

Vinyl Carbamate Epoxide와 2'-(4-Nitrophenoxy)oxirane으로 유발된 돌연변이에 대한 친핵성 물질 및 해독작용 효소에 의한 억제

박광균 · 이자현 · 김혜원 · 김종우* · 김윤수*

연세대학교 치과대학 구강생물학교실, *의과대학 생화학-분자생물학교실
(1997. 6. 24 접수)

Inhibition of Vinyl Carbamate Epoxide- and 2'-(4-Nitrophenoxy)oxirane-induced Mutagenicity by Various Nucleophilic Compounds and Detoxifying Enzymes

Kwang-Kyun Park, Ja-Hyun Lee, Hae-Won Kim, Jong-Woo Kim* and Yoon-Soo Kim*

Department of Oral Biology, Yonsei University College of Dentistry and

*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Yonsei University of College of Medicine

ABSTRACT : The drugs or xenobiotics introduced to the body, are detoxified through the process of biotransformation in the body. In this process, most of the insoluble compounds become more polar, soluble and easily excretable. But, parts of introduced materials are metabolized to highly reactive electrophilic carcinogens through activation pathways. These metabolites are toxic and can react with DNA, RNA and proteins which are nucleophilic compounds. The objective of this study is to illustrate the deactivation pathways of two highly reactive epoxide compounds, vinyl carbamate epoxide (VCO) and 2'-(4-nitrophenoxy)oxirane (NPO). They are the ultimate electrophilic carcinogens of ethyl carbamate(urethane) and 4-nitrophenyl vinyl ether, respectively. In this research, we studied the inhibition of the mutagenic activities of VCO or NPO by nucleophiles [glutathione(GSH) and N-acetylcysteine(NAC)], detoxifying enzymes[epoxide hydrolase and glutathione-S-transferase(GST)] and intracellular organelles (microsomes and cytosol). In addition we also tested the suppression of DNA adducts formation by GSH and NAC. The results are summarized as follow.

1. The microsomes and cytosol which contain epoxide hydrolase and GST, respectively, decreased the mutagenicity of VCO (74% and 95%, respectively), and NPO (35% and 93%, respectively). The nucleophilic GSH and NAC decreased the mutagenicity by 86% (VCO) and 80% (NPO), 76% (VCO) and 40% (NPO), respectively.

2. The purified epoxide hydrolase decreased the mutagenicity of two epoxides in a dose-dependent manner, and GSH also decreased the mutagenicity in the presence of GST.

3. Formation of two DNA adducts, 7-(2'-oxoethyl)guanine (OEG) and N2,3-ethenoguanine(EG), were compared in the presence of calf thymus DNA and epoxide (VCO or NPO) *in vitro* system. The amounts of DNA adducts were decreased in the presence of GSH (25% and 29% in VCO, 32% and 29% in NPO), and NAC (14% and 16% in VCO, 21% and 11% in NPO), respectively.

From these results, it is concluded that the ultimate carcinogenic metabolites, VCO and NPO, can be made in the body, but much of them may be inactivated and detoxified by the nucleophilic GSH, NAC and detoxifying enzymes (epoxide hydrolase and GST). Therefore, by these mechanism, the formation of DNA adducts and mutagenic activities of these two epoxides may be lowered *in vivo*.

I. 서 론

암 분야 연구에서 궁극적 목표는 정상 세포가 어떻게 세포형질을 변환하여 양성 및 악성종양으로 되는지 이해하는 데 있다. 일반적으로 이러한 세포형질 변환은 세포의 성장과 분화에 관여하는 하나 이상의 유전자가 정상조절로부터 이탈되어 일어난다고 생각한다. 이들 유전자들은 정상 성인이 되어도 계속적으로 단백질로 전사되어 작용하는 유전자일 수도 있고, 배발생(embryogenesis)이나 성장과정 등, 일정시기에만 표현되는 유전자일 경우도 있다. 1914년 Boveri는 암세포에서 염색체의 형태가 변형되어 나타나는 경우가 자주 있으며, 이러한 염색체 변형이 세포형질을 변환시키는 데 있어 중요한 역할을 한다고 하였다. 이것을 좀더 현대적 개념으로 바꾸면, Boveri의 체세포 돌연변이(somatic mutation) 학설은 다음과 같이 요약할 수 있다. 발암물질은 DNA와 반응하여 손상을 야기할 수 있는 DNA 부가물(adduct)을 만들고, 이것이 정상으로 회복(repair)되지 않으면 DNA 복제 과정 중에 Watson-Crick 모델(1953a,b)의 A=T, G≡C 염기쌍을 이루지 못하고, 잘못된 염기 쌍을 이루어 세포분열시 DNA 복제과정 중에 DNA 상에 돌연변이를 일으키게 되며, 이 과정은 비가역적이기 때문에 그대로 유전자상에 돌연변이를 지니게 된다. 이러한 돌연변이가 하나 이상의 유전자에 영향을 주게 되면 세포 형질이 변형되어 암을 유발할 수 있다는 가설이다.

물질문명의 발달과 더불어 많은 화학물질들이 만들어졌으며, 이들 화학물 중 많은 것이 종양을 유발하거나 돌연변이성을 유발하는 물질로 작용을 한다. 다양한 종류의 돌연변이 유발물질이 DNA를 손상시킴으로써 암이 유발된다고 보고하였다(Ames, 1979). 이들 돌연변이 유발물질에 대한 노출은 여러 가지 요인에서 기인된다. 여러 가지 경로로 체내에 들어온 이 물질들은 혈행을 따라 이동하여 표적 세포내로 이동한 다음 이물질 대사 효소에 의하여 생물형질전환(biotransformation)되어 대부분은 해독과정을 거쳐 배설되나, 일부는 암을 일으키는 데 있어 여러 가지 생체내 대사과정을 통하여 활성화되어 최종 친전자성 발암물질(ultimate electrophilic carcinogen)로 바뀌게 되고, 이들은 체내에 존재하는 친핵성 물질(nucleophilic substance)인 핵산이나 단백질과 결합하여 종양을 유발하게 된다. 이러한 대사 형질 전환에 관여하는 효소는 크게 두 가지로 나눌 수 있다. Phase I 효소계(cytochrome P 450 system, flavin-monooxygenase, epoxide hydrolase, esterase, amidase 등)는 외부로부터 들어온 화학물질에 기능기(-OH, -SH, -NH₂, -COOH)를 붙여 주거나 변환시켜 주는 효소이고, 또 다른 하나는 phase II 효소계(UDP-glucuronyl transferase, glutathione-S-transferase, methylase, acetylase 등)로 모체 화합

물(parent compounds)이나 중간 대사산물에 glutathione(GSH)이나 glucuronic acid와 같은 생체내에 존재하는 친핵성 물질을 결합하여 축합(conjugation)시키는 반응이다. 이들 대사형질전환을 거치는 도중에 외부로부터 들어온 불용성 화학물질들은 보다 극성을 띄어 물에 잘 녹을 수 있으며, 결과적으로 쉽게 배설될 수 있어서 해독작용을 도와주게 된다. 그러나 이러한 과정에서 형성된 중간 대사산물들 중에는 반응성이 강한 중간 대사산물이 있어, 이들이 배설되기 전에 생체내에 존재하는 친핵성 물질인 DNA나 RNA, 또는 단백질과 먼저 결합하는 경우에는 오히려 독성을 나타내게 된다. 즉, phase I 효소계에 의해 만들어진 대사 중간 산물들은 두 가지 서로 다른 운명을 겪을 수 있다. 중간 대사 산물 가까이에 phase II 효소계가 위치하는 경우에는 이들은 축합반응을 거쳐 세포로부터 체외로 배출될 수 있으며, 또 다른 경우에는 생성된 중간 대사 산물의 반응성이 강하여 이 대사 중간산물이 세포내 단백질이나 핵산과 공유 결합을 형성하여 세포내 생리적 및 유전적 특성을 변화시켜 버리는 것이다. 후자의 경우가 화학물질에 의한 발암, 돌연변이, 기형유발 및 약제독성과 깊은 관계를 가지고 있다.

여러 가지 실험적 상황에서 화학 발암 물질의 효과는 항길항적 작용에 의하여 감소될 수 있으며(Troll 등, 1987; de Flora, 1988; Ito 및 Hirose, 1989; Park 등, 1997; Surh 등, 1995), 이러한 관찰은 암의 예방 가능성을 높여 주었다(Greenwald 등, 1986; McGinnis, 1988-1989; Lee 등, 1995; Oh 등, 1995). 암 예방 물질(chemopreventive agent)의 종류는 많은 경우 그 작용 기전을 모르기 때문에 분류하기가 어려우나, 동물의 발암 모델에 근거하여 각 발암단계에 따라 분류되기도 한다(Wattenberg, 1985). 지금까지 연구된 여러 가지 암 예방 물질들 중 많은 경우에 phase I 및 phase II 효소계에 작용하여 이들의 효소 활성화에 영향을 주어 암발생을 억제하는 것으로 보고되었다. 즉, Phase I 효소계의 활성을 억제하는 물질(Fiala 등, 1977; Wargovich, 1987; Sapmins 등, 1988; Hong 등, 1991; Tadi 등, 1991)이나, phase II 효소계의 유발물질로, glutathione-S-transferase (GST)의 강력한 유도제인 dithiolthione, oltipratz(Kensler 등, 1983; Davidson 등, 1990; Rao 등, 1991) 등이 개발되었다. 또한 최종 친전자성 발암물질의 제거제로 친핵성인 N-acetylcysteine (NAC) (de Flora 등, 1984, 1985, 1986)도 개발되었다.

본 실험에서는 발효식품에 함유된 천연 발암물질로, urethane(ethyl carbamate)의 대사산물인 vinyl carbamate epoxide (VCO)(Park 등, 1990, 1993)와 고무공업이나 플라스틱 산업에서 원료물질로 많이 사용되는 vinyl ether 화학물 중, 합성물질인 4-nitrophenyl vinyl ether(NPVE)의 최종 발암물질인 2-(4-nitrophenoxy)oxirane(NPO)(Park 등, 1997)(Fig. 1)의 비활성화 과정을 밝혀 암 발생을 억제하는 기전을 밝히고, 이를 근거로

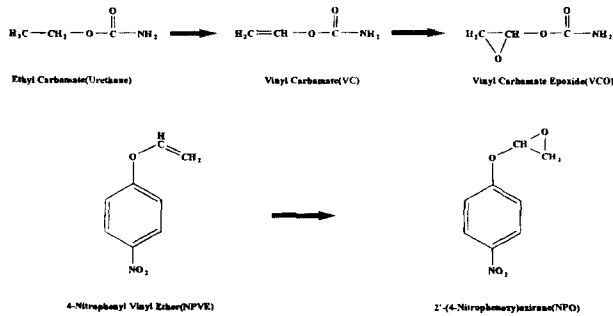


Fig. 1. Possible metabolic activation pathways of ethyl carbamate and 4-nitrophenyl vinyl ether.

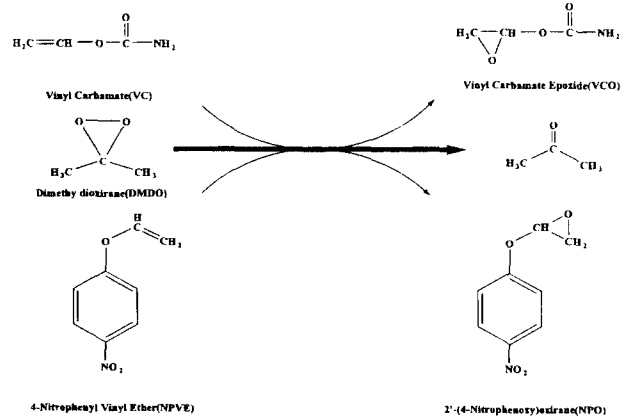


Fig. 2. Synthesis of vinyl carbamate epoxide and 2'-(4-nitrophenoxy)oxirane.

한 암 예방 물질의 개발에 대한 기초지식을 얻고자 본 실험을 계획하였다. 즉, 생체내 친핵성 물질인 GSH나 이와 관련된 친핵성 물질인 NAC, 해독작용 효소를 함유하고 있는 세포내 소기관인 마이크로솜과 세포질, 해독작용에 관여하는 효소인 epoxide hydrolase와 GST가 최종 친전자성 발암물질인 epoxide들의 돌연변이성을 억제하는지를 관찰하였으며, 친핵성 화합물들(GSH와 NAC)이 최종 친전자성 발암물질에 의한 DNA 부가물 형성을 억제하는지 관찰하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

1.1 실험동물

실험에 필요한 세포내 소기관을 얻기 위하여 체중 10 g 내외의 자성 ICR계 생쥐를 삼양사료에서 나오는 쥐사료를 먹여 사육하였고 수돗물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

1.2 시약

Vinyl chlorformate, potassium monoperoxy sulfate, 4A molecular sieve, ammonia gas, 2-bromoethyl-4-nitrophenyl vinyl ether, potassium-t-butoxide, 2,3-epoxypropanol, 4-(4'-nitrobenzyl)pyridine은 Aldrich Chemical Company(Milwaukee, WI, USA)로부터 구입하였으며, 기타 시약은 Sigma Chemical Company(St. Louis, MO, USA)와 국내 시약 대리점으로부터 구입하였다.

1.3 화합물합성

본 실험에 사용하기 위한 VCO 및 NPO는 모체화합물인 vinyl carbamate(VC)나 NPVE과 강력한 산화물질인 dimethyldioxirane(DMDO)을 반응하여 합성하였으며(Fig. 2), 산화제로 사용되는 DMDO는 Adam 등(1987)의 방법으로 합성하였다.

합성된 화합물은 원소분석, 용해점 측정, 질량분석, NMR 분석 등을 통하여 99% 이상의 순도를 갖는 것을 실험에 사용하였다. VCO를 만들기 위하여 우레탄의 중간 대사산물인

VC는 Dahl 등(1980)의 방법으로 vinyl chloroformate와 암모니아 가스를 반응시켜 합성한 후 ethyl ether에서 재결정하여 사용하였다. VCO는 Park 등(1990, 1993)의 방법으로 VC와 DMDO를 이용하여 0 °C에서 합성하였다. NPVE는 Dombroski 및 Hallensleben(1972)의 방법을 변형하여 합성하였으며, NPO는 Isobe 등(1985)의 방법을 변형한 Park 등(1997)의 방법으로 합성하였다. 최종 친전자성 발암물질인 VCO나 NPO는 DNA와 반응하여 Fig. 3의 반응을 통하여 7-(2'-oxoethyl)guanine(OEG)과 N²,3-ethenoguanine(EG)이 만들어 지기 때문에 실험에 필요한 OEG는 Piper 등(1980)의 방법으로, EG는 Oesch 및 Doerjex(1982)의 방법으로 합성하였다.

2. 실험방법

2.1 돌연변이 실험

6~8주의 자성 ICR계 생쥐를 사용하여 3-methylcholanthrene을 50 mg/Kg body weight로 복강에 주사한 후 2일 후에 생쥐를 희생하여 간장을 적출하고, 균등액으로 만들어 9,000×g에서 원심분리하여 상층액(S-9 fraction)을 만들었고, 마이크로솜 분획은 S-9을 105,000×g에서 1시간 동안 원심분리하여 얻었으며, 상층액을 세포질 분획으로 사용하였다. 투석 세포질(dialyzed cytosol)은 0.1 M potassium phosphate 완충액, pH 7.4로 24시간 동안 여러번 완충액을 갈아 주면서 투석한 것을 사용하였다. Microsomal epoxide hydrolase를 함유하는 마이크로솜 분획은 같은 완충액에 마이크로솜을 녹여 사용하였으며, 변성된 마이크로솜 분획은 이 용액을 100 °C에 30분간 가열변성한 다음 식혀서 사용하였다.

돌연변이 실험은 *Salmonella typhimurium* TA1535를 가지고 Ames 등(1975)의 top agar 방법을 변형시킨 Swanson 등(1979)

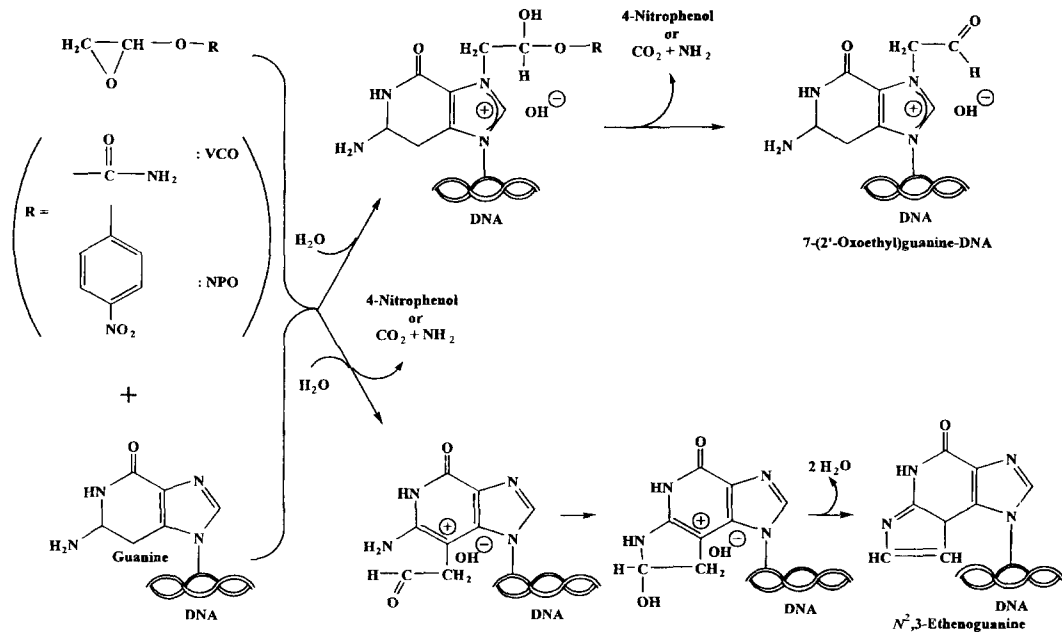


Fig. 3. Possible reactions of 2'-(4-nitrophenoxy)oxirane or vinyl carbamate epoxide with DNA to form base adducts.

의 방법으로 시행하였다. 돌연변이에 대한 억제정도를 보기 위하여 GSH, NAC, 마이크로솜 분획 및 세포질 분획이나 epoxide hydrolase 효소 및 GST 효소를 가하거나 뺀 상태에서 돌연변이 실험을 하였다.

2.2 DNA 부가물 형성 실험

Calf thymus DNA 8 mg을 4 ml의 완충용액에 녹이고, 여기에 1 ml 완충용액에 녹인 각각의 VCO나 NPO와 같은 epoxide 용액(VCO, 3 mg; NPO, 5 mg)을 가하고 6시간동안 실온에서 반응시켜 DNA 부가물을 형성하도록 한 후, 1 N HCl 0.2 ml를 가하여 반응을 중지시켰다. DNA 부가물을 정량하기 위하여 반응액을 18시간 동안 37 °C에서 배양하여 산 가수분해 하였다.

2.3 High performance liquid chromatography(HPLC)

산 가수분해 용액으로부터 예상되는 DNA 부가물을 HPLC로 정량하였다. HPLC는 형광검출기가 부착된 것을 이용하였으며, DNA 부가물의 측정은 Fedtke 등(1989)의 방법으로 역상(reverse phase; RP)인 RP-18 precolumn(7 µm particle size, 3.2 mm × 15 mm, BrownLee Labs, Santa Clara, CA, USA)이 연결된 Chromegabond Reverse Phase Strong Cation Exchange (RP-SCX) column(5 µm particle size, 4.6 mm × 200 mm, ES Industries, Marlton, NJ, USA)을 이용하였으며, 용출 완충용액으로는 10% acetonitrile이 함유되고 formic acid로 pH가 2.8로 조정된 75 mM ammonium formic acid 완충용액을 이용하며, 용출속도는 0.5 ml/min이고, 이때 excitation wave length는 255 nm이고, emission cut-off filter는 345 nm이다.

III. 결 과

1 친핵성 물질 및 마이크로솜과 세포질이 돌연변이성에 미치는 영향

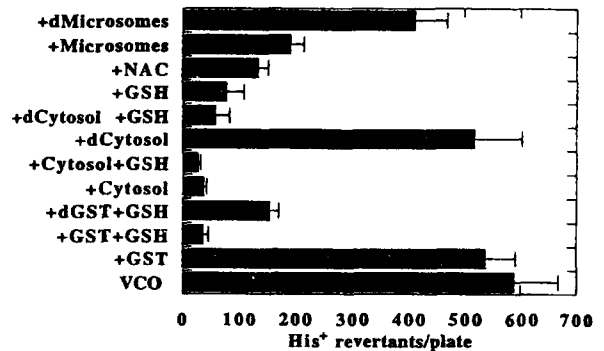


Fig. 4. Effects of glutathione, N-acetylcysteine, glutathione-S-transferase, mouse liver microsomes and cytosol on the mutagenicity of vinyl carbamate epoxide toward *Salmonella typhimurium* TA1535. The control incubation mixture contained VCO(50 nmol) and *Salmonella typhimurium* TA1535(4.6×10^9 cells) in 600 µl of 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. The other incubation mixtures included one or more additional ingredients: GSH (glutathione; 1.2 µmol), NAC (N-acetylcysteine; 1.2 µmol), GST (glutathione-S-transferase; 50 µg), dGST (denatured GST; 50 µg), Microsomes (60 µg protein), dMicrosomes (denatured microsomes; 60 µg protein), Cytosol (60 µg protein) and dCytosol (dialyzed cytosol; 60 µg protein).

세포 소기관이 돌연변이성에 미치는 영향을 보기 위하여 epoxide hydrolase 효소를 함유하고 있는 마이크로솜과 GST를 함유하고 있는 세포질, 세포내에 다량으로 존재하는 친핵성 물질인 GSH와 이와 관련된 친핵성 물질인 NAC의 영향을 보았

다. 세포내 친핵성 물질인 GSH(1.2 μmol)와 NAC(1.2 μmol)은 VCO(GSH; 86%와 NAC; 76%)와 NPO(GSH; 80%와 NAC; 40%) 모두에서 현저한 돌연변이 억제효과를 보였다. Epoxide hydrolase 효소를 함유하고 있는 마이크로솜(60 μg protein)의 경우에 발암물질에 의한 돌연변이성을 억제하였으나(VCO, 74%; NPO, 35%) 변성된 마이크로솜(dMicrosomes)은 돌연변이성 억제 정도가 감소되었다(VCO, 37%; NPO, 26%). GST를 함유한 세포질 실험에서는 세포질(60 μg protein)의 경우에도

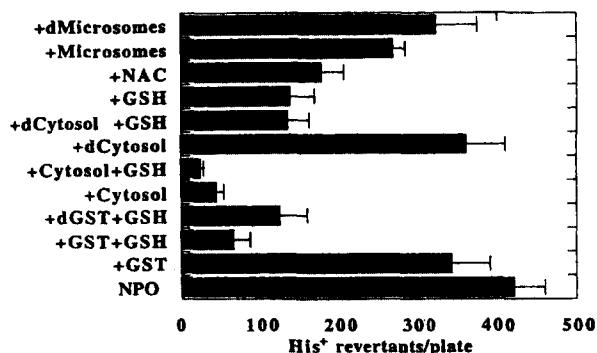


Fig. 5. Effects of glutathione, *N*-acetylcysteine, glutathione-*S*-transferase, mouse liver microsomes and cytosol on the mutagenicity of 2'-(4-nitrophenoxy)oxirane toward *Salmonella typhimurium* TA1535. The control incubation mixture contained VCO (50 nmol) and *Salmonella typhimurium* TA1535 (4.6×10^9 cells) in 600 μl of 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. The other incubation mixtures included one or more additional ingredients: GSH (glutathione; 1.2 μmol), NAC (*N*-acetylcysteine; 1.2 μmol), GST (glutathione-*S*-transferase; 50 μg), dGST (denatured GST; 50 μg), Microsomes (60 μg protein), dMicrosomes (denatured microsomes; 60 μg protein), Cytosol (60 μg protein) and dCytosol (dialyzed cytosol; 60 μg protein).

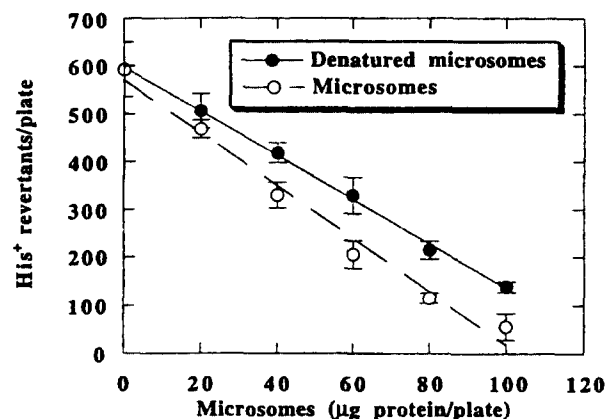


Fig. 7. Effects of mouse liver microsomes on NPO mutagenicity toward *Salmonella typhimurium* TA1535. The mouse liver microsomes were obtained from female ICR mouse as previously described (Leithauser *et al.*, 1990). Denatured microsomes were prepared by boiling at 100 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min. Incubation mixture contained NPO (60 nmol) and *Salmonella typhimurium* TA1535 (3.8×10^9 cells).

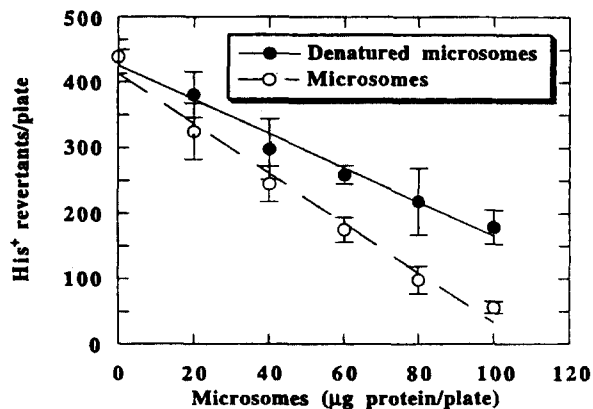


Fig. 6. Effects of mouse liver microsomes on VCO mutagenicity toward *Salmonella typhimurium* TA1535. The mouse liver microsomes were obtained from female ICR mouse as previously described (Leithauser *et al.*, 1990). Denatured microsomes were prepared by boiling at 100 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min. Incubation mixture contained VCO (50 nmol) and *salmonella typhimurium* TA1535 (4.1×10^9 cells).

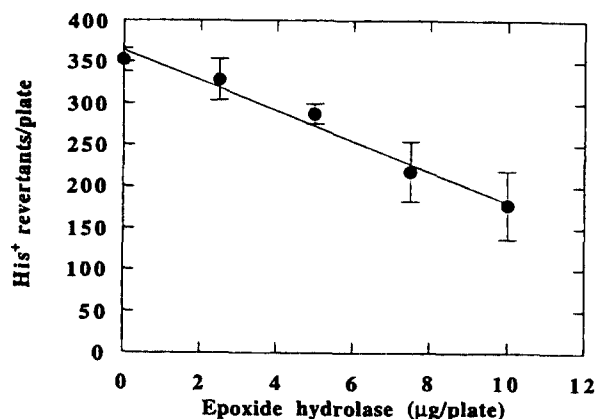


Fig. 8. Effects of human microsomal epoxide hydrolase on VCO mutagenicity toward *Salmonella typhimurium* TA1535. The human microsomal epoxide hydrolase was purchased from Genetest Corp (Woburn, MA, USA). Incubation mixture contained VCO (50 nmol) and *salmonella typhimurium* TA1535 (3.2×10^9 cells).

돌연변이성이 억제되었으나(VCO, 95%; NPO, 93%), 세포질 내에 있는 GSH를 제거하기 위하여 24시간 동안 투석한 다음 사용된 투석 세포질(dCytosol)의 경우에는 돌연변이성이 감소되었다(VCO, 22%; NPO, 28%). 그러나 여기에 다시 GSH(1.2 μmol)을 가한 경우에는 다시 돌연변이성이 회복되었다(Fig. 4 및 5). 이러한 작용이 효소자체의 작용인지, 아니면 세포질에 함유된 GSH의 작용인지 확인하기 위하여 순수 분리된 GST(50 μg)를 사용한 실험에서 GST 자체는 돌연변이성에 영향을 주지 못하였으나, 여기에 GSH를 가한 경우에는 돌연변이 억

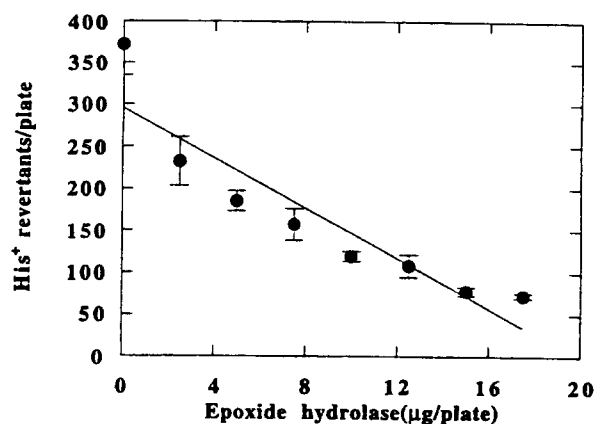


Fig. 9. Effects of human microsomal epoxide hydrolase on NPO mutagenicity toward *Salmonella typhimurium* TA1535. The human microsomal epoxide hydrolase was purchased from Genetest Corp (Woburn, MA, USA). Incubation mixture contained NPO (60 nmol) and *Salmonella typhimurium* TA1535 (3.2×10^9 cells).

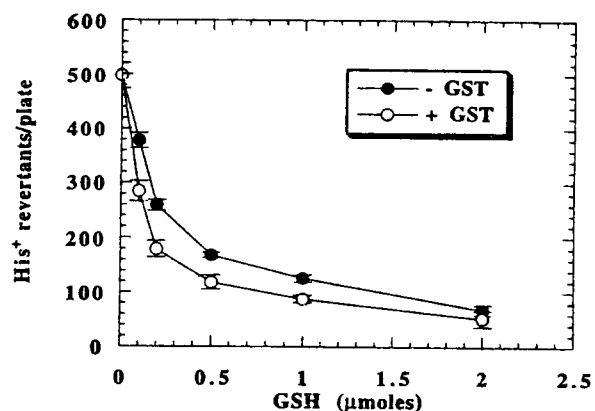


Fig. 10. Effects of GSH on VCO mutagenicity toward *Salmonella typhimurium* TA1535 in the presence or absence of GST. The GST (human placental glutathione-S-transferase) was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Incubation mixture contained VCO (50 nmol), GSH (glutathione; indicated quantities), GST (50 μg) and *Salmonella typhimurium* TA1535 (3.1×10^9 cells).

제 효과가 현저하였다(VCO, 94%; NPO, 84%). 이 효과가 단지 가해진 GSH의 효과인지, 아니면 효소와의 병용 효과인지 관찰하기 위하여 변성된 GST(dGST)를 이용한 실험에서, GST+GSH 처리군보다 dGST+GSH 처리군에서 돌연변이 억제 능력이 떨어졌다(VCO, 73%; NPO, 71%). Epoxide hydrolase 효소를 함유하는 마이크로솜의 효과를 보다 확인하기 위하여 변성된 마이크로솜과 마이크로솜의 용량 의존성(dose-response)에서 효소활성이 없는 변성된 마이크로솜에서도 돌연변이성이 관찰되었으나 변성되지 않은 마이크로솜에 비해

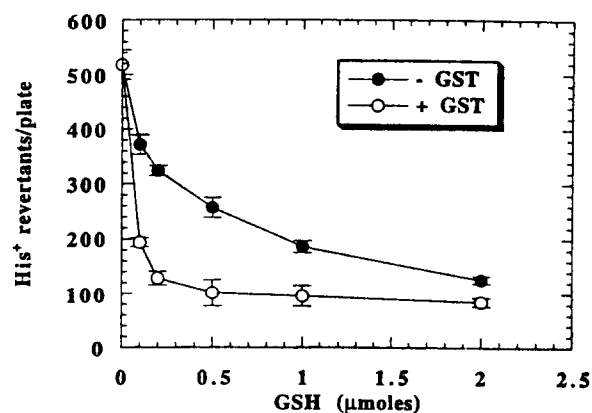


Fig. 11. Effects of GSH on NPO mutagenicity toward *Salmonella typhimurium* TA1535 in the presence or absence of GST. The GST (human placental glutathione-S-transferase) was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Incubation mixture contained NPO (60 nmol), GSH (glutathione; indicated quantities), GST (50 μg) and *Salmonella typhimurium* TA1535 (3.1×10^9 cells).

Table 1. Adducts formed in reaction of VCO with calf thymus DNA *in vitro*

DNA adduct ^a	VCO only	VCO+GSH	VCO+NAC
OEG	31,200 \pm 600 ^b	23,500 \pm 750	26,800 \pm 150
EG	5,400 \pm 50	3,650 \pm 40	4,250 \pm 80

^aDNA adduct formation by VCO (3 mg) in the presence of absence of glutathione (GSH; 2 μmol) and *N*-acetylcysteine (NAC; 2 μmol) with 8 mg calf thymus DNA at 37 $^{\circ}\text{C}$. HPLC separations were performed with liquid chromatography equipped with model SF770 Spectroflow Monitor fluorescence detector (Kratos, Schoeffel Division, Westwood, NJ, USA). For the analyses of OEG and EG, a Chromomegabond reverse-phase column (5 μm particle size, 4.6 mm \times 250 mm, ES Industries, Marton, NJ, USA) was used after passage of the DNA acid hydrolysates through a RP-18 precolumn (7 μm particle size, 3.2 mm \times 15 mm, Brownlee Labs. Santa Clara, CA, USA) essentially as described by Fedtke *et al.* (1989).

^bAverage \pm standard error (pmol/mg protein).

Table 2. Adducts formed in reaction of NPO with calf thymus DNA *in vitro*

DNA adduct ^a	NPO only	NPO+GSH	NPO+NAC
OEG	29,400±3,150 ^b	21,000±250	24,800±950
EG	4,600±450	3,250±20	4,100±20

^aDNA adduct formation by NPO (5 mg) in the presence or absence of glutathione (GSH; 2 μ mol) and *N*-acetylcysteine (NAC; 2 μ mol) with 8 mg calf thymus DNA at 37 °C. HPLC separations were performed with liquid chromatography equipped with model SF770 Spectroflow Monitor fluorescence detector (Kratos, Schoeffel Division, Westwood, NJ, USA). For the analyses of OEG and EG, a Chromomegabond reverse-phase column (5 μ m particle size, 4.6 mm×250 mm, ES Industries, Marton, NJ, USA) was used after passage of the DNA acid hydrolysates through a RP-18 precolumn (7 μ m particle size, 3.2 mm×15 mm, Brownlee Labs. Santa Clara, CA, USA) essentially as described by Fedtke *et al.* (1989).

^bAverage±standard error (pmol/mg protein).

억제정도가 감소되었다(Fig. 6 및 7).

2. Phase I 및 phase II 효소에 의한 돌연변이성 억제 효과

Genetest Corp.(Woburn, MA, USA)에서 구입한 microsomal epoxide hydrolase를 이용한 돌연변이성 억제 실험에서 VCO 및 NPO 모두에서 용량 의존적으로 돌연변이성을 억제하였다(Fig. 8 및 9).

사람 태반에서 분리된 GST 효소가 존재하거나 존재하지 않는 상태에서 돌연변이성은 GSH에 용량 의존적으로 돌연변이성을 억제하였으며, GST가 존재하는 경우에 보다 강하게 돌연변이성을 억제하였다(Fig. 10 및 11).

3. 친핵성물질인 GSH 및 NAC가 DNA 부가물 형성에 미치는 영향

Calf thymus DNA와 최종 친전자성 발암물질과의 *in vitro* 반응에서 형성되는 DNA 부가물로 형성되는 OEG와 EG를 HPLC로 정량한 결과 돌연변이성을 억제하였던 GSH(2 μ mol) 및 NAC(2 μ mol)는 모두 30~40% 정도의 DNA 부가물 형성을 억제하였다(Table 1 및 2).

IV. 고 찰

발효식품속에 흔히 존재하는 우레탄은 cytochrome P450에 의해 중간 대사 발암물질인 VC로 활성화되며, 최종 친전자성 발암물질로 VCO가 형성된다는 보고(Dahl 등, 1978, 1980; Leithauser 등, 1990)에 근거하여 VCO가 합성되었으며(Park

등, 1990), 그 생물학적, 생화학적 성질이 구명되고, 이화합물이 더이상의 활성화 없이도 돌연변이성과 발암성을 가지며, VCO는 가수분해되어 glycolaldehyde로 분해된다는 사실이 보고되었다(Park 등, 1993). 이와 관련하여 NPVE가 cytochrome P450에 의하여 epoxide 화합물인 NPO로 대사되고, 물에 의해 glycolaldehyde와 4-nitrophenol로 분해된다고 보고되었으며(Isobe 등, 1985), 돌연변이성을 갖는다고 보고되었다(Sone 등, 1989). 이러한 성질은 VC나 VCO 화합물과 비슷하여 이화합물을 보다 순수하게 합성하여 NPVE와 NPO가 발암성이 있음을 보고하였다(Park 등, 1997). 일반적으로 vinyl ether는 불안정한 epoxide 중간 산물을 만들어 대사된다고 보고되었다(Murphy 등, 1981, 1983; Isobe 등, 1985; Park 등, 1995). 또한 vinyl ether 화합물은 강력한 돌연변이성과 발암성을 갖는다(Osterman-Golkar 등, 1977; Watbe 등, 1978a,b; Guengerich 등, 1991; park 등, 1997). 이러한 vinyl ether 화합물은 우리 생활용품 가운데 흔히 쓰이는 플라스틱 제품이나 고무제품의 원료 물질로 사용된다.

본 실험에서는 생물화학적 성질이 아주 비슷하면서도 구조적으로 큰 차이가 있는 최종 친전자성 발암물질인 두가지 epoxide- VCO와 NPO - 화합물을 이용하여 이들 화합물의 불활성화 과정을 밝히려고 하였다.

친핵성 물질인 GSH나 NAC가 돌연변이성 활성화도에 미치는 영향을 관찰시 두 화합물 모두에서 강력한 돌연변이성 억제 효과를 관찰하였다. 이는 친핵성 물질인 GSH나 NAC가 최종 발암물질인 친전자성 epoxide 화합물과 비효소적으로 결합을 하기 때문이다.

Epoxide hydrolase는 epoxide를 dihydrodiol로 전환 시켜주는 효소이다(Oesch, 1973). Epoxide hydrolase(epoxide hydrase 또는 epoxide hydratase)는 microsomal cytochrome P450 monooxygenase에 아주 근접되어 있는 가수분해 효소로 arene oxides 나 aliphatic epoxide에 물을 가해 *trans*-1,2-dihydrodiol로 전환시키는 과정을 촉매하며, 만들어진 dihydrodiol 화합물은 epoxide 보다 친전자성이 약하여 반응성이 떨어진다(Sipes 및 Gandolfi, 1991). Arene oxide는 일반적으로 불안정하여 해당 페놀 화합물로 재정리(rearrangement)되어 phase II 효소계에 의해 축합반응을 일으켜 해독이 된다(Sipes 및 Gandolfi, 1991). 지금까지 적어도 4가지 서로 다른 형태의 epoxide hydrolase가 보고되었다(Ariyoshi 등, 1994). 즉, 두가지 마이크로 줍 형태(외부로부터 들어온 xenobiotics를 가수분해시키는 microsomal epoxide hydrolase와 cholesterol 5,6-epoxide나 steroid epoxide를 가수분해시키는 cholesterol epoxide hydrolase)와 두가지 세포질 형태(다양한 종류의 epoxide를 가수분해시키는 cytosolic epoxide hydrolase와 leukotriene A₄를 leu-

kotriene B₄로 가수분해시키는 leukotriene A₄ epoxide hydrolase)로 구분된다(Daly 등, 1972; Gill 등, 1974; Watabe 등, 1981; McGee 및 Fitzpatrick, 1985). 이들중에 microsomal epoxide hydrolase가 대부분의 발암물질이나 세포질내 친전자성 epoxide의 불활성화에 중요하다(Oesch, 1980). 세포내 소기관인 마이크로솜 처리시에 약 70% 정도 돌연변이성이 억제되었으나, 변성된 마이크로솜을 처리시에는 돌연변이성 억제 정도가 훨씬 감소되었다. 이는 마이크로솜에 함유된 epoxide hydrolase에 의해 친전자성 발암물질인 epoxide들이 dihydrodiol로 불활성화 되었음을 시사해주나, 변성된 마이크로솜에 의해서도 돌연변이성 억제 효과가 나타나는 이유는 본 실험으로는 설명할 수 없다. 다만 마이크로솜에 있는 단백질들도 친핵성 물질이기 때문에 친전자성인 epoxide들이 비특이적으로 단백질과 작용하여 이용 가능한 발암물질이 줄어든 결과로 생각할 수 있다. 마이크로솜의 용량 의존적 실험에서도 마이크로솜이 증가할수록 돌연변이성 억제 효과도 증가되었으며, 변성된 마이크로솜의 경우에도 용량 의존적으로 돌연변이성이 억제되나, 변성되지 않은 마이크로솜에 비해 그 정도가 훨씬 감소된 것을 볼 수 있었다. 또한 순수분리된 microsomal epoxide hydrolase를 이용한 용량 의존적 실험에서도 epoxide hydrolase 증가에 따라 돌연변이성이 억제됨을 볼 수 있다. 이는 epoxide 화합물이 비효소적으로도 불활성화 되나 마이크로솜내에 있는 효소에 의해 더욱 더 많은 최종 발암물질이 분해된 결과로 생각할 수 있다.

GST는 외부로부터 들어온 화합물의 NAC 유도체(mercapturic acid) 형성의 첫 단계를 촉매시키는 효소이다(Mantle 등, 1987). GST는 세포질과 마이크로솜에 모두 존재하나 세포질에서 활성도가 보통 5~40배 많다(Sipes 및 Gandolfi, 1991). 이 효소반응에서는 보조인자로 GSH가 필요하다. GSH는 대부분의 포유동물 세포에 mmolar 농도로 존재하며, GST 효소와 같이 반응하거나, 또는 비효소적으로도 여러 가지 친전자성 물질과 반응하는 nucleophilic scavenger로 작용한다(Kosower 및 Kosower, 1978). GST는 친전자성 탄소원자를 함유하는 화합물과 친핵성인 GSH의 sulfhydryl기가 반응하도록 촉매하는 효소로 glutathione thiolate anion(GS-) 반응 결과로 탄소원자와 GSH의 sulfhydryl 기 사이에 thioether 결합이 형성된다(Sipes 및 Gandolfi, 1991). GSH 축합물은 cysteine 유도체로 잘라진 다음 acetylation되어 NAC 축합체로 되어 쉽게 배설된다(Sipes 및 Gandolfi, 1991).

GST를 함유하고 있는 세포질 실험에서 GSH를 함유하고 있는 세포질은 돌연변이성을 현저히 억제 하였으나, GSH를 제거한 투석(dialysis) 세포질의 경우에는 그 돌연변이성 억제 정도가 감소되었다. 그러나 여기에 GSH를 가한 경우에 다시

돌연변이성 억제 효과가 회복되는 것을 보았으며, GSH와 GST 병용 실험에서 변성된 GST를 사용한 것 보다 변성되지 않은 GST를 사용했을 때 돌연변이성 억제 정도가 더 강하였다. GST가 존재하거나 존재하지 않는 상태에서 GSH의 용량 의존적 실험에서 GSH의 농도에 따라 돌연변이 억제 효과가 증가되었으며, GST 존재시에 그 효과가 더욱 강하였다. 이는 GSH의 돌연변이 억제 능력을 GST가 효소적으로 매개하여 보다 그 효과가 강하게 나타난 것을 시사한다. Fig. 3에서 보듯이 VCO와 NPO는 *in vitro*에서 두가지 guanine 부가물을 만들 수 있다. 이들 부가물은 약산에 의해 DNA로부터 쉽게 depurination되어 유리될 수 있으며, HPLC를 이용하여 형광검출기로 정량할 수 있다(Fedtke 등, 1989). 두가지 화합물 모두에서 주 부가물로 OEG가 만들어지며, EG는 보다 소량으로 검출되었다. 주 부가물인 OEG는 DNA 전사과정에서 miscode될 가능성이 거의없이 전사과정중에 정상으로 회복될 수 있다(Barbin 및 Laib, 1985). 그러나 guanine 보다는 쉽게 depurination되기 때문에 apurinic site를 형성하여 돌연변이성을 나타낼 수도 있다(Loeb, 1985). 이에 비하여 EG는 강력한 miscoding 부가물로 작용하여 쉽게 돌연변이를 야기한다(Singer 등,

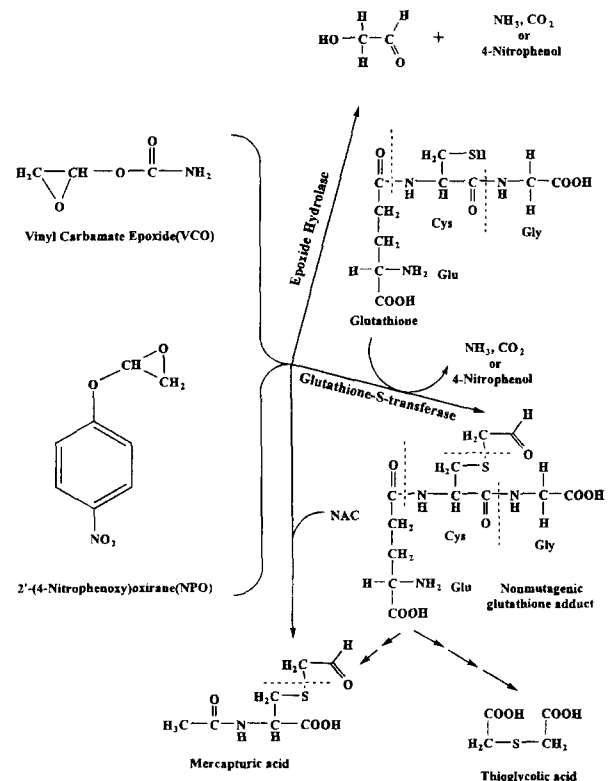


Fig. 12. Possible inactivation pathways of vinyl carbamate epoxide and 2-(4-nitrophenoxy)oxirane.

1987, 1991; Cheng 등, 1991). 이들 DNA 부가물 형성은 친핵성 물질인 GSH 및 NAC 존재시에 그 형성이 현저히 감소되었다. 이는 친핵성 물질이 DNA보다 먼저 친전자성인 epoxide와 결합하여 이용 가능한 최종 발암물질의 양을 감소 시킨 결과이다.

이상의 결과를 토대로 불활성화 과정을 Fig. 12에 표시하였다. 앞으로의 실험에서 epoxide 화합물이 GSH나 NAC와 결합하여 만들어 지는 mercapturic acid 화합물에 대한 연구가 계속되어야 하며, HPLC나 NMR을 이용하여 epoxide hydrolase에 의해 생길 수 있는 불안정한 중간 대사산물인 dihydrodiol에 대한 확인 실험이 필요하며, 또다른 축합화합물을 만드는 효소인 glucuronosyltransferase에 의한 glucuronide 축합물에 대한 실험도 진행되어야 한다.

V. 결 론

본 실험에서는 대부분의 발효식품속에 들어 있는 천연 발암물질인 우레탄의 최종 친전자성 대사 발암물질인 VCO와 고무공업의 원료물질이며, 강력한 인공 발암물질인 NPVE의 최종 친전자성 대사 발암물질인 NPO의 비활성화 과정을 연구하기 위하여 생체내에 많이 존재하는 친핵성물질인 GSH, NAC과 해독작용에 관여하는 효소인 epoxide hydrolase, GST와 이들 효소를 함유하는 세포내 소기관인 마이크로솜과 세포질을 이용하여 최종친전자성 발암물질로 유도된 돌연변이성과 DNA 부가물 형성에 대한 억제 효과를 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

VCO 및 NPO의 돌연변이성은 epoxide hydrolase를 함유하는 마이크로솜과 GST를 함유하는 세포질 분획에 의하여 VCO의 경우 각각 74%와 95%, NPO의 경우 각각 35%와 93% 감소되었으며, 친핵성물질인 GSH, NAC에 의해서도 GSH의 경우 86%와 80%, NAC 경우 76%와 40% 감소되었다. 순수 분리된 epoxide hydrolase 존재하에 VCO 및 NPO의 돌연변이성은 epoxide hydrolase에 대해 용량 의존적 양상으로 억제되었으며, 또한 GST 존재하에서도 돌연변이는 GSH에 용량 의존적 양상으로 돌연변이성이 억제되었다. VCO 및 NPO는 모두 DNA adduct인 7-(2'-oxoethyl)guanine (OEG)과 N2,3-ethenoguanine(EG)을 형성하는데 GSH의 경우 VCO에 의한 OEG 형성을 25%, EG 형성을 29% 감소시켰으며, NPO에 의한 OEG와 EG의 형성도 각각 32%와 29% 감소시켰다. NAC는 VCO에 의한 OEG 형성을 14%, EG 형성을 16% 감소시켰으며, NPO에 의한 OEG 형성과 EG의 형성도 각각 21%와 11% 감소시켰다.

이러한 결과로 보아 생체내에서 형성된 최종 친전자성 발암

물질인 VCO와 NPO는 생체내에 존재하는 친핵성물질인 GSH, 기타 친핵성 물질인 NAC 및 생체내 해독작용 효소인 GST와 epoxide hydrolase 효소에 의하여 비활성화되며, 결과적으로 DNA 부가물을 형성할 수 있는 최종 친전자성 발암물질이 감소되기 때문에 돌연변이가 억제된다고 생각할 수 있다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 한국과학재단 연구비(961-0714-094-1)과 생물공학-생물-95-04-A 연구비의 일부 지원에 의한 연구로 이에 감사드린다.

참고문헌

- Adam, W., Chan, Y.Y., Cremer, D., Gauss, J., Scheutzwow, J. and Schindler, M. (1987): Spectral and chemical properties of dimethyldioxirane as determined by experiment and ab initio calculations. *J. Org. Chem.* **52**: 2800-2803.
- Ames, B.N. (1979): Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science* **204**: 587-593.
- Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975): Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian microsomal mutagenicity test. *Mutat. Res.* **31**: 347-364.
- Ariyoshi, N., Tanaka, M., Ishii, Y. and Oguri, K. (1994): Purification and characterization of dog liver microsomal epoxide hydrolase. *J. Biochem.* **115**: 985-990.
- Cheng, K.C., Preston, B.D., Cahill, D.S., Dosanjh, M.K., Singer, B. and Loeb, L.A. (1991): The vinyl chloride DNA derivative N²,3-ethenoguanosine produces G → A transition in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 9974-9978.
- Dahl, G., Miller, J.A. and Miller, E.C. (1978): Vinyl carbamate as a promutagen and a more carcinogen analog of ethyl carbamate. *Cancer Res.* **38**: 3793-3804.
- Dahl, G., Miller, E.C. and Miller, J.A. (1980): Comparative carcinogenicities and mutagenicities of vinyl carbamate, ethyl carbamate and ethyl N-hydroxy carbamate. *Cancer Res.* **40**: 1194-1203.
- Daly, J.W., Jernia, D.M. and Witkop, B. (1972): Arene oxidase and the NIH shift: The metabolism, toxicity and carcinogenicity of aromatic compounds. *Experientia* **28**: 1129-1149.
- Davidson, N.E., Egner, P.A. and Kensler, T.W. (1990): Transcriptional control of glutathione-S-transferase gene expression by the chemopreventive agent 5-(2-pyridyl)-4-methyl-1,2-dithio-3-thione (oltipratz) in the rat liver. *Cancer Res.* **50**: 2251-2255.
- de Flora, S. (1988): Role and mechanisms of inhibitors in prevention of mutation and cancer. *Mutat. Res.* **202**: 227-

- 246.
- de Flora, S., Astengo, M., Serra, D. and Bennicelli, C. (1986): Inhibition of urethane induced lung tumors in mice by dietary *N*-acetylcysteine. *Cancer Lett.* **32**: 235-241.
- de Flora, S., Bennicelli, C., Camoirano, A., Serra, D., Romano, M., Rossi, G.A., Morelli, A. and de Flora, A. (1985): *In vivo* effects of *N*-acetylcysteine on glutathione metabolism and on the biotransformation of carcinogenic and/or mutagenic compounds. *Carcinogenesis* **6**: 1735-1745.
- de Flora, S., Bennicelli, C., Zannachi, P., Camoirano, A., Morelli, A. and de Flora, A. (1984): *In vitro* effects of *N*-acetylcysteine on the mutagenicity of direct-acting compounds and procarcinogens. *Carcinogenesis* **5**: 505-510.
- Dombroski, J.R. and Hallensleben, M.L. (1972): Preparation and purification of 4-nitrophenyl vinyl ether. *Synthesis* **693-694**.
- Fedke, N., Waljker, V.E. and Swenberg, J.A. (1989): Determination of 7-(2'-oxoethyl) guanine and *N*²,3-ethenoguanine in DNA hydrolysis by HPLC. *Arch. Toxicol. (Suppl)* **13**: 214-218.
- Fiala, E.S., Bobotas, G., Kulakis, C., Wattenberg, L.W. and Weisburger, J.H. (1977): The effects of disulfiram and related compounds on the *in vivo* metabolism of the colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine. *Biochem. Pharmacol.* **26**: 1763-1768.
- Gill, S.S., Hammock, B.D. and Casida, E.J. (1974): Mammalian metabolism and environmental degradation of the juvenoid 1-(4'-ethylphenoxy)-3,7-dimethyl-6,7-epoxy-transoctene and related compounds. *J. Agric. Food Chem.* **22**: 386-395.
- Greenwald, P., Sondik, E. and Lynch, B.S. (1986): Diet and chemoprevention in NCI's research strategy to achieve national cancer control objectives. *Annu. Rev. Public Health* **7**: 267-291.
- Guengerich, F.P., Greiger, L.E., Hogy, L.L. and Wright, P.L. (1991): *In vivo* metabolism of acrylonitrile to 2-cyanoethylene oxide, reaction with glutathione and irreversible binding to proteins and nucleic acids. *Cancer Res.* **51**: 1509-1514.
- Hong, J.Y., Smith, T., Lee, M.J., Li, W., Ma, B.L., Ning, S. M., Brady, J.F., Thomas, P.E. and Yang, C.S. (1991): Metabolism of carcinogenic nitrosamines by rat nasal mucosa and the effect of diallyl sulfide. *Cancer Res.* **51**: 1509-1514.
- Isobe, M., Sone, T. and Takabatake, E. (1985): *p*-Nitrophenyl vinyl ether, a novel substrate for the assay of cytochrome P-450 dependent olefinic epoxidation in hepatic microsomes. *J. Pharmacobiodyn.* **8**: 614-622.
- Ito, N. and Hirose, M. (1989): Antioxidants-carcinogenic and chemopreventive properties. *Adv. Cancer. Res.* **53**: 247-302.
- Kensler, T.W., Egnor, P.A., Trush, M., Buending, E. and Groopman, J.D. (1983): Modification of aflatoxin B1 binding to DNA *in vivo* in rats fed phenolic antioxidants ethoxyquin and dithiolthione. *Carcinogenesis* **6**: 759-763.
- Kosower, N.S. and Kosower, E.M. (1978): The glutathione status of the cell, *Int. Rev. Cytol.* **54**: 109-160.
- Lee, R.C., Shylyankevich, M., Park, K.K., Liem, a., Miller, J. A. and Surh, Y.J. (1995): Effects of capsaicin on metabolism, mutagenicity and tumorigenicity of some chemical carcinogens. *Proc. Am. Asso. Cancer Res.* **34**: 594.
- Leithauser, M.T., Liem, A., Stewart, B.C., Miller, E.C. and Miller, J.A. (1990): 1,*N*⁶-ethenoadenosine formation, mutagenicity and murine tumor induction as indicators of the generation of an electrophilic epoxide metabolite of the closely related carcinogens ethyl carbamate (urethane) and vinyl carbamate. *Carcinogenesis* **11**: 463-473.
- Loeb, L.A. (1985): Apurinic sites as mutagenic intermediates. *Cell* **40**: 483-484.
- Mantle, T.J., Pickett, C.B. and Hayes, J.D. (1987): *Glutathione-S-transferase and Carcinogenesis*. London, Taylor and Francis, pp.3-18.
- McGee, J. and Fitzpatrick, F. (1985): Enzymatic hydration of leukotriene A4: Purification and characterization of a novel epoxide hydrolase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **260**: 12832-12837.
- McGinis, J.M. (1988-1989): National priorities in disease prevention. *Issues Sci. Technol.* **5**: 46-92.
- Murphy, M.J., Dunbar, D.A., Guengerich, F.P. and Kaninsky, L.S. (1981): Destruction of highly purified cytochromes P-450 associated with metabolism of fluorinated ether anesthetics. *Arch. Biochem. Biophys.* **212**: 360-369.
- Murphy, M.J., Dunbar, D.A. and Kaninsky, L.S. (1983): Acute toxicity of fluorinated ether anesthetics. Role of 2,2,2-trifluoroethanol and other metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **71**: 84-92.
- Oesch, F. (1973): Mammalian epoxide hydrates: inducible enzyme catalyzing. the inactivation of carcinogen and cytotoxic metabolites derived from aromatic and olefinic compounds. *Xenobiotica* **3**: 305-340.
- Oesch, F. (1980): Microsomal epoxide hydrolase. In Jacoby WB ed. *Enzymatic basis of detoxication*. New York, Academic Press, pp.277-290.
- Oesch, F. and Doerjler, G. (1982): Detection of *N*²,3-ethenoguanine in DNA after treatment with chloroacetaldehyde *in vitro*. *Carcinogenesis* **3**: 663-665.
- Oh, S.H., Park, K.K., Kim, S.Y., Lee, K.J. and Lee, Y.H. (1995): Evaluation of chemopreventive effects of dietary selenium-rich egg on mouse skin tumor induced by 2'-(4-nitrophenoxy)oxirane and 12-*O*-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. *Carcinogenesis* **16**(12): 2995-2998.
- Osterman-Golker, S., Hultmark, D., Segerback, D., Calleman, C.J., Gothe, R., Egrenberg, L. and Wachtmeister, C.A. (1977): Alkylation of DNA and proteins in mice exposed to vinyl chloride. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **76**: 259-266.

- Park, K.K., Liem, A., Stewart, B.C. and Miller, J.A. (1993): Vinyl carbamate epoxide, a major strong electrophilic, mutagenic and carcinogenic metabolite of vinyl carbamate and ethyl carbamate(urethane). *Carcinogenesis* **14**: 441-450.
- Park, K.K., Surh, Y.J. and Miller, J.A. (1995b): Chemoprotective properties of chlorophyllin against vinyl carbamate, *p*-nitrophenyl vinyl ether and their electrophilic epoxides. *Cancer Lett.* **94**: 33-40.
- Park, K.K., Surh, Y.J., Stewart, B.C. and Miller, J.A. (1990): Synthesis and properties of vinyl carbamate epoxide, a possible ultimate electrophilic and carcinogenic metabolite of vinyl carbamate and ethyl carbamate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169**: 1094-1098.
- Park, K.K., Sohn, Y.W., Liem, A., Kim, H.J., Stewart, B.C. and Miller, J.A. (1997): The electrophilic, mutagenic and tumorigenic activities of phenyl- and 4-nitrophenyl vinyl ethers and their epoxide metabolites. *Carcinogenesis* **18**: 431-437.
- Piper, J.R., Laseter, G. and Montgomery, PO'B Jr (1980): Synthesis and NMR spectra of 7-hydroxyalkyl guanosinium acetates. *J. Med. Chem.* **23**: 357-364.
- Rao, C.V., Tokomo, K., Kelloff, G. and Reddy, B.S. (1991): Inhibition by dietary oltipratz of experimental intestinal carcinogenesis induced by azoxymethane in male F344 rats. *Carcinogenesis* **12**: 1051-1055.
- Singer, B., Kusmierek, J.T., Folkman, W., Chavez, F. and Dosanjh, M.K. (1991): Evidence for the mutagenic potential of the vinyl chloride induced adduct, *N*²,3-etheno-deoxyguanosine, using a site-directed kinetic assay. *Carcinogenesis* **12**: 745-747.
- Singer, B., Spengler, S.J., Chavez, F. and Kusmierek, J.T. (1987): The vinyl chloride-derived nucleoside, *N*²,3-etheno-guanosine, is a highly efficient mutagen in transcription. *Carcinogenesis* **8**: 745-747.
- Sipes, G. and Gandolfi, A.J. (1991): *Biotransformation of toxicants*. In Amdur, M.O., Doull, J. and Klassen, C.D., eds. *Casarett and Doull's Toxicology-Science of poisons*. New York, Pergamon Press, pp.106-107.
- Sone, T., Isobe, M. and Takabatake, E. (1989): Comparative studies on the metabolism and mutagenicity of vinyl ethers. *J. Pharmacobio-Dyn.* **12**: 345-351.
- Sparmins, V.L., Barany, G. and Wattenberg, L.W. (1988): Effects of organosulfur compounds from garlic and onions of bezo[a]pyrene induced neoplasia and glutathione-S-transferase activity in the mouse. *Carcinogenesis* **9**: 131-134.
- Surh, Y.J., Park, K.K. and Shlyankevich, M. (1995): Inhibitory effects of chlorophyllin on chemically induced mutagenesis and carcinogenesis. *Ann. NY. Acad. Sci.* **768**: 246-249.
- Swansosn, A.B., Chambliss, D.D., Blomquist, J.C., Miller, E. C. and Miller, J.A. (1979): The mutagenicity of safrole, estragole, eugenol, *trans*-anethol and some of their known or possible metaolites for *Salmonella typhimurium* mutants. *Mutat. Res.* **60**: 143-153.
- Tadi, P.P., Teel, R.W. and Lu, B.H.S. (1991): Organosulfur compounds of garlic modulate mutagenesis, metabolism and DNA binding of aflatoxin B1. *Nutr Cancer* **15**: 87-95.
- Troll, W., Wiesner, R. and Frenkel, K. (1987): Anticarcinogenic action of protease inhibitors. *Adv. Cancer Res.* **49**: 265-283.
- Wargovich, M.J. (1987): Dialyl sulfide flavor component of garlic (*Allium sativum*), inhibits dimethyl-hydrazine induced colon cancer. *Carcinogenesis* **8**: 487-489.
- Watabe, T., Isobe, M., Yoshikawa, K. and Takabatake, E. (1978a): Studies on metabolism and toxicity of styrene. II. Mutagenesis in *Salmonella typhimurium* by metabolic activation of styrene with 3-methylcholanthrene pretreated rat liver. *J. Pharmacobio Dyn.* **1**: 98-104.
- Watabe, T., Isobe, M., Yoshikawa, K. and Takabatake, E. (1978b): Studies on metabolism and toxicity of styrene. I. Biotransformation of styrene to styrene glycol via styrene oxide by rat liver microsomes. *J. Pharmacobio-Dym.* **1**: 301-309.
- Watabe, T., Kanai, M., Isobe, M. and Ozawa, N. (1981): The hepatic microsomal biotransformation of δ^3 -steroids to 5 α , 6 β -glycols via α - and β -epoxides. *J. Biol. Chem.* **256**: 2900-2907.
- Wattenberg, L.W. (1985): Chemoprevention of cancer. *Cancer Res.* **45**: 1-8.

Vinyl Carbamate Epoxide와 2'-(4-Nitrophenoxy)oxirane으로 유발된 돌연변이에 대한 친핵성 물질 및 해독작용 효소에 의한 억제

박광균 · 이지현 · 김혜원 · 김종우* · 김윤수*

연세대학교 치과대학 구강생물학교실, *의과대학 생화학·분자생물학교실

적 요

체내로 들어온 약물이나 외부 화합물들은 생물형질전환 과정을 거쳐 대부분 해독이 된다. 즉, 이과정을 거치는 도중에 불용성인 물질들은 보다 극성을 띄어 물에 잘 녹을 수 있으며, 결과적으로 쉽게 배설될 수 있어 해독작용을 도와주게 된다. 그러나 유입된 물질의 일부는 암을 일으키는 데 있어 활성화 과정에 관여하여 반응성이 강한 최종 친전자성 발암물질로 대사가 된다. 이 대사물질은 생체내에 존재하는 친핵성 물질인 핵산이나 단백질과 먼저 결합하는 경우에는 오히려 독성을 나타내게 된다. 본 연구에서는 대부분의 발효식품속에 들어 있는 우레탄(ethyl carbamate)의 최종 친전자성 대사 발암물질인 vinyl carbamate epoxide(VCO)와 고무공업의 원료물질이며, 인공 발암물질인 4-nitrophenyl vinyl ether의 최종 친전자성 대사 발암물질인 2'-(4-nitrophenoxy)oxirane(NPO)의 비활성화 과정을 연구하기 위해 생체내에 많이 존재하는 친핵성 물질[glutathione(GSH), N-acetylcysteine(NAC)], 해독작용에 관여하는 효소[epoxide hydrolase, glutathione-S-transferase(GST)]와 이들 효소를 함유하는 세포내 소기관[마이크로솜과 세포질]에 의한 최종 친전자성 발암물질의 돌연변이성과 DNA 부가물 형성에 대한 억제 효과를 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다. VCO 및 NPO의 돌연변이성은 epoxide hydrolase를 함유하는 마이크로솜과 GST를 함유하는 세포질 분획에 의하여 VCO의 경우 각각 74%와 95%, NPO의 경우 각각 35%와 93% 감소되었으며, 친핵성물질인 GSH, NAC에 의해서도 GSH의 경우 86%와 80%, NAC 경우 76%와 40% 감소 되었다. 순수 분리된 epoxide hydrolase 존재하에 VCO 및 NPO의 돌연변이성은 epoxide hydrolase에 대해 용량 의존적 양상(dose-dependent manner)으로 억제되었으며, 또한 GST 존재하에서도 돌연변이는 GSH에 용량 의존적 양상으로 억제되었다. VCO 및 NPO는 모두 DNA adduct인 7-(2'-oxoethyl)guanine(OEG)과 N²,3-ethenoguanine(EG)을 형성하며, GSH의 경우 VCO에 의한 OEG 형성을 25%, EG 형성을 29% 감소시켰으며, NPO에 의한 OEG와 EG의 형성도 각각 32%와 29% 감소 시켰다. NAC는 VCO에 의한 OEG 형성을 14%, EG 형성을 16% 감소시켰으며, NPO에 의한 OEG 형성과 EG의 형성도 각각 21%와 11% 감소 시켰다. 이러한 결과로 보아 생체내에서 형성된 최종 친전자성 발암물질인 VCO와 NPO는 생체내에 존재하는 친핵성물질인 GSH, NAC 및 생체내 해독작용 효소인 GST와 epoxide hydrolase 효소에 의하여 비활성화되며, 결과적으로 이용 가능한 최종 친전자성 발암물질을 감소시켜, DNA 부가물 형성이 감소되기 때문에 돌연변이가 억제되리라 사료된다.