

마우스 소핵(Micronuclei, MN) 시험방법을 이용한 감잎차 추출물의 돌연변이 억제효과

송현순 · 이현걸 · 강명희*†

한국화학연구소 안정성 연구센터

*한남대학교 식품영양학과

Antimutagenic Effects of Persimmon Leaf Tea Extract (PLTE) in Mice Using Micronucleus Induction (MN) Test

Hyun-Soon Song, Hyun-Kul Lee and Myung-Hee Kang*†

Toxicology Research Center, Korea Institute of Chemical Technology, Taejon 305-335, Korea

*Dept. of Food and Nutrition, Han Nam University, Taejon 306-791, Korea

Abstract

The antimutagenic effects of persimmon leaf tea extract (PLTE) at concentration levels consumed by human were examined in mice using micronucleus induction with MMC (mitomycin C) or 4-NQO (4-nitroquinoline-1-oxide). When mice received oral gavage of 10 equivalent to PLTE 24 hr and 6 hr before, and 5 equivalent to PLTE 6 hr before and 3 hr after intraperitoneal injection of MMC, a significant decrease in the frequency of micronuclei were observed. The induction of micronuclei by 4-NQO was suppressed by oral dosage of PLTE at 5 equivalent to PLTE 6 hr before and 3 hr after, 10 equivalent to PLTE 3 hr before and 3 hr after intraperitoneal injection of MMC. Though the components of PLTE have not been analyzed so far, our present results suggest the existence of several bio-antimutagens and/or desmutagens in PLTE, beside catechin, well-known antimutagen.

Key words: persimmon leaf tea extract, antimutagenic effect, micronucleus, MMC, 4-NQO

서 론

최근 건강에 대한 관심이 높아지면서 일반적으로 응용하는 기호차에 대한 관심도 높아졌다. 감은 우리 나라 중부 이남에서 잘 자라므로 우리 주변에서 저렴하고 용이하게 구할 수 있으며 그 잎으로 제조한 감잎차는 최근에 다양한 형태로 시판되고 있으나 녹차 등과는 달리 식품으로서의 감잎이나 감잎차에 대한 건강증진 효과 및 생리활성에 관한 연구는 그동안 제한되어 왔으며 최근 들어 비교적 활발히 연구되고 있다. 감잎으로부터 분리한 여러 flavonoids들이 체내에서 angiotensin-converting 효소들의 활성을 억제시키는 효과가 있음이 보고되었으며(1), 감잎차의 항산화능(2) 및 돌연변이 억제효과에 관한 연구. 감 tannin의 해독 작용과 활성 유리 산소에 대한 scavenging 역할(3), 실험실 조제 발효 감잎차와 시판 감잎차의 SCE(sister chromatid exchange) test에 의한 돌연변이 억제 효과 연구(4,5) 등이 보고되고 있다 또한 Ames test, spore rec assay 및 SOS chromo test 방법을 통한 감잎의 열수 추출물과 tannin의 항돌연변이 효과(6)

및 sarcoma-180 세포를 이용한 *in vivo*에서의 감잎의 항암 효과(7), 그리고 감잎차의 methanol 추출물 중 n-haxane획분에 돌연변이 억제효과가 있었다는 보고(8)도 있다. 최근에는 감잎추출물이 고콜레스테롤혈증 흰쥐의 혈청 총-콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 수준을 감소시키는 효과를 보였다는 연구결과(9) 및 감잎 polyphenol 화합물군의 알레르기 저해효과도 보고된바 있다(10,11). 사람이 실제로 응용하는 조건에서 추출한 감잎차의 돌연변이 억제 효과를 본 결과, 감잎차는 Ames test에서 돌연변이 물질에 의하여 유발된 복귀 돌연변이 colony 유발을 억제시켰고(12) 또한 배양 포유 동물 세포에서 돌연변이 물질에 의하여 유발된 SCE를 억제시켰다(5). 그러나 이 연구들은 모두 *in vitro* 연구이며, 사람의 건강에 중요한 의미를 가질 수 있는 포유 동물계에서의 *in vivo* 연구로 감잎차의 돌연변이 억제 효과를 관찰한 실험 결과는 아직 보고되지 않고 있다.

소핵(Micronucleus, MN) 시험은 시험물질을 마우스 복강 내에 주사하고 24시간 후 골수를 채취하여 소핵의 유발성 유무를 관찰하는 *in vivo* 유전 독성실험법의 하나이

*†To whom all correspondence should be addressed

다. 소핵의 생성원리는 마우스 골수 내에서 erythroblast가 최종 분열한 후 탈핵과정을 거쳐 미성숙적혈구인 다염성 적혈구(PCE, polychromatic erythrocyte)가 되고 이 PCE는 약 10시간 후 성숙적혈구가 되어 혈관으로 가게 되는데 핵이 있는 erythroblast 상태에서 돌연변이 물질의 영향을 받으면 염색체가 깨어져서 더 이상 분화하지 못하고 파편으로 남아 PCE 내에 있게 된다(13). 이를 소핵이라 하며 소핵이 많으면 돌연변이 물질의 영향을 많이 받은 것이다.

본 연구에서는 실제 응용 조건에서 추출한 시판 감잎차의 돌연변이 억제효과를 포유동물체를 이용한 *in vivo* 연구방법인 소핵 시험법으로 알아보기 위해 시도되었다. 두 가지의 서로 다른 돌연변이 물질인 MMC(mitomycin C)와 4-NQO(4-nitroquinoline-1-oxide)로 유발된 마우스 골수 내 소핵 빈도수가 감잎차 추출물의 투여로 감소하는지의 여부를 측정해 보았으며 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

감잎차 재료

감잎차 재료는 감잎(*Diospyros kaki folium*) 100%인 진(眞)식품의 시판제품(증가차)을 구입하여 사용하였다. 감잎차 잎 3g을 80°C의 물 120 mL로 6분간 열수 추출하여 filter paper로 흡입 여과시킨 후 그대로 또는 2배로 희석하여 투여량을 10 mL/kg body weight(BW)로 만든 후, 필요한 시간에 투여하였다.

실험동물

한국 화학 연구소 안전성 연구센터 실험동물 사용실에서 사용한 ICR 계통 특정 병균균 부재(SPF) 마우스를 수컷으로 3~4주령 때 받아 검역하고 순화시킨 후, 8주령 때 시험에 사용하였다. 사육환경 조건은 온도 23±3°C, 상대습도 50±10%, 조명시간 12시간(오전 7시~오후 7시), 환기횟수 13~18회/hr(공조방식), 조도 150~300 Lux 인 사육실에서 polycarbonate제 사육상자를 사용하여 사육하였으며, 사료는 실험동물용 고품사료(제일사료주식회사: 대전광역시 동구 대화동 40-36)와 자외선 유수 살균기로 소독한 수도물을 마음대로 먹게 하였다. 실험동물인 마우스는 돌연변이 시험물질(MMC와 4-NQO)에 따라 실험 I(MMC 사용)과 실험 II(4-NQO 사용)로 두 번에 나누어 한 번에 110마리씩 총 220마리를 사용하였다. 실험 I에서 마우스는 음성대조군(증류수 사용), 양성대조군(MMC 사용), PLTE (persimmon leaf tea extract) I 처리군 및 PLTE II 처리군으로 나눈 후, 다시 PLTE 전처리(24, 6, 3시간 전) 및 후처리(3, 6시간 후) 시간대 별로

5군으로 세분하여 20군, 그리고 PLTE 처리 시간에 상관 없이 감잎차 대조군인 PLTE I 및 PLTE II군을 더하여 총 22 군으로 나누었으며 각 군당 5마리씩 배정하였다. 실험 II에서는 모든 조건이 같으나 돌연변이 시험물질로 MMC 대신 4-NQO를 사용하였다.

투여 경로 및 방법

돌연변이 유발 시험물질은 두 가지를 사용하였는데 간접 돌연변이 유발물질로 MMC를, 직접 돌연변이 유발 물질로는 4-NQO를 사용하였다. 시험물질은 소핵 시험의 일반적인 경로인 복강 내로 투여하였으며 투여량은 MMC는 2 mg/5 mL/kg BW, 4-NQO는 40 mg/10 mL/kg BW로 하였다. 감잎차는 시험물질 투여를 전후하여 지정된 시각에 존대를 사용하여 강제로 경구 투여하였으며 투여량은 10 mL/kg BW로 하였다. 개체 당 투여량은 투여직전에 측정된 체중에 따라 산출하였다. 시험물질 및 감잎차 추출물 투여에는 21 gauge 주사침을 장착한 1 mL 용량의 일회용 주사기를 사용하였다.

감잎차는 각 군별로 다음과 같이 계산하여 투여하였다. 상용 응용방법에 따라 감잎차 15 g을 80°C 증류수 120 mL에 6분간 우려낸 것을 1잔으로 보고 PLTE I 군에는 하루에 5잔 섭취하는 정도의 감잎차를 투여하였고, PLTE II 군에는 하루 10잔 섭취하는 정도의 감잎차를 투여하였다. 투여량은 체중 60 kg 성인을 기준으로 하여 체중 kg 당 감잎차 2 mL 용용한 것을 1잔 섭취로 삼아 마우스의 체중별로 계산하였다. 실제 투여시에는 감잎차 3g을 80°C 증류수 120 mL에 6분간 우려낸 액을 조제하여 5잔 섭취군인 PLTE I 군 마우스에는 이 액 10 mL/kg BW를 1:1로 희석한 것을 체중에 따라 계산하여 투여하였고, 10잔 섭취군인 PLTE II 군에는 이 액 10 mL/kg BW를 체중에 따라 계산하여 투여하였다.

감잎차 추출물은 돌연변이 물질 처리 시간을 기준으로 전처리와 후처리로 나누어 일정한 시간 간격을 두고 각 농도별로 10 mL/kg BW씩 투여하였다. 즉 돌연변이 물질 투여 24, 6, 3시간 전과 3, 6시간 후에 경구 투여하였으며 MMC는 2 mg/kg BW, 4-NQO는 40 mg/kg BW씩 각각 마우스 복강에 투여하여 24시간 후에 골수 채취 표본을 만들어 소핵을 가지는 PCE의 빈도수를 계수하였다.

골수 채취 및 슬라이드 표본 제작

시험물질 투여 24시간에 마우스의 대퇴골로부터 골수를 채취하였으며 골수 슬라이드 표본 제작은 Schmid(14)의 방법을 응용하였다. 마우스는 경추탈골로 도살하여 대퇴골을 적출하였다. 23 gauge 주사침을 사용, 대퇴골로부터 골수를 뽑아 conical 원심관을 이용하여 3 mL 우태아 혈청(GIBCO)으로 씻어내어 현탁시킨 다음 1000 rpm

으로 5분간 원심분리(Hamul Industrial Co.)하였다. 상등액을 제거한 후 침전된 골수를 고르게 현탁시키고 이를 한 방울씩 슬라이드 글라스에 떨어뜨려 도말한 후, 실온에서 충분히 건조시켜 methanol에 5분간 담가 고정하였다. 고정 및 건조가 끝난 슬라이드 표본은 다음 순서로 염색하여 수세와 건조를 거친 후 광학현미경 하에서 1000 배 배율로 관찰하였다 즉, May-Grunwald 염색액 원액에 3분간, May-Grunwald 염색액 1 : 1 희석액에 2분간 염색하고, Giemsa 염색액 1 : 6 희석액에 10분간 염색하였다.

소핵의 계수

동물 당 2매씩 골수 슬라이드 표본을 작성하고 그 중 염색상태가 양호한 1매의 표본을 선정하여 무작위로 코드화한 후 관찰하였다. 소핵 유발 빈도는 1000개의 PCE 중 소핵을 가진 PCE (MN PCE)의 수를 세었으며 평균±SD로 표시하였다. 계수할 때는 세포 직경의 1/5~1/20의 크기로 주변 유허 세포의 핵과 동일한 염색상을 나타내는 원형상 내지 타원형 소체를 소핵으로 계수하였다. 소핵의 계수가 끝나면 도합 200개의 성숙 적혈구(NCE, normochromatic erythrocyte)와 PCE를 계수하여 PCE/(PCE+NCE)의 비율을 산출, 세포독성의 지표로 삼았다.

통계처리 및 판정

각 동물로부터 얻은 기초자료에 대하여 SPSS-PC+ 통계 package를 이용하여 통계처리하였다. 각 그룹 내 투여군 간 및 투여시기에 따른 소핵의 출현빈도는 먼저

분산분석(ANOVA)을 행하여 F 값을 구하여 각 군간의 유의적인 차이를 확인한 후 각 군간의 사후비교는 LSD (least significance difference) test를 사용하였다 MMC (또는 4-NQO) 투여군에 비하여 MMC(또는 4-NQO)+감잎차 투여군에서 소핵의 유의한 감소가 인정될 때, 감잎차 추출물의 돌연변이 억제효과가 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

간접적 돌연변이 물질인 MMC에 의하여 유발된 소핵의 출현 빈도에 미치는 시판 감잎차 추출물의 감소 효과는 Table 1 및 Table 2와 같다. 차 제조에 사용한 증류수군(negative control) 및 차 자체만 투여한 군(PLTE I and PLTE II)에서는 소핵이 거의 유발되지 않은 반면, MMC만을 투여한 모든 양성 대조군(positive control)에서는 높은 빈도의 소핵이 유발됨을 관찰할 수 있었다.

MMC를 투여하기 전에 감잎차 추출물을 먼저 투여하는 pre-treatment 군의 경우, 상용 감잎차 섭취 5잔 분량의 PLTE I 군과 10잔 분량의 PLTE II군 모두 양성 대조군에 비해 소핵 빈도수가 감소하는 경향을 보였으며, 특히 MMC 투여 6시간 전에 감잎차 추출물을 투여한 PLTE I 및 PLTE II군, 그리고 24시간 전에 투여한 PLTE II군에서 22~28% 정도의 유의적인 소핵 빈도수 감소효과가 관찰되었다(Table 1). 이에 비해 MMC를 먼저 투여하고 각각 3시간, 6시간 후에 감잎차 추출물을 투여한 post-treatment의 경우, 6시간 후 투여군은 PLTE I군

Table 1. Effects of pre-treatment with persimmon leaf tea extracts (PLTE) at different intervals, and at two different concentrations on the frequencies of micronuclei induced by MMC in mice¹⁾

Group	Frequency of MN/1000 PCEs			
	Interval between MMC and PLTE (hrs)			
	0	3	6	24
PLTE I control ²⁾	1.4±0.6	-	-	-
PLTE II control ³⁾	0.5±0.0	-	-	-
Negative control (DW) ⁴⁾	-	1.0± 0.7 ⁶⁾	1.0± 0.7	0.6± 0.6
Positive control (MMC) ⁵⁾	-	58.6±11.5	98.2±15.9	58.4± 7.1
MMC+PLTE I	-	48.6± 7.8 (17.1%) ⁷⁾	76.0± 7.4* (22.6%)	52.6±10.2 (9.9%)
MMC+PLTE II	-	54.8± 3.6 (6.5%)	71.2±10.7** (27.5%)	45.4± 6.4* (22.3%)

¹⁾Mice were injected with 2 mg/kg MMC intraperitoneally and were pre-treated orally with PLTE at 5 mL/kg for PLTE I group and at 10 mL/kg for PLTE II group

²⁾PLTE I (5 mL/kg, equivalent to persimmon leaf tea 5 cups) control group without MMC treatment.

³⁾PLTE II (10 mL/kg, equivalent to persimmon leaf tea 10 cups) control group without MMC treatment.

⁴⁾Distilled water control group

⁵⁾MMC (2mg/kg) control group (without PLTE treatment).

⁶⁾Mean ± SD

⁷⁾Numbers in parenthesis are percentages of inhibition.

*Significant differences between positive control and MMC+PLTE groups at p<0.05.

**Significant differences between positive control and MMC+PLTE groups at p<0.01.

Table 2. Effects of post-treatment with persimmon leaf tea extracts (PLTE) at different intervals, and at two different concentrations on the frequencies of micronuclei induced by MMC in mice¹⁾

Group	Frequency of MN/1000 PCEs		
	Interval between MMC and PLTE (hrs)		
	0	3	6
PLTE I control ²⁾	1.4±0.6	-	-
PLTE II control ³⁾	0.5±0.0	-	-
Negative control (DW) ⁴⁾	-	1.0±1.0 ⁶⁾	1.4±0.9
Positive control (MMC) ⁵⁾	-	83.4±28.4	52.2±10.2
MMC+PLTE I	-	32.4±22.9** (61.2%) ⁷⁾	40.8±7.9 (21.8%)
MMC+PLTE II	-	67.6±16.2 (18.9%)	53.2±10.3 (-)

¹⁾Mice were injected with 2 mg/kg MMC intraperitoneally and were post-treated orally with PLTE at 5 mL/kg for PLTE I group and at 10 mL/kg for PLTE II group.

²⁾PLTE I (5 mL/kg, equivalent to persimmon leaf tea 5 cups) control group without MMC treatment.

³⁾PLTE II (10 mL/kg, equivalent to persimmon leaf tea 10 cups) control group without MMC treatment.

⁴⁾Distilled water control group.

⁵⁾MMC (2 mg/kg) control group (without PLTE treatment).

⁶⁾Mean±SD

⁷⁾Numbers in parenthesis are percentages of inhibition.

**Significant differences between positive control and MMC+PLTE groups at p<0.01.

및 PLTE II군 모두 유의적인 차이를 보이지 않았으나 3시간 후 투여 군에서는 소핵 빈도수가 감소하였으며 특히 PLTE I군에서는 61% 정도의 현저한 소핵 빈도수 감소효과를 보였다(Table 2).

직접적 돌연변이 유발물질인 4-NQO에 의해 유발된 소핵의 빈도수에 대한 감일차 추출물의 감소효과를 알아 본 결과는 Table 3 및 Table 4와 같다. 4-NQO 투여하기 전에 감일차 추출물을 투여하는 pre-treatment 군의 경우, PLTE I 및 PLTE II군 모두 소핵이 감소하는 경향이 있었

고, 특히 PLTE I군은 6시간 전에 투여하였을 때, PLTE II 군은 3시간 전에 투여하였을 때 유의적으로 감소하였다. 이에 비해 4-NQO 투여하기 24시간 전에 감일차 추출물을 투여하였을 때는 PLTE II 군에서 감소경향이 보였으나 두 군 모두 유의적인 감소효과가 나타나지 않았다(Table 3). 4-NQO를 먼저 투여하고 난 후에 감일차 추출물을 투여하는 post-treatment의 결과는 Table 4에 나와 있다. 모든 군에서 소핵 빈도수가 감소하는 경향이 보였으나, 특히 3시간 후 투여시에 PLTE I군은 43% (p<

Table 3. Effects of pre-treatment with persimmon leaf tea extracts (PLTE) at different intervals, and at two different concentrations on the frequencies of micronuclei induced by 4-NQO in mice¹⁾

Group	Frequency of MN/1000 PCEs			
	Interval between 4-NQO and PLTE (hrs)			
	0	3	6	24
PLTE I control ²⁾	0.6±0.9	-	-	-
PLTE II control ³⁾	0.8±0.5	-	-	-
Negative control (DW) ⁴⁾	-	0.8±1.3 ⁶⁾	1.0±1.2	1.2±1.1
Positive control (4-NQO) ⁵⁾	-	32.2±11.0	35.6±6.5	23.4±8.6
4-NQO+PLTE I	-	28.6±11.8 (11.2%) ⁷⁾	25.8±8.0* (27.5%)	23.8±9.4 (-)
4-NQO+PLTE II	-	17.0±4.3* (47.2%)	30.6±4.4 (14.0%)	17.2±8.6 (26.5%)

¹⁾Mice were injected with 40 mg/kg 4-NQO intraperitoneally and were pre-treated orally with PLTE at 5 mL/kg for PLTE I group and at 10 mL/kg for PLTE II group.

²⁾PLTE I (5 mL/kg, equivalent to persimmon leaf tea 5 cups) control group without 4-NQO treatment

³⁾PLTE II (10 mL/kg, equivalent to persimmon leaf tea 10 cups) control group without 4-NQO treatment

⁴⁾Distilled water control group.

⁵⁾4-NQO (40 mg/kg) control group (without PLTE treatment).

⁶⁾Mean±SD

⁷⁾Numbers in parenthesis are percentages of inhibition

*Significant differences between positive control and 4-NQO+PLTE groups at p<0.05.

Table 4. Effects of post-treatment with persimmon leaf tea extracts (PLTE) at different intervals, and at two different concentrations on the frequencies of micronuclei induced by 4-NQO in mice¹⁾

Group	Frequency of MN/1000 PCEs		
	Interval between 4-NQO and PLTE (hrs)		
	0	3	6
PLTE I control ²⁾	0.6±0.9	-	-
PLTE II control ³⁾	0.8±0.5	-	-
Negative control (DW) ⁴⁾	-	0.6±0.9 ⁶⁾	1.2± 0.8
Positive control (4-NQO) ⁵⁾	-	22.0±5.7	21.6± 2.9
4-NQO+PLTE I	-	12.6±3.9* (42.7%) ⁷⁾	18.6±11.9 (13.9%)
4-NQO+PLTE II	-	5.8±1.4** (73.6%)	15.8± 3.8 (26.9%)

¹⁾Mice were injected with 40 mg/kg 4-NQO intraperitoneally and were post-treated orally with PLTE at 5 mL/kg for PLTE I group and at 10 mL/kg for PLTE II group.

²⁾PLTE I (5 mL/kg, equivalent to persimmon leaf tea 5 cups) control group without 4-NQO treatment.

³⁾PLTE II (10 mL/kg, equivalent to persimmon leaf tea 10 cups) control group without 4-NQO treatment.

⁴⁾Distilled water control group.

⁵⁾4-NQO (40 mg/kg) control group (without PLTE treatment)

⁶⁾Mcan±SD

⁷⁾Numbers in parenthesis are percentages of inhibition.

*Significant differences between positive control and 4-NQO+PLTE groups at p<0.05

**Significant differences between positive control and 4-NQO+PLTE groups at p<0.01.

0.05), PLTE II군은 74%(p<0.01)의 현저한 감소 효과를 보였다

본 실험결과, 간접적 돌연변이 물질인 MMC나 직접적 돌연변이 물질인 4-NQO의 투여 전과 후에 감잎차 추출물을 처리했을 때 모두 소핵을 감소시켰다. 그러나 소핵의 감소 양상은 서로 달라서 MMC 투여의 경우 6시간, 24시간 전과 3시간 후 투여군에서, 4-NQO의 경우 3시간, 6시간 전과 3시간 후 투여군에서 감잎차 추출물의 농도에 따라 소핵을 유의성 있게 감소시키는 효과가 있었다. 이와 같이 감잎차 추출물의 투여 시간대에 따라 억제 효과가 다르게 나타난 것은 투여 시간대에 따라 마우스의 생리 대사에 의하여 영향을 받는 정도가 다르기 때문이다.

소핵 억제 효과를 본 다른 선행 연구들(15,16)을 보면, tea tannin의 수화물인 tannic acid를 MMC, 혹은 4-NQO 처리하기 전과 후에 투여하였을 때, 동시처리나 3, 9시간 후처리 시에는 감소하지 않았던 반면, 3, 6, 9시간 전에 투여하였을 때 소핵 빈도수가 유의적으로 감소하였고, 특히 6시간 전에 투여하였을 경우 그 감소 정도가 현저함을 보고하였다. 녹차를 MMC 투여 6시간 전에 투여했을 때 소핵 빈도수가 감소했다는 보고도 있다(17).

본 연구결과, 소핵 빈도수의 감소효과는 돌연변이 물질의 종류 및 감잎차 추출물의 농도에 따라서도 서로 다른 양상을 보였다. 돌연변이 억제 효과를 알아본 선행연구들을 살펴보면, Ames test를 이용하여 행한 녹차, 우롱차, 감잎차 추출물의 돌연변이 억제 실험에서 4-NQO에 의하여 유발된 돌연변이에 대하여는 차 추출물을 저농도로 처리 시에, 2AA(2-aminoanthracene)에 의하여 유발

된 돌연변이에 대하여는 고농도로 처리 시에 억제효과가 나타났다(12). 또 포유 동물을 이용한 돌연변이 억제 실험에서 tannin을 저농도로 처리하였을 때, MMC나 UV에 의하여 유발된 SCE(sister chromatid exchange) 빈도수를 감소시켰으나 고농도로 처리 시에는 tannin이 co-mutagenic하게 작용하여 오히려 SCE 빈도수를 증가시켰다는 보고도 있다(15) 이와 같은 선행연구 결과들은 *in vitro* 연구에서 나타나는 돌연변이 억제효과가 돌연변이 유발물질의 종류 및 돌연변이 억제 물질의 농도에 따라 달라짐을 말하는 것이다. *In vivo*로 진행된 본 연구에서도 위의 *in vitro* 선행연구들에서와 같이 돌연변이 억제효과가 돌연변이 유발물질의 종류 및 돌연변이 억제 물질의 농도에 따라 다르게 나타난 것은 *in vivo* 실험에서도 투여해 주는 돌연변이 유발물질의 종류 및 억제 물질의 농도에 따라 생체가 받는 영향이 다르기 때문인 것으로 생각된다.

선행 연구에서 tannic acid나 녹차 추출물을 돌연변이 유발물질 투여 전에 투여했을 때 억제효과를 나타냈던 것과 달리 본 실험에서 감잎차 추출물은 간접 돌연변이 물질(MMC)이나 직접 돌연변이 물질(4-NQO) 투여시, 돌연변이 물질 투여 전과 후에 투여했을 때 모두 억제효과가 있었다. 이는 전보(12)에서와 같이 감잎차 성분에는 녹차에 함유되지 않은 어떤 알려지지 않은 물질이 있어 돌연변이 억제역할을 하는 것으로 짐작된다. 현재까지 분석되어 있는 감잎 성분으로는 수용성 tannin과 caffeine, 비타민 C, sucrose, glucose, fructose 등의 유리당과 당 알코올인 mannitol 등이 알려져 있으며, 감잎차도 녹차나

우롱차처럼 catechin을 함유한다(18,19). 건조되지 않은 감잎에는 수용성 tannin 함량이 약 2%인데 비하여 catechin 혼합물량이 17~34 mg% 정도 존재한다(19). 이에 비해 녹차의 경우 tannin 물질의 60~80%가 catechin이다. 배양세포와 마우스 실험을 통하여 밝혀진 감잎차 추출물의 돌연변이 억제효과는 녹차 catechin에 의한 돌연변이 억제효과와 일치되는 부분이 있어 catechin이 녹차와 감잎차의 돌연변이 억제작용에서 중요한 역할을 하는 것으로 생각되고 있으나 catechin 외의 다른 성분의 작용으로 돌연변이 억제효과를 보일 가능성도 생각해 볼 수 있다.

녹차나 감잎차, 우롱차에 함유된 tannin 성분은 pro-mutagen의 대사활성을 저해하거나 궁극적 돌연변이 물질의 불활성화, 또는 free radical들을 제거함으로써 돌연변이 억제효과를 나타내는 것으로 추측되고 있다. Kada 등(20)은 미생물을 이용한 실험에서 antimutagen을 두 가지의 역할, 즉, 돌연변이 물질이 DNA를 공격하기 이전에 화학적 또는 효소적 작용으로 불활성화시키는 desmutagen으로서의 역할과, 이미 돌연변이 물질이 DNA를 공격한 후 고정화되는 과정을 차단하는 bio-antimutagen으로서의 역할로 나누어 보았다.

세균과 배양 포유동물 세포를 이용한 선행 연구들에서 보면(19,21-23), tannic acid는 DNA의 손상-회복 기능(excision-repair activity)을 강화하거나 복구 효소를 활성화시킴으로써 손상된 DNA를 복구시켜 SCE를 감소시키는 등 bio-antimutagen으로서의 역할을 수행한다. 본 연구에서 간접 돌연변이 물질 뿐 아니라 직접 돌연변이 유발물질 투여 후 감잎차 추출물을 후처리 방식으로 투여하였을 때 돌연변이 억제효과가 나타났으므로 Kada 등(24)의 제안대로 그 기전은 차 추출물 중의 어떤 성분이 bio-antimutagen으로 작용하여 DNA 손상-회복 기능이 촉진된 것에 기인한 결과라고 볼 수 있다.

한편 녹차 catechin에는 desmutagen의 역할이 있음도 보고되었다. 녹차 catechin은 배양세포와 rat에서 돌연변이 물질인 promutagen이 DNA에 손상을 주기 전에 화학적 또는 효소적으로 그 활성을 소멸시킴으로써 desmutagenic activity를 나타낸다(25,26). 즉, 차 추출물 성분이 다양한 promutagen들과 직접 반응하여 promutagen을 불활성화시키거나, NADPH로부터 cytochrome으로의 전자 흐름을 감소시켜 cytochrome P450의 활성을 떨어뜨려 promutagen이 mutagen으로 전환되는 것을 방해한다(27). 본 연구에서 cytochrome P450의 활성을 측정하지는 않았지만 간접 돌연변이 유발물질로 인한 돌연변이 활성이 억제되었던 것으로 보아 부분적으로 감잎차 추출물의 desmutagen 역할이 그 기전이 되었을 가능성도 생각해 볼 수 있다.

또한 가지 생각해 볼 수 있는 기전은 차 추출물 중 polyphenol이 화학적 발암물질의 대사산물로 생성된 superoxide($O_2 \cdot^-$), hydrogen peroxide(H_2O_2), hydroxyl radical

($\cdot OH$) 등의 활성 산소와 자유 라디칼의 생성을 억제하거나 제거하는 역할을 함으로써 세포와 조직의 손상을 억제하는 기전이다(28). 감잎차 추출물에도 polyphenol이 함유되어 있음이 보고되었으므로 이 기전도 생각해 볼 수 있으나 본 실험에서 활성산소 및 자유 라디칼 생성량을 측정하지 않았으므로 이를 증명하기는 어렵다 따라서 본 실험에서 나타난 감잎차 추출물의 돌연변이 억제효과 기전을 정확하게 밝히기 위해서는 앞으로 더 자세한 연구가 필요하리라고 생각된다. 이 외에도 마우스에서 감잎차 추출물이 돌연변이 억제 효과를 나타내는 가능한 기전으로 감잎차 중의 어떤 성분들이 마우스의 골수에서 그들의 target dose를 낮추어 줌으로써 돌연변이 물질의 약역학(pharmacokinetics)적인 면에 영향을 주어 억제효과를 나타내는 것도 생각해 볼 수 있으나(17) 세포 유전학적 실험에서 약력학적인 기전을 논하기는 어려우며 이 분야도 앞으로 더 연구되어야 할 것이다.

요 약

마우스에서 직접 혹은 간접 돌연변이 물질에 의하여 유발된 소핵에 미치는 감잎차 추출물의 억제 효과를 연구한 결과, 사람이 마시는 조건으로 추출한 감잎차 추출물을 하루 5잔 또는 10잔 섭취하는 양으로 투여했을 때 돌연변이 억제효과가 있음을 관찰하였다. 간접 돌연변이 유발물질인 MMC로 유발된 소핵 빈도수는 5잔 섭취량인 PLTE I군의 경우 MMC 투여 6시간 전과 3시간 후에, 10잔 섭취량인 PLTE II군의 경우 MMC 투여 24시간 전과 6시간 전에 감잎차 추출물을 투여하였을 때 마우스 골수 소핵의 빈도수가 유의적으로 감소하였다. 이에 비해 직접 돌연변이 유발물질인 4-NQO로 유발된 소핵 빈도수는 PLTE I군의 경우 4-NQO 투여 6시간 전과 3시간 후에, PLTE II군의 경우 4-NQO 투여 3시간 전과 3시간 후에 감잎차 추출물을 투여했을 때 소핵의 유의한 감소를 나타내었다. 이와 같은 결과는 선행연구에서 녹차나 차의 주성분인 catechin이나 tannic acid를 돌연변이 물질 투여 전에 투여했을 때에만 소핵 빈도수를 감소시켰던 것과 비교해 볼 때 감잎차에는 이들 물질 외에 아직 알려지지 않은 다른 돌연변이 억제 물질이 있는 것으로 생각되며 이에 관해서는 앞으로 더 자세한 연구가 요구된다.

문 헌

1. Kameda, K., Takaku, T., Okuda, H., Kimura, Y., Okuda T., Hatano, T., Agata, I. and Arichi, S.: Inhibitory effects of various flavonoids isolated from leaves of persimmon on angiotensin-converting enzyme activity. *J. Natl. Products*. 50, 680-683 (1989)
2. 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 *Korean J Food Sci. Technol.*, **27**, 281-285 (1995)
- 3 Uchida, S., Ohta, H., Niwa, M., Mori, A., Nonaka, G., Ni-shioka, 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)
 - 4 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. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **25**, 232-239 (1996)
 - 5 Song, H.S., Lee, H.K., Roh, J.K., Choi, E.H. and Kang, M.H : Effects of persimmon leaf tea extract, green tea extract and oolong tea extract on the frequencies of mutagen-induced sister chromatid exchange in mammalian cells. *Korean J Food Sci. Technol.*, **31**, 823-830 (1999)
 - 6 Moon, S.H and Park, K.Y : Antimutagenic effects of boiled water extract and tannin from persimmon leaves. *J. Korean Soc Food Nutr.*, **24**, 880-886 (1995)
 - 7 Moon, S.H, Kim, K.H. and Park, K.Y. Antimutagenic effect of persimmon leaves *in vivo* using sarcoma-180 cells. *J. Korean Soc Food Nutr.*, **25**, 865-871 (1996)
 - 8 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. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **22**, 307-312 (1993)
 - 9 Park, J.-Y, Park, E.-M., Lee, M.-K., Jang, J.-Y., Kim, M.-J and Cho, S.-Y : Effect of persimmon leaves (*Diospyros kaki* folium) extract on serum and liver lipid concentrations in hypercholesterolemic rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **29**, 537-542 (2000)
 - 10 Park, M.-H., Choi, C and Bae, M.-J. Effect of polyphenol compounds from persimmon leaves (*Diospyros kaki* folium) on allergic contact dermatitis. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **29**, 111-115 (2000)
 - 11 Park, M.-H, Choi, C, Son, G.-M., An, B.-J and Bae, M.-J. Effect of polyphenol compounds from persimmon leaves (*Diospyros kaki* folium) on anti-allergy. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **29**, 116-119 (2000)
 - 12 Song, H.S, Lee, H.K and Kang, M.H : Effects of persimmon leaf tea extract (PLTE), green tea extract (GTE), oolong tea extract (OTE) on reversion and survival of selected *Salmonella* tester strains *J Korean Soc. Food Nutr.*, **28**, 599-606 (1999)
 13. Alder, I.D. Cytogenetic tests in mammals. In *Mutagenicity testing - a practical approach*. Venitt, S. and Parry, J.M (eds.). IRL Press, Oxford. p 275-306 (1984)
 14. Schmid, W. : The micronucleus test. *Mutation Res.*, **31**, 9-15 (1975)
 15. Sasaki, Y.F, Matsumoto, K., Imanishi, H., Watanabe, M., Ohta, T., Shirasu, Y. and Tutikawa, K. *In vivo* anticlastogenic and antimutagenic effects of tannic acid in mice. *Mutation Research*, **244**, 43-47 (1991)
 16. 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)
 17. Sasaki, Y.F, Yamada, H., Shimoi, K., Kator, K. and Kimae, N. : The clastogen-suppressing effects of green tea, Po-let tea and Rooibos tea in CHO cells and mice. *Mutation Research*, **286**, 221-232 (1993)
 - 18 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 *Korean J. Food Sci. Technol.*, **26**, 141-146 (1994)
 - 19 Shimoi, K., Nakamura, Y., Tomita, I and Kada, T : Bio-antimutagenic effects of tannic acid on UV and chemically induced mutagenesis in *Escherichia coli* B/r *Mutation Res.*, **149**, 17-23 (1985)
 20. Kada, T, Inoue, T and Namuki, M. : Environmental desmutagens and antimutagens. In *Environmental Mutagenesis. Carcinogenesis and Plant Biology*. Klekowsky, D. (ed.), Praeger Scientific, New York, p 133-152 (1982)
 21. 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)
 - 22 Sasaki, Y.F., Imanishi, H., Ohta, T., Watanabe, M., Matsumoto, K and Shirasu, Y. Suppressing effect of tannic acid on UV and chemically induced chromosome aberrations in cultured mammalian cells. *Agric Biol. Chem.*, **52**, 2423-2428 (1988)
 - 23 Yoo, S.G., Kim, I.S., Ahn, C.W., Kim, S.B. and Park, Y.H. Dismutagenicity of tea extracts from green tea, oolong tea and black tea. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **24**, 160-168 (1995)
 24. Kada, T.K, Kaneko, S., Matsuzaka, T.M. and Hara, Y. : Detection and chemical identification of natural bio-anti-mutagens. A case of green tea factor. *Mutation Res.*, **150**, 127-132 (1985)
 - 25 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)
 - 26 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)
 27. Bu-Abbas, A., Nunez, X., Clifford, M.N., Walker, R., 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)
 28. 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)