

퀘르세틴 및 퀘르세틴 배당체들의 벤조피렌에 대한 유전독성억제효과

김정환 · 허문영[#]

강원대학교 약학대학

(Received April 29, 1998)

Antigenotoxicity of Quercetin and Its Glycosides Against Benzo(a)pyrene-induced Genotoxicity

Jeong Han Kim and Moon Young Heo[#]

College of Pharmacy, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

Abstract—In order to compare the suppressive effect of quercetin and its glycosides, such as quercitrin (quercetin-3-rhamnoside), isoquercitrin (quercetin-3-glucoside), hyperin (quercetin-3-galactoside) and rutin (quercetin-3-rhamnosyl glucoside), on the genotoxicity by benzo(a)pyrene(B(a)P), *in vitro* sister chromatid exchange(SCE) test using mouse spleen lymphocytes and *in vivo* micronucleus test using mouse peripheral blood were performed. B(a)P-induced SCEs *in vitro* were slightly decreased by the simultaneous treatment of quercetin and its glycosides, although there was no significant decrease. On the other hand, MNU-induced micronucleated reticulocytes(MNRETs) *in vivo* were significantly decreased with a dose-dependent manner in all compounds tested. However, there were no differences between quercetin aglycone and glycosides in the suppressive effects under experimental condition of this study. To elucidate the action mechanism of quercetin aglycone and its glycosides against B(a)P-induced genotoxicity, the assay of DNA binding with B(a)P was studied. Quercetin aglycone and its glycosides inhibited B(a)P metabolism in the presence of S-9 mix and decreased the B(a)P/DNA binding in the calf thymus DNA with S-9 mix. These results suggest that antigenotoxicity of quercetin and its glycosides on B(a)P-induced genotoxicity is due to decrease of DNA binding with B(a)P through the inhibition of metabolism with B(a)P in the calf thymus DNA. Therefore, quercetin and its glycosides may act as an antigenotoxic agent and may be useful as a chemopreventive agent of polycyclic aromatic hydrocarbons like B(a)P.

Keywords □ Quercetin, Quercetin glycosides, Flavonoids, Antigenotoxicity, Sister chromatid exchange test, Micronucleus test, Cancer chemopreventive agent, Benzo(a)pyrene.

최근까지 식물성 polyphenol 화합물중 flavonoid 화합물은 약 200여종으로서 식물계에 널리 분포하고 있으며 사람들에게 일상적으로 섭취되고 있는 물질이기 때문에 여러가지 생리활성이 연구되어 왔다.^{1,2)} 사람의 1일 섭취량은 평균 1g이상이라고 추정될 정도로 많은 양이며, 이 중 약 170 mg 정도가 4-oxoflavonoids(flavones, flavanones, chalcone, flavonols) 이며, querce-

tin glycosides와 kaempferol glycosides 같은 flavonols은 약 50 mg 정도가 섭취되고 있다고 알려지고 있다.³⁾

그동안 여러 연구자들에 의하여 quercetin이 Ames 시험 및 기타 *in vitro* mammalian cell assay에서 변이원성이 확인되어 주목을 끌어들였다.⁴⁻⁹⁾ 음식을 통하여 다량으로 섭취되고 있는 quercetin이 변이원성물질(mutagen)이라면 이는 체내에서도 발암물질(carcinogen)이 될 수 있기 때문이다. 그러나 최근에 이러한 quercetin을 비롯한 flavonoid 화합물들의 *in vitro*에서

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0361-250-6914 (팩스) 0361-53-9647

의 변이원성은 Ames test나 기타 *in vitro* test system 자체에 문제가 있어서 나타난다는 것이 알려지기 시작했다.¹⁰⁾ Fe와 Cu같은 산화환원성 금속이나 분자상 산소의 존재하에 quercetin은 자동산화(autooxidation)되어 hydrogen peroxide나 superoxide를 생산하여 이것이 변이원성을 나타내게 한다고 보고되었다.¹¹⁾ 그러나 vitamin C도 이같은 비슷한 조건하에서 변이원성을 나타내고 있다.¹²⁾

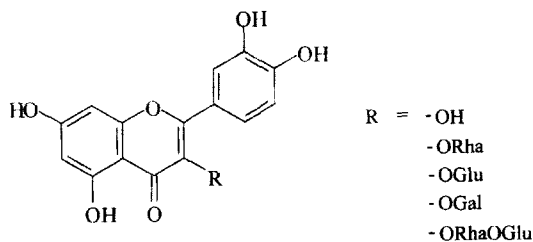
한편, quercetin은 *in vivo* 시험에서 일부 보고¹³⁾를 제외하고 발암성을 나타내지 않았으며 오히려 antimutagenic, 또는 anticarcinogenic활성을 나타낸다는 보고가 많다.^{14, 15)} 저자등도 그동안 여러 연구를 통해서 flavonoid화합물 중 galangin을 비롯한 morin, fisetin, quercetin, flavonol 및 kaempferol 등 flavonol 유도체들의 유전독성 억제효과가 비교적 컸음을 보고한 바 있다.¹⁶⁻¹⁸⁾

본 연구에서는 전보¹⁹⁾에 보고한 바있는 1차발암물질 N-methyl-N-nitroso urea(MNU)유도 유전독성에 대한 quercetin 및 배당체들의 억제효과에 이어서 환경중 다량 분포하는 발암성 polycyclic aromatic hydrocarbon으로서 대사활성화를 통해 작용하는 2차 발암물질(secondary carcinogen)인 benzo(a)pyrene [B(a)P]에 대하여 실제로 식물체내에 가장 많이 분포하여 사람들에게 다량으로 섭취되고 있는 quercetin 및 quercetin glycosides들의 유전독성억제활성을 비교하였으며 이들의 작용기전을 연구하였기에 이에 보고하는 바이다.

실험방법

시약 및 재료

Quercetin과 rutin은 Sigma사(St.Louis, MO, USA)에서 구입하였으며 isoquercitrin은 Carl Roth GmbH+Co사(Karlsruhe, Germany)에서 공급받았다. 또한 quercitrin과 hyperin은 부경대학교 최재수교수로 부터 분양받았으며, 모든 flavonoid 검체들은 TLC와 HPLC로 순품을 확인하고 사용하였다. Benzo(a)pyrene[B(a)P], β-naphthoflavone등 기타 시약들은 Sigma사에서 구입하였다. FBS등 세포배양에 필요한 시약들은 GIBCO사(Grand Island, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다. Fig. 1에 실험대상 flavonoid들의 화학구조를 나타내었다.



Quercetin glycosides	Common names	Sugar class
Quercetin	Quercetin	Aglycone
Quercetin 3-rhamnoside	Quercitrin	Pentose
Quercetin 3-glucoside	Isoquercitrin	Hexose
Quercetin 3-galactoside	Hyperin	Hexose
Quercetin 3-rhamnosyl glucoside	Rutin	Pentose + Hexose

Fig. 1—Structures of quercetin and quercetin glycosides.

Animals

본 실험에서 사용되는 ICR과 C57BL/6 mice는 서울대학교에서 공급받아 강원대 약대 동물사육실내에 있는 양압의 무균동물챔버에서 23±1°C 및 상대습도 55±7%의 조건으로 7~10일 적응시킨 후 사용하였다. 사료는 삼양유지의 마우스용 pellet사료를 주었으며 물은 자유롭게 먹게하고, 12h/12h(L/D) cycle의 조건에서 실험하였다.

***In vitro* Sister Chromatid Exchange test²⁰⁾**

C57BL/6 마우스(♂, 15~25 g)로 부터 무균적으로 비장을 적출하여 일회용 50 ml 무균 실린지의 plunger를 이용하여 세포를 분리시킨 후 cell count하여 20×10⁶ cell/ml로 만들었다. 이 세포현탁액 0.5 ml씩을 배지에 가하여 실험하였다. Complete medium은 15% heat inactivated fetal bovine serum(Gibco No. 200-6140), 1% sodium heparin(1,000unit, Invex No. 33-1), 1% penicillin-streptomycin(Gibco No. 600-5145), 2% concanavalin A(Con A, Sigma No. C-5275), 0.01%-mercaptoethanol(0.05M, Sigma No. M-6250)이 되도록 RPMI 1640 culture medium으로 조제하여 사용하였다.

배양은 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 이루어졌으며 배양후 6시간에 5-bromo-2'-deoxyuridine(Sigma No. B-5002)를 각 culture tube에 10 μM이 되도록 가했다. 배양후 24시간에 유전독성억제실험을 위해서는 B(a)P(10⁻⁴M)와 flavonoid 검체(0, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵

M)을 각각 동시에 첨가한 후 배양개시후 45.5시간에 colcemid(final conc. 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 가해 분열중기 세포를 포획하고 48시간에 배양을 끝내고 염색체 표본을 상법에 따라 만들었다. 이때 음성대조군은 B(a)P의 용매인 dimethylsulfoxide(DMSO)를 각각 사용하였다.

슬라이드들은 0.075M KCl 용액으로 저장액처리를 하고 Carnoy's fixative로 고정한 후 원심분리하여 소량의 고정액에 현탁시킨 세포현탁액을 병냉 정제수에 담가놓았던 슬라이드에 떨어뜨린후 건조한다. 건조한 슬라이드는 Hoechst 33258(6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)액으로 30분간 염색 후 MacIlvain's buffer(0.25M Na_2HPO_4 : 0.1M citric acid=36:1)에 담가 57°C로 가열하고 black light를 30분간 폭로시킨후 10% Giemsa 용액으로 5분간 염색한다. 염색된 슬라이드들은 각 culture당 25개의 2차 metaphase를 관찰하여 SCE빈도를 산출하였으며 각 농도당 2회 실험을 실시하였다.

***In vivo* micronucleus test²¹⁾**

In vivo micronucleus 실험을 ICR mice(♂, 25~30 g)를 사용하여 실시하였으며 실험군당 마우스는 5마리로 하였다. 양성대조물질로서는 MNU와 B(a)P를 사용하였다. 마우스의 말초혈액중 reticulocyte를 이용하는 소핵실험을 실시하였다. 시험의 개요는 B(a)P를 투여하고 48시간 후 꼬리정맥에서 말초혈액을 채취하여 이를 acridine orange가 coating 되어있는 슬라이드 상에 떨어뜨리고 커비슬라이드를 덮은 다음 형광현미경으로 망상적혈구(reticulocytes, RETs)중 소핵을 가진 망상적혈구(micronucleated reticulocytes, MNRETs)의 빈도를 관찰하였으며 이때 마우스 한마리당 1000개의 RETs를 관찰하였다.

한편, 유전독성억제실험을 위해서는 양성대조물질인 B(a)P(150 mg/kg, i.p.)와 flavonoid(0, 0.1, 1, 10, 100 mg/kg)을 각각 경구투여한 후 처음 투여 48시간 후 말초혈액을 채취하여 소핵실험을 실시하였다.

S-9 mix의 조제

S-9은 강원대학교 농업생명대학의 함승시교수로 부터 분양받았다. 모든 실험 조작은 0~4°C의 냉동실에서 무균적으로 행하였고 유도물질로는 phenobarbital (PB)와 5,6-benzoflavone(BF)를 사용하였다. 멸균 생리식염수 1 ml 당 20 mg의 PB를 용해하였고, corn

oil 1 ml 당 10 mg의 BF를 용해하여 유도물질로 사용하였다. 실험용 동물로는 체중이 약 200 g 정도의 7주령된 흰 쥐(SD, male)를 사용하였으며 1일째는 30 mg/kg의 PB를, 2일째는 60 mg/kg의 PB를, 3일째는 60 mg/kg의 PB와 60 mg/kg의 BF를, 4일째는 60 mg/kg의 PB를 복강내에 투여한 후 5일째 단두 도살하여 충분히 방혈시켰다. 도살된 흰 쥐의 간에 냉생리 식염수를 혈관에 가하여 혈액을 제거하였으며 이것을 미리 칭량한 용액에 넣어 중량을 달고 세절하여 3배 중량의 냉각된 0.15 M KCl 용액을 가한 다음 teflon pestle로 homogenize 하였다. homogenate를 9,000×g에서 10분간 원심분리하여 얻어진 상등액이 S9 fraction 이며 이것을 1 ml 씩 microbial centrifuge tube에 담아 dry ice bed 중에서 급속 동결한 후 -80°C deep freezer에 보존하면서 실험에 사용하였다. S9-mix는 실험 직전에 얼음상에서 시험관에 탈이온수 251 μl , 0.2M NaHPO_4 buffer(pH 7.4) 2.5 ml, 0.04M NADP 0.5 ml, 0.2M glucose-6-phosphate 125 μl , Mg-K salt solution(1.65M KCl+0.4 M MgCl_2) 144 μl , S9 1.48 ml의 순서로 가하여 잘 혼합하여 총 부피가 5 ml가 되도록 조제하였다.

B(a)P에 의한 DNA binding effect

Calf thymus DNA 100 μg 에 일정농도의 B(a)P/DMSO 100 μl , Tris/HCl buffer(pH 7.4) 100 μl , S-9 mix 100 μl , DMSO 100 μl 를 가하고 37°C에서 일정 시간 동안 배양한 후 cold acetone 1 ml을 가하여 반응을 정지 시킨 후, 2 M $\text{Na}(\text{Ac})_2$: EtOH(1:50) 4.5 ml을 가하여 3,000 rpm에서 원심분리하고, DNA pellet에 95% EtOH 4.5 ml을 가하여 세척하고 원심분리하는 과정을 2회 반복하였다. 이 때 생긴 DNA pellet을 N_2 -gas 중에서 건조한 후 50 mM EDTA/0.1M NaCl 100 μl 에 녹여 DNA 용액으로 하였으며, 이 용액 10 μl 를 증류수 2.99 ml과 섞어 260 nm에서 UV 측정하여 DNA 양을 계산하였다. 남은 90 μl 에 1 N-HCl 100 μl 를 가하여 75°C에서 1시간동안 가수분해를 한 후 2N-NaOH 50 μl 를 넣어 중화시켰다. 3,000 rpm에서 원심분리하여 얻은 상등액 150 μl 을 DMSO 2.85 ml에 현탁하여 Perkin Elmer Fluorescence Spectrophotometer(Model LS-3)로 Excitation 370 nm, Emission 407 nm에서 형광을 측정하였다.

통계처리

실험을 통해 얻어지는 data들은 Student's t-test와 one-way analysis of variance(ANOVA) test를 사용하여 유의성 검정을 하였다.

결 과

B(a)P 유도 SCE에 대한 quercetin 및 배당체들의 효과

In vitro mouse spleen lymphocyte에서 MNU유도 SCE에 대한 quercetin 및 배당체들의 효과를 Table I에 나타내었다. 대부분의 quercetin 및 배당체들은 B(a)P 유도 SCE에 대하여 $10^{-7} \sim 10^{-5}$ M에서 10% 이하의 억제경향을 나타내었으나 뚜렷하지는 않았다. 한편, quercetin비배당체와 배당체들 사이에 있어서는 억제활성의 차이는 크지 않았지만 quercetin 비배당체가 배당체들 보다 다소 활성이 크게 나타난 것으로 보였다.

B(a)P 유도 MNRET에 대한 quercetin 및 배당체들의 효과

마우스에서 B(a)P유도 MNRET에 대한 quercetin 및 배당체들의 효과를 Table II에 나타내었다. 실험대상 quercetin 및 배당체들은 MNU유도 MNRET에 대하

여 *in vitro* 실험이었던 mouse spleen lymphocyte SCE시험에서와는 달리 뚜렷한 억제경향을 나타내었다. 각 화합물의 투여용량 10 mg/kg 및 100 mg/kg에서 각각 quercetin이 37.3%(p<0.01), 31.3%(p<0.01), rutin은 20.0%(p<0.05), 45.4%(p<0.01), quercitrin이 32.0%, 18.8%, isoquercitrin이 24.5%, 50.8%(p<0.05), hyperin이 29.0%(p<0.01), 30.6%(p<0.01)의 억제효과를 나타내었다. 또한, one-way ANOVA test에서 모든 실험대상 quercetin과 배당체들이 p<0.01의 유의성있는 용량의존적 억제경향을 나타내었다. 한편, quercetin비배당체와 배당체들 사이의 활성차이는 나타나지않았다.

B(a)P에 의한 DNA binding에 미치는 S-9 mix와 배양시간의 영향

Table II에서 나타낸 B(a)P유도 소핵생성에 대한 quercetin과 배당체들의 억제효과에 대한 작용기전으로서 B(a)P와 DNA와의 binding 효과를 검정하였다. 먼저 Table III에 B(a)P에 S-9무첨가와 첨가에 따른 calf thymus DNA에 결합된 B(a)P양을 fluorescence intensity로 나타내었다.

10^{-3} M B(a)P에 S-9 mix를 첨가하여 배양하였을때는 첨가하지않고 배양하였을때와 비교하여 약 6.7배의

Table I— The effect of quercetin and its glycosides against B(a)P-induced SCE in mouse spleen lymphocytes

Concentration ^a		SCE/cell, Mean ± SE ^b				
(M)	Quercetin	Rutin	Quercitrin	Isoquercitrin	Hyperin	
0	18.0±0.6	18.0±0.6	18.0±0.6	18.0±0.6	18.0±0.6	
10^{-7}	17.8±1.2	17.7±0.2	16.9±0.6	18.0±1.0	17.1±0.1	
10^{-6}	16.7±0.7	17.1±0.4	16.8±0.5	17.0±0.9	17.9±0.9	
10^{-5}	16.1±0.6	16.9±0.2	17.0±0.6	17.1±1.6	16.9±1.2	

^{a)} B(a)P or B(a)P plus flavonoid was added to culture at 24 h after initiation of cultures. Cells were harvested at 48 h.

^{b)} Twenty five 2nd metaphases per culture and fifty 2nd metaphases per dose were analyzed.

Table II— Suppressive effects of quercetin and its glycosides on the frequency of MNRETs by benzo(a)pyrene

Dose ¹⁾ (mg/kg, p.o.)	MNRETs/1,000 RETs ²⁾ , Mean ± S.E.				
	Quercetin	Rutin	Quercitrin	Isoquercitrin	Hyperin
0	13.4±0.87	11.0±0.71	10.6±0.81	12.2±0.66	12.4±0.51
0.1	14.2±1.02	11.6±0.51	11.2±0.58	11.0±1.14	11.0±0.71
1	13.6±0.93	10.0±0.89	8.6±0.68	11.4±0.68	12.2±0.66
10	8.4±0.25**	8.8±0.66*	7.2±1.11	9.2±1.62	8.8±0.58**
100	9.2±0.37**	6.0±0.71**	8.6±1.25	6.0±1.22*	8.6±0.51**

¹⁾ B(a)P (150 mg/kg) was intraperitoneally administered and flavonoid was administered orally.

²⁾ 1,000 type I and II reticulocytes(RETs) per animal were examined and the frequency of MNRETs was scored.

*,** Significantly different from the control group(0 mg/kg) at p<0.05 and p<0.01, respectively (Student's t-test).

Table III— DNA binding effect of benzo(a)pyrene with/without S-9 mix

B(a)P ¹⁾ (M)	Fluorescence intensity, Mean±S.D. (Ex. 370 nm, Em. 407 nm) ²⁾	
	Without S-9 mix	With S-9 mix
0	1.9±0.9	2.4±1.4
10 ⁻³	6.5±0.3*	43.7±1.0**

¹⁾ Calf thymus DNA was incubated with 10⁻⁵M B(a)P with/without 20% S-9 mix for 6 h at 37°C in Tris buffer (pH 7.4).

²⁾ The DNA binding effect of B(a)P was analyzed by fluorescence spectrophotometer.

*,** Significantly different from the control group at p<0.05 and p<0.01, respectively (Student's t-test).

Table IV— DNA binding effect of benzo(a)pyrene with S-9 mix on 3, 6, and 12 hours incubation

B(a)P ¹⁾ (M)	Fluorescence intensity, Mean±S.D. (Ex. 370 nm, Em. 407 nm) ²⁾		
	3h	6h	12h
0	0.5±0.1	0.9±0.1	1.2±0.0
10 ⁻⁴	2.5±0.1**	3.3±0.1**	7.1±0.4**
10 ⁻³	26.5±4.60*	47.8±4.2**	54.5±12.8*
10 ⁻²	217.8±3.6**	364.2±9.9**	412.7±22.5**

¹⁾ Calf thymus DNA was incubated with B(a)P and 20% S-9 mix for 3, 6, 12 h at 37°C in Tris buffer (pH 7.4).

²⁾ The DNA binding effect of B(a)P was analyzed by fluorescence spectrophotometer.

*,** Significantly different from the control group at p<0.05 and p<0.01, respectively (Student's t-test).

DNA binding 증가효과를 나타내었다. 따라서 B(a)P의 S-9 mix에 의한 활성대사산물이 DNA와의 반응성이 높은 것으로 판단된다. 한편, Table IV에 B(a)P의 S-9mix와의 배양시간에 따른 DNA binding을 B(a)P농도에 따라 나타내었다. B(a)P와 DNA와의 binding은 배양시간에 따라, 또한 B(a)P농도에 따라 증가되는 경향을 나타내었다. 따라서, quercetin과 배당체들의 B(a)P와 DNA와의 binding 억제효과실험을 위해서 B(a)P의 농도는 10⁻³ M과 배양시간은 6시간으

로 정하여 실험하였다.

B(a)P에 의한 DNA binding에 미치는 quercetin 및 배당체들의 효과

Calf thymus DNA에 B(a)P를 10⁻³ M이 되도록 가하고 여기에 S-9 mix를 20% 되도록 가한 후 quercetin과 배당체들 농도별로 첨가하여 배양하였을 때 DNA와 결합된 B(a)P 화합물을 분석한 결과를 Table V에 나타내었다. 실험대상 quercetin과 배당체들 모두 B(a)P와 DNA binding을 억제하는 것으로 나타났다. 그러나 cytochrome p450(CYP) monooxygenase inducer로 잘 알려져 있는 β-naphthoflavone은 예상대로 증가시키는 것으로 나타났다. 한편, quercetin비배당체는 다른 배당체들보다 억제활성이 비교적 크게 나타났다. 각 화합물의 투여농도 10⁻³M 및 10⁻²M에서 각각 quercetin이 54.9%(p<0.01), 60.3%(p<0.01), rutin은 6.3%, 52.8%(p<0.05), quercitrin이 18.2%(p<0.05), 57.9%(p<0.01), isoquercitrin이 15.7%, 44.9%, hyperin이 23.8%(p<0.05), 36.6%(p<0.05), β-naphthoflavone은 -35.5%(p<0.05), -44.3%(p<0.05)의 억제효과를 나타내었다. 또한, one-way ANOVA test에서 모든 실험대상 quercetin과 배당체들이 p<0.01의 유의성있는 용량-존적 억제경향(β-naphthoflavone의 경우는 증가경향)을 나타내었다.

고 찰

본 연구에서는 flavonoid 화합물 중 flavonol 유도체인 quercetin 과 그 배당체들을 대상으로하여 B(a)P와 같은 2차 발암물질에 의해 유도된 유전독성(자매염색분체교환과 소핵생성)의 억제 활성을 비교하였다.

In vitro mouse spleen lymphocyte에서 quercetin 및 배당체들은 B(a)P유도 SCE에 대하여 약간의

Table V— Suppressive effects of quercetin and its glycosides against DNA binding effect by benzo(a)pyrene with S-9 mix

Treatment of flavonoids ¹⁾ (M)	Fluorescence intensity (Ex. 370 nm, Em. 407 nm), Mean±S.D.					
	Quercetin	Rutin	Quercitrin	Isoquercitrin	Hyperin	β-naphthoflavone
0	51.5±3.57	47.5±7.78	44.5±1.91	48.3±9.74	47.8±2.43	44.2±1.10
10 ⁻⁴	45.7±3.21	49.2±1.42	45.8±4.23	51.2±5.43	47.7±2.30	40.1±3.64
10 ⁻³	23.2±1.41**	44.5±4.70	36.4±0.96*	40.7±3.32	36.4±0.80*	59.9±1.82*
10 ⁻²	20.4±0.95**	22.4±1.80*	18.7±1.36**	26.6±3.51	30.3±1.80*	63.8±4.30*

¹⁾ DNA was incubated with B(a)P and flavonoids for 6h at 37°C in Tris buffer (pH 7.4).

*,** Significantly different from the control group at p<0.05 and p<0.01, respectively (Student's t-test).

억제경향을 나타내었으나 뚜렷하지는 않았다. 한편, quercetin비배당체와 배당체들 사이에 있어서는 억제활성의 차이가 크지 않았지만 quercetin 비배당체가 배당체들 보다 다소 활성이 크게 나타난 것으로 보였다. *in vitro* 시험에서의 이같은 결과는 전보¹⁹⁾에서 보고한 바 있는 mouse spleen lymphocyte에서 N-methyl-N-nitrosourea에 의해 유도된 SCE에 대해서도 quercetin 보다 그 배당체들의 억제활성이 낮았던 결과와도 일치하였다.

그러나, 마우스에서 B(a)P유도 MNRET에 대한 quercetin 및 배당체들의 효과는 *in vitro* 실험이었던 mouse spleen lymphocyte SCE시험에서와는 달리 뚜렷한 용량 의존적 억제경향을 나타내었다. 각 화합물의 최고투여용량 100 mg/kg에서 각각 quercetin이 31.3%(p<0.01), rutin은 45.4%(p<0.01), quercitrin이 18.8%, isoquercitrin이 50.8%(p<0.05), hyperin이 30.6%(p<0.01)의 억제효과를 나타내었다. 그러나 본 실험에서는 분자량을 감안하지 않고 각 유도체들을 0.1~100 mg/kg씩 동일하게 경구투여했음을 고려할때 비배당체인 quercetin이 배당체들보다 활성이 크다고 판단할 수 없었다.

이같이 *in vitro* 시험계에서는 억제활성이 거의 나타나지 않고, *in vivo* 시험계에서는 억제활성이 잘 나타난 것은 *in vitro*에서 사용한 primary cell인 mouse spleen lymphocyte 자체의 대사능이 미약하기 때문에 quercetin의 대사활성화된 대사물에 의해서 일어나는 유전독성억제효과를 나타내지 못했을 가능성이 있다. 실제로 flavonoid들은 *in vitro*보다 대사활성화계가 존재하는 *in vivo* 시험계에서 유전독성억제활성을 잘 나타내고 있다.²²⁾ 본 연구의 결과 *in vitro*에서 보다 *in vivo*에서 quercetin을 비롯한 배당체들이 B(a)P에 의한 유전독성을 비교적 잘 억제하는 것은 이러한 flavonoid들의 유전독성억제효과가 대사활성화된 대사물에 의해서 일어나고, 이들 대사물들이 B(a)P에서 유래되는 B(a)P ultimate form과의 소거작용, 또는 DNA와 B(a)P와의 작용방지를 통해서 이같은 억제효과가 나타나는 것으로 판단된다.²³⁾ 한편, rutin이나 quercitrin과 같은 quercetin배당체들은 구강이나 장관의 박테리아가 생산하는 β-glycosidase에 의해서 당이 가수분해되어 생성된 유리 quercetin이 흡수된다고 알려져 있다.²⁴⁾ 그러나 본 실험의 *in vitro* SCE test에서 사용한 mouse spleen lymphocytes는 quercetin 배당체

들을 가수분해할 수 있는 효소활성이 약하다. 따라서, 세포막 통과가 잘되는 aglycone으로의 생성이 용이하지 않았기 때문에 B(a)P가 세포내 DNA를 손상시켜 일어나는 SCE생성을 억제하지 못했을 가능성도 배제할 수 없다.

한편, *in vivo*에서 quercetin비배당체와 배당체 사이의 뚜렷한 활성차이를 볼 수 없었던 것은 *in vivo*에서는 장내세균들에 의해 quercetin 배당체들이 쉽게 quercetin 비배당체로 가수분해되어 상호간 비슷한 활성을 나타내고 있는 것으로 판단된다.

B(a)P는 간내 CYPs 효소들에 의해 B(a)P-7,8-diol-9,10-epoxide 같은 ultimate forms이 생성되어 이들이 DNA와의 비가역적 결합을 함으로써 mutation이 일어나는 것으로 잘 알려져 있다.²⁵⁾ B(a)P 유전독성억제효과의 작용기전을 규명하기 위하여 DNA level에서 B(a)P에 대한 calf thymus DNA와의 binding효과를 시험하였는 바 cytochrome p450 1A2 inducer인 β-naphtoflavone은 B(a)P와 DNA와의 binding을 농도의존적으로 증가시키나 quercetin 및 그 배당체들은 농도의존적으로 감소시켰다. 이같은 결과는 여러 연구보고들²⁶⁻²⁹⁾과 같이 β-naphtoflavone이 cytochrome p450 1A2 inducer로 작용하여 B(a)P의 대사를 활성화시켜 B(a)P metabolite들과 DNA와의 binding를 증가시키는 것으로 보인다. 따라서 본 실험 대상 quercetin 및 배당체들은 CYPs inhibitor로서 작용하는 것으로 판단된다. 이같은 결과는 여러 연구자들이 보고한 바있는 quercetin 등이 CYPs 관련 효소들의 저해효과를 갖고 있다는 사실과 일치한다.³⁰⁾

따라서 본 연구에서는 quercetin 및 배당체들이 나타내는 유전독성억제작용이 또다른 작용기전일 수 있는 DNA repair modulation효과를 전혀 배제할 수 없지만, 적어도 B(a)P metabolism을 억제하여 DNA와의 adduct 형성을 감소시켜 일어나는 것으로 추정된다.³¹⁾

이상을 요약하면, quercetin 및 그 배당체들은 B(a)P에 의해 유도된 *in vitro* SCE에는 억제활성을 크게 나타내지 못했으나 *in vivo* 소화생성에 대해서는 억제활성을 크게 나타내었다. 이러한 유전독성억제효과는 B(a)P의 대사억제를 통해서 DNA 손상을 저해하는 기전으로 유전독성억제효과를 나타내는 것으로 판단된다. 그러므로 quercetin 및 그 배당체들은 환경발암물질인 B(a)P와 같은 polycyclic aromatic hydrocarbon에 의한 유전독성억제제로서 작용할 수 있는 생리

활성물질들로 판단된다.

감사의 말씀

본 논문은 한국과학재단 핵심전문연구비(과제번호 951-0711-063-2)지원으로 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

문헌

- 1) Kuhnau, J. : The flavonoids. A class of semi-essential food component: Their role in human nutrition. *Wld. Rev. Nutr. Diet* **24**, 117 (1976).
- 2) Pierpoint, W. S. : Flavonoids in the human diet. in *Plant flavonoids in biology and medicine* (Cody, V., Middleton, E. and Harborne, J.B. eds.), A. R. Liss, New York, p. 125 (1986).
- 3) Brown, J. P. : A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds. *Mutation Res.* **75**, 243 (1980).
- 4) MacGregor, J. T. : Genetic toxicology of dietary flavonoids. *Prog. Clin. Biol. Res.* **213**, 33 (1986).
- 5) MacGregor, J. T. : Genetic and carcinogenic effects of plant flavonoids: an overview, Nutritional and toxicology aspects of food safety. *Adv. Exp. Med. Biol.* **177**, 497 (1984).
- 6) Stavric, B. : Mutagenic food flavonoids, *Fed. Proc.*, **43**, 2475 (1984).
- 7) Hatcher, J. F. and Bryan, J. T. : Factors affecting the mutagenic activity of quercetin for *Salmonella typhimurium* TA98: metal ions, antioxidants, and pH. *Mutation Res.* **148**, 13 (1985).
- 8) Bjeldanes, L. F. and Chang, G. W. : Mutagenic activity of quercetin and related compounds. *Science* (Wash. DC) **197**, 577 (1977).
- 9) MacGregor, J. T. and Jurd, L. : Mutagenicity of plant flavonoids: structural requirements for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Res.* **54**, 297 (1978).
- 10) Leighton, T., Ginther, C., Fluss, L., Hater, W. K., Cansado, J. and Notario, V. : Molecular characterization of quercetin and quercetin glycosides in *Allium* vegetables. In *Phenolic compounds in food and their effects on health II* (Huang, M-T., Ho, C-T. and Lee C. Y. eds.), ACS Symposium Series 507, American Chemical Society, p. 220 (1992).
- 11) Huang, M. and Ferraro, T. : *Phenolic compounds in food and cancer prevention*. In *Phenolic compounds in food and their effects on health II* (Huang, M-T., Ho, C-T. and Lee C.Y. eds.), ACS Symposium Series 507, American Chemical Society, p. 28 (1992).
- 12) Stich, H. F., Karim, J., Koropatnick, J. and Lo, L. : Mutagenic action of ascorbic acid. *Nature* **260**, 722 (1976).
- 13) Pamuku, A. M., Yalciner, S. Hatcher, J. F. and Bryan, G. T. : Quercetin, a rat intestinal and bladder carcinogen present in bracken fern (*Pteridium aquilinum*). *Cancer Res.* **40**, 3468 (1980).
- 14) Ogawa, S., Hirayama, T., Nohara, M., Tokada, M., Huai, K. and Fukui, S. : The effects of quercetin on the mutagenicity of 2-acetylaminofluorene and benzo(a)pyrene in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Res.* **142**, 103 (1985).
- 15) Shah, G. M. and Bhattacharya, R. K. : Modulation by plant flavonoids and related phenolic of microsome catalyzed adduct formation between benzo(a)pyrene and DNA. *Chem. Biol. Interact.* **59**, 1 (1986).
- 16) Heo, M. Y., YU, K. S., Kim, K. H., Kim, H. P. and Au, W. W. : Anticlastogenic effect of flavonoid against mutagen-induced micronuclei in mice. *Mutation Res.* **284**, 243 (1992).
- 17) Heo, M. Y., Lee, S. J., Kwon, C. H., Kim, S. W., Sohn, D. H. and Au, W. W. : Anticlastogenic effects of galangin against bleomycin-induced chromosomal aberrations in mouse spleen lymphocytes. *Mutation Res.* **311**, 225 (1994).
- 18) Heo, M. Y., Lee, H. J., Sohn, S. J. and Au, W. W. : Anticlastogenic effect of galangin against mitomycin C-induced micronucleated reticulocytes in mouse peripheral blood. *Mutation Res.* **360**, 37 (1996).
- 19) 김정한, 허문영 : Quercetin 및 quercetin배당체들의 유전독성억제효과. 식품위생안전성학회지 **11**, 115 (1996).
- 20) Wolff, S. : Measurement of sister chromatid ex-

- change in mammalian cells. In DNA repair. A laboratory manual of research procedure (Hanawalt, P. C. and Friedberg, E. C. eds.), Marcel Dekker, New York, p. 575 (1981).
- 21) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, Jr., M. : The micronucleus assay with peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Res.* **278**, 209 (1990).
 - 22) 손수정, 김정환, 김영진, 허인희, 허문영 : N-Methyl-N-nitrosourea 유도 자매염색분체교환생성과 DNA 메틸화에 대한 galangin의 억제효과. *약학회지* **39**, 94 (1995).
 - 23) Flora, S. and Ramel, C. : Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Classification and overview. *Mutation Res.* **202**, 285 (1988).
 - 24) Bokkenheuser, V. D. Shackleton, C. H. and Winter, J. : Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal bacteroides from human. *Biochem. J.* **248**, 953-956 (1987).
 - 25) Wiloski, P. G., Wood, A. W., Chang, R. L., Levin, W., Yagi, H., Hernandez, O., Jerina, D. M. and Conney, A. H. : High mutagenicity and toxicity of diol epoxide derived from benzo(a)pyrene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **68**, 1006 (1976).
 - 26) Kleinow, K. M., James, M. O., Tong, Z. and Venugopalan, C. S. : benzo(a)pyrene in an isolated perfused in situ catfish intestinal preparation. *Environ. Health Prospect.* **106**, 155 (1998).
 - 27) Hirose, Y., Sugie, S., Yoshimi, N., Matsunaga, K. Hara, A. and Nori, H. : Induction of apoptosis in colonic epithelium treated with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine(PhIP) and its modulation by a P450 1A2 inducer, beta-naphthoflavone, in male F344 rats. *Cancer Lett.* **123**, 167 (1998).
 - 28) Kessler, F. K. and Ritter, J. K. : Induction of a rat liver benzo(a)pyrene-trans-7,8-dihydrodiol glucuronidating activity by oltipraz and beta-naphthoflavone. *Carcinogenesis* **18**, 107 (1997).
 - 29) Jensen, K. G., Onfelt, A., Poulsen, H. E., Doehmer, J. and Loft, S. : Effect of benzo(a)pyrene and (+, -)-trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene on mitosis in chinese hamster V79 cells with stable expression of rat cytochrome P450 1A1 or 1A2. *Carcinogenesis* **14**, 2115 (1993).
 - 30) Smith, T. J. and Yang, C. S. : Effects of food phytochemicals on xenobiotic metabolism and tumorigenesis: in Food phytochemicals for cancer prevention I(Huang, M-T., Osawa, T., Ho, C-T. and Rosen, R. T.), ACS Symposium Series 546, American Chemical Society, p. 17 (1994).
 - 31) Middleton, E. and Kandaswami, C. : in The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer : The flavonoids: Advances in Research (Eds. by Harborne, J. B.), Chapman & Hall, London, p. 619 (1993).