20	
		1425 ± 21	
4-NQO + LnA	0.01	703 ± 44	55
	0.1	633 ± 26	60
	0.5	598 ± 61	63
	1.0	537 ± 8	67
	5.0	466 ± 18	73

acid같은 ω-3 지방산이 많이 함유된 생선기름 식이군이 다른 대조군에 비해 크게 저해시켰다고 보고했다. Park 등<sup>22)</sup>은 ω-3 지방산이 결장암을 어떠한 기작으로 저해시키는 지에 대해 연구한 결과 이들 ω-3지방산은 plasma thromboxane B<sub>2</sub>를 감소시키고 결장점막의 ornithine decarboxylase (ODC)를 증가시키고 대장암 발생을 억제시켰다고 보고했다.

한편 Quillardet 등<sup>19)</sup>이 새로이 제안한 방법을 사용해서 앞서 Ames test에서 밝혀진 LnA의 효과를 SOS chromotest에서도 관찰해 보았다. MNNG와 4-NQO에 대한 LnA의 SOS반응 억제효과는 β-galactosidase unit와 alkaline phosphatase unit의 비율(R)로 나타내어 판독하였다. MNNG에 대해서 LnA는 SOS반응을 크게 억제함을 살펴볼 수 있었는데 이는 Ames test결과와 유사한 경향이었고, LnA 첨가농도 0.5%, 1.0%, 5.0%에서 각각 55%, 59%, 82%의 억제효과를 나타내었다(Table 4).

Table 4. SOS response of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG, 0.07μg/assay) treated with different levels of linolenic acid (LnA).

Sample(%)	β-unit <sup>1</sup>	a-unit	R <sup>2</sup>	Inhibition(%)
Spontaneous	11.7	9.3		
MNNG(control)	13.9	9.5	1.46	
MNNG+LnA	0.001	13.8	9.5	1.45 5
	0.01	13.8	8.8	1.56 5
	0.1	12.7	8.6	1.48 48
	0.5	12.7	8.7	1.46 55
	1.0	12.6	9.6	1.30 59
	5.0	11.9	10.7	1.10 82

$$^1\text{Enzyme Unit} = \frac{1000 \times A_{420}}{t}$$

$$^2R = \frac{\beta\text{-galactosidase units}}{\text{Alkaline phosphatase units}}$$

Table 5는 4-NQO에 대한 LnA의 SOS반응 억제효과를 보여 주고 있는데 농도에 의존하여 그 효과가 증가하는 것을 볼 수 있으며 LnA 첨가농도 1.0%, 5.0%에서 각각 70%, 90%의 억제효과를 관찰할 수 있었다.

이러한 연구를 통해 LnA는 산화안정성만 유지된다면 발암물질에 의한 암발생을 효과적으로 억제하는 활성이 있을 것으로 기대된다.

Table 5. SOS response of N-nitroquinoline-1-oxide(4-NQO, 0.02μg/assay) treated with different levels of linolenic acid (LnA).

Sample(%)	β-unit <sup>1</sup>	a-unit	R <sup>2</sup>	Inhibition(%)
Spontaneous	10.9	6.1		
4-NQO(control)	14.6	6.4	2.3	
4-NQO+LnA	0.001	14.4	6.3	2.28 5
	0.01	14.1	6.3	2.26 8
	0.1	13.3	6.1	2.19 35
	0.5	13.0	6.0	2.18 42
	1.0	12.0	6.8	1.78 70
	5.0	11.3	10.7	1.06 90

$$^1\text{Enzyme Unit} = \frac{1000 \times A^{420}}{t}$$

$$^2R = \frac{\beta\text{-galactosidase units}}{\text{Alkaline phosphatase units}}$$

## 요 약

간접 돌연변이원(AFB<sub>1</sub>)과 직접 돌연변이원(MNNG, 4-NQO)의 돌연변이유발성에 미치는 linolenic acid(LnA)의 돌연변이유발 억제효과를 Ames test와 SOS chromotest를 이용하여 조사하였다. Ames test에서 LnA는 AFB<sub>1</sub>에 대해 첨가농도 1.0%, 5.0%에서 89%, 95%의 억제효과를 보였고 MNNG와 4-NQO에 대해서도 AFB<sub>1</sub>에 비해 다소 저해 효과는 낮았으나 농도에 의존하여 돌연변이 유발성을 크게 감소시켰다. SOS chromotest의 경우 MNNG에 대한 LnA의 돌연변이유발 억제효과는 첨가농도 1.0%, 5.0%에서 각각 59%, 82%를 나타내었고 4-NQO에 대해서도 각각 70%, 90%의 높은 SOS반응 억제효과를 관찰할 수 있었다. 본 실험의 결과로부터 LnA는 Ames test와 SOS chromotest에서 간접 돌연변이원과 직접 돌연변이원에 대해 각각 높은 돌연변이유발 억제효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

## 참 고 문 헌

1. Erasmus, U. : Fats and oils, Alive Books, Canada (1986)
2. Caroll, K. K. and Khor, H. T. : Dietary fat in relation to tumorigenesis. *Prog. Biochem. Pharmacol.*, 10, 308 (1975)

3. Chan, P. C. and Dao, T. L. : Enhancement of mammary carcinogenesis by a high-fat diet in Fisher, Long-Evans, and Sprague-Dawley rats. *Cancer Res.*, 41, 164 (1981)
4. Selenkas, S. L., Ip, M. M. and Ip, C. : Similarity between trans fat and saturated fat in the modification of rat mammary carcinogenesis. *Cancer Res.*, 44, 1321 (1984)
5. Bull, A. W., Soullier, B. K., Wilson, P. S., Haydern, M. T. and Nigro, N. D. : Promption of azoxymethane-induced intestinal cancer by high-fat diet in rats. *Cancer Res.*, 36, 4956 (1979)
6. Reddy, B. S., Narisawa, T., Uukusich, D., Weisburger, J. H. and Wynder, E. L. : Effects of quality and quantity of dietary fat and dimethylhydrazine in colon carcinogenesis in rats. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 151, 237 (1976)
7. Birt, D. F. and Pour, P. N. : Increased tumorigenesis induced by N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine in Syrian golden hamsters fed high-fat diet. *J. Natl. Cancer Inst.*, 70, 1135 (1983)
8. Beems, R. B. and Van, B. L. : Modifying effect of dietary fat on benzo[a]pyrene-induced respiratory tract tumors in hamsters. *Carcinogenesis*, 5, 413 (1984)
9. Birt, D. F., Salmasi, S. and Pour, P. M. : Enhancement of experimental pancreatic cancer in Syrian golden hamsters by dietary fat. *J. Natl. Cancer Inst.*, 67, 1327 (1981)
10. Roebuck, B. D., Yager, J. D., Longnecker, D. S. and Wilpone, S. A. : Promotion by unsaturated fat of azaserine-induced pancreatic carcinogenesis in the rat. *Cancer Res.*, 41, 3961 (1981)
11. Reddy, B. S. and Sugie, S. : Effect of different levels of omega-3 and omega-6 fatty acids on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Cancer Res.*, 48, 6642 (1988)
12. Braden, L. M. and Carroll, K. K. : Dietary polyunsaturated fat in relation to mammary carcinogenesis in rats. *Lipids*, 21, 285 (1986)
13. Masao, H., Atsuko, M., Nobuyuki, I., Kana, K. and Harumi, O. : Effects of dietary perilla oil, soybean oil and safflower oil on 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene(DMBA) and 1, 2-dimethylhydrazine(DMH)-induced mammary gland and colon carcinogenesis in female SD rats. *Carcinogenesis*, 11, 731 (1990)
14. Minoura, T., Takata, T. and Sakaguchi, M. : Effect of dietary eicosapentaenoic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rat. *Cancer Res.*, 48, 4790 (1988)
15. Gabor, H. and Abraham, S. : Effect of dietary menhaden oil on tumor cell loss and the accumulation of mass of a transplantable mammary adenocarcinoma in BALB/c mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, 76, 1123 (1986)
16. 최 면 : 지방질원으로서 어유가 백서 상피세포의 인지질 조성 및 protein kinase C 활성화에 미치는 영향. 한국영양학회지, 27, 419 (1994)
17. Maron, D. M. and Ames, B. N. : Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 113, 173 (1983)
18. 박건영, 이경임, 이숙희 : 녹황색 채소류의 돌연변이유발 억제 및 AZ-521 위암세포의 성장저해효과. 한국영양학회지, 21(2), 149 (1992)
19. Quillardet, P. and Hofnung, M. : The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins. *Mutat. Res.*, 147, 65 (1985)
20. Miller, J. : Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1972)
21. Reddg, B. S. : Dietary factors and colon cancer. In "Advances in polyunsaturated fatty acid research", N. Y., p. 59 (1993)
22. Park, H. S., Seo, E. S. and Song, J. : Effect of perilla oil rich in n-3 fatty acid on colon carcinogenesis in MNNG-treated rats. In "Advances in polyunsaturated fatty acid research", N. Y., p. 65 (1993)