

Benzo(a)pyrene 대사물질들의 DNA 에 대한 Adduct 형성 억제에 미치는 Panaxydol 의 효과

박진규·김신일
한국인삼연초연구소
(1989년 4월 11일 접수)

Inhibition of the Formation of Adducts Between Metabolites of Benzo(a)pyrene and DNA by *Panaxydol* *in vivo* and *in vitro*

Jin Kyu Park and Shin Il Kim
Department of Pharmacology, Korea Ginseng & Tobacco Research Institute
Daejeon 302-345, Korea
(Received April 11, 1989)

Abstract □ The binding of bay region diol-epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to target tissue DNA is thought to be essential for the initiation of cancer by these compounds. In this study we investigated the effect of polyacetylenes such as panaxynol and panaxydol on the formation of benzo(a)pyrene (BP)-metabolite-DNA adduct in the liver of ICR mice. Treatment of mice by i.p. administration of polyacetylenes produced a marked reduction in BP metabolite binding to DNA *in vitro*. Following i.v. administration of [³H]BP(300 μCi/21 nmoles/0.1 ml DMSO) to mice, radioactivity was detected in the DNA of the liver *in vivo*. The result of tentative identification of the 4 peaks between the two standard markers for high pressure liquid chromatography showed that the peaks I, II, III, and IV were BP-phenol oxide-DNA adduct (or BP-diol-epoxide-dCyt. adduct), (-) BP-diolepoxide I:dGuO adduct, (+) BP-diol-epoxide I: dGuO adduct, and BP-diol-epoxide II:dGuO adduct, respectively. The minor adduct, (-) BP-diol epoxide I: dGuO was reduced to 69% of the amount of the control, while the major adduct, (+) BP-diolepoxide I: dGuO(peak II) which was produced from (-) BP-7,8-diol was reduced to 78% of that of the control. The amount of the minor adduct, BP-diol-epoxide II:dGuO adduct(peak IV) which formed from (+) BP-7,8-diol was 58% of the control.

These results show that the panaxydol is more related to inhibition of the formation of the minor adducts than of the major adducts, which were generally produced from (±) BP-7,8-dihydro-diols.

Keywords □ *Panax ginseng* C.A. Meyer, polyacetylene, panaxydol, benzo(a)pyrene, DNA, metabolite

서 론

PAH 화합물들의 세포내 DNA 에 대한 공유결합은 흔히 이들 화합물들의 돌연변이 및 발암성과 관련되어 있다.¹⁾ 이것은 여러 PAH 화합물들의 total binding level 과 특정한 adduct 들 모두에 대해 보고된 바 있다.²⁾

Benzo(a)pyrene(BP)은 bioactivation 되는 과정에서 trans dihydrodiol 들로 전환된 후 다시

bioactivation 되는데 그중에서 (+)-(7R, 8S)-diol-(9S, 10R)-BP-epoxide^{3,4)}는 BP 의 bay region diol epoxide 의 4가지 enantiomer 들 중 가장 발암성이 높은 것으로 보고되어 있다. 일반적으로 *in vivo* 에서는 (±)-(7R, 8S)-diol-(9S, 10R)-epoxide-7, 8, 9, 10-tetrahydrobenzo(a)pyrene 과의 DNA 결합이 증가 된다.⁵⁻⁷⁾ 그러나 Philip 등⁸⁾은 Wistar rat mammary cell 의 primary culture 에서 이 DNA-BP adduct 가 없

었다고 보고한 반면에 Moor 등⁹⁾은 rat mammary epithelial 세포에서 상당량의 syn-BPDE adduct 들과 그밖의 확인되지 않은 BP-DNA adduct 들을 확인한 바 있다. BP 에 대한 DNA-adduct 생성반응은 species, tissue, 그리고 cell type 에 따라 다양하게 나타나며,¹⁰⁾ *in vivo* BP-metabolite-DNA adduct 의 형성은 여러 조직¹¹⁻¹⁷⁾에서 연구되었다. 예를 들면 (±)-anti-BP-diol-epoxide 들과의 DNA adduct 는 mouse skin³³⁾에서 tumor initiator 이며, mouse(susceptible strain)의 lung 에서는 완전한 carcinogen³⁴⁾으로 알려져 있다. 또한 PAH 계열의 화합물의 경우 mouse skin 에서의 발암과 그 화합물들의 DNA 와의 공유결합 형성 사이에는 RNA 나 protein 과의 결합과는 달리 확실한 상관관계가 존재한다.³⁵⁾

화학발암제들에 의한 종양생성의 억제효과를 내는 화합물들중 BP-diolepoxide DNA adduct 생성을 감소시키는 화합물들은 항산화제로 널리 알려진 BHA¹⁸⁾나 tannic acid, quercetin, myricetin, anthraflavic acid 등의 식용식물의 phenol 류 등¹⁹⁾이 주목을 끌고 있다. 저자 등²⁰⁾은 인삼으로부터 분리한 polyacetylene 화합물들이 BP 대사에 관여하여 그 대사물질들의 생성 pattern 을 변화시키고 수용성 BP 대사물질들의 urinary excretion 을 증가시킴²⁰⁾을 보고한 바 있다.

본 논문에서는 이와 같은 결과들에 근거하여 *in vitro* 와 *in vivo* DNA-BP 대사물질들의 결합에 미치는 polyacetylene 화합물들의 영향을 panaxydol 을 중심으로 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

Panaxydol, panaxynol 은 김²¹⁾의 방법에 따라 인삼으로부터 순수하게 분리 확인 후 실험에 사용하였다. Benzo(a)pyrene, calf thymus DNA, DNaseI, phosphodiesterase(type I), alkaline phosphatase(type II), acetophenone, butyrophenone 등은 Sigma 제품을 사용하였으며 [³H]benzo(a)pyrene(S. A., 52.6 Ci/mmol)은 Amersham 사 제품을 구입하였다. 그밖에 실험에

사용된 용매류는 GR 급을 사용하였고 HPLC 에 사용된 용매는 Baker 사 제품(HPLC 용)을 사용하였다.

2. 방법

실험동물의 처리

ICR mice(수컷, 20~25g b. w.)를 사용하였다. Polyacetylene 화합물들의 투여는 용량별로 3일 간 매일 오전 9시와 11시 사이에 복강주사(in 0.1 ml corn oil) 하였다. 최종투여 24시간 후에 간을 적출하여 microsome 분획을 얻었으며, 간을 적출하기 전 16시간 동안 절식시켰다. *in vivo* DNA-BP metabolite adduct 형성실험은 polyacetylene 화합물 투여 최종일에(polyacetylene 투여 30분 후) label 된 [³H]benzo(a)pyrene 을 꼬리 정맥주사하였다.

in vitro DNA binding 실험

최종 volume 0.5 ml 에 [³H]BP(4 μ Ci/60 nmol/12.5 μ l), 100 μ g 의 denatured DNA, 400 μ g 의 microsomal protein, 0.2 M 의 인산염 완충액(pH 7.5, 0.12 mM EDTA, 3 mM MgCl₂ 포함)을 포함하는 incubation mixture 를 37°C 에서 2분간 preincubation 시킨 후, 1.25 mM 의 NADPH (5 mM 의 isocitrate, 0.5 U 의 isocitrate dehydrogenase 포함)를 가하는 것으로 시작하여 20분간 반응시킨 후 1 ml 의 ethanol 을 가하여 침전을 얻었다. 이 침전을 2 ml 의 0.15 M NaCl, 0.015 M citrate 용액에 녹인 후 2 ml 의 ethylacetate 로 binding 되지 않은 BP 와 그 대사물질들을 제거하고 이때 물층에 남은 DNA 를 Pelkonen 등²²⁾의 방법으로 분리, 정제, 가수분해하여 추출하였다. 이때 최종적으로 얻어진 DNA-BP metabolites adduct 들을 SEP-PAK C18 cartridge(Waters Co.)를 precolumn 으로 사용, C18 cartridge 에 결합된 DNA-BP metabolite adduct 들만을 용출시킨 후 μ BONDAPAK C18 HPLC column 에 apply 하여, 그 용출 fraction 들의 radio isotope 량을 측정함으로써 대조군과 시험군의 DNA-BP metabolites adduct 들의 양을 비교하였다. 이때의 HPLC 조건은 water : methanol gradient(50~80%, 30분)로 flow rate 는 0.8 ml/분, 10 drops/fraction 으로 하였으며,

standard marker 로는 acetophenone 과 butyrophenone 을 사용하였다.

in vivo DNA binding 실험

Polyacetylene(40 μ moles/kg b. w., i. p.) 투여 3일째에 대조군과 시험군에 [³H]-BP 를 꼬리정맥 주사(300 μ Ci/21 nmoles/0.1 ml/DMSO solution), 24시간 후 적출한 간으로부터 Murmur 등²³⁾의 방법으로 nucleic acid 를 추출하여 RNA 와 glycogen 을 제거하고 spectrophotometric 한 방법으로 DNA 의 양 및 순도를 검정하였다. 이 DNA adduct 들은 *in vitro* 실험과 같은 방법으로 가수분해하고, 그 DNA-BP metabolite adduct 들을 정량하였다.

이 BP-DNA adduct 들은 HPLC 에서 elution 되는 두개의 standard marker 들 사이에 나타나는 4개의 peak 들을^{17,24)} 잠정적으로 확인하였다.

결과 및 고찰

Park 등²⁰⁾은 Polyacetylene 화합물을 투여한 ICR mice 로부터 얻은 간 마이크로솜에 의해 생성되는 BP 대사물질들을 정량한 결과 panaxydol 투여군에서 BP-7, 8-diol 과 quinone 들이 뚜렷하게 증가했음을 보고하였다. 이때 BP 대사효소들의 활성도는 주어진 polyacetylene dose 에서 BP-epoxide 들의 가수분해효소인 epoxide hydratase (EH) 를 뚜렷이 증가시켜 BP monooxygenase 인 arylhydrocarbon hydroxylase(AHH)와의 ratio 를 10배 이상으로 증가시켰으며 BP 의 수용성 대사물질들의 urine 으로의 배설을 대조군의 175%로 증가시켰다. 따라서 본 논문에서는 BP 의 궁극적인 발암물질인 BP-7, 8-diol-9, 10-epoxide 의 전구물질인 BP-7, 8-diol 들의 증가가 이 diol epoxide 들의 DNA 와의 결합을 증가시킬 것인지 아니면 BP 대사효소들의 선택적인 유도로 말미암은 수용성 BP 대사물질들의 배설 촉진²⁰⁾에 따라 DNA-BP metabolite adduct 들의 생성이 억제될 것인지를 *in vitro* 와 *in vivo* DNA binding 실험을 통해 BP 에 의한 발암억제와 관련하여 규명하고자 하였다.

Fig. 1은 polyacetylene 화합물인 panaxynol 과

panaxydol 투여(40 μ moles/kg b. w.)군에서 *in vitro* BP metabolite-DNA adduct 들의 생성량을 관찰한 결과이다. Polyacetylene 투여군의 HPLC peak profile 을 보면 대조군에 비해 각 peak 의 생성량이 현저히 억제되었다. 즉 대조군에서 두개의 marker 들 사이에 나타나는 주요 adduct 들이 polyacetylene 투여군에서는 뚜렷하게 억제되었다. Jefcoate 등²⁵⁾의 보고에 따르면, 7, 8-dihydrodiol 의 dihydrodiol-oxide 로의 secondary monooxygenation 이 BP 의 primary substrate 인 7, 8-dihydrodiol 과 BP-quinone 들의 복합적인 영향에 의해 90~95%까지 inhibition 될 수 있다.

따라서 이러한 결과는 *in vitro* BP metabolite 들의 product inhibition 에 의해 BP 대사의 microsomal oxidation²⁶⁾이 제한된 결과일 수 있다. Plant phenol 들인 tannic acid, quercetin, myricetin, anthraflavic acid 들은 *in vitro* 에서 BP 의 첫 monooxygenation step 인 AHH 활성도를 억제²⁷⁾시킨 결과로 mouse epidermi 에서의 *in vitro*, *in vivo* DNA binding 을 48~73%까지 inhibition 시켰다.¹⁹⁾ 한편 식물의 alkaloid 인 harman 이나 norharman 은 T98 bacteria 에서 BP 나 aniline 의 mutagenicity 에 대하여 comutagenic 한 작용을 나타내는 화합물²⁸⁾이면서 AHH 의 억제와 *in vitro* DNA binding 을 억제시켰다.²⁹⁾

이와 같은 결과는 pyrrolizidine alkaloid 의 potential carcinogen 인 Jacobine 인 경우에도 보고되었다.³⁰⁾ 그러나 그 자체가 carcinogen 인 이상의 화합물들과는 달리 식용식물에 포함되어 있는 phenol 류들은 최근 발암예방제(cancer chemopreventive agent)들로 주목을 받고 있다.

Polyacetylene 화합물들은 암세포인 L-1210 세포나 S-180 세포들에 대하여 *in vitro* 에서 강한 cytotoxicity 를 나타내나,²¹⁾ 정상 ICR mice 의 간에서는 DNA binding 실험에서 사용된 투여량(20 μ mol/kg b. w.)의 경우, 3일간 연속투여시 약 10% 내외의 체중감소를 나타낸 것 이외에는 electron microscope 상의 미세구조에 별다른 차이가 관찰되지 않았다.³⁶⁾

Fig. 2는 panaxydol(40 μ moles/kg b. w.)을 투

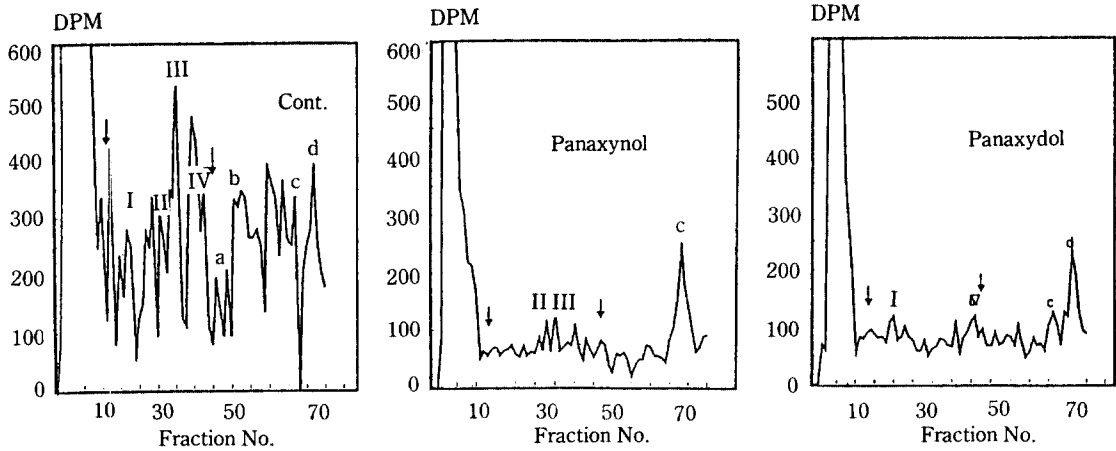


Fig. 1. Elution profile from HPLC of hydrolyzed calf thymus DNA previously incubated with $[^3\text{H}]$ BP and liver microsomes from control, panaxynol, panaxydol treated mice respectively.

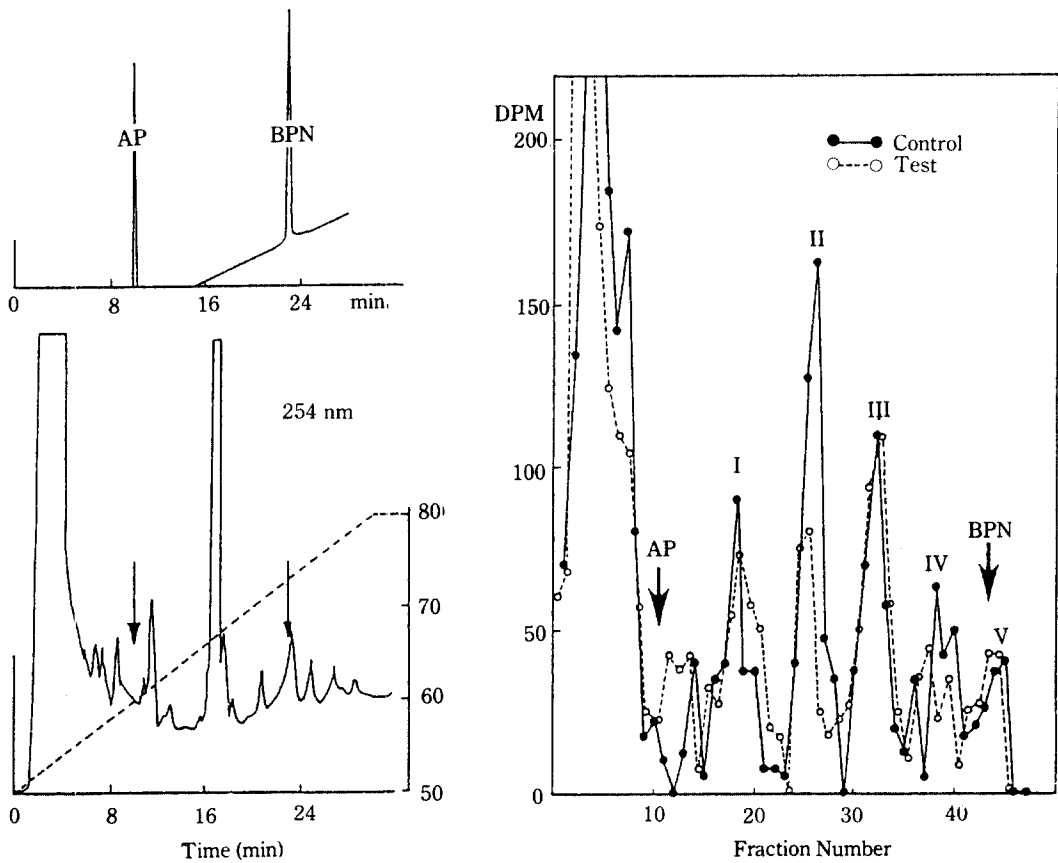


Fig. 2. Effect of panaxydol on BPmetabolite-diol-epoxide-dGuo adduct formation of ICR mice *in vivo*. Comparison of DNA adducts in liver of untreated and panaxydol(40 μ moles/kg b.w.) treated mice. The mice were killed 24hr. after an i.v. dose of $[^3\text{H}]$ BP(65 mCi/1.05 μ moles/kg b.w.). Tissues were pooled from 3 mice. AP: acetophenone BPN: butyrophene

Table 1. Effect of panaxydol on BP-diol epoxide-dGuo adduct formation of ICR mice *in vivo*.

Peak No.		I	II	III	IV	V
DNA adduct	BP phenoloxide: DNA adduct		(1) BPDE I: dGuo adduct	(+) BPDE I: dGuo adduct	BPDE II: dGuo adduct	
Peak DPM/fraction	C	10 (14.6%)	23.3(34%)	15.7 (23%)	12.6(18.4%)	6.8(10%)
No.	T	7.3(14.6%)	16 (32%)	12.2(24.5%)	7.3(14.7%)	7 (14%)
	T/C	0.73	0.69	0.78	0.58	1.03

* Numbers in parenthesis represent percent of total adducts which are sum of dpm for peaks I-IV.

여한 ICR mice에서의 *in vivo* DNA-BP metabolite adduct들의 생성을 관찰한 결과를 보여주고 있다. Standard adduct인 BP-diol epoxide: Guanine adduct를 marker로 사용하지 않은 동일 HPLC elution 조건에서 standard marker들 사이에 나타나는 4개의 peak들을 확인한 바에 따르면, peak I, II, III, IV는 각각 BP-phenol oxide-DNA adduct(또는 BP-diol-epoxide-dCyt. adduct), (-)BP-diol epoxide I: dGuo adduct, (+)BP diol epoxide I: dGuo adduct, 그리고 BP-diol epoxide II: dGuo adduct들로 추정된다. Table 1에 요약된 각 peak들의 dpm을 비교해 본 결과 (-)BP-7, 8-diol로부터 생성되는 major dGuo adduct인 peak III은 대조군보다 약 22% 감소되었고, minor adduct인 peak II는 대조군의 69%로 감소되었다. 그리고 (+)BP-7, 8-diol로부터 생성되는 minor adduct인 peak IV는 오히려 가장 많이 감소하여 대조군의 58%를 나타내었다. 그러나 (+)BP-7, 8-diol들로부터 생성되는 major adduct인 (+)syn-BP-diol epoxide I은 대조군과 시험군 모두에서 *in vivo* DNA adduct로 나타나지 않았다. 이러한 결과는 panaxydol이 (±)BP-7, 8-diol로부터 일반적으로 생성되는 adduct들 중 major보다는 minor adduct들의 생성억제에 더 많이 관여했음을 보여준다. 따라서, panaxydol이 BP 대사에 직접적이기 보다는 간접적으로 관여했을 가능성을 시사해 주고 있다.

Monooxygenase system들에 의한 BP-7, 8-diol의 산화의 stereochemistry에 관한 연구결과³⁷⁾에 따르면 일반적으로, (-)BP-7, 8-diol이 anti-BP-7, 8-diol-9, 10-oxide로 더 우선적으로 전

환된다. 즉 Table 1의 결과는 panaxydol이 BP monooxygenase system을 선택적으로 유도시켜 BP-7, 8-diol 산화의 stereochemistry에 기여한 결과³¹⁾일 수도 있으며 panaxydol에 의해 induction된 epoxide hydratase²⁰⁾의 BP-7, 8-oxide에 대한 stereospecific한 성질에 기인한 것일 수도 있다.

또한, Panaxydol이 monooxygenase system에는 별다른 영향을 주지 않고²⁰⁾ prostaglandin synthetase에 의한 BP의 산화를 억제³²⁾시킨 결과일 수도 있다.

요 약

PAH계 화합물들의 Bay region diol epoxide들의 target tissue에 대한 결합은 암유발과 관련되어 있다. 본 논문에서는 ICR mice의 간에서의 BP-DNA-adduct 생성에 미치는 polyacetylene 화합물인 panaxynol과 panaxydol의 효과를 조사하였다. Panaxynol과 panaxydol을 전처리한 ICR mice의 간 마이크로솜을 포함하는 incubation system은 calf thymus DNA에 대한 BP binding을 뚜렷이 감소시켰다. [³H]-BP(300 μCi/21 nmoles/0.1 ml DMSO, i. v.)를 mice에 주사 후 24시간 후에 간 DNA에서의 방사능을 측정하였다. HPLC에 의해 cochromatography한 두개의 standard marker(acetophenone, bytyrophenone)들 사이에 나타나는 DNA adduct들을 잠정적으로 확인한 결과 (-)BP-7, 8-diol로부터 생성되는 major adduct인 (+)BP-diol epoxide I: dGuo adduct(peak II)는 대조군보다 약 22% 감소된 반면에 minor adduct인 (-)BP-diol

epoxide I : dGuo adduct(peak III)는 대조군의 69%로 감소되었다. 그리고 (+)BP-7, 8-diol로부터 생성되는 minor adduct인 BP-diol epoxide II : Guo adduct(peak IV)는 대조군의 58%로 감소되었다. 이러한 결과는 panaxydol이 (±) BP-7, 8-diol로부터 일반적으로 생성되는 adduct들 중 major보다는 minor adduct들의 생성에 더 많이 관여했음을 보여준다.

인 용 문 헌

1. Miller, J.A.: *Cancer Res.* **30**, 559 (1970).
2. Brookes, P. and Lawley, P. D.: *Nature(Londen)*, **202**, 781 (1964).
3. Buening, M.K., Wislocki, P.G., Levin, Yagi, H., Thakker, D.R., Akagi, H., Koreeda, M., Jerina, D.M and Conney, A.H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 5358 (1978).
4. Slaga, T.J., Bracken, W.J., Gleason, G., Levin, W., Yagi, H., Jerina, D.M. and Conney, A.H.: *Cancer Res.*, **39**, 67 (1979).
5. Macnicoll, A.D., Easty, G.C., Neville, A.M., Grover, P.L. and Sims, P.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**, 1599 (1980).
6. Stamfer, M.R., Bartholomew, J.C., Smith, H.S. and Bartley, J.C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 6251 (1981).
7. Pruess-schwartz, D., Baird, W.M., Nikbakht, A., Merrick, B.A. and Selkirk, J.K.: *Cancer Res.* **46**, 2697 (1986).
8. Phillips, D.H. and Grover, P.L.: *Cancer Res.* **45**, 4167 (1985).
9. Moore, C.J., Pruess-schwartz, D., Mauthe, R.J., Gould, M.N. and Baird, W.M.: *Cancer Res.* **47**, 4402 (1987).
10. Alexandrov, K., Sala, M. and Rojas, M.: *Cancer Res.* **48**, 7132 (1988).
11. Anderson, N.W., Boroujerdi, M. and Wilson, A.G.E.: *Cancer Res.* **41**, 4309 (1981).
12. Ashurst, S.W. and Cohen, G.M.: *Int. J. Cancer*, **27**, 357 (1981).
13. Boroujerdi, M., Kung, H.C., Wilson, A.G.E. and Anderson, M.W.: *Cancer Res.* **41**, 951 (1981).
14. Eastman, A., Sweetnam, J. and Bregnick, E.: *Chem. Biol. Interact.* **23**, 345 (1978).
15. Ioannous, Y.M., Wilson, A.G.E. and Anderson, M.W.: *Cancer Res.* **42**, 1199 (1982).
16. Phillips, D.H., Grover, P.L. and Sims, P.: *Int. J. Cancer*, **22**, 487 (1978).
17. Kulkarni, M.S. and Anderson, M.W.: *Cancer Res.* **44**, 97 (1984).
18. Anderson, M.W., Boroujerdi, M. and Wilson, A.G.E.: *Cancer Res.* **41**, 4309 (1981).
19. Das, M., Khan, W.A., Asokan, P., Biokers, D.R. and Hasan, M.: *Cancer Res.* **47**, 767 (1987).
20. Park, J.K., Kim, S. Il, and Lee, C.B.: *Korean J. Biochem.*, **21**(5) (in press)
21. 김신일 : "인삼의 항암성분에 관한 연구"(박사학위논문), 12(1988).
22. Pelkonen, O., Boobis, A.R., Yagi, H., Jerina, D.M. and Nebert, D.W.: *Mol. Pharmacol.*, **14**, 306 (1978).
23. Murmur, J.A.: *J. Mol. Biol.*, **3**, 208 (1961).
24. Pelling, J.C., Slaga, T.J. and Digiovanni, J.: *Cancer Res.* **44**, 1081 (1984).
25. Jefcoate, C.R.: *Biological basis of detoxification* **2**, 51 (1983).
26. Soda, D.M. and Levy, G.: *J. Pharma. Sci.*, **64**, 1928 (1975).
27. Das, M., Mukhtar, H., Bik, D.P. and Bickers, D.R.: *Cancer Res.* **47**, 760 (1987).
28. Nagao, M., Yahagi, T., Honda, M., Seino, Y., Matsushima, T. and Sugimura, T.: *Proc. Japan Acad.* **53**, 34 (1977).
29. Levitt, R.C., Kegrarerend, C., Nebert, D.W., and Pelkonen, O.: *Biochem. Biophys. Res. Com.* **79**, 1167 (1977).
30. Williams, D.E., Miranda, C.L. and Bahler, D.R.: *Biochem. Pharmacol.*, **3**, 2443 (1983).
31. Cooper, S.S., Grover, P.L. and Sims, P.: *Progress in Drug metabolism* **7**, 316 (1983).
32. Marnett, L.J. and Reed, G.A.: *Biochemistry* **18**, 2923 (1979).
33. Slaga, T.J., Viaje, A., Bracken, W.M., Berry, D.L., Fischer, S.M., Miller D.R. and Leeler, S.M.: *Cancer Lett.* **3**, 23 (1977).
34. Kapitulnic, J., Wislocki, P.G., Levin, W., Yagi, H., Jerina, D.M. and Conney, A.H.: *Cancer Res.* **39**, 354 (1978).

35. Brookes, P. and Lawley, P.D.: *Nature(London)*, **202**, 781 (1964).
36. Park, J.K. and Kim, S.I.: *Korean J. Ginseng Sci.* Vol. 13 (1989) (in press).
37. Thakker, D.R., Yagi, H., Akagi, H., Koreeda, M., Lu, A.Y.H., Levin, W., Wood, A.W., Conney, A.H. and Jerina, D.M.: *Chem. Biol. Interact.* **16**, 281 (1977).