

## 담배연기응축물의 DNA 손상작용과 야채 및 과일추출물의 보호효과

이형주 · 허찬 · 김남이 · 허문영<sup>#</sup>

강원대학교 약학대학

(Received May 9, 2011; Revised May 28, 2011; Accepted June 1, 2011)

### Antigenotoxicity of Vegetable or Fruit Extract against Cigarette Smoke Condensate

Hyeong Ju Lee, Chan Heo, Nam Yee Kim and Moon Young Heo<sup>#</sup>

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

**Abstract** — Cigarette smoke condensate (CSC) is known to be carcinogenic compound. CSC contains many organic compounds such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), and heterocyclic amine compounds (HCAs). Reactive oxygen species (ROS) are also generated and induce oxidative DNA damage during the metabolism of CSC. The rat microsome mediated and DNA repair enzyme treated comet assays together with conventional comet assay were performed to evaluate the mechanisms of CSC genotoxicity. The organic extract of CSC induced oxidative and microsome mediated DNA damage. Vitamin C as a model antioxidant reduced DNA damage in endonuclease III treated comet assay. One of flavonoid, galangin as a CYP1A1 inhibitor, reduced DNA damage in the presence of S-9 mixture. The ethanol extracts of the mixed vegetables (BV) or the mixed fruits (BF) showed potent inhibitory effects against CSC induced DNA damage with oxidative DNA lesions and in the presence of S-9 mixture. These results indicate that BV and BF could prevent CSC-induced cellular DNA damage by inhibiting oxidative stress and suppressing cytochrome P450 in mammalian cells.

**Keywords** □ cigarette smoke condensate, single cell gel electrophoresis, DNA damage, reactive oxygen species (ROS), antioxidant, CYP inhibitor

흡연과 폐암발생은 확실한 인과관계가 있다는 것이 잘 알려져 있다.<sup>1-4)</sup> 흡연은 폐암 뿐 만 아니라 여러 다른 부위의 암과 다양한 만성퇴행성질환을 일으키는 요인이 되고 있다.<sup>5-7)</sup> 담배연기 중에는 약 4,000여종 이상의 화학물질이 들어있고 이 중에 약 60 여종의 발암물질이 함유되어 있다고 알려져 있다.<sup>8)</sup> 특히 대표적인 발암물질은 다환방향족탄화수소류로서 benzo(a)pyrene 같은 물질과 담배 유래 니트로소아민류인 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone[NNK] 등이 함유되어있다. 담배연기로부터 얻는 담배연기응축물(cigarette smoke condensate, CSC)에는 유전독성과 발암성<sup>9-11)</sup>이 있다고 알려져 있다. 우리나라 2010년 현재 성인의 흡연율은 39.6%를 나타내고 있다.<sup>12)</sup> OECD국가(평균 27.3%) 중 최고 수치이다. 한편 흡연은 심혈관계질환의 주된 위험인자로 알려져있기도 하다.<sup>13)</sup>

따라서 공중보건학적으로 흡연은 억제 또는 중지되는 것을 목

표로 하고 있으나 흡연에 의한 질병예방차원에서 화학예방요법제(chemopreventive agent)의 개발이 필요하다. 특히, 인간게놈의 안정성이 여러 가지 환경독성물질들에 의해 위협받고 있으므로 이 같은 유전독성물질들이 DNA를 공격하여 야기시키는 돌연변이로부터 인간게놈을 보호할 수 있는 생리활성물질을 개발할 필요가 있다.

본 연구에서는 CSC의 체세포 DNA에 대한 손상메커니즘을 규명하기 위하여 산화적 DNA손상도와 대사활성화에 따른 DNA 손상도를 비교평가하고, 항산화제 및 대사활성화 억제제에 의한 DNA 손상보호효과를 규명하고자 하였다. 흡연에 대한 유전독성에 대한 보호제로서 항산화활성과 대사활성화억제활성을 가지고 있는 야채 또는 과일추출물의 효과를 규명하여 예방약학적으로 활용가능성을 규명하였기에 이에 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

#### 담배연기응축물(CSC) 시료 및 시약

담배연기응축물(CSC)는 국산담배 디스(타르함량 6.0 mg/개피,

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 033-250-6914 (팩스) 033-255-7865  
(E-mail) myheo@kangwon.ac.kr

필터부착)를 써서 담배연기로부터 입자상물질을 포집할 수 있는 자체제작 담배연기응축물 포집필터시스템에 장착하고 흡인펌프의 공기유량을 조절하여 2분에 1개피가 연소되도록 직경 5.5 cm의 glass filter(0.45  $\mu$ m, Gelman type A/E, USA)에 포집하였다. 여지에 포집된 담배연기 응축물은 dichloromethane을 가하여 30분 sonication하여 추출하고 농축하였다. 이를 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 최종 추출물의 농도가 100 mg/ml가 되도록 다시 녹인 후 0.22  $\mu$ m syringe filter로 여과하여 -70°C로 보관하면서 bioassay에 사용하였다. 한편, DMEM, trypsin EDTA 등 세포배양시약들은 GIBCO사제, vitamin C, galangin 등 이화학시약들은 Sigma제를 사용하였다. Rat 간세포로부터 얻은 S-9(Moltox 사, Boone, NC, USA)을 사용하였다.

### 야채 및 과일추출물의 제조

항산화성 유전독성억제능을 가진 천연물을 제조하기 위하여 강원도 양구지방에서 재배된 배추(*Brassica campestris*), 무청(*Raphanus sativus*), 양파(*Allium cepa*), 오이(*Cucumis sativus*), 셀러리(*Apium graveolens*)를 구입하여 물로 세척 한 후 건조기에서 건조하였다. 건조된 야채를 1 kg : 1 kg : 1 kg : 1 kg : 0.1 kg의 비율로 섞고 여기에 주정(대한주정) 20 l와 정제수 20 l를 가해 20일간 실온에서 방치하고 여과 후 농축하여 암녹색의 연조엑스(Bioactive Vegetables, BV)를 얻었다. 건조야채로부터의 회수율은 약 22%(w/w)였다. 한편, 강원도 양구산 사과(*Malus pumilar*), 배(*Pyrus communis*), 포도(*Vitis vinifera*), 제주산 감귤(*Citrus aurantium*)을 세척하고 1 kg : 1 kg : 1 kg : 1 kg의 비율(제조목적상 임의의 비율로 제조)로 섞고 주정(대한주정)을 30 l를 가하고 실온에서 20일간 방치하였다. 이것을 여과하고 농축하여 암갈색의 연조엑스(Bioactive Fruits, BF)를 얻었다. 생과일로 부터의 회수율은 약 6.7%(w/w)였다.<sup>14,15)</sup>

### Alkaline single cell gel electrophoresis(Comet assay)

다음 세 가지 방법(a, b, c)으로 comet assay<sup>16,17)</sup>를 실시하여 CSC의 DNA 손상도를 평가하였다. 시험방법은 a) conventional comet assay - 통상의 single strand breaks 검출법, b) endonuclease III modified comet assay - oxidized pyrimidine base를 검출하기 위한 cell lysing 후 endonuclease III 처리법, c) S-9 mix pretreated comet assay - S-9 대사활성화 후 single strand breaks 검출법들을 사용하였다.

NIH/3T3 cells을 10% FBS 함유배지 중 배양하여 다음과 같은 방법으로 comet 시험을 실시하였다.<sup>16)</sup> 양성 대조 물질로는 CSC를 사용하였다. 이때 시료를 동시처리하거나 단독투여하여 산화적 DNA 손상 억제효과도 평가하였다. 실험은 cell 5×10<sup>3</sup>개를 culture dish(6 well)에 심고, 24 h 후에 양성대조물질 10  $\mu$ l와 DMSO 10  $\mu$ l를 처리하였다. 45분 후 새로운 배지로 같이주고 1

시간 후 culture dish에 trypsin 2 ml를 넣어 cell을 harvest하여 test tube에 취했다. 1,000 rpm으로 원심분리 후 PBS로 세척 후 다시 1,000 rpm으로 원심 분리하였다.

상층액을 버리고 각각에 0.5%-LMPA(low melting point agarose)를 1 ml를 가해준 뒤 각각 1분씩 섞어주었다. 0.65%-NMPA(normal melting point agarose) 130  $\mu$ l를 미리 입힌 slide (fully frosted)에 이 액 50  $\mu$ l를 떨어뜨린 후 cover slide를 덮었다. 냉장고에서 약 30분간 굳힌 뒤 cover slide를 제거하고 그 위에 다시 0.5%-LMPA를 100  $\mu$ l를 떨어뜨린 후 cover slide로 덮고 냉장고에서 30분간 굳혔다. Cover slide를 제거한 후 lysis buffer(2.5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris, pH 10, 10% DMSO, 1% Triton X-100)에 담가서 약 60분간 용해시켰다. 그 후 전기영동완충액(300 mM NaOH, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 13)에 20분간 담가 정착하였다. 전기영동장치에 slide를 양극 쪽으로 배열한 뒤 25 V, 300 mA에서 15분간 전기영동하였다.

슬라이드를 꺼내 0.4 M tris(pH 7.5)에 30분간 담가 중화시켰다. Tray에 걸어 말린 후 ethidium bromide(2  $\mu$ g/ml)를 20  $\mu$ l를 각각에 떨어뜨린 후 515~560 nm의 excitation filter와 590 nm의 barrier filter를 이용하여 형광현미경으로 관찰하여 image analyzer인 COMET 3.1(Kinetic image, England)을 사용하여 슬라이드 당 50 cell을 분석하였다. 한편endonuclease III 처리 시에는 endonuclease III buffer(40 mM HEPES, 0.1 M KCl, 0.5 mM EDTA, 0.2 mg/ml BSA, pH 8.0 with KOH)에 30분간 씻고 endonuclease III 1  $\mu$ g/ml를 30  $\mu$ l 가한 후 커버글라스로 덮어서 37°C에서 30분간 반응 시키는 것을 cell lysis 후에 하였으며 이하 동일조작을 하였다.

또한, S-9 mix는 1 M KCl 66  $\mu$ l, 0.25 M MgCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 64  $\mu$ l, 0.2 M Glucose-6-phosphate 50  $\mu$ l, 0.04 M NADP 200  $\mu$ l, 0.2 M NaHPO<sub>4</sub> buffer(pH 7.4) 1 ml, H<sub>2</sub>O 420  $\mu$ l, S-9 200  $\mu$ l를 넣어 전체량을 2 ml로 조제하였으며 시료와 함께 처리하였고 농도는 배지 중 10%로 하였다. Comet 시험의 데이터는 Olive tail moment(% DNA×distance of center of gravity of DNA, OTM)와 tail length(distance between the head and the last DNA fragment, TL)로 나타내었다.<sup>18,19)</sup>

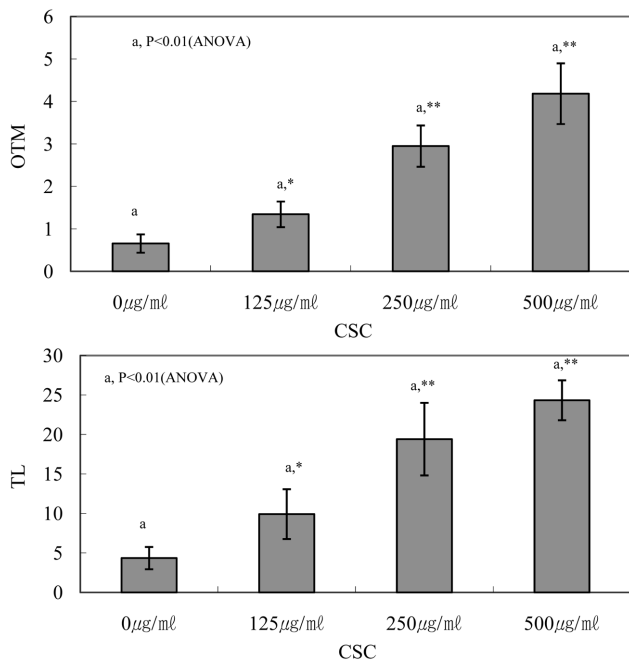
### 통계처리

모든 data는 one way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test 및 Student's t-test를 이용하여 통계처리하였다.

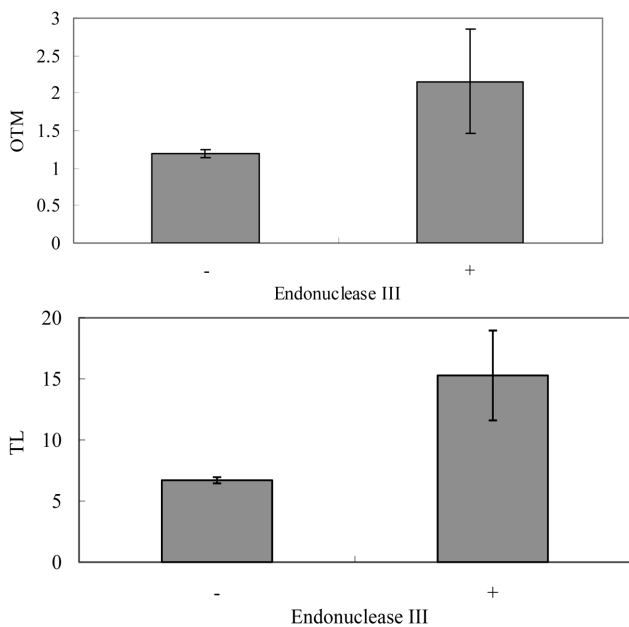
## 결 과

### CSC의 DNA 손상

Fig. 1은 CSC의 농도에 따른 DNA 손상 정도를 보여주는



**Fig. 1** – DNA damage in NIH3T3 cells upon treatment with CSC for 45 min. Other experimental conditions were as described in materials and methods. Each point represents the average of determinations (n=5). Error bars mean standard deviation. Treated groups are analysed by One way ANOVA and Dunnett's test (\*p<0.05, \*\*p<0.01).

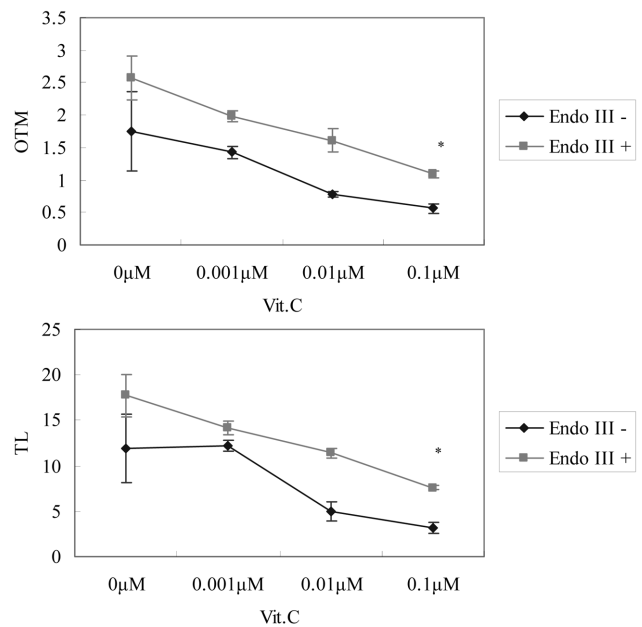


**Fig. 2** – DNA damage of CSC (100 µg/ml) with and without subsequent treatment of endonuclease III. Other experimental conditions were as described in materials and methods. Each point represents the average of duplicate determinations. Error bars mean standard deviation. Treated groups are compared with cells treated with DMSO by Student's t-test.

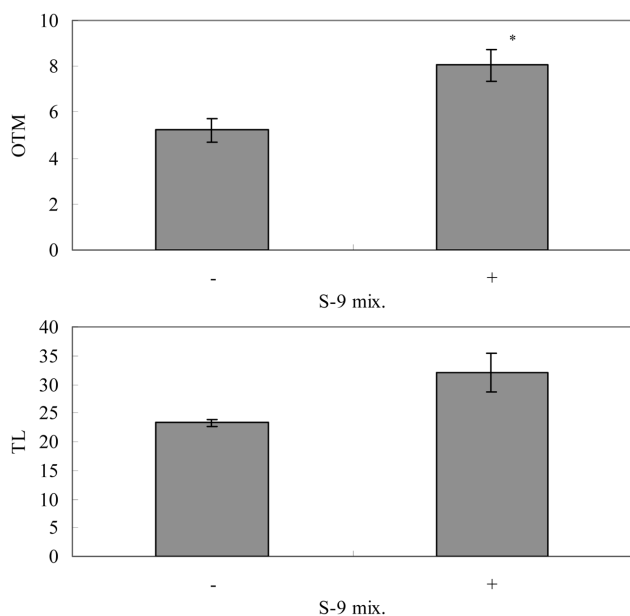
것으로 각각 OTM과 TL을 나타내었다. 125~500 µg/ml의 농도에서 농도 의존적으로 DNA 손상이 증가한 것으로 나타났으며, OTM에서 125 µg/ml(p<0.05), 250 µg/ml(p<0.01), 500 µg/ml(p<0.01), TL에서 125 µg/ml(p<0.05), 250 µg/ml(p<0.01), 500 µg/ml(p<0.01)의 대조군에 비하여 유의성 있는 손상증가가 나타났다.

**CSC의 산화적 DNA 손상과 항산화제에 의한 억제효과**

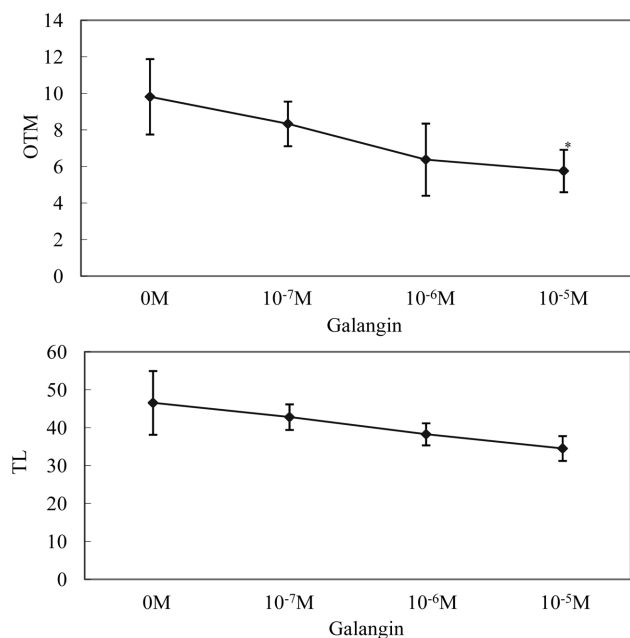
Fig. 2는 CSC 100 µg/ml에서 endonuclease III를 처리했을 때의 DNA 손상을 나타내었다. CSC에 endonuclease III를 처리했을 때 DNA손상이 OTM에서 82.2%, TL에서 55.9%로 증가되는 것으로 보아 CSC는 DNA 염기의 산화적 손상을 일으키는 것으로 나타났다. Fig. 3는 CSC 100 µg/ml에서 endonuclease III를 처리했을 때와 처리하지 않았을 때 항산화제인 vit-C의 효과를 농도별로 나타낸 것으로 endonuclease III를 처리 시 농도의존적으로 DNA 손상이 줄어들었으며 비처리 시보다 감소경향이 뚜렷하였다. 0.1 µM vit-C에 의해 endonuclease III 비처리시 OTM의 경우 67.8%(p<0.05), TL의 경우 73.2%, 처리시 OTM의 경우 58.0%, TL의 경우 57.1% 각각 억제되었다. 따라서 CSC는 pyrimidine 염기의 산화적 손상을 일으키며 이 같은 손상은 vitamin C와 같은 항산화제에 의해 부분적으로 보호될 수 있는 것으로 나타났다.



**Fig. 3** – Effect of vitamin C on CSC (100 µg/ml)-induced DNA damage with and without subsequent treatment of endonuclease III. Other experimental conditions were as described in materials and methods. Each point represents the average of duplicate determinations. Error bars mean standard deviation. Treated groups are compared with cells treated with DMSO by Student's t-test (\*p<0.05 and \*\*p<0.01).



**Fig. 4** – DNA damage of CSC (100 µg/ml) in the presence and absence of S-9 mixture for 45 min. Other experimental conditions were as described in materials and methods. Each point represents the average of duplicate determinations. Error bars mean standard deviation. Treated groups are compared with cells treated with DMSO by Student's t-test (\* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ ).



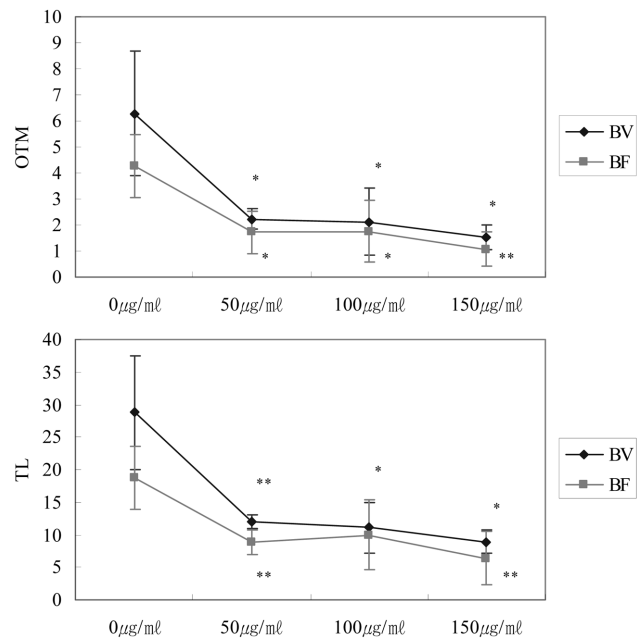
**Fig. 5** – Effect of CYP1A1 inhibitor, galangin on CSC (500 µg/ml)-induced DNA damage in the presence of S-9 mixture. Other experimental conditions were as described in materials and methods. Each point represents the average of duplicate determinations. Error bars mean standard deviation. Treated groups are compared with cells treated with DMSO by Student's t-test (\* $p < 0.05$ ).

**CSC의 대사활성화제 처리 시 DNA 손상과 CYP 저해제의 억제효과**

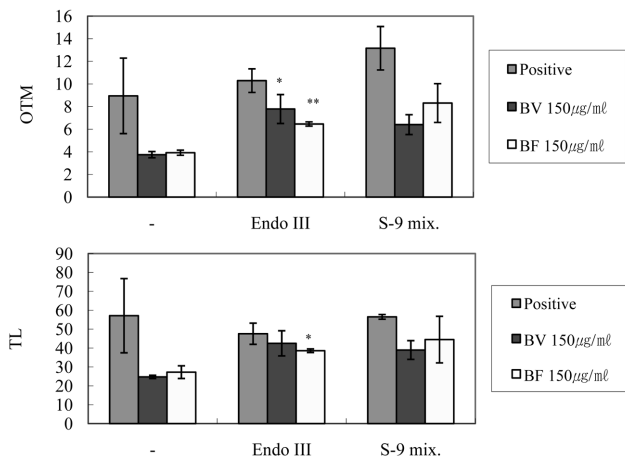
Fig. 4에는 CSC 500 µg/ml에서의 S-9 mixture 45분 처리시의 DNA 손상도를 나타내었다. S-9 mixture 처리 시 DNA 손상이 OTM 54.3( $p < 0.05$ ), TL 37.7% 증가한 것으로 나타났다. 한편, Fig. 5에 CSC 100 µg/ml와 S9 mixture 45분 처리 시 CYP1A1 저해제인 galangin 동시처리 시 DNA 손상 억제효과가 농도의존적으로 나타났다. 10 µM galangin에 의해 OTM의 경우 41.9% ( $p < 0.05$ ), TL의 경우 25.8%로 각각 억제되었다. 따라서 CSC는 대사활성화시 DNA 손상이 증가되는 것으로 보아서 PAH 등 간 접발암물질이 다량 함유되어 있다. 이들의 세포내 유전독성은 flavonoid의 일종인 galangin과 같은 물질에 의해 억제되어 부분적으로 보호될 수 있는 것으로 나타났다.

**BV와 BF의 CSC에 의한 DNA 손상에 대한 억제효과**

Fig. 6에서는 DEP<sub>T</sub> 100 µg/ml에 대한 BV 및 BF의 DNA 손상억제효과를 나타내었다. OTM 및 TL에서 BV, BF 모두 농도 의존적인 억제경향을 나타내었다. 대조군에 비하여 OTM에서 BV의 경우 50, 100, 150 µg/ml에서 모두 유의성( $p < 0.05$ )을 나타내었고 BF의 경우에는 50 µg/ml( $p < 0.05$ ), 100 µg/ml( $p < 0.05$ ), 150 µg/ml( $p < 0.01$ )의 유의성 있는 감소경향을 나타내었다. TL에



**Fig. 6** – Protective effect of BV and BF on CSC (500 µg/ml)-induced DNA damage by comet assay. Each point represents the average of duplicate determinants. Other experimental conditions were as described in materials and methods. Error bars mean standard deviation. Treated groups are compared with cells treated with DMSO by Student's t-test (\* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ ).



**Fig. 7** – Protective effect of BV and BF on CSC (500 µg/ml)-induced DNA damage with and without subsequent treatment of endonuclease III or S9 mixture by comet assay. Other experimental conditions were as described in materials and methods. Each point represents the average of duplicate determinations. Error bars mean standard deviation. Treated groups are compared with cells treated with DMSO by Student's t-test (\* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ ).

서는 BV의 경우 50 µg/ml( $p < 0.01$ ), 100 µg/ml( $p < 0.05$ ), 150 µg/ml( $p < 0.05$ )에서 모두 유의성 있는 감소경향을 나타내었고 BF의 경우에는 50 µg/ml( $p < 0.01$ ), 150 µg/ml( $p < 0.01$ )에서 유의성 있는 감소경향을 나타내었다.

Fig. 7에는 endonuclease III 처리 및 S-9 mix 처리 시 BV 및 BF의 억제효과를 나타내었다. Endonuclease III 및 S-9 mix 미 처리조건 또는 처리조건 하에 BV와 BF는 CSC 100 µg/ml 유도 DNA 손상이 양성대조군에 비해 OTM 과 TL에서 낮아졌다. Endonuclease III 처리시 OTM에서 BV 24.4%( $p < 0.05$ ), BF 37.2%( $p < 0.05$ ), TL에서 BV 10.7%, BF 18.9%( $p < 0.05$ )억제되었다. S-9 mix 처리시 OTM에서 BV 51.3%, BF 36.8%, TL에서 BV 31.1%, BF 21.3% 억제되었다.

## 고 찰

본 연구는 CSC의 유전독성작용기전으로서 single strand breaks 생성과 함께 oxidized base 생성에 의한 손상을 규명하고, S-9 mix 처리 후 대사활성화에 따른 DNA 손상도의 modulation 을 파악하고, CSC와 같은 환경독성물질에 의한 유전독성을 억제할 수 있는 물질의 창출에 목적이 있다. CSC는 125~500 µg/ml의 처리농도에서 농도의존적으로 유의성 있는 유전독성을 나타내었다(Fig. 1). 본 연구의 결과는 CSC 디클로로메탄추출물에 의한 human lymphoblastoid cell line MCL-5에서 comet 시험을 이용한 DNA손상의 유의성 있는 증가현상을 보고한 것과 비슷하였다.<sup>20,21</sup> 또한 담배연기(CS)에 의하여 마우스 간, 폐, 위 조

직에서 comet 시험에 의한 DNA 손상이 single strand break (SSB)가 검출되었다는 보고도 있다.<sup>22</sup> CSC 중에는 benzo(a)pyrene 을 비롯한 여러 가지 발암성물질들과 함께 세포구성성분들의 DNA 손상을 일으키는 물질들이 함유되어 있으며 소핵생성, SCE 증가와 염색체이상 같은 유전독성<sup>23-30</sup>이 야기된다고 보고되었다. 사람에게서도 흡연산모에게서 출생한 신생아 HPRT mutants의 빈도증가, translocations, and DNA strand breaks가 증가되었다고 보고되어 있다.<sup>31</sup> 한편 CSC가 산화기전에 의하여 여러 가지 급 만성 질환들과 관련되어있음이 밝혀지고 있다.<sup>32</sup>

본 연구에서 NIH/3T3 세포에서 CSC 처리 후 전기영동한 슬라이드를 endonuclease III로 처리한 후 comet assay를 실시한 결과 endonuclease III 처리하지 않은 슬라이드에서 보다 OTM에서 82.2%, TL에서 55.9% 증가되었다(Fig. 2). 따라서 CSC는 *in vitro*에서 세포내 DNA의 oxidized base를 생성하는 것으로 나타났다. Endonuclease III는 apurinic(AP)에서 손상된 pyrimidines 을 제거하는 N-glycosylase activity를 갖고 있다. 따라서 endonuclease III 처리 후 comet 실험에서의 DNA의 손상도 증가는 oxidized base의 존재를 확인하는 증거가 된다.<sup>33</sup> 환경유래 입자상물질은 철이나 구리와 함께 Fenton type 반응이나 Harber Weiss반응에 의해 ROS를 생성한다.<sup>34</sup> 유기용매에 의해 추출된 지용성분획에는 B(a)P와 같은 물질이 함유되어 있어 CYP1A1을 발현시켜 ROS와 PAH quinone를 생성시킨다.<sup>35,36</sup> 또한, quinone radical이 함유되어 있어 세포내에서 산화환원반응에 의해 hydroxyl radical을 생성시킨다.<sup>37</sup> 한편, CSC(100 µg/ml)와 함께 항산화성 물질로서 잘 알려진 vitamin C를 0.1~10 µM로 동시 처리한 결과 DNA 손상 및 산화적 DNA 손상 모두 농도 의존적으로 감소되었다(Fig. 3). 따라서 vitamin C와 같은 항산화제는 CSC와 같은 pro-oxidant에 대한 유전독성억제효과가 있는 것으로 판단된다. 이 같은 결과는 생쥐에게 5일 연속 vitamin C(100 mg/kg/day)를 사전투여하였을 때 CSC에 의해 유발되는 SSB가 lung, stomach, liver에서 현저히 감소되었다는 보고<sup>22</sup>와 유사한 결과라고 판단된다.

CSC에는 benzo(a)pyrene, benzo(a)anthracene 등 다환방향족 탄화수소류들이 많이 함유되어있으며 이들 비극성발암물질들은 체내에 흡수되어 대사되어 DNA와 비가역적 공유결합을 하여 돌연변이나 발암성을 야기시킨다고 알려져있다.<sup>38,39</sup> 또한, CSC가 cytochrome P4501A1의 발현을 증가시켰다고 보고된 바 있다.<sup>40</sup> 본 연구에서도 CSC에 S-9 mix을 45분 간 처리하였을 때 DNA 손상도가 OTM에서 54.3%, TL에서 37.7%나 크게 증가된 것으로 보아서 CSC에는 다환방향족탄화수소류가 함유되어있는 것으로 추정된다(Fig. 4).

또한, cytochrome p450 1A1, 1A2의 저해제로 잘 알려져 있는 flavonoid화합물 중의 하나인 galangin<sup>41</sup>을 CSC와 함께  $10^{-7}$ M~ $10^{-5}$ M을 처리하였을 때 농도의존적인 억제경향을 나타내었다

(Fig. 5). Arylhydrocarbon receptor agonist인  $\beta$ -naphthoflavon (BNF)이 CYP1A1을 유도하고 7-ethoxyreserufin O-deethylase (EROD)활성을 증가시키며, CYP1A1 inhibitor인  $\alpha$ -naphthoflavon (ANF)은 benzo(a)pyrene 유도 DNA 손상을 억제시켰다는 보고가 있다.<sup>42)</sup> 따라서 CSC는 대사활성화에 의해 유전독성을 일으키는 2차 발암물질들을 함유하고 있으며 이 같은 물질들은 galangin과 같은 대사저해제에 의해 유전독성이 억제되는 것으로 보인다. Flavonoid들에 의한 다환방향족 탄화수소류의 유전독성 억제효과는 많은 연구결과들이 보고되고 있다.<sup>43,44)</sup> 앞으로 *in vivo* 연구 및 임상연구를 비롯한 더 많은 관련 연구가 필요하지만 CSC를 비롯한 대기부유분진, 디젤분진 등과 같은 환경독성물질의 노출위험이 많은 사람들에게 flavonoid(e.g. galangin, quercetin)와 같은 cytochrome P4501A 저해제가 독성경감효과를 나타낼 수도 있을 것으로 판단된다.<sup>45,46)</sup>

야채와 과일에는 항산화성분인 폴리페놀이 많이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다.<sup>47,48)</sup> 이에 본 연구에서는 5종의 야채로부터 추출된 야채생리활성추출물과 4종의 과일로부터 추출된 과일생리활성추출물들을 대상으로 하여 CSC에 의한 DNA 손상에 대하여 억제효과를 갖는지를 평가하였다. BV와 BF는 50~150  $\mu\text{g}/\text{m}$ 에서 억제경향을 나타내었다(Fig. 6). Endonuclease III 처리 시에도 억제효과를 나타내었다(Fig. 7). 이는 BV 및 BF가 비교적 큰 항산화물질<sup>14)</sup>이기 때문에 산화적 DNA 손상억제효과가 나타난 것으로 보인다. 또한, S-9 mix 처리 시에도 억제경향을 나타내었는데(Fig. 7) 이는 BV와 BF가 각각 EROD 및 MROD 억제활성을 가지고 있기 때문으로 판단된다.<sup>15)</sup> BV와 BF에는 total polyphenol로서 각각 3.52%, 0.96%로서 함량을 나타내며, total flavonoid로서는 각각 0.40%, 0.075% 정도 함유하고 있다.<sup>14)</sup> 기 발표된 논문에서도 배추, 무우청, 양파, 오이, 샐러리와 같은 야채와 사과, 배와 같은 과일에는 quercetin, kaempferol 배당체들이 다량 함유되어 있으며,<sup>49)</sup> 감귤에는 hesperetin, naringenin 배당체,<sup>50)</sup> 포도에는 resveratrol 등<sup>51)</sup> 항산화성 물질이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 고지방 고콜레스테롤 식이마우스에 케일 등 엽채소류 혼합액투여가 oxidative DNA damage를 현저히 감소시켰다고 보고하였다.<sup>52)</sup>

Green tea poly phenol인 사람기관지 상피세포에서 EGCG가 CSC유도 NF- $\kappa$ B 활성화에 작용하여 염증이나 세포증식을 억제할 수 있다고 하고,<sup>53)</sup> tea polyphenol이 CSC에 의한 사람기관지 상피세포에서 산화적 손상과 apoptosis를 억제시켰다.<sup>54)</sup> EGCG가 comet assay를 이용한 시험에서 benzo(a)pyrene diol epoxide와 cigarette smoke condensate유도 DNA fragmentation을 감소<sup>55)</sup>시켰다. 또한 kaempferol이 AHR target gene(CYP1A1)의 upregulation을 억제하였다.<sup>56)</sup> 역학적 조사연구에서도 quercetin이나 naringenin이 풍부한 식품을 섭취하면 폐암을 예방한다는 보고<sup>57)</sup>가 있으며 quercetin은 동물모델에서 식이성발암물질에 의

한 발암억제효과<sup>58)</sup>가 보고된 바 있다. Quercetin은 benzo(a)pyrene의 diol epoxide로의 대사활성화를 억제하였고 이는 특히 CYP1A1 wild type의 genotype에서 잘 나타났다고 보고하였다.<sup>59)</sup> 이 같은 관련연구보고로 보아 BV와 BF는 quercetin과 같은 flavonoid 물질들을 다량 함유하고 있으므로 CYP 산화효소의 억제효과로 CSC와 같은 유전독성물질의 대사활성화가 저해되어 이 같은 chemopreventive 효과가 나타나는 것으로 판단된다.

따라서 BV와 BF는 항산화효과<sup>14)</sup>와 함께 CYP1A1, CYP1A2 등의 효소억제효과<sup>15)</sup>로 본 연구에서의 CSC를 포함하여 기 보고된 대기부유분진,<sup>60)</sup> 디젤분진<sup>15)</sup> 등 환경성 입자상물질의 유전독성에 보호효과를 가질 수 있다고 판단된다. 향후 *in vivo* 연구나 임상연구가 필요하지만 흡연자들에게 산화적 유전독성보호물질로서의 항산화제의 섭취가 권장된다. 또한 천연항산화제들이 흡연유발 ROS에 의한 DNA 손상을 보호하여 돌연변이와 같은 인체간접의 불안정성을 예방할 수 있으리라고 보여진다.

## 결론

본 연구에서는 CSC의 DNA손상도 측정을 위하여 comet assay를 사용한 결과 CSC의 중요한 두 가지 유전독성기전인 산화적 DNA손상과 대사활성화에 의한 DNA손상도를 평가할 수 있었으며, 또한 유전독성억제제의 활성을 검정할 수 있었으며 다음과 같은 결론을 얻었다. CSC는 NIH/3T3 세포에서 농도의존적으로 세포독성과 DNA 손상을 나타내었다. CSC는 DNA 염기에 산화적 DNA 손상을 일으키며 항산화제인 비타민 C에 의하여 감소되었다. CSC는 S-9mixture 대사활성화에 의하여 DNA 손상을 증가시키며 CYP1A 저해제로서 flavonoid인 galangin에 의하여 감소되었다. CSC는 BV 및 BF에 의해서 DNA 손상이 감소되었으며 이는 BV, BF의 항산화 효과 및 대사활성화억제제로 인하여 감소되었다. 본 연구결과, BV, BF와 같은 야채과일 유래 천연 항산화성 유전독성억제효과를 갖는 조성물은 흡연인자의 노출로부터 보호효과를 가질 수 있다고 보여지며 이러한 천연조성물의 예방약학적 응용에 관한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 판단된다.

## 감사의 말씀

본 연구논문은 강원대학교 종합약학연구소의 장비지원에 의한 연구이므로 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- 1) International Agency for Research on Cancer: Tobacco smoking and tobacco smoke, IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans, vol. 83,

- International Agency for Research on Cancer, Lyon, France (2004).
- 2) Hoffman, F. L. : Cancer and smoking habits, in: Adair, F. E. (Ed.), *Cancer: International Contribution to the Study of Cancer in Honor of James Ewing*, Lippincott, Philadelphia, PA, USA, p. 50 (1931).
  - 3) Wynder, E. L. and Graham, E. A. : Tobacco smoking as a possible etiological factor in bronchiogenic carcinoma: a study of six hundred and eight-four proved cases. *J. Am. Med. Assoc.* **143**, 329 (1950).
  - 4) Doll, R. and Hill, A. B. : Smoking and carcinoma of the lung: preliminary report. *Br. Med. J.* **2**, 739 (1950).
  - 5) Doll, R. and Peto, R. : The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the US today. *J. Natl. Cancer Inst.* **66**, 1192 (1981).
  - 6) US Department of Health, and Human Services, Reducing the Health Consequences of Smoking, 25 Years of Progress, Office on Smoking and Health, DHSS Publication No. CDC-89-8411, Government Printing Office, Washington, DC, p. 43 (1989).
  - 7) International Agency for Research on Cancer (IARC), Tobacco smoking, Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, International Agency for Research on Cancer, Lyon, vol. 38 (1986).
  - 8) Hecht, S. S. : Tobacco smoke carcinogens and breast cancer. *Environ. Mol. Mutagen* **39**, 119 (2002).
  - 9) Hecht, S. S. : Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. *Lancet Oncol.* **8**, 461 (2002).
  - 10) Hoffmann, D., Hoffmann, I. and El-Bayomi, K. : The less harmful cigarette: a controversial issue. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 767 (2001).
  - 11) Hecht, S. S. : Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **91**, 1194 (1999).
  - 12) 보건복지부 : 2010년 상반기 흡연실태조사 (2010).
  - 13) Burns, D. M. : Epidemiology of smoking-induced cardiovascular disease. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **46**, 11 (2003).
  - 14) 이승철, 허찬, 이승현, 김현표, 허문영 : 야채 및 과일추출물의 항산화작용과 산화적 염색체손상에 대한 억제효과. *약학회지* **48**, 111 (2004).
  - 15) 허찬, 김남이, 허문영 : 총디젤분진의 DNA 손상작용과 야채 및 과일추출물의 보호효과. *J. Environ. Toxicol.* **21**, 127 (2006).
  - 16) Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. and Schneider, E. L. : A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* **175**, 184 (1988).
  - 17) Olive, P. L., Banath, R. E. and Durand, R. E. : Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet assay. *Radiat. Res.* **122**, 86 (1990).
  - 18) Olive, P. L. and Banath, J. P. : Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: "tail moment" as a function of position in the cell cycle. *Mutat. Res.* **294**, 275 (1993).
  - 19) Duez, P., Dehon, G. and Dubois, J. : Validation of raw data measurements in the comet assay. *Talanta* **63**, 879 (2004).
  - 20) Wolz, L., Krause, G. and Scherer, G. : The comet assay with MCL-5 cells as an indicator of genotoxic treatment with chemicals and cigarette smoke condensates. *Altern. Lab. Anim.* **30**, 331 (2002).
  - 21) De Marini, D. M., Gudi, R., Szkudlinska, A., Rao, M., Recio, L., Kehl, M., Kirby, P. E., Polzin, G. and Richter, P. A. : Genotoxicity of 10 cigarette smoke condensates in four test systems: comparisons between assays and condensates. *Mutat. Res.* **650**, 15 (2008).
  - 22) Tsuda, S., Matsusaka, N., Ueno, S., Susa, N. and Sasaki, Y. F. : The influence of antioxidants on cigarette smoke-induced DNA single-strand breaks in mouse organs: a preliminary study with the alkaline single cell gel electrophoresis assay. *Toxicol. Sci.* **54**, 104 (2000).
  - 23) Hecht, S. S. : Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **91**, 1194 (1999).
  - 24) Bonassi, S., Neri, M., Lando, C., Ceppi, M., Lin, Y.-p., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E. and Fenech, M. : The HUMN collaborative group, effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus Project. *Mutat. Res.* **543**, 155 (2003).
  - 25) Kao-Shan, C.-S., Fine, R. L., Whang-Peng, J., Lee, E. C. and Chabner, B. A. : Increased fragile sites and sister chromatid exchanges in bone marrow and peripheral blood of young cigarette smokers. *Cancer Res.* **47**, 6278 (1987).
  - 26) Ramsey, M. J., Moore, D. H., Briner, J. F., Lee, D. A., Olsen, L., Senft, J. R. and Tucker, J. D. : The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting. *Mutat. Res.* **338**, 95 (1995).
  - 27) Kiyosawa, H., Suko, M., Okudaira, H., Murata, K., Miyamoto, T., Chung, M.-H., Kasai, H. and Nishimura, S. : Cigarette smoking induces formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, one of the oxidative DNA damages in human peripheral leukocytes. *Free Radic. Res. Commun.* **11**, 23 (1990).
  - 28) Loft, S., Vistisen, K., Ewertz, M., Tjønneland, A., Overvad, K. and Poulsen, H. E. : Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans: influence of smoking, gender and body mass index. *Carcinogenesis* **13**, 2241 (1992).
  - 29) Asami, S., Hirano, T., Yamaguchi, R., Tomioka, Y., Itoh, H. and Kasai, H. : Increase of a type of oxidative DNA damage, 8-hydroxyguanine, and its repair activity in human leukocytes by

- cigarette smoking. *Cancer Res.* **56**, 2546 (1996).
- 30) Asami, S., Manabe, H., Miyake, J., Tsurudome, Y., Hirano, T., Yamaguchi, R., Itoh, H. and Kasai, H. : Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung. *Carcinogenesis* **18**, 1763 ((1997).
  - 31) David, M. and DeMarini, D. M. : Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **567**, 447 (2004).
  - 32) Chen, C. and Loo, G. : Cigarette smoke extract inhibits oxidative modification of low density lipoprotein. *Atherosclerosis* **112**, 177 (1995).
  - 33) Farombi, E. O., Moller, P. and Dragsted, L. O. : Ex-vivo and in vitro protective effects of kolaviron against oxygen-derived radical-induced DNA damage and oxidative stress in human lymphocytes and rat liver cells. *Cell Biol. Toxicol.* **20**, 71 (2004).
  - 34) Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. : Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University Press (1999).
  - 35) Kim, K. B. and Lee, B. M. : Oxidative stress to DNA, protein, and antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in rats treated with benzo(a)pyrene. *Cancer Lett.* **113**, 205 (1997).
  - 36) Bonvallot, V., Baeza-Squiban, A., Baulig, A., Brulant, S., Boland, S., Muzeau, R., Barouki, R. and Marano, F. : Organic compounds from diesel exhaust particles elicit a proinflammatory response in human airway epithelial cells and induce cytochrome p450 1A1 expression. *Am. J. Respir. Cell Mol. Bio.* **25**, 515 (2001).
  - 37) Dellinger, B., Pryor, W. A., Cueto, R., Squadrito, G. L., Hegde, V. and Deutsch, W. A. : Role of free radicals in the toxicity of airborne fine particulate matter. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 1371 (2001).
  - 38) Cooper, C. S., Grover, P. L. and Sims, P. : The metabolism and activation of benzo[a]pyrene. In: Bridge, J. W. and Chasseaud, L. F., Editors, Progress in drug metabolism (7th edn.), John Wiley & Sons, Chichester, p. 295 (1983).
  - 39) Hecht, S. S. : Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. *Lancet Oncol.* **3**, 461 (2002).
  - 40) Park, M. J., Songm, Y. J. and Seo, K. W. : Effects of cigarette smoke condensate on the activities of xenobiotic metabolizing enzymes in primary cultured rat hepatocytes. *J. Applied Pharmacol.* **12**, 185 (2004).
  - 41) Zhai, S., Dai, R., Friedman, F. K. and Vestal, R. E. : Comparative inhibition of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 by flavonoids. *Drug Metabol. Dispos.* **26**, 989 (1998).
  - 42) Annas, A., Brittebo, E. and Hellman, B. : Evaluation of benzo(a)pyrene-induced DNA damage in human endothelial cells using alkaline single cell gel electrophoresis. *Mutat. Res.* **471**, 145 (2000).
  - 43) Das, M., Khan, W. A., Asokan, P., Bickers, D. R. and Mukhtar, H. : Inhibition of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adduct formation in epidermis and lungs of SENCAR mice by naturally occurring plant phenols. *Cancer Res.* **47**, 767 (1987).
  - 44) Edenharter, R., Krieg, H., Kottgen, V. and Platt, K. L. : Inhibition of clastogenicity of benzo[a]pyrene and of its trans-7,8-dihydrodiol in mice in vivo by fruits, vegetables, and flavonoids. *Mutat. Res.* **537**, 169 (2003).
  - 45) Quadri, S. A., Qadri, A. N., Hahn, M. E., Mann, K. K. and Sherr, D. H. : The bioflavonoid galangin blocks aryl hydrocarbon receptor activation and polycyclic aromatic hydrocarbon-induced pre-B cell apoptosis. *Mol. Pharmacol.* **58**, 515 (2000).
  - 46) World Cancer Research Fund : Epidemiological studies consistently show that vegetable consumption decreases risk of lung cancer. American Institute for Cancer Research, Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective, American Institute for Cancer Research, Washington, DC, p. 37 (1997).
  - 47) Justesen, U., Knuthsen, P. and Leth, T. : Determination of plant polyphenols in Danish foodstuffs by HPLC-UV and LC-MS detection. *Cancer Lett.* **114**, 165 (1997).
  - 48) Justesen, U., Knuthsen, P. and Leth, T. : Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A.* **799**, 101 (1998).
  - 49) Herotog, M. G. L., Hollaman, P. C. H. and Katan, M. B. : Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 2379 (1992).
  - 50) Mouly, P., Gaydou, E. M. and Auffray, A. : Simultaneous separation of flavanone glycosides and polymethoxylated flavones in citrus juices using liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* **800**, 171 (1998).
  - 51) Matsuoka, A., Furuta, A., Ozaki, M., Fukuhara, K. and Miyata N. : Resveratrol, a naturally occurring polyphenol, induces sister chromatid exchanges in a Chinese hamster lung (CHL) cell line. *Mutat. Res.* **494**, 107 (2001).
  - 52) Kim, M. Y., Cheong, S. H., Kim, M. H., Son, C., Yook, H. S., Sok, D. E., Kim, J. H., Cho, Y., Chun, H. and Kim, M. R. : Leafy vegetable mix supplementation improves lipid profiles and antioxidant status in C57BL/6J mice fed a high fat and high cholesterol diet. *J. Med. Food* **12**, 877 (2009).
  - 53) Syed, D. N., Afaq, F., Kweon, M. H., Hadi, N., Bhatia, N., Spiegelman, V. S. and Mukhtar, H. : Green tea polyphenol EGCG suppresses cigarette smoke condensate-induced NF-



- kappaB activation in normal human bronchial epithelial cells. *Oncogene*. **26**, 673 (2007).
- 54) Qing, C, Chen, P. and Xiang, X. : Effect of tea polyphenols on oxidative damage and apoptosis in human bronchial epithelial cells induced by low-dose cigarette smoke condensate. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* **35**, 123 (2010).
- 55) Baumeister, P, Reiter, M., Kleinsasser, N., Matthias, C. and Harrus, U. : Epigallocatechin-3-gallate reduces DNA damage induced by benzo[a]pyrene diol epoxide and cigarette smoke condensate in human mucosa tissue cultures. *Eur. J. Cancer Prev.* **18**, 230 (2009).
- 56) Puppala, D., Gairola, C. G. and Swanson, H. I. : Identification of kaempferol as an inhibitor of cigarette smoke-induced activation of the aryl hydrocarbon receptor and cell transformation. *Carcinogenesis* **28**, 639 (2007).
- 57) Le Marchand, L., Murphy, S. P., Hankin, J. H., Wilkens, L. R. and Kolonel, L. N. : Intake of flavonoids and lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 154 (2000).
- 58) Yang, C. S., Landau, J. M. Huang, M. T. and Newmark, H. L. : Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr.* **21**, 381 (2001).
- 59) Schwarz, D., Kisselev, P. and Roots, I. : CYP1A1 genotype-selective inhibition of benzo[a]pyrene activation by quercetin. *Eur. J. Cancer* **41**, 151 (2005).
- 60) 김남이, 허문영 : 대기부유분진으로 야기된 DNA 손상에 대한 quercetin, vitamin C, Trolox의 보호효과. *약학회지* **51**, 239 (2007).