

감잎차 추출액의 Sister Chromatid Exchange(SCE) 방법에 따른 항돌연변이 효과

송현순* · 이현걸* · 장해동 · 김종익 · 박옥진 · 이미숙 · 강명희[†]

한남대학교 식품영양학과

*한국화학연구소 안전성연구센터 유전독성연구실

Antimutagenic Effects of Persimmon Leaf Tea Extracts in Sister Chromatid Exchange(SCE) Assay System

Hyun-Soon Song*, Hyun-Kul Lee*, Hae-Dong Jang, Jong-Ik Kim, Ock-Jin Park,
Mee-Sook Lee and Myung-Hee Kang[†]

Dept. of Food and Nutrition, Han Nam University, Taejon 300-791, Korea

[†]Toxicology Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejon 305-343, Korea

Abstract

The antimutagenic effects of persimmon leaf tea extracts(PLTE) on mutagen-induced sister chromatid exchanges(SCEs) were studied. These PLTE did not affect spontaneous SCEs in cultured Chinese hamster cells. The frequency of SCEs induced by mitomycin C(MMC) was not affected by the simultaneous treatment with PLTE without S9 mixture in the S phase of the cell cycle. However, when cells were posttreated with PLTE in the presence of metabolic enzymes of rat liver(S9 mix), the antimutagenic effects on the induction of SCEs by mutagen were observed. MMC-induced SCEs were suppressed by the posttreatment with PLTE at low concentrations($\leq 40\mu\text{g/ml}$) with S9 mix. In contrast, at a high concentration($>40\mu\text{g/ml}$) of PLTE with S9 mix, MMC-induced SCEs were not affected. The antimutagenic effects of PLTE were shown to occur in the G₁ phase of the cell cycle. The results suggested that PLTE could promote DNA-excision repair activity and resulted in an antimutagenic effect.

Key words: persimmon leaf tea extract, sister chromatid exchanges(SCEs), antimutagenic effect, Chinese hamster ovary cell

서 론

감잎은 예로부터 천식이나 고혈압과 같은 여러 질병을 치료하는데 효과가 있는 것으로 알려지면서 우리나라와 중국, 일본 등 아시아 지역에서 많이 사용되어 왔다. 감잎을 이용하고자 할 때는 대개 그 잎을 말려 두었다가 다른 잎차처럼 감잎차의 형태로 음용하여 왔으며 최근 건강에 대한 관심이 높아지면서 우리나라에서도 여러 형태의 감잎차가 시판되고 있다. 그러나 녹차 등과는 달리 식품으로서의 감잎이나 감잎차에 대한 생리 화학적 효능에 대한 연구는 많지 않다. 최근 들어 감잎으로부터 분리한 여러 flavonoid들이 체내에서

angiotensin-converting enzymes의 활성을 억제시키는 효과가 있음이 보고되었으며(1), 우리나라에서의 연구로서는 감잎의 haxane 분획(2) 및 tannin성분(3)이 *Salmonella typhimurium* TA 100에서 항돌연변이 효과가 있음과, 감잎의 tannin이 악성종양에 대한 억제 효과가 있음(4)이 보고되고 있다. 그러나 이제까지의 감잎 관련 연구 보고들은 대부분 감잎으로부터 특정획분을 분리하여 그의 생리 활성도를 측정해 본 것이며 식품으로서 감잎차를 제조하여 그의 생리적 효능을 본 연구는 거의 없다. 다만 감잎차의 처리 방법과 추출 조건을 검토하여 본 결과, 발효법으로 감잎차를 제조하였을 때 SOD 유사 활성도와 비타민 C 함량이 가장

[†]To whom all correspondence should be addressed

높음이 보고된 바 있다(5,6). 따라서 본 연구는 발효법으로 제조한 감염차의 수용성 추출액이 생체내에서 항돌연변이원성을 가지는지의 여부를 검토해 보고자 하여 시도되었다.

특정 물질에 대한 생체내 돌연변이원성 여부는 여러가지 방법으로 측정될 수 있으나 세포내의 염색체를 관찰하여 DNA의 손상여부를 비교적 쉽게 알아 볼 수 있는 방법으로 자매 염색 분체 교환(sister chromatid exchange, SCE) 시험법이 최근 널리 사용되고 있다(7,8). 이 방법은 생체세포 DNA의 손상과 회복을 알아 볼 수 있는 새로운 검사방법으로 소개되고 있으며, 환경성 돌연변이 유발원 및 발암 물질의 검토 방법으로 *in vivo* 뿐만 아니라 *in vitro*에서도 가장 민감한 척도 중의 하나로 인정되어 광범위하게 이용되고 있다(9-12).

본 연구에서는 이 SCE 시험법을 이용하여 돌연변이 유발 물질을 처리하여 배양한 Chinese hamster ovary(CHO) cell의 DNA 손상 정도가 감염차 추출액에 의해 회복되는지를 측정해 보았으며 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

감염차 추출액의 제조

감염차를 제조하기 위한 원료로는 1993년 6월 중순 대전광역시 동구에 야생하는 감나무(*Diospyros kaki*)인 월하시로부터 채취한 감염을 사용하였다. 감염에 붙어있는 불순물을 씻기 위해서 0.001% acetic acid에 1시간 침지시킨 다음 흐르는 물로 세번 씻었다. 세척한 감염은 감염 표면의 물기가 마를 때까지 음지에 둔 다음 1.5×1.5cm으로 잘게 썬 후 시들시들해질 때까지 음지에서 건조시켰다. 건조한 감염을 25°C로 유지되는 항온기에 넣고 1시간마다 분무기로 물을 뿌리면서 12시간 동안 발효시켰다. 발효가 끝난 감염은 감염에 존재하는 효소를 불활성화시키고 동시에 감염의 건조를 위해서 80°C 건조기로 3시간 처리한 다음 통풍에 의해 6시간 통건시켰다. 이상과 같이 만들어진 감염차는 수분 흡수를 방지할 수 있는 플라스틱 용기에 넣어 -20°C에서 보관하였다.

감염차 추출액을 제조하기 위하여 잘게 부순 감염차 1.5g을, 일반인의 음용 조건과 유사할 뿐 아니라 비타민 C와 superoxide dismutase(SOD) 유사 활성 물질의 최적 열수 추출 조건으로 밝혀진(5) 90°C의 증류수 100ml로 3분간 열수 추출한 다음 Whatman No.1 거름종이로 여과시킨 후 동결 건조하였으며 -20°C에서 보

관하면서 분석에 사용하였다.

SCE test

시험계(세포)

ATCC(American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA)로부터 1991년 구입하여 한국화학연구소 안전성연구센터의 변이원성 실험실에서 계대 배양 중인 Chinese hamster ovary 세포(CHO K-1)(13)를 사용하였다. 세포는 액체 질소내에 보관하였으며, 해동하여 7일 이상 배양한 후 도립 현미경으로 미생물 오염 여부를 확인하고 시험에 사용하였다.

배양 방법

배양액 : 시판 Ham's F-12(Gibco #21700-075)를 탈이온 증류수로 용해하여 L-glutamine 292mg, Sodium bicarbonate 1176mg, Penicillin G.Na 및 Streptomycin sulfate 각각 100,000unit를 첨가, 최종 액량을 1000ml로 조정하였다. 이를 membrane filter(pore size 0.22µm)로 여과한 후 Fetal Bovine Serum(FBS, Gibco #240-6000) 50ml를 첨가하여 사용하였다.

배양 조건 : 세포는 포화 수증기에 5% 농도의 이산화탄소를 포함한 공기가 유지되는 37°C 항온 배양기에서 배양하였으며, 매 2일 혹은 3일 마다 0.1% trypsin액으로 세포를 분리하여 계대 배양하였다.

대사 활성계(S9 mixture)의 조제

간 균질액(S9 fraction)은 Maron and Ames(14)의 방법에 따라 Aroclor-1254를 효소 유도제로 하여 수컷 Sprague-Dawley rat의 간으로 조제한 것(Lot No. 95-1, 단백질 25.5mg/ml 함유)을 사용하였다.

대사 활성계(20% S9 fraction 함유)는 상기 방법으로 조제한 S9 fraction과 시판 cofactor(Wako #309-50611)로 사용 직전에 조제, 얼음에 채워 사용하였다. S9 Mix 1ml의 조성은 MgCl₂ · 6H₂O 8µmol, KCl 33µmol, NADH 4µmol, NADPH 4µmol, glucose-6-phosphate 5µmol, sodium-phosphate buffer(pH 7.4) 100µmol이었으며, S9 fraction을 0.2ml 가하여 조제하였다.

시험물질의 처리

냉동 건조된 감염차 추출액을 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해하여 최고 농도액을 조제하고 이를 배양액으로 희석, 각 농도의 원액(100배 농축액)을 조제하였다. 이를 필요 농도별로 50µl/5ml씩 처리하였다.

CHO-K1 세포에 대한 처리

농도 군당 2개의 T-25 세포 배양 flask에 25만개의

CHO K-1 세포를 분주, 약 24시간 배양한 후 돌연변이 유발물질인 mitomycin C(MMC)로 1시간 처리하였다. 이때 MMC 처리 1시간 전에 새 배양액으로 교환해 주어 세포를 안정시킨 후 MMC를 처리해 주었다. 처리가 끝난 후 5ml phosphate buffered saline(PBS)으로 2번 세척한 다음 다시 새 배양액으로 교환하여 필요에 따라 S9 mixture와 함께 감일차 추출액을 농도별로 처리하고, 세포 분열 주기중 G₁ phase에서의 효과를 보기 위하여 3시간 동안 추가 배양하였다. 즉 돌연변이 유발 물질인 MMC를 처리한 후에(posttreatment) 감일차 추출액을 처리하였다. 이에 비해 세포 분열 주기중 S phase에서의 효과를 보기 위한 실험에서는 MMC를 감일차 추출액과 함께 처리하여 5시간 동안 배양하였다.

SCE를 위한 염색체 표본 제작

10 μ M 농도의 BrdUrd(5-bromo-2-deoxyuridine) 존재 하에 약 24시간 배양한 후 1 μ M 농도의 colchicine을 처리하여 다시 2시간 배양하여 중기세포를 수거하였다. 수거한 중기세포를 원심분리한 후 상등액을 제거하고 0.75mM KCl을 처리한 후 고정액(Methanol : acetic acid=3 : 1)으로 세포를 고정하였다. 고정액 처리된 세포현탁액을 slide에 떨어뜨려 현미경으로 세포가 잘 퍼지는 조건을 잡아 염색체 표본을 만들어 건조시켰다. 건조된 slide는 phosphate buffer(pH 7.0)에 10분간 담근 후 암소에서 Hoechst No. 33258(Sigma B-1155)용액으로 10분간 염색하고 UV조사를 마친 후 신선하게 조제된 3% Giemsa액에서 30~40분간 염색하였다. 염색한 slide는 증류수로 세척한 후 dryer로 완전 건조시켰으며 Depex로 mounting하여 실온에서 건조, 보관한 후 SCE를 계수하였다.

SCE의 계수

염색 상태가 상호한 slide를 선정하여 먼저 현미경에서 저배율(200배)로 계수하기 좋은 부위를 선정한 후 1,000배(100 \times objective)의 고배율로 염색체가 잘 퍼진 세포를 골라 SCE 빈도수를 계수하였다. 각 농도마다 2차 분열 중기 세포를 50개 이상 계수하여 그 평균치를 SCE 빈도수로 나타내었다. 감일차 추출액에 의한 SCE 빈도수의 억제 비율(% inhibition)은 Krishna (15)의 방법에 따라 다음 식으로 계산하였다.

$$\% \text{ Inhibition} =$$

$$\frac{\text{No. of SECs/cell in the presence of PLTE} - \text{No. of spontaneous SCEs/cell}}{\text{No. of SCEs/cell in the absence of PLTE} - \text{No. of spontaneous SCEs/cell}} \times 100$$

자료의 처리

모든 자료의 처리는 각 처리군에 따라 평균치±표준오차(SE)를 구하였으며 각군별 유의성 검증을 위해서 one-way 분산분석(ANOVA)을 한 후 F값을 구하였고, Duncan's multiple range test를 이용하여 각 군간의 유의성의 차이를 검증하였다.

결 과

MMC의 처리 농도 및 처리 시기에 따른 SCE 빈도수의 변화

일반적으로 화학물질이 생체세포의 DNA에 손상을 주는 것은 세포 분열 주기(G₁-S-G₂)중 S phase에 처리되었을 때인 것으로 알려져 있으나(16) 녹차 Tannin 성분의 경우 S phase 보다는 G₁ phase에 처리하였을 때 SCE 빈도수를 변화시켰다는 보고(17)가 있다. 따라서 본 실험에서는 돌연변이 유발물질로 사용한 MMC의 처리 농도를 결정하기 위하여 MMC를 CHO cell의 세포 분열 주기중 S phase와 G₁ phase에 각각 처리하여 배양한 후, SCE 빈도수의 변화를 보았으며 그 결과는 Table 1과 같다. MMC를 첨가하지 않은 대조군(negative control)에 비하여 2배 이상의 SCE 빈도수를 보이는 MMC의 농도는, S phase 처리의 경우 0.05 μ M 이었던 것에 비해 G₁ phase 처리의 경우는 0.5 μ M 이상인 것으로 나타났다. 이는 세포 분열 주기를 맞추어 주기 위해 S phase의 경우는 MMC를 5시간 처리하였

Table 1. Sister chromatid exchange(SCE) frequencies in Chinese hamster ovary(CHO) cells exposed to mitomycin C(MMC)

Duration of treatment	Dose of MMC(μ M)	SCEs	Significance
5 hours ¹⁾ (S phase)	0 ²⁾	6.98 \pm 0.25	-
	50 \times 10 ⁻³	12.90 \pm 0.37	*p<0.05
	75 \times 10 ⁻³	14.70 \pm 0.30	*p<0.05
1 hour ³⁾ (G ₁ phase)	0	8.00 \pm 0.27	-
	10 \times 10 ⁻³	8.24 \pm 0.27	NS ⁴⁾
	50 \times 10 ⁻³	9.20 \pm 0.36	NS
	100 \times 10 ⁻³	10.68 \pm 0.25	*p<0.05
	500 \times 10 ⁻³	17.12 \pm 0.55	*p<0.05
	1000 \times 10 ⁻³	21.72 \pm 0.59	*p<0.05

¹⁾CHO cells were treated with MMC for 5 hours in the S phase of the cell cycle in the absence of S9 mixture

²⁾Negative control : phosphate-buffer saline

³⁾CHO cells were treated with MMC for 1 hour in the G₁ phase of the cell cycle in the presence of S9 mixture

⁴⁾Not significant at $\alpha=0.05$ level by Duncan's multiple range test

고 G₁ phase의 경우는 1시간 처리하였기 때문인 것으로 보여진다.

감잎차 추출액의 처리 농도에 따른 SCE 빈도수의 변화

감잎차 추출액을 농도별로 CHO cell의 S phase와 G₁ phase에서 처리하여 배양한 후 SCE 빈도수의 변화를 본 결과는 Table 2 및 Table 3과 같다. 감잎차 추출액을 S phase에 처리했을 경우, 200µg/ml까지는 농도 증가에 따른 SCE 빈도수의 증가가 없었으나 1000µg/ml에서는 SCE 빈도수가 증가하였다(Table 2). 이에 비해 감잎차 추출액이 G₁ phase에 처리되었을 경우는 1000µg/ml을 포함한 모든 농도에서 감잎차 추출액에 의한 SCE 빈도수의 증가는 볼 수 없었다(Table 3).

Table 2. SCE frequencies in CHO cells exposed to persimmon leaf tea extracts(PLTE) in the S phase of the cell cycle^{1,2)}

Dose of PLTE(µg/ml)	SCEs	Significance
0	6.98±0.25	
1.6	7.26±0.29	NS ³⁾
8	7.02±0.23	NS
40	6.94±0.24	NS
200	7.98±0.28	NS
1000	8.54±0.34	*p<0.05

¹⁾In the absence of S9 mixture

²⁾CHO cells were treated with each concentration of PLTE for 5 hours in the S phase of the cell cycle

³⁾Not significant at α=0.05 level by Duncan's multiple range test

Table 3. SCE frequencies in CHO cells exposed to PLTE in the G₁ phase of the cell cycle in the presence of S9 mixture¹⁾

Dose of PLTE(µg/ml)	SCEs	Significance
0	9.22±0.23	NS ²⁾
10	9.16±0.35	NS
20	9.16±0.32	NS
40	8.88±0.45	NS
80	9.16±0.33	NS
160	8.36±0.26	NS
1000	8.96±0.31	NS

¹⁾CHO cells were treated with PLTE for 1 hour in the G₁ phase of the cell cycle

²⁾Not significant at α=0.05 level by Duncan's multiple range test

따라서 본 실험 조건에 따라 추출한 감잎차 추출액이 mutagen이 처리되지 않은 CHO cell의 G₁ phase에 처리되었을 때는 감잎차 자체에 의한 SCE 유발 효과는 없는 것을 확인할 수 있었다.

감잎차 추출액의 SCE 빈도수 억제 효과

CHO 세포의 세포 분열 주기중 S phase에서의 감잎차 처리효과를 보기 위하여 0.05µM의 MMC를 감잎차 추출액과 동시에 처리하여 배양한 후, 감잎차 추출액의 SCE 빈도수 억제효과를 본 결과는 Table 4와 같다. S phase에 처리하였을 경우, 감잎차 추출액의 첨가에 의한 SCE 빈도수 억제 효과는 볼 수 없었으며 오히려 감잎차 추출액의 농도 1000µg/ml에서는 SCE 빈도수가 유의적으로 증가하였다.

Table 4. Effect of PLTE on MMC(0.5µM)-induced SCEs in CHO cells in the absence of S9 mixture¹⁾

Treatment	SCEs/cell	% of inhibition ²⁾	Significance
Negative control ³⁾	6.98±0.25 ⁴⁾		
PLTE(1000µg/ml)	8.54±0.34		
MMC	12.90±0.37		
MMC+PLTE(1.6µg/ml)	12.00±0.37	7.0	NS ⁵⁾
MMC+PLTE(8µg/ml)	12.90±0.30	0.0	NS
MMC+PLTE(40µg/ml)	12.50±0.37	3.1	NS
MMC+PLTE(200µg/ml)	13.76±0.38	-	NS
MMC+PLTE(1000µg/ml) ⁶⁾	16.18±0.53	-	*p<0.05

¹⁾CHO cells were treated with 0.5µM MMC and each concentrations of PLTE simultaneously for 5 hours in the S phase of the cell cycle in the absence of S9 mixture

²⁾Percentage inhibition was calculated by using the formular

$$100 - \frac{\text{No. of SCEs/cell in the presence of PLTE}}{\text{No. of SCEs/cell in the absence of PLTE}} \times 100$$

The number of spontaneous SCEs per cell(negative control) was subtracted from the numerator and the denominator

³⁾Phosphate-buffered saline ⁴⁾Mean±S.D.

⁵⁾Not significant at α=0.05 level by Duncan's multiple range test

⁶⁾This concentration of PLTE acted as a co-SCE inducer

Table 5. Effect of PLTE on MMC(1 μ M)-induced SCEs in CHO cells in the presence of S9 mixture¹⁾

Treatment	SCEs/cell	% of inhibition ²⁾	Significance
Negative control ³⁾	8.00 \pm 0.27 ⁴⁾		
PLTE(1000 μ g/ml)	8.96 \pm 0.31		
MMC	23.56 \pm 0.72		
MMC+PLTE(1.6 μ g/ml)	23.16 \pm 0.64	2.6	NS ⁵⁾
MMC+PLTE(8 μ g/ml)	21.28 \pm 0.64	14.7	*P<0.05
MMC+PLTE(40 μ g/ml)	19.56 \pm 0.54	25.7	*P<0.05
MMC+PLTE(200 μ g/ml)	21.80 \pm 0.51	11.3	NS
MMC+PLTE(1000 μ g/ml) ⁶⁾	22.62 \pm 0.71	6.0	NS

¹⁾CHO cells were treated with 1 μ M MMC for 1 hour and were posttreated with each concentrations of PLTE for 3 hours in the G₁ phase of the cell cycle in the presence of S-9 mixture

²⁾Percentage inhibition was calculated by using the formular

$$100 - \frac{\text{No. of SCEs/cell in the presence of PLTE}}{\text{No. of SCEs/cell in the absence of PLTE}} \times 100$$

The number of spontaneous SCEs per cell(negative control) was subtracted from the numerator and the denominator.

³⁾Phosphate-buffered saline ⁴⁾Mean \pm S.D.

⁵⁾Not significant at $\alpha=0.05$ level by Duncan's multiple range test

⁶⁾This concentration of PLTE acted as a co-SCE inducer

Table 6. Effect of PLTE on MMC(0.5 μ M)-induced SCEs in CHO cells in the presence of S9 mixture¹⁾

Treatment	SCEs/cell	% of inhibition ²⁾	Significance
Negative control ³⁾	9.22 \pm 0.32 ⁴⁾		
PLTE(1000 μ g/ml)	8.96 \pm 0.31		
MMC	18.56 \pm 0.52		
MMC+PLTE(10 μ g/ml)	16.80 \pm 0.39	16.7	*P<0.05
MMC+PLTE(20 μ g/ml)	15.32 \pm 0.43	30.7	*P<0.05
MMC+PLTE(40 μ g/ml)	18.32 \pm 0.62	2.3	NS ⁵⁾
MMC+PLTE(80 μ g/ml)	19.12 \pm 0.45	-	NS
MMC+PLTE(160 μ g/ml)	19.56 \pm 0.62	-	NS
MMC+PLTE(1000 μ g/ml)	18.00 \pm 0.39	-	NS

¹⁾CHO cells were treated with 0.5 μ M MMC for 1 hour and were posttreated with each concentrations of PLTE for 3 hours in the G₁ phase of the cell cycle in the presence of S-9 mixture

²⁾Percentage inhibition was calculated by using the formular

$$100 - \frac{\text{No. of SCEs/cell in the presence of PLTE}}{\text{No. of SCEs/cell in the absence of PLTE}} \times 100$$

The number of spontaneous SCEs per cell(negative control) was subtracted from the numerator and the denominator.

³⁾Phosphate-buffered saline ⁴⁾Mean \pm S.D.

⁵⁾Not significant at $\alpha=0.05$ level by Duncan's multiple range test

⁶⁾PLTE acted as a co-SCE inducer

G₁ phase에서의 감일차 처리효과를 보기 위해 1 μ M의 MMC를 먼저 처리하고 감일차를 S9 mixture와 함께 후처리 방식으로 처리하였을 때의 SCE 빈도수 억제효과를 본 결과는 Table 5와 같다. 감일차 추출액 농도 8 μ g/ml와 40 μ g/ml에서 각각 14.7%와 25.7%의 유의적인 억제효과가 있었으며 감일차의 농도가 200 μ g/ml 이상이 되면 억제효과가 나타나지 않았다. 이와 같은 결과를 확인하기 위하여 MMC의 농도를 더 낮추어, SCE 빈도수가 대조군의 2배 이상을 보이는 최소의 MMC 농도인 0.5 μ M로 하여 처리한 후 감일차 추출액의 SCE 빈도수 억제효과를 살펴 본 결과는 Table 6과

같다. Table 5에서와 마찬가지로 경향으로, MMC 농도가 낮을 때에도 감일차 농도 10 μ g/ml와 20 μ g/ml에서 각각 16.7%와 30.7%의 유의적인 억제효과를 보였으며 40 μ g/ml 이상이 되면 SCE 빈도수 억제효과가 나타나지 않았다.

이와 같은 결과로부터 감일차의 수용성 추출액에, MMC로 인해 유발된 SCE 빈도수를 낮추어 주는 효과가 있음을 확인할 수 있었으며 감일차 농도가 너무 높은 경우는 이런 경향이 나타나지 않는 것을 관찰할 수 있었다.

고찰

우리가 응용하는 여러가지 차의 종류 중 본 연구에서 다룬 감염차의 항돌연변이 효과에 대한 연구는 매우 제한되어 있다. 현재까지 감염차의 항돌연변이 효과에 대한 연구는 Ames test 결과 감염차의 methanol 추출액중 hexane 회분에 항돌연변이 효과가 있었다는 보고(2)와 최근 시판 감염차의 열수추출물 및 감염 tannin의 항돌연변이 효과를 Ames test, spore rec assay 및 SOS chromotest 방법으로 검토해 본 결과 항돌연변이 성을 관찰할 수 있었다는 보고(3)가 있을 뿐이며, SCE 방법에 의한 감염차 추출액의 항돌연변이 효과에 대한 연구는 아직 보고된 바 없다. 이에 비해 녹차에 대해서는 Ames test에 의한 항돌연변이 효과가 그 동안 수차례 보고되어 왔으며(18-23), 최근에는 녹차의 tannin 성분들(17) 혹은 tannic acid (24)와 SCE 빈도수와의 관계도 보고되고 있다. 녹차의 tannin성분은 promutagen의 metabolic activation을 저해하거나, 최종적으로는 mutagen이나 free radical들을 불활성화시켜, mutagenesis에 항돌연변이 효과가 있는 것으로 추측되고 있다.

본 연구에서는 S9 mixture 존재 하에 G₁ phase에서 후처리 방식(MMC 처리후 감염차 처리)으로 감염차를 처리했을 때, 저농도(40µg/ml 이하)에서 MMC로 인해 유발된 SCE 빈도수를 낮추는 것으로 나타났다. 그러나 그 보다 높은 농도(40µg/ml 이상)에서는 이런 효과가 나타나지 않았다(Table 5, 6). 이와 같은 결과는, 감염차가 아닌 녹차 tannin 성분들의 항돌연변이 효과 여부를 SCE 방법으로 실험해 본 결과, tannin의 농도가 낮을 때(6.7µg/ml 이하)는 MMC 처리로 유발된 SCE 빈도수를 유의적으로 억제하였으나, 고농도(20µg/ml)에서는 억제하지 못하고 오히려 SCE 빈도수를 증가시키는 것을 관찰한 Imanishi 등(17)의 연구 결과와 비교해 볼 때, 매우 유사한 경향을 보여 감염차의 항돌연변이 효과가 녹차와 같을 수도 있음을 짐작할 수 있었다.

감염차 추출액 농도가 낮을 때 나타나는 이와 같은 SCE 억제 효과의 기전에 대해서는 여러가지 가능성을 생각해 볼 수 있다. 우선 본 실험 결과 MMC와 감염차 추출액을 동시 처리하였을 때, 감염차 추출액의 SCE 빈도수 억제 효과가 보이지 않았던 것으로 보아(Table 4), 또 MMC는 pro-mutagen이 아니라 세포에 직접 작용하는 mutagen임을 감안해 볼 때, 감염차 추출액이 세포에 첨가된 돌연변이 유발 물질(MMC)을 불활성화시키지는 않는 것으로 보인다. 뿐만 아니라 S9 효소계가 세포에 처리된 MMC를 불활성화시켜 SCE 빈

도수를 감소시켰다고 보기도 어렵다. 왜냐하면 본 실험에서 MMC 처리 후 S9 효소계를 넣어 준 세포의 경우도 높은 SCE 빈도수를 보였기 때문이다(Table 5, 6).

본 실험에서, 저농도의 감염차 추출액이 SCE 빈도수의 감소 효과를 보이는 기전은 Imanishi 등(17)이 제안한 녹차 tannin 성분들의 항돌연변이 효과의 기전과 유사할 것으로 생각된다. 즉 저농도에서는 소량의 감염차 추출액이 S9 효소군에 의해 대사되어 그 대사산물이 항돌연변이 효과를 보이나, 고농도일 경우는 감염차 추출액 자체에 의해 S9 효소군의 활성이 저해되어 감염차 추출액의 대사산물이 충분한 양 만들어지지 않아 SCE 빈도수의 감소 현상이 나타나지 않은 것으로 생각해 볼 수 있다. 이와 같은 해석은 본 연구에서 S9 효소군을 넣어주지 않았을 경우 MMC로 인해 유발된 SCE 빈도수를 감염차 추출액이 감소시켜 줄 수 없었던 결과(Table 4)로도 뒷받침된다고 볼 수 있다.

녹차에 대한 여러 연구들에서도 S9 mixture를 첨가 하였을 때에만 항돌연변이 효과가 있는 것이 보고되었으며(18-20), 특히 녹차의 tannin 성분들의 경우, S9 mixture가 없을 때는 MMC로 유발된 SCE 빈도수의 감소 효과가 나타나지 않았으나, S9 mixture를 처리해 주었을 때 저농도의 녹차 tannin 성분들이 MMC로 유발된 SCE 빈도수를 감소시키는 것을 관찰하여 본 연구 결과와 같은 경향을 보고하였다. 이와같은 결과는 녹차 tannin 성분들의 항변이원성 효과의 기전과 본 연구에서의 감염차 추출액의 항변이원성 효과의 기전이 유사할 수도 있음을 시사해 주고 있다.

Sasaki 등은 몇편의 연구 보고들(17,23,24)을 통하여 tannic acid를 포함한 tannin 성분들이 mutagen으로 유발된 SCE의 빈도수를 감소시키는 기전은 DNA-excision repair system에 변화가 일어나는데 기인한다고 보았다. 그들은 tannin 성분들의 SCE 빈도수 감소 효과가, mutagen 처리 후에 tannic acid 혹은 tannin 성분들을 처리한 후처리 방식(posttreatment)의 경우 나타났으며 cell cycle로는 G₁ phase 처리시에만 이 효과를 볼 수 있었다는 점을 들어 그들의 주장을 뒷받침하였다. 이들이 사용한 tea tannin 성분들에 의한 SCE 감소효과가 본 실험에서의 감염차 추출액에 의한 SCE 감소효과와 매우 비슷한 것으로 보아 본 연구에서의 감염차 추출액도 그 자체로는, 특히 고농도로 부여되었을 때 DNA-excision repair activity를 방해하나, S9 mixture 존재하에서 감염차 추출액 중의 어떤 성분들이 대사되면 그 대사산물은 DNA-excision repair activity를 촉진시켜 MMC로 유발된 SCE 빈도수를 감소시키는 것으로 생각된다.

본 연구 결과 SCE 방법에 따른 감잎차 추출액의 항돌연변이 효과가 감잎 중 어느 성분에 기인하는지를 알 수 없었으나 감잎의 생리활성물질에는 tannin이 polyphenol 성분의 43%에 해당될 만큼 많이 함유되어 있고 (6,25) 감잎차의 tannin 성분에는 SOD 유사 활성(6) 뿐만 아니라 항돌연변이 효과(3)가 있음도 보고되고 있으므로 녹차처럼 감잎차 추출액의 항돌연변이 효과도 부분적으로는 tannin에 기인할 것으로 생각된다. 앞으로 감잎차의 각획분의 항돌연변이 효과에 대한 보다 자세한 연구가 수행된다면 이에 대한 보다 명확한 결론에 도달할 수 있으리라고 본다.

한편 Moon 등(2,3)은 감잎차의 hexane 획분 및 tannin 성분의 경우, 농도가 증가할수록 *Salmonella typhimurium* TA 100에서 S9 mixture 없이도 항돌연변이 효과가 dose-response 방식으로 증가하는 것을 보고하였는데, 이로보아 원핵세포(procaryotic cell) 실험계인 Ames test에 의한 항돌연변이 효과는 본 연구에서 사용한 진핵세포(eukaryotic cell) 실험계인 SCE test에 의한 항돌연변이 효과와 그 기전 및 전개 양상이 다른 것으로 생각된다. 그러나 이 부분에 대해서도 앞으로 비교 검토가 되어야 하리라고 본다.

요 약

돌연변이 유발 물질인 mitomycin C(MMC)를 처리하여 배양한 Chinese hamster ovary(CHO) cell에 대한 감잎차 추출액의 항돌연변이 효과를 자매 염색 분체 교환(sister chromatid exchange, SCE) 시험법을 사용하여 측정하여 보았다. 감잎차 추출액 자체는 CHO 세포의 SCE 빈도수를 변화시키지 않았으며, 세포의 분열 주기중 S phase에 S9 mixture 없이 감잎차 추출액이 처리되었을 경우 MMC로 유도된 SCE 빈도수를 감소시키지 않았다. 그러나 S9 mixture 존재하에 G₁ phase에서 MMC 처리 후 감잎차를 처리하는 후처리 방식으로 감잎차 추출액을 처리하였을 때, 저농도(< 40µg/ml)에서 MMC로 인해 유발된 SCE 빈도수가 낮아지는 것을 볼 수 있었다. 이에 비해 고농도(>40µg/ml)에서는 SCE 빈도수의 감소 효과가 없었다.

본 연구 결과, MMC 처리된 CHO 세포에 대한 감잎차 추출액의 항돌연변이 효과를 볼 수 있었고, 이 효과는 S9 mixture 존재하에서 저농도의 감잎차 추출액이 G₁ phase에 처리되었을 때 나타났다. 감잎차 추출액의 이러한 항돌연변이 효과의 기전은 감잎차 추출액의 대사산물이 MMC 처리된 CHO 세포에 대한 DNA-excision repair activity를 촉진시키기 때문인 것으로 생각

된다.

감사의 글

본 연구는 1994년도 한남대학교 부설 생활과학연구소의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Rameda, K., Takaku, T., Okuda, H. and Kimura, Y. : Inhibitory effects of various flavonoids isolated from leaves of persimmon on angiotensin-converting enzymes activity. *J. Natl. Products*, **50**, 68(1989)
2. Moon, S. H., Kim, J. O., Rhee, S. H., Park, K. Y., Kim, K. H. and Rhew, T. H. : Antimutagenic effects and compounds identified from hexane fraction of persimmon leaves. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **22**, 307 (1993)
3. 문숙희, 박진영 : 감잎 열수추출물 및 감잎탄닌의 항돌연변이 효과. *한국영양식품학회지*, **24**, 880(1995)
4. Kim, B. G., Rhew, T. H., Choe, E. S., Chung, H. Y., Park, K. Y. and Rhee, S. H. : Effect of selected persimmon leaf components against sarcoma 180 induced tumor in mice. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **22**, 334(1993)
5. 박윤주, 강명희, 김종익, 박옥진, 이미숙, 장해동 : 감잎의 처리 방법과 추출조건에 따른 감잎차의 vitamin C와 superoxide dismutase(SOD) 유사활성의 변화. *한국식품과학회지*, **27**, 281(1995)
6. 박윤주, 강명희, 박옥진, 이미숙, 장해동, 김종익 : 감잎차 추출액의 superoxide dismutase(SOD) 유사활성 물질의 분석. *한국식품과학회지*, 투고중(1996)
7. Dwedney, R. S., Lovell, D. P., Jenkinson, P. C. and Anderson, D. : Variations in sister chromatid exchange among members of the general UK population. *Mutation Res.*, **171**, 43(1986)
8. Carrano, A. V., Thompson, L. H., Lindl, P. A. and Miwkler, J. L. : Sister chromatid exchange as indicator of mutagenesis. *Nature*, **271**, 551(1978)
9. Nayak, B. N. and Petras, M. L. : Environmental monitoring for genotoxicity *in vitro* sister chromatid exchange in the house mouse(*Mus musculus*). *Can. J. Genet. Cytol.*, **27**, 351(1985)
10. Ikenchi, T. and Sasak, M. : Differential inducibility of chromosome aberrations and sister chromatid exchanges by indirect mutagen in various mammalian cell lines. *Mutation Res.*, **90**, 149(1981)
11. Carrano, A. V. and Natarajan, A. T. : Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutation Res.*, **204**, 379(1988)
12. 강명희 : 식이성 요인이 SCE 빈도수로 본 흡연자의 DNA 손상에 미치는 영향. *한국영양학회지*, **27**, 740 (1994)
13. Kao, F. T. and Puck, T. T. : Genetics of somatic mammalian cells. IV. Properties of Chinese hamster

- cell mutants with respect to the requirement for proline. *Genetics*, **55**, 513(1967)
14. Maron, D. M. and Ames, B. N. : Revised methods for the *Salmonella mutagenicity* test. *Mutation Res.*, **113**, 173(1983)
 15. Krishna, G., Nath, J. and Ong, T. : Inhibition of cyclophosphamide and mitomycin C-induced sister chromatid exchanges in mice by vitamin C. *Cancer Res.*, **46**, 2670(1986)
 16. Dean, B. J. and Danford, N. : Assays for the detection of chemically induced chromosome damage in cultured mammalian cells. In "*Mutagenicity testing : A practical approach*" Vernitt, S. and Parry, J. M. (eds.), IRL Press, Oxford, p.187(1984)
 17. Imanishi, H., Sasaki, Y. F., Ohta, T., Watanabe, M., Kato, T. and Shirasu, Y. : Tea tannin components modify the induction of sister-chromatid exchanges and chromosome aberrations in mutagen-treated cultured mammalian cells and mice. *Mutation Res.*, **259**, 79(1991)
 18. Yamada, J. and Tomita, Y. : Antimutagenic activity of water extracts of black tea and oolong tea. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 2197(1994)
 19. Yoo, S. G., Kim, I. S., Ahn, C. W., Kim, S. B. and Park, Y. H. : Desmutagenicity of tea extracts from green tea, oolong tea and black tea. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **24**, 160(1995)
 20. Yen, G. C. and Chen, H. Y. : Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agr. Food Chem.*, **43**, 27(1995)
 21. Wang, Z. Y., Cheng, S. J., Zhou, Z. C., Athar, M., Khan, W. A., Bickers, D. R. and Mukhtar, M. : Antimutagenic activity of green tea polyphenols. *Mutation Res.*, **223**, 273(1989)
 22. Ito, Y., Ohnishi, S. and Fujie, K. : Chromosome aberrations induced by aflatoxin B₁ in rat bone marrow cells *in vivo* and their suppression by green tea. *Mutation Res.*, **222**, 253(1989)
 23. Sasaki, Y. F., Imanishi, H., Ohta, T., Watanabe, M., Matsumoto, K. and Shirasu, Y. : Suppressing effect of tannic acid on UV and chemically induced chromosome aberrations in cultured mammalian cells. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2423(1988)
 24. Sasaki, Y. F., Imanishi, H., Ohta, T., Watanabe, M., Matsumoto, K. and Shirasu, Y. : Suppressing effect of tannic acid on the frequencies of mutagen-induced sister-chromatid exchanges in mammalian cells. *Mutation Res.*, **213**, 195(1989)
 25. 정선화, 문광덕, 김종국, 성종환, 손태화 : 감잎차 제조를 위한 감잎의 성장 시기별 함유 성분의 변화. 한국식품과학회지, **26**, 141(1994)

(1996년 2월 27일 접수)