

단삼의 항산화적 항돌연변이 효과

안병용 · 김동길¹ · 최동성*

원광대학교 생명자원과학부, ¹우석대학교 생물산업생명공학부

Antimutagenic Effect of Tansen (*Salvia miltiorrhiza* Bunge). Ahn, Byung-Yong, Dong-Gil Kim¹, and Dong-Seong Choi*. Division of Life Science and Natural Resource, Wonkwang University, ¹Division of Bioscience and Industrial Biotechnology, Woosuk University, Chonbuk 565-701, Korea - To confirm the effects of binlang (*Areca catechu* L.) and tansen (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) on the mutagenicity induced by hydrogen peroxide, SOS Chromotest with *Escherichia coli* PQ37 and Ames test with *Salmonella typhimurium* TA104 were performed. Methanol-soluble parts of their water extracts showed high inhibitory effect against the mutagenicity of hydrogen peroxide in two bacterial mutation assays. Step-wise fractionation of methanol-soluble part from tansen was done using ethyl acetate, butanol and water. Among these fractions, water fraction strongly reduced the mutagenic activities by hydrogen peroxide. The water fraction was further partitioned by Sephadex LH-20 column chromatography, and 6 subfractions were obtained. The fraction III showed the strongest inhibitory effects against the mutagenic activities induced by hydrogen peroxide. The inhibition rates of fraction III at concentration of 500 µg/assay were 28%, 30% and 15% against 4-NQO, MNNG and B(a)P, respectively. But the mutagenic potency of AFB₁ was increased.

Key words : SOS Chromotest, Ames test, antimutagenic effect, *Salvia miltiorrhiza* Bunge

거의 모든 생명체는 공기중의 산소에 의해 그 생명을 유지해 나가면서 산소로부터 생성된 산소 라디칼에 의해 [1] DNA 손상은 물론 지질의 과산화, 단백질의 산화적 변성, 종양, 형질전환, 돌연변이, 노화 및 암을 유발한다 [2]. 이러한 라디칼에 대한 생체기능은 catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase 등과 같은 세포내 효소적 항산화 방어 시스템과 glutathione, vitamin C, E와 같은 비효소적 항산화제에 의하여 조절되어진다 [3]. 만약 산화능과 항산화능 사이의 항상성이 파괴된 산화적 스트레스 상태에서는 유리 라디칼과 관련된 여러 장애와 질병이 초래될 수도 있다 [4]. 따라서 유리 라디칼적 DNA 손상으로 발생하는 여러 질병을 효과적으로 예방하고 또한 건강한 생활을 유지하고자 β-carotene, vitamin E, C, garlic, selenium 등과 같은 항산화적 항돌연변이원성 물질 [5]에 관심이 모아지고 있다.

동양권에서 생약은 오랫동안 질병의 예방, 치료 및 수명연장을 위해 사용되어 왔으며, 이러한 생체기능 조절 성분이 함유된 생약재로부터 항산화성 또는 항돌연변이원성 물질을 탐색하려는 연구가 많이 진행되어 왔다. 저자들도 5종의 직·간접변이원에 대한 생약재의 항돌연변이 효과를 검색하여 [6, 7] 세포내 항돌연변이원성 물질을 숙지황 열수추출물로부터 정제한 바 있으며 [8], 또한 과산화수소로부터 발생된 활성산소종에 대한 95종 생약재의 열수추출물의 돌

연변이 억제효과를 스크리닝하여 억제활성이 강한 단삼과 빈랑을 탐색하였다 [9]. 그러나 돌연변이 억제효과는 세균수 및 세포분열 속도의 감소로 인하여 위양성(false positive)의 돌연변이 억제효과를 나타낼 수 있으므로, 본 연구에서는 이에 관한 상세한 연구를 선행한 후 활성이 인정된 단삼으로부터 과산화수소의 변이원성에 대한 돌연변이 억제 물질을 분획, 정제한 후 이에 대한 4종의 직·간접변이원성의 억제효과를 bacterial mutation assay를 이용하여 검토하였다.

재료 및 방법

생약 시료

본 연구에 사용한 생약재는 서울 경동시장 내 생약협회에서 구입하여 80 mesh로 분쇄한 후 시료 10 g에 10배(w/v)량의 증류수를 가하여 100 °C에서 2시간 동안 환류추출한 다음 감압여과(Whatman No. 2) 및 동결건조하여 물 추출물로 사용하였다. 동결건조한 물 추출물에 10배량의 메탄올을 가하여 진탕하고 여과한 후 메탄올 가용성과 불용성 성분으로 분획하였다. 메탄올 가용성 분획물은 감압농축하고, 불용성 분획물은 증류수에 용해한 후 동결건조하였다.

시약 및 기기

변이원으로 사용된 hydrogen peroxide(H₂O₂), 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO), N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)는 Fluka(Switzerland)사로 부터 구입하였으며, aflatoxin B₁(AFB₁), benzo(a)pyrene[B(a)P], β-naphtho-

*Corresponding author

Tel. 82-652-290-1430; FAX. 82-652-290-1430
E-mail: dschoi@core.woosuk.ac.kr

flavone 및 phenobarbital은 Sigma(U.S.A.)사 제품을 사용하였다. S9 분획 조제는 Ong 등[10]의 방법에 따라서 7주령 (200±10 g)된 래트(male Sprague Dawley)에 phenobarbital과 β -naphthoflavone을 투여한 후 무균적으로 제조하였다.

시험 균주

SOS Chromotest의 기본 균주인 *Escherichia coli* PQ37 [*sfIA::Mud(Ap lac)cts lac Δ U169 mal⁺ uvrA galE galY Pho^C rfa*]은 P. Quillardet 박사(Pasteur 연구소, France)로부터, 산화적 스트레스에 대한 adaptive response(*oxyR*⁺) 반응이 결여된 *Salmonella typhimurium* TA104(*hisG428, oxyR, rfa Δ uvrB/pKM101*)은 B. N. Ames 박사(California 대학, U.S.A.)로부터 제공 받아 각각의 유전형질을 확인한 후 사용하였다.

SOS Chromotest

SOS Chromotest는 Quillardet와 Hofnung[11]의 방법에 준하여 수행하였으며, 변이원 및 균의 최적 농도를 각각 설정하였다. L 배지(bacto tryptone 10 g, bacto yeast extract 5 g, NaCl 6 g/L)에 하룻밤 배양된 배양액을 2%(v/v)가 되도록 접종하여 37 °C에서 2시간 진탕배양 하였다. 각각의 멸균 시험관에 10배(v/v) 희석된 균 배양액 0.6 mL를 분취하고, 여기에 각 농도의 변이원 및 시료 10 μ L를 혼합한 다음, 37 °C에서 2시간 배양하였다.

생약 시료의 색소로 인한 효소반응 측정의 간섭을 방지하기 위하여 배양액을 4 °C에서 25분간 원심분리(1,200×g)하여 상등액을 제거한 후 잔사에 0.6 mL의 L 배지를 현탁시킨 균 부유액 0.2 mL를 취하여 각각의 효소 활성을 측정하였다. β -galactosidase는 415 nm, alkaline phosphatase는 400 nm에서 OD를 측정하였으며, 활성 단위는 흡광도×1,000/반응시간(분)으로 계산하였다. Ratio(R)값은 β -galactosidase unit/alkaline phosphatase unit로 계산하였고, SOS 반응의 유도 정도를 나타내는 유도지수(induction factor; IF)는 R(C)/R(0)로 나타내었다. R(C)는 변이원 또는 변이원과 시료를 같이 첨가한 시험구의 R 값이며, R(0)은 변이원과 시료를

첨가하지 않았을 때의 R 값으로 1로 정하였다. 돌연변이 억제효과는 [(IF₀-IF)/IF₀]×100]으로 계산하였고, 변이원만을 첨가한 양성 대조구의 IF 값은 IF₀, 시료 첨가구의 IF 값은 IF_s로 나타내었다.

Salmonella typhimurium reversion assay(Ames test)

Ames test를 개량한 preincubation법[12]으로 실시하였으며, H₂O₂ 50 μ L(16.98 μ g/assay)와 시료 50 μ L(500 μ g/assay)를 혼합한 다음, 37 °C에서 20분간 배양하였다. 돌연변이 억제효과는 [(M-S₁/M-S₀)×100]으로 계산하였고, 변이원만을 첨가했을 때의 복귀 돌연변이주의 수를 M, 자연복귀 돌연변이주의 수를 S₀, 변이원과 시료를 첨가했을 때의 복귀 돌연변이주의 수를 S₁로 나타내었다.

Cell division test

SOS Chromotest를 이용한 돌연변이 억제시험법에서 시료 첨가에 따른 균의 생육속도를 관찰하기 위하여 균 부유액을 PB solution(1M/15 sodium phosphate buffer, pH 7.2)에 10진법으로 희석한 후 L 평판배지에 도말하여 37 °C에서 24시간 배양된 콜로니를 계수하였다. *S. typhimurium*(ADS 65)의 배양액을 PB solution에 6배 희석한 다음 각각의 시료를 돌연변이원성 억제 시험법과 동일한 농도로 처리하여 일정시간 간격으로 탁도(OD₆₆₀)를 측정(Photometer, Taitec, Japan.)하였으며 이때 시료별 대조구를 각각 사용하였다.

컬럼크로마토그래피에 의한 활성분획 정제

단삼 물 추출물의 메탄올 가용성 분획물을 증류수에 녹인 후 에틸아세테이트, 부탄올과 물층으로 순차적으로 분획하였다. 돌연변이 억제 효과를 나타낸 수용성 분획물(0.1 g/0.5 mL)을 Sephadex LH-20 column(2×70 cm)에 loading한 다음 50% 메탄올로 1 drop/9.7 sec씩 용출시키면서 10분당 1 cell씩 분획하였으며, 280 nm 파장에서 흡수특성이 동일한 용출액을 모아 농축 및 동결건조 후 시료로 사용하였다.

Table 1. Inhibitory effects of methanol-soluble and methanol-insoluble parts from hot water-extracted *Areca catechu* L. and *Salvia miltiorrhiza* Bunge on the mutagenicity induced by hydrogen peroxide in *Escherichia coli* PQ37

Testing part	β -gal (units)	Ap (units)	R	IF	Inhibition rate (%)	
Negative control	2.04	20.8	0.098	1.00		
Positive control	6.12	17.33	0.35	3.60 ± 0.50		
<i>Areca catechu</i> L.	water extract	3.04	15.33	0.19	1.93	43.0 ± 1.50
	methanol insoluble	5.68	22.06	0.25	2.51	26.0 ± 0.50
	methanol soluble	2.56	14.00	0.18	1.78	48.0 ± 1.50
<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge	water extract	4.24	19.93	0.21	2.07	29.0 ± 0.50
	methanol insoluble	4.28	16.86	0.25	2.46	27.0 ± 1.20
	methanol soluble	3.68	20.06	0.18	1.78	47.0 ± 2.50

Data are presented as the mean ± S.D. of 2 dependent assays. The concentration of hydrogen peroxide and test sample was 7.92 μ g/assay and 100 μ g/assay, respectively. Abbreviation: β -gal (β -galactosidase units), Ap (alkaline phosphatase units), IF (induction factor), R (Ratio)

결과 및 고찰

SOS Chromotest에서의 변이원성 억제효과

H₂O₂에 대한 단삼, 빈랑 물 추출물과 이들의 메탄올 불용성 및 가용성 부분의 돌연변이원성 억제효과를 비교하였다(Table 1). 단삼의 경우 각각 29%(물 추출물), 27%(메탄올 불용성) 및 47%(메탄올 가용성), 빈랑의 경우 43%(물 추출물), 26%(메탄올 불용성) 및 48%(메탄올 가용성)의 억제효과를 나타내었다. 단삼과 빈랑 물추출물의 메탄올 가용성 부분은 메탄올 불용성 부분보다 억제효과가 우수하였으며, 단삼의 경우 분리에 따른 억제효과가 뚜렷하였다. 빈랑의 메탄올 가용성 부분의 경우, 구성 효소인 alkaline phosphatase의 unit가 감소된 반면 단삼의 경우 증가되었다. 구성효소인 alkaline phosphatase의 unit 저하는 균수의 감소에 기인한 것으로 평가되어지나 실험자의 숙련도에 따라 차이를 나타낼 수 있으므로 정확한 평가를 내리기는 곤란하다. SOS Chromotest를 이용한 돌연변이 억제시험은 시험균주를 유전독성물질과 함께 일정 시간 배양한 후 β-galactosidase 활성의 억제 정도를 측정하고 있는데 lag phase의 연장이나 균수의 감소로 인해 β-galactosidase unit가 감소되어 위양성의 돌연변이 억제효과를 나타낼 수도 있다 [11]. 따라서 이러한 결점을 보완하기 위하여 SOS Chromotest의 실험 조건과 동일한 조건에서 균수를 확인하였다(Table 2). Alkaline phosphatase 활성이 감소된 빈랑 메탄올 가용성 부분의 경우 균수가 감소되었으나, 단삼 메탄올 가용성 부분의 경우 균의 생장이 증가되었다. 따라서 H₂O₂에 대한 단삼 메탄올 가용성 부분의 돌연변이원성 억제효과는 균수의 감소 및 균의 활력 저하에서 기인된 결과가 아닌, 돌연변이 억제효과에 의한 것임을 확인할 수 있었다.

Ames test에서의 변이원성 억제효과

SOS Chromotest와 Ames test는 활성물질을 구별하는 민감도와 신뢰도가 약간 다를 수가 있으므로 SOS Chromotest에서 항돌연변이 효과가 가장 높은 메탄올 가용성 부분을 Ames test를 이용하여 H₂O₂의 변이원성에 대한 억제효과를 비교하였다(Table 3). 500 µg/plate 농도에서 빈랑과 단

Table 2. Effects of methanol-soluble parts from hot water-extracted *Areca catechu* L. and *Salvia miltriorrhiza* Bunge on growth of *Escherichia coli* PQ37

Parameter	Treatment conditions (same to SOS Chromotest procedure)			
	Blank ¹⁾	Control ²⁾	Control + Binlang	Control + Tansen
10 ⁵ CFU/mL	760	406	375	465

¹⁾Bacterial suspension alone.

²⁾Bacterial suspension treated with H₂O₂ (7.92 µg/assay).

Binlang (*Salvia miltriorrhiza* Bunge), Tansen (*Areca catechu* L.).

Table 3. Inhibitory effects of methanol-soluble parts from hot water-extracted *Areca catechu* L. and *Salvia miltriorrhiza* Bunge on the mutagenicity induced by hydrogen peroxide in *Salmonella typhimurium* TA104

Samples	Revertants	Inhibition rate(%)
Negative control	469 ± 8.0	
Positive control	1208 ± 4.0	
<i>Areca catechu</i> L.	684 ± 8.0	71
<i>Salvia miltriorrhiza</i> Bunge	1016 ± 3.0	26

Data are presented as the mean ± S.D. of 3 plates. The concentration of hydrogen peroxide and test sample was 16.97 ng/plate and 500 µg /plate, respectively.

삼 물 추출물의 메탄올 가용부분은 각각 71%, 26%의 돌연변이 억제 효과를 나타내었으며, SOS Chromotest에 비해 첨가된 시료 농도가 5배가 높은 Ames test에서 빈랑의 돌연변이 억제효과는 현저하게 상승되었다.

Ames test에서, 70% 이상의 돌연변이 억제효과는 항균성에 기인될 가능성이 크므로 [13] 고농도의 시료에서 기인된 성장저해 효과로 추정되어 20분간 배양한 후 균수를 비교하고자 하였으나, 균의 회색시 H₂O₂ 및 시료 농도의 감소로 인해 유의성 있는 결과를 얻지 못하였다. 따라서 H₂O₂를 첨가하지 않은 시료 그 자체의 생육속도에 대한 영향을 비교한 결과 빈랑 메탄올 가용성 부분은 배양시간이 경과함에 따라 *S. typhimurium* TA104의 lag phase가 현저하게 지연되었으며(Fig. 1) 이러한 결과는 *E. coli*의 성장저해를 나타낸 Table 2의 결과와 일치하였다. 또한 빈랑 물 추

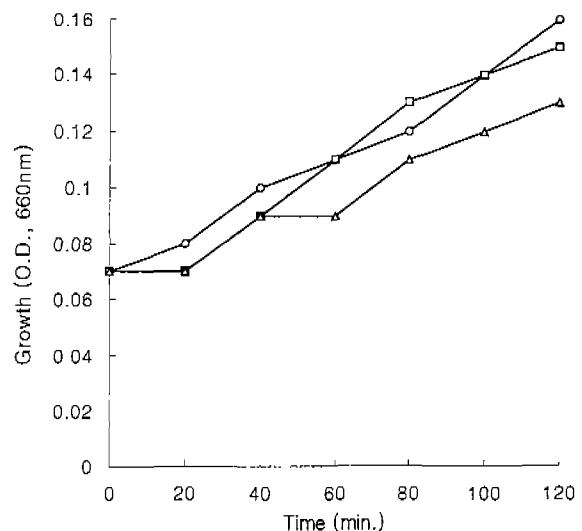


Fig. 1. Comparison of cell growth of *Salmonella typhimurium* TA104 in diluted phosphate buffer solution containing methanol-soluble parts from hot water-extracted *Areca catechu* L. and *Salvia miltriorrhiza* Bunge.

○; control(untreated H₂O₂), △; *Areca catechu* L., □; *Salvia miltriorrhiza* Bunge. The concentration of test sample was 5.0 mg/6 mL.

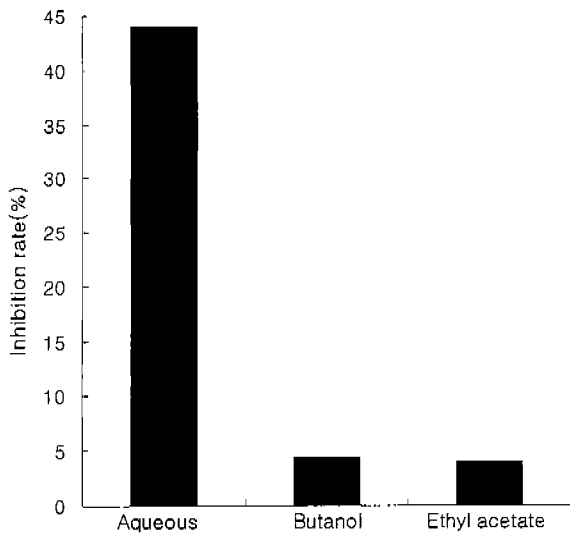


Fig. 2. Inhibitory effects of solvent fractions of methanol-soluble part from hot water-extracted *Salvia miltiorrhiza* Bunge on the mutagenicity induced by hydrogen peroxide in *Escherichia coli* PQ37. The concentration of hydrogen peroxide and test sample was 7.92 µg/assay and 100 µg/assay.

출물에는 DNA와 단백질의 합성 속도를 저해하는 arecoline 이 다량 함유되어 있으며[14], 세포독성 및 유전독성을 나타낸 보고[15]들과 일치하였으며, 4-NQO에 대한 cinnamaldehyde의 돌연변이 억제효과가 균의 생존에는 아무런 영향 없이 lag phase 가 2~4시간 지연되기 때문이라는 연구결과[16]와도 유사성을 나타내고 있다. *S. typhimurium* TA104에서, H₂O₂로 처리된 돌연변이는 Fenton 반응에 의해 발생된 hydroxyl radical과 singlet oxygen 에 의해 유도되나[17], 과산화수소로부터 유래된 유리 라디칼 중에 의한 SOS 반응 기작이 밝혀지지는 않아 라디칼의 반응선택성에 관한 평가는 어려웠다.

두 시험계에서 H₂O₂의 변이원성에 대한 단삼 물 추출물의 억제효과는 생육저해에 기인된 돌연변이 억제효과일 가능성이 배제되었다. 따라서 메탄올 가용성 부분을 에틸아세테이트, 부탄올과 물을 사용하여 차례로 분획한 다음, 각 분획물의 돌연변이원성 억제효과를 조사한 결과 수용성 분획은 44%, 부탄올 분획은 4.5%, 에틸아세테이트는 4%의 억제효과를 나타내었다(Fig. 2).

컬럼크로마토그래피에 의한 분획물의 돌연변이원성 억제 효과

단삼 물 추출물의 용매분획 중 수용성 분획물에 함유된 돌연변이원성 억제물질을 분리, 정제할 목적으로 컬럼크로마토그래피를 행하여 6개의 subfraction을 얻었다(Fig. 3). H₂O₂의 변이원성에 대하여 100 µg/assay의 농도의 fraction I, II, III, IV, V, VI는 각각 11, 6, 26, 22 및 11%의 억제효과를 나타내었다(Fig. 4). 억제효과가 가장 높은 fraction III

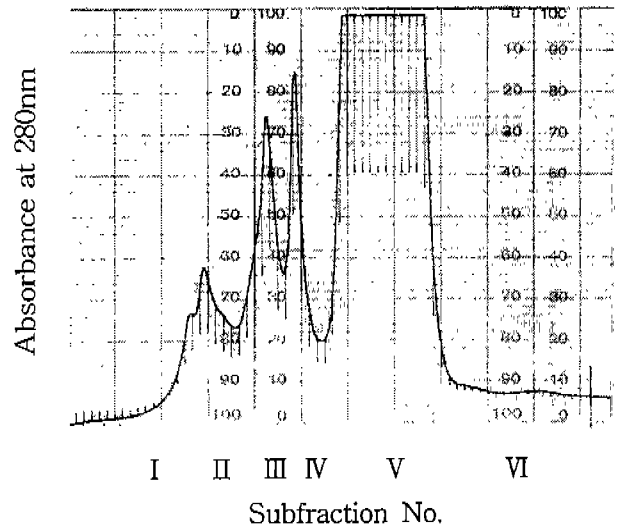


Fig. 3. Chromatography of the subfractions separated by Sephadex LH-20 column chromatography.

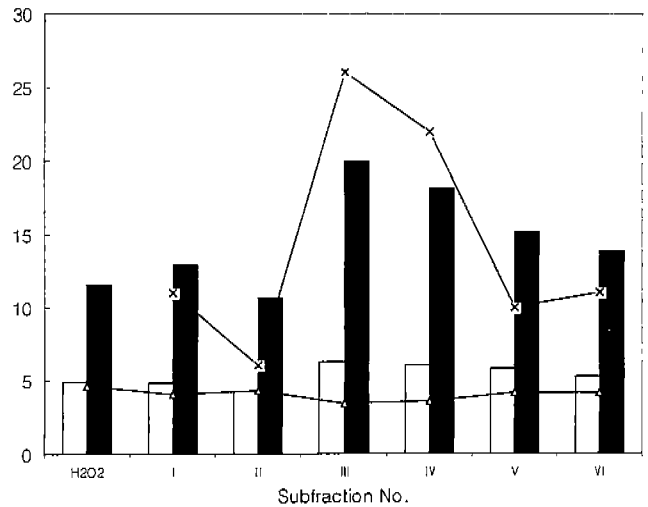


Fig. 4. Inhibitory effects of each subfractions separated by Sephadex LH-20 column chromatography from aqueous fraction of *Salvia miltiorrhiza* Bunge on the mutagenicity of hydrogen peroxide in *Escherichia coli* PQ37.

△; induction factor, ■; alkaline phosphatase(unit), □; β-galactosidase(unit), ×; inhibition rate (%). The concentration of hydrogen peroxide and test sample was 7.92 µg and 500 µg/assay, respectively.

의 경우 변이원성 억제 효과와 동반하여 alkaline phosphatase 활성도 증가되었는데, 이러한 결과는 항돌연변이원성에 의한 생존력의 증가로 해석되며 균의 생육을 저해하지 않은 결과임이 재확인되었다. 따라서 항산화적 역할에 기인된 fraction III의 항돌연변이 효과를 고찰하고자 직·간접 변이원에 대한 돌연변이 억제시험을 500 µg/assay 농도에서 수행하였으며 그 결과는 Fig. 5와 같다. Fraction III는 4-NQO, MNNG 및 B(a)P로 유도된 돌연변이원성에 대하여 각각 28%, 30%, 15% 억제효과를 나타낸 반면 AFB₁으로 유도된 돌

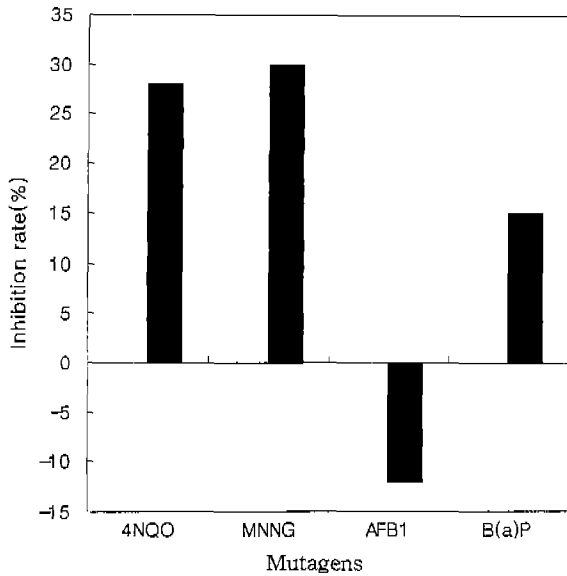


Fig. 5. Inhibitory effects of the fraction III obtained from aqueous fraction of *Salvia miltriorrhiza* Bunge on the mutagenicity of four model mutagens in *Escheriachia coli* PQ 37. The concentration of 4-NQO is 30 ng/assay and 1500 ng/assay for MNNG, 30 ng/assay for AFB₁, 2500 ng/assay for B(a)P. The concentration of fraction III was 500 µg/assay.

연변이원성을 12% 상승시켰다. Fraction III는 직접 변이원성에 대한 억제효과와 간접변이원성을 상승 및 억제시키는 성분이 혼재되어 있는 것으로 판단되었다.

Zahang 등[18]은 에테르로 추출한 단삼으로부터 7종의 quinone을 분리하여 항산화성을 검색한 결과 tanshinone IIa만을 제외한 6종의 quinone이 항산화성을 나타내었고, 그중 4종의 quinone은 BHA, BHT와 비슷한 항산화력을 보고한 바 있다. 또한 Sato 등[19]은 단삼의 에테르 추출물이 열수 추출물보다 B(a)P, Trp-P-1[3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido (4,3-b)indole]의 변이원성에 대하여 강한 항돌연변이 효과를 보고 하였다. 항산화제는 세포내에서 퍼옥사이드의 양을 감소시키는 물론 화학적 상호작용에 의해 직접 변이원에 대한 억제효과를, 간접변이원에 대한 항돌연변이 원성은 변이원의 활성화에 필요한 cytochrome P450의 산화를 억제하여 나타날 가능성이 크다[20]. 이상의 보고들과 본 실험결과로부터 H₂O₂ 및 직·간접변이원으로부터 유도된 돌연변이원성에 대한 억제효과를 나타낸 fraction III에는 유기용매 추출물로부터 동정된 성분과는 상이한 수용성 활성 물질이 함유되었을 가능성이 시사되었다.

요 약

SOS Chromotest(*E. coli* PQ37)와 Ames test(*S. typhimurium* TA104)에서 H₂O₂에 대한 단삼과 빈랑 물 추출물의 돌연변이 억제효과를 확인하기 위하여 돌연변이 억제효과

와 생존력을 고찰하였다. 단삼과 빈랑 물 추출물의 메탄올 가용성 부분은 H₂O₂의 변이원성에 대하여 강한 돌연변이 억제효과를 나타내었으나, 빈랑의 메탄올 가용성 부분은 H₂O₂로 처리된 *E. coli* PQ37과 H₂O₂를 처리하지 않은 *S. typhimurium* TA104의 생육을 지연시켰다. 그러나 단삼의 메탄올 가용성 부분은 균의 생육을 지연시키지 않았다. 따라서 단삼 메탄올 가용성 부분을 에틸아세테이트, 부탄올 그리고 물로 각각 분획하여, H₂O₂ 대한 돌연변이 억제효과를 검색한 결과 물 분획이 가장 강한 억제효과를 나타내었다. 단삼의 물 분획을 Sephadex LH-20 column chromatography를 행하여 6분획을 얻었으며, 이들 중 fraction III가 과산화수소의 변이원성을 가장 강하게 억제하였다. SOS Chromotest에서 500 µg/assay 농도의 Fraction III는 4-NQO, MNNG 및 B(a)P의 변이원성에 대하여 각각 28, 30, 15% 억제효과를 나타내었으나, AFB₁의 변이원성은 12% 상승시켰다.

감사의 글

본 연구는 1999년도 우석대학교 교내연구비에 의해 이루어졌으며 연구비 지원에 감사드립니다. 또한 *E. coli* PQ37를 제공해 주신 P. Quillardet 박사와 *Salmonella typhimurium* TA100을 제공해 주신 B. N. Ames 박사에게 감사를 드립니다.

REFERENCES

- Ahn, B. Y., I. K. Maeng, and D. S. Choi. 1998. The inhibitory effects of medicinal plants on the mutagenicity of hydrogen peroxide. *Journal of HRDC, Woosuk University* 3: 13-22.
- Ahn, B. Y., K. S. Lee, G. S. Song, I. K. Maeng, and D. S. Choi. 1998. Bio-antimutagenic effects of water extract from *Rehmannia glutinosa* Liboschitz in SOS Chromotest. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 439-445.
- de Silva, H. V. and D. M. Shankel. 1987. Effects of antimutagen cinnamaldehyde on reversion and survival of selected *Salmonella* tester strains. *Mutation Res.* 187: 11-19.
- Halliwell, B. and O. I. Aruoma. 1991. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mamalian systems. *FEBS Lett.* 281: 9-19.
- Han, J. S. 1991. Effects of various chemical compounds on spontaneous and hydrogen peroxide induced reversion in *Salmonella typhimurium* TA104. *Mutation Res.* 266: 77-84.
- Hayatsu, H., S. Arimoto, and T. Negishi. 1991. Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Res.* 202: 429-449.
- Hu, J. J., N. Dubin, D. Kurland, B. L. Ma, and G. C. Roush. 1995. The effects of hydrogen peroxide on

- DNA repair activities. *Mutation Res.* **336**: 193–201.
8. Kristina, S., L. Yun, N. Jagadeesan, B. Helmut, A. Kristina, and C. G. Roland. 1989. Cytotoxic and genotoxic effects of *Areca*-related compounds in cultured human buccal epithelial cells. *Cancer Res.* **48**: 5294–5298.
 9. Maron, D. M. and B. N. Ames. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.* **113**: 173–215.
 10. Ong, T. M., M. Mukhtar, C. R. Wolf, and E. Zeiger. 1980. Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* **4**: 55–60.
 11. Pero, R. W., G. C. Roush, M. M. Markowitz, and D. G. Miller. 1990. Oxidative stress, DNA repair and cancer susceptibility. *Cancer Detect. Prev.* **14**: 555–559.
 12. Quillardet, P. and M. Hofnung. 1985. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: Procedures. *Mutation Res.* **147**: 65–78.
 13. Sato, M., T. Sato, Y. Ose, H. Nagase, H. Kito, and Y. Saki. 1992. Modulating effect of tanshinones on mutagenic activity of Trp-P-1 and benzo(a)pyrene in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Res.* **265**: 149–154.
 14. Simic, M. G. 1988. Mechanisms of inhibition of free radical processes in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Res.* **87**: 377–386.
 15. Song, G. S., B. Y. Ahn, I. K. Maeng, Y. J. Kwon, S. B. Han, and D. S. Choi. 1997. Antimutagenicity screening of water extracts from Chinese herb with SOS Chromotest with several direct mutagens. *Food Biotechnol.* **6**: 214–218.
 16. Song, G. S., B. Y. Ahn, K. S. Lee, I. K. Maeng, and D. S. Choi. 1997. Effect of hot water extracts from medicinal plants on the mutagenicity of indirect mutagens. *Korean J. Food Sci. Technol.* **29**: 1288–294.
 17. Tyrsina, E. G., O. G. Rossikhina, S. K. Abilev, and Y. A. Tyrsin. 1994. Inhibition of the bacterial mutagenicity of MNNG by ascorbic acid and ascorbyl palmitate. *Mutation Res.* **321**: 81–87.
 18. Wall, M. E., M. C. Wani, G. Manikumar, T. J. Hughes, H. Taylor, R. Mcgivney, and J. Waner. 1988. Plant antimutagenic agents, 3. Coumarins. *J. Nat. Prod.* **51**: 1148–1152.
 19. Wary, K. K. and R. N. Sharan. 1991. Cytotoxic and cytostatic of arecoline and sodium nitrite on human cell *in vitro*. *Int. J. Cancer.* **47**: 396–400.
 20. Zahang, K., Y. Bao, P. Wu, R. T. Rosen, and C. Ho. 1990. Antioxidative components of Tanshen (*Salvia miltiorrhiza Bunge*). *J. Agric. Food Chem.* **38**: 1194–1197.

(Received February 10, 1999)