

Galangin의 유전독성 억제효과와 작용기전

허문영[†] · 류재천*

강원대학교 약학대학

*한국과학기술원 도핑콘트롤센터

Antigenotoxicity of Galangin and its Action Mechanism

Moon Young Heo and Jae-Chun Ryu*

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

*Doping Control Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul 130-650, Korea

(Received March 29, 1998)

ABSTRACT : In order to compare the suppressive effect of galangin on the genotoxicity by N-methyl-N-nitrosourea (MNU) or benzo[a]pyrene (B(a)P), *in vivo* micronucleus test using mouse peripheral blood and *in vitro* sister chromatid exchange(SCE) test using mouse spleen lymphocytes were performed. MNU or B(a)P-induced micronucleated reticulocytes *in vivo* was decreased by the simultaneous treatment of galangin. MNU or B(a)P-induced SCEs *in vitro* was also decreased by the simultaneous treatment of galangin. On the other hand, the determinations of [³H]MNU-induced total DNA binding and methylated DNA were performed to find out the mechanism of action. [³H]MNU-induced total DNA binding was inhibited by the treatment of galangin in calf thymus DNA. HPLC analysis of DNA hydrolysates showed that galangin caused a decrease of 7-methyl guanine and O⁶-methyl guanine in calf thymus DNA. To elucidate the action mechanism of galangin against B(a)P, alteration of B(a)P metabolism was studied. Galangin inhibited B(a)P metabolism in the presence of S-9 mix and decreased B(a)P-DNA binding in calf thymus DNA with S-9 mix.

Keyword : Galangin, Peripheral blood micronucleus assay, Sister chromatid exchange, DNA binding, DNA methylation, Alkylating agent, N-nitro-N-nitrosourea(MNU), Benzo(a)pyrene, Cancer chemopreventive agent

서 론

본인들은 그동안 flavonoid화합물 중 galangin, morin, fisetin, quercetin, flavonol 및 kaempferol 등 flavonol유도체들의 유전독성 억제효과가 비교적 컸음을 보고한 바 있다(Heo *et al.*, 1992, Heo *et al.*, 1993, Heo *et al.*, 1994, Heo *et al.*, 1996). 특히, 이들 천연물질 중 galangin(3,5,7-trihydroxy flavone)은 benzo(a)pyrene[B(a)P]과 N-methyl-N'-nitro-N-nitroso guanidine(MNNG)를 비롯한 여러가지 발암물질들의 유전독성(염색체이상, 자매염색분체교환, 소핵생성등)을 강하게 억제시켰다. 한편, galangin은 B(a)P와 같은 2차 발암물질에 대하여 대사활성화를 억제하여 활성분태형의 생성감소와 함께 DNA 결합을 저해하는 기전으로 소핵생성등의 유전독성을 억제하

였다(Kim *et al.*, 1991).

이에 본 연구에서는 DNA손상과 염색체손상을 각각의 지표로 하는 유전독성시험인 자매염색분체교환시험과 소핵시험을 이용하여 galangin의 유전독성억제활성을 검정하여 비교하고, MNU와 B(a)P에 의한 DNA손상을 규명할 수 있는 DNA binding과 methylated DNA 및 B(a)P metabolites 분석을 통하여 작용기전을 연구하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

시약 및 재료

Galangin (3,5,7-trihydroxy flavone, CAS No. 548-83-4)은 Aldrich사에서 구입하여 HPLC로 순도(99.9%이상)를 확인하고

[†]To whom correspondence should be addressed.

사용하였으며, N-methyl-N-nitrosourea(MNU)와 benzo(a)pyrene [B(a)P]등 기타 시약들은 Sigma사에서 구입하였다. [³H] N-nitro-N-nitrosourea (1.7Ci/mmol; 1Ci=62.9GBq)은 Du Pont사로부터 구입하여 사용하였다. 한편 O⁶-methylguanine은 한림대학교 화학과 전종갑교수가 합성한 것을 사용하였다. FBS등 세포배양에 필요한 시약들은 GIBCO사에서 구입하여 사용하였다.

Animals

본 실험에서 사용되는 ICR과 C57BL/6 mice는 서울대학교에서 공급받아 강원대 약대 동물사육실내에 있는 양압의 무균 동물챔버에서 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 vivo Micronucleus test (Hayashi, *et al.*, 1990)

In vivo micronucleus 시험을 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 MNU 또는 B(a)P를 투여하고 48시간 후 꼬리정맥에서 말초혈액을 채취하여 이를 acridine orange가 coating 되어있는 슬라이드 상에 떨어뜨리고 커버슬라이드를 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 MNU (40 mg/kg, i.p.) 또는 B(a)P (150 g/kg, i.p.) 단독, 또는 양성대조물질과 galangin (0, 0.1, 1, 10 mg/kg)을 각각 경구투여한 후 처음 투여 48시간 후 말초혈액을 채취하여 소핵시험을 실시하였다.

In vitro Sister Chromatid Exchange test (Wolff *et al.*, 1981)

C57BL/6 마우스 (♂, 15~25 g)로 부터 무균적으로 비장을 적출하여 일회용 50ml 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, Invenex No.33-1), 1% penicillin-streptomycin (Gibco No. 600-5145), 2% concanavalin A (Con A, Sigma No. C-5275), 0.01% β-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 MNU(10⁻⁵M) 또는 B(a)P(10⁻⁴M) 단독, 또는 양성대조물질과 galangin(0, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵M)을 각각 동시에 첨가한 후 배양개시후 45.5시간에 colcemid(final conc. 0.4 μg/ml)를 가해 분열중기세포를 포획하고 48시간에 배양을 끝내고 염색체 표본을 상법에 따라 만들었다. 이때 음성대조군은 MNU의 용매인 생리식염수와 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 빙냉 정제수에 담가놓았던 슬라이드에 떨어뜨린후 건조한다. 건조한 슬라이드는 Hoechst 33258 (6.25 μg/ml)액으로 30분간 염색 후 MacIlvain's buffer (0.25M Na₂HPO₄:0.1M 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.

MNU/DNA binding 정량(Dixit *et al.*, 1986)

Calf thymus DNA 100 μg에 [³H]-MNU 10 μCi, MNU 2.5×10⁻⁶ M을 Tris/HCl(pH7.4)에 녹이고, galangin을 0, 10⁻⁴, 10⁻³, 10⁻² M을 가하여 37°C incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양후 2M Na(Ac)₂:EtOH(1:50) 4.5 ml를 가하여 3,000 rpm에서 원심분리하고, DNA pellet에 95% EtOH 4.5 ml를 가하여 세척하고 원심분리하는 과정을 2회 반복하였다. DNA pellet은 N₂ gas중에서 건조하였다. N₂ gas로 건조시킨 DNA pellet을 50 mM EDTA/0.1M NaCl 100 μl로 녹인 후 DNA용액으로 하였으며, 이용액 10 μl를 증류수 2.99 ml과 섞어 260 nm에서 UV 측정하여 DNA양을 계산하였다. 이 DNA용액 10 μl를 cocktail 5 ml가 들어있는 glass vial에 넣고 현탁한 후 liquid scintillation counter로 측정하였다.

Methylated DNA 정량(순수정등, 1995)

상기 50 mM EDTA/0.1 M NaCl 100 μl에 녹아 있는 DNA 80 μl를 1N-HCl 50 μl를 가하고, 70°C에서 1시간 배양하여 가수분해시켰다. 2N-NaOH 20 μl를 가하여 중화시킨 후, 총량이 150 μl가 된 검체를 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액 80 μl를 취하여 혼합 표준액 16 μl를 가해 검액으로 하였다.

HPLC분석은 standard base들인 adenine, 1-methyladenine,

guanine, 7-methylguanine(7-meG), O⁶-methylguanine(O⁶-meG), cytosine, thymine들과 용해시키는데 사용한 methanol, DMSO, free MNU들을 injection하여 peak를 확인 및 분리한 다음, 모두 합쳐 각각 20 µg/ml이 되게 표준액으로 제조하였다. 검체 20 µl를 injection하여 7-meG와 O⁶-meG의 용출액을 받아 cocktail과 혼합한 후, LSC로 측정하였다. HPLC는 Shimadzu 9A, column은 shimadzu C-18을 사용하였고, mobile phase는 10% citrate buffer(pH 3.8)를 사용하였다. 유속은 1 ml/min, 검출기의 흡광도는 254 nm로 하였다.

B(a)P/DNA binding 정량

Calf thymus DNA 100 µg에 B(a)P/DMSO 100 µl(최종농도 10⁻³M), Tris/HCl buffer (pH 7.4) 100 µl, S-9 mix 100 µl, DMSO 100 µl를 가하고 37°C에서 일정 시간 동안 배양한 후 cold acetone 1 ml을 가하여 반응을 정지 시킨 후, 2 M Na(Ac): EtOH (1:50) 4.5 ml을 가하여 3,000 rpm에서 원심분리하고, DNA pellet 에 95% EtOH 4.5 ml을 가하여 세척하고 원심분리하는 과정을 2회 반복하였다. 이 때 생긴 DNA pellet을 N₂-gas 중에서 건조한 후 50 mM EDTA/0.1 M NaCl 100 µl에 녹여 DNA 용액으로 하였으며, 이 용액 10 µl를 증류수 2.99 ml과 섞어 260 nm에서 UV 측정하여 DNA 양을 계산하였다. 남은 90 µl에 1 N-HCl 100 µl를 가하여 75°C에서 1시간동안 가수분해를 한 후 2N-NaOH 50 µl를 넣어 중화 시켰다. 3,000 rpm에서 원심분리하여 얻은 상등액 150 µl을 DMSO 2.85 ml에 현탁하여 Ex. 370 nm, Em. 407 nm에서 형광을 측정하였다. 한편, 검체의 DNA binding 억제효과를 실험하기 위하여 B(a)P가 10⁻³M이 되도록 하고 여기에 검체를 0, 10⁻⁴, 10⁻³, 10⁻²M이 되도록 가하여 6시간 배양하였다.

Benzo(a)pyrene metabolites 정량(Kim *et al.*, 1991)

Tris/HCl buffer (pH 7.4) 280 µl에 B(a)P 10⁻³ M 10 µl (최종 농도는 2×10⁻⁵M)에 galangin을 10 µl (최종농도는 각각 2×10⁻⁶, 2×10⁻⁵, 2×10⁻⁴ M), S-9 mix 200 µl로 반응을 개시하여 6시간 동안 배양한 후 cold acetone 1 ml을 가하여 반응을 정지 시킨 후, ethyl acetate 3 ml 가하여 미반응 B(a)P 및 대사물들을 추출하여 상온에서 감압농축한 후, methanol 2 ml에 용해시켜 HPLC(Shimadzu 9A)와 fluorescence detector (Ex. 370 nm, Em. 407 nm)를 사용하여 미반응 B(a)P 를 분석하였다. 이 때 사용한 HPLC 고정상은 Shimadzu C-18이고, 이동상은 75% acetonitrile을 사용하였다.

통계처리

실험을 통해 얻어지는 data들은 Student's t-test와 one-way

analysis of variance (ANOVA) test를 사용하여 유의성 검정을 하였다.

결 과

MNU 또는 B(a)P유도 유전독성에 대한 galangin의 효과
i) MNU 또는 B(a)P유도 SCE생성에 대한 galangin의 효과

In vitro mouse spleen lymphocyte에서 MNU유도 SCE에 대한 galangin의 효과를 Table 1에 나타내었다. Galangin은 MNU유도 SCE에 대하여 약간의 억제경향을 나타내었으나 뚜렷하지는 않았다. Student's t-test를 사용한 유의성검정에 의하면 10⁻⁶M에서 4.7%(p<0.05), 10⁻⁵M에서 6.8%(p<0.01)의 유의성 있는 억제효과를 나타내었다. 한편, one-way ANOVA test에서 p=0.027로서 용량의존적인 억제경향을 나타내었다.

한편, B(a)P유도 SCE에 대해서도 농도에 따라 억제경향을 나타내었다. 그러나 Student's t-test를 사용한 유의성검정에 의하면 10⁻³M에서만 20.0%(p<0.05)의 유의성 있는 억제효과를 나타내었다. 한편, one-way ANOVA test에서 p=0.047로서 용량의존적인 억제경향을 나타내었다.

ii) MNU 또는 B(a)P유도 소핵생성에 대한 galangin의 효과

마우스에서 MNU 및 B(a)P유도 MNRET에 대한 galangin의 효과를 Table 2에 나타내었다. Galangin은 MNU유도 MNRET에 대하여 *in vitro* 실험이었던 mouse spleen lymphocyte SCE시험에서보다는 다소 큰 억제경향을 나타내었다. MNU유도 MNRET에 대해서는 0.1, 1.0, 10 mg/kg 투여용량에서 각각 36.9%(p<0.01), 40.4%(p<0.01), 36.9%(p<0.01)의 억제효과를 나타내었으나 뚜렷한 용량의존적인 효과를 나타내지는 못했다. 한편, B(a)P유도 MNRET에 대해서는 0.1, 1.0, 10 mg/kg 투여용량에서 각각 36.2%(p<0.01), 28.1%(p<0.05), 21.2%의

Table 1. The effect of galangin against MNU or B(a)P-induced SCE in mouse spleen lymphocytes

Galangin ^a (M)	SCE/cell, Mean ± S.E. ^b	
	MNU	B(a)P
0	19.0±0.1	18.0±0.6
10 ⁻⁷	18.7±0.1	17.2±0.0
10 ⁻⁶	18.1±0.1*	17.2±0.6
10 ⁻⁵	17.7±0.1**	14.4±0.4*

^aMNU (10⁻⁵M) or B(a)P(10⁻⁴M) as positive carcinogen plus galangin was added to culture at 24 h after initiation of cultures. Cells were harvested at 48 h. Twenty five 2nd metaphases per culture and fifty 2nd metaphases per dose were analyzed.

^bSignificantly different from the control group at *p<0.05 and **p<0.01.

Table 2. The effect of galangin against MNU or B(a)P-induced MNRET in mouse peripheral blood

Dose ^a (mg/kg, i.p.)	MNRET/1,000RET, Mean ± SE ^b	
	MNU	B(a)P
0	34.6 ± 1.7	17.4 ± 1.3
0.1	21.8 ± 2.3**	11.1 ± 0.7**
1	20.6 ± 1.2**	12.5 ± 0.9*
10	21.8 ± 1.3**	13.7 ± 1.8

^aMice (n=5) were treated with MNU (40 mg/kg, i.p.) or B(a)P (150 mg/kg, i.p.) and galangin (p.o), simultaneously, and then peripheral blood was collected from tail after 48 h.

^bSignificantly different from the control group at *p < 0.05 and **p < 0.01 (Student's t-test)

억제효과를 나타내었다. 한편, one-way ANOVA test에서 MNU의 경우 p < 0.01, B(a)P의 경우 p < 0.02로서 용량의존적인 억제경향을 나타내었다.

MNU 또는 B(a)P유도에 대한 galangin의 유전독성억제 작용기전

i) MNU에 의한 DNA binding 및 methylated DNA 생성에 미치는 galangin의 효과

Table 3에서 나타난 것처럼 calf thymus DNA에 MNU 2.5 × 10⁻⁶ M과 [³H]-MNU 10 μCi 및 galangin을 0, 10⁻⁴, 10⁻³, 10⁻² M 농도로 처리하였을 때 DNA와 [³H]-MNU의 binding이 10⁻⁴ M에서 54.6%, 10⁻³M에서 36.2%, 10⁻² M에서 53.0%의 억제효과를 나타내었으나 ANOVA 검정에서 p=0.29로서 농도의존적 억제경향은 작았다.

한편, Table 4에서 나타난 것처럼 calf thymus DNA에 MNU 2.5 × 10⁻⁶ M과 [³H]-MNU 10 μCi 및 galangin을 0, 10⁻⁴, 10⁻³, 10⁻² M 농도로 처리하였을 때 7-methylguanine생성이 10⁻⁴M에서 42.8%, 10⁻³M에서 52.6%, 10⁻² M에서 78.3%의 억제효과를 나타내었으나 ANOVA 검정에서 p = 0.25의 억제경

Table 3. Suppressive effect of galangin on the methylation of [³H]-MNU in the calf thymus DNA

Treatment ^a [³ H]-MNU(μCi)+Galangin	DPM/μg of DNA (mean ± S.E.) ^b	
	Mean ± SE	
0	0	9.1 ± 2.9
10	0	3700.0 ± 1248.7
10	10 ⁻⁴	1683.4 ± 1257.3
10	10 ⁻³	2363.0 ± 745.3
10	10 ⁻²	1743.6 ± 31.2

^aDNA was incubated with MNU(2.5 × 10⁻⁶M) and [³H]-MNU (10 μCi) with galangin for 24h at 37°C in Tris buffer(pH 7.4).

^bDuplicate experiments

Table 4. Suppressive effect of galangin on the DNA methylation of [³H]-MNU in the calf thymus DNA

[³ H]-MNU(μCi)+Galangin (M)	Treatment ^a	DPM/μg of DNA (mean ± S.E.) ^b	
		7-Methylguanine O ⁶ -Methylguanine	
		Mean ± SE	Mean ± SE
0	0	10.6 ± 5.5	8.8 ± 0.5
10	0	194.6 ± 84.3	96.7 ± 55.6
10	10 ⁻⁴	115.8 ± 38.2	34.1 ± 4.5
10	10 ⁻³	99.7 ± 51.3	29.7 ± 1.1
10	10 ⁻²	69.0 ± 18.8	30.9 ± 3.3

^aDNA was incubated with MNU (2.5 × 10⁻⁶M) and [³H]-MNU (10 μCi) with galangin for 24h at 37°C in Tris buffer (pH 7.4).

^bDuplicate experiments

향을 나타내었다. O⁶-methylguanine생성도 10⁻⁴M에서 71.2%, 10⁻³M에서 76.2%, 10⁻² M에서 74.9%의 억제효과를 나타내었으나 ANOVA 검정에서 p=0.17의 억제경향을 나타내었다.

ii) Benzo(a)pyrene의 DNA binding과 metabolism에 미치는 영향

Table 5에 나타난 것처럼 calf thymus DNA에 B(a)P를 10⁻³ M이 되도록 가하고 여기에 S-9mix를 20%되도록 가한 후 galangin을 농도별로 첨가하여 배양하였을 때 DNA와 결합된 B(a)P 화합물을 분석한 결과, galangin 투여농도 10⁻⁴M에서 17.6%, 10⁻³M에서 36.0%(p < 0.05), 10⁻²M에서 57.8%(p < 0.05)의 억제효과를 나타내었으며 ANOVA test에서도 p < 0.01의 유의성이 있는 농도의존적 억제경향을 나타내었다.

한편, Table 6에 calf thymus DNA에 B(a)P를 2 × 10⁻⁵M이 되도록 가하고 여기에 S-9mix를 40%되도록 가한 후 galangin을 농도별로 첨가하여 배양하였을 때 DNA와 결합하지않은 B(a)P 화합물을 ethyl acetate로 추출하여 HPLC로 분석한 결과, 잔류 B(a)P는 galangin 투여농도 2 × 10⁻⁶M에서 62.5%(p <

Table 5. Suppressive effects of galangin against DNA binding effect by benzo(a)pyrene with S-9 mix.

Treatment ^a (μg/ml)	FL.intensity(Ex. 370 nm, Em. 407 nm) ^b	
	mean ± S.D.	
0	50.0 ± 4.80 ^c	
10 ⁻⁴	41.2 ± 2.71 ^c	
10 ⁻³	32.0 ± 1.65 ^{c*}	
10 ⁻²	21.1 ± 3.55 ^{c*}	

^aDNA was incubated with 10⁻³ M B(a)P, 20% S-9 mix and galangin for 6h at 37°C in Tris buffer (pH 7.4)

^bTriplicate experiments

^cSignificantly dose-dependent decrease(p < 0.01); Analysis of Variance

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

Table 6. The comparison of suppressive effects on benzo(a)pyrene metabolism with S-9 mix by galangin

Treatment ^a (M)	Residual B(a)P (μM) ^b	
	mean	S.D.
0	1.60±0.100 ^c	
2×10 ⁻⁶	2.60±0.100 ^{c**}	
2×10 ⁻⁵	3.17±0.404 ^{c*}	
2×10 ⁻⁴	4.60±0.100 ^{c**}	

^a20 μM B(a)P was incubated with galangin for 6h at 37°C in Tris buffer (pH 7.4)

^bTriplicate experiments. The residual B(a)P was analyzed by reversed-phase HPLC.

^cSignificantly dose-dependent decrease(p<0.01); Analysis of Variance

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

0.01), 2×10⁻⁵M에서 98.1%(p<0.05), 2×10⁻⁴M에서 187.5%(p<0.01)의 증가효과를 나타내었으며 ANOVA test에서도 p<0.01의 유의성이 있는 농도의존적 억제경향을 나타내었다.

고 찰

최근까지 식물성 polyphenol 화합물중 flavonoid 화합물은 약 200여종으로서 식물계에 널리 분포하고 있으며 사람에게 일상적으로 섭취되고 있는 물질이기 때문에 여러가지 생리활성이 연구되어 왔다(Kuhnau *et al.*, 1976). 사람에게서 1일 섭취량은 평균 1g 이상이라고 추정될 정도로 많은 양이며, 이 중 약 170 mg 정도가 4-oxoflavonoids (flavones, flavanones, chalcone, flavonols) 이며, quercetin glycosides와 kaempferol glycosides 같은 flavonols은 약 50 mg 정도가 섭취되고 있다고 알려지고 있다(Cody *et al.*, 1986).

본 연구에서는 flavonoid 화합물 중 flavonol 유도체인 galangin을 대상으로하여 MNU와 B(a)P와 같은 1,2차 발암물질에 의해 유도된 각종 유전독성(자매염색분체교환과 소핵생성)의 억제 활성을 비교하였다.

MNU와 같은 N-nitroso화합물들은 쉽게 가수분해되어 1-alkane diazotic acid를 생성하고, 이어서 alkyl diazonium ion으로 분해되어 DNA alkylation을 하게 된다. B(a)P와 같은 다환방향족탄화수소화합물들은 cytochrome p450류와 같은 대사활성화 효소에 의해 B(a)P-7,8-diol-9,10-epoxide와 같은 ultimate form으로 변환되어 DNA와 부가체를 형성한다. 이때 생성되는 DNA 부가체들은 자매염색분체교환과 같은 DNA손상에 의한 돌연변이와 발암에 깊은 관련이 있다고 잘 알려져 있다(Dixt *et al.*, 1986, Chang *et al.*, 1985).

In vitro mouse spleen lymphocyte에서 galangin은 MNU 또

는 B(a)P유도 SCE에 대하여 약간의 억제경향을 나타내었으나 크지는 않았다. 그러나, 마우스에서 MNU 또는 B(a)P유도 MNRET에 대한 galangin의 효과는 *in vitro* 실험이었던 mouse spleen lymphocyte SCE시험에서와는 달리 비교적 큰 억제경향을 나타내었다.

이같이 *in vitro*시험계에서는 억제활성이 거의 나타나지 않고, *in vivo*시험계에서는 억제활성이 잘 나타난 것은 *in vitro*에서 mouse spleen lymphocyte자체의 대사능이 미약하기 때문에 galangin의 대사활성화된 대사에 의해 일어나는 유전독성 억제를 나타내지 못했을 가능성이 있다. 실제로 flavonoid들은 *in vitro*보다 대사활성화계가 존재하는 *in vivo*시험계에서 유전독성억제활성을 잘 보이고 있다(손수정등, 1995).

한편, calf thymus DNA를 이용한 total binding 실험에서는 galangin이 MNU에 의한 DNA binding을 저해하고 있는 것으로 나타났으며, 이로 인해 7-methyl guanine과 O⁶-methyl guanine의 생성도 감소되었다. 또한, B(a)P에 대한 total binding 실험에서는 galangin이 B(a)P의 대사를 억제하여 B(a)P ultimate forms의 감소로 인한 DNA binding을 억제하는 것으로 판단된다.

그동안 antimutagenesis 및 anticarcinogenesis의 작용기전으로서 독성물질 및 그 대사산물들의 1) 표적기관으로의 도달 및 반응차단, 2) 라디칼등의 포착제거, 3) 전암세포의 promotion 억제, 4) DNA repair 기능향진 등이 제시되고 있다(Flora *et al.*, 1988).

따라서 galangin이 MNU에 의한 유전독성을 억제하는 것은 MNU에서 유래되는 alkylating ion 과의 작용, 또는 DNA와 MNU와의 작용방지를 통해서 이같은 억제효과가 나타나는 것으로 보인다. 또한, galangin이 B(a)P의 유전독성을 억제하는 것은 microsomal enzyme의 대사활성을 저해하므로써 이같은 억제효과를 나타내는 것으로 보인다. 물론 이들의 유전독성억제효과의 또다른 기전으로서 DNA repair enzyme의 modulation기전을 전혀 배제할 수는 없다.

이상을 요약하면, galangin은 MNU 및 B(a)P에 의한 SCE와 소핵생성을 억제시켰으며, 이러한 억제효과는 MNU에 의한 DNA methylation을 감소시키며, B(a)P의 대사억제를 통해서 ultimate forms을 감소시켜 DNA 손상을 저해하는 기전으로 유전독성억제효과를 나타내는 것으로 판단된다. 그러므로 galangin은 MNU와 같은 alkylating agent와 B(a)P와 같은 polycyclic aromatic hydrocarbon에 의한 유전독성억제제로서 작용할 수 있는 생리활성물질로 판단된다.

감사의 말씀

본 연구는 보건복지부 97년도 보건의료기술개발사업연구비

로 수행되었음을 밝히는 바이다.

참고문헌

- Cody, V., E. Middleton and J.B. Harborne (1986) : Plant flavonoids in biology and medicine, A.R. Liss, New York.
- Chang, R.L., M.-T. Hung, A.W. Wood, C.-Q. Woang, H.L. Newmark, H. Yagi, J.M. Sayer, D.M. Jerina and A.H. Conney (1985) : Effect of ellagic acid and hydroxylated flavonoids on the tumorigenicity of benzo(a)pyrene and (\pm)-7 β , 8 α -dihydroxy-9 α ,10 α - epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene on mouse skin and in the newborn mouse, *Carcinogenesis*, **6**: 1127-1133.
- Dixit, R. and B. Gold (1986) : Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea-induced mutagenicity and DNA methylation by ellagic acid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8039.
- Flora, S. and C. Ramel (1988) : Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis, Classification and overview, *Mutation Res.*, **202**, 285.
- Hayashi, M., T. Morita, Y. Kodama, T. Sofuni and M. Ishidate, Jr. (199) : The micronucleus assay with peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutation Res.*, **278**: 209-213.
- Heo, M.Y., K.S. Yu, K.H. Kim, H.P. Kim and W.W. Au (1992) : Anticlastogenic effect of flavonoid against mutagen-induced micronuclei in mice, *Mutation Res.*, **284**, 243-249.
- Heo, M.Y., C.H. Kwon, D.H. Sohn, S.J. Lee, S.W. Kim, J.H. Kim and W.W. Au (1993) : Effect of flavonol derivatives of 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.* **16**, 196-204.
- Heo, M.Y., S.J. Lee, C.H. Kwon, S.W. Kim, D.H. Sohn and W.W. Au (1994) : Anticlastogenic effects of galangin against bleomycin-induced chromosomal aberrations in mouse spleen lymphocytes, *Mutation Res.*, **311**, 225-229.
- Heo, M.Y., S.J. Lee, S.J. Sohn and W.W. Au (1996) : Anticlastogenic effect of galangin against mitomycin C-induced micronucleated reticulocytes in mouse peripheral blood, *Mutation Res.*, **360**, 37-41.
- H.K. Kim, K.H. Kim, M.Y. Heo and H.P. Kim (1991) : Effects of Antimutagenic flavonoid galangin, on benzo(a)pyrene metabolism in mice, *Korean biochem. J.*, **24**(2), 141-147.
- Kuhnau, J. (1976) : The flavonoids. A class of semi-essential food component : Their role in human nutrition, *Wld. Rev. Nutr. Diet*, **24**, 117-191.
- Wolff, S. (1981) : Measurement of sister chromatid exchange in mammalian cells, In DNA repair. A laboratory manual of research procedure (Hanawalt, P.C. and Friedberg, E.C. eds.), Marcel Dekker, New York, pp. 575-586.
- 손수정, 김정환, 김영진, 허인희, 허문영 (1995) : N-Methyl-N-nitrosourea 유도 자매염색분체교환생성과 DNA 메틸화에 대한 galangin의 억제효과, *약학회지*, **39**, 94-101.