

## Genistein이 햄스터 협낭 구강암 모델에 미치는 암예방 효과

김영연 · 명 훈 · 김명진

서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

**Abstract****CHEMOPREVENTIVE EFFECT OF GENISTEIN IN HAMSTER BUCCAL POUCH CARCINOGENESIS**

Young-Youn Kim, Hoon Myoung, Myung-Jin Kim

*Department of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Seoul National University*

Recently, the consumption of soy products has been associated with low rates of hormone-dependent and hormone-independent cancers. Asians, who consume 20-50times more soy per capita than Americans, have lower incidence and death rates from breast and prostate cancer. Because soy contains the isoflavones genistein and daidzein (present as their glycosidic conjugates) at mg/g concentrations, it has been suggested that isoflavones might be acting as natural chemopreventive agents.

During the 1980s several groups of investigators carried out experiments to test the effectiveness of soy in the diet in animal models of cancer. These studies reported a protective effect of soy; none showed that soy increased cancer risk. Genistein was shown to inhibit the growth of a wide variety of tumor cell types in culture.

The purpose of this study was to evaluate the effects of genistein on the carcinogenesis induced by topical application of 0.5% 9, 10-dimethyl 1,2-benzanthracene (DMBA) on the hamster buccal pouch. 48 syrian hamsters were employed in this study, divided into experimental group and control. 24 animals (DMBA topical application group) had the right buccal pouch painted 3times weekly with 0.5% DMBA in mineral oil, 24 animals (genistein group) were supplied with 0.1mg genistein with DMBA topical application. 3 animals in the experimental group and control were sacrificed at serially each other week after experiments. Their buccal pouches were removed and routinely processed for microscopic examination.

The results were as follows:

1. In DMBA topical application and genistein group, they showed carcinogenesis as time goes by experimental stage.
2. Genistein group was retarded in carcinogenesis related to the acanthosis, hyperkeratosis, epithelial dysplasia.
3. p53 immunohistochemical study showed that the p53 protein of genistein group was less expressed than that of the control group.

Thus, it seems that genistein has chemopreventive effect on the carcinogenesis in the oral cavity, but further study is required to elucidate the anticancer mechanism of genistein.

**Key words** : Genistein, Chemoprevention, DMBA

**I. 서 론**

구강암은 여러 진단 기법의 발달과 다양한 치료 방법에도 불구하고 5년 생존율은 50%미만으로 일단 발병하게 되면 치명적이라고 할 수 있다. 따라서 다른 모든 질환과 마찬가지로 구강암에 있어서도 예방이 중요하다고 할 것이다.

이론적으로 암 발생의 기시 단계를 막거나, 증진, 진행 단계를 막음으로써 암 발생을 예방할 수 있으며, 이런 작용을 할 수 있는 물질을 이용한 암 예방을 암화학예방요법(chemoprevention)이라

고 한다<sup>1)</sup>. 이런 작용을 할 수 있는 물질로는 retinoid(natural and synthetic analogues of vitamin A), plant phenolics(green and black teas, flavonoids, ellagic acid), 호르몬 길항제(tamoxifen, finasteride), polyamine 생합성 억제제(difluoromethylornithine), 항기생충제(oltipraz, quinacrine), 비스테로이드성 진통제(aspirin, ibuprofen, sulindac) 등이 알려져 있다<sup>2)</sup>.

식생활과 암 발생에 관한 여러 역학 조사 결과 콩을 풍부히 섭취하는 동양인들(20~80mg/day)은 서양인(1~3mg/day)에 비해 유방암, 전립선암에 의한 사망률이 현저히 낮음이 보고되었다<sup>2,3)</sup>. 또한 미국으로 이주한 아시아인들이 콩 섭취가 줄어들면 이런 종류의 암이 발생할 가능성이 증가하는 것으로 알려져 있다. 따라서 콩의 생리활성 물질에 대한 관심이 급격히 높아지고 있다. 그 중에서 에스트로젠과 유사한 구조를 가진 genistein의 존재가 콩에서 규명되었고, 이 물질이 다양한 생리 활성을 가지고 있음이 밝혀 졌다<sup>4)</sup>.

**김 명 진**

110-744 종로구 연건동 28-2

서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

**Myung-Jin Kim**

Dept. of OMFS, School of Dentistry, Seoul National Univ.

28-2 Yeongun-Dong, Chongro-Gu, Seoul, 110-744, Korea

Tel: 82-2-760-2631 Fax: 82-2-766-4948

Genistein은 여러 동물 실험 모델에서 암예방효과가 있는 것으로 밝혀졌다<sup>5-10)</sup>. 또한 다양한 암 세포주에서도 억제 효과가 있는 것으로 밝혀져 있다<sup>11,12)</sup>. 본 연구는 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene(DMBA)유도 햄스터 협낭 구강암 모델에서 genistein이 구강암 발생과정에 미치는 효과를 분석하고자 계획되었다.

## II. 재료 및 방법

실험에 사용된 동물은 체중 100gm 내외의 생후 4주에서 6주 사이의 햄스터를 사용하였으며 물과 사료에 자유롭게 접근할 수 있는 동일 조건하에서 사육되었다. 발암물질은 DMBA(Sigma Chemical Co., St. Luise, USA)를 0.5% 농도로 mineral oil(Sigma Chemical Co., St. Luise, USA)에 용해 시켰다. 이렇게 만들어진 용액을 균일한 농도를 유지할 수 있도록 주의하면서 우측 협낭 점막에 1주일에 3회 면봉으로 도포하였다. 실험군(n=24)은 DMBA를 도포하면서 genistein (Sigma Chemical Co., St. Luise, USA)을 복용시켰다. genistein 20mg을 100% 에탄올 10ml에 녹인 후 증류수로 희석하여 에탄올은 5%농도가 되도록 하였으며 이렇게 만들어진 용액 1ml(genistein 0.1mg)를 매일 위관을 통해 경구 복용시켰다.

각 군의 실험동물에서는 실험 시작 2주 쯤부터 2주 간격으로 16주까지 무작위로 3마리씩 희생시키고 협낭을 적출한 후 즉시 10% 중성 포르말린 용액에 고정시켜 통법에 따라 탈수하고 파라핀에 포매한 후 4~5micro 두께의 파라핀 절편을 제작하여 Hematoxilin-Eosin(H&E) 중염색을 시행하여 대조군과 실험군에서 광학현미경 관찰을 시행하였다.

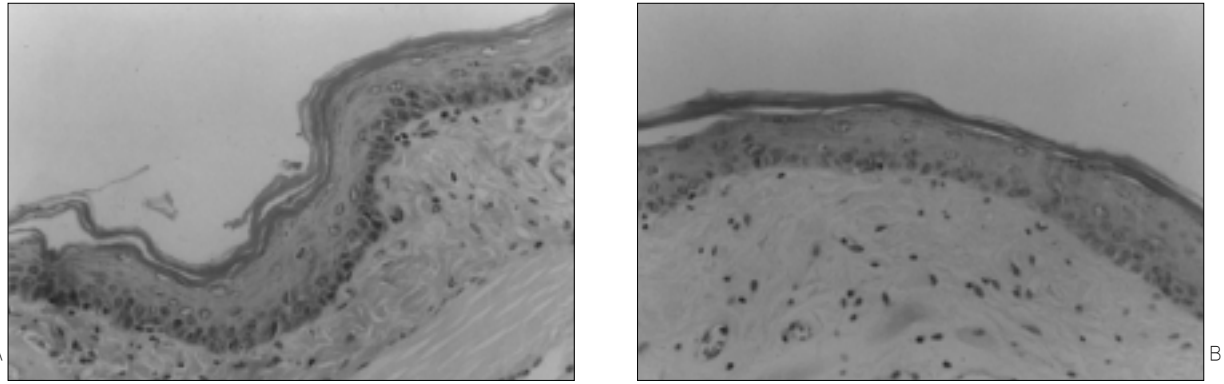
또 p53 면역조직화학 염색을 위해 박절편을 xylene으로 탈파라핀하고 각 단계의 알콜을 거쳐 함수시켰다. 증류수로 3회 세척한 후 전처치로 10mM sodium citrate buffer 용액에 담근 상태에서 microwave로 5분씩 2회 처리하였다. 내인성 peroxidase의 활성을 억제시키기 위하여 3% 과산화수소수 용액으로 5분간 처리한 후 증류수와 PBS로 세척하였다. DAKO LSAB kit(DAKO, carpinteria, CA)의 blocking 시약으로 30분간 부란시켜 비특이적 IgG 결합을 방지하였다. 그리고, 상온에서 일차 항체 DO-7(Novocastra, Newcastle, United Kingdom)로 60분이상 부란한 뒤 PBS로 3회 세척하였고, biotin이 표지된 이차 항체로 30분간 부란한 후 PBS로 3회 세척하였다. peroxidase가 표지된 Streptavidin으로 30분간 부란시키고 PBS로 충분히 세척하였다. 3,3'-diaminobenzidine(DAB)으로 5분간 발색시킨 후 증류수로 충분히 세척하였다. Meyer's hematoxylin으로 대조염색한 후 Permount로 봉입하였다. 각 주의 시편에서 3군데 이상의 대표부위를 광학현미경으로 400배 사진 촬영하여 상피세포층에서 전체 세포수 100개당 p53이 염색된 세포수를 계산하였다.

## III. 결 과

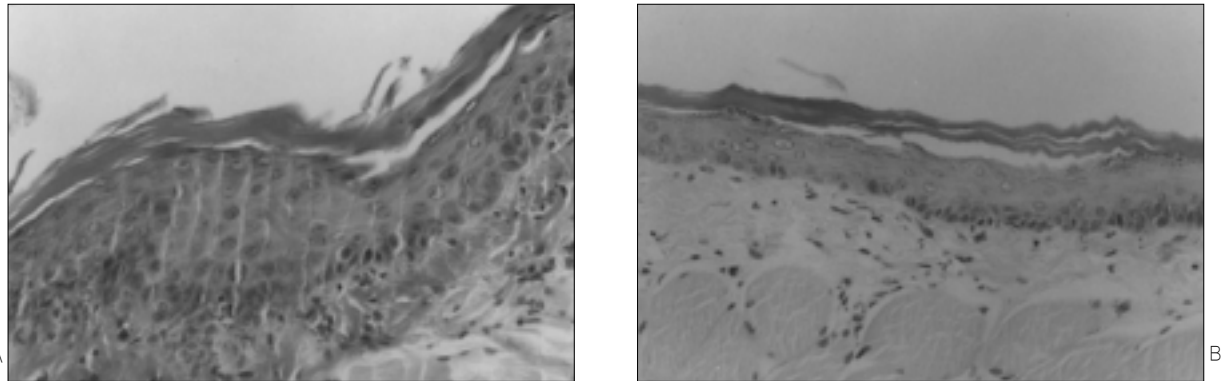
### 1. 조직병리학적 소견

대조군 2주군에서는 미약한 염증 세포의 출현이 보였고 경미하게 각화층이 두꺼워져 있었다. 실험군 2주군은 대조군과 마찬가지로 각화층이 두꺼워져 있었다. 대조군 4주군은 각화층이 더욱 두꺼워지고 극세포층을 보였다(Fig. 1A). 실험군 4주군은 대조군과 마찬가지로 각화층이 두꺼워지고 극세포층을 보이기 시작하였다(Fig. 1B). 대조군 6주군에서는 극세포층이 더욱 심해지고 기저세포층에서는 다형성증, 농염상이 나타났다. 실험군 6주군은 실험군 4주와 유사하게 과각화증이 관찰되었으며 극세포층이 증가하였다. 대조군 8주군은 각화층이 더욱 두꺼워지고 기저세포층의 핵/세포질 비율이 커지며 경도의 상피이형성 소견을 보이기 시작하였다(Fig. 2A). 실험군 8주군은 극세포층, 과각화증과 일부 세포들의 각화가 관찰되었다. 또한 기저세포들은 농염되고 다소 배열이 불규칙하였으나 대조군에 비해 미약하였다. 또 대조군에서 보이던 상피 이형성의 소견은 아직 보이지 않았다(Fig. 2B). 대조군 10주군은 상피적하부에서 염증세포들의 침윤이 심해지고 대체로 이형성의 소견이 뚜렷해지며 중등도의 상피 이형성증 소견을 보이기 시작하였다(Fig. 3A). 또 기저상피막은 부분적인 파괴로 결합조직내 상피도 형성을 보였다. 실험군 10주군은 상피의 비후 및 과각화가 관찰되고 상피세포들은 때때로 각화를 보이며 기저막은 다소 파괴상을 보이거나 실험군 8주와 유사 소견이었으며 이형성 소견은 대조군에 비해 미약하였다(Fig. 3B). 대조군 12주군은 상피층 내 불규칙한 이형성 세포들의 배열과 더욱 커진 핵/세포질 비율 및 유사 분열상도 관찰되었고 상피 이형성은 더욱 심해졌다(Fig. 4A). 실험군 12주군은 실험군 10주군과 유사한 이형성의 소견을 보였으며 대조군 12주군에 비해 미약한 이형성의 소견을 보였다(Fig. 4B). 대조군 14주군은 상피층에서는 상피 내암의 소견과 일부에서는 하부결체조직으로 침투하는 분화도가 양호한 이형성 세포, 각질 형성 등 편평상피암의 소견도 보였다(Fig. 5A). 실험군 14주군은 대부분이 이형성의 소견을 보이거나 부분적으로는 이형성 세포들의 불규칙한 배열상과 가끔 유사분열이 보이는 상피내암의 소견도 관찰되었다(Fig. 5B). 대조군 16주군은 분화도가 좋은 편평상피세포암의 소견과 14주군보다 심한 하부 결체조직으로의 침투상과 주변에 심한 염증 세포의 소견을 보였다(Fig. 6A). 실험군 16주군은 분화가 잘 된 편평세포암종의 소견을 보였으며 결합조직내 상피도는 분화도가 높은 상피세포로 이루어지고 암진주 형성을 나타내었다(Fig. 6B).

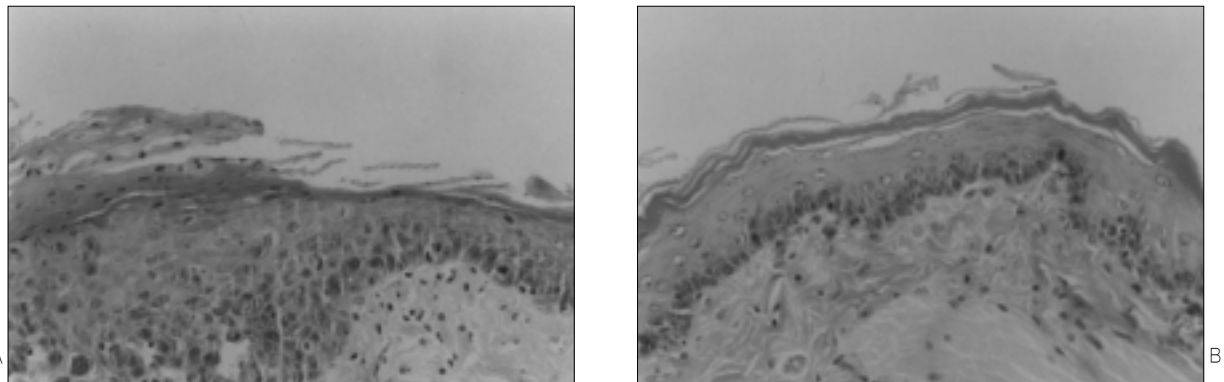
이상의 결과를 과각화증, 극세포증, 유사분열상, 세포핵 다형성증(nuclear pleomorphism)등으로 실험군과 대조군을 비교하여 분석하면 표와같다(Table 1).



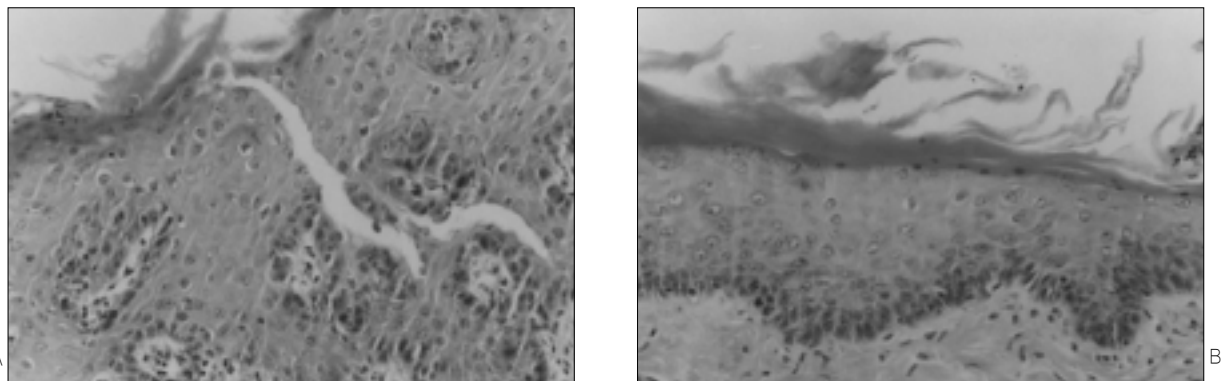
**Fig. 1.** Photomicrography of control group 4 weeks( $\times 200$ , H&E)(A) and experimental group 4 weeks( $\times 200$ , H&E)(B). There were slight acanthosis and hyperkeratosis in the epithelium(A, B).



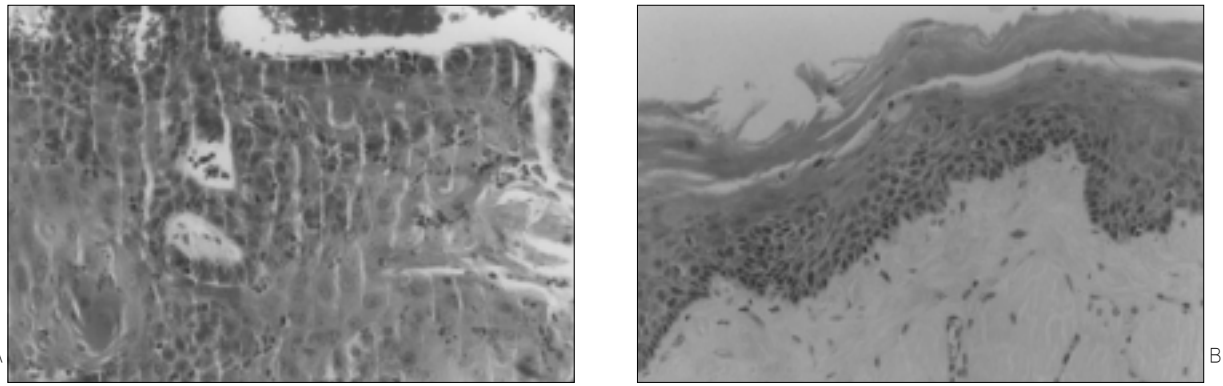
**Fig. 2.** Photomicrography of control group 8 weeks( $\times 200$ , H&E)(A) and experimental group 8 weeks( $\times 200$ , H&E)(B). There was acanthosis in the epithelium(A, B). The acanthosis in the experimental group is weaker than that of the control group. Slight epithelial dysplasia was shown in the control group(A).



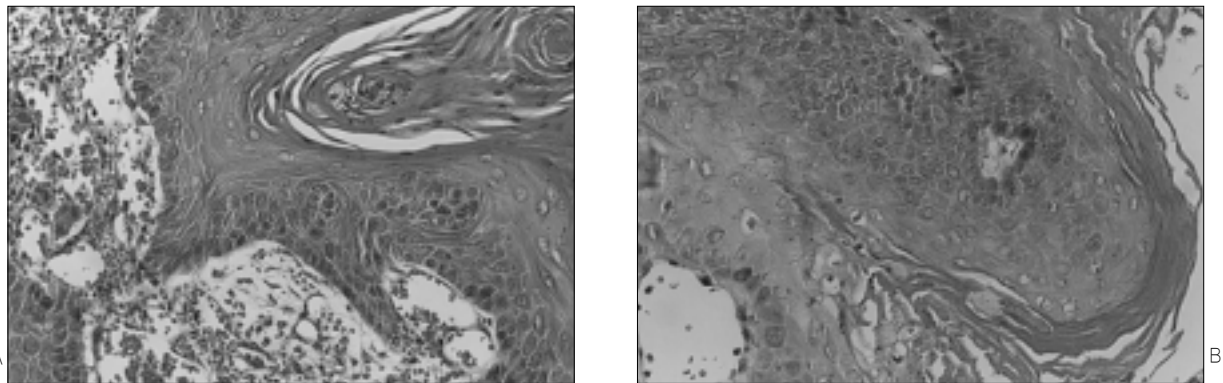
**Fig. 3.** Photomicrography of control group 10 weeks( $\times 200$ , H&E)(A) and experimental group 10 weeks( $\times 200$ , H&E)(B). Epithelial dysplasia was shown in the control group(A) and experimental group(B). The epithelial dysplasia in the control group was more severe than that of the experimental group.



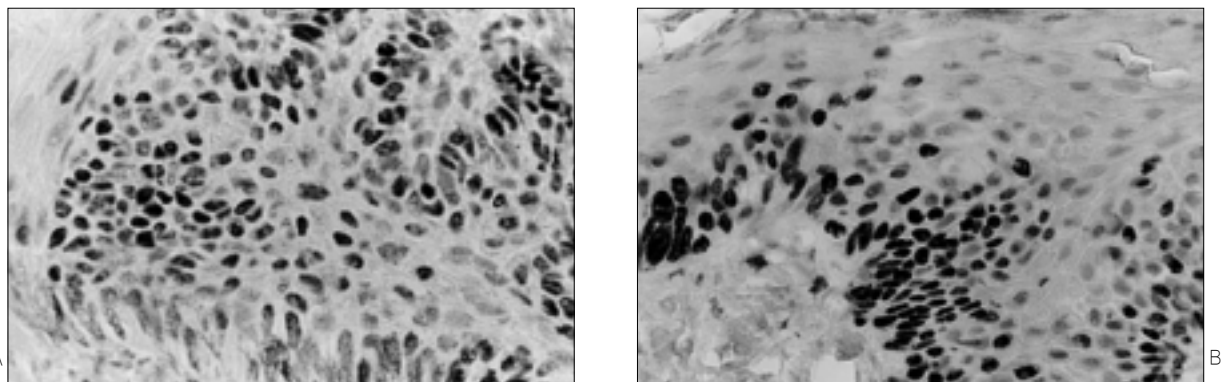
**Fig. 4.** Photomicrography of control group 12 weeks( $\times 200$ , H&E)(A) and experimental group 12 weeks( $\times 200$ , H&E)(B). The control group showed mitotic figures and basal hyperplasia(A). The experimental group showed mild epithelial dysplasia(B).



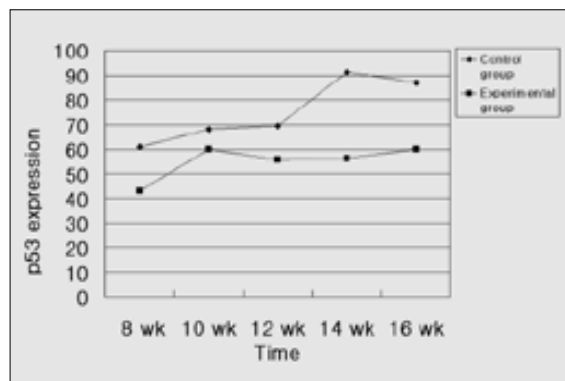
**Fig. 5.** Photomicrography of control group 14 weeks( $\times 200$ , H&E)(A) and experimental group 14 weeks( $\times 200$ , H&E)(B). The control group showed severe epithelial dysplasia or carcinoma in situ(A). The experimental group showed moderate epithelial dysplasia(B).



**Fig. 6.** Photomicrography of control group 16 weeks( $\times 200$ , H&E)(A) and experimental group 16 weeks( $\times 200$ , H&E)(B). The control group showed invasion to the connective tissue(A). The experimental group showed the features of well differentiated carcinoma.



**Fig. 7.** p53 expression of control group 14 weeks( $\times 400$ )(A) and experimental group 14 weeks( $\times 400$ )(B). Mutant p53 expression in the epithelial layer was shown.



**Fig. 8.** p53 expression during hamster buccal pouch carcinogenesis.

**Table 1.** Summary of histopathologic findings during hamster buccal pouch carcinogenesis

	Control group								Experimental group							
	2w	4w	6w	8w	10w	12w	14w	16w	2w	4w	6w	8w	10w	12w	14w	16w
Hyperkeratosis	±	+	+	++	++	+++	+++	+++	±	+	+	++	++	++	+++	+++
Acanthosis	-	±	+	+	++	+++	+++	+++	-	±	+	+	+	++	+++	+++
Mitotic figures	-	-	-	+	+	+++	+++	+++	-	-	-	-	+	+	++	+++
Nuclear pleomorphism	-	-	±	+	+	++	+++	+++	-	-	-	-	+	+	++	+++

w : week

- : negative, ±: trace, +: mild, ++: moderate +++: marked

## 2. p53 면역조직화학염색

실험군과 대조군의 상피세포층에서 상피 이형성이 나타난 8주 이후부터 전체 세포수 100개당 p53이 염색된 세포수를 계산하였다. 전반적으로 대조군보다 실험군에서 p53의 발현이 적게 나타났다. Mann-Whitney U 검정에서 8주, 10주, 12주군은 통계적 유의성이 없었지만, 14주(Fig. 7A, B), 16주에서는 p value 0.05로 유의성 있는 것으로 나타났다(Fig. 8).

## IV. 총괄 및 고안

구강암에서 주로 연구된 암화학예방요법으로 주로 연구된 약제로는 레티노이드, beta carotene, vitamin E 등이 있다. 그 중에서도 레티노이드는 약 2,000종 이상이 알려져 있으며 활발하게 연구되고 있고 임상적으로도 암예방효과를 얻었다는 보고가 있다<sup>13</sup>. 그러나 독성이 심한 것이 단점이며, 레티노이드 치료요법을 끝낸 후 3~4개월 내 50%의 재발율이 있었다<sup>14</sup>. 국내에서는 아직 임상 실험 단계까지 진행된 것은 없으나 동물 실험을 이용하여 홍삼, 토코페롤<sup>15</sup>, 비타민 C, 비타민 A<sup>16</sup> 등의 구강암 예방효과가 연구된 바 있다.

DMBA(Dimethyl-1,2-benzanthracene)는 polycyclic aromatic hydrocarbon으로 그 대사과정중에 핵산의 공유결합구조의 변형을 일으킴으로써 강력한 발암 효과를 나타낸다<sup>17</sup>. Everson은 실험적인 암발생은 햄스터 협낭이나 설에 DMBA를, 백서의 구개에 4-nitroquinoline 1-oxide(4NQO)를 이용하는 것이 가장 발생율이 높다고 하였다<sup>18</sup>. 햄스터 협낭의 DMBA 발암 모델에 관련된 많은 연구에서 이미 보고<sup>18-21</sup>된 바와 같이 본 실험의 발암과정에서 보이는 조직학적 소견은 기존의 연구와 일치하는 것이었다. 즉 초기의 기저막 비후 등의 염증소견을 거쳐 상피 이형성의 조직학적 특징을 보이며 이어 12주에서는 이형 세포의 출현이 있어 상피 내암의 소견을 보이게 되고 DMBA 도포 후 16주에는 개체별로 약간의 차이가 있으나 유두상의 증식이 있는 편평세포암종의 형성에 이르게 된다. 이 모델은 시간적 진행에 따라 발암 과정을 잘 보이기 때문에 발암과정에 대한 연구 뿐만 아니라 암화학예방요법에 사용되는 약제의 치료 효과를 보기 위한 동물 모델로도 유용하다.

많은 연구자들이 실험 동물 발암 모델-유방암, 간암, 폐암, 방광

암, 피부암 등-에서 콩 또는 콩 추출 물질의 암화학예방요법에 대해서 연구했다<sup>5-10</sup>. 문헌에 따르면 26개 연구 사례 중 17개 연구에서 콩이 예방적 효과를 보였다<sup>22</sup>. 콩이 암 유발 위험을 증가시킨다는 보고는 없었다.

Mokhtar 등은 간암을 일으키는 nitrosamine의 전구물질인 nitrite와 dibutylamine을 Swiss albino mice에 복용 시켰을 때 콩을 같이 10~12개월 복용시킨 군은 그렇지 않은 군에 비해 조직학적으로 괴사 및 이형성의 소견이 현저히 감소하였으며 간암 발생율도 감소하였음을 보였다<sup>6</sup>. 이 결과는 Fitzsimons 등의 실험에서도 비슷하게 나타났다<sup>23</sup>. 이들도 발암 물질로 dibutylamine을 이용하였고 콩을 복용시킨 군과 복용시키지 않은 군을 비교하였는데 6개월 쯤 콩을 복용한 군은 간세포(liver cell) 주위에 림프구 침윤이 있었지만 세포 괴사나 종양의 소견은 관찰되지 않았으며 전자현미경 소견에서도 정상 소견을 보였다. 그러나 콩을 복용시키지 않은 군은 이형성의 소견이 관찰되었으며 전자현미경 소견에서도 미토콘드리아의 증창과 내형질 세망(endoplasmic reticulum)의 이상 소견이 관찰되었다. Baggott 등은 DMBA로 유방암을 유도할 때 miso(일본식 된장)를 복용시킨 군은 그렇지 않은 군에 비해 종양의 발생이 지연되었으며 악성 종양보다 양성 종양이 발생하는 경향이 있다고 하였다<sup>24</sup>. 이상의 실험 결과들은 본 실험의 결과와 상피 이형성 및 종양의 발생이 지연된다는 점에 있어서는 일치하는 것이다. 차이점은 이상의 실험들은 콩의 단일 추출물이 아니라 콩을 복용시켰거나, 콩으로 만든 발효식품을 복용시켰다는 점이며 본 실험에서는 genistein이라는 콩 추출 성분을 복용시켰다는 점이다.

Genistein은 콩에 풍부하게 함유되어 있는 이소플라본(isoflavone)의 일종이다. genistein에 관련된 다양한 생물학적 활성들은 항산화(antioxidant)와 항염증작용<sup>25</sup>, phenolic phytoestrogen activity<sup>26</sup>, ornithine decarboxylase의 억제<sup>27</sup>, prostaglandin synthetase의 억제<sup>28</sup>, tyrosine kinase활성의 억제<sup>29</sup>, 혈관생성 작용의 억제<sup>30</sup> 등이다.

Akiyama 등은 1987년 genistein이 특이적으로 상피 성장 인자의 tyrosine kinase의 효과를 억제한다는 사실을 체외 실험을 통해 밝혔다<sup>29</sup>. tyrosine kinase는 상피성장인자수용체(epidermal growth factor receptor), 인슐린 수용체(insulin receptor), 신경성장인자수용체(nerve growth factor receptor)등에 존재하는 부분으로 세포 내부에서 신호 전달에 있어서 중요한 역할을 담당한다<sup>31</sup>. 이러한

성장 인자들이 세포막에 있는 수용체에 결합하는 것은 세포 성장과 분화에 아주 중요하다. 일단 결합되면 이러한 수용체들은 단백질 인산화, 효소 활성화, 2차 신호전달 물질의 생성, 세포핵 내부의 유전자의 전사(transcription) 등과 같은 복잡한 세포질 내 또는 핵 내 변화를 일으키게 된다. 특히 수용체 내부에 tyrosine kinase 활성이 있는 수용체들은 세포분열에 관련된 신호를 전달하는데 절대적으로 필요하다<sup>32</sup>.

따라서 genistein이 세포 성장을 저해하는 효과를 보이는 것은 여러 성장인자 특히 상피성장인자의 tyrosine kinase 활성을 억제하기 때문이라는 가설을 세울 수 있다<sup>33</sup>. 그러나 Peterson 등은 후에 genistein이 체내에서 도달할 수 있는 생리적 농도 (18.5micro mol/L 또는 5micro g/mL)에서는 tyrosine kinase의 활성을 효과적으로 억제할 수 없다고 하였으며 보다 많은 연구가 필요하다고 하였다<sup>34</sup>.

Fotsis 등은 이소플라본의 일종인 genistein이 혈관내피세포 증식과 혈관생성을 억제한다고 하였다<sup>35</sup>. 그들은 합성된 genistein이 50microM 농도에서 가장 효과적으로 뇌 모세혈관 세포를 억제한다고 하였다. 또한 collagen gel과 BME cell을 이용한 체외 실험 모델에서 genistein이 혈관생성을 억제한다고 하였다.

활성 산소의 발생, 특히 면역 반응에서 활성화된 세포에 의한 활성 산소의 발생은 암발생에서 중요한 역할을 하는 것으로 받아들여지고 있다. 수십년 동안 genistein은 식품산업에서 화학적 항산화제(chemical antioxidant)로 쓰여왔지만<sup>36</sup> 최근에 genistein이 종양 세포와 면역 세포에 의한 활성 산소의 생성을 감소시킬 수 있음이 밝혀졌다. Genistein은 agonist에 의해 유발된 활성 산소의 생성을 직접적으로 저해할 수도 있고 고농도의 활성 산소를 유발시키는 조건을 억제할 수도 있다<sup>36</sup>. 이러한 결과들은 genistein의 항암 효과가 일부는 항산화제 작용에 의한 것임을 뒷받침한다.

대표적인 종양억제 유전자인 p53은 DNA 손상에 반응하여 세포증식의 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으나, 유전자에 돌연변이가 일어나게 되면 오히려 종양유전자로서의 잠재력을 가지게 된다<sup>37</sup>. 폐, 유방, 대장, 식도, 피부 등의 성인 암종의 약 절반 이상에서 p53 유전자 변이가 보고되었고, 이러한 변이는 인체 암종의 가장 공통적이고 흔한 변화라고 간주되고 있다<sup>38,39</sup>. p53 종양억제유전자의 산물인 정상형의 p53 단백질은 정상세포나 조직에서 미량만이 존재하나, 변이된 p53유전자의 산물인 변이형의 p53단백질은 종양세포나 병소에서 고농도로 나타난다<sup>38</sup>. 이러한 차이는 전환된 세포에서의 p53 단백질의 안정도의 차이에서 오는데, 즉 정상세포 조직의 p53 단백질은 6-20분 정도의 매우 짧은 반감기를 가지는 반면, 변이된 p53단백질은 6-8시간 정도의 긴 반감기를 가진다<sup>40</sup>. 인간의 편평상피세포암 뿐만 아니라, 햄스터 협낭 구강암 모델에서도 p53 단백질의 변이가 발암 단계의 초기 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>41</sup>. 본 연구에서는 p53 단백질의 정상형과 돌연변이형에 모두 반응하는 항체를 사용하였으나, 주로 오래 지속되는 돌연변이형의 단백질이 주로 인지되었으리라 사료된다. 본 실험에서는 전반적으로 대조군에 비해 실험군에서 p53의 발현이 적게 나타났는데, 이 사실은 실험군의 예후가 우수하다는 사실을 뒷받침한다.

Genistein과 p53의 발현에 대해서는 몇 가지 세포주에서 연구되었는데 아직 확립된 견해는 없다. Constantinou 등은 genistein이 인간 유방암 세포주인 MCF-7에서 apoptosis를 촉진시키는데, genistein이 정상 p53 단백질을 안정화시키는 역할을 하기 때문이라고 하였다<sup>42</sup>. 또 다른 유방암 세포주인 MDA-MB-231에서는 genistein이 apoptosis를 일으키나 그 경로는 p53과는 무관하고 Bax 와 p21WAF1유전자와 관련이 있을 것이라고 하였다<sup>43</sup>. p53 유전자의 양이 다른 여러 악성 흑색종 세포주에서는 p53 유전자의 양이 많을수록 genistein의 성장 억제 작용이 적게 나타나는 것으로 보고되었다<sup>44</sup>. Genistein과 p53 발현의 연관성에 대해서는 보다 많은 연구가 필요하리라 사료된다.

1993년 Kennedy 등은 DMBA 유도 햄스터 협낭암 모델에서 콩 추출물의 일종인 Bowman-Birk inhibitor가 구강암을 억제할 수 있다는 가능성을 보였다<sup>45</sup>. Bowman-Birk inhibitor는 protease inhibitor의 일종으로 콩에서 다량 발견된다. 다른 콩 추출 물질이 구강암에 관련되어 항암예방효과를 보인다는 보고는 아직까지 없었으며 genistein도 구강암에서 연구된 적은 없었다.

본 연구에서는 genistein이 구강암 발생에 있어 광학현미경 관찰 결과 과각화증, 극세포증, 상피 이형성증 등에서 발암과정을 지연시키는 양상을 보였으나 발암과정 자체를 완전히 차단하지는 못하였다. 향후 연구에서는 콩 섭취와 구강암 등의 상관관계에 대한 역학 조사 및 그 자세한 기전에 대한 분자생물학적 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## V. 결 론

콩 추출물인 genistein이 구강암 발생과정에 미치는 영향을 연구하고자 DMBA로 구강암을 유발한 뒤 genistein 투여군과 비투여군으로 나누어 시기별로 협낭 조직을 채득하여 조직 슬라이드를 만들어 관찰한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. DMBA를 도포한 대조군과 실험군 모두에서 시간 경과에 따른 단계적 발암 양상을 보였다.
2. 조직 염색 결과 genistein 투여군은 투여하지 않은 군에 비해 과각화증, 극세포증, 상피이형성증 등에서 발암 과정이 지연되는 양상을 보였다.
3. p53 면역조직화학염색 결과 전반적으로 genistein 투여군이 투여하지 않은 군에 비해 p53의 발현이 적게 나타났다.

이상의 결과로 genistein이 구강암에서도 암화학예방 효과를 다소 보이는 것으로 관찰되나 그 자세한 기전에 대해서는 보다 많은 분자생물학적 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. Boone CW, Kelloff GJ, Malone WE : Identification of candidate cancer chemopreventive agents and their evaluation in animal models and human clinical trials:a review. *Cancer Res* 50:2-9, 1990.
2. Messina M, Barnes S : The role of soy products in reducing risks of certain cancers. *J Natl Cancer Inst* 83:541-546, 1991.
3. Messina M, Persky V, Setchell KDR, Barnes S : Soy intake and cancer risk:a review of the in vitro and in vivo data. *Nutr Cancer*

- 21:113-131, 1994.
4. Steele VE, Pereira MA, Sigman CC, Kelloff GJ : Cancer chemoprevention agent development strategies for genistein. *J Nutr* 125:713S-716S, 1995.
  5. Sharma OP, Adlercreutz H, Strandberg JD, Zirkin BR, Coffey DS : Soy of dietary source plays a preventive role against the pathogenesis of prostatitis in rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43:557-564, 1992.
  6. Mokhtar NM, El-Asser AA, El-Bolkainy MN, Ibrahim HA, El-din NB, Moharram NZ : Effect of soybean feeding on experimental carcinogenesis-III. Carcinogenicity of nitrite and dibutylamine in mice: a histopathological study. *Eur J Cancer Clin Oncol* 24:403-411, 1988.
  7. Helms JR, Gallaher JJ : The effect of dietary soy protein isolate and genistein on the development of preneoplastic lesions (aberrant crypts) in rats. *J Nutr* 125:802S(abs.), 1995.
  8. Makela S, Pylkkanen L, Santti R, Adlercreutz H : Effects of foods on the immune and hormonal systems, University of Zurich and Swiss Federal Institute of Technology, Switzerland, 1991, P.135-139.
  9. Troll W, Wiesner R, Belman S, Shellabarger CJ : Inhibition of carcinogenesis by feeding diets containing soybeans. *Proc Am Assoc Cancer Res* 20:265(abs), 1979.
  10. Kim JP, Park JG, Lee MD, Han MD, Park ST, Lee BH, Jung SE : Co-carcinogenic effects of several Korean foods on gastric cancer induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats. *Jap J Surg* 15:427-437, 1985.
  11. Shao ZM, Wu J, Shen ZZ, Barsky SH : Genistein exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 58:4851-4857, 1998.
  12. Kuo SM. Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Lett* 110:41-48, 1996.
  13. De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA : Retinoid chemoprevention of upper aerodigestive tract carcinogenesis. Philadelphia, JB Lippincott, 1992, P. 93-109.
  14. Hong WK, Endicott J, Itri LM, et al : 13-cis-retinoic acid in the treatment of oral leukoplakia. *N Engl J Med* 315:1501-1505, 1986.
  15. 정세용, 이의웅 : DMBA유도 햄스터 협낭암에서 홍삼 및 Tocopherol의 항암효과에 대한 면역조직화학적 연구. *대한구강악안면외과학회지* 18:29-38, 1992.
  16. 김일규 : 비타민 C 및 비타민 A가 햄스터협점막의 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA) 유도 구강암에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. *대한구강악안면외과학회지* 12: 93-117, 1986.
  17. Bizub D, Wood AW, Shalka AM : Mutagenesis of the Ha-ras oncogene in mouse skin tumors induced by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:6048-6052, 1986.
  18. Everson JW : Animal models of intraoral chemical carcinogenesis. A review. *J Oral Path* 10:129-146, 1981.
  19. Odokoya O, Shklar G : Initiation and promotion in experimental oral carcinogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 58:315-320, 1984.
  20. Wong DTW, Biswas DK : Expression of c-erbB proto-oncogene during DMBA-induced tumorigenesis in hamster cheek pouch. *Oncogene* 2:67-72, 1987.
  21. Gimenez-Conti IB, Shin DM, Bianchi AB, et al : Changes in keratin expression during DMBA induced hamster cheek pouch carcinogenesis. *Cancer Res* 50:4441-4445, 1990.
  22. Barnes S : Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. *J Nutr* 125:777S-783S, 1995.
  23. Fitzsimons JTR, Orson NV, El-Aaser AA : Effects of soybean and ascorbic acid on experimental carcinogenesis. *Comp Biochem Physiol* 93:285-290, 1989.
  24. Baggott JE, Ha T, Vaughn WH, Juliana MM, et al : Effect of miso(Japanese soybean paste) and NaCl on DMBA-induced rat mammary tumors. *Nutr Cancer* 14:103-109, 1990.
  25. Wei H, Wei L, Frenkel K, Bowens R, Barnes S : Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation in vitro and in vivo by genistein. *Nutr Cancer* 20:1-12, 1993.
  26. Mc-Lachlan JA : Estrogens in the environment. New York, Elsevier Science Publishing Co. Inc., 1985, P.60-85.
  27. Majumdar APN : Role of tyrosine kinases in gastrin induction of ornithine decarboxylase in colonic mucosa. *Am J Physiol* 259:G626-630, 1990.
  28. Coyne DW, Morrison AR : Effect of the tyrosine kinase inhibitor genistein on interleukin-1 stimulated PGE2 production in sesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 173:71-74, 1990.
  29. Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe SI, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y : Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* 262:5592-5595, 1987.
  30. Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, Hase T, Montesano R, Schweigerer L : Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and in vitro angiogenesis. *J Nutr* 125(3 Suppl):790S, 1995.
  31. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, et al : Molecular biology of the cell, 3rd ed. Garland Publishing, Inc, 1994, P.759-770.
  32. Cantley LC, Auger KR, Carpenter C, et al : Oncogenes and signal transduction. *Cell* 64:281-302, 1993.
  33. Peterson TG, Barnes S : Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cells: independence from estrogen receptors and the multi-drug resistance gene. *Biochem Biophys Res Commun* 179:661-667, 1991.
  34. Peterson TG, Barnes S : Isoflavones inhibit the growth of human prostate cancer cell lines without inhibiting epidermal growth factor receptor autophosphorylation. *Prostate* 22:335-345, 1993.
  35. Hammerschmidt PA, Prat DE : Phenolic antioxidants of dried soybeans. *J Food Sci* 43:556-559, 1978.
  36. Akimura K, Utsumi T, Sato EF, Klostergaard J, Inoue M, Utsumi K : Role of tyrosyl phosphorylation in neutrophil priming by tumor necrosis factor-alpha and granulocyte colony stimulating factor. *Arch Biochem Biophys* 298:703-709, 1992.
  37. Levine AJ, Memard J, Finlay CA : The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 351:453-456, 1991.
  38. Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL : Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Cancer* 335:675-679, 1990.
  39. Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, et al : A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10124-10128, 1991.
  40. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC : p53 mutations in human cancers. *Science* 253:49-53, 1991.
  41. Gimenez-Conti IB, LaBate M, Liu F, Osterndorff E : p53 alterations in chemically induced hamster cheek-pouch lesions. *Mol Carcinog* 16:197-202, 1996.
  42. Constantinou AI, Kamath N, Murley JS : Genistein inactivates bcl-2, delays the G2/M phase of the cell cycle, and induces apoptosis of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. *Eur J Cancer* 34:1927-1934, 1998.
  43. Li Y, Upadhyay S, Bhuiyan M, Sarkar FH : Induction of apoptosis in breast cancer cells MDA-MB-231 by genistein. *Oncogene* 18:3166-3172, 1999.
  44. Rauth S, Kichina J, Green A : Inhibition of growth and induction of differentiation of metastatic melanoma cells in vitro by genistein: chemosensitivity is regulated by cellular p53. *Br J Cancer* 75:1559-1566, 1997.
  45. Troll W, Kennedy AR : Protease inhibitors as cancer chemopreventive agents. New York, Plenum, 1993, P.9-64.