

In vivo Supravital Staining Micronucleus Test에 의한 β-Carotene과 Galangin의 소핵생성억제효과

허문영* · 김정한 · 류재천¹

강원대학교 약학과, ¹한국과학기술연구원 도핑콘트롤센터
(1997. 1. 3 접수)

Anticlastogenicity of β-Carotene and Galangin using *in vivo* Supravital Staining Micronucleus Test

Moon Young Heo*, Jeong Han Kim and Jae-Chun Ryu¹

College of Pharmacy, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea,

¹Doping Control Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul 130-650, Korea.

ABSTRACT : The micronucleus test using peripheral blood reticulocytes (RETs) was evaluated in ICR mice treated with N-methyl-N-nitrosourea (MNU) and benzo(a)pyrene [B(a)P] as model clastogens. The frequency of micronucleated reticulocytes (MNRETs) in both positive compounds was similar to other results which were reported previously. On the other hand, an anticlastogenic effect of the natural antioxidant, β-carotene and one of flavonoids, galangin as model anticlastogens were investigated using simultaneous treatment. Mice were treated with a model clastogen alone, or with a model clastogen and a model anticlastogen simultaneously. Both β-carotene and galangin showed anticlastogenic effects against MNU- or B(a)P-induced micronuclei in mice. However, galangin has stronger activity than β-carotene. Results from our experiment suggest that the *in vivo* supravital staining micronucleus test using peripheral blood is useful in the evaluation of clastogenic and anticlastogenic effects.

Key words : *In vivo* supravital micronucleus test, Reticulocyte, Micronucleated reticulocyte, N-Methyl-N-nitrosourea, Benzo(a)pyrene, β-Carotene, Galangin

서 론

지금까지 화학물질의 안전성평가기법 중 유전독성시험법들은 미생물을 이용한 Ames test와 *in vitro* 수준에서의 염색체이상 검출을 위한 chromosome aberration test 및 *in vivo*에서의 염색체 손상을 검출하기 위한 micronucleus test(소핵시험)이 시행되고 있다(국립보건안전연구원, 1993).

그러나 최근에는 분자생물학적 기법이 접목된 새로운 유전독성시험법이 개발되고 있으며 이들 방법에 대하여 국제적인 표준화 작업들이 ICH(International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use)등을 중심으로 이루어지고 있

다 (The collaborative Study Group for the Micronucleus Test, 1992).

그동안 *in vivo*수준에서의 micronucleus test는 마우스 골수세포(mouse bone-marrow cell)를 이용하여 수행되고 있는데 (Schmid, 1975), 주지하다시피 본 시험은 genetic endpoint의 관찰시 소핵이 아닌 artifact의 구별에 곤란한 점이 많아서 시험결과에 의심이 있게 된다. 따라서 이를 극복하기 위한 방법으로 개발된 supravital staining법을 이용한 말초혈액에서의 소핵시험이 OECD guideline document No. 474로 추가되어서 활용될 전망이다(OECD guideline for the testing of chemicals). 그러므로 국내에서도 화학물질의 안전성평가시 이러한 최신 기반기술을 습득하고 빠른 시일내에 표준화 및 외국의 데이터

*To whom correspondence should be addressed.

와 harmonization할 필요가 절실하다.

기존의 소핵시험에서 골수세포의 도말표본을 관찰할 때 가장 문제가 되고 있는 것은 artifact이다. 특히 랫트골수세포의 도말시 비만세포가 파괴되어 세포질중에 과립이 분산되게 되면 Giemsa염색시 소핵과 유사하게 보이게 되어 구별하기 힘들다. 또한 RNA성 과립도 실제 소핵처럼 보인다. 한편 polychromatic erythrocyte와 norchromatic erythrocyte의 Giemsa염색에 의한 구별도 용이하지 않다. 따라서 현행 마우스골수소핵시험을 개선해야할 필요가 커지고 있다(Hayashi *et al.*, 1983).

최근 일본의 Hayashi group에서는 artifact를 구별하기 위한 방법으로서 DNA와 특이적으로 반응하는 acridine orange(AO)형광염색법을 개발했다(Hayashi *et al.*, 1990). 이 방법으로는 골수세포 뿐만 아니라 말초혈액도 이용 가능하여 망상적혈구(reticulocyte)에 supravital staining을 실시하여 망상적혈구를 적색형광을 발하는 망상구조로 식별하고 동시에 황록색 형광을 발하는 소핵을 검출하는 방법이 개발되었다. 이 방법은 말초혈액의 소량을 사용하기 때문에 동물을 죽이지 않고 경시적으로 채혈하여 소핵을 가진 망상적혈구(micronucleated reticulocyte)를 관찰하는 방법으로서 매우 선택성이 높다.

본 연구에서는 *in vivo* supravital staining micronucleus test의 확립과 응용을 위하여 model clastogen으로서 1차 발암물질인 N-methyl-N-nitrosourea(MNU)와 2차발암물질인 benzo(a)pyrene[B(a)P]의 소핵생성효과와 model antimutagen으로서 항산화성 비타민 A 전구물질인 β -carotene과 flavonoid의 일종인 galangin을 용량별로 각각 동시투여하여 상기 MNU와 B(a)P에 대한 소핵생성억제효과를 비교하여 본 시험의 응용가능성을 확립하는 동시에 β -carotene과 galangin의 염색체손상억제효과를 비교평가하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

in vivo supravital staining micronucleus test의 확립과 응용을 위한 model clastogen과 anticlastogen의 소핵생성효과와 소핵생성억제효과와 dose-response효과의 검정을 위하여 다음과 같이 실험하였다. 실험동물은 6~8주령의 20~25 g의 숫컷 ICR마우스를 사용하며 온도 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$, 형광등 명암 12시간간격 교대의 사육환경에서 5마리씩 케이지에 넣어 실험하였다.

2. 실험재료

Model clastogen으로서 1차발암물질인 MNU와 2차발암물

질인 B(a)P와 model antimutagen으로서 비타민 A 전구물질인 β -carotene과 flavonoid의 일종인 galangin을 용량별로 동시투여하여 소핵생성 및 억제효과를 비교하였다. 투여경로는 model clastogen들은 일반적으로 복강투여하였으며, model antimutagen들은 경구투여하였다.

3. 소핵시험

Hayashi등의 방법(Hayashi *et al.*, 1990)에 따라 Acridine orange 용액(1 mg/ml) 10 μl 을 70°C 의 slide warmer상의 slide glass위에 균일하게 도포하였다. Acridine orange 로 도포된 slide glass를 공기중에서 건조시켰다. 한편, 시험물질 투여후 48시간에 마우스의 꼬리정맥으로 부터 주사기를 이용하여 말초혈액을 취한 후, 그중 5 μl 를 slide glass에 떨어뜨리고 cover glass로 덮었다. Cell이 고정될때까지 약 3시간 정도 방치한 후 형광현미경으로 관찰하였다. 마우스 1개체당 적색을 띠는 1,000개의 망상적혈구(reticulocyte,RET)를 관찰하여 그 중에서 초록색 형광을 띠는 소핵을 가진 망상적혈구(micronucleated reticulocytes, MNRETs)의 갯수를 산출하여 소핵생성빈도도 하였다. 이때 관찰한 망상적혈구는 적어도 적색의 형광이 선상으로 보이는 것(III형) 이상을 대상으로 하였다(Hayashi, 1991).

결과 및 고찰

in vivo supravital staining micronucleus test의 확립과 응용을 위한 model clastogen과 anticlastogen의 소핵생성효과와 소핵생성억제효과와 dose-response효과를 규명하였다. Model clastogen으로서 MNU(40 mg/kg, i.p.)와 B(a)P(150 mg/kg, i.p.)에 대해서 model anticlastogen으로서 β -carotene과 galangin을 각각 0, 0.1, 1, 10 mg/kg 동시에 경구투여하여 소핵생성억제효과를 관찰하였다.

Model clastogen으로서 MNU(40 mg/kg, i.p.)와 B(a)P(150 mg/kg, i.p.)에 대해서 마우스에 각각 5마리씩 2군으로 나누어 복강투여한 결과는 표 1, 2와 같았다. 실험결과, MNU투여군

Table 1. Clastogenic effect of MNU on the frequency of MNRETs in mice

Treatment ¹ (40 mg/kg, i.p.)	MNRETs/1,000 RETs ²					
	individual value					mean \pm S.E.
Experiment 1	25	29	32	31	28	29.0 \pm 1.22
Experiment 2	32	34	37	40	30	34.6 \pm 1.78

¹MNU was intraperitoneally administered.

²1,000 reticulocytes (RETs) per animal were examined and the frequency of MNRETs was scored.

Table 2. Clastogenic effect of B(a)P on the frequency of MNRETs in mice

Treatment ¹ (150 mg/kg, i.p.)	MNRETs/1,000 RETs ²					
	individual value					mean ± S.E.
Experiment 1	16	17	14	16	-	15.8 ± 0.62
Experiment 2	14	16	18	22	17	17.4 ± 1.33

¹B(a)P was intraperitoneally administered.

²1,000 reticulocytes(RETs) per animal were examined and the frequency of MNRETs was scored.

에서 제1회 시험과 제2회 시험 사이의 유의성이 있는 차이 ($p < 0.01$)는 있었으나 소핵출현빈도의 차이는 그리 크지는 않았다.

MNU의 경우에 40 mg/kg 복강주사시 실험 I에서 29.0 ± 1.22 , 실험 II에서 34.6 ± 1.78 을 나타내어 Hitotsumachi 등 (Hitotsumachi *et al.*, 1992)이 보고한 결과인 N-ethyl-N-nitrosourea(ENU) 25 mg/kg 복강투여시 13.0 ± 3.7 과 50 mg/kg 투여시 37.8 ± 6.5 를 나타내어 비록 MNU 대신 ENU를 사용하

Table 3. Anticlastogenic effect of β -carotene on the frequency of MNRETs by MNU(40 mg/kg, i.p.)

Treatment ¹ (mg/kg, p.o.)	MNRETs/1,000 RETs ²					
	individual value					mean ± S.E.
0	25	29	32	31	28	29.0 ± 1.22
0.1	28	14	23	31	34	26.0 ± 3.51
1	21	19	15	24	29	$21.6 \pm 2.36^*$
10	21	24	22	24	21	$22.4 \pm 0.68^{**}$

¹MNU was intraperitoneally administered and β -carotene was administered orally.

²1,000 reticulocytes (RETs) per animal were examined and the frequency of MNRETs was scored.

*,**Significantly different from the control group (0 mg/kg) at $p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively (Student's t-test).

Table 4. Anticlastogenic effect of β -carotene on the frequency of MNRETs by B(a)P(150 mg/kg, i.p.)

Treatment ¹ (mg/kg, p.o.)	MNRETs/1,000 RETs ²					
	individual value					mean ± S.E.
0	16	18	16	18	15	16.6 ± 1.34
0.1	16	12	15	14	18	15.0 ± 2.24
1	15	10	15	19	15	14.8 ± 3.19
10	15	13	12	15	10	$13.0 \pm 2.12^*$

¹B(a)P was intraperitoneally administered and β -carotene was administered orally.

²1,000 reticulocytes (RETs) per animal were examined and the frequency of MNRETs was scored.

*,**Significantly different from the control group (0 mg/kg) at $p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively (Student's t-test).

였고 투여용량이 40 mg/kg이었지만 결과는 유사하였다. 한편, B(a)P의 경우에 150 mg/kg 복강투여시 실험 I에서 15.8 ± 0.62 , 실험 II에서 17.4 ± 1.33 을 나타내어 통계적으로 유의성이 없는 약간의 차이를 나타내었다. 이러한 결과는 Shimada 등 (Shimada *et al.*, 1992)이 보고한 B(a)P 125 mg/kg 경구투여시 9.8 ± 3.2 와 250 mg/kg 투여시 21.2 ± 3.6 의 결과와 비교해 볼 때 상호유사한 결과로 판단된다.

Model anticlastogen으로서 β -carotene 각각 0, 0.1, 1, 10 mg/kg 동시에 경구투여하여 소핵생성억제효과를 관찰하였다. 표 3에서 MNU에 의해 유도된 소핵생성에 대하여 β -carotene은 0.1-10 mg/kg 투여용량에서 다소의 억제경향($p = 0.109$, ANOVA test)을 나타내었으나 크지는 않았다. 표 4에서 B(a)P에 의해 유도된 소핵생성에 대해서도 약간의 억제경향($p = 0.151$, ANOVA test)을 보였으나 크지 않았다.

Model anticlastogen 으로서 galangin 각각 0, 0.1, 1, 10 mg/kg 동시에 경구투여하여 소핵생성억제효과를 관찰하였다. 표

Table 5. Anticlastogenic effect of galangin on the frequency of MNRETs by MNU (40 mg/kg, i.p.)

Treatment ¹ (mg/kg, p.o.)	MNRETs/1,000 RETs ²					
	individual value					mean ± S.E.
0	32	34	37	40	30	$34.6 \pm 1.78^*$
0.1	19	28	27	18	17	$21.8 \pm 2.35^{***}$
1	21	16	23	21	22	$20.6 \pm 1.21^{***}$
10	22	25	22	23	17	$21.8 \pm 1.32^{***}$

¹MNU was intraperitoneally administered and galangin was administered orally.

²1,000 reticulocytes (RETs) per animal were examined and the frequency of MNRETs was scored.

*Significantly dose-dependent decrease ($p < 0.01$; Analysis of Variance).

Table 6. Anticlastogenic effect galangin on the frequency of MNRETs by B(a)P (150 mg/kg, i.p.)

Treatment ¹ (mg/kg, p.o.)	MNRETs/1,000 RETs ²					
	individual value					mean ± S.E.
0	14	16	18	22	17	$17.4 \pm 1.33^*$
0.1	10	11	14	10	10	$11.0 \pm 0.77^{***}$
1	12	14	10	-	14	$12.5 \pm 0.95^{***}$
10	16	13	17	9	-	$13.7 \pm 0.79^{***}$

¹B(a)P was intraperitoneally administered and galangin was administered orally.

²1,000 reticulocytes (RETs) per animal were examined and the frequency of MNRETs was scored.

*Significantly dose-dependent decrease ($p < 0.01$; Analysis of Variance).

*,**Significantly different from the control group (0 mg/kg) at $p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively (Student's t-test).

5에서 MNU에 의해 유도된 소핵생성에 대하여 galangin은 억제경향을 나타내었다($p < 0.01$, ANOVA test). 한편, 표 6에서 B(a)P에 의해 유도된 소핵생성에 대해서도 억제경향을 나타내었다($p < 0.01$, ANOVA test).

최근 암의 치료제개발과 함께 암의 예방요법제 창출에 관한 많은 연구가 진행되고 있다(11,12). 현재까지 약 500여종의 물질에 대하여 antimutagenesis나 anticarcinogenesis 효과가 검증되었으며(De Flora *et al.*, 1992), 미국의 국립 암연구소에서는 이 중에서 비교적 항산화효과가 크다고 알려져 있는 retinoids와 β -carotene, vitamin C와 E 등에 대해서 암 발생위험도가 높은 사람(cancer high risk individuals)들을 대상으로하여 임상 실험에 들어가 있다(Kelloff *et al.*, 1992). 이러한 천연물 유래 항산화성 암화학예방요법제(cancer chemopreventive agent)의 개발은 암의 예방을 위해 단지 흡연등 발암위험성이 있는 환경적 요소만 배제할 것이 아니라, 일상적으로 널리 섭취되고 있는 식품을 통해서 발암방어인자의 적극적 섭취와 같은 노력이 필요하기 때문이다.

본 연구에서는 이러한 암화학예방요법제개발의 일환으로 *in vivo* micronucleus test를 사용하여 활성물질들을 찾는 기초 연구를 수행하였다. Model clastogen으로서 1차발암물질인 N-methyl-N-nitrosourea(MNU)와 2차발암물질인 benzo(a)pyrene [B(a)P]를 사용하여 검정하였고, model anticlastogen으로서 flavonoid의 일종인 galangin과 비타민 A 전구물질인 β -carotene을 용량별로 동시투여하여 소핵생성 및 억제효과를 비교하였다.

Model clastogen으로서 MNU(40 mg/kg, i.p.)와 B(a)P(150 mg/kg, i.p.)는 기보고된 논문들의 경과와 유사한 수준의 소핵생성효과를 나타내었다(Hitotsumachi *et al.*, 1992, Shimada *et al.*, 1992). 한편, model anticlastogen 으로서 이미 활성이 잘 알려져 있는 β -carotene과 galangin(Kim *et al.*, 1991과 손등, 1995)을 각각 0, 0.1, 1, 10 mg/kg 동시에 경구투여하여 소핵생성억제효과를 관찰한 결과, β -carotene과 galangin은 model clastogen에 대한 소핵생성억제경향을 잘 나타내었다. 그러나 1차 및 2차발암물질에 대하여 β -carotene은 염색체손상억제효과가 훨씬 낮은 편으로 나타났다.

OECD guideline document No.474의 micronucleus test에는 최근에 새로이 개발된 supravital staining법을 이용한 말초혈액에서의 소핵시험법을 추가로 등재하여 기존의 골수소핵시험의 대체법으로 활용될 전망이다. 이와 같은 세계적인 추세에 부응하여 우리나라에서도 신속히 대처해나가야 하는데 국내의 연구진에서 미미한 편이다. 본 실험의 결과로부터 *in vivo* supravital staining micronucleus test는 염색체손상 및 항염색체손상시험에 유용하다고 판단된다.

결 론

새로운 소핵시험법인 *in vivo* supravital staining micronucleus test의 활용을 위하여 model clastogen으로서 MNU (40 mg/kg, i.p.)와 B(a)P(150 mg/kg, i.p.)에 의해 유도된 말초혈액 중의 소핵생성에 대해서 model anticlastogen으로서 galangin과 β -carotene 각각 0, 0.1, 1, 10, 100 mg/kg 동시에 경구투여하여 소핵생성억제효과를 관찰하였다.

Model clastogen으로 사용한 MNU와 B(a)P는 외국의 여러 연구자들이 보고한 것과 비슷한 소핵생성효과를 나타내었다. 한편, 이렇게 확립된 소핵시험법의 응용을 위하여 model anticlastogen으로서 이미 활성이 잘 알려진 galangin과 β -carotene을 사용하여 소핵생성억제효과를 검정한 결과에서도 양호한 억제경향을 나타내었다.

따라서, 새로운 소핵시험법에 의한 model clastogen 및 model anticlastogen의 평가방법 연구에서 재현성이 높고 적용이 용이한 시험법으로 확립되어 향후 *in vivo* 유전독성평가에 활용될 가치가 매우 높다고 판단된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 96년도 보건의료기술개발사업연구비로 수행되었음을 밝히는 바이다.

참고문헌

- De Flora, S., Bronzetti, G. and Sovels, F.H.(1992): Assessment of antimutagenicity and anticarcinogenicity, *Mutation Res.*, **267**, 153.
- Hayashi, M. (1991): The micronucleus test, Scientist Publisher, Tokyo, pp. 83-90.
- Hayashi, M., T. Morita, Y. Kodama, T. Sofuni and M. Ishidate Jr. (1990): The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutation Res.*, **245**, 245-249.
- Hayashi, M., T. Sofuni and M. Ishidate Jr. (1983): An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Res.*, **120**, 241-247.
- Hitotsumachi S., Y. Kimura, M. Katoh, N. Ishihara, T. Hara and T. Shibuya (1992): Micronucleus tests on N-ethyl-N-nitrosourea with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutation Res.*, **278**, 113-115.
- Kelloff, G.J., Boone, C.W., Malone, W.F. and Steele, V.E (1992): Chemoprevention clinical trials, *Mutation Res.*, **267**, 291.
- Kim, H.K., Kim, K.H., Heo, M.Y. and Kim, H.P. (1991): Effects of antimutagenic flavonoid, galangin, on benzo(a)

- pyrene metabolism in mice, *Korean Biochem. J.*, **24**(2), 141-147.
- OECD (1993): OECD guideline for the testing of chemicals.
- Schmid, W. (1975): The micronucleus test, *Mutation Res.*, **31**, 9-15.
- Shimada H., H. Suzuki, S. Itho, C. Hattori, Y.Matsuura, S. Tada and C. Watanabe (1992): The micronucleus test of benzo(a)pyrene with mouse and rat peripheral blood reticulocytes, *Mutation Res.*, **278**, 165-168.
- The collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992): Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: The summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS, *Mutation Res.*, **278**, 83-98.
- 국립보건안전연구원 (1993): 독성시험표준작업지침서.
- 손수정, 김정환, 김영진, 허인희, 허문영 (1995): N-methyl-N-nitrosourea유도 자매염색분체교환생성과 DNA 메틸화에 대한 galangin의 억제효과, *약학회지*, **39**, 94-101.