

## 형질전환동물세포주(Big Blue<sup>®</sup> Transgenic Mouse Cell Line)를 이용한 돌연변이 및 항돌연변이시험

식품의약품안전청 국립독성연구소 유전독성과, <sup>1</sup>부경대학교 식품생명과학과

엄미옥 · 한의식 · 김종원 · 손수정 · 류병규  
변은경 · 최재수<sup>1</sup> · 오혜영

### Antimutagenic and Mutagenic Test in Big Blue<sup>®</sup> Transgenic Mouse Embryonic Cell

Mi Ok Eom, Eui Sik Han, Jong Won Kim, Soo Jung Sohn, Byung Kyu Ryu,  
Eun Kyung Byun, Jai Soo Choi<sup>1</sup> and Hye Young Oh

*Division of Genetic Toxicology, National Institute of Toxicological Research, KFDA,  
5 Nokbun-dong, Eunpyung-ku, Seoul 122-704, Korea*

*<sup>1</sup>Department of Food & Life Science, Pukyong National University,  
Pusan 608-701, Korea*

Transgenic animal cell with a  $\lambda$  shuttle vector containing a *lac I* target gene is useful as a short-term *in vitro* mutagenesis assay. The gene is recovered from the treated cell by exposing mouse genomic DNA to *in vitro* packaging extracts and plating the rescued phage on agar plates containing 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactopyranoside (X-gal). Phage with mutations in the *lac I* gene form blue plaques, whereas phage with a nonmutated *lac I* form colorless plaques. In order to establish this new transgenic technology, we studied the mutagenicity of the direct-acting alkylating agent and indirect mutagen benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P) in the Big Blue<sup>®</sup> transgenic mouse embryonic cell line. MNU or B[*a*]P caused an induction of mutations over negative control, 1% DMSO and we confirmed the reproducibility of the transgenic mutagenicity assay. Also, dose-dependent response has been observed in cells treated with B[*a*]P. When the antimutagenic effect of *Ecklonia stolonifera*, an edible brown algae having a strong antioxidizing activity, on MNU-induced mutation was evaluated, the methanol extract of *Ecklonia stolonifera* showed reduction of mutant frequency in cells treated with MNU.

**Key Words:** Transgenic mouse embryonic cell, *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU), Benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P), *Ecklonia stolonifera*, Mutation assay, Antimutagenicity

## 서 론

인간에게 고통을 주고 있는 질병 중 많은 부분이 돌연변이로 인한 특정 유전자의 손상 및 손상 유전자의 발현과 관련되어 있음이 밝혀져 왔다. 특히 암은 유전자 돌연변이의 결과로 생기는 대표적인 질병으로서, 조기발견이외에는 효과적인 대처수단이 없기 때문에 암을 예방할 수 있는 물질의 개발이 절실하게 요구되고 있다. 많은 발암 요인 중 화학물질에 의한 돌연변이 유발작용이 현대 산업사회에서의 발암성과 관련하여 많은 관심의 대상이 되고 있다. 이러한 화학물질에 의한 돌연변이를 검출하는 대표적인 방법으로는 *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*와 같은 박테리아를 이용한 복귀돌연변이시험,<sup>1)</sup> 포유류 배양세포를 이용한 체외 염색체 이상시험,<sup>2)</sup> 설치류 조혈세포를 이용한 체내 소핵시험<sup>3)</sup> 등이 있으며, 그 외에도 포유류의 배양세포를 이용한 체외 마우스 림포마 tk<sup>+</sup> 유전자 돌연변이 시험, 부정기 DNA 합성시험 등이 이용되고 있다. 그러나 이러한 유전독성시험법은 독성 효과, 특정유전자 산물간의 관련성, 특정유전자의 역할을 명확히 설명해 줄 수 없는 단점을 가지고 있다.

최근의 형질전환동물(세포주)을 사용한 유전독성 평가법은 돌연변이원이나 발암물질의 약동태학, DNA 복구(repair) 및 생체내 변환 같은 생리학적, 생화학적 효과를 연구하는 데 유용하게 사용되는 연구기법이다.<sup>4)</sup> 특히 형질전환동물 시스템은 발암과정에서 대사과정의 역할조사, 조직·기관 특이적인 돌연변이 평가, *in vivo*에서 포유류의 돌연변이 기전연구에 이용된다.<sup>4,5)</sup>

Big Blue 형질전환 마우스 배아 세포주(transgenic mouse embryonic cell line)은 Big Blue<sup>®</sup> 형질전환 마우스의 배아 세포에서 유래된 것으로 유전적인 변화와 분화과정에 의해 불멸화된 것이다. 각 세포는 형질전환 마우스의 유전체에서와 똑같은 위치에 삽입된 Big Blue 람다 파지 셔틀 벡터(lambda phage shuttle vector,  $\lambda$ LIZ) (Fig. 1)를 40 copy 이상 포함한다.<sup>6)</sup> 각 파지는  $\beta$ -galactosidase를 encoding하는 유전자의 전사를 방해하는 락토스 억제인자인 target *lac I* 유전자를 가진다. 돌연변이물질에 의해 *lac I* 유전자에 돌연변이가 생기면 억제인자가 그 기능을 상실하여  $\beta$ -galactosidase가 만들어진다. 형질전환 Big Blue 돌연변이 시험법은 이러한 *lac I* 유전자의 특성에 원리를

두고 있어서 쉽게 돌연변이체를 구별할 수 있다. 즉, genomic DNA를 *in vitro* packaging extract와 함께 배양하면  $\lambda$ LIZ는 마우스 유전체에서 선택적으로 잘려져 나와 파지 입자내로 packaging된다. 이 파지를 SCS-8 *E. coli* 숙주세포와 함께 X-gal 함유 고형배지에서 배양하면 청색 돌연변이 플라크(plaques)과 무색의 돌연변이되지 않은 플라크가 생긴다. 출현한 플라크수들로부터 돌연변이 빈도(mutant frequency, MF)를 정량적으로 결정할 수 있다. 또한 청색 돌연변이 플라크로부터 DNA를 회수하여 염기서열을 분석하면 시험한 화학물질이 어떤 유형의 돌연변이를 얼마만큼의 빈도로 발생시키며, 어떤 위치에서 발생시키는지 알 수 있게 되므로 화학물질에 의한 돌연변이 유발기전, 발암기전, 특정유전자의 생체내에서의 역할 등을 알 수 있다.<sup>5,7)</sup>

한편, 식품을 비롯한 각종 천연물에는 변이원 물질의 활성을 억제하거나 경감시키는 작용이 있음이 최근 많이 발표되고 있는데 예를 들면 마늘, 양배추, 콩, 미나리과 식물, 양파, 차, 글루, 통밀, 현미, 십자화과 식품 등은 암예방 효과를 가진 식물로 알려져 있다. 이들의 항돌연변이 기전은 명확히 밝혀져 있지는 않으나 *in vivo* 및 *in vitro* 시험을 통하여 항돌연변이 효과가 입증되고 있다.<sup>8-12)</sup> 우리 나라에서 식용으로 많이 소비되고 있는 녹조류나 갈조류 같은 해조류가 옛날부터 민간에서 간질, 통풍, 담석증 등에 약용으로 이용되어 왔으며 항암효과가 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 연구는 전래 약용 식물의 효과를 형질전환동물세포주를 사용하여 과학적으로 입증하고 작용기전을 밝혀 암 예방제로 개발함으로써 국민보건에 큰 장애가 되고 있는 암을 예방하는데 기여하고 동시에 천연물 자원을 고부가가치를 낼 수 있는 신물질을 창출하는데 도움이 될 것이다.

본 연구에서 선택한 *Ecklonia stolonifera* (속칭: 곰피)의 예상되는 활성 항암성분은 polysaccharides<sup>11,13,14)</sup>로서 강력한 항산화효과를 나타내어, 이제까지 항산화효과를 나타낸 많은 천연물이 돌연변이유발성을 억제했듯이<sup>15,16)</sup> 항돌연변이효과를 나타낼 것으로 기대되며, 실제로 CHL 세포의 benzo[a]pyrene (B[a]P)에 의한 염색체이상시험에서 염색체이상유발 빈도를 감소시켰다.<sup>17)</sup> 따라서 항돌연변이 효과를 좀 더 명확히 밝히기 위해서 형질전환동물(세포주)을 사용한 유전독성 검색체계를 도입하여 그 시험법을 확립하고, 확립된 시험법으로 곰피의 효과를 검색하고자 하였다.

재료 및 방법

1) 재료

Methylnitrosourea (MNU, Sigma N-4766), Benzo [a]pyrene (B[a]P, Sigma B-1760), MTT (Sigma M-2128)를 사용하였으며, Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)와 Fetal Bovine Serum은 미국의 Gibco BRL에서 구입하였다. Big Blue DNA isolation kit(#720201), Transpack packaging extract (#200223), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal, #700202), Big Blue media (#720300) 및 Assay tray(#3400041), Big Blue transgenic mouse embryonic cell line(#726010), SCS-8 *E. coli* strain(#700288) 등은 Stratagene (La Jolla, CA, USA)에서 구입하였다. 곰피의 메탄올 추출물은 부산 부경대학교 최재수 교수님으로부터 제공받아 사용하였다.

2) 세포주 및 균주 배양

실험에 사용한 Big Blue transgenic mouse embryonic cell line(#726010)은 Big Blue λshuttle (Fig. 1)를 가진 Big Blue transgenic mouse embryonic cell 을 immortalize시킨 cell line으로서 10% fetal calf serum과 50 units/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine이 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하의 incubator에서 배양하였다. 매 3~4일마다 계대배양하였으며, 자연발생적인 돌연변이의 생성을 최소화하고자 구입 후부터 10번 미만으로 계대배양한 세포만을 실험에 사용하였다.

박테리아 균주는 SCS-8 *E. coli* strain(#700288)으로서, LB-tetracyclin agar plate에서 배양하였다. 실험

시에는 하나의 독립된 colony를 취하여 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.2% maltose를 첨가한 NZY 배지(5.0 g NaCl, 2.0 g MgSO<sub>4</sub>, 5.0 g yeast extract, 10.0 g casein peptone)에 접종하여 37°C에서 진탕배양하였다. 배양 후 10 mM MgSO<sub>4</sub>용액으로 600 nm에서의 O.D.값이 0.5가 되도록 희석하여 준비하였다.

3) 대사활성화계

생체의 대사활성화를 위하여 Maron과 Ames의 방법<sup>1)</sup>에 따라 체중 200 g 정도의 Sprague-Dawley 수컷 랫드에 Aroclor 1254를 복강내 투여하여 효소를 유도시킨 간장으로부터 S9 분획을 제조하고 사용시까지 -70°C에 보관하였다.

S9 혼합물은 각 시험개시 직전에 조제하여 사용하였고, 그 조성은 다음과 같다.

4) 세포독성시험

세포의 생존율을 측정하기 위하여 Mitochondrial dehydrogenase의 활성지수를 나타내는 MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5, -diphenyltetrazolium bromide] 비색환원분석법을 수행하였다. Mossman<sup>18)</sup>의 방법을 변형하여 96 well plate에 각 well (n=4)당

	용량	최종농도
Distilled water	2.35 ml	
0.1 M Phosphate buffer (pH 7.4)	0.20 ml	4 mM
0.1 M NADP	0.20 ml	4 mM
0.1 M Glucose-6-phosphate	0.25 ml	5 mM
330 mM MgCl <sub>2</sub> /50 mM KCl salt solution	0.50 ml	33/5 mM
S9	1.50 ml	30%
	5.00 ml	

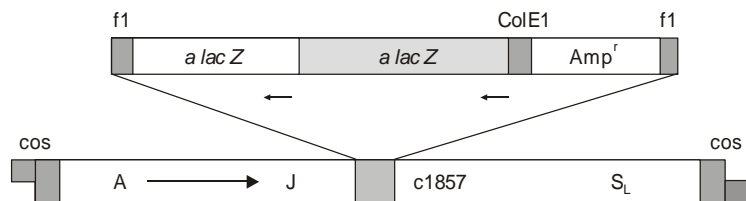


Fig. 1. Big Blue<sup>®</sup> λLIZ phage shuttle vector.

5,000개의 세포를 24시간동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하의 incubator에서 배양한 후 시험물질을 2시간 처리하였다. 처리시간이 지나면 세포를 PBS로 충분히 씻어주고 배지를 교환한 후 각 well당 10 µl의 MTT 용액(5 mg/ml)을 첨가한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 4시간 동안 배양하였다. 상층액을 제거하고 dimethyl-sulfoxide (DMSO) 150 µl를 넣은 다음 10분간 잘 혼합하여 침전물을 용해시킨 후 microplate reader (E-max, Molecular Device, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 시험결과는 세포를 배양하지 않은 well에서 측정된 흡광도에 대하여 보정하였으며, 흡광도는 시험물질이 처리되지 않은 대조군과 비교하여 생존율로 변환하였다.

### 5) 실험방법

(1) 시험물질의 조제 및 처리: 양성대조물질인 MNU와 B[a]P, 곰피의 메탄올 초추출물은 모두 DMSO를 용매로하여 시험용액으로 하였다. 시험법을 확립하기 위한 대조물질 MNU는 현재까지 돌연변이 빈도가 보고된 100 µg/ml의 단일농도로 세포가 30~40% 성장을 나타낼 때 30분간 처리하였다. 음성대조군으로는 용매로 사용된 1% DMSO를 사용하였다. 처리시간 30분이 지나면 PBS로 충분히 씻어주고 세포가 성장하도록 될

때까지 배양하였다.

(2) Genomic DNA 분리: 배양한 세포를 PBS로 씻은 후 scraper를 이용하여 모은 후 원심분리하였다. Genomic DNA 분리는 Big Blue DNA isolation kit를 이용하여 proteinase K 처리한 다음 phenol/chloroform 추출, ethanol 침전을 차례로 진행하여 수행하였다. 분리된 DNA는 분자량이 상당히 큰 상태이므로 균일한 상태를 만들고자 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) 하에서 최소한 12시간 이상 상온에서 보관한 후 다음 실험에 사용하였다.

(3) *In vitro* packaging & plating: 분리한 DNA를 정량한 후 0.5 mg/ml의 DNA를 Transpack packaging extract와 함께 30°C에서 배양하여 셔틀 벡터를 회수하고 다시 λhead로 package되도록 하였다.

Packaging으로 인해 형성된 감염성 파지 스톡을 SCS-8 *E. coli* 숙주 박테리아 세포와 37°C에서 20분간 혼합하여 감염되도록 하고 발색기질 X-gal이 포함된 top agar를 세포-파지와 혼합하여 bottom agar (25×25 cm<sup>2</sup> assay tray, Stratagene사) plate에 부었다. Top agar는 사용할 때 50°C로 유지시켰다. Top agar가 굳어지면 37°C에서 16시간 동안 배양시켰다. Assay tray인 25×25 cm<sup>2</sup> plate에는 15,000개 이상의 플라크가 생기지 않도록 미리 적정한 후 실험하였다. 배

Table 1. Mutant frequency of MNU

Group	Number of total plaques	Number of mutant plaques	Mutant frequency ×10 <sup>-4</sup>	Mean mutant ×10 <sup>-4</sup> ±SD
Control*	10370	1	0.96	0.55±0.39 (0.4~0.7)
	20740	2	0.96	
	36408	1	0.28	
	70560	3	0.43	
	14000	0	0.00	
	30480	2	0.66	
MNU 100 µg/ml	11070	5	4.52	4.26±1.51 (4~9)
	22140	14	6.32	
	69700	26	3.73	
	41810	12	2.87	
	53110	17	3.20	
	27600	8	2.90	
	41400	26	6.28	

\*1% DMSO

MNU=methyl nitrosourea

양이 끝나면 출현한 청색 플라크의 수를 세어 전체 플라크 수에 대한 비율로서 돌연변이 빈도를 결정하였다. 계산에 사용된 식은 다음과 같다.

$$MF = \frac{\text{blue plaque의 수(mutant)}}{\text{수+blue plaque 수}}$$

결 과

1) 형질전환동물세포주를 이용한 돌연변이 시험법

Big Blue 세포주에서의 돌연변이 유발능이 보고<sup>7,19,20,26)</sup>된 화학물질 중 MNU를 양성대조물질로 선택하여 실시하였다. 처리농도는 보고된 100 µg/ml MNU를 처리하였고, 음성대조물질로는 용매로 사용한 1% DMSO를 처리하였다. 독립된 수 회의 실험결과 평균 MF는  $4.26 \pm 1.51 \times 10^{-4}$ 로서 음성대조군의  $0.55 \pm 0.39 \times 10^{-4}$ 와 비교하여 7.7배 높은 값을 나타내었다 (Table 1). 시험에 이용한 Big Blue<sup>®</sup> 형질전환 마우스 배아 세포의 자발적인 MF는  $0.93 \times 10^{-4}$ 으로 알려져 있다. 또 Big Blue<sup>®</sup> 랫드 세포에서 보고<sup>7,19,20)</sup>된 MNU의

MF값은  $0.4-0.7 \times 10^{-4}$ 과 비교해 볼 때 시험법의 타당성 및 재현성을 확인하였으며, 형질전환동물세포주를 이용한 돌연변이빈도 시험법을 확립하였다.

2) 세포독성시험

Big Blue<sup>®</sup> 형질전환 마우스 배아 세포에 대해 시험물질인 곰피의 메탄올 추출물과 B[a]P의 처리농도를 결정하기 위하여 먼저 MTT assay를 수행하였다. 곰피의 메탄올추출물은 용매로 DMSO를 선택하였으며, 최고용해 농도는 42.66 mg/ml였으며, 최고용해농도로 세포배양배지에 처리하였을 경우 외에는 세포독성이 없는 것으로 관찰되었다(Fig. 2). 따라서 곰피의 메탄올 추출물의 처리농도는 염색체 이상시험<sup>17)</sup>에서 효과를 나타낸 농도를 참조하여 세포독성이 없는 25.6, 51.2, 100.3 µg/ml의 세 농도로 처리하였다.

대사활성화계에서 양성대조물질로 선정한 B[a]P에 대한 세포독성시험결과(Fig. 3) 60 µg/ml의 농도를 처리하였을 때 83%의 세포생존율을 보였고, 그 이상의 처리농도에서는 독성을 나타내었기 때문에 본 시험에서는 20, 40, 60 µg/ml를 처리농도로 시험하였다.

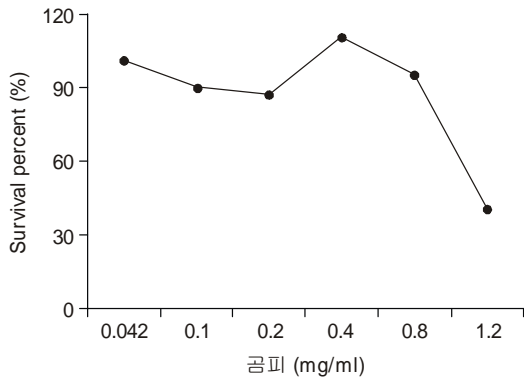


Fig. 2. Cytotoxicity of *Ecklonia stolonifera* in Big Blue<sup>®</sup> transgenic mouse embryonic cell.

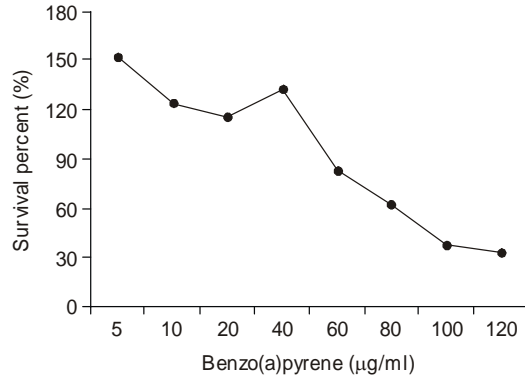


Fig. 3. Cytotoxicity of benzo[a]pyrene in Big Blue<sup>®</sup> transgenic mouse embryonic cell.

Table 2. Mutant Frequency of Benzo[a]pyrene

Group	Control*	B[a]P		MNU	
		20 µg/ml	40 µg/ml	60 µg/ml	100 µg/ml
Mean mutant frequency $\times 10^{-4} \pm SD$	$0.55 \pm 0.39$	$9.1 \pm 3.78$	$14.3 \pm 4.86$	$20.0 \pm 4.14$	$4.26 \pm 1.51$

\*1% DMSO

**Table 3.** Effect of *Ecklonia stolonifera* on MNU-induced mutation (Mean mutant frequency $\times 10^{-4} \pm SD$ )

Group	곰피( $\mu\text{g/ml}$ )			
	0	25.6	51.2	100.3
Control*	0.55 $\pm$ 0.39	1.39 $\pm$ 0.95	0.93 $\pm$ 0.44	-
MNU100 $\mu\text{g/ml}$	4.26 $\pm$ 1.51	1.42 $\pm$ 0.40	0.90 $\pm$ 0.42	1.09 $\pm$ 0.77

\*1% DMSO

### 3) B[a]P에 의한 MF

B[a]P은 외인성 대사활성화계 S9 혼합물과 함께 세포에 2시간 동안 처리하고나서 성장된 세포로부터 genomic DNA를 분리하였다. 분리한 DNA를 Transpack packaging extract로 packaging시키고 감염성 파지 입자를 만든다. B[a]P에 의한 *lac* 에 발생한 돌연변이는 SCS-8 *E. coli* 숙주 박테리아 세포에 감염시켜 X-gal이 함유되어 있는 고형배지에 플레이팅(plating)하여 검출하였다. 음성대조군은 용매로 사용된 1% DMSO로 하였다.

B[a]P 20, 40, 60  $\mu\text{g/ml}$ 에 대한 MF는 각각  $9.1 \pm 4.14 \times 10^{-4}$ ,  $14.3 \pm 4.86 \times 10^{-4}$ ,  $20.5 \pm 3.78 \times 10^{-4}$ 로 나타났다(Table 2). 음성대조군의 MF와 비교해볼 때 B[a]P의 처리농도가 증가함에 따라 각각 16, 26, 36배 증가하는 농도 의존적인 경향을 나타내었다.

### 4) MNU의 처리에 대한 곰피의 효과

MNU와 곰피의 메탄올 추출물을 병용 처리한 결과를 Table 3에 나타내었다. 곰피의 메탄올 추출물의 MF는 음성대조군의 MF와 유사하였으며, 100  $\mu\text{g/ml}$  MNU와 곰피의 메탄올 추출물 25.6, 51.2, 100.3  $\mu\text{g/ml}$ 을 병용처리한 후의 MF는 각각  $1.42 \pm 0.40 \times 10^{-4}$ ,  $0.90 \pm 0.42 \times 10^{-4}$ ,  $1.09 \pm 0.77 \times 10^{-4}$ 로서 나타났다. 곰피의 병용투여결과 MNU에 의한 MF가 67 ~ 79% 감소하여 농도의존적인 경향을 보이지는 않지만 항돌연변이 효과를 관찰하였다.

## 고 찰

유전독성평가는 화학물질의 잠재적 발암성을 규명하고 어떠한 화학물질이 유전자 손상을 유발시키는지

평가하기 위해 필수적으로 수행되어야 한다.<sup>21)</sup> 따라서 화학물질의 생체내 영향을 유전자 수준에서 평가하는 것은 여러 가지 면에서 필수불가결하다. 대부분의 발암물질이 돌연변이 유발 물질<sup>22-24)</sup>이라는 것이 일반적인 사실로 받아들여지고 있고, 돌연변이원으로는 환경, 식품, 약물 등의 여러 경로에 의한 화학물질이 주종을 이루고 있으므로<sup>25)</sup> 발암기전 연구에 있어서 돌연변이원에 대한 연구가 필수적이다.

형질전환 동물/세포주 모델은 자신의 유전체에 외부 유전자를 삽입하여 생체내에서의 돌연변이를 검출할 수 있도록 만들어졌으며, 표적 유전자로 사용되는 *lac I*, *lac Z* 유전자는 돌연변이가 일어났을 때 표현형 반응을 할 수 있기 때문에 색상 검색이 가능하여 쉽게 돌연변이를 측정할 수 있어서 매우 유용하다.<sup>27-29)</sup> Big Blue<sup>®</sup> 모델은 *lac I* 유전자를 표적으로 하고있어 비교적 크기가 작아 쉽게 추출하여 sequencing될 수 있고 많은 돌연변이 생체지표에 매우 민감하다.<sup>30,31)</sup>

따라서 본 연구에서는 기존의 유전독성시험에 비해 다양한 장점을 가지는 형질전환세포주를 이용한 화학물질의 돌연변이 검출시험법을 확립하고자 MNU를 돌연변이 유발물질로 선택하여 시험하였다. Big Blue<sup>®</sup> 형질전환 동물 시험법을 적용한 연구에서 경구투여 후 위장관에 대한 발암효과를 보인 MNU<sup>32)</sup>는 모든 조직으로 신속히 확산되어 guanine의 O<sup>6</sup> 위치에 직접적으로 작용하여 메틸화시키며, 변이원성인 O<sup>6</sup>-methyl-guanine 부가체를 생성한다.<sup>33)</sup> MNU를 Big Blue<sup>®</sup> 형질전환 마우스 배아 세포에 처리하였을 때 음성대조용매의 7.7배에 해당하는 MF를 보여 돌연변이를 유발함을 확인하였고, 이로써 새로운 유전독성검색체계를 확립하였다. 또한 확립한 시험법의 유용성을 높이기 위하여 Ames test를 비롯한 많은 대사활성화계의 유전독성시험에서 변이원성물질로 알려졌는 B[a]P을 이

용하여 생체외 대사활성화계에서의 형질전환 돌연변이 시험법을 실시하였다. B[a]P 20, 40, 60 µg/ml에 대한 MF는  $9.1 \pm 4.14 \times 10^{-4}$ ,  $14.3 \pm 4.86 \times 10^{-4}$ ,  $20.5 \pm 3.78 \times 10^{-4}$ 로서 농도 의존적 돌연변이 유발성을 관찰하였다.

우리 나라에서는 전통적으로 해조류를 식용으로 이용되어져왔으며, 민간에서 간질, 통풍, 담석증등에 약용으로 사용되기도 하였다. 그러나 식용 해조류의 항돌연변이 효과는 거의 연구되지 않았다. 최근 많은 항돌연변이 연구들이 보고되고 있으며, 특히 우리나라의 남, 동해안에 서식하는 갈조류인 *Ecklonia stolonifera* (속칭: 곰피)의 메탄올 추출물이 강력한 항산화효과,<sup>16)</sup> nitrite 제거효과,<sup>15)</sup> B[a]P에 의한 염색체 이상 억제효과,<sup>17)</sup> aflatoxin B1에 의한 돌연변이 억제효과,<sup>34)</sup> B[a]P과 MNU에 의한 소핵유발 억제 및 DNA 손상(Comet assay) 억제효과<sup>34)</sup> 등이 보고되었다. 따라서 곰피의 메탄올 추출물에 대한 항돌연변이 효과를 좀 더 명확히 밝히기 위해서 형질전환동물세포를 이용한 *in vitro* 유전독성 검색체계를 도입하여 그 시험법을 확립하였고, 확립된 시험법으로 곰피의 효과를 검색하고자 하였다.

본 연구에서 100 µg/ml MNU와 곰피의 메탄올 추출물 25.6, 51.2, 100.3 µg/ml을 병용처리한 후의 MF는 각각  $1.42 \pm 0.40 \times 10^{-4}$ ,  $0.90 \pm 0.42 \times 10^{-4}$ ,  $1.09 \pm 0.77 \times 10^{-4}$ 로서 나타났다. 곰피의 병용투여결과 MNU에 의한 MF가 67 ~ 79% 감소하여 농도 의존적인 경향을 보이지는 않지만 항돌연변이 효과를 관찰하였다. 지금까지 곰피의 항돌연변이 효과는 B[a]P에 대한 효과만이 언급되었지만<sup>17,34)</sup> 본 시험에서는 *in vitro* 시험계에서 DNA에 직접 작용하는 화학물질인 MNU에 대해서도 강력한 항돌연변이 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 시험계에 의한 차이라기보다는 화학물질 특성에 기인하는 것으로 사료된다. MNU 처리로 생긴 돌연변이체의 돌연변이 스펙트럼은 91%가 G : C ↔ A : T transition이었고<sup>19)</sup> B[a]P 또한 lac I 유전자의 CpG 서열에 특이적(81%)으로 돌연변이를 유발<sup>31,35)</sup>하므로 곰피의 메탄올 추출물은 DNA 서열의 GC 부위의 돌연변이에 특이적으로 효과를 발휘하는 것으로 추측된다. 그러므로 lac I transgene을 이용한 B[a]P에 의한 돌연변이도 곰피의 추출물에 의해 저해될 것으로 생각된다. 기대되는 곰피의 항돌연변이 효과를 이용한 암 예방제 개발의 기초 자료로 활용하기 위해서는 돌연변이

된 염기서열을 분석하여 변이의 종류와 특성을 확인하는 등 그 작용기전을 밝히는 추가 연구가 필요하리라고 사료된다.

## 결 론

본 연구에서는 형질전환 세포주를 이용한 돌연변이 시험법을 확립하며, 본 시험법을 이용한 곰피의 항돌연변이 효과를 연구하고자 하였다. 형질전환동물로부터 제조된 세포주를 이용하여 유전자 돌연변이를 검출할 수 있는 최신유전독성 시험법을 확립하였으며, 음성대조물질인 1% DMSO, 양성대조물질인 MNU (100 µg/ml)에 대한 MF는 각각  $0.55 \pm 0.39 \times 10^{-4}$ ,  $4.26 \pm 1.51 \times 10^{-4}$ 였으며, 대사활성화계에서의 양성대조물질인 B(a)P 20, 40, 60 µg/ml에 대한 MF는  $9.1 \pm 4.14 \times 10^{-4}$ ,  $14.3 \pm 4.86 \times 10^{-4}$ ,  $20.5 \pm 3.78 \times 10^{-4}$ 로서 농도 의존성을 보였다. 또한 MNU (100 µg/ml)에 병용투여된 곰피의 메탄올추출물은 MNU에 의한 MF를 유의하게 억제함을 알 수 있었다. 이상의 연구 결과를 통하여 본 실험에서 사용한 형질전환 세포주 돌연변이 시험법에서 곰피는 MNU에 의한 돌연변이 빈도를 유의하게 억제시켰으며, 돌연변이된 염기서열을 분석하여 변이의 종류와 특성을 확인하는 등 그 작용기전을 밝히는 추가 연구가 필요하리라고 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 식품의약품안전청 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고 문헌

- 1) Maron DM, Ames BN. Revised methods for the salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* 1983; 113: 173- 215.
- 2) Ishidate M Jr., Sofuni T, Yoshikawa K. Chromosomal aberration tests *in vitro* as a primary screening tool for environmental mutagens and/or carcinogens. *Gann Monograph on Cancer Res* 1981; 27: 95-108.
- 3) Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res* 1975; 31: 9-15.
- 4) Shane B, Lockhart A, Winston G, Tindall K. Mutant frequency of lac I in transgenic mice following benzo [a]pyrene treatment and partial hepatectomy. *Mutat*

- Res* 1997; 377: 1-11.
- 5) Gorelick MJ. Overview of mutation assays in transgenic mice for routine testing. *Environ Mol Mutagen* 1995; 25: 218-230.
  - 6) Stratagene, Big Blue<sup>®</sup> transgenic mouse assay system: Instruction manual, La Jolla California, 1997.
  - 7) Wyborski DL, Malkhosyan S, Moores JC, Perucho M, Short JM. Development of a rat cell line containing stably integrated copies of a lambda/*lac I* shuttle vector. *Mutat Res* 1995; 334: 161-165.
  - 8) Cho KJ, Lee YS, Ryu BH. Antitumor effect and immunology activity of seaweed toward Sarcoma 180. *Bull Korean Fish Soc* 1990; 23: 345-361.
  - 9) Hah JC, Choe ES, Rhew TH, Young HS, Park KY. Antitumor effects of selected medicinal plant components to implanted Sarcoma 180 in the mouse. *J Korean Cancer Association* 1991; 23: 197-204.
  - 10) Hiroyuki N, Hideomi A, Koichi A, Shinziro H, Kazutosi N. Studies on the antitumor activity of marine algae. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1989; 55: 1259-1263.
  - 11) Hiroyuki N, Hideomi A, Koichi A, Shinziro H, Kazutosi N. Antitumor activity of polysaccharides and lipids from marine algae. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1989; 55: 1265-1269.
  - 12) Yamamoto I, Nagumo T, Yagi K, Tominaga H, Aoki M. Antitumor effect of extracts from Sargassum and Laminaria. *Japan J Exp Med* 1974; 44: 543-548.
  - 13) Michio F, Noriko I, Yamamoto I, Nagumo T. Purification and chemical and physical characterization of an antitumor polysaccharide from the brown seaweed Sargassum fulvellum. *Carbohydrate Research* 1984; 125: 97-102.
  - 14) Terukazu N, Niriko I, Michio F, Junko H, Kanki K, Iwao U. Polysaccharides from the brown seaweed Sargassum fulvellum and their heterogeneity and antitumor activity. *Kitasato Arch Exp Med* 1988; 61: 59-63.
  - 15) Choi JS, Lee JH, Kim HG, Young HS, Moon SI. Screening of antioxidant activity of plants and marine algae and its active principles from *Prunus davidiana*. *Kor J Pharmacogn* 1993; 24: 299-303.
  - 16) Lee JH, Park JC, Choi JS. The antioxidant activity of *Ecklonia stolonifera*. *Arch Pharm Res* 1996; 19: 223-227.
  - 17) Lee JH, Oh HY, Choi JS. Preventive Effect of *Ecklonia stolonifera* on the Frequency of Benzo[*a*]pyrene- Induced Chromosomal Aberrations. *J Food Sci Nutr* 1996; 1: 64-68.
  - 18) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival - Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Method* 1983; 65: 55-63.
  - 19) Provost GS, Kretz P, Hamner R, Matthews C, Rogers B, Lundberg K, Dycaico M, Short J. Transgenic systems for *in vivo* mutation analysis. *Mutat Res* 1993; 288: 133-149.
  - 20) Suri A, deBoer J, Kusser W, Glickman B. A 3 milliTesla 60 Hz magnetic field is neither mutagenic nor Co-Mutagenic in the presence of menadione and MNU in a transgenic rat cell line. *Mutat Res* 1996; 372: 23-31.
  - 21) Recio L. Transgenic animal models and their application in mechanistically based toxicology research. *CIIT Activities* 1995; 15: 1-10.
  - 22) Koch WH, Henrikson EN, Cebula TA. *Salmonella typhimurium* strain TA100 differentiates several classes of carcinogens and mutagens by base substitution specificity. *Carcinogenesis* 1994; 15: 79-88.
  - 23) Lawley PD. Mutagens as carcinogens - development of current concepts. *Mutat Res* 1989; 213: 3-25.
  - 24) McCann JS, Kobori NE, Ames BN. Detection of carcinogens as mutagens - bacterial tester strains with R-factor plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 979-983.
  - 25) Ryu JC, Youn JY, Cho KH, Chang IM. Transgenic mutagenesis assay to elucidate the mechanism of mutation at gene level. *Environmental Mutagens & Carcinogens* 1998; 18: 15-21.
  - 26) Manjnatha MG, Chen JB, Shaddock JG Jr., Harris AJ, Shelton SD, Casciano DA. Molecular analysis of *lac I* mutations in Rat 2 cells exposed to 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene - evidence for DNA sequence and DNA strand biases for mutation. *Mutat Res* 1996; 372: 53-64.
  - 27) Heddle JA, Tao KS. The transmission rate of the *lac I* transgene from the Big Blue<sup>™</sup> mouse. *Mutat Res* 1995; 348: 63-66.
  - 28) Lundberg KS, Provost GS, Kretz PI, Short JM. The use of selection in recovery of transgenic targets for mutation analysis. *Mutat Res* 1993; 301: 99-105.
  - 29) Summers WC, Glazer PM, Malkevich D. Lambda phage shuttle vector for analysis of mutations in mammalian cells in cultures and in transgenic mice. *Mutat Res* 1989; 220: 263-268.
  - 30) Schaaper RM, Bryan ND, Glickman BW. Mechanisms of spontaneous mutagenesis - An analysis of the spectra of spontaneous mutation in the *Escherichia coli lac I* gene. *J Mol Biol* 1986; 189: 273-284.



- 31) Kochler SW, Provost GS, Fieck A, Kretz PL, Bullock WO, Sorge JA, Putman DL, Short JM. Spectra of spontaneous and mutagen-induced mutations in the *lac I* gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7958-7962.
- 32) VanDuuren BL, Goldschmidt BM, Katz C, Seidman AI, Paul JS. Carcinogenic activity of alkylating agents. *J Natl Cancer Inst* 1974; 53: 695-700.
- 33) Horsfall MJ, Gordom AJE, Burns PA, Zielenska M, van der Vliet GME, Glickman BW. Mutational specificity of alkylating agents and the influence of DNA repair. *Environ Mol Mutagen* 1990; 15: 107-122.
- 34) Lee JH, Kim ND, Choi JS, Kim YJ, Heo MY, Lim SY, Park KY. Inhibitory effects of the methanolic extract of an edible brown alga, *Ecklonia stolonifera* and its component, phloroglucinol on aflatoxin B<sub>1</sub> mutagenicity *in vitro* (Ames test) and on benzo[*a*]pyrene or *N*-methyl-*N*-nitrosourea clastogenicity *in vivo* (mouse micronucleus test). *Natural Product Sciences* 1998; 4: 105-114.
- 35) Skopek TR, Kort KL, Marino DR, Mittal LV, Umbenhauer DR, Laws GM, Adams SP. Mutagenic response of the endogenous *hprt* gene and *lac I* transgene in benzo[*a*]pyrene-treated Big Blue B6C3F<sub>1</sub> mice. *Environ Mol Mutagen* 1996; 28: 376-384.