

Ellagic Acid의 생체외 염색체이상 및 생체외·내 소핵시험에서의 염색체 손상 억제 효과

식품의약품안전청 국립독성연구소 유전독성과, ¹한양대학교 의과대학 미생물학교실
및 의과학연구소

오혜영 · 김종원 · 박장환¹ · 한의식 · 손수정
강일현 · 김인숙 · 하광원

Anti-clastogenicity Study of Ellagic Acid - *In Vitro* Chromosome Aberration and Micronucleus Assay in Chinese Hamster Lung Fibroblast Cells and *In Vivo* Micronucleus Assay in Bone Marrow Cells of ddY Mice

Hye Young Oh, Jong Won Kim, Chang Hwan Park¹, Eui Sik Han,
Soo Jung Sohn, Il Hyun Kang, In Sook Kim and Kwang Won Ha

*Genetic Toxicology Division, National Institute of Toxicological Research,
Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea,*

¹*Department of Microbiology, Hanyang University College of Medicine,
Seoul 133-791, Korea*

Dietary anticarcinogens/mutagens have been demonstrated to significantly reduce the incidence of cancers in animals and humans. The ellagic acid (EA) is a naturally occurring plant phenol which has been shown to reduce the carcinogenicity and mutagenicity of a variety of carcinogens, including *N*-nitrosomethylurea, benzo[*a*]pyrene, aflatoxin B₁. The chromosome aberration assay using cultured mammalian cells is one of the most sensitive methods to predict environmental mutagens and/or carcinogens, and is a complementary test to the *Salmonella*/microsome assay (Ames test), and the *in vitro* micronucleus assay is a mutagenicity test system for the detection of chemicals which induce the formation of small membrane bound DNA fragment i.e. micronuclei in the cytoplasm of interphase cells. The *in vivo* micronucleus assay, which examines metaphase chromosomes from the bone marrow cells of rodents exposed to a test chemical just before sacrifice, is a powerful tool and cytogenetic assay. This assay may be used to detect damage to actively dividing cells not only from experimental test substances, but also from their metabolites as they are formed within the test animal. In this study, EA was treated in chinese hamster lung fibroblast (CHL) cells using *in vitro* chromosome aberration assay, *in vitro* micronucleus assay, and in ddY mice using *in vivo* micronucleus assay for their inhibitory effects against mitomycin C (MMC)-induced genotoxicity. The frequencies of chromosome aberrations and micronuclei were found to be decreased following EA treatment. On the basis of our results, we found that the EA had inhibitory effects on MMC-induced genotoxicity and we concluded that these test systems are useful and sensitive for screening of antimutagens.

Key Words: Ellagic acid, Anti-clastogen, Anti-mutagen, Chromosome aberration assay, *In Vitro* micronucleus assay, *In vivo* micronucleus assay

서 론

암은 치료보다 예방이 더욱 효과적인 암을 정복하는 대안으로 대두되고 있다.^{1,2)} 현재까지 IARC (International Agency for Research on Cancer, 국제 종양연구소)에서 발표한 사람 발암물질의 대부분은 돌연변이 유발물질이며, 돌연변이 유발물질의 대부분이 발암물질로 알려져 있다. 또한 특정 발암유전자 및 발암억제유전자에서 발생한 돌연변이가 악성종양의 원인이라는 많은 연구결과들은 발암화와 돌연변이간의 상호 연관성을 뒷받침해주고 있다. 돌연변이 유발기작과 그 억제 기전을 규명하는 것은 암을 정복하는데 중요한 실마리를 제공해 줄 것으로 생각된다.³⁾ 식이성 항발암물질 및 항돌연변이물질은 동물과 사람에서 암 발생을 유의하게 억제시키는 것으로 알려져 있다.^{1,2)}

포유류 배양세포를 이용한 염색체이상 시험은 중기 염색체의 구조적 이상과 수적 이상을 검색할 수 있는 시험법으로서, 염색체 중기 형성을 못하게 하는 물질의 경우 염색체 손상성을 정확하게 반영하지 못하는 단점을 지니고 있으며, 수적 이상 중 배수성의 검색은 가능하나 시험법 자체적인 한계 때문에 이수성을 검출하지 못하는 단점을 내포하고 있다.⁴⁾ 생체외 소핵시험은 염색체 구조적 이상과 수적 이상 등의 염색체 및 유전체 수준에서 손상정도를 검색할 수 있는 간단하면서도 경제적인 시험법이며, 배양되어지는 모든 세포에 적용할 수 있는 장점을 가지고 있다. 또한 기존의 염색체이상 시험법으로는 검색이 안되는 염색체의 수적 이상인 이수성을 제대로 밝혀낼 수 있는 장점을 가지고 있다.⁵⁻⁹⁾ 생체외 소핵시험에서는 염색체 구조이상 및 non-disjunction과 같은 이수성을 포함하는 수적 이상을 검출할 수 있기 때문에 같은 세포에서의 다른 endpoints인 염색체이상과 소핵유발성을 가진 염색체 이상시험과 소핵시험을 비교, 검색하였다. 마우스 골수세포를 이용한 골수소핵시험은 생체내 대사능력을 가지고 있기 때문에 전구 돌연변이물질/발암물질의 대사체가 돌연변이능력이 있는지를 검색할 수 있는 장점을 가지고 있다.

Mitomycin C (MMC)는 이가 알킬화제로서 oxygen free radical을 생성하며, DNA adduct를 형성하며, cross linking agent로서 DNA 절단 효과, 유전자돌연변이, 염색체구조이상, 자매염색분체교환, 소핵형성,

유전적 전좌(mouse heritable translocation) 유발, 우성 치사(dominant lethal) 유발 등의 돌연변이를 유발하는 것으로 알려져 있어 돌연변이물질로 선정하였다.¹⁰⁾

Ellagic acid (EA)는 딸기, 호두 등의 자연에 존재하는 식물성 페놀화합물로서, 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험(일명, 에임즈 테스트)에서 *N*-nitrosomethylurea, benzo[*a*]pyrene, aflatoxin B₁ 등 여러 발암물질에 대한 돌연변이 억제효과가 있음이 보고되었으나,¹¹⁻¹⁷⁾ 염색체 손상성에 대한 연구는 미미한 형편이다.

본 연구에서는 생체외 소핵시험, 염색체이상시험과 마우스를 이용한 골수소핵시험을 통하여 EA의 MMC에 의해 유도되는 염색체 손상에 미치는 효과를 연구하였다.

재료 및 방법

1) 실험재료

Ellagic acid (EA), mitomycin C (MMC), dimethyl sulfoxide (DMSO), 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, USA)에서, Eagle's minimal essential medium (EMEM), fetal Bovine Serum (FBS), phosphate buffered saline (PBS, Ca²⁺, Mg²⁺ free)은 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였고 그 밖의 시약은 특급 시약을 사용하였다.

2) 세포주 및 세포배양

포유동물 세포는 Chinese hamster lung fibroblast (CHL)로서 일본 의약품식품위생연구소의 Sofuni 박사로부터 분양받아 사용하였다. Modal chromosome number는 25이며, 세포주기는 15시간이다.^{18,19)} 배양액은 10% fetal bovine serum (FBS)와 1%의 penicillin-streptomycin을 포함한 Eagle's minimal essential medium (EMEM)을 사용하였다. 배양된 세포는 2~3일 마다 0.25% trypsin-EDTA용액을 이용하여 계대 유지하였다. 포화 습도하에서 5% CO₂를 공급하는 37°C의 dual CO₂ incubator (Shel-lab 1845 TC, USA)에서 배양하였다.

3) 시험물질의 조제 및 처리

생체의 시험에서는 EA는 시험직전에 DMSO를 용매로 하여 조제하였으며, 용매대조물질로 시험물질의 조제에 사용한 옥수수유를 사용하였다. 생체내 골수소핵 시험에서는 EA는 투여직전에 옥수수유에 녹여 사용하였으며, 용매대조물질로는 시험물질의 조제에 사용한 옥수수유를 사용하였고, 시험물질과 용매대조물질은 10 ml/kg의 용량으로 경구투여하였다. 양성대조물질은 MMC를 주사용 생리식염수에 용해시켜 2mg/kg/10ml의 용량으로 복강투여하였다.

4) 농도설정을 위한 세포독성시험

Mitochondrial dehydrogenase의 활성지수를 나타내는 MTT 비색환원분석법을 수행하였다. Mossman²⁰⁾의 방법을 변형하여 96 well plate에 각 well (n=4)당 50,000개의 세포를 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양한 후 시험조건과 동일하게 처리하였다. 각 well당 10 µl의 MTT 용액(5 mg/ml)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 4시간 동안 노출시켰다. 상층액을 제거하고 DMSO 150 µl를 넣은 다음 10분간 잘 혼합하여 침전물을 용해시킨 후 microplate reader (E-max, Molecular Device, USA)를 사용하여 540 및 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 시험결과는 세포를 배양하지 않은 well에서 측정된 흡광도에 대하여 보정하였으며, 흡광도는 시험물질이 처리되지 않은 대조군과 비교하여 생존율로 변환하였다. 또한 hemocytometer를 이용한 trypan blue exclusion assay도 수행하였다.

5) 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

EA를 DMSO에 녹인 후 세포배양 배지에 10%되게 첨가하여 세포독성시험을 실시하였다. 세포 계대시에 1회용 24 well plate에 1 well당 1×10⁴개의 세포를 파종하여 2일간 배양한 후, 최고투여용량인 배지의 1 mM의 농도로부터, 공비 2로 5단계의 농도를 설정하였다. 37°C 24시간 배양한 후 Dulbecco's phosphate buffered saline 0.5 ml로 2회 세척하고 methanol로 10분간 고정하여 5% Giemsa (in phosphate buffer, pH 6.8)로 30분간 염색한 후 현미경으로 관찰하여 50% 세포독성을 보이는 농도를 구하였다.

예비독성시험에서 결정된 50% 세포독성 농도를 최

고 농도로 하고, 공비 2로 3단계의 농도를 대사활성 부재 및 존재하에서 24시간과 48시간 시험농도로 하였다. 또한, 용매대조군으로 DMSO 처리군과 기지의 양성대조군을 각각 처리하여 시험하였다. 대사활성 부재하의 시험은 CHL 세포를 직경 60 mm의 petri dish에 1×10⁵/ml되도록 파종하여 1일간 배양한 후, 각각 시험물질과 양성대조물질 등을 함유하는 배양액으로 교환하여 22시간 배양하였다. 각 petri dish에 colcemid를 0.2 µg/ml 되도록 처리한 후 2시간 더 배양하여 총 검체 처리시간이 24시간이 되도록 하였다. 0.25% trypsin- EDTA로 세포를 모은 후 37°C의 저장액(0.075 M KCl) 4 ml에 현탁 시킨 다음 37°C 수조에 20분간 방치하였다. 고정액(methanol : acetic acid = 3 : 1)으로 3회 고정시킨 후 50% 질산 처리하여 냉장 보관된 슬라이드에 세포침전액을 떨어뜨려 염색체 표본을 만들고, 공기 건조법으로 슬라이드를 제작하여, 5% Giemsa로 30분간 염색하여 현미경으로 관찰하였다.

한 시험 농도당 100개의 세포분열 중기상을 현미경(Carl Zeiss, ×1000, Germany)하에서 판독하여 염색체이상 유무를 관찰하였다. 염색체이상은 Sofuni등(1989)의 Chromosome Aberration Atlas에 따라 크게 구조이상(structural aberrations)과 숫적 이상(numerical aberration)으로 분류하고, 구조이상은 gap (chromatid and chromosome gap), ctb (chromatid break), cte (chromatid break), csb (chromosome break), cse (chromosome exchange)으로 구분하여 기록하였다. 구조이상의 종류를 1개 이상 갖는 세포를 양성세포 1개로 계수하고 그 종류를 각각 기록하였다. 염색체 숫적 이상은 배수성을 판독하였다. 염색체이상의 수가 통계학적으로 유의성 있게 용량 의존적으로 증가하거나, 하나 이상의 용량단계에서 재현성 있게 양성반응을 나타낼 경우를 양성으로 하였다.²¹⁾

6) 포유류 배양세포를 이용한 소핵시험

최고용해도를 기준으로 하여 예비시험의 최고농도를 결정하였으며, EA의 경우 공비 2를 적용하였다. 예비독성시험에서 결정된 50% 세포독성 농도를 최고 농도로 하고, 공비 2로 4단계의 농도를 시험농도로 하였다. 또한, 용매대조군으로 DMSO 처리군과 기지의 양성대조군을 각각 처리하여 시험하였다. CHL 세포의 경우 직접법을 수행하였다. 직접법은 CHL 세포를 직경 60

mm의 petri dish에 1×10^5 /ml되도록 파종하여 1일간 배양한 후, 각각 시험물질과 양성대조물질 등을 함유하는 배양액으로 교환하여 24시간 배양하였다. 0.25% trypsin-EDTA로 세포를 모은 후 4°C의 저장액(0.075 M KCl) 4 ml에 현탁시킨 다음 바로 원심분리하였다. 고정액(methanol : acetic acid = 3 : 1)으로 2회 고정시킨 후 50% 질산 전처리하여 냉장보관된 슬라이드에 세포침전액을 떨어뜨려 염색체 표본을 만들고, 공기 건조법으로 슬라이드를 제작하여, 5% Giemsa로 30분간 또는 Acridine orange를 이용하여 염색한 후 광학현미경 또는 형광현미경($\times 400 \sim \times 1000$)으로 관찰하였다. MMC 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 사용하였다.

한 시험 농도당 1,000개의 세포를 광학현미경(Carl Zeiss, $\times 400 \sim \times 1,000$) 또는 형광현미경(Nikon, $\times 400 \sim \times 1,000$)하에서 판독하여 small MN, large MN, multi MN으로 구분하여 관찰하였다. 소핵을 하나 가지는 세포는 소핵의 직경이 $< 1/3$ 이하이면 small MN으로, $1/3$ 초과 $< 1/2$ 미만이면 large MN으로 구분하였으며, 소핵을 두 개 이상 가지는 세포는 multi MN으로 구분하였다. 통계학적으로 유의성 있게 용량 의존적으로 증가하거나 하나 이상의 용량단계에서 재현성 있게 양성반응을 나타낼 경우를 양성으로 하였다. 즉, 용량-반응 관계는 Cochran-armitage test를 수행하였으며, 유의성 검정은 t-test를 수행하여 P-값 < 0.05 일 경우 양성으로 판정하였다.^{9,22)}

7) 실험동물

식품의약품안전청 청정동물사에서 생산된 SPF (특정병원체 부재) 5주령 ddY계 마우스를 공급받아 온도 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$, 배기 10~18회/hr, 형광등 명암 12시간 교대주기, 조도 300~500 Lux의 사육환경에서 폴리카보네이트 사육상자(70 W X 240 L X 120 H mm)에 5마리씩 넣어 사육하였다. 1~2주일간의 순화 사육기간 동안 관찰하여 정상적인 건강한 동물만 시험에 사용하였으며, 사료는 신촌사료(주)의 실험동물 사료를 구입하여 고압증기 멸균한 다음 실험동물에 자유로이 공급하였다. 또한 정제수를 자유로이 공급하였다.

8) 마우스 골수세포를 이용한 생체내 소핵시험

(1) 군 분리 및 개체의 식별: 순화기간을 거친 모든 동물의 체중을 측정, 소정의 범위에 드는 동물을 선별

하여 무작위로 각 군에 배분하였다. 개체의 식별은 색소(피코린산액)에 의한 부위별 피모 염색법과 사육상자별 tag 표시법을 이용하였다.

(2) 투여량과 표본제작시기의 결정을 위한 예비시험: 소핵시험 본시험의 투여량 및 표본제작시기의 결정을 위하여 각 군에 암, 수 각 2마리씩을 배정하고, 생리식염수 10 ml/kg의 용매대조군과 MMC 2 mg/kg의 양성대조군을 설정하였다. EA은 0.01, 0.1, 1, 10, 100 mg/kg의 5농도를 선정하였으며, 1회 경구투여하고 투여 후 24, 30, 48시간 경과 시에 골수를 채취하여 도말 표본을 제작하였다. 제작된 슬라이드를 광학현미경하에서 관찰하여 1,000개의 다염성 적혈구에서의 소핵출현 빈도수를 계수하여 본 시험농도를 설정하였다.

(3) 소핵시험

가) MMC유도 소핵형성의 EA 투여횟수와 투여시간의 효과; EA의 투여횟수와 투여시간의 효과를 보기 위하여 EA 1회 투여 용량은 2 mg/kg/ 10 ml로 하였고, 투여횟수는 1회, 2회, 3회이었으며, 양성대조물질인 MMC처리를 0시간으로 하여 ~24시간, ~6시간 전처리와 0시간 동시처리, 6시간, 24시간 후처리 하였다.

나) EA의 MMC유도 소핵형성의 억제효과; EA의 항돌연변이 효과를 보기 위해 MMC 2 mg/ml을 복강투여하고 동시에 EA를 100 mg/kg을 최고 투여량으로 하여 공비 0.1의 5단계 농도를 1회 경구투여 하였다.

(4) 골수세포 표본의 제작: Schmid의 방법¹⁸⁾에 따라 골수표본을 제작하였다. 경추탈구법에 의해 희생한 동물의 양쪽대퇴골에 0.5 ml의 FBS를 주입하여 골수를 채취한 후 골수세포 부유액을 1,500 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 후 침전된 골수를 pasteur pipet으로 소량의 혈청에 고르게 현탁시켜 청결한 슬라이드에 떨어뜨려 도말하고 공기 중에서 충분히 건조시킨 다음 메탄올에 5분간 고정하였다. 건조가 끝난 표본을 Giemsa용액(Gurr R-66, pH 6.8의 1/150 M phosphate buffer에 5% (v/v)로 제조한 것)으로 30분간 염색하였다. 염색 후 동일 완충액에 1회 세척하고 0.004%의 구연산수용액에 다시 수 초간 세척한 다음, 증류수에 수 회 세척하고 공기 중에서 건조시켰다.

(5) 골수 도말표본의 관찰: 관찰은 2명의 관찰자에 의해 맹검법으로 검경 하였다. 마우스 1마리당 1,000개의 적혈구에서 다염성적혈구(polychromatic erythrocyte, PCE)와 정염성적혈구(normochromatic erythrocyte, NCE)의 비를 구하고, 다시 1,000개의 다염

성적혈구중에서 소핵을 가진 다염성적혈구(micro-nucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 출현빈도를 구하였다. 계수시 소핵의 크기는 세포직경의 1/2로부터 식별 가능한 범위까지로 하였으며, 주변 유핵세포의 핵과 염색상이 동일한 것을 선택하였다.

(6) 통계학적 분석: Hayashi 방법¹⁹⁾에 따라 3단계의 통계처리법을 적용하여 결과를 분석하였다. 1, 2단계의 비교자료 활용에 의한 검정을 거쳐, 3단계에는 음성대조군과 시험물질 투여군과의 소핵적혈구의 출현빈도에 관한 유의차는 Cochran Armitage 경향검정법을, 다염성적혈구의 출현빈도에 관한 유의차는 t-test를 행

하였다.

결 과

1) 생체의 염색체이상시험

(1) 용량설정을 위한 예비 세포독성시험: EA의 경우 최고용해도인 12.5 µg/ml를 최고농도로 하여 6.25, 3.13, 1.56 µg/ml의 4단계 농도로 결정하였다.

(2) 생체의 염색체이상시험: Table 1에서 EA가 MMC에 유도된 염색체이상을 억제할 수 있는 지를 실험한 결과이다. MMC 0.1 µg/ml에 유도된 염색체이상

Table 1. Inhibitory effects of ellagic acid on MMC induced chromosome aberration in CHL cells without metabolic activation

Compound (µg/ml)		ctg	ctb	cte	csg	csb	cse	pol (%)	Aberrant ^{†,‡} rate (%)	Inhibition
MMC	EA									
0.1	-	13.33	7.00	52.00	2.00	1.00	1.00	0.00	75.00±5.10	
0.1	12.5	10.33	4.00	32.67	1.67	0.00	0.33	0.00	49.00±9.42	34.7*
0.1	6.25	4.00	3.00	27.33	1.33	0.00	1.00	0.00	36.67±6.94	51.1**
0.1	3.13	5.33	2.67	32.67	0.00	0.00	1.00	0.00	41.67±2.05	44.4**
0.1	1.56	3.33	1.00	51.00	0.33	0.00	0.33	0.00	56.00±4.90	25.3*
-	-	2.33	0.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.67±0.47	

[†]ctg, Chromatid Gap; ctb, Chromatid Break; cte, Chromatid Exchange; csg, Chromosome Gap; csb, Chromosomal Break; pol, polyploidy; aberrant, aberrant cells. [‡]mean±standard deviation (n=3). ^{||}Inhibition rate: 100-aberrant of sample/ aberrant of PC×100.

*P<0.05, **P<0.01, t-test

Table 2. Inhibitory effects of ellagic acid on MMC induced micronuclei in CHL cells

Compound [†] (µg/ml)		Type of micronucleated cell			No. cells with MN [†]	Inhibition rate [‡] (%)
MMC	EA	Small MN (<1/3)	Large MN (1/3 ~ 1/2)	Multi MN		
0.1	-	75	11	17	103±1.5	
0.1	12.5	17	2	4	23±2.5	78**
0.1	6.25	23	4	12	39±9.1	62**
0.1	3.13	37	7	15	58±8.0	44**
0.1	1.56	35	14	6	55±5.1	47**
-	-	4	0	0	4±0.6	

[†]Mean±standard deviation (n=3). [‡]Inhibition rate: 100-MN of sample/MN of PC×100

*P<0.05, **P<0.01, t-test

Table 3. Inhibitory of ellagic acid on the MMC (2 mg/kg/10 ml) induced MNPCEs by different treatment times of ellagic acid in ddY male mice

Compound [†]	Treatment time [‡] (hr)	Treatment number	MNPCE (Mean±S.D.)	PCE/(PCE+NCE) [¶] (Mean±S.D.)	Inhibition rate (%) ^{‡‡}
Oil	0	1	1.00±1.00	0.49±0.00	
E+M	-24	1	60.33±9.29	0.49±0.01	-8.38
E+E+M	-24, 0	2	81.00±7.00	0.49±0.01	8.38
E+E+M+E	-24, 0, 6	3	35.00±8.66*	0.48±0.04	37.13
E+M	0	1	46.00±2.65*	0.47±0.04	17.37
E+M+E	0, 6	2	36.67±5.77**	0.47±0.02	34.13
M+E	6	1	43.67±14.36	0.49±0.01	21.56
E+M+E	-24, 6	2	51.00±4.00	0.49±0.01	8.38
MMC	0	1	55.67±3.21	0.47±0.02	0.00

[†]M, MMC; E, ellagic acid; MMC, mitomycin C. [‡]MMC treat time, 0 hr. ^{||}The number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) was calculated from 1000 PCEs per animal (n=3). [¶]The percentage of PCE in 1000 erythrocytes per animal. NCE, normochromatic erythrocytes. ^{‡‡}Inhibition rate: 100-MNPCE of sample/MNPCE of PC×100. [#]Dose; MMC, 2 mg/kg/10 ml, ellagic acid, 2 mg/kg/10 ml
*P<0.05, **P<0.01, t-test

Table 4. Inhibitory effects of ellagic acid on the MMC-induced MNPCEs in ddY male mice

Compound (mg/kg)		MNPCE [†] (Mean±S.D.)	PCE/(PCE+NCE) [‡] (Mean±S.D.)	Inhibition rate (%)
MMC	EA			
2	-	1.20±0.8	0.48±0.03	
2	100	46.0±10.0	0.49±0.02	32.6*
2	10	34.0±8.5	0.49±0.02	50.1**
2	1	52.8±10.0	0.48±0.01	22.6
2	0.1	62.6±7.3	0.48±0.04	8.2
2	0.01	65.6±13.1	0.49±0.01	3.8
-	-	68.2±12.0	0.47±0.03	

[†]The number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) was calculated from 1000 PCEs per animal (n=5). [‡]The percentage of PCE in 1000 erythrocytes per animal. NCE, normochromatic erythrocytes. ^{||}Inhibition rate: 100-MNPCE of sample/MNPCE of PC×100
*P<0.05, **P<0.01, t-test

을 EA 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 µg/ml을 동시처리하였을 때 각각 34.7, 51.1, 44.4, 25.3% 억제하였다.

2) 생체외 소핵시험

(1) 용량설정을 위한 예비 세포독성시험: 생체외 염색체이상시험에서의 결과와 비교를 위하여 EA의 경우 최고용해도인 12.5 µg/ml를 최고농도로 하여 6.25, 3.13, 1.56 µg/ml의 4단계 농도로 결정하였다.

(2) 생체내 소핵시험: Table 2에서 EA가 MMC에 유도된 소핵형성을 억제할 수 있는 지를 실험한 결과이다. MMC 0.1 µg/ml에 유도된 소핵형성을 EA 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 µg/ml을 동시처리하였을 때 각각 34.7, 51.1, 44.4, 25.3% 억제하였다.

3) 생체내 소핵시험

(1) 예비독성시험을 통한 최고 처리농도 결정: 최고

100 mg/kg을 최고농도로 공비 10을 적용하여 10, 1, 0.1, 0.01 mg/kg의 5단계 농도로 결정하였다.

(2) 소핵시험: Table 3에서 ellagic acid의 투여 횟수와 전후처리의 관계를 확인하기 위하여 실험한 결과 MMC 처리 전후에 3회 투여한 경우에 가장 강한 억제 효과(37.13%)를 보였다. MMC 처리전후 2회 투여한 경우에 34.13%의 억제효과를 보였으며, MMC 처리 전후 시간 간격이 큰 2회 투여군과 MMC 처리 전 2회 투여군은 8.38%의 억제를 보였다. 투여횟수에 비례하였으며, MMC 노출에 가까운 시간에 투여하였을 때 효과가 있음을 보였다.

Table 4에서 EA가 MMC (2 mg/ml)에 유도된 소핵형성 억제 효과를 살펴보았다. EA를 100, 10, 1, 0.1, 0.01 mg/ml의 5농도로 MMC와 병용 투여한 결과 각각 32.6, 50.1, 22.6, 8.2, 3.8%의 억제 효과를 나타내었다.

고 찰

돌연변이는 크게 유전자 돌연변이와 염색체 돌연변이로 구분할 수 있다. 염색체 돌연변이는 다시 염색체 구조이상과 수적 이상으로 구분되어 진다. 많은 암 예방물질에 대한 돌연변이 연구는 Ames test 등을 이용한 frame shift mutation, base pair substitution mutation 등의 유전자 돌연변이에 대한 연구가 주된 연구였다.^{11~17)} 본 연구에서는 염색체 돌연변이의 검출할 수 있는 시험법을 이용하여 MMC에 대한 EA의 염색체 돌연변이 억제능을 연구하였다. 염색체 손상성을 연구할 수 있는 생체외 및 생체내 시험방법으로 여러 시험방법이 제시되어지고 있다. 그 중에서 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험은 염색체의 중기상에서의 구조적 이상과 수적 이상을 검색할 수 있는 시험법으로 돌연변이 물질을 검출하기 위하여 전 세계적으로 가장 오랜 동안, 가장 많이 수행되어진 시험법중의 하나이다. 그러나 이 시험법은 염색체 중기상 형성을 못하게 하는 물질의 경우 정확한 염색체 손상정도를 반영하지 못하는 단점을 지니고 있으며, 수적 이상 중배수성의 검색은 가능하나 시험법 자체적인 한계 때문에 이수성을 검출하지 못하는 단점을 내포하고 있다.^{18~21)} 요즘 새롭게 제시되어지고 있는 생체외 소핵시험은 염색체 구조이상과 nondisjunction과 같은 이수성을 포함하는 수적 이상을 염색체 및 유전체 수준에

서 검색할 수 있는 신속하고, 간편하며, 경제적인 시험법이다.^{5~9)} 본 연구에서는 같은 CHL 세포에서의 다른 생체지표인 염색체이상시험과 소핵시험을 실시하여 염색체 손상성을 비교, 검색하였다. 한편, 포유동물인 설치류의 골수내 다염성적혈구를 이용한 소핵시험법은 1975년 Schmid¹⁸⁾에 의해 개발된 이후, 화학물질 등의 변이원성을 평가하는 *in vivo* 시험법으로 세계적으로 이용되어 오고 있다. 설치류의 적혈구를 표적으로 한 소핵시험은 적혈구의 분화과정 중에 형성되는 비정상적인 염색체 성분인 소핵의 유도를 지표로 하는 세포유전학적 시험법이다. 이 소핵시험은 많은 연구를 통하여 동물의 성, 계통,^{19,23)} 투여경로 차이²⁴⁾에 따른 비교 논문들이 보고되어 있으며, 검체 투여방법, 채취시간에 따른 골수세포의 적혈구 생성에 미치는 영향에 관한 연구가 계속되어 왔다.²⁵⁾ 또한 생체내 골수소핵시험은 생체내 변환 등을 반영할 수 있는 시험방법으로 알려져 있다.²⁶⁾ 본 연구에서는 IARC (국제종양연구소) 및 USEPA (미국환경보호청)에서 유전독성 자료를 요약한 GAP (Genetic Activity Profile) 보고에 따르면 oxygen free radical을 생성하며, DNA adduct를 형성, DNA 절단 효과, 유전자돌연변이, 염색체구조이상, 자매염색분체교환, 소핵형성, 유전적 전자 유발, 우성 치사 유발 등의 돌연변이를 유발하는 것으로 잘 알려진 MMC를 염색체손상 돌연변이물질로 선정하였다.¹⁰⁾ 항돌연변이물질은 돌연변이를 일으키는 물질(mutagen)의 작용을 제거하는 작용이 있는 물질을 말하며, 그 작용양식에 따라 2개의 유형으로 나뉘어지는데, 첫째, 돌연변이원 불활화물질(desmutagen)로, 돌연변이원이 DNA에 장애를 일으키기 전에 돌연변이원에 직접 작용하여 변이활성을 불활화시키는 물질로서, 환원제, 항산화제 등에 의한 수식, peroxidase 등에 의한 효소적 수식, 섬유성분 등 생체 고분자에 의한 흡착 등이 이에 속한다. 둘째로는, 일단 변이원에 의해 손상이 일어난 세포에 DNA 수복이나 복제과정에 작용하여 돌연변이 유발빈도를 낮추는 효과를 갖는 물질로 전자의 desmutagen과 구별하여 bioantimutagen이라 칭한다. EA는 desmutagen으로서의 항돌연변이효과, 아포토시스(apoptosis) 유도제로서의 항암효과 등이 보고되었으며, 생체외 세포형질전환 시험법에서 억제 효과가 보고되었다.²⁷⁾ 항돌연변이효과로서 2-nitrofluorene, 4-4-dinitro-2-biphenylamine, 1-nitropyrene, 1,3-dinitropyrene, 2-nitro-p-phenylenediamine, 3-nitro-

0-phenylenediamine, 4-nitro-o-phenylenediamine, aflatoxin B1, B[a]P, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), IQ, N-methyl-N-nitrosourea과 같은 많은 돌연변이물질에 대하여 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험에서의 억제효과가 있음이 보고되었으나, 물질특이적으로 dimethylnitrosamine 유도 돌연변이능은 억제하지 못하는 것으로 알려져 있다. 또한 CHO세포를 이용한 자매염색분체교환 시험에서는 1-nitropyrene, 1,6-dinitropyrene에 대한 억제효과는 없는 것으로 보고되고 있다.¹⁶⁾ 항발암효과로서는 EA가 발암물질에 직접 결합하여 발암기능을 제거하거나, 발암물질이 유전자에 손상을 주는 물질로의 전환을 억제하거나, 발암물질을 대사시키기 위해 phase II enzyme GST 활성을 증가시킨다고 보고되고 있다.²⁸⁾ 또한 한국인에 많이 발생하는 위암의 경우에도 랫드 중기발암모델에서 억제효과가 있음이 보고되기도 하였다.²⁸⁾ 본 연구에서 염색체이상시험과 생체외 및 생체내 소핵시험에서 염색체 손상성 억제효과를 연구하였는데, 본 시험조건에서 EA는 MMC (0.1 µg/ml)에 유도된 염색체 이상을 농도 의존적으로 억제하였는데, 6.25 µg/ml 처리시 최고 51.1%까지 억제하였다. EA는 MMC (0.1 µg/ml)에 유도된 생체외 소핵을 농도 의존적으로 억제하였으며, 12.5 µg/ml 처리시 최고 78%까지 억제하였고, 10 mg/kg 단회 경구 투여시 MMC (2 mg/kg/10 ml)에 의해 유도된 생체내 골수소핵 형성을 최고 50.1%까지 억제하였다. EA는 염색체이상시험에 비하여 생체외 소핵시험에서 억제효과가 더 크게 나타났는데, 이는 염색체 중기상에서의 100개의 세포를 판독하는 염색체이상시험에 비하여 간기에서의 1,000개의 세포를 판독하는 생체외 소핵시험에서 중기상에 비하여 간기상의 비율이 더 크므로, 세포주기 상태에 따른 염색체 손상성의 억제가 더 많이 반영되어진 것으로 생각되어진다. EA는 생체외 및 생체내 시험에서 모두 MMC에 의해 유도된 염색체 손상성에 대하여 억제능을 가지는 것을 나타내는데, 유전자 돌연변이 억제능력 뿐만 아니라 염색체 손상성도 억제할 수 있어 유전체 수준에서 암예방 억제 효과가 가지는 물질이라 사료된다. 또한 본 연구에 사용되어진 3가지 시험법은 염색체 손상성을 보호할 수 있는 있는 항돌연변이물질/암예방 물질의 검색 및 염색체 손상에 대한 기전연구에 유용할 것으로 생각되어진다.

감사의 글

본 연구는 선도기술개발사업(G7 project) 연구비 지원 및 식품의약품안전청 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- 1) Surh YJ. Molecular mechanism of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat Res* 1998; 18: 1-8.
- 2) Kim DJ. Dietary factors and cancer prevention. *J Kor Assoc Cancer Preven* 1998; 3: 24-39.
- 3) McGregor DB, Rice JM, Venitt S. The use of short- and medium-term tests for carcinogens and data on genetic effects in carcinogenic hazard evaluation: IARC Scientific Publication No. 146, International Agency for Research on Cancer, France, Lyon, 1999.
- 4) Ishidate Jr. M, Odashima S. Chromosome tests with 134 compounds on chinese hamster cells *in vitro* - a screening for chemical carcinogens. *Mutat Res* 1977; 48: 337-354.
- 5) Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 1985; 147: 29-36.
- 6) Matsushima T, Hayashi M, Matsuoka A, Ishidate Jr. M, Miura KF, Shimizu H, Suzuki Y, Morimoto K, Ogura H, Mure K, Koshi K, Sofuni T. Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis* 1999; 14: 569-80.
- 7) Kirsch-Volders M, Elhajouji A, Cundari E, Van Hummelen P. The *in vitro* micronucleus test: a multipoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat Res* 1997; 392: 19-30.
- 8) Marzin D. The position of the *in vitro* micronucleus test within the battery of screening for genotoxic potential determination and the regulatory guideline. *Mutat Res* 1997; 392: 175-181.
- 9) Matsuoka A, Matsuura K, Sakamoto H, Hayashi M, Sofuni T. A proposal for a simple way to distinguish aneugens from clastogens in the *in vitro* micronucleus test. *Mutagenesis* 1999; 14: 385-389.
- 10) Genetic activity profile, <http://www.epa.gov/gapdb>
- 11) Chen SC, Chung KT. Mutagenicity and antimutagenicity studies of tannic acid and its related compounds. *Food Chem Toxicol* 2000; 38: 1-5.

- 12) de Mejia EG, Castano-Tostado E, Loarca-Pina G. Antimutagenic effects of natural phenolic compounds in beans. *Mutat Res* 1999; 441: 1-9.
- 13) Loarca-Pina G, Kuzmicky PA, de Mejia EG, Kado NY. Inhibitory effects of ellagic acid on the direct-acting mutagenicity of aflatoxin B₁ in the Salmonella microsuspension assay. *Mutat Res* 1998; 398: 183-187.
- 14) Abraham SK. Anti-genotoxic effects in mice after the interaction between coffee and dietary constituents. *Food Chem Toxicol* 1996; 34: 15-20.
- 15) Loarca-Pina G, Kuzmicky PA, de Mejia EG, Kado NY, Hsieh DPH. Antimutagenicity of ellagic acid against aflatoxin B₁ in the Salmonella microsuspension assay. *Mutat Res* 1996; 360: 15-21.
- 16) Kuo ML, Lee KC, Lin, JK. Genotoxicities of nitro-pyrenes and their modulation by apigenein, tannic acid, ellagic acid and indole-3-carbinol in the Salmonella and CHO systems. *Mutat Res* 1992; 270: 87-95.
- 17) Josephy PD, Lord HL, Snieckus VA. Inhibition of benzo[a]pyrene dihydrodiol epoxide mutagenicity by synthetic analogues of ellagic acid. *Mutat Res* 1990; 242: 143-149.
- 18) Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res* 1975; 31: 9-15.
- 19) Hayashi M, Hashimoto I, Sakamoto S, Hamada YC, Sofuni T, Yoshimura MI. Statistical analysis of data in mutagenicity assays; Rodent micronucleus assay. *Environ Health Perspect Supp* 1994; 102(1): 49-52.
- 20) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
- 21) JEMS-MMS. Atlas of chromosome aberration by chemicals, Japanese Environmental Mutagen Society- Mammalian Mutagenicity Study Group. Tokyo, 1988.
- 22) Kim JW, Han ES, Park MS, Eom MO, Kim IS, Jun HS, Jung HK, Sim WS, Oh HY. *In vitro* micronuclei formation of bisphenol A in chinese hamster lung fibroblast CHL cells and various human derived cells. *Environ Mutagen & Carcinogen* 2000; 14: 112-121.
- 23) Hayashi M, Sutou S, Shimida H, Sato S, Sasaki YF, Wakada A. Difference between intraperitoneal and oral gavage application in the micronucleus test. *Mutat Res* 1989; 223: 329-344.
- 24) Sutou S. Sex difference in the micronucleus test. *Mutat Res* 1986; 172: 151-163.
- 25) Sutou S. Strain difference in the micronucleus test. *Mutat Res* 1988; 204: 307-316.
- 26) Hayashi M, Sutou S, Shimida H, Sato S, Sasaki YF, Wakada A. Difference between intraperitoneal and oral gavage application in the micronucleus test. *Mutat Res* 1989; 223: 329-344.
- 27) Steele VE, Kelloff GJK, Wilkinson BP, Arnold JT. Inhibition of transformation in cultured rat tracheal epithelial cells by potential chemopreventive agents. *Cancer Res* 1990; 50: 2068-2074.
- 28) Han BS, Kim DJ, Shin DH, Ahn BW, Lee KK, Kim KS, Cho JC, Choi KS, Jang DD. Chemopreventive effect of ellagic acid on stomach in medium-term rats multi-organ bioassay. *Kor J Vet Pub Hlth* 1999; 23: 83-92.