

7, 12-dimethylbenz[a]anthracene(DMBA)로 유발된 햄스터 협낭암에서 chlorophyllin의 암예방효과에 관한 실험적 연구

윤규호

인제대학교 의과대학 부속 상계백병원치과 구강악안면외과

Abstract

AN EXPERIMENTAL STUDY ON THE CHEMOPREVENTIVE EFFECT OF CHLOROPHYLLIN IN HAMSTER CHEEK POUCH TUMOR INDUCED BY 7, 12-DIMETHYLBENZ[A]ANTHRACENE

Kyu-Ho Yoon

Department of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Medicine, Inje University.

Carcinogenesis is a multi-stage process that generally consists of at least three steps; initiation, promotion, and progression. If one of these carcinogenic steps were suppressed or delayed, the cancer could be prevented. Cancer chemoprevention is defined to be inhibition or reversal of the carcinogenic process by the specific chemical agents and is a novel approach to cancer management alternative to conventional chemotherapy. Chlorophyllin(Chl), a water-soluble derivative of chlorophyll, containing sodium and copper, has been known to be strong antimutagen in several test systems, but its mechanism of antimutagenic action is unknown.

In the present experiment, the possibility of Chl as chemopreventive drugs on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene(DMBA)-induced hamster buccal pouch carcinogenesis was investigated by mutagenicity test, carcinogenicity test, and frequency or spectrum of H-ras mutations in the both of DMBA-induced and chlorophyllin-pretreated-DMBA induced tumor by polymerase chain reaction and non-isotopic restriction fragment length polymorphism.

The treatment of Chl reduced the yields and multiplicity of the 0.5% DMBA-induced tumor, 86% to 62.5% and 3.7 ± 0.6 to 1.4 ± 0.3 , respectively. The occurrence of histidine revertant by $20 \mu\text{mole}$ DMBA was inhibited 25.6 to 81.7% by 1 to $5 \mu\text{M}$ Chl in a dose-dependent manner. The mutation rates of H-ras gene in DMBA-induced and Chl-pretreated-DMBA induced tumor were 96%, 94% of which the most mutations were in codon 12/13.

These results suggest that Chl inhibits the carcinogenic action of DMBA by the formation of complex between Chl and DMBA or the inhibition of the activation of DMBA in vivo. But Chl did not affect the mutation rates or its spectrum in already formed tumor.

Key words: Chemoprevention, DMBA, Mutation, Non-isotopic restriction fragment length polymorphism Tumor yield

I. 서 론

암은 화학적, 물리적, 생물학적, 유전적 손상의 결과로 발생한다. 이러한 암의 발생을 유발시킬 수 있는 특이한 외부적 요인으로는 흡연, 직업성이거나 환경에서 유래된 화학물질, 방사선, 음식물 속에 함유된 특이 성분 및 바이러스 등이 포함된다¹⁾. 스테로이드성 호르몬과 같은 내인성 화합물은 호르몬에 반응을 보이는 조직(유방, 난소, 전립선 및 자궁내막)에서 암 촉진제로 작용하기도 하며^{2,3)}, 또한 유전인자들은 암 발생에 대한 각 개인의 감수성에 중대한 영향을 주기도 한다.

암예방(chemoprevention)이란 비세포독성 영양물질(noncy-

totoxic nutrients)이나 약물을 사용하여 암세포의 돌연변이 클론(mutant clone) 생성이나 진행을 방지하므로써 암 발생과정을 억제하거나 진행을 억제하는 것으로 정의하였다^{4,5)}. 암이 단순히 한 가지 역치(threshold)에 의해 야기되는 것이 아니라 다단계적으로 일어나는 분자생물학적, 세포학적 과정이라는 사실을 인식하게 되어 암을 예방하기 위한 보다 다양한 접근이 시도되었으며, 암의 개시단계에서 병이 침윤성이며, 전이성인 단계로의 진행은 그 기간이 몇 년이 걸릴지 모르는 특징을 가지고 있어서, 암 진행과정 중에 약물을 이용하여 더 이상의 진행을 억제할 수 있으리라 생각되었다^{6,7)}.

암 발생과정이 유전자 수준에서 변화가 일어나는 암 개시단계, 암 촉진단계 및 악성으로 진행되기 위한 암 진행단계 등, 다단계로 되어 있기 때문에 암 발생 초기단계 뿐만 아니라 후기단계에서도 암 진행을 막을 수 있는 기회가 있다^{1,8-10)}. 일반적으로 암 발생과정의 억제 물질들은 이들이 효과를 나타내는 암 발생단계에 따라 크게 세 가지로 구분되는데⁸⁾, (1) 발암물질의 형성이나 흡수를 억제하는 물질, (2) 세포내 목적물과 반응하거나, 목적물과의

윤규호

139-707, 서울특별시 노원구 상계7동 761-1
인제대학교 의과대학 부속 상계백병원 치과

Kyu-Ho Yoon

Dept. of OMFS, Sanggae Paik Hospital, College of Medicine, Inje University,
761-1, Sanggae-7 Dong, Nowon-Gu, Seoul, 139-707, Korea.

Tel. 02-950-1163 Fax. 938-4109

도달을 억제하는 차단제(blocking agents) 및 (3) 발암물질에 노출된 세포가 신생물로 나타나는 과정을 억제하는 억제제(suppressing agents)로 분류되며, 어떤 억제물질은 차단제와 억제제의 기능을 다 가지기도 한다^{8,11)}. 암예방 후보물질들에 대한 원천, 화학구조 및 생리학적 효과, 또한 비타민과 같은 미량 영양소(folic acid, Vitamin A, C, E), 광물질(selenium, molybdenum 및 calcium), 자연산물(carotenoids, isothiocyanates 및 flavonoids), 합성 화합물(vitamin A 및 E 유도체들, 2-difluoromethylornithine[DFMO] piroxicam, tamoxifen, 및 oltipratz) 등, 다양한 방법의 연구가 있었다^{12,21)}.

1980년 Lai 등²²⁾은 녹색 채소류가 benzo[a]pyrene으로 유발된 돌연변이성을 억제한다고 보고하였으며, 이러한 항돌연변이성은 추출물 속에 들어 있는 엽록소의 함량과 밀접한 관련이 있다고 하였다. 그러나 수용액에서 엽록소는 불용성이기 때문에 수용성 유도체로 sodium-copper 염을 가지고 있는 chlorophyllin(CHL)이 엽록소 대신에 실험에 자주 사용되었으며, 엽록소와 마찬가지로 CHL은 다환성 방향족 탄화수소(polycyclic aromatic hydrocarbons),^{23,24)} heterocyclic amines²⁵⁻²⁷⁾, aflatoxin B1^{28,29)}, 무기화합물^{30,31)}, 이온화 방사선³²⁾, 다양한 환경 공해산물들³³⁻³⁷⁾과 같은 다양한 종류의 환경 발암물질의 유전 독성이나 DNA 결합능을 억제한다. 이러한 항돌연변이성은 방향성 돌연변이 물질들이 CHL과 불활성 복합체(inactive complex)를 형성하기 때문이며^{38,40)}, 이와는 달리 non-planar한 돌연변이 물질들에서는 CHL의 항돌연변이성 효과가 떨어진다³⁹⁾. 최근 연구에서 benzo[a]pyrene의 최종 친전자성 대사 발암물질인 benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide(BPDE), urethane의 최종 친전자성 대사산물인 vinyl carbamate epoxide, 4-nitrophenyl vinyl ether의 최종 친전자성 대사산물인 2'-(4-nitrophenoxy)oxirane의 돌연변이성, 발암성 및 DNA 결합능도 CHL에 의해 억제되었는데, 이는 CHL이 BPDE의 활성부위와 직접 결합하는 것을 시사한다⁴¹⁻⁴³⁾. 이처럼 CHL은 다양한 종류의 발암물질이나 이들의 최종 친전자성 대사산물에 대하여도 항돌연변이성이나 항발암성 및 DNA adduct 형성 능력을 억제하는 것으로 보고되고 있다.

구강에 발생하는 암종은 정상조직으로부터 암종으로 이행되기까지 여러 단계의 변화 과정을 거치는 데, 암으로 진행되기 전에 전단계 병소인 구강점막의 백반증으로 시작되는 경우가 많기 때문에 암의 조기발견이 가능하다. 백반증은 4.4 내지 17.5%에서 편평상피세포암종으로 이행되며, 백반증에 조직학적으로 이행성(dysplasia)이 동반된 경우에는 암발생률이 훨씬 높아 36%에 이른다⁴⁴⁾. 또한 구강점막의 백반증은 신체 내부 장기에 발생하는 전암병소에 비하여 임상적으로 찾아내기가 용이하기 때문에 암 예방 연구의 초점이 되고 있으며, 선진 각국에서는 암예방 연구의 모델로 구강점막의 백반증을 많이 연구하는 추세이다. 그러므로 본 연구에서 햄스터 협낭에 DMBA를 처리하여 협낭암을 유발하였으며, CHL을 전 처리하여 암예방 여부를 관찰하였고, 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene(DMBA)의 돌연변이성을 CHL이 억제하는 지와, 암예방제 처리가 유전자 돌연변이 발생률이나 양상에 어떤 영향을 미치는 지에 대해 실험하였다. 즉, 본 실험의 목적은 DMBA로 유발된 햄스터 협낭암에 대한 CHL의 암예방제

로서의 가능성을 보는 데 있다.

Ⅲ. 연구재료 및 방법

1. 실험동물 및 재료

1) 실험동물

동일한 조건에서 표준 고품사료와 물을 주어 사육한 3-4주 된 특정 무균의(specific pathogen free) Cricetus larabensis계의 Chinese hamster 암컷을 구입하여 2주간 실험 동물실에서 적응 기간을 거쳐 6주 된 것을 실험에 사용하였다.

2) 실험재료

7,12-Dimethylbenz[a]anthracene(DMBA)은 Sigma Chemical Company(St. Louis, MO, U.S.A.)로부터 구입하였으며, chlorophyllin(CHL)은 Aldrich Chemical Company(Milwaukee, WI, U.S.A.), 나머지 시약과 제한효소(Promega, U.S.A.)들도 최상급으로 국내 시약 대리점을 통하여 구입하였다.

2. 연구방법

1) 실험군

실험군은 크게 실험군 당 30마리로 5군으로 나누어 아무런 처치도 하지 않은 1) 정상 대조군, 2) 발암물질을 녹이는 유기용매(mineral oil)만을 처리한 실험 대조군, 3) 발암물질인 DMBA를 도포한 중앙유발군, 4) DMBA 처치 10분전에 CHL을 처리한 군, 5) CHL만을 처리한 군으로 나누어 실험하였다.

2) 암유발 실험

중앙유발은 0.5%가 되게 DMBA를 mineral oil에 녹여 햄스터 협낭 편측에 일주일에 두 번씩 실험 전기간(22주)에 걸쳐 도포하여 종양을 유발하였다.

3) 암예방물질의 투여

암예방물질은 발암물질을 바르기 10분전에 증류수에 녹인 0.1% CHL 용액을 햄스터 협낭편측에 국소도포하였다.

4) 돌연변이성 억제 실험

돌연변이성 조사는 Maron과 Ames의 liquid preincubation method를 사용하였다⁴⁵⁾. 시험균주로는 Salmonella typhimurium TA98(ATCC, U.S.A.)을 사용하였고 DMBA는 10 μ l dimethyl sulfoxide에 녹여 사용하였다. 하루 배양하여 3 \times 10⁸cell/ml로 키운 Salmonella typhimurium TA98과 DMBA를 37°C에서 30분간 preincubation하여 그 혼합물에 soft agar를 넣고 혼합하여 minimal glucose agar plate에 부어주고, 48시간 더 배양하여 histidine+ revertant(His^r)의 수를 세었다. CHL의 돌연변이 억제를 보기 위하여 preincubation시 DMBA와 함께 CHL을 처리하여 그 반응 효과를 관찰하였다.

Table 1. H-ras Amplification and Sequencing primers

Name	Exon	DNA strand	DNA sequence 5' →3'
Ras 1	2	Sense	CTAAGCCTGTTGTTTTGCAGGAC
Ras 2	2	Antisense	GCTAGCCATAGGTGGCTCACCTG
Ras 3	2	Antisense	TACTGATGGATGTCCTCGAA
Ras 4	2	Sense	ACTGGACATCTTAGACACAGCAGTT
Rex 1	1	Sense	TGTGCTTCTCATTGGCAGGTG
Rex 2	1	Antisense	CTCGTCCACAAGTGGTTCTGG

5. 암유전자 돌연변이 분석

정상세포가 암세포로 형질 전환 시 CHL이 암유전자의 변이에 대한 효과를 알아 보기 위하여, 발암원 처리로 형성된 유두종양과 암예방물질로 형질 전환이 억제된 상태에서 발생한 유두종양에서 암유전자를 polymerase chain reaction(이하 PCR이라 함)을 이용하여 제한효소 절편길이 다형화 현상[restriction fragment length polymorphism (이하 RFLP이라 함)]으로 분석하였으며, 세포의 암유전자로는 H-ras 유전자를 대상으로 하였다.

a. DNA 추출

정상적인 협낭조직과 협낭 종양조직에서 genomic DNA를 추출하기 위하여 세포용해 완충용액(50mM Tris-HCl, pH8.0, 0.2M NaCl, 0.1M EDTA, 1% SDS) 0.5ml에 proteinase K를 0.4µg/ml의 농도로 넣고 조직을 잘게 잘라 37°C shaking water bath에서 16시간 동안 배양하였다. 그 다음 phenol/chloroform으로 3번 반복 처리한 후 absolute ethanol로 DNA를 침전시키고 원심 분리하여 vacuum oven에서 10분 동안 에탄올을 증발시킨 후 적당량의 TE 완충용액(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0)에 녹여 두었다.

b. 유전자 돌연변이 검출

H-ras 유전자의 codon 61을 포함하는 exon 2 부위를 증폭시키기 위하여 다음과 같이 PCR을 시행하였다. PCR 반응은 50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH9.0), 0.1% Triton X-100, 200µM dNTPs, 2mM MgCl₂, 1unit Taq DNA polymerase(Promega)로 구성된 반응액에 0.01µM Ras 4 primer와 0.01µM Ras 2 primer(Table 1), genomic DNA 0.5µg을 혼합하여 총 10µl로 맞추어 후 DNA Thermal Cycler 9600 (Perkin Elmer Cetus)를 이용하여 95°C에서 3분간 denaturation시킨 후, 1차 PCR (95°C 30sec denaturation, 55°C 1min annealing, 72°C 1min, extension, 10cycle)을 수행하였다. 1차 PCR 반응액에 0.5µM Ras 4 primer와 0.5µM Ras 3 primer를 넣어 총 부피를 20µl로 하고, 반응액 중의 MgCl₂를 1mM로 맞추어 2차 PCR (95°C 30sec, 55°C 1min, 72°C 1min, 30 cycle)를 실시하였다. 이 PCR 산물을 ethidium bromide (EtBr)가 들어있는 2% agarose gel에 2 µl씩 loading하여 100V에서 30분간 전기영동한 후, ultraviolet(UV)하에서 band를 확인하였다. 이와 동시에 genomic DNA를 넣지 않고 동일하게 PCR을 수행하여 전기영동함으로써 DNA의 오염 여부도 확인하였다. Codon 61의 돌연변이 검출은 PCR을 이용한 비방사성 제한 효소 절편길이 다형화 현상[non-isotopic restriction fragment length polymorphism (RFLP)]을 이용하였다. Ras 2, Ras 3, Ras 4를 이용하

여 증폭시킨 PCR 산물을 각각 Mse I(NEB, 0.2unit/µl), Taq I(NEB, 0.5unit/µl), Xba I(BM, 0.5unit/µl)로 37°C에서 2시간 동안 digestion 시켜 12% polyacrylamide gel에서 200V로 3시간 전기 영동하여 EtBr로 염색한 후 UV하에서 RFLP 형태를 관찰하는 것으로 돌연변이의 여부를 관찰하였다.

Codon 12/13의 돌연변이는 제한효소 Mnl I을 이용하여 조사하고, codon 13의 돌연변이는 Hinf I을 이용하여 다형화 현상을 조사하였다. Rex 1과 Rex 2 primer (Table 1)을 이용하여 152bp의 DNA 산물을 얻을 수 있으며, 이 산물을 Mnl I(NEB, 0.25unit/µl), 또는 Hinf I(NEB, 0.5 unit/µl)으로 37°C에서 2시간 동안 반응 시켜 RFLP 형태를 관찰하여 돌연변이 여부를 확인하였다.

RFLP에서 발견된 돌연변이는 다시 염기서열을 확인하여 돌연변이 양상을 결정하였다. 염기서열을 알아보기 위해 먼저 PCR을 수행하였으며, 그 조건은 10mM Tris-HCl (pH9.0), 0.1% Triton X-100, 200µM dNTPs, 2mM MgCl₂, 1unit Taq DNA polymerase로 구성된 반응액에 Ras 1 primer와 Ras 2 primer 및 genomic DNA 0.5µg을 넣고, 95°C에서 3분간 denaturation하고, 95°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 30번 반복하고, 72°C에서 10분간 extension시켜 219bp의 PCR 산물을 얻었다. 이 산물을 Sequence PCR products sequencing kit(USB)를 사용하여 정제과정 없이 직접 염기서열을 분석하였다. 먼저 PCR 산물 5µl에 exonuclease I과 alkaline phosphatase를 각각 1µl씩 넣고 37°C에서 20분간, 85°C에서 15분간 배양하여 여분의 primer와 dNTP를 제거하였다. 이렇게 처리한 PCR product DNA에 10pmole의 Ras 3 primer를 넣고 100°C에서 2분간 denaturation한 후, 반응 완충용액, 0.1M dithiothreitol, 1 : 5 diluted labeling mix. α-³⁵S-dATP, sequenase로 labeling 반응을 실시한다. Termination mixture 즉, G, A, T, C에 α-³⁵S-dATP로 labeling된 DNA를 넣고 37°C에서 10분간 배양하고 stop solution을 넣어 denaturation하였다. 이 반응산물을 6% urea acrylamide gel에 전기영동하고, autoradiogram을 얻어 염기서열을 분석 확인하였다.

IV. 연구성적

1. CHL의 암억제 실험

DMBA로 햄스터 협낭암을 유발시켰으며, 암예방물질인 CHL을 전 처리시에 협낭에 발생한 유두종양은 암예방물질을 처리하지 않았을 때에 비하여 현저히 감소되었다. 즉, 유두종양을 가지고

Table 2. Effects of Chlorophyllin on Tumor yield and Tumor mutiplicity of DMBA-induced Hamster buccal pouch Tumor

Experimental Groups	Tumor Yield (%)	Tumor Multiplicity (Mean ± Std. Error)
Normal(No treatment)	0	0
Solvent only (Mineral oil)	0	0
DMBA ^a	86.0	3.7 ± 0.6 ^c
CHL ^b + DMBA	62.5	1.4 ± 0.3
CHL	0	0

^a 0.5% 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene in mineral oil (twice/week topical application)

^b 0.1% chlorophyllin in water was treated 10min before DMBA topical application.

^c All animals were sacrificed at 22week.

있는 실험동물의 비율을 나타내는 종양발생률(tumor yield)과 실험동물 당 가지고 있는 유두종양의 평균 개수를 나타내는 종양 생성률(tumor multiplicity)을 비교하였는데, DMBA로 종양을 유발한 경우에 실험동물 중 86%에서 1개 이상의 유두종양이 나타났으며, 종양발생률은 평균 3.7개이었으나, CHL을 처리한 경우에는 종양발생률은 62.5%로 감소되었으며, 종양발생률도 1.4개로 감소되었다. 실험에 사용한 유기용매나 암예방물질 자체는 종양발생에 아무런 영향을 주지 않았다(Table 2).

Table 3. Effect of Chlorophyllin on the Mutagenicity of DMBA

Treatment	Histidine revertant positive (His+)/plate	% inhibition
DMBA(20μmole/plate)	317 ± 32	
DMBA + 1μmole CHL	239 ± 27	25.6
DMBA + 3μmole CHL	154 ± 31	51.7
DMBA + 5μmole CHL	58 ± 11	81.7

2. CHL의 돌연변이 억제 실험

DMBA가 생체내에서 발암성을 나타내려면 먼저 생체내 대사에 관여하는 여러 가지 효소에 의해 최종 친전자성 대사산물로 전환된 후, DNA와 결합하여 adduct를 형성하고, 세포분열시에 DNA 복제를 거치는 과정 중에 돌연변이를 일으킴으로써 암발생을 유발한다. 그러므로 CHL의 암예방 가능성을 보기 위하여는 돌연변이성 억제정도를 보는데, 본 실험에서 DMBA에 의해 유발되는 돌연변이성은 plate 당 histidine+ revertant수가 평균 317개이었으나, 1μmole CHL을 전 처리 시에 239개, 5μmole CHL 전 처리 시에는 58개까지 억제되었다(Table 3).

3. CHL의 H-ras 유전자 돌연변이 분석

협낭 유두종양에서 H-ras 유전자의 codon 61의 돌연변이는 중

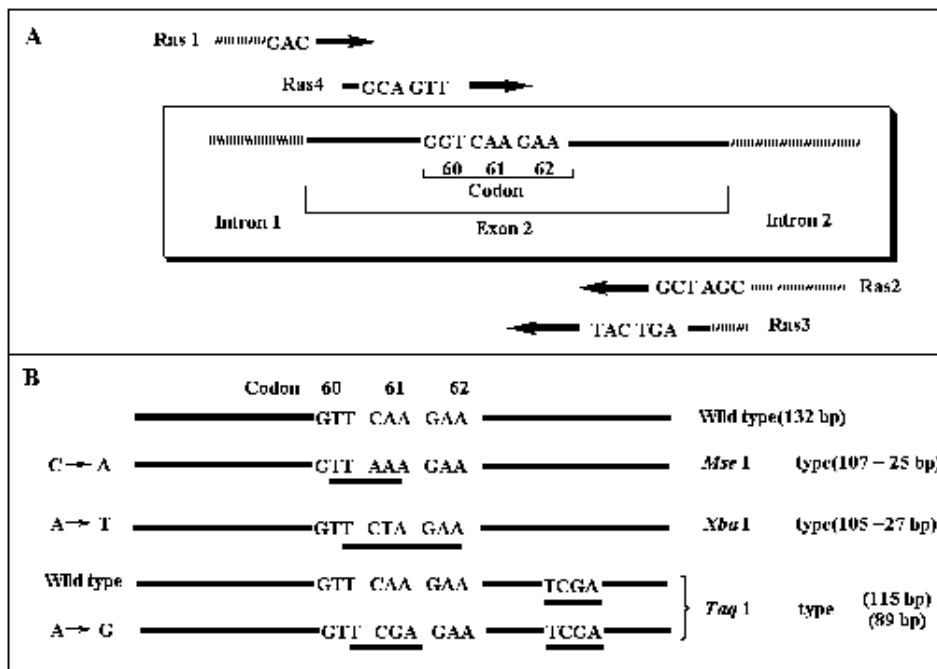


Fig. 1. Strategy for analysis of H-ras activating point mutations at codon 61 by a PCR-based, non-isotopic restriction fragment length polymorphism(RFLP) method. A. Sequence codon 61 in exon 2 and location of primer(Ras 2, Ras 3, and Ras 4) used for H-ras mutation analysis. Amplification of the sequence around codon 61 was performed as described in material and methods. B. Mutation profile of codon 61 of H-ras. Mutation of the first base of codon 61 from C to A would give rise to Mse I site. Mutation of the middle base of codon 61 from A to T would give rise to an Xba I site. Mutation of the middle base of codon 61 from A to G would give rise to a Taq I site.

양조직에서 얻은 genomic DNA를 PCR를 이용하여 codon 61을 포함하는 exon 2부위를 증폭시켜 132bp의 DNA 절편을 얻고, 여기에 *Mse* I, *Xba* I, *Taq* I으로 처리하여 RFLP 형태를 보았다. Codon 61의 CAA가 그대로 있는 wild type의 경우는 *Mse* I, *Xba* I으로 잘랐을 때 132bp의 절편을 나타내나, 돌연변이가 있는 경우에는 Fig. 1에서와 같이 다양한 종류의 절편을 나타낼 수 있다. 즉, CAA의 첫번째 염기인 C가 A로 변환된 경우에는 *Mse* I site를 갖게 되어 107bp의 절편을 나타내고, codon 61의 두번째 염기인 A가 T로 변환된 경우에는 *Xba* I site를 갖게 되어 105 bp의 절편을 보인다. 또한 *Taq* I으로 잘랐을 때는 증폭된 DNA 중에 codon 61 부위 외에 또 다른 *Taq* I site가 있어 wild type은 115bp, 돌연변이가 있는

경우에는 89bp를 나타낸다. 본 실험에서는 codon 61 부위의 돌연변이는 거의 관찰되지 않았으며, 단지 *Mse* I에 의한 107bp의 절편만 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

Codon 12/13의 돌연변이는 제한효소 *Mnl* I을 이용하여 조사하였고, codon 13의 돌연변이는 *Hinf* I을 이용하였다. *Rex* 1과 *Rex* 2 primer(Table 1)를 이용하여 152bp의 DNA 절편을 얻었으며, 이 산물을 *Mnl* I 또는 *Hinf* I으로 37°C에서 2시간 동안 반응 시켜서 RFLP 형태를 codon 61과 같은 방법으로 관찰하였다. 즉 *Mnl* I을 처리한 경우에 PCR로 얻은 152bp내에는 이 제한효소에 의한 절단부위가 존재하여 86bp와 66bp의 절편을 얻을 수 있으나, 이 제한효소에 의한 절단부위(GAGG)중 어느 하나라도 돌연변이가

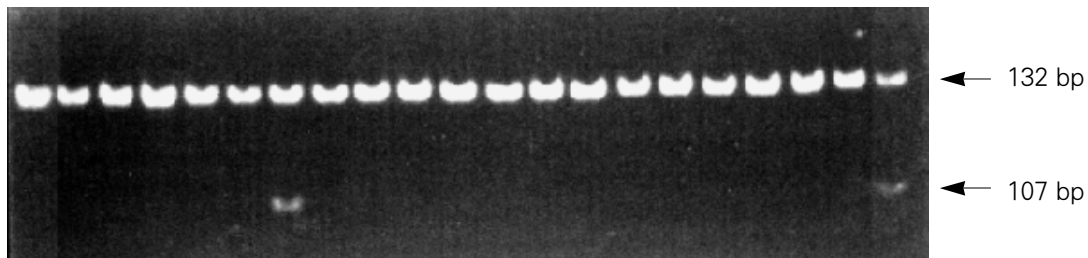


Fig. 2. Restriction fragment length polymorphism of DMBA-induced or CHI-DMBA-induced hamster buccal pouch tumor.

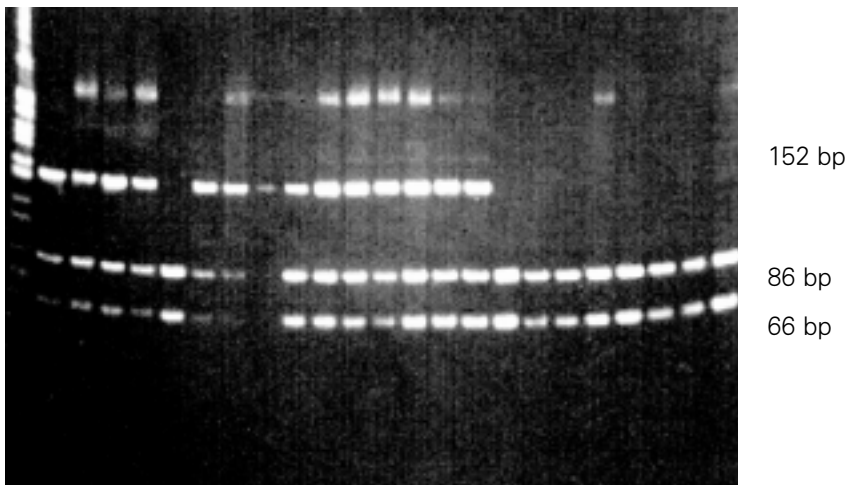
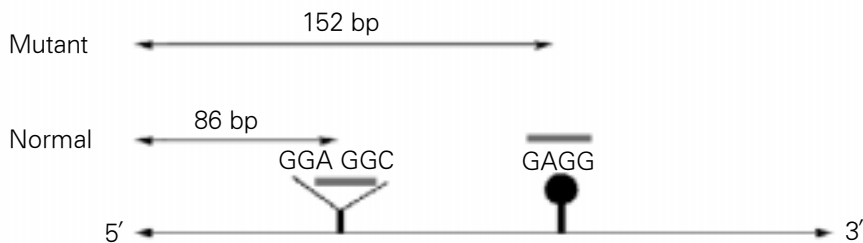


Fig. 3. A strategy for detection of *Mnl* I restriction fragment length polymorphisms created by mutations in codon 12 or 13 of H-ras-1. Wild type *Mnl* I restriction sites (●) near the first exon are indicated. The position of the polymorphic *Mnl* I site (GAGG) relative to the sequences of the normal codon 12 (GGA) and codon 13 (GGC) is shown.

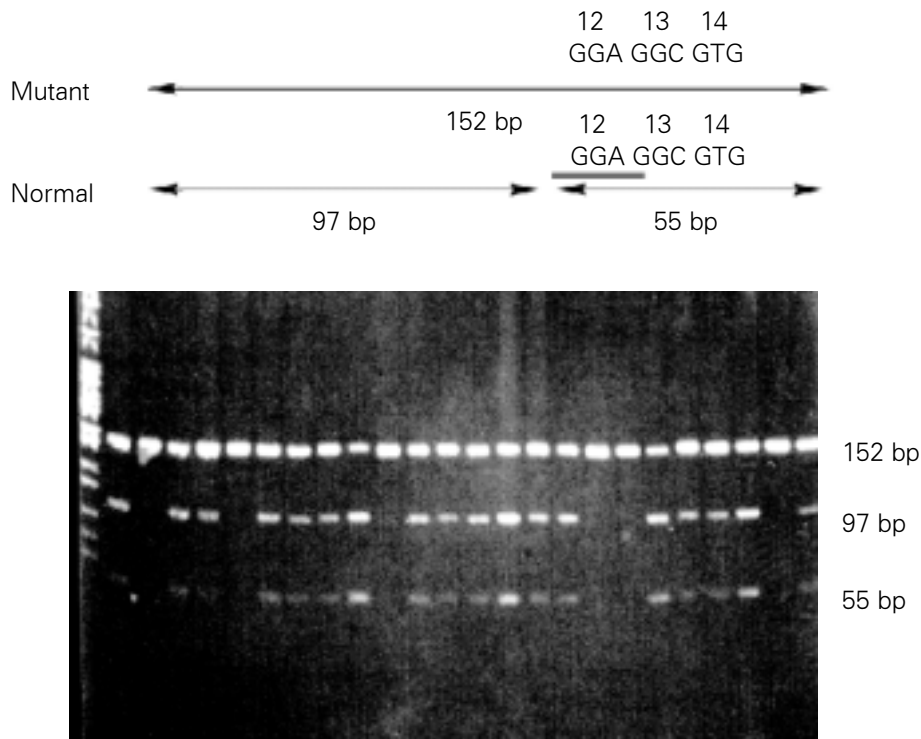


Fig. 4. A strategy for detection of Hinf I restriction fragment length polymorphisms created by mutation at codon 13 of H-ras. PCR amplification of DNA using Rex-1 and Rex 2 gives rise to a 152 bp containing exon 1. Mutation of the middle base of codon 13 from G to T would give rise to a new Hinf I site within 152 bp, generating mutation-specific fragments of 97 and 55 bp.

Table 4. Frequency and Profile of Activating H-ras Mutations at the Codon 12/13 and 61 in DMBA-induced Hamster buccal pouch Tumor.

Treatment	ras mutation frequency	Profile of H-ras mutation			
		Codon 12/13	Codon 61 (CAA)		
			AAA ^a	C ^b G ^c A	CT ^d A
DMBA	48/50(96%)	47	1	0	0
DMBA + CHL	47/50(94%)	46	2	0	0

^aAdenine, ^bCytidine, ^cGuanine, ^dThymine

일어난 경우에는 이 절단부위가 인식되지 않으므로 152bp만 관찰된다. 본 실험의 경우에는 이 제한효소에 의하여 거의 모든 유두종양에서 절편 없이 152 bp가 인식되는 것으로 보아 거의 모든 유두종양에서 돌연변이 양상이 12/13 codon에 나타남을 알 수 있었다(Fig. 3). 또한 Hinf I(GGAGT)으로 절단 시에는 13번 codon의 경우에 두번째 염기가 G에서 T로 돌연변이가 일어난 경우에만 인식됨으로 wild type의 경우에는 절단되지 않고 돌연변이가 일어난 경우에만 인식이 되어 97bp와 55 bp절편이 발견될 수 있다. 본 실험에서 12/13 codon에 돌연변이가 나타난 경우 중 많은 경우가 이 제한효소에 의해 절단이 되는 것으로 보아 12/13 codon 돌연변이의 대부분은 13번codon에서 G가 T로 돌연변이가 일어

났음을 알 수 있었다(Fig. 4).

DMBA로 유발된 협낭암에서는 H-ras 유전자의 돌연변이가 거의 나타났으며, 주로 codon 12/13에서 발견되었으나, codon 61에서 CAA가 AAA로 돌연변이된 경우도 있었으며, CHL을 전 처리한 유두종양의 경우에도 돌연변이 발현빈도나 양상에 큰 차이가 없었다(Table 4).

V. 고 찰

CHL에 대한 다양한 돌연변이 물질의 활성은 생체내^{25,27,30,33} 또는 시험관 실험^{29,34,36,38}을 통하여 연구되었으나 항발암성에 대한 실험

결과는 많지 않았다. 최근 연구에서 Nelson⁴⁶⁾은 CHL이 쥐에서 dimethylhydrazine으로 유도된 대장암의 발생을 촉진한다고 보고하였으나, 이와는 달리 Imai 등⁴⁷⁾은 aflatoxin B1으로 유발된 송어의 간암실험에서 CHL이 간암발생을 억제한다고 보고하였으며, 다양한 종류의 발암물질을 이용한 생쥐의 피부암 실험에서도 CHL은 유두종양 발생을 현저히 감소시켰다⁴⁸⁾. CHL은 구조 내에 pyrrole ring system을 함유하고 있어서 다양한 발암물질과 비공유 복합체를 형성하는 interceptor molecule로 작용하여 암예방 효과를 나타내는 것으로 생각되며, 특히 planar aromatic ring structure를 갖는 발암물질에 가장 예방효과가 큰 것으로 알려졌다³⁹⁾. 또한 CHL은 non-planar한 발암물질인 vinyl carbamate의 발암성을 억제하는 사실로 미루어 또 다른 기전이 작용할 가능성이 있는 것으로 보고있다⁴⁰⁾.

CHL은 여러 가지 발암물질에 의한 DNA adduct 형성을 억제한다^{26,27,41,43)}. 본 실험에서도 CHL이 DMBA의 돌연변이성을 억제하는 것은 DNA adduct 형성을 억제하여 일어난 결과로 해석되는데, CHL이 수용성이기 때문에 방향성 화합물들과 복합체를 형성하면 지용성인 발암물질들을 쉽게 배설할 수 있기 때문이다. CHL과 발암원 물질 사이의 복합체 형성은 발암물질의 활성화 과정을 억제하며, CHL과 최종 친전자성 대사 활성화 발암물질과의 결합은 수용액 상태에서 친전자성 물질을 분해함으로써 이들 발암물질이 생체내 친핵성 물질인 DNA와 결합하는 것을 감소시킨다⁴¹⁻⁴³⁾. 이러한 반응은 ellagic acid가 발암물질과 결합하여 불활성인 복합체를 형성하는 것과 같은 양상이다⁴⁸⁾. 분자 포획(molecular trapping)을 통한 발암물질의 비활성화 외에도 CHL은 발암원 물질이 최종 친전자성 대사 활성화물질로 변환되는 것에 영향을 줄 수 있다고 생각할 수 있다. 즉, CHL을 피하 주사시에 마이크로솨에 존재하는 aminopyrine N-demethylase와 aniline hydroxylase 효소 활성이 감소되며, hexobarbital로 유발된 수면 시간을 연장시킨다⁴⁷⁾. CHL에 의한 간장내 대사 관련 효소의 감소는 간장내 hemoprotein의 생합성을 감소시키며, 결과적으로 cytochrome의 양이 감소된다. Cytochrome 양의 감소는 발암물질의 대사활성에 관여하는 cytochrome P-450 효소를 감소시키므로 발암물질의 대사 활성이 감소되게 된다. 최근 연구에서 CHL은 cytochrome P450IA와 P450III_{E1}과 밀접한 관련이 있는 7-ethoxyresorufin O-deethylase와 N-nitrosodimethylamine N-demethylase 효소활성을 억제하며, 특히 NADPH-cytochrome c reductase의 효소활성이 가장 큰 영향을 받는다⁴⁰⁾. 또한 Yun 등⁴⁹⁾은 CHL이 cytochrome P-450 효소활성을 비특이적으로 억제한다고 보고하였다.

화학물질을 이용한 암의 예방은 기존의 항암제에 의한 암세포의 치료와는 전혀 다른 새로운 개념의 암 정복 전략으로서 최근 국내외에서 이에 관한 연구가 시도되고 있으며, 지금까지 연구된 발암 억제물질들은 단순히 그 발암물질의 작용을 차단 또는 억제하는 현상학적인 결과에서 얻은 것으로 그 정확한 작용기전은 아직 밝혀지지 않았다. 현재까지 가장 광범위하게 연구되어진 암억제물질은 비타민 A의 유도체인 retinoid인 데, 이는 발암물질로 유발된 전암병소를 보다 분화가 잘된 상태로 회복시키기도 하며, 인터페론 알파 등과 병용하면 자궁경부와 피부에서의

암발생을 억제한다^{50,51)}. 암예방제의 검색이나 개발은 주로 시험관내 또는 생체실험을 통해 이루어지며, 암발생을 억제하는 현상학적인 것에 기초하므로, 그물질이 암발생을 억제하는 것은 알 수 있으나, 그 기전에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 암예방제가 그 성격상 암발생 고위험군에서 장기간 사용을 필요로 하므로 이러한 약물이 종양유전자에 미치는 직접적인 영향에 대하여 연구할 필요가 있다.

정상세포를 암세포로 변형시키는 암유전자 활성화 기전은 크게 나누어 암유전자의 정성적 변화와 정량적 변화로 나눌 수 있는데, 암유전자의 정성적 변화에 속하는 것은 H-ras 유전자 등의 변이로 codon 12, 13, 59, 61 등의 돌연변이에 따라 아미노산의 치환이 따르고, 이에 따라 GTP 가수분해 활성이 현저히 감소하게 되고 결과적으로 G protein과 GTP가 계속적으로 결합하고 있기 때문에 p21의 활성화가 지속적으로 유지되어 암세포로 변형을 일으키게 된다. 본 실험에서 사용된 CHL은 이러한 종양유전자의 정성적 변화에는 별다른 변화를 주지 않았다. 즉, CHL이 발암원 물질과 복합체를 형성하거나, 발암물질의 활성화를 억제하여 이용 가능한 최종 친전자성 발암물질의 양을 감소시켜 친핵성인 DNA와의 결합을 감소시킨 결과로 유두종양과 같은 암발생빈도는 줄이게 되나, CHL 자체가 유두종양내 종양유전자의 돌연변이 발현빈도와 양상에는 영향을 주지 않음을 알 수 있었다.

VI. 결 론

본 실험에서는 암예방물질인 CHL이 종양 발생에 미치는 영향과 돌연변이 활성화에 미치는 영향을 보고, 종양 발생과정에서의 종양유전자의 정성적 변화에 주는 영향을 조사하고자 발암물질로 알려진 DMBA로 햄스터 협낭에 유두종양을 유발하였으며, CHL을 전 처리하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 0.5% DMBA로 종양을 유발시에 종양발생률은 86.0% 이었으며, 종양생성률은 3.7 ± 0.6 이었으나, CHL을 전 처리한 경우에는 종양발생률이 62.5%로 감소되었으며, 종양생성률도 1.4 ± 0.3 으로 현저히 감소되었다.
2. 20 μ mole DMBA에 의한 돌연변이성을 검사한 결과 histidine+ revertant 수는 317 ± 32 이었으나 1~5 μ mole CHL 처리시에 dose-dependent 양상으로 25.6~81.7%까지 돌연변이성이 억제되었다.
3. DMBA로 유발된 유두종양에서 암유전자인 H-ras 돌연변이는 96%, CHL 전처리 한 경우에는 94%로 돌연변이가 나타났으며, 두 경우 모두 대부분 (DMBA 경우 47/48, CHL 전처리시 46/47) codon 12/13에 돌연변이가 나타났다.

이상의 실험결과로 CHL은 발암물질인 DMBA와 복합체를 형성하여 DMBA의 활성화 과정을 억제하므로써 생체내 DNA와 결합할 수 있는 최종 친전자성 대사 발암물질의 형성을 감소시키고, 따라서 이용 가능한 발암물질이 감소된 결과로 DMBA-DNA adduct 형성이 감소되고, 이에 따라 돌연변이성이 억제되며, 돌연변이의 감소로 인해 암발생이 감소된 결과로 암예방효과를 나

타내는 것으로 생각된다. 그러나 이미 형성된 유두종양 내에서 H-ras 유전자의 돌연변이의 발생빈도에는 영향을 주지 못하였으며, 돌연변이 형태도 변화시키지 않는다는 것을 알 수 있었다. 따라서 CHL은 구강암의 암예방제로서의 가능성을 알 수 있었으며, 향후 구강암 발생 고위군에서 CHL의 임상적 적용에 대한 계속적인 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

참고문헌

- Weinstein IB. Cancer prevention: Recent progress and future opportunities. *Cancer Res*, 1991,51:5080s-5085s.
- Henderson BE, Ross RK, Pike MC, et al. Endogenous hormones as a major factor in human cancer. *Cancer Res*, 1982,42:3232-3239.
- Henderson BE, Ross R, Berstein L. Estrogens as a cause of human cancer: The Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Res*, 1988,48:246-253.
- Sporn MB. Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. *Cancer Res*, 1976,36:2699-2702.
- Lippman SM, Hittelman WN, Lotan R, et al. Recent advances in cancer chemoprevention. *Cancer Cells*, 1985,3:59-65.
- Wattenberg LW. Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. *Cancer Res (Suppl)*, 1983,43:2448s-2453s.
- Sporn MB. Carcinogenesis and cancer: Different perspectives on the same disease. *Cancer Res*, 1991,51:6215-6218.
- Wattenberg LW. Chemoprevention of cancer. *Cancer Res*, 1985,45:1-8.
- Wattenberg LW. Inhibition of chemical carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*, 1978, 60:11-18.
- Garewal HS, Meyskens FL Jr. Chemoprevention of cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*, 1991,5:69-77.
- Wattenberg LW. Inhibition of chemical carcinogenesis by minor nutrient constituents of the diet. *Proc Nutr Soc*, 1990,49:173-183.
- Block G, Patterson B, Subar AF. Fruit, vegetables, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer*, 1992,18:1-29.
- Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, fruit, and cancer. I. Epidemiology. *Cancer Causes Control*, 1991,2:325-357.
- Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, fruit, and cancer. II. Mechanisms. *Cancer Causes Control*, 1991,2:427-442.
- Dorant E, Van Den Brandt PA, Goldbohm RA. A protective cohort study on Allium vegetables consumption, garlic supplement use, and the risk of lung carcinoma in the Netherlands. *Cancer Res*, 1994,54:6148-6153.
- Ziegler RG, Subar AF, Claft NE, et al. Does beta-carotene explain why reduced cancer risk is associated with vegetable and fruit intake? *Cancer Res*, 1992,52:2060s-2066s.
- Fontham ETH. Protective dietary factors and lung cancer. *Int J Epidemiol* 19(suppl1), 1990,s32-s42.
- Dragsted LO, Strube M, Larsen JC. Cancer-protective factors in fruits and vegetables: Biochemical and biological background. *Pharmacol Toxicol* 72(suppl 1), 1993,116-135.
- National Research Council, Committee on Diet and Health, Food and Nutrition Board, Commission on Life Sciences. Diet and Health: Implication for reducing chronic disease risk. National Academy Press, Washington DC, 1989.
- Weisburger JH. Nutritional approach to cancer prevention with emphasis on vitamins, antioxidants, and carotenoids. *Am J Clin Nutr*, 1991,53:226s-237s.
- The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N Engl J Med*, 1994,330:1029-1035.
- Lai C-N, Butler MA, Matney TS. Antimutagenic activities of common vegetables and their chlorophyll content. *Mutat Res*, 1980,77:245-250.
- Terwel L, van der Hoeven JCM. Antimutagenic activity of some naturally occurring compounds towards cigarette-smoke condensate and benzo[a]pyrene in the Salmonella/microsome assay. *Mutat Res*, 1985,152:1-4.
- Romert L, Curvall M, Jenssen D. Chlorophyllin is both a positive and negative modifier of mutagenicity. *Mutagenesis*, 1992,7:349-355.
- Negishi T, Nakano H, Kitamura A, et al. Inhibitory activity of chlorophyllin on the genotoxicity of carcinogens in Drosophila. *Cancer Lett*, 1994,83:157-164.
- Guo D, Dashwood R. Inhibition of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)-DNA binding in rats given chlorophyllin: dose-response and time-course studies in the liver and colon. *Carcinogenesis*, 1994,15:763-766.
- Dashwood RH, Breinholt V, Bailey GS. Chemopreventive properties of chlorophyllin: inhibition of aflatoxin B1(AFB1)-DNA binding in vivo and antimutagenic activity against AFB1 and two heterocyclic amines in the Salmonella mutagenicity assay. *Carcinogenesis*, 1991,12:939-942.
- Breiholt V, Schimerlik M, Dashwood R, et al. Mechanisms of chlorophyllin anticarcinogenesis against AFB1: complex formation with the carcinogen. *Chem res Toxicol*, 1995,8:506-514.
- Whong WZ, Stewart J, Brockman HE, et al. Comparative antimutagenicity of chlorophyllin and five other agents against aflatoxin B1-induced reversion in Salmonella typhimurium starin TA98. *Teratogen Carcinogen Mutagen*, 1988,8:215-224.
- Sarkar D, Sharma A, Talukder G. Differential protection of chlorophyllin against alastogenic effects of chromium and chlordane in mouse bone marrow in vivo. *Mutat Res*, 1993,301:33-38.
- Olvera O, Zimmering S, Arceo C, et al. The protective effects of chlorophyllin in treatment with chromium(VI) oxide in somatic cells of Drosophila. *Mutat Res*, 1993,301:201-204.
- Abraham SK, Sharma L, Kesavan PC. Role of chlorophyllin as an in vivo anticlastogen: protection against gamma-radiation and chemical clastogens. *Mutat Res*, 1994,322:209-212.
- Renner HW. In vivo effects of single or combined dietary antimutagens on mutagen-induced chromosomal aberrations. *Mutat Res*, 1990,244:185-188.
- Ong TM, Whong WZ, Stewart J, et al. Chlorophyllin : a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixtures. *Mutat Res*, 1986,173:111-115.
- Camoiano A, Balansky RM, Benniselli C, et al. Experimental databases on inhibition of the bacterial mutagenicity of 4-nitroquinoline 1-oxide and cigarette smoke. *Mutat Res*, 1994,317:89-109.
- Espinosa-Aguirre JJ, Reyes RE, Rubio J, et al. Mutagenic activity of urban air samples and its modulation by chilli extracts. *Mutat Res*, 1993,303:55-61.
- Sarkar D, Sharma A, Talukder G. Chlorophyll and chlorophyllin as modifiers of genotoxic effects. *Mutat Res*, 1994,318:239-247.
- Hayatsu H, Negishi T, Arimoto S, et al. Porphyrins as potential inhibitors against exposure to carcinogens and mutagens. *Mutat Res*, 1993,290:79-85.
- Arimoto S, Fukuoka S, Itome C, et al. Binding of polycyclic planar mutagens to chlorophyllin resulting in inhibition of the mutagenic activity. *Mutat Res*, 1993,287 :293-305.
- Tachino N, Guo D, Dashwood WM, et al. Mechanisms of the in vitro antimutagenic action of chlorophyllin against benzo[a]pyrene: studies of enzyme inhibition, molecular complex formation and degradation of the ultimate carcinogen. *Mutat Res*, 1994,308:191-203.
- Park KK, Surh YJ, Miller JA. Chemoprotective properties of chlorophyllin against vinyl carbamate, p-nitrophenyl vinyl ether and their electrophilic epoxide. *Cancer Lett*, 1995,94:33-40.
- Park KK, Surh YJ. Chemopreventive activity of chlorophyllin against mouse skin carcinogenesis by benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide. *Cancer Lett*, 1996,102:143-149.
- Surh YJ, Park KK, Shlyankevich M. Inhibitory effects of chlorophyllin on chemically induced mutagenesis and carcinogenesis. *Ann NY Acad Sci*, 1995, 768:246-249.

44. Siverman S, Gorsky M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation, A follow-up study of 257 pateints. *Cancer*, 1984,53:563.
45. Maron DM, Ames BN. Revised methods for Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res*, 1983,113:173-215.
46. Nelson RL. Chlorophyllin, an antimutagen, acts as atumorpromoter in the rat-dimethylhydrazine colon carcinogenesis model. *Anticancer Res*, 1992,12:737-740.
47. Imai K, Arimoto T, Sato M, et al. Effects of sodium metachlorophyllin on the activity and components of the microsomal drug-metabolizing enzyme system in rat liver. *Chem Pharm Bull*, 1986,34:4287-4293.
48. Sayer JM, Yagi H, Wood AW, et al. Extremely facile reaction between theultimate carcinogen benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide and ellagic acid. *J Am Chem Soc*, 1982,104:5562-5566.
49. Yun CH, Jeong HG, Jhoun JW, et al. Non-specific inhibition of cytochrome P450 activities by chlorophyllin in human and rat liver microsomes. *Carcinogenesis*, 1995,16:1437-1440.
50. Sporn MB, Robert AB. Role of retinoids in differentiation and carcinogenesis. *Cancer res*, 1992,43:3034-3040.
51. Sporn MB and Newton DL. Chemoprevention of cancer with retinoids. *Fed Proc*, 1979,38:2528-2534.