

감잎차, 녹차, 우롱차 추출물이 돌연변이 물질로 유발된 Sister Chromatid Exchanges 빈도에 미치는 영향

송현순 · 이현걸 · 최언호* · 강명희**

한국화학연구소 안정성 연구센터, *서울여자대학교 식품미생물 공학과

**한남대학교 식품영양학과

Effects of Persimmon Leaf Tea Extract, Green Tea Extract and Oolong Tea Extract on the Frequencies of Mutagen-Induced Sister Chromatid Exchange in Chinese Hamster Ovary Cells

Hyun-Soon Song, Hyun-Kul Lee, Eon-Ho Choi* and Myung-Hee Kang**

Toxicology Research Center, Korea Institute of Chemical Technology

*Department of Food and Microbial Technology, Seoul Women's University

**Department of Food and Nutrition, Han Nam University

Abstract

The suppressing effects of crude extracts of three Korean teas, persimmon leaf tea extract (PLTE), green tea extract (GTE) and oolong tea extract (OTE), were studied on the induction of sister chromatid exchange (SCE) in cultured Chinese hamster ovary cells. When cells were treated with tea extract after mitomycin C (MMC) treatment, the frequency of MMC-induced SCEs were decreased at the high concentration (1000 µg/mL) of PLTE in the presence of S9 mix and at low concentrations (20~80 µg/mL) of PLTE in the absence of S9 mix. Whereas GTE and OTE showed suppressing effects on the MMC-induced SCEs at low concentrations (10~20 µg/mL) for OTE and 160 µg/mL for GTE only in the presence of S9 mix. MMC-induced SCEs were decreased by post-treatment with each tea extracts with S9 mix in the G1 phase of the cell cycle. These results suggest that PLTE, GTE and OTE could have bio antimutagenic activities, and also suggest that PLTE might have unknown antimutagenic components which would be responsible for the inhibitory effect against direct acting mutagenicity.

Key words: antimutagenic effect, persimmon leaf tea extract, green tea extract, oolong tea extract, sister chromatid exchanges

서 론

차(*Camellia sinensis*)는 세계적으로 소비되는 가장 일반적인 음료중의 하나이며 기호식품으로서 그 가공법에 따라 녹차와 홍차, 우롱차로 나누어진다. 이들은 서로간에 성분차이는 있으나 일반적으로 여러 가지 약리적, 생리적 효능이 많아⁽¹⁾ 우리 나라에서도 많이 음용 되고있다.

일찌기 녹차에 관하여는 다방면으로 많은 연구가 이루어져 왔다. 국내의 경우 녹차 추출물의 항산화 효과⁽²⁾와 항산화 성분에 관한 연구, free radical 소거작용,

아질산염 분해 작용 및 저장 중 비효소적 갈변 등에 관한 연구들이 되어 있다. 국외적으로는 질병예방 차원에서의 case-control study에 의한 항암 효과에 관한 연구 결과가 많이 보고되어 왔다^(3,4). *In vivo* 실험들로 Chinese hamster ovary (CHO) cell에서 benzo(α)pyrene (B(α)P)이나 mitomycin C (MMC)에 의하여 유발된 염색체 이상(chromosome aberration, CA)⁽⁵⁾이나 쥐 골수 세포에서 aflatoxin에 의하여 유발된 CA가 녹차 섭취에 의하여 감소되었다는 것⁽⁶⁾과 녹차의 수용성 추출물이 다양한 식이성, 혹은 환경성 돌연변이 물질에 대하여 강력한 억제력을 나타내었다는 연구보고⁽⁷⁾가 있다. 녹차의 수용성 추출물 성분 중 polyphenol이 aflatoxin B1 처리된 V79 cell에서 자매염색분체 교환(sister chromatid exchange, SCE)과 CA⁽⁸⁾를, tannic acid들이 CHO

Corresponding author: Myung-Hee Kang, Dept. of Food and Nutrition, Han Nam University, 133 Ojung-dong, Taeduk-ku, Taejon, 306-791, Korea

cell에서 UV와 MMC에 의하여 유발된 SCE[®]를 감소시켰으며, Ames test에 의한 녹차의 돌연변이 억제효과도 그 동안 수 차례 보고되어 왔다^(10,12). 녹차의 구성성분인 catechins이 hamster V79 배양 cell에서 4-niroquinoline-1-oxide (4-NQO)로 유발된 돌연변이를 억제시켰다는 보고⁽¹⁰⁾와 함께 최근에는 녹차의 tannin성분들⁽¹³⁾ 및 tannic acid⁽⁹⁾와 SCE 유발빈도의 관계도 보고되고 있다.

우롱차의 경우 녹차와 더불어 추출물의 xanthin oxidase 저해 효과⁽¹⁴⁾와 Ames test에 의한 그 수용성 추출물의 항돌연변이 효과가 연구⁽¹⁵⁾되었고 간접적 돌연변이원들에 대하여 강력한 돌연변이 억제력을 나타내었다는 연구보고⁽¹²⁾도 있다. 또한 녹차와 더불어 차의 주요 성분함량과 돌연변이 억제간의 관계에 관한 연구⁽¹⁶⁾가 되어져 있다.

최근 들어서는 이들 차와 함께 감잎차가 널리 응용되고 있다. 감은 우리 나라 중부 이남에서 잘 자라며 따라서 그 잎으로 제조한 감잎차는 주변에서 저렴하고 용이하게 구할 수 있는 잇점이 있다. 감잎차의 경우 감잎의 일반 성분과 제조 방법, 향기 성분 등에 관한 연구⁽¹⁷⁾를 비롯하여 조리 방법에 따른 비타민 C의 변화, 감잎의 처리 방법과 추출 조건에 따른 비타민 C와 superoxide dismutase의 함량 변화⁽¹⁸⁾ 및 tannin 물질의 분포 등과 polyphenol 물질 및 영양 성분에 관한 연구 등이 보고되어 있다. 감잎차의 돌연변이 억제 효과에 관한 연구들을 보면 감 tannin의 해독 작용과 활성 유리 산소의 scavenging 역할⁽¹⁹⁾, 실험실 조제 발효 감잎차의 SCE test에 의한 돌연변이 억제 효과 연구⁽²⁰⁾가 있다. Ames test를 통한 감잎의 열수 추출물과 tannin의 항돌연변이 효과⁽²¹⁾ 및 Sarcoma-180 세포를 이용한 *in vivo*에서의 감잎의 항암 효과⁽²²⁾, 감잎차의 methanol 추출물 중 n-haxane 획분에 돌연변이 억제효과가 있었다는 보고⁽²³⁾도 있다. 차 추출물의 돌연변이 억제효과에 관한 대부분의 선행연구들이 원핵세포를 이용한 방법인 Ames test에 의해 진행되었으며 진핵 세포계를 이용한 돌연변이 억제효과를 본 연구들은 많지 않다.

이에 본 연구에서는 그동안 항돌연변이 효과가 있다고 보고된 차 중에서 감잎차, 녹차, 우롱차를 임의로 택하여 일반적인 음용 조건으로 열수 추출한 후, 진핵 세포계인 CHO cell에서의 돌연변이 억제효과를 비교하고자 하여 시도되었다.

재료 및 방법

차 추출물의 제조

감잎차는 감잎차 100%인 진식품의 제품(증차차), 녹차는 녹차잎 100%인(주)태평양의 억수 설록차(덤음차), 우롱차는 역시 (주)태평양의 제품을 구입하여 각 시료를 10 g씩 칭량, 일반 음용 조건인 80°C의 물 100 mL로 3분간 열수 추출하였다. Whatman No. 1 거름종이로 흡입 여과시킨 후 membrane filter (Acrodisc, 0.45 μm, Gelman Sciences)로 제공하여 vacuum evaporator (40 cmHg, 65°C, B chi)에서 농축 후 냉동건조(-65°C, Labconco freeze dry/shell freeze system)시켜 냉동실에 보관하면서 실험에 사용하였다. 냉동 건조된 각 차의 열수 추출물의 수율은 감잎차 9.2%, 녹차 18.8%, 그리고 우롱차는 18.8%였다.

SCE test 및 사용 세포

SCE 시험은 Dean 등⁽²⁴⁾의 방법을 응용하여 전보⁽²⁰⁾에서와 같은 방법으로 실시하였다. 세포는 ATCC (American Type Culture Collection)로 부터 1991년 구입하여 한국 화학연구소 안전성연구센터의 변이원성 실험실에서 계대 배양 중인 Chinese hamster ovary 세포(CHO K-1)를 사용하였다. 세포는 액체 질소 tank (MVE SX-18)내에 보관하였으며, 해동하여 7일 이상 배양한 후 도립 현미경(Nikon)으로 미생물 오염 여부를 확인하고 시험에 사용하였다.

배양 방법

배양액은 시판 Ham's F-12 nutrient mixture (Gibco #21700-075)를 탈이온 증류수로 용해하여 L-glutamine 292 mg, sodium bicarbonate 1,176 mg, penicillin G. Na 및 streptomycin sulfate 각각 100,000 unit를 첨가, 최종 액량을 1,000 mL로 정용하였으며, 이를 멸균 membrane filter (Acrodisc, pore size 0.22 μm, Gelman Sciences)로 여과한 후 fetal bovin serum (FBS, Gibco #240-6000) 50 mL를 첨가하여 사용하였다. 배양 조건은 세포를 포화수증기 5% 농도의 이산화탄소를 포함한 공기가 유지되는 37°C 항온배양기 (Forma 3326)에서 배양하였으며, 2일 혹은 3일마다 0.1% trypsin액으로 세포를 분리하여 계대 배양하였다.

대사 활성계 (S9 mix)

간 균질액(S9 fraction)은 Maron 등⁽²⁵⁾의 방법에 따라 Aroclor-1254를 효소유도제로 하여 수컷 Sprague-Dawley rat의 간으로 조제한 것(Lot No. 95-1, 단백질 25.5 mg/mL 함유)을 사용하였다. 즉, 상기 방법으로 조제한 S9 fraction과 NADPH-regenerating system인 시판 cofactor (Wako #309-50611)를 사용 직전에 조제

(20% S9 fraction 함유)하였으며 효소의 분해를 막기 위하여 S9 mix가 들어있는 tube를 얼음에 채워 사용하였다. S9 mix 1 mL 중의 조성은 MgCl₂·6H₂O 8 μM, KCl 33 μM, NADH 4 μM, NADPH 4 μM, glucose-6-phosphate 5 μM, sodium phosphate buffer (pH 7.4) 100 μM 및 S9 fraction 200 μL로 하여 단백질 함량을 5.1 mg/mL 되게 조제하였다. S9 mix는 0.5 mL/flask로 처리되었다.

시험물질의 처리

냉동 건조된 각 차의 추출물을 DMSO에 용해하여 최고 농도액(각 차로서 1 g 해당량/mL)을 조제한 후, 이를 배양액으로 희석, 각 농도의 원액(100배 농축액)을 조제하였다. 이를 필요 농도별로 10 μL/mL씩 처리하였다.

CHO-K1 세포에 대한 처리

농도군 당 2개의 T-25 세포배양 flask (50 mL, Falcon)에 25만개의 CHO-K1 세포를 파종, 약 24시간 배양한 후 돌연변이 유발 물질인 MMC로 1시간 처리하였다. 이때 MMC 처리 1시간 전에 새 배양액으로 교환해 주어 세포를 안정시킨 후 MMC를 처리해 주었다. 처리가 끝난 후 5 mL phosphate buffered saline (PBS)으로 2번 세척한 다음 다시 새 배양액으로 교환하여 필요에 따라 S9 mix와 함께 각 차 추출물을 농도별로 처리하고, 세포분열 주기중 G1 phase에서의 효과를 보기 위하여 3시간 동안 추가 배양하였다. 즉, 돌연변이 유발 물질인 MMC를 처리한 후에 각 차 추출물을 처리하였다(post-treatment).

SCE를 위한 염색체 표본 제작

10 μM 농도의 BrdUrd (5-bromo-2-deoxyuridine) 존재하에 백색등에 노출되지 않도록 flask를 알루미늄 호일로 싸서 약 24시간 배양한 후 1 μM 농도(최종 농도)의 colchicine을 처리하고 다시 2시간 배양하여 중기세포를 수거하였다. 수거한 중기세포를 원심분리한 후 상등액을 제거하여 vortex로 세포를 잘 분산시켜 0.75 mM KCl을 처리한 다음 고정액(methanol: acetic acid=3:1)으로 세포를 고정하였다. 고정액으로 처리된 세포현탁액을 slide에 떨어뜨려 현미경으로 세포가 잘 퍼지는 조건을 잡아 염색체 표본을 만들어 건조시켰다. 건조된 slide는 phosphate buffer (pH 7.0)에 10분간 담근 후 암소에서 Hoechst No. 33258 (Sigma B-1155)용액으로 10분간 염색하고 5분간 UV를 조사한 다음 신선하게 조제된 3% Giemsa액에 30분간 담

구어 차별 염색하였다. 염색한 slide는 증류수로 세척한 후 dryer로 완전 건조시켰으며 depex로 mounting하여 실온에서 건조, 보관하면서 SCE 유발 빈도를 계수하였다. 차별염색법은 Perry 등의 방법⁽²⁶⁾을 응용하였다.

SCE 유발 빈도의 계수

염색상태가 양호한 slide를 선정하여 먼저 현미경에서 저배율(200배)로 계수하기 좋은 부위를 선정한 후 1000배(100 x objective)의 고배율로 염색체가 잘 퍼진 세포를 골라 SCE 유발 빈도를 계수하였다. 각 농도마다 2차 분열 중기 세포를 50개 이상 계수하여 그 평균치를 SCE 유발 빈도로 나타내었다. 각 차 추출물에 의한 SCE 유발 빈도의 억제비율(inhibition, %)은 Krishna의 방법⁽²⁷⁾에 따라 다음식으로 계산하였다

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{\text{No. of SCEs/cell in the presence of tea extracts} - \text{No. of spontaneous SCEs/cell}}{\text{No. of SCEs/cell in the absence of tea extracts} - \text{No. of spontaneous SCEs/cell}} \times 100$$

결과해석 및 자료의 처리

결과해석은 돌연변이 물질에 의하여 유발된 자매염색 분체가 차 추출물 처리로 인하여 감소되는 정도를 보아 시판 차들의 돌연변이 억제효과 유무를 판단하였다. 모든 자료의 처리는 각 처리 군에 따라 평균치 ±표준편차(S.D.)를 구하였으며, 각 군별 유의성 검증을 위해서 one-way 분산분석(ANOVA)을 한 후 F값을 구하였고, Duncan's multiple range test를 이용하여 각 군간의 유의성의 차이를 검증하였다.

결과 및 고찰

돌연 변이 물질에 의하여 유발된 SCE 빈도에 미치는 감잎차 추출물의 처리농도에 따른 변화와 억제효과는 Table 1과 같다. MMC 처리하여 세포에 돌연변이를 유발시킨 후 감잎차 추출물을 처리하는 후처리 방식(post-treatment)으로 처리하였을 경우 S9 mix 처리 군에서는 고농도인 1,000 μg/mL 농도에서 SCE 유발 빈도의 유의성 있는 감소가 나타났다. 이에 비하여 S9 mix를 처리하지 않은 군에서는 20, 40, 80 μg/mL 처리 군에서 SCE의 유발 빈도가 억제되었으나 감잎차의 처리 농도를 160 μg/mL이상으로 증가시켰을 때 이에 따른 SCE 유발 빈도의 감소는 없거나 미미하였

Table 1. Effect of persimmon leaf tea extract (PLTE) on MMC-induced SCEs in CHO cells¹⁾

Dose of PLTE (µg/mL)	+S9		-S9	
	(SCEs/cell) (Mean ± SD)	Inhibition ²⁾ (%)	(SCEs/cell) (Mean ± SD)	Inhibition (%)
Negative Control ³⁾	9.7 ± 0.3		7.0 ± 0.2	
PLTE (1,000)	9.5 ± 0.2		7.3 ± 0.3	
MMC	19.8 ± 0.3 ^{bc4)}		13.8 ± 0.4 ^{bc}	
MMC ± PLTE (10)	18.9 ± 0.3 ^{ab}	9	13.9 ± 0.3 ^{bc}	
MMC ± PLTE (20)	19.9 ± 0.3 ^{bc}	5 ¹⁾	12.9 ± 0.3 ^a	13
MMC ± PLTE (40)	19.3 ± 0.4 ^{bc}	4	12.7 ± 0.3 ^a	15
MMC ± PLTE (80)	20.3 ± 0.4 ^c	-	12.9 ± 0.2 ^a	13
MMC ± PLTE (160)	19.3 ± 0.5 ^{bc}	4	14.5 ± 0.3 ^c	-
MMC ± PLTE (1,000)	18.0 ± 0.3 ^a	17	13.2 ± 0.3 ^{ab}	9

¹⁾CHO cells were treated with 0.5 µM MMC for 1 hour and were post-treated with each concentrations of PLTE for 3 hours in the G1 phase of the cell cycle in the presence or absence of S9 mix.

²⁾Percentage inhibition was calculated by using the following formula.

$$100 - \frac{\text{No. of SCEs/cell in the presence of PLTE}}{\text{No. of SCEs/cell in the absence of PLTE}} \times 100$$

The number of spontaneous SCEs per cells (negative control) was subtracted from the numerator and the denominator.

³⁾Phosphate-buffered saline.

⁴⁾Data bearing different superscript letters in the same column were significantly different ($p < 0.05$).

⁵⁾SCE frequencies were not decreased.

다. CHO cell에서 MMC 처리로 생긴 SCE 유발 빈도에 미치는 감잎차 추출물의 첨가효과는 그 처리 농도가 다를 뿐 S9 존재 시나 비존재 시 모두 감소시키는 경향을 보여주었으므로 시판 감잎차에는 돌연변이 물질로 유발된 SCE 빈도를 수정하는 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 실험실 제조 감잎차를 대상으로 SCE 유발 빈도를 측정하였던 선행 연구 결과⁽²⁰⁾와도 일치하는 것이다. 감잎차의 돌연변이 억제효과에 대한 다른 연구에서 보면 감잎에서 추출한 tannin이 Ames test에서 직접 혹은 간접 돌연변이 물질에 대하여 돌연변이 억제효과를 나타내었으며 Spore rec assay에서나, SOS chromotest에서도 강한 돌연변이 억제 작용을 나타내어 열수 추출물보다 활성이 크게 나타났다⁽²¹⁾.

녹차 추출물의 처리 농도에 따른 SCE 유발 빈도의 변화와 억제효과는 Table 2와 같다. S9 mix와 함께 녹차 추출물을 160 µg/mL 농도로 처리한 군에서 SCE 유발 빈도가 18% 감소하였으며, 다른 농도로 처리한 군에서는 SCE 유발 빈도가 오히려 다소 증가하였다. 또 S9 mix를 처리하지 않은 군에서는 녹차 추출물의 농도가 증가 할 수록 SCE 유발 빈도도 따라 증가하였다. 이로써 녹차 추출물을 S9 mix와 함께 처리 시 특정 농도(160 µg/mL)에서 MMC로 인한 세포 돌연변이를 억제하는 능력이 나타났으나, S9 mix와 함께 처리하지 않은 녹차 추출물에는 세포 돌연변이 억제력이 거의 없었다. 이와 같은 결과는 본 연구에서 사용한 방법과 같은 진핵세포(eukaryotic cell) 실험체인 CHO

cell을 이용한 염색체 이상(CA) 실험 방법을 사용하였을 때 녹차 추출물이 MMC나 B(α)P 처리 후 S9 mix와 함께 처리하였을 때만 억제 시키는 효과가 있었으며 S9 mix 없이 단독으로 처리 시 오히려 CA를 증가 시키어 돌연변이 억제 효과가 없었음을 관찰한 선행 보고⁽¹³⁾와 같은 경향이었다. 이제까지의 녹차에 관한 연구들은 주로 녹차의 추출물보다는 녹차중의 특정 성분을 정제, 분리하여 녹차의 돌연변이 억제력이나 항암력이 있음을 보고한 것들이었다. 즉, 녹차의 catechin components^(6,28) 및 polyphenol⁽²⁹⁾이 돌연변이 억제와 항암작용을 하며, (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG)는 *in vivo* Drosophila mutation assay인 wing spot test 및 DNA repair test에서 돌연변이 물질에 대한 억제효과가 있음이 보고되었다⁽³⁰⁾. 녹차 성분 중 tannic acid⁽³¹⁾와 catechin 추출물⁽³²⁾은 포유 동물에서 돌연변이 물질에 의하여 유발된 SCE를 억제하는 효과가 있었다. 녹차의 특정 성분을 분리하여 실시한 위의 연구들에 비해 crude extract를 사용할 경우에는 돌연변이 억제력을 가진 여러 성분들이 함께 작용하여 그 효과를 더욱 증가 시킬 수도 있는 반면, 돌연변이 억제력을 갖지 않은 성분들이 함께 존재함으로써 억제력을 감소 시킬 수도 있을 것이다. 본 실험 결과, 녹차 추출물에서의 돌연변이 억제효과가 탁월하게 나타나지는 않았던 것은 후자의 경우처럼 작용한 것으로 사료된다. 또 본 연구에서 진핵세포 실험체인 CHO cell에서의 SCE 방법을 사용한 결과, 원핵세포계인 Ames test 결과들에서 나타난 돌연변이 억제력의 탁월

Table 2. Effect of green tea extract (GTE) on MMC-induced SCEs in CHO cells¹⁾

Dose of GTE ($\mu\text{g/mL}$)	+S9		-S9	
	(SCEs/cell) (Mean \pm SD)	Inhibition ²⁾ (%)	(SCEs/cell) (Mean \pm SD)	Inhibition (%)
Negative Control ³⁾	9.0 \pm 0.2		8.2 \pm 0.2	
GTE (1,000)	9.1 \pm 0.3		\times ⁵⁾	
MMC	16.3 \pm 0.3 ^{bd)}		17.9 \pm 0.3 ^{ab)}	- ⁶⁾
MMC \pm GTE (10)	18.8 \pm 0.4 ^{d)}	-	18.8 \pm 0.4 ^{bc)}	-
MMC \pm GTE (20)	18.9 \pm 0.4 ^{d)}	-	17.5 \pm 0.3 ^{a)}	4
MMC \pm GTE (40)	18.2 \pm 0.3 ^{cd)}	-	19.6 \pm 0.3 ^{c)}	-
MMC \pm GTE (80)	17.5 \pm 0.3 ^{c)}	-	19.2 \pm 0.3 ^{c)}	-
MMC \pm GTE (160)	14.9 \pm 0.3 ^{a)}	18	22.1 \pm 0.4 ^{d)}	-
MMC \pm GTE (1,000)	18.5 \pm 0.3 ^{d)}	-	\times	-

¹⁾CHO cells were treated with 0.5 μM MMC for 1 hour and were post-treated with each concentrations of GTE for 3 hours in the G1 phase of the cell cycle in the presence or absence of S9 mix.

²⁾Percentage inhibition was calculated by using the following formula.

$$100 - \frac{\text{No. of SCEs/cell in the presence of GTE}}{\text{No. of SCEs/cell in the absence of GTE}} \times 100$$

The number of spontaneous SCEs per cells (negative control) was subtracted from the numerator and the denominator.

³⁾Phosphate-buffered saline.

⁴⁾Data bearing different superscript letters in the same column were significantly different ($p < 0.05$).

⁵⁾No countable metaphase.

⁶⁾SCE frequencies were not decreased.

한 효과는 볼 수 없었다.

우롱차 추출물의 돌연변이 억제효과는 Table 3과 같다. CHO cell에서 MMC 처리로 유발된 SCE에 대하여 S9 mix와 함께 우롱차 추출물을 처리했을 때 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 16%, 20 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 10%의 감소를 보여 통계적으로 유의한 돌연변이 억제 효과가 있었고, 우롱차 추출물의 농도가 증가함에 따라 그 감소 효과는 점차 줄어들어 고농도(1,000 $\mu\text{g/mL}$)에서는 감소 효과가 없었으며 오히려 증가하였다. 이는 고농도로 우롱차를 처리했을 때 오히려 co-mutagenic하게 작용하였기 때문이라고 생각된다. S9 mix를 처리하지 않은 군에서는 저농도(10-40 $\mu\text{g/mL}$)에서 약간 SCE 유발 빈도를 감소시키는 경향을 보였을 뿐 유의한 감소는 나타나지 않았으며, 추출물의 농도가 80 $\mu\text{g/mL}$ 이상일 경우는 SCE가 다소 증가하였다. 본 실험 결과 우롱차는 S9 mix와 함께 저농도로 처리 시에만 MMC 처리로 생긴 SCE 유발 빈도를 유의성 있게 감소시키는 것을 알 수 있었다. Yen 등⁽³³⁾과 Chen 등⁽³⁴⁾은 우롱차에 돌연변이 억제효과가 있음을 보고하였으며 이 효과는 우롱차 성분 중 catechins, ascorbic acid와 caffeine 함량에 비례한다고 하였다. 우롱차에서의 돌연변이 억제효과나 항암 효과는 주로 polyphenol 성분에 의하고 그 중 가장 활성이 큰 것은 주성분인 EGCG였다⁽³⁵⁾.

이상 CHO 배양세포에 있어서 세가지 차의 수용성 추출물의 돌연변이 억제작용에 대한 실험을 해 본 결과, 세가지 차 모두 S9 mix와 함께 후처리 해준 경우

농도 의존적이지는 않았지만 각기 특정 농도에서 SCE 유발 빈도가 억제, 감소되는 결과를 나타내었고, 감잎차의 경우 S9 mix를 처리하지 않은 군에서도 SCE 유발 빈도를 감소시키는 효과가 있었다. 본 실험은 돌연변이원인 MMC를 CHO cell에 먼저 처리한 후 차 추출물을 처리해주는 후처리 방식으로 진행되어 돌연변이 물질들을 불활성화시킬 수 있는 기회가 없었으므로 돌연변이원이 불활성화되는 기전에 의해 돌연변이 억제가 되었다고 보기는 어렵다. 그 대신, 본 실험에서 나타난 각 차 추출물의 돌연변이 억제효과 기전은 차 추출물 중의 어떤 성분들이 S9 mix에 의하여 먼저 대사된 후 그 대사산물이 이미 손상된 DNA 염기에 대하여 DNA-excision repair activity를 촉진시킴으로써 SCE 유발 빈도를 감소시키는 기전, 즉 bio antimutagenic하게 작용한 것으로 생각된다⁽³⁶⁾. 그 동안의 연구들도 녹차 성분 중 catechins의 돌연변이 억제 효과는 배양세포⁽⁹⁾와 rat⁽⁶⁾에서 catechins의 대사 산물들이 직접적 돌연변이 물질에 대하여 bio antimutagenic하다는 것이 지배적이었다⁽¹³⁾. 실제로 catechins 중 주요 성분의 하나인 epigallocatechin gallate (EGCG)는 bacteria에서 생물학적 돌연변이 억제효과를 나타낸다고 보고되고 있다^(37,38). 본 실험에서 각 차의 성분들을 분리하여 시험하지는 않았으나, 각 차 추출물의 돌연변이 억제효과는 각 차 성분 중 catechins이나 polyphenols에 기인하는 것으로 생각된다^(8,16). 본 실험 결과, 감잎차의 경우 S9 mix를 처리하지 않은 군에서도 SCE 유발 빈도

Table 3. Effect of oolong tea extract (OTE) on MMC-induced SCEs in CHO cells¹⁾

Dose of OTE ($\mu\text{g/mL}$)	+S9		-S9	
	(SCEs/cell) (Mean \pm SD)	Inhibition ²⁾ (%)	(SCEs/cell) (Mean \pm SD)	Inhibition (%)
Negative Control ³⁾	11.6 \pm 0.3		8.1 \pm 0.2	
OTE (1,000)	11.4 \pm 0.2		\times ⁵⁾	
MMC	21.0 \pm 0.4 ⁴⁾		21.6 \pm 0.6 ^{4b)}	
MMC \pm OTE (10)	19.4 \pm 0.5 ^{a)}	16	21.0 \pm 0.2 ^{a)}	5
MMC \pm OTE (20)	20.0 \pm 0.5 ^{ab)}	10	21.2 \pm 0.5 ^{ab)}	4
MMC \pm OTE (40)	20.3 \pm 0.6 ^{abc)}	7	21.5 \pm 0.7 ^{ab)}	1
MMC \pm OTE (80)	21.1 \pm 0.3 ^{c)}	-	22.2 \pm 0.3 ^{b)}	- ⁶⁾
MMC \pm OTE (160)	20.6 \pm 0.3 ^{bc)}	3	23.5 \pm 0.6 ^{c)}	-
MMC \pm OTE (1,000)	24.2 \pm 0.5 ^{d)}	-	\times	

¹⁾CHO cells were treated with 0.5 μM MMC for 1 hour and were post-treated with each concentrations of OTE for 3 hours in the G1 phase of the cell cycle in the presence or absence of S9 mix.

²⁾Percentage inhibition was calculated by using the following formula.

$$100 - \frac{\text{No. of SCEs/cell in the presence of OTE}}{\text{No. of SCEs/cell in the absence of OTE}} \times 100$$

The number of spontaneous SCEs per cells (negative control) was subtracted from the numerator and the denominator.

³⁾Phosphate-buffered saline.

⁴⁾Data bearing different superscript letters in the same column were significantly different ($p < 0.05$).

⁵⁾No countable metaphase.

⁶⁾SCE frequencies were not decreased.

를 감소시키는 효과가 있었는데, 이는 감잎차 추출물에는 catechins 외에도 비타민 C, A, B₁, D, 엽산, pantothenic acid 등이 함유되어 있고, 녹차 및 우롱차와는 다른 어떤 성분이 있어 S9 mix와 대사 되기 이전에 돌연변이를 억제할 수 있는 기능이 있기 때문일 것이다.

결론적으로, 돌연변이 유발 물질인 MMC를 사용하여 유도한 SCE test에서 녹차, 우롱차 추출물은 S9 mix와 함께 처리 시, 감잎차 추출물은 S9 mix와 함께 혹은 S9 mix 없이 처리 시 용량 상관성은 없었지만 일정 농도에서 모두 SCE 감소효과를 나타내는 돌연변이 억제 효과를 볼 수 있었다. 다른 차에 비해 감잎차는 S9 mix 없이 처리하였을 때에도 SCE 유발 빈도를 감소시킨 것으로 보아 감잎차에는 돌연변이 억제효과를 나타내는 성분인 catechins이나 polyphenol 성분 외에 다른 어떤 알려지지 않은 성분이 더 있을 것이다. 이 부분에 대해서는 앞으로 본 연구에서 사용한 CHO cell의 SCE 실험 방법을 이용하여 각 차에서 돌연변이 억제효과를 나타내는 성분을 분리해 각 구성 성분 별로 돌연변이 억제력을 알아보는 실험이 더 진행되어야 하리라고 본다.

요 약

배양 CHO cell에 SCE법을 이용하여 실제로 음용하

는 조건에서 추출한 시판 감잎차, 녹차, 우롱차 추출물의 돌연변이 억제효과를 보기 위하여 실험하였다. 돌연변이 물질로 사용한 MMC에 의하여 유발된 SCE 빈도에 미치는 각 차 추출물의 돌연변이 억제 효과를 본 결과, 감잎차는 MMC 처리 후 S9 mix와 함께 고농도(1000 $\mu\text{g/mL}$)로 세포에 처리되었을 때 SCE 빈도를 유의하게 감소시켰다. S9 mix 없이 감잎차 추출물만을 후처리한 경우는 저농도(20~80 $\mu\text{g/mL}$)에서 SCE 유발빈도를 유의하게 감소시켰다. 우롱차는 MMC 처리 후 S9 mix와 함께 저농도(10~20 $\mu\text{g/mL}$)로 처리 시 SCE 유발빈도를 감소시키는 효과가 있었으며, 녹차는 MMC 처리 후 S9 mix와 함께 추출물 농도 160 $\mu\text{g/mL}$ 로 처리 시 SCE 유발빈도를 감소시키는 효과가 있었다. 감잎차, 녹차, 우롱차 모두 농도는 다르나 각 추출물을 S9 mix와 함께 세포분열 주기 중 G1 기에 후처리 되었을 때에 SCE 빈도를 감소시키는 효과가 있었으며, 감잎차는 S9 mix 없이 단독으로 후처리 되었을 때에도 용량 상관성은 없지만 SCE 빈도를 감소시키는 효과가 있었다. 결론적으로, 시판 감잎차, 녹차, 우롱차 추출물에는 MMC로 유발된 돌연변이를 억제시키는 효과가 있는 것을 확인할 수 있었으며, 감잎차의 경우 S9 mix 없이도 SCE 빈도를 감소시키는 효과가 있었던 것으로 보아 다른 두 차와는 다른 기전의 돌연변이 억제 작용을 하는 성분이 있는 것으로 사료된다.

문헌

1. Bokuchava, M.A. and Skobeleva, N.I.: The biochemistry and technology of tea manufacture. *CRC Crit. Rev. in Food Sci. Nutr.*, **12**, 303-370 (1980)
2. Yeo, S.G., Ahn, C.W., Lee, Y.W., Lee, T.G., Park, Y.H. and Kim, S.B.: Antioxidative effect of tea extracts from green tea, oolong tea and black tea (in Korean). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **24**, 299-304 (1995)
3. Hunter, O.J., Manson, J.E., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Rosner, B., Hennekens, C.H., Speizer, F.E. and Willett, W. C.: A prospective study of caffeine, coffee, tea and breast cancer. *Am. J. Epidemiol.*, **136**, 1000-1001 (1992)
4. Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B. and Kromhout, D.: Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet*, **342**, 1007-1011 (1993)
5. Sasaki, Y.F., Yamada, H., Shimoi, K., Kator, K. and Kinai, N.: The clastogen-suppressing effects of green tea, Po-lei tea and Rooibos tea in CHO cells and mice. *Mutation Res.* **286**, 221-232 (1993)
6. Ito, Y., Ohnishi, S. and Fujie, K.: Chromosome aberrations induced by aflatoxin B1 in rat bone marrow cells *in vivo* and their suppression by green tea. *Mutation Res.*, **222**, 253-261 (1989)
7. Bu-Abbas, A., Clifford, M.N., Walker, R. and Ioannides, C.: Marked antimutagenic potential of aqueous green tea extracts.: mechanism of action. *Mutagenesis*, **9**, 325-331 (1994)
8. Wang, Z.Y., Cheng, S.J., Zhou, Z.C., Athar, M., Khan, W.A., Bickers, D.R. and Mukhtar, H.: Antimutagenic activity of green tea polyphenols. *Mutation Res.*, **223**, 273-285 (1989)
9. Sasaki, Y.F., Imanishi, H., Ohta, T., Watanabe, M., Matsumoto, K. and Shirasu, Y.: Suppressing effect of tannic acid on the frequencies of mutagen induced sister chromatid exchanges in mammalian cells. *Mutation Res.*, **213**, 195-203 (1989)
10. Kuroda, Y.: Bio-antimutagenic activity of green tea catechins in cultured Chinese hamster V79 cells. *Mutation Res.*, **361**, 179-186 (1996)
11. Yamada, J. and Tomita, Y.: Antimutagenic Activity of Water Extracts of Black Tea and Oolong Tea. *Biosci. Biochem.*, **58**, 2197-2200 (1994)
12. Yen, G.C. and Chen, H.Y.: Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agr. Food Chem.*, **43**, 27-32 (1995)
13. Imanishi, H., Sasaki, Y.F., Ohta, T., Watanabe, M., Kato, T. and Shirasu, Y.: Tea tannin components modify the induction of sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in mutagen treated cultured mammalian cells and mice. *Mutation Res.*, **259**, 79-87 (1991)
14. Yeo, S.G., Park, Y.B., Kim, I.S., Kim, S.B. and Park, Y. H.: Inhibition of xanthine oxidase by tea extracts from green tea, oolong tea and black tea (in Korean). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **24**, 154-159 (1995)
15. Yeo, S.G., Kim, I.S., Ahn, C.W., Kim, S.B. and Park, Y.H.: Desmutagenicity of tea extracts from green tea, oolong tea and black tea (in Korean). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **24**, 160-168 (1995)
16. Bu-Abbas, A., Nunnz, X., Clifford, M.N., Walker, R. and Ioannides, C.: A comparison of the antimutagenic potential of green, black and decaffeinated teas.: contribution of flavanols to the antimutagenic effect. *Mutagenesis*, **11**, 597-603 (1996)
17. Chung, S.H., Moon, K.D., Kim, J.K., Seong, J.H. and Sohn, T.H.: Changes of chemical components in persimmon leaves during growth for processing persimmon leaves tea (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **26**, 141-146 (1994)
18. Park, Y.J., Kang, M.H., Kim, J.I., Park, O.J., Lee, M.S. and Jang, H.D.: Changes of vitamin C and superoxide dismutase(SOD)-like activity of persimmon leaf tea by processing method and extraction condition (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **27**, 281-285 (1995)
19. Uchida, S., Ohta, H., Niwa, M., Mori, A., Nonaka, G., Nishioka, I. and Ozaki, M.: Prolongation of life span of stroke prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) ingesting persimmon tannin. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 1049-1052 (1990)
20. Song, H.S., Lee, H.K., Jang, H.D., Kim, J.I., Park, O.J., Lee, M.S. and Kang, M.H.: Antimutagenic effects of persimmon leaf tea extracts in sister chromatid exchange (SCE) assay system (in Korean). *J. Korean Soc. Food Nutr.* **25**, 232-239 (1996)
21. Moon, S.H. and Park, K.Y.: Antimutagenic effects of boiled water extract and tannin from persimmon leaves (in Korean). *J. Korean Soc. Food Nutr.* **24**, 880-886 (1995)
22. Moon, S.H., Kim, K.H. and Park, K.Y.: Antimutagenic effect of persimmon leaves *in vivo* using Sarcoma-180 cells (in Korean). *J. Korean Soc. Food Nutr.* **25**, 865-871 (1996)
23. Moon, S.H., Kim, J.O., Rhee, S.H., Park, K.Y., Kim, K.H. and Rhew, T.H.: Antimutagenic effects and compounds identified from hexane fraction of persimmon leaves (in Korean). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **22**, 334-339 (1993)
24. Dean, B.J. and Danford, N.: Assays for the detection of chemically induced chromosome damage in cultured mammalian cells in: *Mutagenicity testing: a practical approach* (Venitt, S. and Parry, J.M.eds) IRL Press Limited, P.O. Box 1, Eynsham, Oxford ox 81JJ, England, 187-232 (1984)
25. Maron, D.M. and Ames, B.N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res.*, **113**, 173-215 (1983)
26. Perry, P.E. and Wolff, S.: New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*, **251**, 156-158 (1974)
27. Krishna, G., Nath, J. and Ong, T.: Inhibition of cyclophosphamide and mitomycin C induced sister chromatid exchanges in mice by vitamin C. *Cancer Res.*, **46**, 2760-2764 (1986)
28. Klaunig, J.E.: Chemopreventive effects of green tea components on hepatic carcinogenesis. *Prev Med.* **21**, 510-519 (1992)
29. Weisburger, J.H., Hara, Y., Dolan, L., Luo, F.Q., Pittman, B., Zang, E.: Tea polyphenols as inhibitors of mutagenicity of major classes of carcinogens. *Mutation Res.*, **371**, 57-63 (1996)

30. Hayatsu, H., Inada, N., Kakutani, T., Arimoto, S., Negishi, T., Mori, K., Okuda, T., Sakada, T.: Suppression of genotoxicity of carcinogens by (-)-epigallocatechin gallate. *Prev. Med.*, **21**, 370-376 (1992)
31. Sasaki, Y.F., Imanishi, H., Ohta, T., Watanabe, M., Matsumoto, K. and Shirasu, Y.: Suppressing effect of tannic acid on the frequencies of mutagen-induced sister-chromatid exchanges in mammalian cells. *Mutation Res.*, **213**, 195-203 (1989)
32. Fujie, K., Aoki, T., Ito, Y. and Maeda, S.: Sister chromatid exchanges induced by trihalomethanes in rat erythroblastic cells and their suppression by crude catechin extracted from green tea. *Mutation Res.*, **300**, 241-246 (1993)
33. Yen, G.C., Chen, H.Y.: Relationship between anti-mutagenic activity and major components of various teas. *Mutagenesis*, **11**, 37-41 (1996)
34. Chen, H.Y., Yen, G.C.: Possible mechanisms of anti-mutagens by various teas as judged by their effects on mutagenesis by 2-mino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline and benzo[a]pyrene. *Mutation Res.*, **393**, 115-122 (1997)
35. Stoner, G.D., Mukhtar, H.: Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *J. Cell Biochem. Suppl.*, **22**, 169-180 (1995)
36. Kada, T., Inoue, T. and Namiki, M.: Environmental desmutagens and antimutagens, in: Klekowsky (ed.), *Environmental Mutagenesis, Carcinogenesis and Plant Biology*, Praeger Scientific, New York, 133-152 (1982)
37. Shimoi, K., Nakamura, Y., Tomita, I., Hara, Y. and Kada, T.: The pyrogallol related compounds reduced UV induced mutations in *Escherichia coli* B/r WP2. *Mutation Res.*, **173**, 239-244 (1986)
38. Yam, T.S., Shah, S. and Hamilton-Miller, J.M.: Microbiological activity of whole and fractionated crude extracts of tea (*Camellia sinensis*), and of tea components. *FEMS Microbiol Lett.*, **152**, 169-174 (1997)

(1998년 11월 11일 접수)