

*Drosophila*에서 Genistein의 항돌연변이 효과

부산대학교 생물학과, ¹식품영양학과

윤 희 선 · 박 건 영¹ · 이 원 호

Antimutagenic Effects of Genistein in *Drosophila* Somatic Mutation Assaying System

Hee-sun Yun, Kun-Young Park¹, and Won-Ho Lee

Departments of Biology, and ¹Food Science & Nutrition,
Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

This study was carried out to determine the antimutagenic effects of genistein on the somatic mutagenicity induced by Trp-P-2 and MNNG using *Drosophila* wing spot test. For this purpose, mutagen alone or mutagen with genistein was administered to the heterozygous (*mwh*+) third instar larvae by feeding, and somatic cell mutations were detected in adult fly wing hairs.

Genistein did not show any mutagenicity at the feeding concentrations of 5 ~ 15% in the test system. As the feeding concentration of genistein increased, the mutagenicity induced by Trp-P-2 showed a remarkable inhibition especially in the case of small *mwh* spots. The antimutagenic effect of genistein on the mutagenicity for the total *mwh* spot formation induced by Trp-P-2 was observed to be 15.5 ~ 85.7%. In the case of direct mutagen, MNNG, the small *mwh* spot inhibition was dependent on the dose of genistein, while the large *mwh* spot inhibition was vice versa. Total *mwh* spot inhibition rate was somewhat limited, approximately 17.6 ~ 34%, by the mutagenicity induced by MNNG. Therefore, in comparison of antimutagenic effects, the mutagenicities induced by the indirect mutagens were more inhibited by genistein than those of the direct mutagen.

These results indicate that genistein have inhibitory effects on the mutagenicity induced by mutagens. It seems to suggest that genistein may exert inhibitory effects on mutagenic and/or carcinogenic properties of DNA damaging agents.

Key Words: Genistein, *Drosophila* wing spot test system, Trp-p-2, MNNG

서 론

많은 돌연변이원과 발암원들의 노출로부터, 유해영향을 방지 또는 감소하는 효과적인 수단으로써 일상생활에서 항돌연변이원과 항발암원을 섭취하는 것이 제

안되어졌다.^{1,2)} 즉, 자연 또는 합성물질로부터 예방성분을 추출하여 암형성 발생초기부터 막아보려는 화학적 예방법의 접근이다.³⁾

화학적 예방제들은 과일, 야채, 향료, 각종 차종류 등에 자연적으로 함유되어 있다고 알려져 있고 야채나

과일에서 추출된 화학적 예방물질을 phytochemicals (plant chemicals)라고 부르는데 지금까지 알려진 phytochemicals에는 vitamin A, C, E, indoles, isothiocyanates, dithiolthiones, organosulfur 물질, vanillin, chlorophyllin, dietary fibres, carotenoids, retinoids 등이 있다.¹⁾

탁월한 효과를 가지고 있음이 입증된 것들 중 대표적인 것이 '콩'으로서, 콩의 효능에 대한 연구는 여러 나라의 암 발생비 차이에 대한 역학적 조사에서 시작되었다. 전통적으로 저지방, 고-콩음식을 먹는 아시아 여성들에게서 서양 여성보다 유방암 발생률이 4~6배나 적었으며⁴⁾ 미국으로 이주한 아시아 여성들이 고지방 음식을 먹으며 여러 세대 지나면서 유방암 발생률이 미국여성에 접근했다는 보고가 있다.⁵⁾ 이런 연구에서 볼 때, 아시아인과 서양인사이의 유방암발생 차이가 유전적 요인이라기보다는 음식 또는 환경쪽에 있다는 것을 말한다.⁶⁾ 아시아와 서양음식의 가장 큰 차이 중의 하나는 서양보다 동양의 식생활에 많이 이용되며 조리법이 매우 다양하게 발달되어 있는 '콩음식' 섭취였다.^{4,7)}

특히, 콩에 있어서 isoflavone은 약 1~3 mg/g 정도로 상당한 양이 존재하며 Isoflavone에 속하는 genistein은 주로 β -glucosides, 즉 당과 결합한 genistin 형태로 콩 속에 들어 있으나⁷⁾ 된장과 같은 콩 발효식품에는 genistein 함량이 상대적으로 높게 함유되어 있다.⁸⁾ 또한 genistein은 endogenous female sex hormone인 estradiol과 구조적으로 매우 유사하고 estrogen receptor(ER)에 약하게 결합하는 estrogen antagonist이며, free radical 형성, DNA damage 그리고 궁극적으로 carcinogenesis를 막는 강력한 항산화성질과 항암성질을 가지기 때문에 최근 연구에 많은 주목을 받고 있다.^{6,9)} *In vitro*에서, 여러 cancer cell lines의 성장을 억제하며 protein tyrosine kinase (PTK), topoisomerase II를 억제한다는 연구가 보고되고 있다.^{10,11)}

한편, 인간에게 적용하기에 적합한 발암 및 돌연변이원성 실험은 고등동물에 의한 실험이겠으나, 실험상 많은 경비와 시간이 소요되며 기존의 많은 환경성 돌연변이원이나 새롭게 합성되어지고 있는 여러 화학물질들을 실험하는데는 여러 난점이 있고 동물의 발암실험에서 고빈도의 결과를 보인 것이 원핵생물에서는 전혀 돌연변이원성을 나타내지 않는 경우라던지 원핵생

물에서 강력한 돌연변이원성을 나타낸 물질들이 동물에서의 발암성은 약하게 나타나는 등 정량적 측면에서 불일치성을 보이는 경우가 많이 있다.¹²⁾

이러한 원핵생물과 포유류를 연결하기 위한 중간생물로서 오래 전부터 유전학적으로 많은 정보가 축적되어 있고 포유류 대사 효소계의 대부분을 가지고 있는 submammalian eukaryote에 해당하는 *Drosophila*를 이용한 검출법들이 다각도로 고안되어져 왔다.^{13~15)}

*Drosophila*를 이용한 체세포 염색체 돌연변이 검출계로는 Würzler등의 연구팀^{12,14)}에 의해 개발된 wing hair spot 검출계인 *mwh/flr* system과 *mwh/+* system 등이 있으며 이는 체세포 염색체 중 제 3염색체상에 존재하는 표지유전자를 이용하여, 유충에 있어서 특정 발생 단계에 검출대상물질을 처리하여 성체로 분화한 후 날개에 나타난 강모에 대한 mutant clone종류와 크기 등에 의해 제 3염색체상에 유발된 다양한 체세포 돌연변이를 분석하는 검출계이다.^{14,15)}

이러한 *Drosophila*를 재료로 한 체세포 염색체 돌연변이 검출계를 이용하면 각종 화학물질들의 돌연변이 유발정도를 단시간에 조사할 수 있고 기 조사된 항돌연변이 물질들과의 혼합처리에 의한 항돌연변이 및 항발암원의 효과정도를 검증하는 접근이 가능하게 될 것이다.

본 실험에서는 *Drosophila*의 체세포 염색체 돌연변이 검출계 중에서 *w*, *mwh* system을 이용하여 여러 생물들에서 강력한 돌연변이원으로 알려진 수종의 화학적 mutagens를 처리하여 돌연변이의 유발정도를 조사하고, 여러 실험들에서 돌연변이 억제 효과기능이 있는 것으로 보고되어지고 있는 genistein을 혼합처리하여, 이 검출계를 이용한 본 생물에 대한 영향정도를 조사하고자 한 것이다.

재료 및 방법

1) 실험재료

Genistein은 처리 직전 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Chemical Co., USA)에 용해시킨 후, 증류수로 희석하여 사용하였다. 체세포 돌연변이 유발을 위하여 사용된 돌연변이원은 3-amino-1-methyl-5H-pyrido (4,3-b)indole(Trp-P-2) 및 N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)이며 처리 직전에 이들 돌연변이원들도 DMSO에 용해시킨 후, 증류수로 희석하여

사용하였다.

체세포 염색체 돌연변이 검출계로서 사용한 초파리는 *w*와 표지 유전자로서 *mwh*(1세포당 3 이상의 강모를 나타내는 multiple wing hairs; 3-0.0)를 호모로 가지는 *w; mwh*이다. *w* 계통에서는 미교배의 암컷(*w/w; +/+*)을, *w; mwh* 계통에서는 수컷(*w/Y; mwh/mwh*)을 취하여 상호교배에 사용하였다(Fig. 1).

2) 방법

(1) Genistein의 독성실험과 체세포 돌연변이원성 조사: Genistein의 적절한 처리 농도를 알기위해 농도별(5, 10, 12, 15, 20%)로 heterozygous 3령기 유충(*mwh/+*) 50개체가 들어 있는 배지 표면상에 genistein 250 μ 씩을 처리하여 우화될 때까지 genistein에 노출되도록 하였다. 처리된 vial에서 생존하는 성체수를 세어서, probit analysis로 LD₅₀ 값을 정하였다.¹⁶⁾

Genistein의 체세포 돌연변이 유발 정도를 알기 위해, 농도별(5, 10, 12, 15%)로, heterozygous 3령기 유충(*mwh/+*)에 genistein 250 μ 씩을 처리하였다. 처리 후 우화한 성체 날개의 표면에 나타난 mutant hair를 검경하였고, 염색체 돌연변이 빈도는 돌연변이 clone의 수/측정한 날개의 수로 나타내었다

(2) Mutagens 처리와 genistein의 항돌연변이원성 실험: Fig. 1의 교배도에 준하여 *w; +* 계통에서는 미교배의 암컷을, *w; mwh* 계통에서는 수컷을 취하여 3~4일간 양호한 조건하에서 사육하였다. 준비된 두 계통의 암수를 10 ml의 corn-meal agar 배지가 들어 있는 사육병당 20쌍 정도로 교배시켜 형광등 아래에서 overnight 한 후, 새로운 배지가 든 사육병으로 transfer하여 8시간 동안 알을 수집하였다.

산란 72시간 경과 후의 heterozygous 3령기 유충(72 \pm 4 hr) 시기에 유충들이 있는 배지 표면상에 처리물질을 떨어뜨려(droplet technique) 용화될 때까지 처리물질에 노출되도록 하였다.^{14,17)} Control (DMSO

2%), genistein, 각종 돌연변이원 단독처리 그리고 돌연변이원과 genistein의 혼합물질의 처리량은 각각 250 μ 이었다. 모든 실험은 온도 25°C, 습도 70%, 암 조건하에서 이루어졌다.

처리 후 우화되어 나온 성체(*mwh/+*)를 70% ethanol에 고정시켜두었다가, 쌍안 실체 해부 현미경을 통해 개체당 날개 한 장씩을 떼어 표본 제작에 사용하였다. 400배의 광학현미경하에서 날개 표면에 mutant hair를 가진 세포수의 clone을 검경하였다.¹⁴⁾

Wing spot data는 Graf¹⁸⁾에 의한 방법으로 평가하였으며 통계분석을 위해 2개의 다른 범주로 구분하였다. 하나는 유충 시기의 날개 원기 세포에서 염색체상 *mwh* 좌위와 + 좌위 사이의 결실이나 불분리에 의한 1~2개의 영향을 받은 세포를 가진 clone을 small *mwh* spots으로, 그리고 체세포 염색체 재조합에 의한 3개 이상의 영향을 받은 세포를 가진 clone을 large *mwh* spots으로 구분하였다. 보다 상세한 통계분석과정은 Frei와 Würzler¹⁹⁾에 준하였으며 clone 형성의 control 보정빈도/24,400 cells(각 wing에서 측정되는 cell 수)에 기초를 두고, genistein에 의한 억제율은 [(genotoxin alone-genotoxin plus genistein)/genotoxin alone] \times 100으로 계산하였다.²⁰⁾

돌연변이원에 대한 genistein 농도별 억제효과는 ANOVA test(one-side)로서 분석하였으며 $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$, $\alpha = 0.05$ 에서 검증하였다.²¹⁾

결과 및 고찰

1) Genistein에 대한 lethal test와 돌연변이 유발 빈도 조사

*Drosophila melanogaster*의 wing hair spot 검출계로 변이원들(Trp-P-2, MNNG)에 의한 체세포 염색체 돌연변이 유발에 미치는 genistein의 영향을 조사하기 위해, 먼저 genistein을 단독처리하여 독성 효과가 나타나지 않는 농도의 범위를 알아보고 그 농도범위내에서 체세포 염색체 돌연변이 유발 정도를 조사하였다.

예비실험에 있어서 heterozygous 3령기 유충(*mwh/+*)이 50개체씩 들어있는 vial에 5, 10, 12, 15, 20%로 genistein을 처리한 후 생존하는 개체의 수는 genistein의 농도가 증가함에 따라서 감소하는 경향성을 보였다. 그리고, probit analysis로 계산된 반치량에 해당하는 LD₅₀값은 10.7 \pm 0.7% 였다.

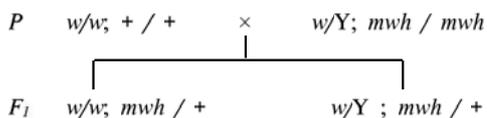


Fig. 1. Mating scheme for obtaining the heterozygous (*mwh/+*) larvae.

Genistein의 체세포 염색체 돌연변이원성을 조사한 결과는 Yun 등²²⁾의 보고에서와 같고 본 실험에서의 control (DMSO 2%)의 돌연변이 유발 정도는 Graf 등¹⁴⁾의 조사에서 염색체상 결실이나 불분리 등에 의한 small spot 유발 빈도 0.200 ~ 0.333과 염색체 사이의 재조환에 의한 large spot 유발빈도가 0.017 ~ 0.062였다는 실험결과와 유사하였다. Genistien (5 ~ 15%)에 노출된 배지에서 성장 우화한 성체의 날개에 나타난 small spots, large spots 그리고 전체 spot 유발 빈도는 Frei와 Würbler¹⁹⁾의 통계방법으로 분석하여 볼 때, 대조구(DMSO 2%)와 전연 차이를 보이지 않았다.

이러한 결과들은 본 실험조건하에서는 genistein이 염색체상의 불분리, 결실 또는 재조환 등을 포함하는 돌연변이를 유발하지 않았다는 것을 의미한다. 따라서, 각종 mutagen과 genistein 혼합실험에 있어서는 genistein 10%를 중간 농도로 두고 5, 10 및 15%의 농도를 사용하였다.

2) Trp-P-2 처리에 대한 genistein의 돌연변이 유발억제 효과

Trp-P-2는 구운 생선이나 튀긴 쇠고기 등의 단백질 내 tryptophan 가열에 의한 탄 부분에서 발견되는 heterocyclic amines (HAs)들 중의 하나이며 여러 동물들에 있어서 강력한 간접돌연변이원으로 알려져 있다.²³⁾

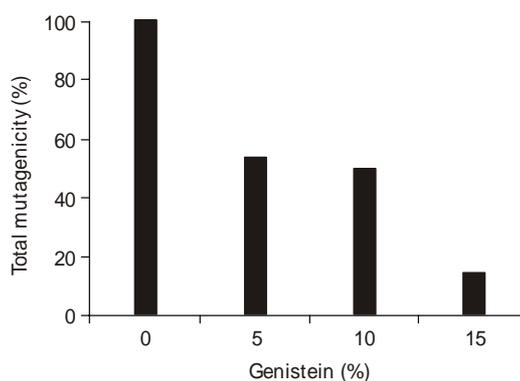


Fig. 2. Effect of genistein on the mutagenicity induced by Trp-P-2 3 mg/ml in the *Drosophila* wing spot system (mwh/+).

Fig. 2는 Trp-P-2 3 mg/ml에 대한 genistein 농도 별 혼합처리 결과로서 체세포 유사분열과정동안 염색체상의 결실이나 불분리 등에 의한 small spot 유발의 경우 genistein 농도가 증가할수록 억제율도 증가하였는데, 특히 genistein 15% 혼합처리에서 대조구와 비교하여 돌연변이 유발빈도 차이가 없을만큼 96.4% 정도로 높은 억제율을 보였다. 염색체 재조환에 의한 large spot 유발 억제율도 각각 96.5%, 70.2%, 70.2%로 70% 이상의 높은 억제 효과를 보였다. 전체 mwh spot 유발 억제는 genistein 5% 혼합처리에서 약

Table 1. Frequencies of mutation and antimutagenic effect detected in the *Drosophila* wing spot test after combined treatment with Trp-P-2 4 mg/ml and genistein

Exposure dose		Spots/wing* Statistical diagnosis [†]			
Trp-P-2 (mg/ml)	Genistein (%)	Small mwh spots (1 ~ 2 cells)	Large mwh spots (>2 cells)	Total mwh spots	
0	0	300	0.173 (52)	0.027 (8)	0.200 (60)
4	0	60	0.483 (29)+	0.033 (2)i	0.517 (31)+
4	5	60	0.433 (26)+ [16.1] [‡]	0.033 (2)i [0.0]	0.467 (28)+ [15.8]
4	10	60	0.250 (15)i [75.3]	0.083 (5)+ [-]	0.333 (20)+ [57.9]
4	15	60	0.283 (17)i [64.5]	0.133 (8)+ [-]	0.417 (25)+ [31.6]

*No. of spots in parenthesis. [†]Statistical diagnosis according to Frei and Würbler (1988): +, positive; -, negative; i, inconclusive; m, multiplication factor. Kastenbaum-Bowman tests, one sided; probability levels: $\alpha=\beta=0.05$.

[‡]Inhibition by Genistein (%): Based on the control-corrected frequencies of clone formation per 24400 cells, approximate number of cells examined per wing, (Clone/wings/24400), the percentages of inhibition by genistein were calculated as follows: [(Trp-P-2 alone-Trp-P-2 plus Genistein)/Trp-P-2 alone]×100, (Abraham, 1994).

Table 2. Frequencies of mutation and antimutagenic effect detected in the *Drosophila* wing spot test after combined treatment with Trp-P-2 5 mg/ml and genistein

Exposure dose		No. of wings	Spots/wing* Statistical diagnosis [†]			
Trp-P-2 (mg/ml)	Genistein (%)		Small <i>mwh</i> spots (1 ~ 2 cells)	Large <i>mwh</i> spots (>2 cells)	Total <i>mwh</i> spots	
	0	0	300	0.173 (52)	0.027 (8)	0.200 (60)
5	0		60	0.567 (34)+	0.117 (7)+	0.683 (41)+
5	5		60	0.367 (22)+ [50.8] [‡]	0.083 (5)+ [37.0]	0.450 (27)+ [48.3]
5	10		60	0.367 (22)+ [50.8]	0.083 (5)+ [37.0]	0.450 (27)+ [48.3]
5	15		60	0.350 (21)+ [55.1]	0.117 (7)+ [0.0]	0.467 (28)+ [44.8]

46.4%, 10%에서는 약 50% 그리고 15% 처리에서의 경우에서 약 85.7%의 억제율을 보여 genistein 혼합처리 농도증가에 따라 억제율이 일정하게 증가하였음을 알 수 있었다.

Table 1은 Trp-P-2 4 mg/ml에 대한 genistein 농도별 혼합처리 결과이다. Small spot 유발 억제율은 genistein 5% 혼합처리에서 16.1%였고, genistein 10, 15% 혼합처리에서는 75.3%, 64.5%로 약 65% 이상의 높은 억제 효과를 보였다. 그러나 Trp-P-2 4 mg/ml 단독처리구의 large spot 유발빈도가 0.033으로 control과 차이가 없어 large spot 유발에 대한 억제 정도를 알 수 없었지만 혼합된 genistein 농도가 증가할수록 large spot의 유발이 다소 관찰되었다. 전체 *mwh* spot 유발에서는 genistein 농도별 혼합처리에 따라 15.8%, 57.9% 및 31.6%의 억제율을 보였다.

Table 2는 Trp-P-2 5 mg/ml에 대한 genistein 농도별 혼합처리 결과로써 small spot 유발 억제율은 혼합 genistein의 농도에 따라 50.8 ~ 55.1% 정도였다. 그리고 large spot 유발 억제율은 genistein 5%와 10% 농도처리구에서 약 37%였다. 전체 *mwh* spot 유발에 있어서는 genistein 농도별 혼합처리에 따라 5, 10% 처리구에서는 48.3%, 15% 처리구에서는 44.8%의 억제율을 보였다.

이러한 결과에서 알 수 있는 바와 같이, Trp-P-2에 대한 genistein의 영향은 small spot 유발의 경우 genistein 농도가 높아질수록 억제효과가 커졌으나, large spot 유발 억제는 없거나 낮아지는 경향을 보였다. 전체 돌연변이 유발에서 볼 때, genistein의 Trp-P-2에 대한 영향은 첨가한 genistein의 농도 증가

에 따라 돌연변이 유발 억제 효과도 15.8 ~ 85.7%로 크게 나타났다.

3) MNNG 처리에 대한 genistein의 돌연변이 유발 억제 효과

본 실험에 사용된 MNNG는 nitroso compound에 속하고 mono-functional alkylating agent로서 여러 실험 동물들에서 각종 암 연구에 많이 이용되고 있다.²⁴⁾ 이들의 발암 작용은 핵산의 alkylation과 같은 DNA염기배열에 유전적 이상을 일으키는 작용 특히, GC→AT로의 transition에 주로 관여하며 낮은 빈도의 frameshift형 변이, amino acid의 nitroamino 화 등 주로 DNA정보 발현에 이상을 일으키는 직접 돌연변이원이다.²⁵⁾

Fig. 3은 MNNG 2 mg/ml에 대한 genistein 농도별 혼합처리 결과이다. Fig에서 볼 수 있는 바와같이

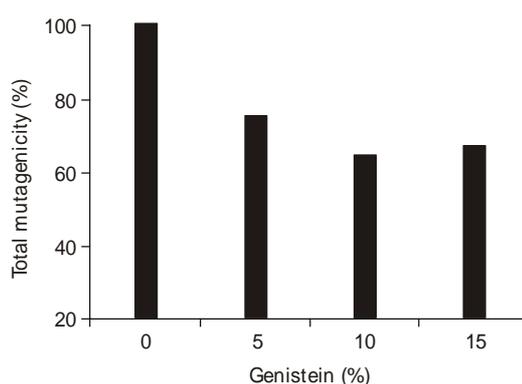


Fig. 3. Effect of genistein on the mutagenicity induced by MNNG 2 mg/ml in the *Drosophila* wing spot system (*mwh*/+).

Table 3. Frequencies of mutation and antimutagenic effect detected in the *Drosophila* wing spot test after combined treatment with MNNG 3 mg/ml and genistein

Exposure dose		No. of wings	Spots/wing* Statistical diagnosis [†]		
MNNG (mg/ml)	Genistein (%)		Small <i>mwh</i> spots (1 ~ 2 cells)	Large <i>mwh</i> spots (>2 cells)	Total <i>mwh</i> spots
0	0	300	0.173 (52)	0.027 (8)	0.200 (60)
3	0	60	0.717 (43)+	0.717 (43)+	1.433 (86)+
3	5	60	0.683 (41)+ [6.1] [‡]	0.450 (27)+ [38.6]	1.133 (68)+ [24.3]
3	10	120	0.575 (68)+ [27.6]	0.558 (67)+ [22.9]	1.125 (135)+ [25.0]
3	15	60	0.550 (33)+ [30.7]	0.677 (40)+ [7.2]	1.217 (73)+ [17.6]

[‡]Inhibition by Genistein (%): Based on the control-corrected frequencies of clone formation per 24400 cells, approximate number of cells examined per wing, (Clone/wings/24400), the percentages of inhibition by genistein were calculated as follows: [(MNNG alone-MNNG plus Genistein)/MNNG alone]×100, (Abraham, 1994).

small spot와 large spot를 종합한 전체 *mwh* spot에서, 본 농도하의 돌연변이 유발 억제율은 genistein 5% 혼합처리의 결과에서는 약 23%, 10%에서는 약 34% 그리고 15% 처리에서의 경우에서 약 32.1%의 억제율을 보였다.

Table 3은 MNNG 3 mg/ml에 대한 genistein 농도별 혼합처리 결과이다. Small spot 유발 억제율은 MNNG 2 mg/ml 경우보다 높은 6.1 ~ 30.7% 정도였다. 그리고 large spot 유발은 genistein 15%를 혼합했을 때 약 7.2% 정도의 돌연변이 유발억제율을 보였으나 오히려 genistein 5% 혼합처리의 경우가 약 38.6%로 억제율이 높았다. 전체 *mwh* spot 유발은 genistein 농도별 혼합처리에 따라 각각 24.3%, 25%, 17.6%의 억제율을 보였다.

Table 4 는 MNNG 4 mg/ml에 대한 genistein 농도별 혼합처리결과로서 small spot 유발 억제율은 10.1 ~ 48% 정도로 MNNG 3 mg/ml 경우보다 높았다. 그리고 large spot 유발 억제율은 30.5%, 7.6% 및 15.3%였다. 전체 *mwh* spot 유발은 genistein 농도별 혼합처리에 따라 각각 21.7%, 21.7%, 29.3%의 억제율을 보였다.

이러한 결과에서 알 수 있듯이, MNNG에 대한 genistein의 영향은 small spot 유발의 경우 genistein 농도가 높아질수록 억제효과가 커졌으나, large spot 유발 억제는 낮아지는 경향을 보였다. 한편, 전체적인 돌연변이 유발에서 볼 때, Trp-P-2 에 대한 돌연변이 유발 억제 효과 약 15.8 ~ 85.7%와 비교하여 genistein 의 MNNG에 대한 영향은 첨가한 genistein 농도 증가

Table 4. Frequencies of mutation and antimutagenic effect detected in the *Drosophila* wing spot test after treatments combined with MNNG 4 mg/ml and genistein

Exposure dose		No. of wings	Spots/wing* Statistical diagnosis [†]		
MNNG (mg/ml)	Genistein (%)		Small <i>mwh</i> spots (1 ~ 2 cells)	Large <i>mwh</i> spots (>2 cells)	Total <i>mwh</i> spots
0	0	300	0.173 (52)	0.027 (8)	0.200 (60)
4	0	120	0.833 (100)+	0.900 (108)+	1.733 (208)+
4	5	60	0.767 (46)+ [10.1] [‡]	0.633 (38)+ [30.5]	1.400 (84)+ [21.7]
4	10	60	0.567 (34)+ [40.4]	0.833 (50)+ [7.6]	1.400 (84)+ [21.7]
4	15	60	0.517 (31)+ [48.0]	0.767 (46)+ [15.3]	1.283 (77)+ [29.3]

에 상관없이 돌연변이 유발 억제율은 약 17.6 ~ 34%로서 Trp-P-2에 비하여는 다소 낮은 억제율을 나타내었다.

이상의 결과는 된장, 콩된장, 청국장, 미소 및 콩의 메탄올 추출물의 MNNG에 대한 돌연변이 유발 억제 조사에서 AFB₁에 비해 돌연변이 억제효과가 다소 낮게 나타났다는 연구결과²⁶⁾와 유사하였고, 어성초와 케일 추출물의 MNNG에 대한 억제도 직접돌연변이원 보다는 간접돌연변이원에서 돌연변이가 더 억제되는 경향을 보였다.²⁴⁾ 이러한 경향에 대하여 Choi등²⁴⁾과 Ham등²⁷⁾은 직접 돌연변이원에 노출 될 경우는 곧 바로 염색체 등과 같은 유전물질의 상해를 초래하지만, 간접 돌연변이원은 대사의 과정에서 최종 변이 유발 물질로의 전환에 따르는 효소계의 많은 경로들이 돌연변이 유발을 차단할것으로 생각된다고 하였다.

지금까지 genistein에 대한 많은 연구들을 볼 수 있는데, *in vitro*에서 Okura등²⁸⁾과 Markovits등¹¹⁾은 DNA 골격에 일시적인 분열을 야기시켜 복제 전사, 재조합, 전좌 같은 유전적 과정을 유도하는 topoisomerase II 활성을 저해한다고 보고하였고, Akiyama등¹⁰⁾은 cell growth에 중요한 역할을 하는 protein tyrosine kinase를 억제하였다고 발표하였다. Zwiller등²⁹⁾은 proto-oncogene인 *c-jun*와 *c-fos* 발현을 억제한다고 보고하였으며 암세포 증식과 신혈관 생성을 저해했다는 결과를 Fotsis등³⁰⁾이 보고하였다. 그리고 Monti와 Sinha³¹⁾와 Peterson등^{32,33)}은 estrogen 수용체(ER)에 경쟁적으로 결합함으로써 antiestrogen 활성을 나타내어 유방암 세포의 성장을 억제하며, 또한 유방암과 같은 hormone 의존성인 전립선암 세포 성장을 억제한다고 보고한 바 있다. 그외에도 Yanagihara등³⁴⁾은 hormone 비의존적인 위암 세포증식도 억제하였다는 보고를 하였고 genistein이 cell cycle 중의 G₂-M기에서 세포 증식을 저지한다는 기작에 관한 연구가 Matsukawa등³⁵⁾과 Choi등^{36,37)}에 의해 보고되었다. 또한 *in vivo*에서 genistein은 유방암을 유발시킨 SD rat 암컷 실험에서 chemoprevention 활성을 발휘하였고,³⁸⁾ neonatal genistein 또한 유방암을 억제하였다는 발표가 있기도 하였다.³⁹⁾

여러 실험들에서 genistein 이 돌연변이 억제 및 여러 종류의 암에 대해 항암 효과를 가지고 있음을 알 수 있는데,⁴⁾ genistein은 콩에 풍부하게 존재하므로 부작용이 없고 유전적 독성을 억제하며 적은 비용 및 구강 섭취가 가능하고 활동기작이 알려진 chemopreventive

agents^{2,40)}로서 콩음식을 통한 genistein 섭취는 돌연변이 유발을 억제하고 발암성을 예방하는 방편이 될 것으로 사료된다.

*Drosophila*를 이용한 wing spot 검출계는 화학물질, complex mixture 또는 순수 화학물의 유전적 독성에 대한 정보뿐만 아니라 chemoprevention agents에 의한 유전적 독성변화 연구에 유용함을 알 수 있었고, 이 검출계를 이용한 본 실험에서 genistein은 각종 돌연변이원에 의해 유도된 체세포 염색체상의 변이에 대하여 유의적인 항돌연변이 효과가 있는 것으로 확인되었다.

결 론

본 연구는 Trp-P-2 및 MNNG에 의하여 유발되는 체세포 돌연변이에 대한 genistein의 돌연변이 유발억제 효과를 조사하기 위하여, *in vivo* 돌연변이 검출계인 *Drosophila* wing spot test 계를 사용하여 수행하였다. 이런 목적으로, heterozygous (*mwh*+) 3령기 유충에 돌연변이원 단독처리 또는 돌연변이원과 genistein의 혼합처리를 실시하여 성체로 분화한 후 날개에 나타난 강모에 대한 mutant clone 종류와 빈도로 체세포 돌연변이를 분석하였다. Genistein자체(5 ~ 15%)는 돌연변이원성을 나타내지 않았으며, Trp-P-2에 대한 genistein의 영향은 염색체 결실 및 불분리에 의한 small spot 유발의 경우 genistein 농도가 높아질수록 억제효과가 커졌으나, 염색체 재조환에 의한 large spot 유발 억제는 낮아지는 경향을 보였다. 전체 돌연변이 유발에서 볼 때, 첨가한 genistein의 농도 증가에 따라 돌연변이 유발 억제 효과도 약 15.8 ~ 85.7%로 크게 나타났다. MNNG의 경우, 염색체 결실 및 불분리에 의한 small spot 유발은 genistein 농도가 높아질수록 억제효과가 커졌으나, 염색체 재조환에 의한 large spot 유발 억제는 낮아지는 경향을 보였다. 전체 돌연변이 유발에서 볼 때, 첨가한 genistein 농도 증가에 상관없이 돌연변이 유발 억제는 약 17.6 ~ 34%로 일정하며 다소 낮은 억제율을 보였다. 이상의 결과에서와 같이 genistein의 항돌연변이 효과는 직접돌연변이원보다 간접돌연변이원에서 그 정도가 크게 나타나고 있음을 알 수 있었다.

본 실험의 결과에서 genistein이 각종 돌연변이원들에 의해 유도된 체세포 염색체상의 변이에 대하여 유의적인 항돌연변이 효과를 나타내었고, 이는 DNA상해

요인에 의한 돌연변이 및 암 유발과정에 저해 효과를 나타낼 수 있음을 간접적으로 시사하는 것으로 사료된다.

참고 문헌

- 1) Ferguson LR. Chemopreventive agents in the diet. *Mutation Res* 1994; 307: 395-410.
- 2) Morse MA, Stoner GD. Cancer chemoprevention: Principle & prospects. *Carcinogenesis* 1993; 14(9): 1737-1746.
- 3) Greenward P. Chemoprevention of cancer. *Scientific American* 1996; 275(3): 96-99.
- 4) Messina M, Persky V, Serchell DRK, Barnes S. Soy intake and cancer risk: A review of the *in vitro* and *in vivo* data. *Nutr Cancer* 1994; 21: 113-131.
- 5) Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, Hildesheim A, Nomura AMY, West DW, Wu-williams AH, Kolonel LN, Horn-Ross PL, Rosenthal JF, Hyer MB. Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85(22): 1819-1827.
- 6) Zava DT, Duwe G. Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells *in vitro*. *Nutr Cancer* 1997; 27(1): 31-40.
- 7) Coward L, Barnes NC, Setchell DRK, Barnes S. Genistein, Daidzein and their β -glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *J Agric Food Chem* 1993; 41: 1961-1967.
- 8) Lee JS, Cheigh HS. Composition and antioxidative characteristics of phenolic fractions isolated from soybean fermented food. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 1997; 26(3): 383-389.
- 9) Peterson G, Barnes S. Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cells: Independence from estrogen receptors and the multi-drug resistance gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 179(1): 661-667.
- 10) Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe SI, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y. Genistein a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinase. *J Biol Chem* 1987; 262(12): 5592-5595.
- 11) Markovits J, Linassier C, Fosse P, Couprie J, Pierre J, Jacquemin-Sablon A, Saucier JM, Le Pecq JB, Larsen AK. Inhibitor effects of the tyrosine inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Res* 1989; 49: 5111-5117.
- 12) Würgler FE, Vogel EW. *In vivo* mutagenicity tests using somatic cells of *Drosophila melanogaster*. In: Chemical Mutagens, Vol. 10 (F.J. de serres, editor) pp. 1-72, New York, Plenum Press, 1985.
- 13) Sato T, Nishino H, Nagase H, Niikawa M. Bio-antimutagen detection method with wing spot test by *Drosophila melanogaster*. *Jpn J Toxicol Environ Health* 1994; 40(6): 498-503.
- 14) Graf U, Würgler FE, Katz AJ, Frei HJ, Hall CB, Kale PG. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen* 1984; 6: 153-188.
- 15) Yoo MA, Ryo H, Todo T, Kondo S. Mutagenic potency of heterocyclic amines in the *Drosophila* wing spot test and its correlation to carcinogenic potency. *Japan J Cancer Res* 1985a; 76: 468-473.
- 16) SPSS Inc., pp. 1-999, New York, SPSS Inc., In: SPSS X user's guide, 1986.
- 17) Frei H, Clements J, Howe D, Würgler FE. The genotoxicity of the anticancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res* 1992; 279: 21-33.
- 18) Graf U. The relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Experientia* 1995; 51: 168-173.
- 19) Frei H, Würgler FE. Statical methods to whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Res* 1988; 203: 297-308.
- 20) Abraham SK. Antigenotoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination. *Mutagenesis* 1994; 9(4): 383-386.
- 21) Jerrold HZ. Multisample hypotheses: The analysis of variance. In: eds, by Englewood Cliffs Biostatistical analysis, pp. 162-184, New Jersey, Prentice-Hall International, Inc., 1984.
- 22) Yun HS, Yoo MA, Park KY, Lee WH. Antimutagenic effect of genistein toward environmental mutagen. *J Korean Environ Sci Soc* 1999; 8(5): 569-574.
- 23) Layton DW, Bogen KT, Knize MG, Hatch FT, Ohnson JVM, Felton JS. Cancer risk of heterocyclic amines in cooked foods: an analysis and implications for research. *Carcinogenesis* 1995; 16(1): 39-52.
- 24) Choi YH, Park KY, Lee SM, Yoo MA, Rlee SH, Lee WH. Inhibitory effect of the fresh juice of Kale on the genotoxicity of Aflatoxin B₁. *Korean J Genetics* 1995;

- 17(3): 183-190.
- 25) McCann J, Choi E, Yamazaki E, Ames BN. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals. *Proc Nat Acad Sci* 1975; 72: 5135-5139.
 - 26) Lim SY. Studies of the antimutagenic and anticancer activities of Doenjang. *Ph. D. Dissertation, Pusan Nat Univ* 1997
 - 27) Ham SS, Han HS, Choi KP, Oh DW. Inhibitory effects of *Synurus deltoides* extracts on the mutagenesis induced by various mutagens. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 1997; 26(3): 528-533.
 - 28) Okura A, Hiroharu A, Hirofumi O, Tomoko Y, Yoshiaki M. Effect of genistein on topoisomerase activity and on the growth of [Val 12]Ha-ras-transformed NIH 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157(1): 183-189.
 - 29) Zwiller J, Sassone-Corsi P, Kakazu K, Boynton AL. Inhibition of PDGF-induced *c-jun* and *c-fos* expression by a tyrosine protein kinase inhibitor. *Oncogene* 1991; 6: 219-221.
 - 30) Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, Fleischmann G, Hase T, Montesano R, Svhweigerer L. Genistein, a dietary-derived inhibitor of *in vitro* angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 2690-2694.
 - 31) Monti E, Sinha BK. Antiproliferative effect of genistein and adriamycin against estrogen-dependent and -independent human breast carcinoma cell lines. *Anticancer Research* 1994; 14: 1221-1226.
 - 32) Peterson TG, Coward L, Kirk M, Falany CN, Barnes S. The role of metabolism in mammary epithelial cell growth inhibition by the isoflavones genistein and biochanin A. *Carcinogenesis* 1996; 17(9): 1861-1869.
 - 33) Peterson G, Barnes S. Genistein and biochanin A inhibit the growth of human prostate cancer cells but not epidermal growth factor receptor tyrosine autophosphorylation. *The Prostate* 1993; 22: 335-345.
 - 34) Yanagihara K, Akihiro Ito, Tetsuya Toge, Michitaka Numoto. Antiproliferative effects of isoflavones on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract. *Cancer Res* 1993; 53: 5815-5821.
 - 35) Matsukawa Y, Marui N, Sakai T, Satomi Y, Yoshida M, Matsumoto K, Nishino H, Aoike A. Genistein arrests cell cycle progression at G₂-M. *Cancer Res* 1993; 53: 1328-1331.
 - 36) Choi YH, Zhang C, Lee WH, Park KY. Genistein-induced G₂/M arrest is associated with the inhibition of cyclin B1 and the induction of p21 in human breast carcinoma cells. *Int J Oncol* 1998; 13(2): 391-396.
 - 37) Choi YH, Lee WH, Park KY, Zhang C. p53-independent induction of p21(WAF1/CIP1), reduction of cyclin B1 and G₂/M arrest by the isoflavone genistein in human prostate carcinoma cells. *Japan J Cancer Res* 2000; 91: 164-173
 - 38) Lamartiniere CA, Moore JB, Brown NM, Thompson R, Hardin MJ, Barnes S. Genistein suppresses mammary cancer in rats. *Carcinogenesis* 1995a; 16(11): 2833-2840.
 - 39) Lamartiniere CA, Moore JB, Holland M, Barnes S. Neonatal genistein chemoprevents mammary cancer. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995b; 208: 120-123.
 - 40) Abraham SK. Inhibition of *in vivo* genotoxicity by coffee. *Fd Chem Toxic* 1989; 27(12): 787-792.