

한국인 두경부암종 환자에서 Cytochrome P450 1A1, 2E1 및 N-acetyltransferase 2 효소의 다형성 분석에 따른 유전적 감수성에 대한 연구

이영수 · 김태균 · 우순섭 · 심광섭 · 공 구*
한양대학교 의과대학 치과학교실, 병리학교실*

Abstract

GENETIC SUSCEPTIBILITIES OF CYTOCHROME P450 1A1, 2E1, AND N-ACETYLTRANSFERASE 2 TO THE RISKS FOR KOREAN HEAD AND NECK CANCER PATIENTS

Young-Soo Lee, Te-Gyun Kim, Soon-Seop Woo, Kwang-Sub Shim, Gu Kong*
Department of Dentistry, Department of Pathology, College of Medicine, Hanyang University*

Individual genetic susceptibilities to cancers may result from several factors including differences in xenobiotics metabolism to chemical carcinogens, DNA repair, altered oncogenes and suppressor genes, and environmental carcinogen exposures. Among them, genetic polymorphisms of metabolizing enzymes to chemical carcinogens have been recognized as a major important host factors in human cancers. They have two main types of enzymes: the phase I cytochrome P-450 mediating enzymes (CYPs) and phase II conjugating enzymes.

The purpose of this study is to determine the frequencies of genotypes of phase I (CYP1A1 and CYP2E1) and phase II (NAT2) metabolizing enzymes in healthy control and head and neck cancer patients of Korean and to identify the relative high risk genotypes of these metabolizing enzymes to head and neck cancer in Korean. The author has analyzed 132 head and neck cancer patients and 113 healthy controls using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The results were as following:

1. The frequencies of genotypes of CYP1A1, CYP2E1 and NAT2 in healthy control were as following:
CYP1A1 exon 7 polymorphism: Ile/Ile: Ile/Val: Val/Val = 59.3%: 36.3%: 4.4%
CYP2E1 Pst I polymorphism: C1/C1: C1/C2: C2/C2 = 61.1%: 32.1%: 6.2%
NAT2 polymorphism: F/F: F/S: S/S = 43.4%: 48.7%: 8.0%
2. In analysis of phase I enzyme, Val/Val genotype in CYP1A1 exon 7 polymorphism and C2/C2 genotype in CYP2E1 Pst I polymorphism were associated with relative high risks to head and neck cancers (Odds' ratio: 2.09 and 1.37, respectively).
3. Among the genotypes of NAT2 enzyme polymorphism, S/S genotype of NAT2 enzyme had 1.03 times of relative risk to head and neck cancers.
4. In combined genotyping of CYP1A1, CYP2E1, and NAT2 enzymes polymorphisms, the patients with Val/Val and C1/C1, C2/C2 and fast acetylator, and Val/Val and fast acetylator had higher relative risks than the patients with each baseline of combined genotypes (Odds' ratio: 2.82, 1.98 and 2.1, respectively).

These results suggest the combined genotypes of Val/Val and C1/C1, C2/C2 and fast acetylator, and Val/Val and fast acetylator were more susceptible to head and neck cancers in Korean. And genotyping of metabolizing enzymes could be useful for predicting individual susceptibility to head and neck cancer.

I. 서 론

암의 발생에 대한 개개인의 감수성은 여러 발암 요인의 개인적 차이, 즉 발암 원인 물질에 대한 노출 정도, 발암 물질과 관련된 Xenobiotics 대사 효소의 활성화도, DNA 수복계의 활성화도, 여러 종양 관련 유전자의 변이율 등의 차이에 의해 결정된다. 이들 중 Xenobiotics 대사 효소의 활성화도는 유전적으로 결정되며, 대부분의 외부 및 내부 발암 물질이 DNA와 결합하여 변이를 일으키는 과정이 이들 효소에 의해 활성화되기 때문에, 암 발생에 대한 개개인의 감수성과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다¹⁻³⁾. 특히 흡연자 중에서 발생빈도가 높은 폐암, 후두암 등에서는 암의 발생 빈도와 개인의 유전적 감수성의 상관관계를 밝히려는 연구가 활발히 진행되고 있다⁴⁻⁶⁾. 이러한 발암에 대한 개인의 유전적 감수성을 결정하는데는 발암물질의 대사에 관여하는 유전자, 즉 phase I 과정의 Cytochrome P450 family (CYPs)와 phase II 과정의 glutathione S-transferase (GST)와 N-acetyltransferase (NAT) 등이 중요한 역할을 하는 효소들로 알려져 있다. 외부 또는 내부의 발암물질은 phase I 대사에 의해 활성화되고, 활성화된 발암물질은 DNA와 결합하여 DNA adduct를 형성하거나, phase II 대사에 의해 비활성된다. 인체 DNA의 손상 및 변이는 발암 물질과 결합된 DNA adduct 형성에 의해 발생되므로 phase I과 phase II 대사 효소의 활성화도에 따라 발생된 DNA adduct 양에 의해 암 발생의 위험도가 결정된다. 최근에는 분자 생물학적 기법의 발달로 phase I 대사와 phase II 대사에 관여하는 CYPs, GST, NAT 효소 등의 cloning 및 염기 서열 등이 결정되었으며, 활성화도에 따른 각 효소의 아형의 분류가 가능하게 되었다. 미국을 비롯한 서양 국가와 일본 등에서는 흡연과 밀접한 연관성이 있는 폐암 등에서 대사 효소의 다형성에 대한 아형 분류와 개개인의 암발생 위험도 결정에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다^{5,8-13)}.

흡연과 관련된 폐암, 후두암, 방광암 등에서 Xenobiotics 대사 효소의 다형성 및 유형과 상대적 위험도에 대한 많은 연구가 진행되어 왔으며, 두경부암과 Xenobiotics 대사 효소의 다형성 및 유형에 대한 연구는 주로 GSTM1과 CYP1A1 대사 효소에 대해서 이루어져 왔다⁴⁻⁶⁾. 그러나 phase I 대사에서 중요 효소 중에 하나로 알려진 CYP2E1 이나 phase II 대사에서 중요 효소인 NAT2에 관한 연구나 phase I이나 phase II 대사 효소의 조합 유형에 대한 연관성에 대한 연구는 인·후두암을 포함한 두경부 암종에서는 소수의 연구에서만 이루어지고 있다¹⁴⁻¹⁶⁾. 대사 효소의 다형성은 연령, 성별, 인종에 따라 다소 차이가 있는 것으로 알려져 있으며, 특히 인종에 의한 차이는 지역과 인종간의 암 발생 빈도 및 종류, 생활 습관에 따른 암 발생 빈도 및 유형

의 차이를 설명하는데 한 기전으로 생각되고 있다^{17,18)}.

그러므로 본 연구에서는 정상 한국인과 두경부암 환자군에서 Xenobiotics의 대사와 관련된 phase I 대사의 대표적 효소인 CYP1A1 및 CYP2E1와 phase II 대사 효소인 NAT-2에 대한 유형 및 빈도의 분포를 중합효소 연쇄반응-제한효소 절편 길이 다형현상 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) 방법을 이용하여 분석하고, 각 유전자 유형 및 phase I와 phase II 대사 효소의 조합 유형간에 상대적 위험도를 측정함으로써, 상대적 위험도가 가장 높은 집단을 분류하여 한국인에서 발생한 두경부암 환자에서의 개인적 감수성과의 연관성을 규정하고자 하며, 또한 이들 유전자 다형성에 의한 고위험도 군을 예방적 차원에서 중요한 지표(marker)로 이용할 수 있는 가능성을 제시하고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 대상 집단의 선정

- ① 두경부암 실험군의 설정 : 한양대학병원에서 두경부에 발생한 편평 상피암종으로 조직학적 진단을 받은 113여명의 환자를 실험군의 대상으로 하였다.
- ② 대조군의 설정: 암으로 진단 받은 경험이 없는 132여명의 정상인에서 유전자 빈도 분석을 시행하였다.
- ③ 실험군 및 대조군의 대부분이 남성이었고, 성별 및 연령의 분류는 따로 하지 않았다.

각각 실험군 및 대조군으로부터 말초 혈액을 채취하여 실험재료로 사용하였다. 말초 혈액으로부터의 DNA 추출은 Wizard™ Genomic DNA purification system (Promega, Madison, WI, U.S.A.)에 의해 시행하였다.

2. Xenobiotics 대사 효소 다형성을 위한 유전자 부위 결정 방법

유전자의 다형성 분석을 중합효소 연쇄반응 - 제한효소 절편 길이 다형현상(PCR-RFLP)에 의해 분석하였으며, PCR primer의 염기 서열은 Table 1과 같으며, PCR 반응을 위한 조건은 다음과 같다.

중합효소 반응(PCR)은 1xPCR buffer(50mM KCl, 10mM Tris-Cl pH=8.0, 0.01% gelatin, 0.1% Triton x-100, 1.5mM MgCl₂), 200μM dNTPs, 1unit의 Taq DNA polymerase(Takara, Tokyo, Japan)의 혼합액에 각각의 primer 20pmol 및 0.2μg의 DNA를 혼합하여 총 20μl 용량을 맞춘 후 DNA thermal cycler를 이용하여 PCR 반응을 시켰다.

Table 1. Primers sequences for genotyping of xenobiotic metabolizing enzymes.

· CYP1A1 exon 7 polymorphism (Hirvonen et al, 1992)
Forward: CYP1A1 A(Ile)
5'-CGG AAG TGT ATC GGT GAG ACCA-3'
CYP1A1 G(Val)
5'-CGG AAG TGT ATC GGT GAG ACCG-3'
Backward: 5'-GTA GAC AGA TCT AGG CCT CA-3'
· CYP2E1 Pst I polymorphism (Hayashi et al, 1991b)
Forward: 5'-CCA GTC GAG TCT ACA TTG TCA-3'
Backward: 5'-TTC ATT CTG TCT TCT AAC TGG-3'
· NAT2 polymorphism (Hickman and Sim, 1991)
Forward: 5'-GAC ATT GAA GCA TAT TTT GAA AG-3'
Backward: 5'-GAT GAA AGT ATT TGA TGT TTA GG-3'

① CYP1A1의 exon 7 다형성에 대한 PCR 반응 및 결과 분석:

CYP1A1의 exon 7 다형성은 대립인자-특이중합반응 (allelic specific PCR) 방법을 이용하였다. 즉 forward primer의 3'-말단 부위에 다형성을 나타내는 염기 배열의 차이로 primer를 제작하고 backward primer를 공통으로 사용하여 두쌍의 반응을 동시에 일으켜 PCR 반응 유무에 따라 다형성을 결정하였다. PCR 반응 조건으로 denaturation은 95℃에서 1분, annealing은 60℃에서 1분간 총 35 cycle 반응시켰다. 두 개의 PCR 반응 유무에 따라 AA (Ile/Ile), AG(Ile/Val), GG(Val/Val) 유전자 유형으로 나누었다. 중합효소 반응 산물의 염기 크기는 200bp이며 A(Ile) primer를 이용한 중합효소 반응에서만 band가 나타나면 Ile/Ile 유형이고, B(Val) primer를 이용한 중합효소 반응에서만 band가 나타나면 Val/Val 유형이며, A(Ile), B(Val) 모두에서 band가 나타나면 Ile/Val 유형이 된다(Fig. 1).

② CYP2E1의 Pst I 다형성에 대한 PCR 반응 및 결과 분석:

CYP2E1의 Pst I 다형성에 대한 PCR 반응에 있어서 denaturation 95℃에서 1분, annealing은 55℃에서 1분, 그리고 extension은 72℃에서 1분을 35 cycle 시행한 후 마지막으로 72℃에서 10분 연장 반응시켰다. PCR 반응 확인 후, PCR 산물 15μl, 1x enzyme buffer, Pst I 효소(5 unit/μl) 0.5μl을 총 20μl에 맞춘 후 37℃에서 1일간 부양하고 70℃에서 5분간 가열한 후 2% agarose에 전기 영동하여, 제한 효소에 의한 인식 부위 유무에 따라 CYP2E1의 Pst I 다형성을 결정하였다. 제한 효소 처리전에 PCR 산물의 염기 크기는 410bp이며, 두 개의 allele 모두에 제한 효

소의 인식 부위가 있으면, 290bp, 120bp 크기의 band가 나타나며(C2/C2 type), 한 개만 있으면 410, 290, 120bp의 band가 나타나며(C1/C2 type), 두 개의 allele 모두에 제한 효소의 인식 부위가 없을 때에는 410bp만 나타났다(C1/C1 type)(Fig. 2).

③ NAT2 다형성에 대한 PCR 반응 및 결과분석:

PCR 반응 조건은 94℃에서 5분간 denaturation, annealing은 60℃에서 1분, 그리고 extension은 72℃에서 1분을 35 cycle 시행한 후, 마지막으로 72℃에서 10분간 extension 반응을 시켰다. PCR 산물을 2% agarose 겔에서 전기 영동하여 1000bp의 산물을 확인한 후에 제한 효소 결핍 부위에 따라 S1, S2, 그리고 S3의 slow acetylator 유전자 유형을 결정하였다.

(a) S1 유형의 결정:

S1 유형은 1000bp의 PCR 산물 10μl을 Kpn I 제한 효소(Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) 9 unit를 가지고 37℃에서 3시간 이상 부양한 후 2% agarose 겔에 전기 영동하였다. 완전히 1000bp의 PCR 산물이 분해된 경우, 즉 520bp과 480bp만 보이는 경우, S1 allele가 없는 homozygote로 분류하였으며, 분해가 전혀없이 1000bp만 보이는 경우를 S1 allele의 homozygote로, 1000bp와 520bp, 480bp가 보이는 경우는 S1 allele의 heterozygote로 하였다 (Fig. 3A).

(b) S2 유형의 결정:

S2 유형은 (a)에서와 마찬가지로 PCR 산물을 Taq I 제한효소(Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) 로 전기 영동하였다. 400bp의 band와 400bp의 분해 크기인 230bp과 170bp의 유무에 따라 S2의 유형을 결정하였다. 즉, 400bp의 band만 있으면 S2 homozygote로, 230bp과 170bp의 band만 있으면 S2가 없는 homozygote로 분류하였다 (Fig. 3B).

(c) S3 유형의 결정:

S3의 유형은 (a), (b)에서 마찬가지로 PCR 산물을 BamH I 제한효소(Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) 11 unit를 가지고 37℃에서 3시간이상 부양한 후 전기 영동 상에서 1000bp만 보이면 S3 allele의 homozygote로, 150bp과 850bp만 보이면 S3 allele가 없는 homozygote로 분류하였다.

(d) 유전자 유형과 표현형 유형 결정:

이상의 3가지 유형을 각 실험 대상 표본에서 결정한 후 S1, S2, S3 유형 중 두 allele가 있는 경우 slow acetyla-

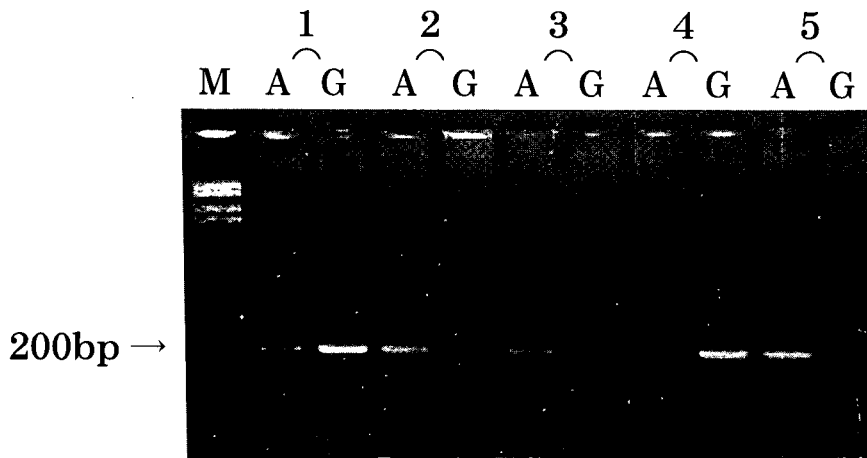


Fig. 1. Genotyping of the CYP1A1 gene in Val/Ile polymorphism. Predominant homozygotes for isoleucine (Ile/Ile): Case 2, 3, 5, heterozygotes for Ile/Val polymorphism (Ile/Val): Case 1, rare homozygote for valine (Val/Val): Case 4.

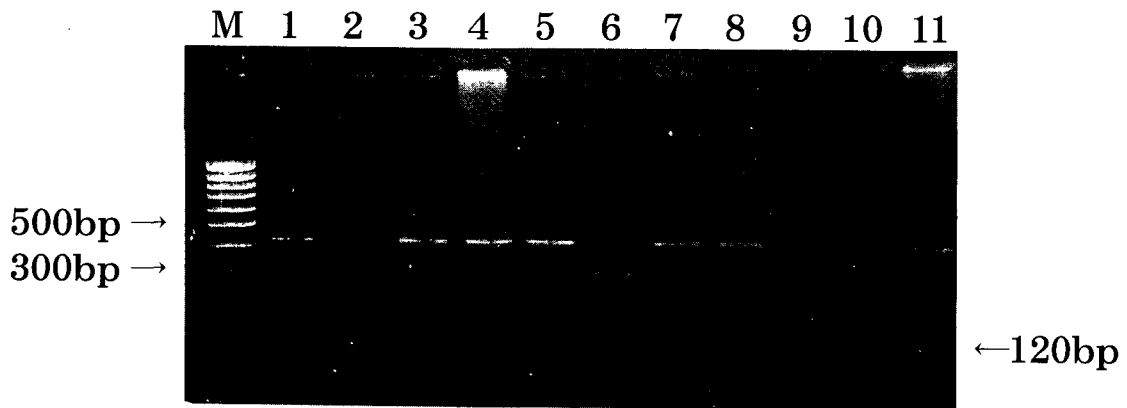


Fig. 2. Genotyping of the CYP2E1 gene in Pst I polymorphism. Homozygotes with (-) restriction site of Pst I enzyme (C1/C1): Case 3, 4, 5, 8, 10, heterozygotes for Pst I polymorphism (C1/C2): Case 1, 2, 7, 9, 11, rare homozygotes with (+) restriction site of Pst I (C2/C2): Case 6.

tor 유전자 유형 S/S로, 두 allele 모두 없는 경우 rapid acetylator 유전자 유형 F/F로, 한 개만이 있는 경우 intermediate 유전자 유형 S/F로 분류하였다. 또한 S/F와 F/F 유전자 유형을 rapid acetylator 표현형 유형으로 분류하고, S/S 유전자 유형은 slow acetylator 표현형 유형으로 분류하였다 (Fig. 3C).

3) 통계처리

각각 Xenobiotics 대사 효소들의 다형성에 의한 유형 분포 차이에 대한 평가 및 상대 위험도 차이의 평가를 위해 chi-square test를 사용했다. Odds' ratio가 각 유전자 유형 및 각 유전자 유형 간의 조합에 따른 상대적 위험도 측정을 위해 사용했으며, 모든 통계 처리는 computer software인 SPSS program(ver. 8.0, SPSS Inc, Chicago, IL, U.S.A.)을 이용했다.

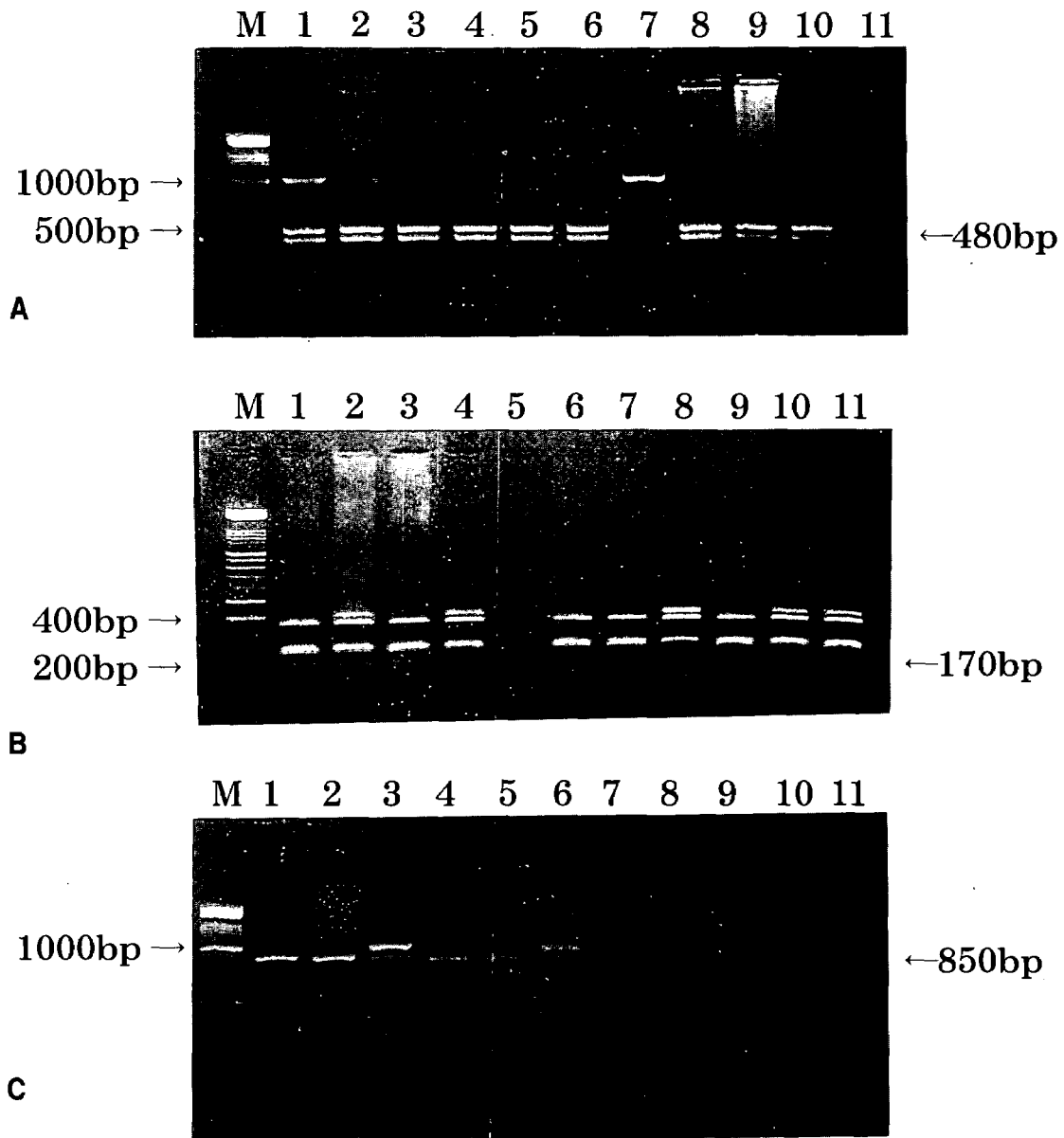


Fig.3. Genotyping of the NAT2 gene.

A: Determination of S1 allele with Kpn I digestion

S1X: Case 1, 7, 11, XX: Case 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10

B: Determination of S2 allele with Taq I digestion

S2S2: Case 8, S2X: Case 2, 4, 10, 11, XX: Case 1, 3, 5, 6, 7, 9

C: Determination of S3 allele with Bam HI

S3X: Case 3, 6, 8, 10, XX: Case 1, 2, 4, 5, 7, 9, 11

(X: undetermined allele)

Ⅲ. 결 과

1. 정상인에서 CYP1A1, CYP2E1, NAT2 대사 효소들의 다형성 유형 분포

113명의 정상 한국인에서 CYP1A1 exon 7 (Val/Ile) 다형성 분포는 Ile/Ile, Ile/Val, Val/Val 유형이 각각 59.3%, 36.3%, 그리고 4.4%였다. CYP2E1 Pst I 다형성에 대해서는 C1/C1, C1/C2, C2/C2 유형이 각각 61.1%, 32.1%, 그리고 6.2%였다. Phase II 대사효소인 NAT2 효소 유형의 분포는 F/F, F/S, S/S 유형이 각각 43.4%, 48.7% 및 8.0%였다 (Table 2).

2. 두경부암 환자 CYP1A1, CYP2E1, NAT2 대사 효소들의 다형성 유형 분포 및 유전자 유형에 따른 상대적 위험도

132명의 두경부암 환자에서 CYP1A1 exon 7 (Val/Ile)에 대한 다형성 유형 분포는 Ile/Ile, Ile/Val, Val/Val 유형이 각각 58.3%, 42.6%, 9.1%로 정상인과 비교했을 때 Val/Val 유형이 2배 정도 높은 빈도를 보였으나 유형간의 통계학적 유의성 (P=0.583)은 없었다. Ile/Ile 유형에 대한 상대적 위험도는 Ile/Val, Val/Val 유형이 각각 0.91 및 2.09배의 상대적 위험도를 보였다. CYP2E1 Pst I의 다형성의 분포는 C1/C1, C1/C2, C2/C2 유형이 각각 59.8%, 31.8%, 8.3%로 C2/C2 유형이 정상인에 비해 약간 높은

Table 2. Frequencies of CYP1A1, CYP2E1, and NAT2 enzymes genetic polymorphisms in head and neck cancers

	Genotypes			Total(%)	P value
	Ile/Ile	Ile/Val	Val/Val		
CYP1A1 polymorphism (exon 7)					
Healthy control	67(59.3)	41(36.3)	5(4.4)	113(100)	0.583
Cancer patients	77(58.3)	43(32.6)	12(9.1)	132(100)	
OR	1	0.91	2.09		
CI		0.53~1.56	0.70~6.23		
CYP2E1 polymorphism	C1/C1	C1/C2	C2/C2		
Healthy control	69(61.1)	37(32.7)	7(6.2)	113(100)	0.529
Cancer patients	79(59.8)	42(31.8)	11(8.3)	132(100)	
OR	1	0.99	1.37		
CI		0.57~1.71	0.50~3.73		
NAT2 polymorphism	F/F	F/S	S/S		0.987
Healthy control	49(43.4)	55(48.7)	9(8.0)	113(200)	
Cancer patients	58(43.9)	63(47.7)	11(8.3)	132(100)	
OR	1	0.97	1.03		
CI		0.57~1.74	0.40~2.70		

OR: Odds' ratio; CI: 95% confidence interval

Table 3. Combined CYP2E1 and CYP1A1 enzymes genetic polymorphisms in head and neck cancer.

Enzymes	Genotypes					
	C1/C1		C1/C2		C2/C2	
CYP2E1	N	V	N	V	N	V
CYP1A1						
healthy control	66	3	35	2	11	0
cancer patient	70	9	39	3	11	0
OR	1	2.82	1.05	1.41	0.94	-
CI		0.73~10.90	0.59~1.85	0.22~8.73	0.38~2.32	-

N: Non-Val/Val V: Val/Val

Table 4. Combined CYP2E1 and NAT2 enzymes genetic polymorphisms in head and neck cancer.

Enzymes	Genotypes					
	C1/C1		C1/C2		C2/C2	
CYP2E1	F	S	F	S	F	S
NAT2						
healthy control	64	5	35	2	5	2
cancer patient	71	8	39	3	11	0
OR	1	1.44	1.00	1.35	1.98	-
CI		0.44~4.63	0.59~1.77	0.21~8.35	0.65~6.01	-

F: Fast acetylator S: Slow acetylator

Table 5. Combined CYP1A1 and NAT2 enzymes genetic polymorphisms in head and neck cancer.

Enzymes	Genotypes					
	Ile/Ile		Ile/Val		Val/Val	
CYP1A1	F	S	F	S	F	S
healthy control	63	4	36	5	5	0
cancer patient	60	7	41	2	10	2
OR	1	1.83	1.20	0.42	2.1	-
CI		0.51~ 6.59	0.67~ 2.11	0.07~ 2.25	0.68~ 6.50	-

F: Fast acetylator S: Slow acetylator

빈도를 보였으나 통계학적 유의성은 없었다. C1/C1 유형에 대한 상대적 위험도는 C1/C2 및 C2/C2 유형이 각각 0.99 및 1.37배의 상대적 위험도를 보였다. Phase II 대사 효소인 NAT2 효소 유형 분포는 F/F, F/S, S/S 유형의 분포가 각각 43.9%, 47.7% 및 8.3%로 정상인과 비슷한 분포를 하였으며 F/F 유형에 대한 상대적 위험도는 F/S, S/S 유형이 각각 0.97 및 1.03이었다.

3. Phase I 대사효소 (CYP1A1 및 CYP2E1) 및 Phase II 대사효소 (NAT2) 효소 유전자 유형 조합에 따른 상대적 위험도 평가

CYP1A1, CYP2E1 및 NAT2 유전자 유형 조합에 따른 유형 조합 분포 및 상대적 위험도를 검색하였다. CYP1A1 exon 7 다형성과 CYP2E1 Pst I 다형성에 의한 유전자 조합 분포에서 Ile/Ile 및 C1/C1 유형 조합에 대해서 Val/Val 및 C1/C1 유형 조합, Val/Val 및 C1/C1 유형 조합은 각각 2.82 및 1.41배의 상대적 위험도를 보였다 (Table 3). CYP2E1과 NAT2 다형성에 의한 유전자 분포에서는 C1/C1 및 fast acetylator 유형에 대해 C2/C2 및 fast acetylator 유형과 C1/C1 및 slow acetylator 유형이 각각 1.98배 및 1.44배의 상대적 위험도를 나타냈다 (Table 4). CYP1A1과 NAT2 다형성에 의한 유전자 분포에서는 Ile/Ile 및 fast acetylator 유형에 대해서 Val/Val 및 fast acetylator와 Ile/Ile 및 slow acetylator 유형이 각각 2.1배 및 1.83배의 상대적 위험도를 보였다 (Table 5).

IV. 고 찰

인체에 발생하는 대부분의 암은 외부 또는 내부로부터 폭로되는 발암 인자와 이러한 발암인자에 대한 폭로는 개개인의 유전적 인자 사이의 상호 작용에 의해 발생한다^{1,3)}. 이론적으로 외부의 발암물질(흡연, 대기오염, 화학제 등)에 노출된 상태에서 개개인의 감수성에 차이가 있는 것으로 생각

되어 왔다. 이러한 개개인의 감수성 차이는 Xenobiotics 대사 효소의 활성도, DNA 수복계의 활성도, 발암에 관여하는 종양 유전자 및 종양 억제 유전자의 변이율 등의 차이에서 비롯된다. 이런 요소들 중 Xenobiotics 대사 효소의 활성도는 유전적으로 결정되며, 최근 분자 생물학적 기법의 발달로 발암 물질의 폭로와 개인적 감수성에 대한 연구의 방법으로 Xenobiotics의 대사 효소(phase I 및 II)에 대한 상대적 위험도를 결정하고 이로부터 얻은 지표를 암예방에 이용하려는 연구가 활발해지고 있다^{19,20)}.

전통적으로 오랫동안 화학적 발암과정 연구의 대상인 물질은 polycyclic aromatic hydrocarbons(PAH)와 aromatic amines이었다. 이 물질들은 모두 흡연에 의해 생성되는 물질로서 폐암, 유방암, 방광암 및 상부 소화기 및 호흡기암(구강암, 후두암 등)의 중요 원인 인자로 잘 알려져 있다. 이들 대사에 관여하는 대표적인 효소로는 cytochrome P450 대사 효소계 (CYPs), 그리고 GSTM1 및 NAT2와 같은 약물대사 효소들에 있으며, 이들 효소의 유전자 다형성에서 기인된 발현(expression)의 차이에 따라 암발생에 있어 개인간의 유전적 감수성에 차이가 나타나는 것으로 밝혀지고 있다. CYPs는 phase I 약물대사 효소로서 여러 화학물질 등의 발암원 (pro-carcinogen)의 활성화에 관여하고 있으며, 후두암, 폐암, 방광암은 이 CYPs 효소계의 다형성과 깊은 관계가 있는 것으로 보고되었다^{18,21-23)}.

CYP1A는 aryl hydrocarbon hydroxylase의 활성도와 관계 있는 CYPs 효소계의 대표적인 효소로서, PCR-RFLP 방법에 의해 두 곳에 다형성 부위가 알려져 있다. 즉 Msp I 제한 효소 부위와 exon 7의 Val/Ile 다형성 부위이며, 인종간에 다형성 유형 빈도의 차이가 있음이 보고되고 있다. Exon 7 유전자 유형 중 활성도가 제일 높은 유형은 Val/Val 유형으로 일본인에서는 4.0%이며, 백인종에서 0-1%의 빈도를 보이고 있다^{5,11,18,24)}. 본 연구에 의하면 정상 한국인에서 Val/Val의 유형 분포는 4.4%로 일본인의 분포와 비슷하였다. CYP1A1의 Val/Val 유형은 흡연과 연관된 폐암, 후두암, 식도암 등에서 2~4배의 상대적 위험도를 보이고 있으며, 이런 상대적 위험도의 결과는 인종간에 차이가 없는 것으로 보고되고 있다^{15,16)}. 본 연구에서 한국인의 두경부암에서 Val/Val 유형에 대한 상대적 위험도는 2.09배로 나타났다.

CYP2E1 대사 효소는 methanol에 의해 활성화가 유도되는 cytochrome P450계의 효소로서, 100여 종의 매우 다양한 화학물질을 대사시킨다. 이들 중에는 발암 물질로 알려져 있는 benzene, dimethylnitrosamine, vinyl chloride 등이 있다. 지금까지 CYP2E1 다형성에 대해서 네 부위에서 알려져 있다. 즉 5' -flank 부위의 Rsa I/Pst I 제한 부위(C1/C2), intron 5의 Psa I 제한 부위, intron 6의

Dra I 제한 효소 부위 및 intron 7의 Taq I 제한 효소 부위 등이다. 이들 중 Rsa I/Pst I 제한 효소 부위가 CYP2E1 효소 활성도와 밀접한 연관성이 있다. CYP2E1 다형성과 발암에 대한 개인적 감수성 연구는 여러 암종에서 시행되었는데 통계학적으로 유의한 상대적 위험도를 보이고 있지는 않다^{14,15,25,26}. 두경부암에서 CYP2E1 다형성에 대한 연구에서는 C2/C2 유형이 1~1.5배의 상대적 위험도를 보이는 것으로 보고되었다^{15,27,28}. 본 연구에서도 C2/C2 유형이 1.37배의 상대적 위험도를 보였으며 이런 결과는 이전의 연구 결과와 비슷한 것으로 생각된다.

Phase II 대사 효소인 NAT2 효소는 여러 약물 및 화학제, 특히 발암제인 benzidine과 aromatic amine 계열 화학제의 acetylation 대사에 관여하는 효소로서 활성도에 따라 slow 및 rapid acetylator로 구별된다. 또한 최근에는 분자생물학적 기법의 발달과 더불어 PCR-RFLP 방법에 의하여 NAT2 효소의 염기 배열이 결정되었으며 유전자 유형의 다형성에 의해 S1, S2, S3와 F1 유전자 유형으로 구분이 가능해졌다. 이러한 유전자 유형 및 표현형 유형은 인종 및 지역간에 차이가 있는 것으로 보고되고 있다. 백인에서는 slow acetylator 유형이 52%, 중국인과 일본인을 대상으로한 아시아인에서는 14%를 보이며, 흑인에서는 35%로 백인과 아시아인의 중간 빈도를 나타내고 있으나, 한국인에서는 8%로 매우 낮은 빈도를 나타내고 있다^{29,30,31}.

NAT2의 다형성의 특징 유전자 유형인 S/S 유형 및 slow acetylator 표현형 유형이 담배나 aromatic amine과 연관된 암종, 특히 방광암의 발생에 있어 개인적 유전적 감수성과 연관이 있음이 보고되고 있다. 직업적으로 aromatic amine에 노출되는 집단에서 slow acetylator 표현형 유형이 나타난 집단에 대해, aromatic amine의 노출을 차단함으로써 방광암의 발생을 예방할 수 있는 가능성이 제시되고 있다^{17,18,32}.

후두암에서 NAT2 표현형 유형 및 유전자 유형 다형성과 개인적 유전적 감수성에 대한 연구가 소수에서 보고되고 있다. Gonzalez 등¹⁴은 백인에서 slow acetylator 표현형 유형이 2배의 높은 상대적 위험도를 보이는 것으로 보고하고 있으며, Morita 등¹⁵은 일본인에서 NAT2 다형성과 후두암의 발암 과정과의 연관성은 유의성이 있으며, slow acetylator 유형이 rapid acetylator 유형보다 2.7배 높은 상대적 위험도를 보이는 것으로 보고하고 있다. 본 연구에서는 한국인 후두암에서 slow acetylator 표현형 유형은 유의한 상대적 위험도를 보이고 있지 않으며 이러한 차이점은 인종간에 NAT2 다형성에 대한 유형의 분포 차이와 식사 습관 등을 포함한 환경적 요소의 차이로 설명할 수 있다.

NAT2 효소와 발암 과정과의 연관성을 설명하는 기전으로는 두 가지가 제시되고 있는데 국소 및 전신 반응에서 일어나는 효소의 작용으로 서로 상반된 역할이 제시되고 있

다. 첫번째로는 전신 반응에서 일어나는 기전으로 폭로된 발암 물질은 체순환계에 흡수되어 phase I 대사와 phase II 대사에서 관여하는 효소의 활성화에 의해 활성도가 좌우되며, 이미 설명한 것처럼 phase II대사 효소인 NAT2 효소가 phase I 대사 효소로 활성화된 발암 물질을 해독화시킨다. 그러므로 NAT2의 slow acetylator 유형이 발암기전과 매우 연관성이 높은 것으로 설명이 가능하며, 방광암에서 slow acetylator 유형에서 상대적 위험도가 높은 것이 이런 기전으로 설명될 수 있다. 두번째로는 NAT2 효소의 국소 부위에서 일어나는 반응에 대한 기전으로 NAT2의 fast acetylator 유형과 연관이 있다는 연구 결과의 설명이 가능한 기전이기도 하다. Slow acetylator 유형보다 fast acetylator 유형에서는 국소 부위의 상피세포에서 구운 육류, 담배 등에 많이 함유되어 있는 것으로 알려진 arylamine을 더 효율적으로 acetylation시킨다. Arylamine은 acetylator에 의해 hydroxyl amine이나 acetoxyster 등으로 대사되며 이러한 물질은 electrophilic intermediate로써 DNA와 결합하여 돌연 변이를 유발하며 이러한 돌연 변이들이 특정 암 유전자나 암 억제 유전자에서 활성화를 일으키면 발암 기전을 촉진하게 된다^{33,34}. 본 연구에서는 Table 4, 5에서 보고된 것처럼 fast acetylator와 C2/C2 유형 그리고 fast acetylator와 Val/Val이 각각 약 2배의 상대적 위험도를 보인 것으로 나타났다. 이런 결과는 한국인에서는 직접적으로 두경부의 상피 세포에 발암 물질이 노출되어 일어나는 국소반응에서 NAT2 효소가 두경부암 발암 과정에 관여할 것으로 생각된다. 또한, 백인과의 식습관의 차이와 한국인에서 slow acetylator 유형의 매우 낮은 빈도 등이 slow acetylator 유형 보다는 rapid acetylator가 한국인 두경부암종 발생과 연관되어 있을 것으로 생각된다.

외부 및 내부로부터 폭로된 발암물질은 phase I 대사효소(CYPs)와 phase II 대사효소(NAT, GST)의 활성도에 의해 인체내에서 활성도가 결정되며 이론적으로 이러한 두 대사과정 효소의 다형성에 의한 유형을 조합할 때 유전적 감수성 결정은 더욱 유효할 것이며, 암 예방에 있어 상대적 위험도가 높은 집단을 예상할 수 있는 중요한 자료를 제공할 수 있을 것으로 생각된다^{2,35,36}. 지금까지 두경부암에서는 phase I 및 phase II 대사 효소에 대한 다형성의 유전자 유형 조합에 의한 상대적 위험도에 대한 연구는 보고되어 있지 않다. Table 3, 4, 5에서 후두암 환자에서 phase I (CYP1A1, CYP2E1) 및 phase II (NAT2) 대사 효소의 다형성 유형 조합에 의해 유전적 감수성을 분석하였다. 주목할 결과로서는 첫째 Val/Val와 C1/C1 조합이 Non-Val/Val와 C1/C1 조합에 비해 2.82배의 높은 상대적 위험도를 나타낸 것이다. 이러한 결과는 한국인 후두암 환자에서 Val/Val 및 C1/C1 유형이 가장 위험한 유전자 유형

이라는 것을 제시하는 것이다. 둘째로는 fast acetylator와 C2/C2 유형과 fast acetylator와 Val/Val이 각각 1.98배와 2.1배의 상대적 위험도를 보였다. 이러한 결과는 매우 특이한 유전자 유형 조합으로 이미 설명한 바와 같이 NAT2 유형 분포가 인종간, 특히 동서양 인종간에서 차이가 있고, 특히 한국인에서 slow acetylator가 매우 낮은 빈도(8%)를 보이는 것은 NAT2에 의한 국소 대사과정이 한국인 두경부암 발암 과정에 관여할 것으로 생각되며 향후 이에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서는 PCR-RFLP 방법을 이용하여 정상 한국인과 두경부암 환자에서 CYP1A1, CYP2E1 및 NAT2 효소 다형성에 대한 유전자 유형을 조사하였으며 한국인 두경부암 환자에서 각 유형간의 상대적 위험도를 조사하여 대사 효소의 유전적 감수성을 결정하였으며 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 정상 한국인에서 CYP1A1, CYP2E1 및 NAT2 효소 다형성의 분포는 다음과 같다.
CYP1A1 exon 7 다형성: Ile/Ile: Ile/Val: Val/Val = 59.3%: 36.3%: 4.4%
CYP2E1 Pst I 다형성: C1/C1: C1/C2: C2/C2 = 61.1%: 32.1%: 6.2%
NAT2 다형성: F/F: F/S: S/S = 43.4%: 48.7%: 8.0
2. CYP1A1의 exon 7 다형성에서는 Ile/Ile 유형에 비해 Val/Val 유형이 2.09배의 상대적 위험도를 보였으며, CYP2E1의 Pst I 다형성에서는 C1/C1 유형에 비해 C2/C2 유형이 1.37배의 상대적 위험도를 보였다.
3. NAT2 다형성 분석에서는 F/F 유형에 비해 F/S 및 S/S 유형이 각각 0.97 및 1.03배의 상대적 위험도를 보였다.
4. CYP1A1, CYP2E1 및 NAT2 효소 유형의 조합에서는 Val/Val과 C1/C1, C2/C2와 fast acetylator, Val/Val과 fast acetylator 유형 조합이 각각의 기준 유형 조합에 비해 2.82, 1.98, 2.1배의 상대적 위험도를 보였다.

이상의 결과들을 종합해 보면 Val/Val과 C1/C1, C2/C2와 fast acetylator, Val/Val과 fast acetylator 유형 조합이 한국인에서 두경부암 발생에 있어 유전적으로 감수성이 높은 집단으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Hulka BS: Epidemiological studies using biological markers: Issues for epidemiologists. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1: 13-19, 1991.
2. Perera FP: Environment and Cancer: Who are susceptible? *Science* 278: 1068-1073, 1997.
3. Perera FP, Mooney LA: The role of molecular epidemiology in cancer prevention. In DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA(eds): "Cancer Prevention." Philadelphia: J.B. Lippincott, 1-15, 1993.
4. Alexandrie A-K, Sundberg MI, Seidegard J, Tornling G, Rannug A: Genetic susceptibility to lung cancer with special emphasis on CYP1A1 and GSTM1: a study on host factors in relation to age at onset, gender and histological cancer types. *Carcinogenesis* 15: 1785-1790, 1994.
5. Hayashi S-I, Watanabe J, Nakachi K, Kawajiri K: Genetic linkage of lung cancer-associated MspI polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P450IA1 gene. *J Biochem* 110: 407-411, 1991(a).
6. Nakachi K, Imai K, Hayashi S-I, Watanabe J, Kawajiri K: Genetic susceptibility to squamous cell carcinoma of the lung in relation to cigarette smoking dose. *Cancer Res* 51: 5177-5180, 1991.
7. Nakachi K, Imai K, Hayashi S, Kawajiri K: Polymorphisms of the CYP1A1 and glutathione S-transferase genes associated with susceptibility to lung cancer in relation to cigarette dose in a Japanese population. *Cancer Res* 53: 2994-2999, 1993.
8. Nebert DW: Role of genetics and drug metabolism in human cancer risk. *Mut. Res.* 247: 267-281, 1991.
9. Board PJ: Biochemical genetics of glutathione S-transferase in man. *Am J Hum Genet* 33: 36-43, 1981.
10. Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K: Genetic polymorphisms in the 5' -flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *J Biochem* 100: 559-564, 1991(b).
11. Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Yoshii A, shinoda N, Watanabe J: Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P450IA1 gene. *FEBS Lett* 263: 131-133, 1990.
12. Kellermann G, Shaw CR, Luyten-Kellermann M: Aryl hydrocarbon hydroxylase inducibility and bronchogenic carcinoma. *New Engl J Med* 298: 934-937, 1973.
13. Kuori RE, McKinney CE, Slomiany DJ, Snodgrass DR, Wary NP, McLemore TL: Positive correlation between high aryl hydrocarbon hydroxylase activity and primary lung cancer as analysed in cryopreserved lymphocytes. *Cancer Res* 42: 5030-5037, 1982.
14. Gonzalez MV, Alvarez V, Pello MF, Men ndez MJ, Su rez C, Coto E: Genetic polymorphism of N-acetyltransferase-2, glutathione S-transferase-M1, and cytochromes P450IIE1 and P450IID6 in the susceptibility to head and neck cancer. *J Clin Pathol* 51: 294-298, 1998.
15. Morita S, Yano M, Tsujinaka T, Akiyama Y, Taniguchi M, Kaneko K, Miki H, Fujii T, Yoshino K, Kusuoka H, Monden M: Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer* 80: 685-688, 1999.
16. Park JY, Muscat JE, Ren Q, Schantz SP, Harwick RD, Stern JC, Pike V, Richie JP Jr, Lazarus P: CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms and oral cancer risk. *Cancer*

- Epidemiol Biomarkers Prev 6: 791-797, 1997.
17. Rannug A, Alexandrie A-K, Persson I, Ingelman-Sundberg M: Genetic polymorphism of cytochromes P450 1A1, 2D6 and 2E1: Regulation and toxicological significance. *JOEM* 37: 25-36, 1995.
 18. Raunio H, Husgafvel-Pursiainen K, Snttila S, Hietanen E, Hirvonen A, Pelkonen O: Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility—a review. *Gene* 159: 113-121, 1995.
 19. Perera FP: Molecular cancer epidemiology: A new tool in cancer prevention. *J Natl Cancer Inst* 78: 887-898, 1987.
 20. Schulte PA, Perera FP: Molecular epidemiology: Principles and Practices. New York: Academic Press, 1993.
 21. Gonzalez FJ: The molecular biology of the cytochrome P450s. *Pharmacol Rev* 40: 243-288, 1989.
 22. Idle JR: Is environmental carcinogenesis is modulated by host polymorphism? *Mutation Res* 247: 259-266, 1991.
 23. Seideg rd J, Pero RW, Markowitz MM, Roush G, Miller DG, Beattie EJ: Isoenzyme(s) of glutathione transferase (class Mu) as a marker for the susceptibility to lung cancer: a follow up study. *Carcinogenesis* 11: 33-36, 1990.
 24. Tefra T, Ryberg, Haugen A, Nebert DW, Skaug V, Br gger A, B rresen A-L: Human CYP1A1 (cytochrome P1450) gene: lack of association between the MspI restriction fragment length polymorphism and incidence of lung cancer in a Norwegian population. *Pharmacogenetics* 1: 20-25, 1991.
 25. Farker K, Lehmann MH, Kastner R, Hoffmann A, Janitzky V, Schubert J, Matz U, Hofmann W: CYP2E1 genotyping in renal cell/urothelial cancer patients in comparison with control populations. *Int J Clin Pharmacol Ther* 36: 463-468, 1998.
 26. Morita S, Yano M, Shiozaki H, Tsujinaka T, Ebisui C, Morimoto T, Kishibuti M, Fujita J, Ogawa A, Taniguchi M, Inoue M: CYP1A1, CYP2E1 and GSTM1 polymorphisms are not associated with susceptibility to squamous-cell carcinoma of the esophagus. *Int J Cancer* 71: 192-197, 1997.
 27. Lucas D, Menez C, Floch F, Gourlaouen Y, Sparfel O, Joannet I, Bodenez P, Jezequel J, Gouerou H, Berthou F, Bardou LG, Menez JF: Cytochromes P4502E1 and P4501A1 genotypes and susceptibility to cirrhosis or upper aerodigestive tract cancer in alcoholic Caucasians. *Alcohol Clin Exp Res* 20: 1033-1037, 1996
 28. Matthias C, Bockmuhl U, Jahnke V, Jones PW, Hayes JD, Aldersea J, Gilford J, Bailey L, Bath J, Worrall SF, Hand P, Fryer AA, Strange RC: Polymorphism in cytochrome P450 CYP2D6, CYP1A1, CYP2E1 and glutathione S-transferase, GSTM1, GSTM3, GSTT1 and susceptibility to tobacco-related cancers: studies in upper aerodigestive tract cancers. *Pharmacogenetics* 8: 91-100, 1998.
 29. Deguchi T, Mashimo M, Suzuki T: Correlation between acetylator phenotypes and genotypes of polymorphic arylamine N-acetyltransferase in human liver. *J Biol Chem* 265: 12757, 1990.
 30. Hickman D, Sim E: N-acetyltransferase polymorphism comparison of phenotype and genotype in humans. *Biochem Pharmacol* 42: 1007, 1991.
 31. Yu MC, Skipper PL, Taghizad K, Tannenbaum SR, Chan KK, Henderson BE, Ross RK : Acetylator phenotype, aminobiphenyl-hemoglobin adduct levels, and bladder cancer risk in white, black, and Asian men in Los Angeles, California. *J Natl Cancer Inst* 86: 712, 1994.
 32. Cartwright RA, Glashan RW, Rogers HJ, Ahmad RA, Barham-Hall D, Higgins E: Role of N-acetyltransferase phenotypes in bladder carcinogenesis: A pharmacogenetic epidemiological approach to bladder cancer. *Lancet* 2: 842-845, 1982.
 33. Grant DM: Molecular genetics of the N-acetyltransferases. *Pharmacogenetics* 3: 45-50, 1993.
 34. Hein DW, Rustan TD, Grant DM: Human liver polymorphic (NAT2) and monomorphic (NAT1) N-acetyltransferase isozymes catalyze metabolic activation of N-hydroxyarylamines and N-hydroxy-N-acetyl-arylamines proximate carcinogens. *FASEB J* 6: A1274, 1992.
 35. Kawajiri K, Watanabé J, Eguchi H, Hayashi S: Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and lung cancer susceptibility. *Pharmacogenetics* 5 Spec No: S70-S73, 1995.
 36. Mooney LA, Perera FP: Application of molecular epidemiology to lung cancer chemoprevention. *J Cellular Biochem* 25S: 63-68, 1996.
 37. Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Karjalainen A, Anttila S, Vainio H: Point-mutational MspI and Ile-Val Polymorphisms closely linked in the CYP1A1 gene: Lack of association with susceptibility to lung cancer in Finnish study population. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 1: 485-489, 1992.

저자연락처

우편번호 133-791
서울특별시 성동구 행당동 17번지
한양대학교 병원 치과
이 영 수

원고 접수일 2000년 4월 23일
게재 확정일 2000년 6월 02일

Reprint requests

Young-Soo Lee
Dept. of Dentistry, Hanyang University Hospital
#17 Haengdang-Dong, Seongdong-Ku, Seoul, 133-791, Korea
Tel. 82-2-2290-8671, 8675 Fax. 82-2-2290-8678

Paper received 23 april 2000
Paper accepted 02 june 2000