

Galangin의 생체외 및 생체내 부정기 DNA합성 억제 효과

식품의약품안전청 국립독성연구소 유전독성과

김종원 · 한의식 · 엄미옥 · 박미선
이진주 · 정해관 · 오혜영

Inhibition Effects of Galangin against 2-AAF Induced *in vitro* and *in vivo* Unscheduled DNA Synthesis

Jong Won Kim, Eui Sik Han, Mi Ok Eom, Mi Sun Park,
Jin Joo Lee, Hai Kwan Jung and Hye Young Oh

Genetic Toxicology Division, National Institute of Toxicological Research, KFDA,
Seoul 122-704, Korea

Unscheduled DNA synthesis (UDS) test is well validated and known as one of genetic toxicity tests. UDS provides information as an indicative of DNA synthesis and DNA repair. The purpose of this study is that we would like to help for many researchers to evaluate test substances (drug, food additive and so on) correctly and its application to assess antimutagenic effect. For this purpose, according to SOP, we have performed *in vitro* and *in vivo* UDS test in male rat hepatocyte treated with 2-acetylaminofluorene (2-AAF) as a positive control compound. Thereafter, we have selected galangin which is one of anti-oxidants and flavonoids, and performed UDS test about galangin. And we have studied antimutagenic effect of galangin against 2-AAF using *in vitro* and *in vivo* UDS test in male rat hepatocyte. In the *in vitro* UDS test, 2-AAF showed significantly increase UDS from 10^{-8} M to 10^{-5} M. According to above results, we selected 10^{-6} M 2-AAF as a co-treatment concentration which was shown highest increase UDS. The percentage of UDS in treated all concentration of galangin was similar to that of negative control. When the galangin co-treated with 2-AAF, galangin inhibited 2-AAF-induced UDS up to 80%. In the *in vivo* UDS test, 2-AAF showed significantly increase UDS in 0.75, 7.5, 75 mg/kg. According to above results, we selected 75 mg/kg 2-AAF as a co-treatment concentration which was shown highest increase UDS. The galangin didn't show any increase compared with negative control in all doses. When the galangin co-treated with 2-AAF, galangin inhibited 2-AAF-induced UDS up to 83%.

Key Words: *in vitro* unscheduled DNA synthesis, *in vivo* unscheduled DNA synthesis, 2-acetylaminofluorene, Galangin

서 론

돌연변이물질/발암물질은 DNA 손상을 받게 되면 p53 등을 포함하는 여러 DNA 손상 반응 신호 전달 경로를 거쳐 세포의 생존여부를 결정하게 된다.¹⁾ DNA 손상에 의한 DNA 복구는 세포의 생존을 위한 세포 및 개체의 일반적인 현상이다. DNA 손상은 DNA adduct, strand break 등으로 대별되는데, 이러한 손상은 HPLC-ECD 또는 단일항체를 이용한 DNA adduct 측정법,²⁾ 알칼리성 단세포 전기영동 시험법,³⁾ 자매 염색분체 교환 시험법⁴⁾ 등에 의해 검출이 가능하다. 또한, 부정기 DNA합성 방법은 DNA 손상으로 인한 DNA 복구능을 측정함으로써 DNA 손상을 간접적으로 측정할 수 있는 유전독성시험법이다.^{5~10)} 이러한 부정기 DNA합성 방법은 세포와 동물사용에 따라 생체외 방법과 생체내 방법^{11,12)}으로 구분할 수 있으며, 측정방법에 따라 방사선동위원소법(autoradiography)과 액체섬광계수법(liquid scintillation counting method; LSC)으로 구분되어진다.

2-acetylaminofluorene (2-AAF)는 간 돌연변이물질/발암물질로서 잘 알려져 있다. 또한 OECD guideline 등에서 UDS 시험의 대표적인 양성대조물질로 제시하고 있다.¹¹⁾

Galangin은 항산화 플라보노이드로서, 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험에서 유전자 돌연변이 형성을 억제하고,^{13,14)} 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험 및 자매염색분체교환시험에서 염색체 손상을 억제하며,^{15,16)} 생체내 소핵시험에서 골수소핵 형성을 억제^{14,15)}하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 galangin의 2-AAF에 의한 DNA 손상 및 DNA 복구에 미치는 항돌연변이 효과를 연구하였다.

재료 및 방법

1) 재료

Galangin (CAS No. 548-83-4), 2-AAF (2-acetylaminofluorene, CAS No. 53-96-3), Collagenase type IV, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma Aldrich에서 구입하였으

며, Williams' medium E (WME), fetal bovine serum (FBS)은 GibcoBRL에서, [³H]-thymidine (70-86Ci/mM)은 Amersham에서 구입하였다.

배양 배지는 2.2 g NaHCO₃, 10 ml insulin (4 units/ml), 10 ml dexamethasone (100 mM), 1% penicillin/streptomycin, 5% FBS가 포함된 WME를 사용하였다. Perfusion buffer는 0.5 mM EGTA, 10 mM HEPES, 1% penicillin/streptomycin이 포함된 pH 7.2의 Ca⁺⁺-Mg⁺⁺ free Hank's balanced salt solution (HBSS)을, collagenase buffer는 collagenase 100 units/ml, 10 mM HEPES를 포함하는 pH 7.2의 비혈청 WME를 사용하였다.

2) 실험동물

실험동물은 식품의약품안전청의 청정시설내에서 생산 사육된 SPF (특정병원성부재) Sprague Dawley (SD) 수컷 랫트를 동물사육조건(온도 23 ±1°C, 습도 55±5%, 배기 10~18회/hr, 형광등 명암 12 hr cycle, 조도 300~500 Lux) 하의 폴리카보네이트 사육상자에서 사육하였으며, 1주일간의 순화사육 기간 동안에 관찰하여 체중이 180~220 g이며, 특이한 외형상의 문제점이 나타나지 않는 동물만 시험에 사용하였다. 사료는 신촌사료회사에서 실험동물사료를 구입하여 고압증기 멸균기에서 121°C, 15분간 멸균하였고, 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다.

3) Primary rat hepatocyte 분리 및 배양¹⁷⁾

수컷 SD계 rat에 pentobarbital sodium (2 ml/kg)을 복강 주사하여 마취시킨 후 간문맥에 21 G I.V. Catheter (녹십자의료공업)를 사용하여 perfusion buffer를 관류하였다. 이때 간 밑의 상대정맥 및 하대동맥을 절단하고 간에 분당 20 ml의 유속으로 "collagenase buffer" 200 ml를 관류하였다. 간을 절제하여 washing buffer로 세척 후 collagenase buffer 50 ml을 넣은 멸균 배양접시에 간을 옮겼다. 간세포를 작게 절단하고 40 Mesh (Sigma, USA)를 통과시킨 후 600 rpm으로 2분 동안 원심분리 하였다. 2~3회 반복하여 원심분리한 후 침전물을 배양배지에 현탁시켜, 간세포의 생존율을 트립판 블루 염색법에 의해 측정하였다. 세포수를 1×10⁶ cells/ml로 조정하여 rat tail collagen으로 전

처리된 6 well plate에 넣어 포화 습도 하에서 5% CO₂를 공급하는 37°C의 CO₂ incubator (Shel-lab 1845 TC, USA)에서 배양하였다. 4시간 후 부착되지 않은 세포를 제거해주기 위해 배지를 교환하였다.

4) 부정기 DNA합성 시험법

(1) 시험물질의 조제 및 처리: 시험물질은 처리 또는 투여직전에 조제하여 사용하였다. 음성대조군으로서 생체의 시험에서는 DMSO를 사용하였으며, 생체내 시험에서는 corn oil을 사용하였다. 생체의 시험에서 처리된 시험물질인 2-AAF와 galangin의 단독처리 및 병용처리는 최종부피가 0.5%를 초과하지 않는 용량을 18시간 동안 처리해 주었으며, 생체내 시험에서는 5 ml/kg이 되도록 1회 경구투여 하고 16시간 후에 harvest하였다.

(2) 세포독성시험: 생체의 시험에서는 본시험에서의 최고농도결정을 위하여 24시간 배양 후 시험물질 및 양성대조물질을 18시간 처리해 준 후 세포독성의 지표로서 생존율을 MTT assay¹⁸⁾ 및 트립판 블루 염색법으로 측정하였다. MTT assay는 96 well plate에 각 well (n=3)당 1×10⁶ cells/ml의 세포를 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건 하의 incubator에서 배양한 후 시험조건과 동일하게 처리하였다. 즉, 생체의 시험에서 2-AAF, galangin은 DMSO에 용해하였으며, 본시험에서와 동일한 조건인 18시간을 적용하였다. 2-AAF의 세포독성 시험은 10⁻⁴ M을 최고농도로 한 후 희석배율을 10으로 하여 5단계의 농도를 선정하였고, galangin은 자매염색분체교환시험에서의 연구 보고를 기초로 하여¹⁸⁾ 10µg/ml을 최고농도로 선정한 후 희석배율을 10으로 하여 4단계의 농도를 세포독성시험에 적용하였다. 처리시간 후 PBS로 씻어주고 배지를 교환하여 각 well당 10µl의 MTT 용액(5 mg/ml)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 4시간 동안 노출시켰다. 상층액을 제거하고 DMSO 150 µl를 넣은 다음 10분간 혼합하여 침전물을 용해시킨 후 microplate reader (E-max, Molecular Device, USA)를 사용하여 540 nm 및 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 시험결과는 세포를 배양하지 않은 well에서 측정된 흡광도에 대하여 보정하였으며, 흡광도는 시험물질이 처리되지 않은 대

조군과 비교하여 생존율로 변환하였다. 또한 hemocytometer를 이용한 트립판 블루 염색법도 병행하였다. 음성대조군으로 사용한 DMSO 최고농도는 배지의 0.5%를 초과하지 않았다.

생체내 시험에서 2-AAF, galangin은 투여직전 corn oil에 용해하였으며, 본시험에서와 동일한 투여 조건인 16시간을 적용하였다. 2-AAF는 0.75, 7.5, 75 mg/kg의 3단계의 농도를 선정하였다. Galangin은 0.25, 2.5, 25 mg/kg의 3단계의 농도를 선정하여 세포독성시험을 진행하였다. 투여부피는 동물체중당 5 ml/kg으로 하였다.

(3) 생체의 부정기 DNA합성 시험: 6 well plate에 1×10⁶ cells/ml로 분주하여 24시간 배양한 후, hydroxyurea가 포함된 배지에 18시간 동안 시험물질과 ³H-TdR을 함께 처리해 주었다. PBS로 2회 세척한 후 0.25% trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 수거하고 배지와 섞어 원심분리 하였다. 200 µl의 lysis buffer (0.1 M NaOH, 2% Na₂CO₃, 1% SDS)를 첨가하여 37°C, 30분간 반응시킨 후 96 well plate에 150µl의 cocktail solution (OptiPhase SuperMix, Wallac)과 25µl의 lysed sample을 넣어 15분간 혼합한 다음 beta counter (Liquid Scintillation & Luminescence Counter, Wallac)를 이용하여 측정하였다. DNA 양은 UV-VIS spectrophotometer (Milton Roy, Spectronic 1201, USA)를 이용하여 결정하였다.

(4) 생체내 부정기 DNA합성 시험: 시험물질은 투여직전에 조제하여 사용하였다. 간세포는 SD 수컷 rat에 2-AAF와 galangin을 1회 경구투여 후 16시간째에 도살하여 얻었다. 한 군당 3마리의 male rat를 사용하였으며, 분리되어 4시간 후 부착되어진 세포는 ³H-thymidine을 포함하는 배지에서 4시간 동안 배양한 후, DNA합성에 사용되지 않은 방사성 물질을 제거하기 위해 과량의 비표지된 thymidine이 포함된 배지에서 14시간 더 배양하였다. 세포 수거 이후의 과정은 생체의 시험과 동일하게 수행하였다.

(5) 통계처리 및 평가: 본 연구의 모든 실험 결과는 평균치와 표준편차를 계산하였고, 부정기 DNA합성률 측정에서 얻은 대조군과 실험군과의 차이는 student's t-test를 이용하여 유의성을 판정하였다.

결 과

1) 생체외 부정기 DNA합성 시험법

(1) 세포독성: 2-AAF, galangin은 DMSO에 용해하였으며, 본 시험에서와 동일한 조건인 18시간을 적용하였다. 2-AAF는 처리한 $10^{-8} \sim 10^{-4}$ M 농도에서 유의적인 세포독성을 발견할 수 없었다(Fig. 1). 따라서 부정기 DNA합성 시험에서도 동일한 조건을 적용하였다. Galangin은 0.01~1 μ g/ml의 3단계 농도에서는 유의적인 세포독성을 발견할 수 없었으나 최고농도인 10 μ g/ml에서는 세포독성을 나타내었다(Fig. 2). 2-AAF와 galangin의 병용처리시에는 2-AAF의 경우, 생체외 부정기 DNA합성 시험

에서 유의적인 양성의 결과를 보인 10^{-6} M을 적용하였고, galangin의 경우, 0.01~1 μ g/ml의 3단계 농도를 적용하였는데 병용처리한 모든 농도에서 유의적인 세포독성은 발견할 수 없었다(Fig. 3).

(2) 생체외 부정기 DNA합성 시험법: 2-AAF는 처리된 $10^{-8} \sim 10^{-5}$ M 농도에서 유의성 있고 재현성 있는 부정기 DNA합성을 증가시켰으나 적용한 최고농도인 10^{-4} M에서는 유의성 있는 증가가 유발되지 않았다(Fig. 4). Galangin은 처리된 0.01~1 μ g/ml의 모든 농도군에서 음성대조군과 비교하여 유의한 차이를 관찰할 수 없었다(Fig. 5). 2-AAF (10^{-6} M)와 병용처리된 galangin은 처리된 0.01~1 μ g/ml 농도범위에서 농도 의존적이고, 유의성 있는 증가를 보였으며, 최고 80%까지 억제하였다

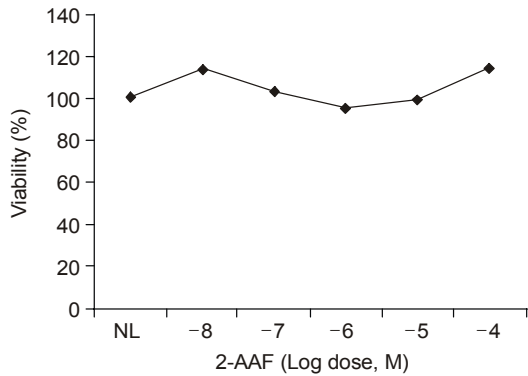


Fig. 1. Viability after 2-AAF treatment for 18 hrs in primary rat hepatocyte.

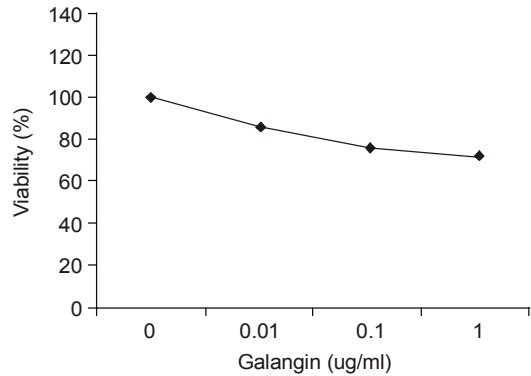


Fig. 3. Viability using liquid scintillation counting after galangin treatment for 18 hrs in primary rat hepatocyte.

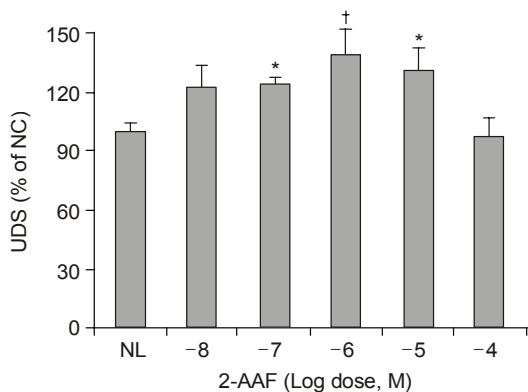


Fig. 2. Unscheduled DNA synthesis using liquid scintillation counting after 2-AAF treatment for 18 hrs in primary rat hepatocyte. *p<0.05, † p<0.01

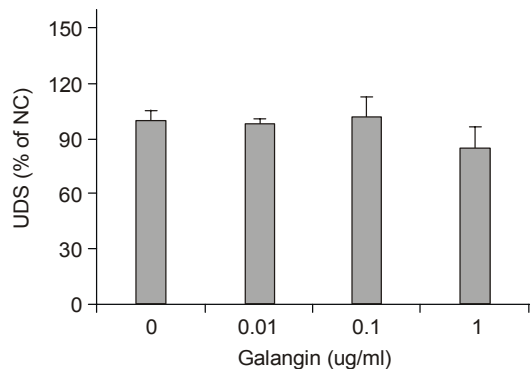


Fig. 4. Unscheduled DNA synthesis using liquid scintillation counting after galangin treatment for 18 hrs in primary rat hepatocyte.

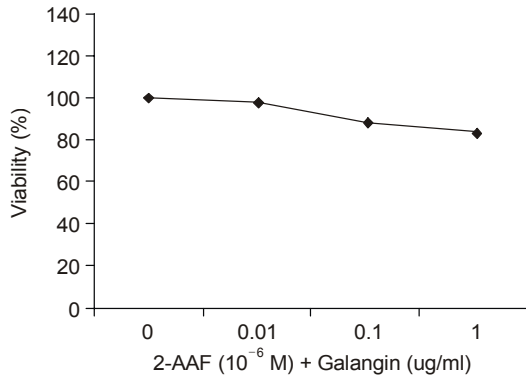


Fig. 5. Viability after galangin with 2-AAF (10⁻⁶ M) treatment for 18 hrs in primary rat hepatocyte.

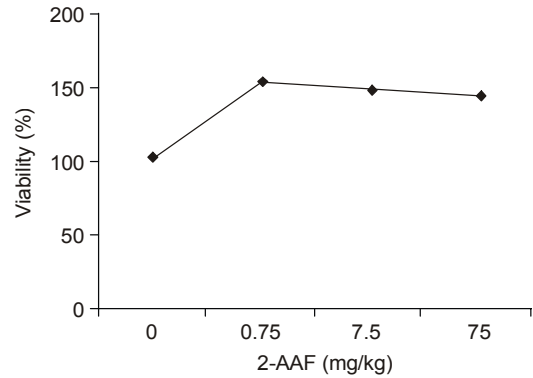


Fig. 7. Viability in primary hepatocyte after 2-AAF treatment for 16 hrs in Sprague Dawley male rat.

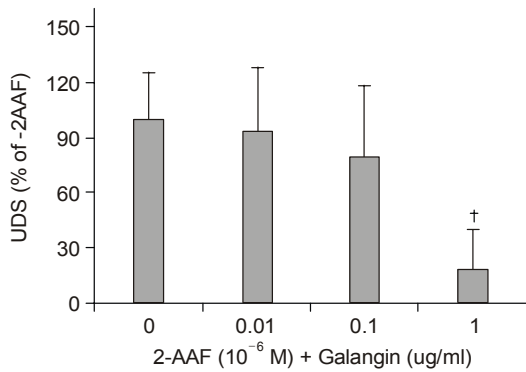


Fig. 6. Unscheduled DNA synthesis using liquid scintillation counting after galangin with 2-AAF (10⁻⁶ M) treatment for 18 hrs in primary rat hepatocyte. † p<0.01

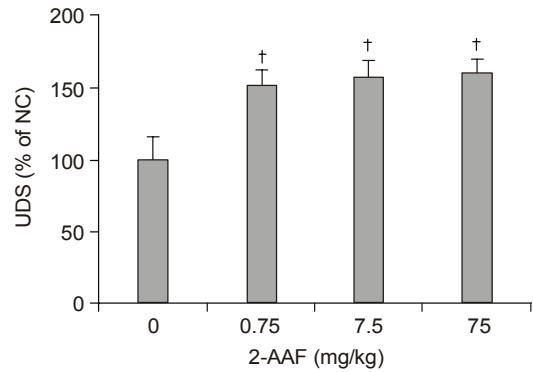


Fig. 8. *in vivo* Unscheduled DNA synthesis using liquid scintillation counting in primary hepatocyte after 2-AAF treatment for 16 hrs in Sprague Dawley male rat. *p<0.05, † p<0.01

(Fig. 6). 재현성 확인을 위한 반복시험에서도 같은 결과를 나타내었다.

2) 생체내 부정기 DNA합성 시험법

(1) 세포독성: 2-AAF, galangin은 투여직전 corn oil에 용해하였으며, 본시험에서와 동일한 투여 조건인 16시간을 적용하였다. 2-AAF는 처리한 0.75, 7.5, 75 mg/kg의 농도에서 유의적인 세포독성을 발견할 수 없었다(Fig. 7). 따라서 부정기 DNA합성시험에서도 동일한 조건을 적용하였다. Galangin은 시험에 적용한 0.25, 2.5, 25 mg/kg의 농도에서 음성대조군과 비교하여 유의한 차이를 관찰할 수 없었다(Fig. 8). 2-AAF와 galangin의 병

용처리시에는 2-AAF의 경우, 생체내 부정기 DNA 합성 시험에서 유의적인 양성의 결과를 보인 75 mg/kg을 적용하였고, galangin의 경우, 0.25, 2.5, 25 mg/kg의 3단계 농도를 적용하였는데 병용처리한 모든 농도에서 유의적인 세포독성은 발견할 수 없었다(Fig. 9).

(2) 생체내 부정기 DNA합성 시험법: 2-AAF는 투여한 0.75, 7.5, 75 mg/kg 농도군에서 음성대조군과 비교하여 각각 152%, 156%, 159%의 유의성 있는 증가를 보였으며(Fig. 10), Galangin은 투여된 모든 농도군에서 세포독성이 IC₅₀를 보이지 않아 2-AAF (75 mg/kg)와 병용처리된 galangin의 최고

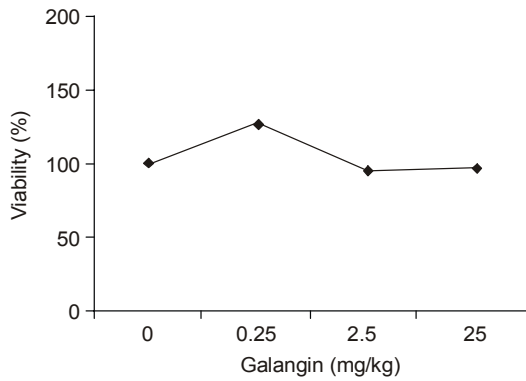


Fig. 9. Viability in primary hepatocyte after galangin treatment for 16 hrs in Sprague Dawley male rat.

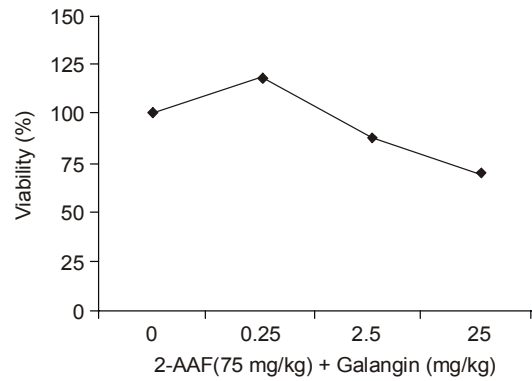


Fig. 11. Viability in primary hepatocyte after galangin with 2-AAF (75 mg/kg) treatment for 16 hrs in Sprague Dawley male rat.

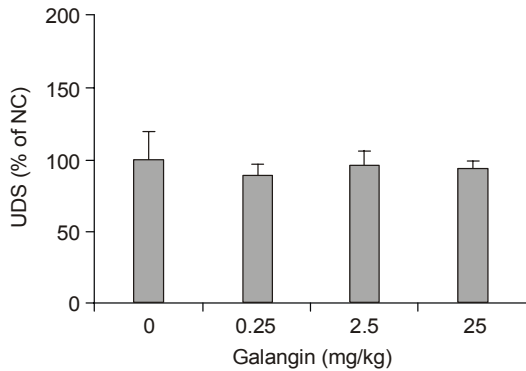


Fig. 10. *in vivo* Unscheduled DNA synthesis using liquid scintillation counting in primary hepatocyte after galangin treatment for 16 hrs in Sprague Dawley male rat. * $p < 0.05$, † $p < 0.01$

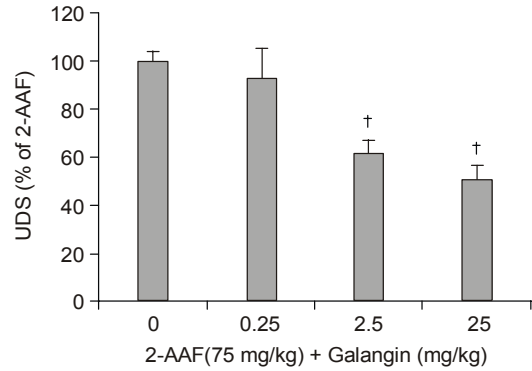


Fig. 12. *in vivo* Unscheduled DNA synthesis using liquid scintillation counting in primary hepatocyte after galangin with 2-AAF (75 mg/kg) treatment for 16 hrs in Sprague Dawley male rat. † $p < 0.01$

농도를 25 mg/kg을 최고농도로 하여 생체내 부정기 DNA합성시험을 진행하였다(Fig. 11). 2-AAF (75 mg/kg)와 galangin의 병용투여된 0.25, 2.5, 25 mg/kg의 3농도군은 2-AAF 대조군과 비교하여 각각 89%, 35%, 17%의 부정기 DNA합성을 보였다. Galangin은 2-AAF에 의해 유도된 부정기 DNA합성을 최고 83%까지 억제하였다(Fig. 12).

고 찰

UDS 시험법은 투여된 동물 또는 처리된 세포에서 DNA 복구를 유발할 수 있는 물질을 검색할

수 있는 시험방법이다. UDS는 DNA 손상에 의한 DNA 복구의 지표가 되며, 1~3 bases의 손상 검출에는 감수성이 떨어지지만, 20~30 bases의 손상을 유발하는 물질의 검출에는 유용하다. 그러나 UDS 반응은 절단된 DNA 염기 및 손상된 부위에서의 DNA 복구 정도에 의해 결정되기 때문에 절단 복구 반응에 의해 수복되어지지 않는 DNA 손상은 검출할 수 없는 한계를 가지고 있다. UDS 시험은 돌연변이 활성화에 대한 특정 정보가 없는 시험물질에 대한 genome에서의 DNA 손상에 대한 정보를 제공해 줄 수 있다. DNA 손상이 유발되면 대부분은 절단 복구 반응에 의해 복구되어

지는데, 이때 복구에 사용되어진 ^3H TdR을 자동 방사표지법 또는 액체섬광계수법으로 측정함으로써 복구능을 검출한다. 변형된 액체섬광계수법에서는 G1기의 세포가 S기로 들어가는 간섭을 막을 수 있도록 hydroxyurea를 처리한 방법을 사용하며, 자동 방사표지법은 S기의 세포에 간섭을 받을 수 있는 액체섬광계수법보다 민감하다고 알려져 있다.

UDS 시험에 사용되어지는 동물 종으로서는 일반적으로 rat를 많이 사용하고 있지만, mouse를 이용하기도 하며, 조직장기로서는 간세포, 신장세포, 피부세포, 사람유래 간세포 등이 사용되어지고 있다. 간세포는 흡수되어지는 많은 promutagen 또는 procarcinogen을 대부분 활성형으로 대사시킬 수 있어, 유전독성 연구에 많이 이용되는 조직 중의 하나이다. 그리고 간세포는 분열하지 않고, 현저하게 복제하지 않기 때문에 UDS 측정에 적합하며 *in vitro* 시험에서 대사활성계를 적용하지 않아도 되는 장점이 있다. 이와 관련하여 일차배양 간세포에서 UDS 유발과 돌연변이원성 및 발암성의 높은 상관관계에 관한 연구가 많이 수행되어져 있다.

한편, 2-AAF는 OECD 가이드라인 등에서 제시하는 UDS 시험의 양성대조물질로서 가장 많이 사용되어지는 간 유전독성 및 간 발암물질이다. 생체내 시험에서 UDS 반응은 물질의 특성에 따라 N-nitrosodimethylamine (CAS No. 62-75-9) 등의 초기 표본 시간(2~4 hours)과 2-AAF 등의 후기 표본 시간(12~16 hours)으로 나눌 수 있다. 본 연구에서는 생체내 UDS 시험의 경우에는 2-AAF를 16시간 적용한 방법을 사용하였으며 생체의 UDS 시험에서는 18시간 적용한 방법을 사용하였다. 이는 1999년에 국립독성연구소에서 개정한 표준작업지침서에서 제시하는 유전독성시험법 중 DNA 손상과 DNA 복구를 지표로 하는 생체의 및 생체내 부정기 DNA합성 시험법을 적용한 것으로서 국제적으로 널리 사용하고 있는 연구 방법을 수행한 것이며, 이를 통하여 유전독성시험을 올바르게 평가하고 신뢰성을 확보하는 연구의 토대가 되었다고 사료된다.

항산화 효과가 있는 플라보노이드인 galangin은 항돌연변이 물질로서 미생물을 이용한 복귀돌연변이 시험에서 유전자 돌연변이 형성 억제,^{13,14)}

포유류 배양세포를 이용한 염색체이상 시험 및 자매염색분체교환 시험에서 염색체 손상성의 억제,^{15,16)} 및 생체내 소핵 시험에서 골수소핵 형성을 억제^{14,15)}하는 것으로 알려졌다. 본 연구에서는 2-AAF에 의해 유도된 생체의 및 생체내 부정기 DNA합성이 galangin에 의해 억제되는 것을 확인하였는데, 이와 같은 돌연변이 억제능은 2-AAF에 의한 DNA 손상을 galangin이 차단하거나 저해시킴으로써 DNA 복구가 감소한 결과로 사료된다.

현재까지 알려진 IARC (International Agency for Research on Cancer)에서 발표한 사람 발암물질의 대부분은 돌연변이 유발물질로 밝혀져 있으며, 특정 부분에서 발생한 돌연변이가 악성종양의 원인이라는 많은 연구결과들은 암화와 돌연변이간의 상호 연관성을 뒷받침해주고 있다. 따라서 돌연변이 유발기전과 그 복구 기전을 규명하는 것은 암을 극복하는 중요한 정보를 제공해 줄 것으로 생각되어진다.¹⁹⁾ 이와 관련하여 DNA 손상, DNA 복구 및 세포사멸 연구가 국내외^{20~23)}에서 활발히 진행되고 있으며, 향후 DNA 손상으로 인한 DNA 복구에 관여하는 유전자 및 단백질에 대한 연구가 더욱 진행되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

- 1) 양성대조물질로서 2-AAF를 선정하여 primary rat hepatocytes를 이용한 생체의 부정기 DNA합성 시험법 및 생체내 부정기 DNA합성 시험법을 수행하였다.
- 2) 간 유전독성 및 간 발암물질인 2-AAF는 생체의 및 생체내 부정기 DNA합성 시험에서 유의성 있는 증가를 나타내었다.
- 3) 항산화 효과가 있는 플라보노이드인 galangin은 생체의 및 생체내 부정기 DNA합성 시험에서 음성대조군과 비교하여 유의성 있는 증가를 나타내지 못하였다.
- 4) 생체의 부정기 DNA합성 시험에서 galangin은 2-AAF와 병용 처리시 2-AAF에 의해 유도된 부정기 DNA합성을 최고 80%까지 억제하였다.
- 5) 생체내 부정기 DNA합성 시험에서 galangin은 2-AAF와 병용 처리시 2-AAF에 의해 유도된 부정기 DNA합성을 최고 83%까지 억제하였다.

감사의 글

본 연구는 식품의약품안전청 국립독성연구소 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- 1) Zhou BS, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000; 408: 433-439.
- 2) Melamede RJ, Kow YW, Bepalov IA, Wallace SS. Detection of oxidative DNA damages immunochemical and electrochemical approaches. Technologies for Detection of DNA damage and Mutation. edited by Pfeifer, G.P. Plenum Press, New York. 1996; 103-115.
- 3) Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider ED. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Res* 1988; 175: 184-191.
- 4) Perry P, Evans S. Cytological detection of mutagen carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature* 1975; 258: 121-125.
- 5) Ashby J, Lefevre PA, Burlinson B, Penman MG. An assessment of the *in vivo* rat hepatocyte DNA repair assay. *Mutat Res* 1985; 156: 1-18.
- 6) Butterworth BE, Ashby J, Bermudez E, Casciano D, Mirsalis J, Probst G, Williams G. A protocol and guide for the *in vivo* rat hepatocyte DNA-repair assay. *Mutat Res* 1987; 189: 123-133.
- 7) Kennelly JC, Waters R, Ashby J, Lefevre PA, Burlinson B, Benford DJ, Dean SW, Mitchell I de G. *In vivo* rat liver UDS assay. In: Kirkland DJ, Fox M, (Eds). Supplementary Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney. 1993; 52-77.
- 8) Madle S, Dean SW, Andrae U, Brambilla G, Burlinson B, Doolittle DJ, Furigata C, Hertner T, McQueen CA, Mori H. Recommendations for the performance of UDS tests *in vitro* and *in vivo*. *Mutat Res* 1994; 312: 263-285.
- 9) Fautz R, Hussain B, Efstathiou E, Hechenberger-Freudl C. Assessment of the relation between the initial viability and the attachment of freshly isolated rat hepatocytes used for the *in vivo/in vitro* DNA repair assay (UDS). *Mutat Res* 1993; 291: 21-27.
- 10) Mirsalis JC, Tyson CK, Butterworth BE. Detection of genotoxic carcinogens in the *in vivo/in vitro* hepatocyte DNA repair assay. *Environ Mutagen* 1982; 4: 553-562.
- 11) OECD guideline, Genetic toxicology, TG no 471-478, <http://www.oecd.org/ehs/test/health.htm>
- 12) 유전독성과, 표준작업지침서 (II), 식품의약품안전청 국립독성연구소, 1999; 9-124.
- 13) Wall ME, Wani MC, Manikumar G, Arrahm P, Taylor H, Hughes TJ, Waner J, McGivney R. Plant anti-mutagenic agents: II. Flavonoids. *J Natl Prod* 1988; 51: 1084-1091.
- 14) Sohn SJ, Huh IH, Au WW, Heo MY. Antigenotoxicity of galangin against *N*-methyl-*N*-nitrosourea. *Mutat Res* 1998; 402: 231-236.
- 15) Heo MY, Kwon CH, Sohn DH, Lee SJ, Kim SW, Kim JH, Au WW. Effects of flavono derivatives on the micronuclei formation by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine and the enhancement of bleomycin-induced chromosome aberration by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine. *Arch Pharm Res* 1993; 16: 196-204.
- 16) Sohn SJ, Kim JH, Kim YJ, Huh IH, Heo MY. Inhibition of *N*-methyl-*N*-nitrosourea induced sister-chromatid exchange and DNA methylation by galangin. *Yakhak Hoeji* 1995; 39: 94-101.
- 17) Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structure. *J Cell Biol* 1969; 43: 506-520.
- 18) Mosmann T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
- 19) Chen PL, Che CF, Chen Y, Xiao J, Sharp ZD, Lee WH. The BRC repeats in BRCA2 are critical for RAD51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 5287-92.
- 20) Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000; 408: 307-310.
- 21) Park EJ, Lee GR, Joo JH, Hong SH, Park SD. Effects of *Phellodendron amruense* on DNA replication inhibition in methyl methanesulfonate-treated chinese hamster ovary cells. *J Toxicol Pub Health* 1999; 15: 461-467.
- 22) Kim DH, Yang KH. Effects of monosodium glutamate on unscheduled DNA synthesis and DNA single-strand breaks in primary cultures of rat hepatocytes.

- Environmental Mutagens & Carcinogens* 1987; 7: 65-71.
- 23) Kim SH, Han HM, Kang SY, Jung KK, Kim TG, Oh HY, Lee YK, Rhee HM. Modulation of chemical carcinogen-induced unscheduled DNA synthesis by dehydroepiandrosterone (DHEA) in the primary rat hepatocytes. *Pharmacology & Toxicology* 1999; 22: 474-478.
-