

## Trp P-1 변이원성에 대한 Resveratrol의 항돌연변이 효과

장귀현 · 안병용\* · 권용주\*\* · 최동성\*\*\*†

식품의약품안전청 식품오염물질과, \*원광대학교 한의학전문대학원,

\*\*전북대학교 식품공학과, \*\*\*우석대학교 생명공학부

### Antimutagenic Effect of Resveratrol on Trp P-1 in *Salmonella typhimurium* TA98

Gui-Hyun Jang, Byung-Young Ahn\*, Yong-Ju Kwon\*\* and Dong-Seong Choi\*\*\*†

Food Contaminants Division, Korea Food & Drug Administration, Seoul 122-020, Korea

\*Professional Graduated School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

\*\*Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Jeonju 561-758, Korea

\*\*\*Division of Bioscience and Biotechnology, Woosuk University, Samrye 565-701, Korea

#### Abstract

The antimutagenic activity of resveratrol on the mutagenicity induced by Trp P-1(3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido(4,3-b)indole) was studied using the Ames test with *Salmonella typhimurium* TA98 and 100. Trp P-1 showed strong mutagenicity in *S. typhimurium* TA98, but was highly decreased mutagenicity in *S. typhimurium* TA100. This result suggests that the mutagenicity of Trp P-1 can be mainly induced by the DNA lesions causing frame shift. Resveratrol itself did not show antibacterial effect upon 300 µg/assay. Resveratrol showed the strongest inhibitory effect with dose dependent manner on the mutagenicity induced by Trp P-1. The inhibition rates of resveratrol at concentration of 2, 10, 25, 50, 100, 300 µg/assay were 13%, 30%, 52%, 65%, 81%, 89%, respectively.

Key words : resveratrol, trp P-1, ames test, antimutagenicity.

#### 서 론

환경 중에 함유된 극소수의 돌연변이원성 물질은 발암성과 높은 상관성을 가진 반면, 많은 항돌연변이원 물질도 환경 중에 함께 존재한다<sup>1)</sup>. 따라서 많은 연구자들은 fiber, cinnamaldehyde, coumarin, epigallocatechin gallate 및 tannic acid와 같은 돌연변이 억제물질을 채소, 과일 및 생약재로부터 동정하였다<sup>2-4)</sup>. 오래전부터 항암치료의 민간요법으로 포도요법이 자주 소개되었고 최근에는 포도로부터 resveratrol(3,4',5-trihydroxy-trans-stilbene)이 분리 동정되어 구조

가 밝혀지면서(Fig. 1), 이에 대한 암예방 효과, 항염증 효과, 항산화 효과의 기능이 밝혀지고 있다<sup>5)</sup>. Resveratrol은 포도, 땅콩, 뽕나무 등에서 주로 발견되지만 포도의 껍질에서는 50~10 µg/g, 그리고 적포도주에서는 1.5~3 mg/l 정도의 많은 양이 존재한다<sup>5)</sup>. 따라서 본 연구에서는 포도를 먹음으로써 쉽게 섭취할 수 있는 resveratrol의 또 다른 기능의 하나인 항돌연변이 효과를 검색한 후 그 기작을 밝히고자, 불고기 중의 대표적인 헤테로사이클릭 아민류의 하나인 Trp P-1을 변이원으로 사용하여 그에 대한 항돌연변이 효과를 Ames test로 선행 조사하였다.

† Corresponding author : Dong-Seong Choi

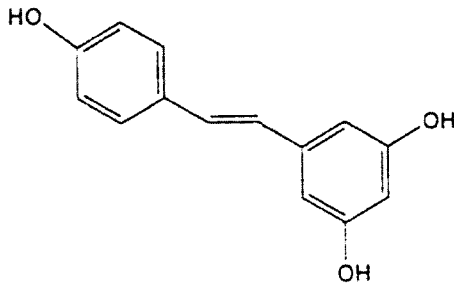


Fig. 1. Structure of resveratrol.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

Trp P-1 (3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole)과 resveratrol은 Sigma(U.S.A.)사 제품을, petri dish는  $\gamma$ -ray 살균제품(NUNC Co.)을 사용하였다. 시험 균주인 *Salmonella typhimurium* TA98, 100은 Ames 박사(California 대학, U.S.A.)로부터 기증받아 각각의 유전형질을 확인한 후 사용하였으며 유전자 특성은 Table 1과 같다.

### 2. S9 분획 조제

S9 분획 조제는 Ong 등<sup>6)</sup>의 방법에 따라서 무균적으로 행하였고, 실험용 동물로는  $200 \pm 10$  g의 7주령된 래트(male, Sprague Dawley)를, 유도물질로는 phenobarbital과  $\beta$ -naphthoflavone을 사용하였다.

### 3. Ames test

Ames test를 개량한 preincubation 법<sup>7)</sup>으로 실시하였다. 각 농도의 변이원 50  $\mu$ l, 하룻밤 배양시킨 균액 ( $1 \sim 2 \times 10^9$ ) 100  $\mu$ l, 멸균수 50  $\mu$ l와 0.5% S9 mix 0.5 ml를 혼합하고 37°C에서 210 rpm으로 20분간 진탕 배양하였다. 배양액에 미리 준비해 둔, 0.5 mM의 histi-

dine · biotin이 첨가된 top agar [agar 6 g, NaCl 5g per liter (45°C)] 2 ml을 혼합한 후에 minimal glucose agar plate [agar 15 g, 멸균수 930 ml, 50  $\times$  VB salt 20 ml, 40% glucose 50 ml] 상에 도포, 평판 고화시킨 다음, 37°C에서 48시간 배양하여 생긴 복귀돌연변이주 (*his*<sup>+</sup> revertant colony)의 수를 계수하여 돌연변이 원성을 판정하였다. 항돌연변이 효과는 [(M-S<sub>1</sub>/M-S<sub>0</sub>) $\times$ 100]으로 계산하였고, 이때 변이원 만을 첨가했을 때 돌연변이주의 수를 M, 자연복귀 돌연변이주의 수를 S<sub>0</sub>, 변이원과 resveratrol을 첨가했을 때의 복귀 돌연변이주의 수를 S<sub>1</sub>로 나타내었다.

### 4. 균 생육 억제효과 검색

*S. typhimurium* TA98을 Oxoid nutrient broth No.2 (25g per liter)에  $5 \times 10^8$  CFU/ml의 농도로 하룻밤 배양한 균액 0.5 ml을 0.066M phosphate buffer (pH 7.0) 4.5 ml에  $10^{-5}$ 배 희석하여  $5 \times 10^3$  CFU/ml의 농도로 맞추었다. 균 희석액 100  $\mu$ l에 각 농도별 시료 50  $\mu$ l와 0.066M phosphate buffer 0.55 ml을 혼합한 후 37°C에서 210 rpm으로 20분간 배양하였다. 배양액에 histidine · biotin이 함유되지 않은 2 ml의 top agar를 붓고 혼합한 다음, minimal glucose agar plate에 도포하고 37°C에서 48시간 배양하여 발생한 균수를 계수하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 변이원의 용량반응

미생물을 이용한 돌연변이원성 시험계에서 변이원에 대해 돌연변이는 자발적 과정이 아닌 유도성이기 때문에 돌연변이가 유발되는 세포적 시스템이 불활성화되면 돌연변이는 유도되지 않는다. 또한 항돌연변이 효과는 세포적 기능이 손실된 변이주에서 효과가 상승되므로<sup>8)</sup> 사용 가능한 균주에 대한 변이원성 검색

Table 1. Genetic characteristics of *Salmonella typhimurium* TA98, 100 used in Ames test

Test strains	Histidine mutation	LPS <sup>1)</sup>	Repair <sup>2)</sup>	R-factor <sup>3)</sup>	Mutation characteristics
TA 98	<i>hisC3052</i>	<i>rfa</i>	$\Delta$ <i>uvrB</i>	+R	Frame shift
TA100	<i>hisG46</i>	<i>rfa</i>	$\Delta$ <i>uvrB</i>	+R	Base substitution

<sup>1)</sup> The *rfa* mutation(deep rough character) causes partial loss of the lipopolysaccharide(LPS) barrier that coats the surface of the bacteria.

<sup>2)</sup> The deletion( $\Delta$ ) through *uvrB* includes the nitrate reductase(*chl*) and biotin(*bio*) gene.

<sup>3)</sup> R-factor plasmid, pKMI01, contains the ampicillin resistance factor.

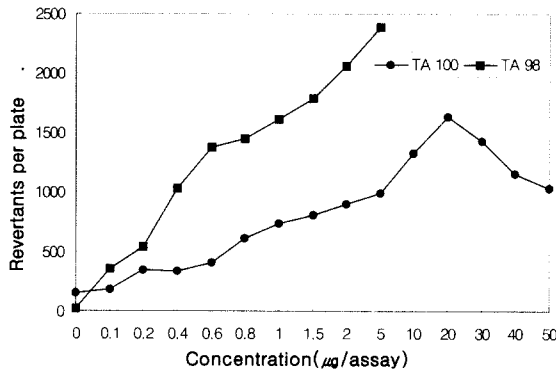


Fig. 2. Number of revertants induced by Trp P-1 with S9 in *Salmonella typhimurium* TA98.

이 선행되어야 한다. 따라서 틀변경 돌연변이를 일으키는 *S. typhimurium* TA98과 G-C쌍의 염기치환 돌연변이 특성을 지닌 *S. typhimurium* TA100에서 Trp P-1의 변이원의 용량반응을 시험하였으며, 그 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 400 ng의 농도에서 *S. typhimurium* TA98 및 *S. typhimurium* TA100에서 각각의 복귀돌연변이주의 수는 1032와 333로 나타났다. 염기치환 돌연변이를 유발하는 *S. typhimurium* TA100와 비교할 때 틀변경 돌연변이를 일으키는 *S. typhimurium* TA98에서 복귀돌연변이주의 수가 약 3배 증가되었다. 이러한 결과는 Trp P-1은 염기치환을 일으키기보다는 틀변경을 주로 일으켜 돌연변이를 일으킨다는 것을 뒷받침하는 결과로 해석되었다. 따라서 Trp P-1의 변이원성에 대한 항돌연변이 시험은 *S. typhimurium* TA98에서 효과가 클 것으로 판단되었고, 변이원의 적정농도는 400 μg으로 나타났다.

2. 균 생육에 대한 resveratrol의 한계농도

항돌연변이의 활성은 시험법, 변이원, 균 농도 및 균의 종류에 따라 경향이 다르게 나타날 수 있음은 물론 활성의 유·무까지도 다르게 나타날 수 있으나, 특히 시료의 항균력에 의한 균수의 감소나 세포분열 속도의 감소로 인하여 위양성의 결과를 나타낼 수도 있다. 저자들은 빈랑의 물추출물이 이러한 위양성의 결과를 나타냄을 보고한 바 있다<sup>9)</sup>. 식물체내에서 resveratrol은 방어기작으로써 외부감염이나 쇼크 등에 의한 스트레스에 의해 유도되어지며 곰팡이나 미생물의 감염시 항균성을 나타냄이 보고되었다<sup>10)</sup>. 따라서 resveratrol에 의한 시험균주의 생육저해 유·무를 알아보기 위하여 변이원을 첨가하지 않은 상태에서 resveratrol을 농도별로 첨가하여 생육상태를 시험하

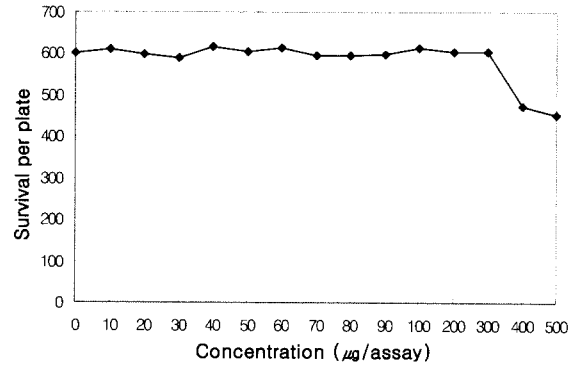


Fig. 3. The effect of resveratrol on the growth of *Salmonella typhimurium* TA98.

였으며, 그 결과는 Fig. 3과 같다. *S. typhimurium* TA98는 resveratrol의 농도가 300 μg/assay까지는 균의 생육에 영향을 미치지 않았으나 400 μg/assay 이상의 농도에서는 균의 생육이 저해되었으며 500 μg/assay 이상의 농도에서는 생육저해 효과가 현저하게 나타났다.

3. 항돌연변이 효과

균 생육에 대한 resveratrol의 한계농도 시험결과로부터 세포독성을 나타내지 않는 300 μg/assay까지의 항돌연변이 효과를 검색한 결과는 Table 2와 같다. Trp P-1으로 유도된 돌연변이원성에 대하여 resveratrol의 농도를 assay당 2, 10, 25, 50, 100, 300 μg으로 증가시켰을 경우 항돌연변이 효과는 각각 13%, 30%, 52%, 65%, 81% 및 89%로 나타났다. Resveratrol의

Table 2. Inhibition effects of resveratrol on the mutagenicity of Trp P-1 with S9 in *Salmonella typhimurium* TA98

Concentration (μg/assay)	Revertants	Inhibition rate(%)
Spontaneous	23±2.0 <sup>1)</sup>	-
Trp P-1 <sup>2)</sup>	1,053±10	-
2	923±20	13.0
10	745±20	30.0
25	520±30	52.0
50	388±10	65.0
100	214± 7	81.0
300	231± 5	89.0

<sup>1)</sup> Mean±S.D of triplicate experimentes.

<sup>2)</sup> The concentration of Trp P-1 was 400 ng/assay.

농도를 증가시킴에 따라 항돌연변이 억제효과도 증가되면서 뚜렷한 용량 의존적 반응을 나타내었으나 100  $\mu\text{g}$  /assay 이상의 농도에서는 억제효과가 현저하게 증가되지는 않았다. Wall 등<sup>11)</sup>은 Ames 시험계에서 유기용매로 추출한 39 families(2,060종)의 고등식물 추출물의 항돌연변이원성 시험한 결과, 90% 이상의 돌연변이원성을 나타낸 시료는 독성 내지 high dose에 의한 영향일 가능성이 높다고 평가하였다. 따라서 resveratrol 자체만으로는 항균활성을 나타내지 않았으나 변이원과 S9 mix가 혼합되어 promutagen이 ultimate mutagen으로 활성화되었을 경우의 항균활성의 검색이 조사되어야 할 것으로 사료된다. 또한 간접변이원인 Trp P-1에 대한 resveratrol의 강한 억제효과가 1차적으로 S9의 효소 활성이 저해를 받는지의 유·무를 확인하여 효소에 관한 영향이 아님이 확인되면, 대사활성화를 받아 생성된 변이원의 활성체를 실험시키는지 또는 promutagen 자체의 활성화를 억제하는지에 관한 연구 수행이 요망된다 할 수 있다.

## 요 약

Trp P-1에 의해 유도된 돌연변이원성에 대한 resveratrol의 억제효과를 *Salmonella typhimurium* TA 98, 100를 이용한 Ames test법으로 검색하였다. 먼저 틀변경 돌연변이를 일으키는 *S. typhimurium* TA98과 염기치환 돌연변이 특성을 지닌 *S. typhimurium* TA 100에서 Trp P-1의 변이원성을 비교한 결과 *S. typhimurium* TA98에서 복귀돌연변이주의 뚜렷하게 수가 증가되었다. 이러한 결과는 Trp P-1의 돌연변이 유발은 틀변경을 주로 일으킨 돌연변이 유도란 사실을 뒷받침하는 결과로 해석되며, *S. typhimurium* TA 98에서 Trp P-1의 최적농도는 400 ng로 나타났다. *S. typhimurium* TA98의 생육에 영향을 미치지 않는 농도까지 resveratrol의 농도를 assay당 2, 10, 25, 50 100, 300  $\mu\text{g}$ 으로 증가시켰을 경우 항돌연변이 효과는 각각 13%, 30%, 52%, 65%, 81% 및 89%로 나타났다. 이러한 결과로부터 Trp P-1의 변이원성에 대하여 resveratrol은 강한 돌연변이 억제효과를 나타내며, 용량 의존적으로 억제함이 확인되었다.

## 참고문헌

1. Hayatsu, H., Arimoto, S. and Negishi, T.: Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis, *Mutation Res.*, 202, 429 (1988).
2. Kata, T., Morita K. and Inoue, T.: Antimutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate, *Mutation Res.*, 53, 351 (1981).
3. Kada, T., Aikawa, M. K. and Kiriya, S. S.: Adsorption of pyrolysate by vegetable fibers, *Mutation Res.*, 141, 149 (1984).
4. Ho, C., Lee, C. Y. and Huang, M.(Eds.): Phenolic compounds in food and their effects on health, I. *Analysis, Occurrence & Chemistry, American Chemical Society*, p.1~7 (1992).
5. Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W. W., Fong, H. H. S., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G., Moon, R. C. and Pezzuto, J. M.: Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes, *Science*, 275, 218 (1997).
6. Ong, T. M., Mukhtar, M., Wolf, C. R. and Zeiger, E.: 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 (1980).
7. Ames, B. N. and Maron, D. M.: Revised methods for the *S. typhimurium* mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173 (1983).
8. Bage, A., Kenyon, C. J. and Walker, C.: Inducibility of gene product required for UV and chemical mutagenesis in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 78, 5749 (1981).
9. Ahn, B. Y., Kim, D. G. and Choi, D. S.: Antimutagenic effect of Tansen(*Salvia miltiorrhiza* Bung), *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 197 (1999).
10. Langcake, P. and Pryce, R. J.: The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection, *Physiol. Planta Pathol.*, 9, 77 (1976).
11. Wall, M. E., Wani, M. C., Hughes, T. J. and Taylor, T.: Plant antimutagenic agents, I. general bioassay and isolation procedures, *J. Nat. Prod.*, 51, 866 (1988).