

녹차 추출물에 의한 니코틴의 코티닌으로 전이 촉진

경윤주 · 이동희

서울시립대학교 생명과학과

Enhanced conversion to cotinine from nicotine by green tea extract

Yoon-Joo Kyung and Dong-Hee Lee. (Department of Life Science, The University of Seoul, Seoul, 139-743)

ABSTRACT : Cigarette smoking deals a harmful effect directly to smokers and even to non-smokers through environmental tobacco smoke. The major damaging component in cigarette smoke is nicotine which converts to various carcinogens. Among the carcinogenic metabolites, nitrosamine-4-(methylnitrosamino)-1- (3-pyridyl)-1- butanone (NNK) is responsible for many types of lung cancers. Recent studies report that activation of NNK is markedly inhibited in the presence of cotinine, a safer metabolite from nicotine. It is well known that tea extract have potentials to prevent cancers. This study aims to correlate green tea's potential for cancer prevention with an accelerated formation of cotinine. In the presence of tea extract, a nicotine to cotinine conversion was studied in established cell lines and xenopus oocytes. Among three lines of cell used, PLC/PRF5 and 293 cells showed a fast turnover from nicotine to cotinine while HepG2 cell line showed a marginal difference between groups treated and non-treated with tea extract. A microinjection procedure using Xenopus oocyte was utilized to probe for the effect of tea extract in accelerating nicotine conversion to cotinine. According to this procedure, tea extract's unusual potential for converting nicotine to cotinine is also substantiated. Overall, this present study indicated that tea extract have an unusual effect on conversion of nicotine to cotinine in cells.

Key words: cigarette smoking, green tea, nicotine, cotinine, cancer prevention

서 론

흡연을 통하여 인체에 유입되는 니코틴은 흡연자 자신은 물론 공기중의 담배연기 (environmental tobacco smoke)로 간접흡연자에게 많은 피해를 초래한다. 인체 내에서 니코틴은 폐암, 각종 순환기 및 소화성 질환을 유발하는 요인으로 작용하고 있다. 이는 국민 의료비 증대 및 삶의 질 저하라는 부정적 결과를 유발한다. 니코틴은 강한 독성을 가진 무색 또는 연황색 액체로서 즉각적 위해를 초래하는 물질로 분류되어 있다. 흡연의 위험성은 잘 알려져 있는 바와 같이 폐암을 비롯한 각종 암질환, 고혈압, 구강질환, 위산과다분비 촉진에 따른 각종 위장질환, 동맥경화증을 비롯한 각종 순환계 질환, 노화 촉진 등에 중요한 요소로 작용하고 있다¹⁻⁵⁾.

흡연으로 인하여 우리나라에서 호흡기계 질환이 크게 늘어나고 있는 실정이며 사망자의 원인으로 볼 때 호흡기 일반질환이 3.9%, 폐암 2.9%의 증가율을 보이고 있다. 특히 폐암의 경우 흡연자와 비흡연자의 폐암발생율은 2:1정도로 흡연자의 폐암 발생율이 월등히 높다^{2,3)}. 이러한 이유로 선진국에서는 담배를 줄이는

인구가 급격히 늘어나고 있으나, 우리나라에서는 오히려 청소년 및 여성의 흡연인구가 증가하고 있다⁶⁻¹¹⁾. 따라서, 담배의 위험성을 감소시킬 수 있는 의약품의 개발이 시급한 실정이나, 의약품의 개발은 오랜 시간이 걸리며, 많은 자금이 소요된다. 이러한 면에서 현재 한의학 및 동양의학에서 밝혀진 바와 같이 천연물의 새로운 기능을 이용한 신기능 식품 및 식품첨가물을 개발하고 활용하는 것이 비교적 간단하고 신속한 대안으로 고려되어야 하며 또한 매우 시급한 사항이라 할 수 있다.

니코틴에서 유래되는 대표적인 발암물질인 Nitrosamine-4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) 성분은 A/J mouse에 폐암을 발생시킨 것으로 보고되고 있다¹²⁻¹⁸⁾. 그러나, 폐암이 유도된 A/J mouse을 이용하여 녹차추출물의 폐암발생억제효과를 검사한 결과, 약 45%의 감소율을 나타내었다. 이러한 사실은 녹차성분이 NNK에 의한 폐암발생을 억제하는 기작을 갖고 있음을 알 수 있다. 최근의 연구보고에 의하면, 천연녹차의 추출물은 환경호르몬, 각종 중금속의 독성을 제거하는 데 탁월한 효능을 나타내고 있다¹⁹⁻²¹⁾. 녹차 성분중의 카테킨이 니코틴의 독성을 중화시킨다는 산발적인 보고가 있다. 담배와 녹차와의 관계

가 거론되기 시작한 것은 담배 1개피를 피우면 몸 속의 비타민 C가 25mg정도 소모된다는 보고로부터 기인하였다. 실제로 녹차에는 레몬의 5~8배의 비타민 C가 포함되어 있으며, 또 카테킨 성분은 매우 낮은 농도에서도 니코틴과 결합하여 침전을 형성하기 때문이다. 전통적으로 녹차는 상습 흡연자를 니코틴의 위해로부터 보호한다고 알려져 있으나, 이에 대한 과학적이고 체계적인 보고는 전무한 실정이다.

본 연구는 지금까지 산발적으로 보고된 녹차의 니코틴 제거 및 중화기능을 체계적으로 연구하여 이를 검증하고자 한다. 그러나, 녹차의 암예방 효과에 대한 기작은 거의 알려져 있지 않다. 최근의 보고는 니코틴의 주요대사산물인 코티닌이 안정한 물질임과 동시에 NNK의 활성 및 형성을 억제하는 것으로 알려져 있다²²⁻²³. 본 연구는 세포내의 니코틴의 대사에 있어, 코티닌으로의 전이도에 녹차의 추출물이 미치는 영향에 대하여 연구하였다. 녹차의 추출물은 시험관에서 직접혼합한 경우와 세포주를 이용한 실험에서, 니코틴이 코티닌으로의 전이에 긍정적 영향을 주었다. 이 결과는 녹차의 성분중에 니코틴의 여러 대사경로 중에서 코티닌의 대사를 유도하는 물질이 함유되어 있음을 의미한다. 이 결과는 아울러, 녹차의 암예방의 가능성에 대하여 설명할 수 있는 기전을 제시한다. 이를 위하여, 본 연구는 세포내의 니코틴의 대사에 있어, 코티닌으로의 전이도에 녹차의 추출물이 미치는 영향에 대하여 연구하였다. 녹차의 추출물은 시험관에서 직접혼합한 경우와 세포주를 이용하여 니코틴이 코티닌으로의 전이에 끼치는 영향에 대하여 연구하였다. 이 실험의 결과는 녹차의 성분 중에 니코틴의 여러 대사경로 중에서 코티닌의 대사를 유도하는 물질을 함유하고 있을 가능성을 제시할 수 있을 것이며, 아울러, 녹차의 암예방의 가능성에 대하여 설명할 수 있는 기전을 제시할 것으로 판단된다.

재료 및 방법

생물체내에서 니코틴의 대사를 연구하기 위하여 니코틴을 위시한 관련대사산물의 양을 정확히 측정하는 것이 매우 중요하다. 이를 위하여 주로 니코틴, 코티닌, thiocyanate, carboxyhemoglobin 등을 측정하여 왔다. 이중 코티닌을 측정하는 것이 아래의 세 가지 이유에 의거하여 정확한 것으로 알려져 있다. 니코틴 (반감기가 약 30분)에 비해 cotinine은 15시간 정도로 안정하여 측정에서 오차영향을 대폭 줄일 수 있으며, thiocyanate는 음식물에 다양하게 존재하므로, 외부요인에 의하여 오차가 크고, carboxyhemoglobin 측정법은 일산화탄소에 의해 변동이 심하기 때문이다.

본 실험에서 사용된 니코틴 (-)는 시그마에서 구입하였다. 니코틴 용액의 stock solution은 10 mM이며, 모든 실험에 있어 니코틴의 농도는 1 mM로 정하여 사용하였다. Stock solution은 빛에 의한 파괴를 방지하기 위하여 알루미늄 호일을 씌워, 냉암소에 보관하였다. 녹차의 추출물은 약 1.18g의 녹차조성물을 95°C의

중류수 900ml로 추출하였다. 추출된 원액은 섭씨 4도의 냉암소에 보관하였으며, 모든 실험에 사용된 추출액은 추출한 지 1주일 이상 경과되지 않은 것을 사용하였다. 아래에서 언급되는 실험에서 별도의 언급이 없으면 니코틴 1 mM과 녹차 추출물 120 μ l을 5ml의 배양액에 첨가한 다음 실험에 임하였다. 보조성분을 첨가한 녹차추출물도 사용하였는데, 이는 생삼 100 g을 멸균된 증류수 100 ml에서 분쇄하여, 원심 분리한 후, 추출액을 필터로 멸균하여 사용한 것이다. 첨가시에는 항상 녹차 추출액의 1/10 (v/v) 비율로 첨가하여 사용하였다. 위와 같이 준비된 니코틴과 녹차 추출물을 보조성분의 첨가 또는 비 첨가의 조건하에서 언급된 농도로 사용하여 아래의 직접혼합법, 세포주 및 제노푸스 미숙란을 이용하여 독성의 해독 작용을 검증하는 데 사용하였다.

Cotinine의 정량법

니코틴은 약 30여분의 반감기를 갖고 있으나, cotinine의 경우 15시간 이상의 반감기를 가지고 있어 니코틴의 무독화 생성물로의 전이를 안정적으로 측정할 수 있다. Cotinine 측정을 위하여 보통 Gas Chromatography (GC), High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Radioimmunoassay (RIA), 혹은 Direct Barbituric Acid (DBA)방법등이 사용되어 왔다 (Brunnemann, 1992). GC 및 HPLC 방법은 상당한 정확성을 갖는 대신 많은 수의 sample을 측정하기 매우 불편하며, RIA는 방사성 동위원소를 사용하여야 하는 부담감으로 본 검증 시스템에서는 제외되었다. 이에 본 실험에서는 시험관내에서의 직접혼합법 또는 니코틴의 세포내 유입후 대사가 진행되는 정도를 DBA법을 이용하기로 하였다. 그러나, 이 방법은 다량의 샘플을 취급하기에 어려움이 있어, cotinine의 양을 보다 간편하며 정확히 측정할 수 있는 Barlow 등에 의해 1987년에 개발된 방법을 변형하여 사용하였다²⁴⁻²⁷.

Cotinine 정량법의 실시를 위하여, 1ml polypropylene tube에 200 μ l의 sample 혹은 standard를 buffer 또는 증류수에 넣는다. 이때 실험결과 신뢰성을 갖기 위하여 한 sample당 3개의 tube를 사용하였다. 측정대상시료에 100 μ l의 4M sodium acetate (pH 4.7) buffer, 40 μ l의 1.5M KCN, 40 μ l의 0.4M chloramine T, 200 μ l의 78mM barbituric acid in acetone (50/50, v/v)을 순서대로 넣고 10초동안 잘 혼합한다. 이 혼합물을 상온 (25°C)에서 15분간 반응시키고 여기에 40 μ l의 1 M sodium metabisulfite를 넣어 반응을 중지시킨다. 흡광도는 490nm에서 측정하여 standard cotinine과 비교하여 정량하였다.

직접혼합법

녹차 추출물의 니코틴에서 코티닌으로의 전이 조절 기능은 니코틴과 녹차의 두 요소를 직접 혼합한 후 코티닌의 생성량을 측정하였다. 소형 튜브 (1.5ml)에 1 mM의 니코틴 (-) 200 μ l와 동량의 녹차 추출물을 보르텍스로 혼합한 후 실온에서 0, 10, 20,

30, 60, 120분 경과 후 생성된 cotinine의 양을 측정하였다. 이 때 사용한 온도는 섭씨 15, 25, 37도이다. 서로 다른 온도를 사용하는 이유는 코티닌의 생성 촉진에 관여하는 과정이 순수한 화학적 반응인지 아니면, 효소등의 생물학적 촉매가 관여하는 사항을 검증하기 위한 것이었다.

세포배양

사용된 세포주는 hepatocyte에서 연유하는 것으로 사용하였다. 즉 HepG2와 PLC/PRF5 cell를 사용하였다. 1주일간 배양하여 소량씩 분주하여 Stock cell을 제조한다. 정량을 위하여 분주된 간 세포를 1주일간 배양하고 다시 니코틴이 함유된 배지에서 1일간 배양한다. 이 세포에 효능 검증을 할 대상물인 추출물 또는 분획을 첨가하여 배양한 후, 다양한 시간대 별로 배양한 후 원심분리하여 상층액을 회수하고, 상층액에 포함된 cotinine을 DBA법으로 정량하였다.

세포배양에 사용된 것은 100% confluency의 상태에서 동일하게 분획된 상태에서 세포배양을 1주일간을 추가로 실시한 다음, 모든 실험 대상 세포가 100% confluency에 도달한 후 니코틴 또는 녹차의 추출물을 처리하였다. 모든 실험에 있어 니코틴의 처리는 1 mM의 농도를 사용하였다. 녹차의 추출물은 약 120 μ l를 투입한 다음 세포를 배양하였다. 아울러 녹차성분이 세포 내에 이미 흡수되어 존재할 경우, 신규 유입되는 니코틴의 중화의 효용성을 검증하기 위하여, 녹차의 추출물이 함유된 배지 (배지 1ml 당 120 μ l 첨가)에 6시간 동안 예비 배양하였다. 예비 배양이 완료된 후, 세포를 PBS로 세척한 후, 니코틴이 함유된 배지에 세포를 배양하였다.

세포배양이 각 시간대 별로 종료된 후 (0', 10', 20', 30', 60', 120') 세포는 섭씨 4도의 PBS (phosphate buffered saline)로 3-4 차례 씻어 낸 후, 트립신을 사용하지 않고 대신, 스크래퍼를 이용하여 긁어서 세포를 수확하였다. 배양액도 역시 얼음위에 보존한 다음, DBA법으로 흡광도를 측정하였다. 원심분리를 이용하여 세포가 수거된 후, 냉장 PBS 100 μ l를 넣고 초음파 분쇄기 (Vibra Cell-200; Newton, Conn., USA)로 최고의 setting (6)으로 단속적으로 30초간 파쇄한 후 DBA법을 이용하여 490nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

제노푸스 미숙란을 이용한 분해도 측정

위에서 언급한 세포주를 이용한 측정법은 시차의 문제점을 내재하고 있다. 즉, 니코틴 또는 녹차추출물이 배양액에 투입된 시간과 실제 세포 내로 침투되는 데 있어 시차의 가능성이 존재할 수 있다. 이 문제점을 개선할 수 있는 방법이 직접 주사법이다. 그러나, 세포주를 그대로 이용하는 것은 주사할 수 있는 세포수의 한계성과 세포자체의 극소성의 문제점을 갖고 있다. 이에, 제노푸스 미숙란을 이용하였다. 제노푸스는 통칭 "South African Clawed Frog"라고 불리고 있으며, 근래에는 환경 독성물질로 인

하여 초래되는 배아의 기형 발달 현상을 연구하는데 중점적으로 사용되고 있다. 미숙란은 in vivo translational system 이라하여, 신규로 발견된 단백질을 미숙란내에서 발현시키고 단백질의 구조 및 기능을 연구하는 데 주로 사용되어 왔다²⁸⁻²⁹⁾.

이 실험에 사용된 미숙란은 지름이 1.2 mm에 해당되는 발달 5단계의 것을 사용하였다. 미숙란은 모체에서 분리한 후, 섭씨 15도의 OR2 용액에서 하루정도를 배양하였다. 미숙란은 단단하고 질긴 보호막이 있다. 이 보호막은 세포밖으로부터 물질의 유입을 저해하므로 제거했다. 섭씨 15도의 배양이 종료되면, 미숙란은 니코틴 실험직전, 미세 핀셋을 이용하여, 콜라겐이 주성분인 질긴 보호막을 직접 제거하였다. 차후 많은 수의 미숙란이 필요할 때는 Collagenase Type 3 (Sigma Chemical)을 이용하여 보호막을 제거하였다.

혼합법의 경우와 같이 준비된 혼합액을 각 미숙란에 500nl를 Eppendorf micromanipulator를 이용하여 주사한 후 세포주의 실험과 같은 시간대 별로 배양한 후, 생성된 코티닌의 양을 정량하였다. 아울러, 주사기법의 효용성을 대비하기 위하여, OR2 배양액에 세포배양실험에서 사용된 니코틴 및 녹차의 농도 하에서 동일한 배양시간대 동안 녹차 추출물의 니코틴 분해 효능을 검증하였다. 사용된 온도는 섭씨 15, 25(실온), 32도의 세가지를 사용하였다. 섭씨 37도의 온도도 사용하였으나, 이 온도에서는 미숙란이 쉽게 터지는 문제가 발생하여, 32도에서 실험을 수행하였다. Homogenization은 dounce homogenizer를 이용하여 OR2에 담가 분쇄 처리하였으며, 난황은 원심분리를 통해 제거하였다. 원심분리후 상층액을 취한 다음, 코티닌은 위에서 언급한 DBA법을 이용하여 측정하였다.

결 과

본 실험에서 직접혼합법, 세포주, 및 제노푸스 미숙란을 이용하여 니코틴이 무해하며 안정적인 대사물질인 코티닌으로의 전이도를 검증하였다. 개괄적으로 볼 때, 니코틴의 코티닌으로의 전이는 녹차 추출물이 존재할 때, 가속화되는 것으로 판단된다.

녹차추출물의 니코틴 제거 효능을 인체에 무해한 코티닌의 생성도를 통하여 측정하였다. 직접혼합법의 경우 (그림 1)에서는 보조성분을 첨가하여 조형한 녹차추출물을 2배로 희석하여 니코틴과 같은 부피로 300 μ l을 넣은 후 직접 혼합한 후 생성되는 코티닌의 양을 측정하였다. 녹차 추출물의 니코틴 분해 기능은 본 두 요소를 직접 혼합하여 측정하였다. 10, 20, 30, 60, 120분 경과 후 생성된 cotinine의 양을 측정하였다. 코티닌의 생성은 녹차추출물 또는 녹차에 첨가된 보조성분의 존재하에서 가속화 되는 것으로 보인다.

이 결과는 코티닌으로의 전이에 녹차의 추출물이 효과를 주고 있다는 잠재적 증거를 제공하고 있다. 녹차의 추출물이 존재하지 않는 조건하에서는 니코틴의 분해물로의 전이가 매우 느린 편이

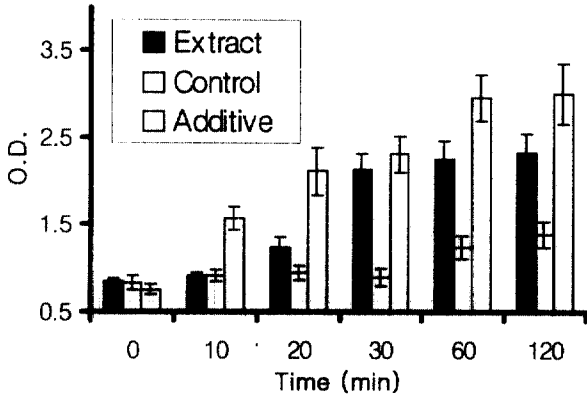


Fig. 1. Nicotine to cotinine conversion in the mixture of tea extract.

다. 즉, 10-20분 사이에서 분해물의 생성은 매우 느린 것이 관찰되었다. 반면에, 녹차 추출물의 존재 하에서는, 현격한 코티닌의 생성이 관찰되었다. 이는 녹차의 추출물이 니코틴과 시험관 상태에서 반응하여 니코틴의 분해를 가속화시킨다는 것을 입증하고 있다.

PLC/PRF5의 cell line을 이용한 세포배양실험에서도 유사한 코티닌 생성 패턴이 관찰되었다 (그림 2-1). 세포배양에 있어 각 시간대가 경과된 후 (0', 10', 20', 30', 60', 120'), 세포를 냉장된 buffer로 씻어 낸 후, scraping과 원심분리로 세포를 수거 한 후, 초음파 분쇄기로 파쇄한 후 490nm의 파장에서 흡광도를 측정 한 결과를 비교할 때 녹차의 효능은 긍정적으로 작용하는 것으로 나타났다. 이 실험에서 사용된 세포의 morphology의 변화는 사용된 시간대의 협소성 (최대 120')으로 인해 차별적인 관찰 결과를 얻지 못하였다. 그림 2-2는 녹차의 성분이 세포 내에 이미 흡수되어 존재할 경우, 새로 유입되는 니코틴의 독성을 중화시키는 데 있어 유의성을 검증하기 위하여, 녹차의 추출물이 함유된 배지에 6시간을 미리 준비 배양하였다. 준비 배양이 완료된 후, 세포를 PBS로 세척한 후, 니코틴이 함유된 배지에 세포를 배양하였다.

실험조건이 차이로 인하여 그림 2-1과 2-2는 서로 맞대어 비교할 수는 없지만, 각각의 대조군과의 차이를 볼 때, 세포내에 이미 존재하는 조건하에서 니코틴의 분해가 신속히 일어나는 것으로 판단된다. 이는 실제상황에 있어 흡연자가 녹차성분을 장기적으로 음용할 경우나 흡연직전 녹차관련 음료를 음용하는 것이 흡연후의 경우보다 더 유리함을 암시할 수 있는 결과라 할 것이다.

그림 2-1 및 2-2에서 세포 배양의 결과가 직접 혼합법의 경우와 같은 패턴을 보인 것은 다음의 의미로 해석 될 수 있다. 우선, 니코틴 분해의 효능이 있는 성분은 세포막의 투과에 있어 용이성을 보인다는 것이다. 아울러, 세포내에서도 안정성을 유지할 수 있다는 것이다. 물질의 안전성은 세포의 연령에 관계없이 동일한 유형을 보인다. 완전 confluency의 상태에서 동일하게 분획된 상태에서 세포배양을 추가로 실시하여 대상 세포가 60-100% confluency에 도달한 것에서도 동일한 유형이 관찰되었다. 니코틴 독성의 중화에 관여하는 녹차의 성분은 흡착 후 침강의 기전을

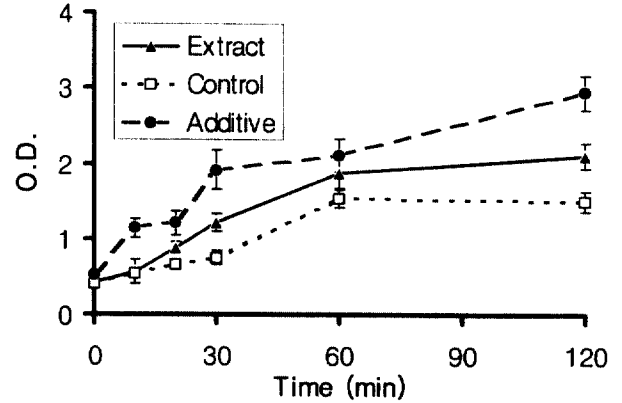


Fig. 2-1. Cotinine measurement on PLC/PRF5 cell

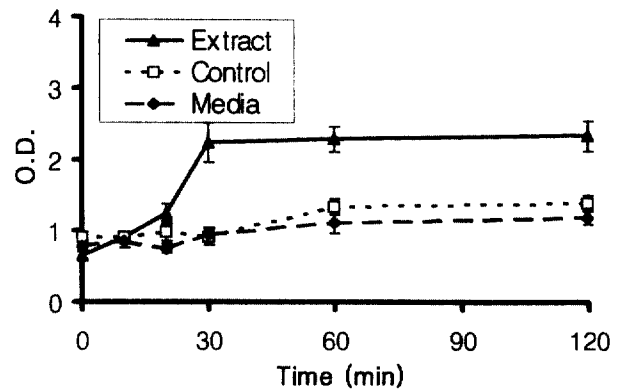


Fig. 2-2. Cotinine formation affected by tea extract absorbed in cells.

통해 이루어 진다는 것이 통념이었다. 본 세포 배양 실험의 결과는 흡착-침강-독성중화의 가설에 배치되는 것으로 판단된다.

흡착을 통한 카테킨에 의한 니코틴을 위시한 독성물질의 침강 가설은 세포 내 자유 니코틴의 양을 줄여줄 수는 있음을 설명할 수 있다. 그러나, 녹차 성분이 존재하는 조건하에서 배양시간 증가에 따른 지속적인 코티닌의 양의 증대가 본 실험에서 관찰되고 있다. 이 실험의 결과는 카테킨 외에 알려지지 않은 새로운 물질이 니코틴의 분해에 효능을 발휘하고 있음을 암시한다 해도 무방할 것이다.

그림 3의 경우는 HepG2 cell line을 이용한 실험이다. 이 실험의 결과도 관점에 따라서는 긍정적인 결과로 파악될 수 있다. 그러나, 녹차관련 시료를 검증하고 분석하기에는 매우 유의성이 낮은 결과라고 판단된다. 이 결과는 녹차의 니코틴 제거 효능의 검증은 세포주에 따라 불일치되는 결과를 초래할 수 있으며, 미약하며 신뢰할 수 없는 결과를 제공할 수 있다. 세포의 특성에 따라 수용체 및 반응 시차등이 문제점으로 지적될 수 있을 것이다.

제노투스 미숙란을 이용한 분해도 측정은 세포주를 이용한 측정법에서 예견될 수 있는 세포주별 반응 및 흡수에 따른 시차등의 문제점을 극복하고자 시도되었다. 니코틴은 반감기가 짧은 이유로 인하여, 시차 (response 또는 absorption lag period)의 극복은 매우 의미있는 일이라 할 수 있다. 즉, 세포배양실험에 있어

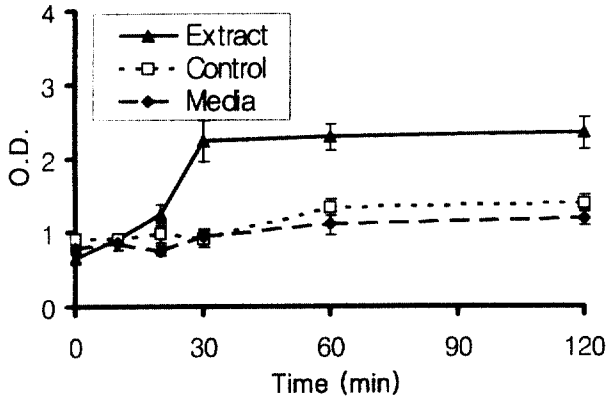


Fig. 3. HepG2 cell culture under tea extract treatment

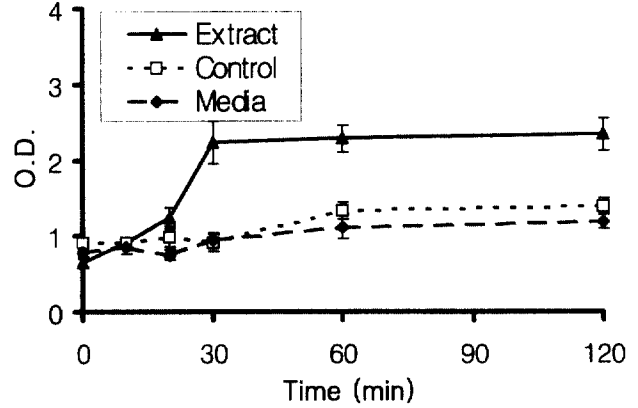


Fig. 5. Incubation of non-injected oocytes with nicotine

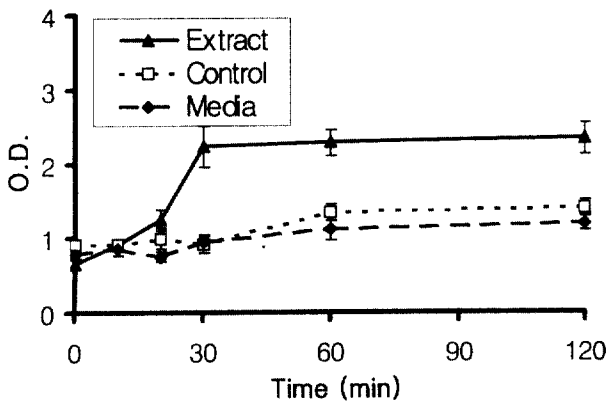


Fig. 4. Cotinine measurement on oocytes microinjected with nicotine

니코틴 또는 녹차추출물이 배양액에 투입된 시간과 실제 세포내로 침투되는 데 있어 시차의 가능성이 크다고 할 수 있다. 직접 주사법에 있어 세포주를 이용하는 것은 많은 세포를 다룰 수 없다는 점과 세포자체의 극소의 규모성의 문제점으로 제노푸스 미숙란을 이용하였다. 이 실험에 사용된 미숙란은 stage V의 것으로 지름이 1.2 mm 정도로 크기에 있어 균일하고, 실험 당 10-20 개로 충분하였다.

그림 4에서는 니코틴 추출물 및 녹차성분을 직접 주사하여 나타난 결과를 기술하고 있다. 직접 혼합법의 경우와 같이 준비된 성분을 각 미숙란에 500 nl씩을 주사한후 세포실험과 같은 시간대 별로 배양한 후, 생성된 코티닌의 양을 정량하였다. 그림 4에서 나타나는 패턴은 세포주 배양의 실험에 비해 매우 즉각적이라 할 수 있다. 니코틴의 반감기가 30분에 불과하므로, 가능한한 반응 및 흡수에 관련된 시차를 줄이는 것은 신뢰성있는 검증시스템 확립에 도움을 줄 것이다. 위의 직접혼합법 및 세포 배양의 유형과 같다고 할 것이다. 그러나, 차이는 더욱 직접혼합법에 비견될 정도로 높은 유의성을 보이므로, 차후 in vitro assay에 있어 중점적으로 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

실험 방법에 기술된 것과 같이 세 가지의 차별적 온도하 (섭씨 15, 25, 32)에서 실험을 하였지만 온도별 차별성은 관찰되지

않아 그래프로 표시하지 않았다. 그림 5는 미숙란을 이용하였지만 주사에 의하지 않고 배양에 의한 니코틴 및 녹차성분의 유입을 유도하여 수행한 실험이다. 이 실험에서는 녹차성분 및 니코틴의 미숙란의 막 통과와 난이성으로 인하여 전반적으로 지연되는 점이 관찰되었다.

제노푸스 미숙란을 이용한 니코틴의 분해도 측정은 본 실험에서 최초로 시도되었다. 이는 니코틴의 분해도 측정뿐만 아니라, 각종 독성 물질의 위해성 측정 및 독성 중화 물질을 선별하는 데 있어 유용하게 사용될 것으로 사료된다. 녹차에 의한 니코틴 분해의 촉진 및 코티닌의 생성 촉진은 녹차흡연자에 있어, 비타민 C의 보충 및 카테킨에 의한 흡착에 기인할 것이라는 일반적인 통념에 배치되는 것으로 볼 수 있다. 위의 두가지 이유라면, 녹차의 존재하에서 니코틴의 코티닌으로 전이가 촉진되는 현상을 설명할 수 없으므로, 본 실험의 결과에 의거하여 in vitro의 조건에 국한된 것이지만, 녹차의 성분 중 알려지지 않은 미지의 물질이 관여하여 니코틴에서 코티닌으로의 전이를 촉진한다는 가정을 제시할 수 있다.

고찰

한국 사회의 조밀성과, 고도의 역동성으로 인하여, 흡연은 증가하고 있으며, 간접 흡연의 피해는 증가하고 있다. 사회가 발전할수록 보건위생 부문에 대한 관심과 더불어 의료비용은 급속히 증가하고 있다. 그 중에서 흡연이 초래하는 난치성, 노인성 질환은 공중위생차원에서 대처해야하는 질환이다. 이러한 뚜렷한 치료제의 개발이 불투명하므로 백선에 의해 예방하는 방법이 발병 후 치료하는 것보다 훨씬 효과도 크고 비용도 적게 든다. 흡연으로 인한 인체의 니코틴 흡수는 즉각적으로 치사에 도달하지는 않지만 직접 간접적으로 고통을 수반하는 많은 질환을 일으키므로 일상생활에 지장을 주며 일생동안 위험을 초래하고 있다. 특히 산모에 의한 흡연은 태아에게 여러 피해와 심각한 기형마저 초래한다.

흡연은 개방사회에 있어 증가 추세에 있고, 우려할 정도의 파급성을 보인다. 이는 흡연의 심각성을 말해주는 것으로 이 흡연

을 통한 체내 니코틴을 신속히 분해할 수 있는 제재의 개발은 인간 사회의 공중보건위생의 관점에서 그 중요성을 갖는다고 할 수 있다. 특히, 한국의 경우는 급속한 개방화 및 행동 표현의 자유화로 청소년 및 여성의 흡연이 가속화 될 것이 자명하므로 니코틴을 신속히 제거하는 제재의 개발이 시급한 실정이다.

녹차 추출물의 니코틴 제거 효능의 과학적 검증은 많은 파급효과를 초래할 것으로 기대된다. 니코틴 제거기능이 있는 신기능 음료 및 식품첨가물 개발로 연결이 될 것이다. 녹차의 추출물을 이용하여 니코틴 제거 효과가 있다고 알려진 음료를 개발하고, 유효성분의 고효율 추출 방법을 개발하여 유효성분의 분말 또는 농축액을 식품첨가물로 개발하고 구성성분을 파악함으로써 니코틴 제거기능에 대한 과학적인 접근 근거를 제공할 것이다.

흡연 시 상당량의 체내 비타민 C가 소모된다는 보고가 있다, 녹차에는 레몬의 5~8배의, 비타민 C가 포함되어 있으며, 녹차의 유용성분인 카테킨은 매우 낮은 농도에서도 니코틴과 결합하여 침전을 형성함을 보여주고 있다. 위의 두 가지 특질에 힘입어 녹차는 흡연자를 니코틴의 피해로부터 상당 부분 보호해준다는 것이 통설이었다. 그러나, 본 세포 배양 실험의 결과가 의미하는 새로운 사항은 니코틴 분해에 관여하는 녹차의 성분은 일반적으로 알려진, 흡착후 침강을 통한 니코틴 독성의 중화라는 일반적인 통념에 배치되는 것으로 판단된다. 왜냐하면, 흡착을 통한 침강은 세포 내 자유 니코틴의 양을 줄여줄 수는 있지만 코티닌의 양의 증대로 관찰되는 본 실험의 결과는 카테킨외에 알려지지 않은 물질이 니코틴의 분해에 효능을 발휘하고 있음을 의미한다 할 것이다. 위의 두가지 효능 (비타민 보충 및 카테킨의 흡착능)과 함께, 본 실험에서 알려진 니코틴 분해능은 흡연으로 비롯된 피해를 녹차가 경감시킬 수 있음을 암시하고 있다.

본 실험의 결과 및 검증 시스템은 기능성 식품 개발 및 유용식품의 선별 방법 확립에 기여할 것이다. 반응성이 좋은 세포주를 선택하여, 개발된 식품첨가물의 효능을 편이하게 검증할 수 있을 것으로 판단된다. 아울러, 기능성 식품 개발에 대한 노하우와 실험방법의 확립은 향후 기능성 식품 개발의 기반기술을 제공할 것이다. 특히 이번 실험에 이용된 제노프스 미숙란을 이용한 니코틴 제거능의 검증 시스템은 유사한 형태의 실험에 사용될 수 있을 것이다. 이는 기능성 식품의 대량생산 방법에 대한 기반 기술 확보로 이어져, 시험 생산을 통하여 기능성 음료의 생산에 관한 노하우 축적이 성취될 것이다.

요 약

흡연은 직접 또는 environmental tobacco smoke를 통하여 많은 위해성 물질을 인체에 유입시킨다. 이러한 위해 물질중 니코틴은 인체내의 대사에 따라서 암을 유발시키는 물질로 전이되기도 한다. 니코틴의 대사산물로 대표적인 발암물질인 nitrosamine-4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)가 있다. 많은 연구는 녹차의 추출물이 암을 예방하는데 탁월한 효능

이 있음을 보고하고 있다. 그러나, 녹차의 암예방 효과에 대한 기작은 거의 알려져 있지 않다. 최근의 보고는 니코틴의 주요대사산물인 코티닌이 안정한 물질임과 동시에 NNK의 활성 및 형성을 억제하는 것으로 알려져 있다. 본 연구는 세포내의 니코틴의 대사에 있어, 코티닌으로의 전이도에 녹차의 추출물이 미치는 영향에 대하여 연구하였다. 녹차의 추출물은 시험관에서 직접 혼합한 경우와 세포주를 이용한 실험에서, 니코틴이 코티닌으로 전이하는 데 긍정적 영향을 주었다. 이 결과는 녹차의 성분 중에 니코틴의 여러 대사경로중에서 코티닌의 대사를 촉진하는 물질이 함유되어 있음을 의미한다. 이 결과는 아울러, 녹차의 암 예방의 가능성에 대하여 설명할 수 있는 기전을 제시한다.

참 고 문 헌

- Hoffmann D, Melikian AA, Wynder EL (1996) Scientific challenges in environmental carcinogenesis. *Prev Med*, 25(1):14-22.
- Trushin N, Hecht SS (1998) Stereoselective metabolism of nicotine and tobacco-specific N-nitrosamines to 4-hydroxy-4-(3-pyridyl)butanoic acid in rats. *Chem Res Toxicol*, 12(2):164-71.
- Witschi H, Espiritu I, Maronpot RR, Pinkerton KE, Jones AD (1997) The carcinogenic potential of the gas phase of environmental tobacco smoke. *Carcinogenesis*, 18(11):2035-42.
- Wynder EL, Muscat JE (1995) The changing epidemiology of smoking and lung cancer histology. *Environ Health Perspect*, 103 Suppl 8:143-8.
- Hecht SS (1999) Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *Natl Cancer Inst*, 91(14):1194-210.
- Hecht SS (1997) Tobacco and cancer: approaches using carcinogen biomarkers and chemoprevention. *Ann N Y Acad Sci*, 833:91-111.
- Schuller HM, McGavin MD, Orloff M, Riechert A, Porter B (1995) Simultaneous exposure to nicotine and hyperoxia causes tumors in hamsters. *Lab Invest*, 73(3):448-56.
- Gupta PC, Murti PR, Bhonsle RB (1996) Epidemiology of cancer by tobacco products and the significance of TSNA. *Crit Rev Toxicol*, 26(2):183-98.
- Hasseus B, Wallstrom M, Osterdahl BG, Hirsch JM, Jontell M (1997) Immunotoxic effects of smokeless tobacco on the accessory cell function of rat oral epithelium. *Eur J Oral Sci*, 105(1):45-51.
- Toubas PL (1986) Effects of maternal smoking and caffeine habits on infantile apnea: a retrospective study. *Pediatric*, 78(1):159-63.

11. Tunstall-Pedoe H (1991) The drinking, passive smoking, smoking deception and serum cotinine in the Scottish Heart Health Study. *J Clin Epidemiol*, 44(12):1411-4.
12. Prokopczyk B, Cox JE, Hoffmann D, Waggoner SE (1997) Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *J Natl Cancer Inst*, 89(12):868-73.
13. Brunnemann KD, Prokopczyk B, Djordjevic MV, Hoffmann D (1996) Formation and analysis of tobacco-specific N-nitrosamines. *Crit Rev Toxicol*, 26(2):121-37.
14. Carmella SG, Borukhova A, Akerkar SA, Hecht SS (1997) Analysis of human urine for pyridine-N-oxide metabolites of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, a tobacco-specific lung carcinogen. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 6(2):113-20.
15. Carmella SG, Borukhova A, Desai D, Hecht SS (1997) Evidence for endogenous formation of tobacco-specific nitrosamines in rats treated with tobacco alkaloids and sodium nitrite. *Carcinogenesis*, 18(3):587-92.
16. Hoffmann D, Rivenson A, Hecht SS (1996) The biological significance of tobacco-specific N-nitrosamines: smoking and adenocarcinoma of the lung. *Crit Rev Toxicol*, 26(2):199-211.
17. Lackmann GM, Salzberger U, Tollner U, Chen M, Carmella SG, Hecht SS (1999) Metabolites of a tobacco-specific carcinogen in urine from newborns. *J Natl Cancer Inst* 1999 Mar 3;91(5):459-65.
18. Schuller HM, Orloff M (1998) Tobacco-specific carcinogenic nitrosamines. Ligands for nicotinic acetylcholine receptors in human lung cancer cells. *Biochem Pharmacol*, 55(9):1377-84.
19. Chung FL (1999) The prevention of lung cancer induced by a tobacco-specific carcinogen in rodents by green and black Tea. *Proc Soc Exp Biol Med*, 220(4), 244-8.
20. Chung FL, Wang M, Rivenson A, Iatropoulos MJ, Reinhardt JC, Pittman B, Ho CT, Amin SG (1998) Inhibition of lung carcinogenesis by black tea in Fischer rats treated with a tobacco-specific carcinogen: caffeine as an important constituent. *Cancer Res*, 58(18):4096-101.
21. Fujiki H, Suganuma M, Okabe S, Sueoka N, Komori A, Sueoka E, Kozu T, Tada Y, Suga K, Imai K, Nakachi K (1998) Cancer inhibition by green tea. *Mutat Res*, 18: 307-10.
22. Lee CK, Fulp C, Bombick BR, Doolittle DJ (1996) Inhibition of mutagenicity of N-nitrosamines by tobacco smoke and its constituents. *Mutat Res*, 367(2):83-92.
23. Blackburn CW, Peterson CA, Hales HA, Carrell DT, Jones KP, Urry RL, Peterson CM (1994) Nicotine, but not cotinine, has a direct toxic effect on ovarian function in the immature gonadotropin-stimulated rat. *Reprod Toxicol*, 8(4):325-31
24. Barlow RD, Thompson PA, Stone RB. (1987) Simultaneous determination of nicotine, cotinine and five additional nicotine metabolites in the urine of smokers using pre-column derivatisation and high-performance liquid chromatography. *BJ Chromatogr*, 419:375-80.
25. Willers S, Skarping G, Dalene M, Skerfving S (1995) Urinary cotinine in children and adults during and after semiexperimental exposure to environmental tobacco smoke. *Arch Environ*, 50(2):130-8.
26. Olincy A, Young DA, Freedman R (1997) Increased levels of the nicotine metabolite cotinine in schizophrenic smokers compared to other smokers. *Biol. Psychiatry*, 42(1):1-5.
27. Robert, D. (1995) Colorimetric method for measuring cotinine-the primary metabolite of nicotine *Clin. Chim. Acta*, 165, p.45-52.
28. Lee DH, Selester B, Pedersen, K (1995) Free movement of 27K zein in the endoplasmic reticulum. *Protein Eng.*, 9:91-96.
29. Lee DH. (1998) Characterization of 27K zein as a transmembrane protein. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 31(2), 196-200.