

## 多段階 發癌過程 中 Promotion 段階에서의 TPA에 의한 Mouse Epidermal ODC의 誘導 및 藥物에 의한 遮斷效果

金美敬 · 鄭文鎬 · 張日武\*

서울대학교 保健大學院 環境保健學科, \*서울대학교 天然物科學研究所

### Induction of Mouse Epidermal ODC by TPA and Inhibition by Plant Flavonoids, in Skin Tumor Promotion

Mi Kyung Kim, Moon Ho Chung and Il Moo Chang\*

Department of Environmental Health, Graduate School of Public Health,  
Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

\*Natural Products Research Institute, Seoul National University

#### ABSTRACT

The study was conducted to investigate the mechanism of tumor promotion as the time courses and the doses of promoter, and the effect of plant flavonoids on the TPA-induced ODC responses. The results are summarized as follows:

1. A single, topical application of 17 nmole of the potent tumor promoter, 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, resulted in an induction of mouse epidermal Ornithine Decarboxylase with a peak at 5 hours after treatment and maximized 5.1 times as large as ODC activities of control.
2. Dose-response curve indicated that the tumor promotion increases proportionally between 1.7 and 170 nmole of TPA. This dose dependency relationship indicated that the ability of TPA to stimulate ODC is linked its ability to promote tumors.
3. Naturally occurring plant flavonoids with anticarcinogenic and antipromotional activities were tested for their abilities to inhibit ODC response induced by skin tumor promoter TPA. Intra peritoneal administration of flavonoids compounds (rutin, naphthoflavone, baicalein, quercitrin) and herbal drugs (sophorae flos, crataegi fructus, armeniacae semen) inhibited 17 nmole TPA-induced ODC activities in mouse epidermis *in vivo*.

**Keywords :** Multistage carcinogenesis, tumor promotion, ODC (ornithin decarboxylase), TPA (12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate), quercitrin, naphthoflavone, rutin, hesperidin, baicalein, armeniacae semen, sophorae radix, crataegi fructus.

#### I. 서 론

癌은 세계적으로 3대 사인 중의 하나로<sup>1)</sup> 국내에서도 신생물에 의한 사망 빈도가 점차 증가하여 87년 3위에서 88년에는 2위로 부상하였다.<sup>2)</sup>

인류는 발암물질에 대해 약물, 식이, 흡연 등 自發的 暴露 및 대기, 수질, 산업장 유해물질, 방사선 조사 등 非自發的 環境性 暴露에 노출된 상태에 있다.<sup>3)</sup>

발암 물질의 대부분은 DNA에 대한 반응성 및 *Salmonella*에 대한 변이원성 등 Initiator로서 시험 여부에 대해 음성으로 판정되며,<sup>4)</sup> 산업장, 환경 중에서의 일반적 폭로 수준은 발암 농도이하이다. 이와 같은 nonmutagen과 subcarcinogenic dose에 의한 발암과정은 多段階 發癌性(multistage carcinogenesis)으로 설명될 수 있다.

多段階 發癌性은 1941년 Berenblum이 Benzo(a)pyrene(BP)의 단독 투여에 비해 소량의 BP와 cro-

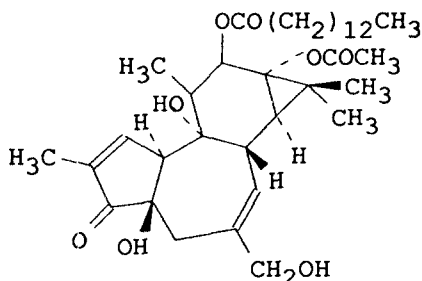


Fig. 1. Chemical structure of TPA.

ton oil의 동시 투여로 발암성이 증대함을 보고한 이래 Mottram, Boutwell, Hecker 등으로 이어져 왔다.<sup>5)</sup> 또한 疫學 조사에 의하면 담배로 인한 폐암, 식이 습관과 관련된 결장암, 유방암, 전립선암, 췌장암 및 saccharin에 의한 방광암 등이 이 중 Promotion에 기인한다고 보고하고 있다.<sup>6)</sup>

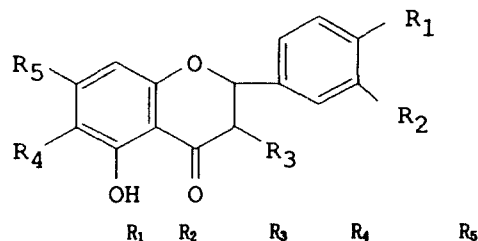
多段階 發癌性은 Initiation-Promotion-Progression으로 대별되며, Promotion은 neoplastic development의 단계로, Boutwell에 의해 세포내 유전정보의 발현을 변화시키는 물질에 의한 가역적 변화의 단계로 정의되며,<sup>1,7)</sup> 자발적으로 혹은 promoter를 매개로 하여 발암물질에 의해 Initiation된 세포를 증식하는 과정이다.<sup>1,8)</sup>

각 단계별 차단 가능성에 있어, Initiation은 폭로 전 혹은 폭로 직후에나 가능하나 Promotion의 차단은 악성화 단계 이전에 어느때나 가능하여 사람에게 있어 20~30년의 발암전 잠복기에 해당되므로 개입(Intervention)에 의한 차단의 가능성이 가장 큰 단계이다.<sup>9)</sup>

Promoter는 그 자체는 발암물질이 아니지만 종양 발생을 촉진하는 물질로 이를 평가하는 것은 화학물질의 안전성 평가에 필요하다. Tumor promoter는 염증, 비후를 유발하고, 유전자 발현의 변화 및 DNA 합성을 증가시키며, 화학구조상 TPA type과 Non TPA type로 구분된다.<sup>6)</sup>

본 실험에서 사용하는 TPA(12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate or phorbol myristate acetate)는 phorbol ester의 일종이며 巴豆(Croton tiglium)의 주성분으로(Fig. 1)<sup>10)</sup> *in vivo, in vitro* 결과 promoter로 인정되었고 mouse피부에 1회 접촉만으로도 생화학적 변화를 일으킨다.<sup>11)</sup>

TPA는 생체내 TPA수용체에 결합하여 phospholipid dependent protein kinase(PKC) 및 ODC(Ornithine Decarboxylase)를 연쇄적으로 활성화시켜 세포내 polyamine의 농도를 증가시키고, DNA regu-



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Quercitrin	-OH	-OH	-OC <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub>	-H	-OH
Rutin	-OH	-OH	-OC <sub>12</sub> H <sub>12</sub> O <sub>9</sub>	-H	-OH
Hesperidin	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-H	-H	-OC <sub>12</sub> H <sub>12</sub> O <sub>9</sub>
Baicalein	-H	-H	-H	-OH	-OH

Fig. 2. Chemical structures of flavonoids.

lation의 이상에 의한 DNA합성의 증가를 유발한다.<sup>12)</sup>

TPA는 단기간 검색에도 적합하여 mouse 피부에 1회만 도포하였을 경우에도 그 지표가 되는 ODC를 활성화시키므로<sup>11)</sup> 이를 이용해 특정 화합물의 Promotion단계의 기여도를 조사할 수 있다.

ODC는 분자량이 52,000이고 dimer로 존재하며,<sup>13)</sup> complete carcinogen과 promoter에 의해 활성화되며, ornithine을 脫炭酸하여 putrescine, spermidine, spermine 등의 polyamine을 생성하는 물질이다.<sup>14)</sup> 결과적으로 세포내 상승된 polyamine은 핵산, 단백질, 인지질과의 비공유 결합에 의해 생화학적 반응의 속도변화를 가져오므로, 본 脫炭酸 反應은 정상세포 및 종양세포의 성장, 증식에 필요한 과정이다.<sup>12, 15)</sup>

Tumor promotion에 대해서는 그 機轉이, 직접적으로 DNA에 손상을 주는 발암물질에 비해 거의 알려져 있지는 않으나, gap junction을 통한 cell-to-cell communication의 억제함에 의한 성장 조절 기전의 저해<sup>16, 17)</sup> 혹은 free radical의 생성에 의한 세포독성에 의함으로 보고되고 있다.<sup>18, 19)</sup> 이에 근거하여 retinoids,<sup>20)</sup> 항산화제, 항염증제, protease inhibitors 등이 Promotion inhibitor로 연구 중이다.<sup>1, 3, 13)</sup>

그 중의 식물 성분으로서 flavonoids는 천연물 중 널리 존재하여 일상생활 중에 쉽게 섭취가 가능한 물질이며(Fig. 2), 구조적으로 conjugated chain에 의한 항산화성 역할과 생체내에서는 xanthine oxidase의 반응생성물인 산화물 제거효과<sup>21)</sup> 및 항염작용<sup>22, 23)</sup>이 보고되고 있다. 실제로 그 중 quercetin이 TPA에 의한 ODC의 활성화를 억제한다고 보고되었다.<sup>24)</sup> 따라서 본 연구에서는 구조-활성 관계에 입

각하여 수 개의 flavonoids성 물질들의 Promotion 단계에 대한 기여도를 검색하고자 한다.

원인물질의 제거로써 발암에 대한 1차적 예방이 가장 바람직하나<sup>24)</sup> 사람의 경우 발암 원인의 80% 이상이 環境的 因子에 의한다고 보고되고 있다.<sup>25)</sup> 따라서 본 연구의 목적은 암의 2차적 예방법으로, 非自發的 暴露의 결과로 유전자 변형이 일어난 세포의 증식을 억제하는 즉, Promotion 단계의 억제를 통한 항암 가능성을 제안하고, 발암물질은 아니지만 발암에 기여할 수 있는 여러 환경물질의 promoter로서의 진위여부를 검증하는 시험방법의 향후 개발의 기초 자료로 제공하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### (1) 실험동물

생후 21일된 ICR계 웅성 mouse를 서울대학교 동물 사육장으로부터 분양받아 2~3주간 적응시킨 후 몸무게가  $21.04 \pm 1.30$  g이 되었을 때 실험에 사용하였으며 실험기간 중 식이와 물은 자유롭게 공급하였다. 실험동물은 circadian rhythm에 의한 변수를 제거하기 위해 오후 1~3시 사이에 경추탈골법에 의해 희생시켰다.<sup>11, 14, 26)</sup>

#### (2) 시약 및 기기

##### 1) 시약

Promoter로서 TPA(12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate), Inhibitor여부의 시험 대상물질 중 flavonoid계 화합물로는 Rutin, Baicalein(Nakari Chemical), Quercitrin(Nakari Chemical), Hesperidin(국립보건원),  $\beta$ -Naphthoflavone(Aldrich Chemical) 과 천연물은 산사, 괴화, 행인 등(경동시장에서 구입)의 생약류이고, 기타 DTT(Dithiothreitol), PLP(Pyridoxal Phosphate), l-[1-<sup>14</sup>C]-ornithine(이상 Sigma) 등이다.

##### 2) 기기

Liquid Scintillation Counter(Hewlett Packard Co.), Rotary Vacuum Evaporator(Eyela), Refrigerator Centrifuge(DuPont Co.), Homogenizer(Eyela), UV/VIS Spectrophotometer(Philips).

## 2. 방법

#### (1) Promoter의 투여

5~6주령의 mouse의 등부위를 약  $1.5 \text{ cm}^2$  면적으로 실험 2~3일전 전기면도기를 이용하여 제모하였다. TPA를 acetone에 녹여  $17 \text{ nmol}/0.2 \text{ ml}$  농

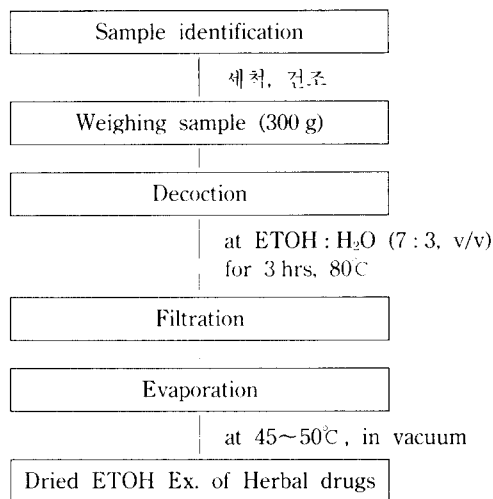


Fig. 3. Preparation of Herbal Ex. from crude plant samples.

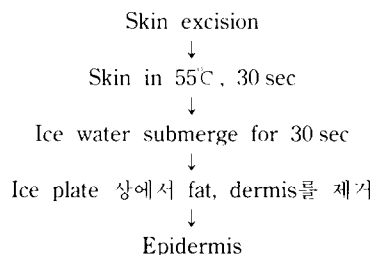


Fig. 4. Separation of epidermis from mouse skin.

도로 마이크로피펫을 사용하여 피부에 도포하였다.<sup>11, 14, 26)</sup>

#### (2) 약물의 투여

각 화합물은  $20 \text{ mg}/\text{kg}$ ,  $0.2 \text{ ml}$  농도로 1일 1회, 5일간 복강 투여하며, 대상 생약은  $400 \text{ mg}/\text{kg}$ ,  $0.2 \text{ ml}$  농도로 동일한 방법으로 처치하고 6일째 TPA  $17 \text{ nmole}$ 을 상기의 방법으로 투여하였다. 생약 시료의 조제법은 Fig. 3에 나타난 것처럼 Ethanol(ETOH :  $\text{H}_2\text{O} = 7 : 3$ ) 추출법에 따랐다.<sup>27)</sup> 추출한 용액을 여과하고 이 과정을 2회 반복한 여액을 모아 Rotary vacuum evaporator(Eyela)로 건조시켰다. 각 시료는 PBS에 녹여 실험에 이용하였다.

#### (3) 피부로부터 Epidermis의 분리

5마리 Mice를 한 군으로 동일 용량의 약물을 처치하였고, Boutwell,<sup>11, 14, 26)</sup> Birt<sup>28)</sup>의 방법을 변형하여 절개된 피부에서 지방과 진피부위를 가능한 한 제거하고 Epidermis만을 분리하였다.

#### (4) Epidermis로부터 ODC의 분리

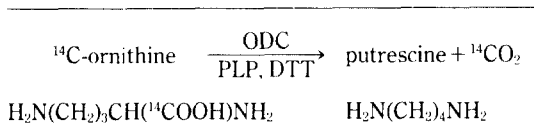


Fig. 5. Principle of ODC assay.

분리한 Epidermis를 3 ml의 homogenizing buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.6 containing 4 mM DTT (Dithiothreitol), 1 mM EDTA(Ethylenediamine-tetraacetate), 0.2 mM PLP(Pyridoxal Phosphate)를 가한 후 teflon homogenizer를 이용하여 빙수 중에서 5분간 균질화했다. 균질액은 33,000 rpm, 0°C 상태에서 30분간 초원심 분리를 하여 상등액을 취하였다.

(5) ODC의 활성도 정량

Pegg,<sup>29)</sup> Gottesman<sup>30)</sup>의 방법을 변형하여 isotope가 부착된 기질을 반응시켜 반응 부산물 <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>를 정량하였다. (4, 5)

1) 시약

Substrate solution :

- 5 μl of 20 mM 1-Ornithine(in 10 mM HCl)
- 10 μl of 12.5 μCi 1-[1-<sup>14</sup>C]-Ornithine (57 mCi /mmol)
- 5 μl of 2 mM PLP (in 10 mM NaOH)
- 12.5 μl of 25 mM DTT (in D.W.)
- 2.5 μl of 0.5 M Tris-HCl buffer pH 7.5

NaOH, 1 N

HClO<sub>4</sub>, 6 N

Scintillation fluid :

1/중 PPO 4g, POPOP 1g을 녹인 toluene과 ethanol(7 : 3)의 혼액

2) 방법

0.2 ml Epidermal Ex.를 Fig. 6과 같은 순서로 기질과 37°C, 1시간 반응 시켜 발생된 <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>를 filter paper에 포집하였다. 포집된 <sup>14</sup>C의 radioactivity를 5 ml Scintillation fluids가 든 용기에 넣고 LSC(Liquid Scintillation Counter(Helwlett Packard)를 이용하여 1분간, cpm단위로 측정하여 이를 효소활성의 지표로 하였다. 이때 LSC의 기�효율은 58%였으며 가한 Epidermal Ex.량은 비례적으로 효소의 활성을 증가시켰다.

(6) 단백질 정량

초원심분리에 의해 분리한 상등액으로부터 일정량의 단백질에서 발생한 CO<sub>2</sub>량을 산출하여 효소활성의 지표로 하기 위하여 Lowry의 방법을 수정하여

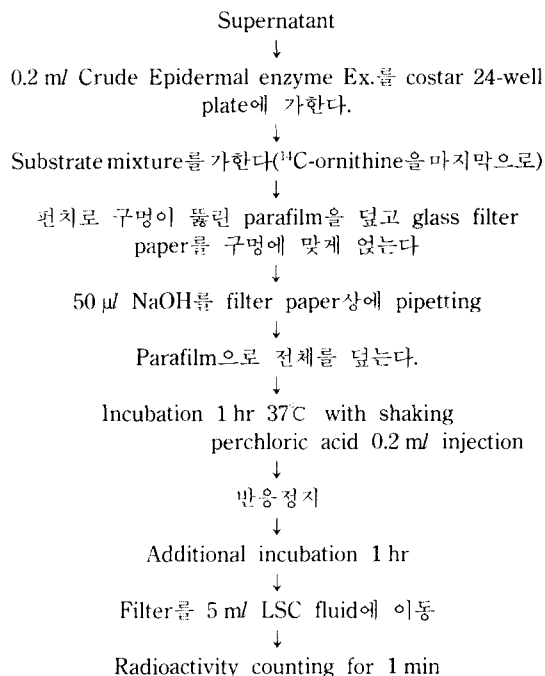


Fig. 6. ODC assay from mouse epidermis.

단백질을 정량하였다.<sup>31, 32)</sup> 이때 표준단백질로는 Bovine Serum Albumine(BSA)을 사용하였다.

시험관(16×150 mm)을 준비하고 Table 1의 순서에 따라 용액을 첨가하였다. Standard Calibration Curve를 만들기 위해 표준단백 BSA용액을 기지의 농도로 시험관에 첨가하였다. 별도로 앞에서 분리한 Mouse Epidermal Ex. 0.1 ml/을 연속적으로 시험관에 첨가하고, 각 시험관의 최종 부피는 1.0 ml/이 되게 하였다.

다음으로 alkaline copper solution 1 ml/을 각 시험관에 첨가하여 vortex를 한후 상온에서 15분간 방치를 하였다. 이때 alkaline copper solution은 A액 15 ml/, B액 0.75 ml/, C액 0.75 ml/의 혼액으로 용시 조제했다.

충분히 반응이 된 후 Folin-Ciocalteus(phenol) reagent 3 ml/를 첨가하여 vortex를 하고 상온에서 45분 방치한 후 spectrophotometer(Philips)를 이용하여 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 이때 증류수를 blank로 하였다.

(7) 통계 처리

모든 시험 항목의 유의성을 검증하기 위해 그룹별 유의성 검정과 각 시간별 차이의 유의성 검증은 ANOVA와 Duncan test를 시행하였다. 또한 각 시

**Table 1.** Procedure for the lowry rotein assay

Reagent	Tube #													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Water (ml)	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0	0.9	0.9	0.9	0.9
BSA (ml)	—	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	1	—	—	—	—
Epidermal Ex. (ml)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.1	0.1	0.1	0.1
Alkaline Cu soln	1 ml													
	Vortex, standing 15 min													
Folin reagent	3 ml													
	Vortex, standing 45 min													
	Measurement A <sub>540</sub>													

Reagents : Alkaline Cu solution

A액 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10% in 0.5 N NaOH.

B액 CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 1% in D.W.

C액 Sodium tartrate 2% in D.W.

BSA Standard 0.3 mg/ml in D.W.

2 N Folin-Ciocalteus (phenol) reagent; 2 N Folin reagent 10% in D.W.

Sample dilution : # 11 : Not diluted, # 12 : ×5 dilution, # 13 : 2×10 dilution, # 14 : ×20 dilution.

간별 대조군과 처리군간의 유의성 검정은 ANOVA와 t-test를 하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. Tumor Promotion에 관한 연구

TPA에 의한 시간 경과에 따른 ODC유도 양태와 양-반응 관계를 시험해 보았다. 이는 약물에 의한 TPA의 ODC의 유도에 미치는 영향과 TPA와 ODC의 연관성을 확인하기 위해서 필요하다.

TPA는 강력한 Tumor promoter로서 세포내 특정 효소인 protein kinase C(PKC)를 활성화시켜 연속적으로 세포막 주위의 ion channel과 수용체의 기능의 변화, 유전자 발현의 이상, 궁극적으로 세포의 분화 및 증식을 유발한다.<sup>33)</sup> 이러한 과정에서 세포의 분화 및 증식에 관계되는 ODC도 활성화되는 것으로 보여진다.

세포내 신호전달 체계의 주요 효소인 PKC가 세포 증식의 조절 기능을 한다는 증거를 제공하며, 연쇄적인 ODC의 증가는 세포 분화 및 증식을 의미한다.<sup>33)</sup>

본 실험은 발암성의 특징 단계의 연구를 통해 인간의 발암 원인을 탐구하고자 하였다. Tumor Promotion의 비특이적 증거로는 epidermal ODC, protein kinase C(PKC), protein phosphorylation의 증가 등이 있으며,<sup>28)</sup> 그 중 Tumor promoter TPA와 ODC의 원인적 연관성을 확정함으로써 Promotion 단계를 차단할 가능성이 있는 약물의 검색, 나아가 새로운 promoter의 검색 방법으로서의 모델을 제시할

수 있다고 생각된다.

또한 PKC와 ODC의 연쇄적 활성화에 대한 분자 생물학적 기전(molecular mechanism)의 해명을 고찰할 것을 이후의 과제로 상정한다.

#### (1) TPA의 Mouse Epidermal ODC의 유도

TPA 17 nmole을 1회 도포한 후 Mouse Epidermal ODC에 대한 영향을 평가하기 위해 처치 후 시간경과에 따라서 유도의 변화 및 최대 활성을 나타내기까지의 도달시간을 시험하였다(Table 2, Fig. 7). 본 실험은 정상적 조건에서 TPA에 의한 효소의 유도과정을 근거로 하여, 약물에 의한 효소의 활성변화에 미치는 영향을 평가하기 위한 단기간 검색반응의 최적 조건을 설정하기 위함이다.

그 결과 4, 5, 6시간이 경과하면 각 시간별로 처리군은 대조군에 비해 유의한 차이를 나타냈으며 ( $p < 0.05$ ), 5시간이 경과하면 효소의 활성은 최대로 증가하여 처리군이 대조군에 비해 약 5.1배 만큼 높았다. 이와 같은 결과는 *in vivo*에서 Boutwell,<sup>11, 14, 26)</sup> Perchellet,<sup>34)</sup> *in vitro*에서 Gottesman<sup>30)</sup>과 유사하다. 또한 각 시간별 활성의 차이를 유의성 검증하였더니 대조군과 처리군의 5시간 경과 후의 효소의 활성의 차이는 유의한 결과를 나타내었다(5시간 경과 후  $p < 0.05$ ).

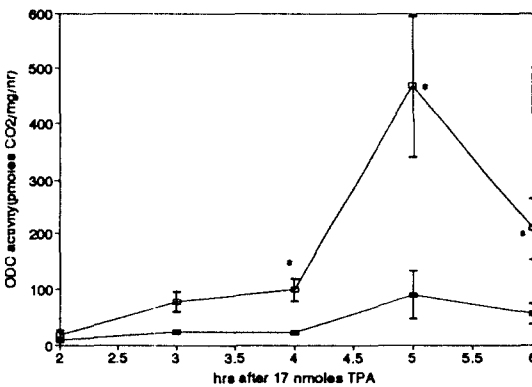
#### (2) TPA의 epidermal ODC 유도에 대한 양-반응 관계

TPA 투여 후 5시간 경과후의 각 농도에 따른 ODC유도에 대한 영향을 시험하였더니, Boutwell<sup>11, 14, 26)</sup>의 결과와 마찬가지로 Tumor Promotion에 있어

**Table 2.** Time course of induction of ODC by TPA

Time	Enzyme specific activity (p moles CO <sub>2</sub> in 1 hr/mg protein)	
	Control	Treatment
2 hrs	9.14 ± 1.59	19.05 ± 8.40
3 hrs	24.35 ± 2.78	78.72 ± 17.71
4 hrs*	23.08 ± 2.62	99.77 ± 19.40
5 hrs*	91.07 ± 42.93	468.48 ± 126.78
6 hrs*	57.13 ± 17.96	209.87 ± 55.65

All values are the means ± S.D.  
Significantly different from control at the indicated times(\*p<0.05).



**Fig. 7.** Time course of induction of ODC by TPA. Groups of 3 mice were treated with 0.2 ml acetone or 17 nmoles TPA dissolved in acetone and killed at the times indicated. Further details were described in Materials and Methods. Results are mean ± S.D. (bars) of enzyme assay. Significantly different from control at the indicated times (\*p<0.05). (■ : control, □ : TPA treatment).

TPA의 양-반응 곡선은 1.7, 17, 170 nmole 수준에서 ODC의 활성을 비례적으로 증가시켰다(Table 3, Fig. 8), 0.17 nmole 수준은 대조군과 유사하였다.

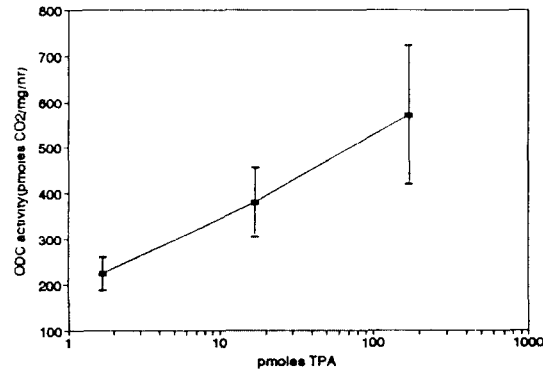
Tumor promoter TPA에 대해 ODC는 용량의 존적으로 활성화되므로 이와 같은 양-반응의 비례 관계는 원인적 연관성을 나타내며, ODC가 Tumor Promotion 단계의 지표가 되는 효소임을 확인할 수 있다. 또한 ODC 활성의 유도 정도는 각 용량의 TPA는 Mouse 피부에 대한 Tumor promoter로서의 효능(Efficacy)과 상당히 관련이 있음을 시사한다.<sup>26)</sup>

이와 같은 TPA와 ODC의 원인적 연관 관계를 통하여, Promotion 단계에 대한 화합물의 영향으로써

**Table 3.** The dose response of a single topical application TPA between 0 and 170 nmoles on epidermal ODC

Dose (nmoles TPA)	No. of mice	Enzyme specific activity (pmoleCO <sub>2</sub> in1 hr/mgprotein)
0	5	97.07 ± 42.93
0.17	5	102.37 ± 52.47
1.7	5	223.45 ± 36.26
17	5	379.76 ± 74.03
170	5	570.63 ± 152.40

All values are the means ± S.D.



**Fig. 8.** The dose response of a single topical application of 1.7, 17 and 170 nmoles TPA on epidermal ODC. Groups of 5 mice were killed with the indicated dose of TPA and killed 5 hrs later. The specific activity of enzyme were measured as described in Materials and Methods. Results are the means ± S.D. (bars) of enzyme assay.

promoter 혹은 antipromoter 여부를 시험할 수 있다. 즉, 항암 가능성이 있는 물질의 검색을 통한 항암제의 개발과 promoter로 확인되는 물질에 대해서는 인간에 대한 폭로의 규제가 요구된다.

**2. Promotion 단계에서의 차단효과**

최근의 경향은 야채섭취와 발암률 저하간의 연관성 검증 및 발암 억제책으로 야채의 섭취를 권장하고 있는 추세이다. 그 예는 indoles, thiocyanates, isothiocyanates, flavonoids, ellagic acid 등이다.<sup>35)</sup>

본 실험에서는 비교적 독성이 적고 천연 식물중에 널리 존재하는 flavonoids의 발암에 대한 관련성을 조사하여 항암제의 개발 가능성을 제시하였다.

Tumor Promotion의 저해제로서 수개의 flavonoid 화합물 및 그의 다량 함유 식물 생약을 검색해

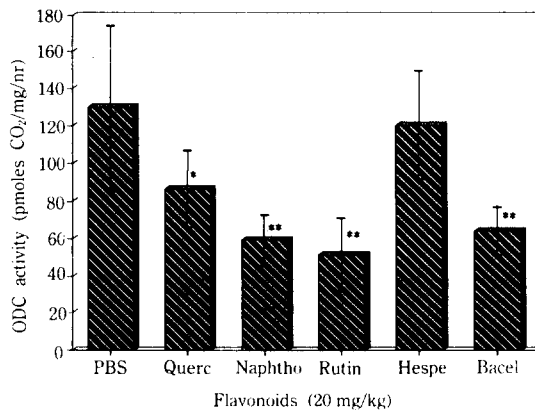
**Table 4.** The effect of five flavonoids on the stimulation of ODC activities by TPA

Treatment	No. of mice	Enzyme specific activity (pmoles CO <sub>2</sub> in 1 hr/mg protein)	% Inhibition
1. PBS	6	130.10 ± 48.92	—
2. Quercitrin	6	86.72 ± 22.47*	33.24
3. Naphthoflavone	5	59.49 ± 15.12**	54.27
4. Rutin	6	51.66 ± 21.59**	60.29
5. Hesperidin	5	120.77 ± 32.28	7.17
6. Baicalein	6	64.37 ± 13.83**	50.52

All values are the means ± S.D.

Significantly different from the PBS group (\*p<0.05, \*\*p<0.01).

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(\text{ODC activities of the PBS-treated group}) - (\text{ODC activities of the flavonoids-treated group})}{(\text{ODC activities of the PBS-treated group})} \times 100$$



**Fig. 9.** The effect of five flavonoids on the stimulation of ODC activities by TPA. Groups of 5~6 mice were given i.p. injections of 0.2 ml/PBS or samples (20 mg/kg) dissolved in PBS for 5 days. The mice were killed 5 hrs after TPA treatment at 6th day for enzyme assay. Results are the means ± S.D. (bars) of enzyme assay. Significantly different from the PBS groups (\*p<0.05, \*\*p<0.01).

본 결과 유의한 저해작용을 나타내었다. 이는 flavonoid 고유의 conjugated chain 구조에 의한 항산화성 작용, 산화물 제거<sup>21)</sup> 및 항염효과 등<sup>22, 23)</sup>이 TPA의 Promotion의 기전 중의 하나라고 생각되는 유리기 (free radical)의 생성에 관여하는 것으로 생각되어진다.

그러나, flavonoids가 항암제로 개발이 되기 위해서는 mutagen으로 논란<sup>21)</sup>이 되고 있는 flavonoids의 독성 검색을 거친 후 TPA 뿐만 아니라 기타의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, benzoyl peroxide, anthralin 등의 기타의 promoter<sup>34)</sup>에 대한 억제효과 역시 검증되어야 하며, 발암물

질로 Initiation이 된 후 Promotion에 대한 *in vivo*에서의 효과도 반드시 확인되어야 할 것이다.

(1) 일부 flavonoid계 물질의 ODC유도에 미치는 영향

대상 화합물 5종을 20 mg/kg로 1일 5회, 5일간 복강 투여한 후 희생 당일 promoter TPA 도포에 대한 효소의 유도에 미치는 영향을 통하여 (Table 4, Fig. 9), 약물의 항Promotion작용을 평가하고자 하였다.

5종의 투여군 중 Quercitrin(p<0.05), Naphthoflavone, Rutin, Baicalein(이상 p<0.01) 등 4종의 투여군이 TPA에 의한 ODC유도에 대해 유의한 저해효과를 나타내었다. 각 화합물의 복강 투여는 Rutin, Naphthoflavone, Baicalein, Quercitrin의 순으로 각각 60.29%, 54.27%, 50.52%, 33.34%의 저해효과를 보였다(Table 4).

(2) 일부 천연물의 ODC유도에 미치는 영향

대상 생약 3종을 400 mg/kg로 상기의 flavonoid 화합물과 동일한 방법으로 복강 투여 후 promoter TPA에 의한 ODC 유도에 미치는 영향을 통해 Promotion억제 작용성을 평가하였다(Table 5, Fig. 10).

3종의 투여군 중 모두가 TPA에 의한 ODC 유도에 유의한 저해 효과를 보였다(p<0.01). 귀화, 산사, 행인의 순으로 각 59.67%, 50.61%, 41.08%씩 효소활성의 저해를 보였다(Table 5).

### 3. 표피세포내 총단백질 정량

Lowry method에 의한 BSA 표준단백질을 이용한 검량선에 의거하여 시간 경과별(Table 6), TPA 용량별(Table 7) 및 각 약물 처리에 따른(Table 8) 세포내 총단백질량을 산출하였고 최종적으로 단위 단백질 기준 1시간의 반응중에 발생된 CO<sub>2</sub>

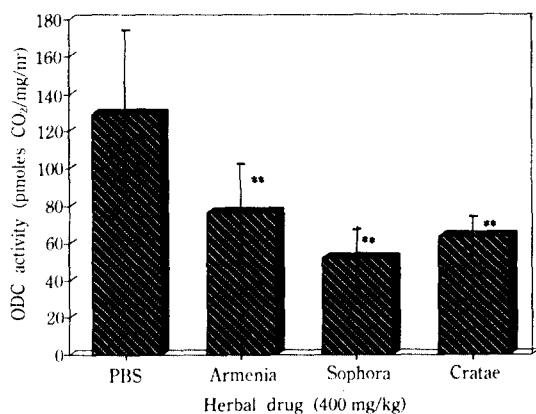
**Table 5.** The effect of three herbal drugs on the stimulation of ODC activities by TPA

Treatment	No. of mice	Enzyme specific activity (pmoles CO <sub>2</sub> in 1 hr/mg protein)	% Inhibition
1. PBS	6	130.10 ± 48.92	—
2. Armeniaca semen (행인)	6	76.66 ± 28.87**	41.08
3. Sophorae radix (괴화)	6	52.47 ± 16.89**	59.67
4. Crataegi fructus (산사)	5	64.26 ± 11.75**	50.61

All values are the means ± S.D.

Significantly different from the PBS group (\*\*p < 0.01).

% Inhibition represents the same as Table 4.



**Fig. 10.** The effect of three herbal drugs on the stimulation of ODC activities by TPA. The experimental procedures are as the same Fig. 9 except that the dose of samples is 400 mg/kg and samples are prepared as described in Materials and Methods. Results are the means ± S.D. Significantly different from the PBS group (\*\*p < 0.01).

**Table 6.** Total proteins by time course after a single application of 17 nmoles TPA to mouse skin  
(Unit : µg protein/ml crude epidermal Ex.)

Time	Amounts of protein	
	Control	Treatment
2 hrs	216.34 ± 40.85	225.34 ± 26.64
3 hrs	208.24 ± 14.45	236.14 ± 38.72
4 hrs	184.12 ± 26.34	214.54 ± 43.60
5 hrs	124.91 ± 60.63	167.03 ± 56.99
6 hrs	208.42 ± 93.17	192.22 ± 7.56

All values are the means ± S.D.

mole 수(CO<sub>2</sub> moles in 1 hr/mg protein)로 환산하였다.<sup>36)</sup>

**Table 7.** Total proteins by TPA doses  
(Unit : µg protein/ml crude epidermal Ex.)

Dose (nmoles TPA)	No. of mice	Amounts of protein
0	5	212.94 ± 57.36
0.17	5	260.02 ± 92.35
1.7	5	296.87 ± 60.71
1	5	329.27 ± 130.03
170	5	367.06 ± 48.65

All values are the means ± S.D.

**Table 8.** Total proteins by chemical compounds and herbal drugs  
(Unit : µg protein/ml crude epidermal Ex.)

Treatment	No. of mice	Amounts of protein
1. PBS	6	228.94 ± 94.62
2. Quercitrin	6	342.24 ± 66.61
3. Naphthoflavone	5	367.49 ± 61.52
4. Rutin	6	386.97 ± 73.01
5. Hesperidin	5	240.82 ± 49.39
6. Baicalein	6	278.08 ± 27.43
7. Armeniaca semen (행인)	6	251.62 ± 57.66
8. Sophorae radix (괴화)	6	264.76 ± 46.19
9. Crataegi fructus (산사)	5	282.29 ± 49.34

All values are the means ± S.D.

Table 6, 7과 같이 TPA처리 후 시간과 TPA의 용량에 따른 단백질량의 유의한 차이는 없었다. 이는 promoter는 DNA의 복제 단계에서 그 합성을 증가시켜 단백질의 합성을 증가시키지만<sup>3)</sup> 1회 도포로는 유의한 차이를 보일 수 없음을 의미하며, 단백질 합성 저해제인 cycloheximide에 의해서도 유의한 저해효과를 보이지 않았다(자료 미기재).

TPA에 의한 ODC의 차단효과를 보이는 기전은 단백질 합성을 차단하거나, ODC의 분해의 촉진 등



의 안정화를 저해할 경우이다.<sup>13)</sup> Table 8과 같이 flavonoid계 화합물 및 천연물은 5일간 투여시 유의한 단백질 합성의 저해가 없었다. 따라서 flavonoid계 화합물 및 천연물에 의한 유도억제는 ODC의 안정화의 저해에 기인하는 것으로 추측된다.

- (1) 시간경과에 따른 표피세포내 총단백질량의 변화
- (2) TPA용량에 따른 표피세포내 총단백질량의 변화
- (3) 각 약물처리 후 표피세포내 총단백질량의 변화

## 결 론

본 실험은 다단계 발암과정 중 Promotion단계에 대한 연구 및 차단효과를 보고자 하였다.

### Tumor promotion에 관한 연구

- ① TPA 17 nmole의 1회 피부 도포는 Mouse Epidermal ODC를 투여 후 4, 5, 6시간이 경과하면 각 시간별로 대조군과 처리군은 유의한 차이를 보였으며( $p < 0.05$ ), 5시간 후에는 최대로 증가하여 처리군은 대조군에 비해 약 5.1배 만큼 높았다.  
또한 각 시간별 처리군과 대조군의 활성의 차이성은 5시간 경과후가  $p < 0.05$  수준에서 유의함을 나타냈다.
- ② Promoter로서 TPA와 그 지표가 되는 Mouse Epidermal ODC의 양반응 관계에 의해 원인적 연관성을 확인했으며, 용량의 증가는 TPA는 Mouse Epidermal ODC를 유도하는 데 있어 효과가 있음을 입증했다.

### TPA의 ODC유도에 대한 약물의 차단효과

- ① Flavonoid계 화합물 5종을 20 mg/kg를 1일 1회, 5일간 복강투여한 결과, 5종 중 4종이 TPA 처리후의 ODC의 활성에 유의한 차단효과를 보였다(Quercitrin  $p < 0.05$ , Naphthoflavone, Rutin, Baicalein  $p < 0.01$ ).
- ② Flavonoid함유 식물 생약 3종을 400 mg/kg를 동일한 방법으로 투여한 결과, 3종 모두 TPA 처리 후의 ODC의 활성에 유의한 차단효과를 보였다(행인, 괴화, 산사  $p < 0.01$ ).

## 참고문헌

- 1) Klassen, C. D., Amdur, M. O. and Doull, J. : Cas-
- arett and Doull's Toxicology 4th ed., Mac. Pub. 127-200, 1991.
- 2) 보건사회부 : 보건년감(199), 136-137, 1990.
- 3) Penelope ReVelle and Charles ReVelle : The environment-Issues and choice for society 2nd ed., Willard Grant Press Boston, 551-584, 1984.
- 4) Perera, P. : Perspectives on the risk assessment for nongenotoxic carcinogens and tumor promoters, *Env. Health Persp.*, **94**, 231-235, 1991.
- 5) Berenblum, I. : The carcinogenic action of croton resin, *Cancer Res.*, **1**, 44-50, 1941.
- 6) Pitot, H. C. : Cancer-Principles and practice of oncology Vol. 1, 3rd ed., Chp. 8. Principles of carcinogenesis, Chemical, Lippincott Press, 116-135.
- 7) Slaga, T. J. : Overview of tumor promotion in animals, *Env. Health Persp.*, **50**(3), 3-14, 1983.
- 8) Barrett, J. C. and Wiseman, R. W. : Cellular and molecular mechanism of multistep carcinogenesis : Relevance to carcinogen risk assessment, *Env. Health Persp.*, **76**, 65-70, 1987.
- 9) Bertram, J. S., Kolonel, L. N. and Meyskens, F. L. : Rationale and strategies for chemoprevention of cancer in humans, *Cancer Res.*, **47**, 3012-3031, 1987.
- 10) Nishimura, N. et al. : Bioscience Series : 생명현상의 화학적 approach-발암 5th ed. Chp. 4. 2단계 발암성과 발암 promoter, 化學同人, 61-78, 1989.
- 11) O'Brien, T. G. : The induction of ODC as an early, possibly obligatory event in mouse skin carcinogenesis, *Cancer Res.*, **36**, 2644-2653, 1976.
- 12) Pegg, A. E. : Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy, *Cancer Res.*, **48**, 759-774, 1988.
- 13) Shin-Ichi Hyashi : International encyclopedia of pharmacology and therapeutics section 129 Ornithine decarboxylase, *Pergamon Press*, 1-45, 1989.
- 14) O'Brien, T. G., Simsiman, R. C. and Boutwell, R. K. : Induction of the polyamine biosynthetic enzymes in mouse epidermis and their specificity for tumor promotion, *Cancer Res.*, **35**, 2426-2433, 1975.
- 15) Russell, D. H. and McVicker, T. A. : Polyamine metabolism in mouse liver after partial hepatectomy, *Biochem. Biophys. Acta*, **244**, 85-93, 1971.
- 16) Klauning, J. E. and Ruch, R. J. : Biology of disease : Role of inhibition of intercellular communication in carcinogenesis, *Lab. Inv.*, **62**, 135-146, 1990.
- 17) Maldonado, D. E., Rose, B. and Loewenstein, W.

- R. : Growth factors modulate junctional cell-to-cell communication, *J. Membr. Biol.*, **106**, 203-210, 1988.
- 18) Larsson, R. and Cerutti, P. : Oxidant-induced phosphorylation of ribosomal protein S6, *J. Biol. Chem.*, **263**, 17452-17458, 1988.
- 19) Goldstein, B. D. and Czerniecki, B. : The role of free radicals in tumor promotion, *Env. Health Persp.*, **81**, 55-57, 1989.
- 20) Verma, A. K., Shapas, B. G., Rice, H. M. and Boutwell, R. K. : Correlation of the inhibition by retinoids of tumor promoter-induced mouse epidermal ODC and of skin tumor promotion, *Cancer Res.*, **39**, 419-425, 1979.
- 21) Iwao Hirono : Bioactive molecules Vol. 2 : Naturally occurring carcinogens of plant origin-Toxicology, Pathology, and Biochemistry : Chp. 3. Flavonoids, Elsevier Press, 53-85, 1985.
- 22) 안영근, 박영길, 김정훈 : Quercetin이 마우스 면역 작용에 미치는 영향. 약학회지, **35**(5), 401-415, 1991.
- 23) 김창중, 정현삼, 정진모 : Flavonoids의 약리작용(4). 약학회지, **35**(3), 165-173, 1991.
- 24) Nakadate, T., Jeng, A. Y. and Blumberg, P. M. : Comparison of PKC functional assays to clarify mechanism of inhibitor action, *Bioch. Pharm.*, **37** (8), 1541-1545, 1988.
- 25) 유근영 : 종양의 발생원인 및 위험요인. 서울대학교 의과대학편, 종양학, 서울대학교 출판부, 31-44, 1989.
- 26) O'Brien, T. G., Simsiman, R. C. and Boutwell, R. K. : Induction of the polyamine-biosynthetic enzymes in mouse epidermis by tumor-promoting agents, *Cancer Res.*, **35**, 1662-1670, 1975.
- 27) 강삼식, 윤혜숙, 장일무 : 천연물 과학. 서울대학교 출판부, 167-176, 1988.
- 28) Wei, H. W., Tye, L., Brensnick, E. and Birt, D. F. : Inhibitory effect of apigenin, a plant flavonoid, on epidermal ODC and skin tumor promotion in mice, *Cancer Res.*, **50**, 499-502, 1990.
- 29) Seely, J. E. and Pegg, A. E. : Method in enzymology Vol. 94 Polyamines : Ornithine Decarboxylase (Mouse kidney), 158-161, 1983.
- 30) Lichti, U. and Gottesman, M. M. : Genetic evidence that a phorbol ester tumor promoter stimulates ODC activity by a pathway that is independent of cyclic AMP-dependent protein kinases in CHO cells, *J. Cell. Phys.*, **113**, 433-439, 1982.
- 31) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurements with Folin phenol reagents, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
- 32) Cooper, T. G. : The of biochemistry Chp. 2. Spectrophotometry-Lowry Protein Determination, A Wiley-Interscience Pub., 53-55, 1977.
- 33) Weinstein, I. B. : The origin of human cancer : Molecular mechanism of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment-twenty-seven G. H. A. Clowes Memorial Award Lecture, *Cancer Res.*, **48**, 4135-4143, 1988.
- 34) Gali, H. U., Perchellet, E. M. and Perchellet, J.-P. : Inhibition of tumor promoter-induced ODC activity by tannic acid and other polyphenols in mouse epidermis *in vivo*, *Cancer Res.*, **51**, 2820-2825, 1991.
- 35) Birt, D. F. and Brensnick, E. : Chemoprevention by nonnutrient component of vegetables and fruit-Human Nutrition : A comprehensive treatise, 6th Vol., Plenum Pub., 1990.
- 36) Segel, I. H. : Biochemical calculations 2nd ed. Chp. 6. Isotopes in biochemistry, John Wiley & Sons, INC., 354-396, 1968.