

**식물추출 혼합제재인 phyto-extract mixture의
 니트로세이션 억제능과 항산화능 분석**

김지훈¹ · 신미정¹ · 조희재² · 이상원¹ · 정종문*

¹(주)유젠바이오 중앙연구소, ²(주)제일제당 제약연구소, 수원대학교 생명과학과

**Analysis of Nitrosation Inhibition and Antioxidant Effect by
 Phyto-Extract Mixture**

Ji-Hoon Kim¹, Mi-Jung Shin¹, Hee-Jae Cho², Sang Won Lee¹ and Jong-Moon Jeong*

¹Life Science Research Center of EugenBio Co.

²Institute of Science & Technology, Cheil Jedang Co.

Department of Life Science, University of Suwon

The most representative nitrosamine derived from nicotine, nitrosamine-4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone(NNK), has been reported to cause lung cancer in A/J mice. It has been also demonstrated that NNK-induced lung tumorigenesis involves O⁶-methylguanine(O⁶MeG) formation, leading to GC → AT transitional mispairing during DNA replication. Our in vitro experiment, modified from the method of DBA assay, examined the ability of phyto-extract mixture to inhibit the metabolism of nicotine to nitrosamines. The production of nitromorpholine from morpholine was inhibited about 75% at the concentration of 20 mg/mL of phyto-extract mixture, which was lower than vitamine C and green tea powder. NNK, which is a pro-carcinogen in laboratory animals, is hydroxylated primarily in liver and lung by CYP 1A2, 2A6 and 3A4. A critical phase of NNK activation is its change to an unstable metabolite methyl-diazohydroxide via CYP-mediated α-hydroxylation; and then it provides a methyl group to the DNA to form DNA adducts which can easily induce mutations. Aroclor^R 1254 was used to induce CYPs in the liver of a Sprague-Dawley rat. The ability of various test samples to inhibit CYPs that participate in NNK activation was evaluated, following the removal of the liver from the rat. Microsomal CYP1A2 catalyzing the conversion of NNK into strong carcinogenic chemicals was inhibited more efficiently by phyto-extract mixture than green tea powder. These results indicate that phyto-extract mixture can be used to reduce O⁶MeG DNA adducts for chemoprevention.

Key words: NNK, O⁶MeG, phyto-extract mixture, nicotine, cotinine

서 론

담배에는 니코틴과 타르 이외에 약 4000가지 정도의 화학 성분이 포함되어 있으며, 그 중 40가지는 발암물질로 알려져 있다. 담배연기는 미립자 성분과 기체 성분으로 구성되는데, 1회 흡연시 약 50 cc의 연기가 폐 속으로 들어가며 이때 18 mg의 미립자 성분과 32 mg의 기체 성분이 흡입된다. 이들 성분 중에서 이산화탄소 전량, 니코틴의 90% 그리고 타르의 70%가 몸 속으로 흡수된다. 미립자 성분 중에는 강력한 발암물질들이 존재하며, 특히 흡연으로 인하여 생성된 니트로사민(nitrosamine)은 발암물질로 분류된다⁽¹⁾.

Magee와 Barnes는 동물실험을 통하여 N'-nitrosodimethylamine(NDMA)이 매우 강력한 간암 유발물질임을 증명하였고⁽²⁾, 최근까지 약 200 종류의 N-니트로사민에서 발암 활성이 보고되었다⁽³⁻⁶⁾. Druckrey와 Preussmann은 담배 연기에 알칼로이드로부터 유도된 니트로사민이 존재함을 밝혔고⁽⁷⁾, Boyland 등은 NNN(N'-nitrosanornicotine)과 NAB(N'-nitrosoanabasine)가 각각 실험용 쥐에서 폐암과 식도암을 일으킨다고 보고하였다^(8,9).

Smith와 Loepky는 이미니움(iminium) 이온을 경유하는 3차 구조 아민의 니트로세이션 연구로⁽¹⁰⁾ 다수의 니트로사민이 니코틴으로부터 유래함을 증명하였고^(11,12), Hecht 등은 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone(NNK), 4-(methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-butanal(NNA), NNN 및 다른 니트로화합물들이 니코틴에서 유래됨을 밝혔을 뿐만 아니라, 담배에서 직접 NNK를 검출하였다⁽¹³⁻¹⁵⁾. 현재까지 담배에서 동정된 니트로사민은 NNN, NNK, NNAL, NAT, NAB, iso-

*Corresponding author : Jong-Moon Jeong, Hwasung-Si, Bongdam-Eup, Wau-Ri, San 2-2, Kyonggi-Do, 445-743
 Tel: 82-31-220-2481
 Fax: 82-31-222-6514
 E-mail: jmjeong@mail.suwon.ac.kr

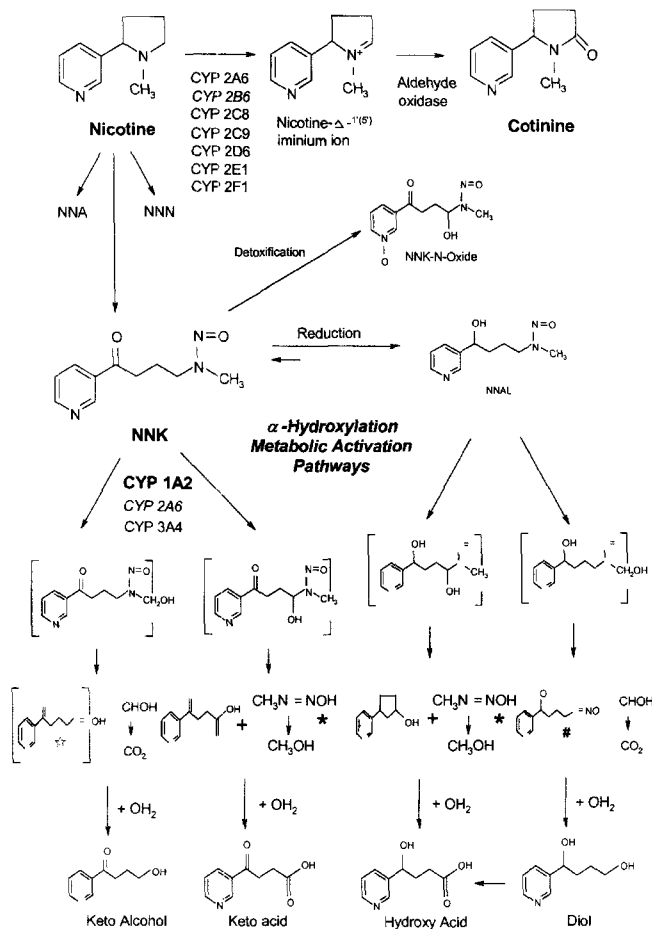


Fig. 1. Metabolism pathways of Nicotine and NNK in human. Oxobutyl diazohydroxides(☆) and hydroxybutyl diazohydroxides(#) form DNA adducts via pyridyloxobutylation and pyridylhydroxybutylation, respectively. Methyl diazohydroxides(*) form DNA adducts via methylation.

NNAN 그리고 iso-NNAC 등으로, 이 중 NNN, NNK, NAT는 다른 니트로사민류보다 다량 검출되며, 특히 NNN, NNK, NNAL은 아주 강력한 발암물질들로 확인되었다. 니트로사민은 매일 흡연자에게는 20 µg, 간접 흡연자에게는 60 µg까지 노출되고 있다^(16,17). NNK는 간과 폐에서 주로 Cytochrome P450(CYP) 1A2, 2A6, 3A4 효소에 의해 활성화되어 α-수산화반응(hydroxylation)을 통해 불안정한 대사산물인 메틸다이아조하이드록사이드(methyl-diazohydroxide)로 변환된 후, DNA에 메틸기(CH₃ group)를 주어 DNA 부가생성물(O⁶MeG)을 형성시킴으로써 돌연변이를 유도, 결국 폐암을 유발하는 것으로 알려져 있다(Fig. 1).

니코틴의 주요 대사산물인 코티닌과 기타 대사산물인 keto acid 및 hydroxy acid는 매우 빠른 속도로 대사되어 소변으로 배출되는데, 이러한 대사 과정은 개인마다 차이가 있다. 흡연에 의한 비발암성 생성물인 코티닌, keto acid 및 hydroxy acid는 간 등에 존재하는 CYP 효소에 의해 니코틴이 발암물질인 니트로사민으로 전환되는 경로를 방해하는 경쟁적 억제제로 작용할 수 있다. 따라서, 니코틴이 NNK, NNA, NNN으로 전환되는 것보다 코티닌으로 빠르게 대사되는 것이 담

Table 1. Effective content of phyto-extract mixture derived from eight plants

Name of component	Effective content
<i>Camellia sinensis</i>	40~80%
<i>Morus alba</i>	5~20%
<i>Ginkgo biloba</i>	5~20%
<i>Apium graneolens</i>	1~10%
<i>Citrus limon</i>	1~10%
<i>Malus pumila</i>	1~10%
<i>Glycyrrhiza glaba</i>	1~10%
<i>Citrus unshiu</i>	0.5~5%

배에 의한 해를 줄일 수 있으며, 궁극적으로 발암율을 낮출 수 있을 것이다. 그러므로 니코틴이 코티닌으로 전환되는 경로를 활성화하고, NNK 생성에 관여하는 효소의 활성을 억제할 수 있다면, 흡연에 의한 암 발생율을 효과적으로 낮출 수 있을 것이다. 따라서 본 연구는 흡연으로 초래되는 각종 질병 상태를 재현할 수 있는 *in vitro* 모델을 통하여 모폴린의 니트로세이션 억제능과 NNK 활성화에 관여하는 CYP 효소의 억제능을 분석함으로써 본 연구에서의 천연물 소재인 phyto-extract mixture에 의한 암 유발 억제능을 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 천연식물소재인 녹차(*Camellia sinensis* L.), 상엽(*Morus alba* L.)은 에스프리트 코퍼레이션에서 구입하였고, 은행(*Ginkgo biloba* L.), 감초(*Glycyrrhiza glaba* L.), 진피(*Citrus unshiu* M.)는 (주)삼광약업에서 공급받아 사용하였으며, 사과(*Malus pumila* M.), 레몬(*Citrus limon* F), 그리고 셀러리(*Apium graveolens* L.)는 시장에 나와 있는 싱싱한 것들을 이용하였다. 녹차엽 및 상엽 추출물은 80°C에서 30분간 추출 후 100 mesh 망에 여과하였으며, 과채류(사과, 레몬, 셀러리) 및 은행 추출물은 깨끗이 세척 후 분쇄하여 착즙하고 100 mesh망에 여과하여 준비하였다. 또한 한약재(감초, 진피) 추출물은 100°C에서 2시간 추출하여 100 mesh망에 여과하였으며, 위의 염류 추출물과 과채류 여과액을 함께 잘 혼합하여 분사 건조하여 분말을 만든 후 실험에 사용하였다. Table 1은 녹차를 포함하는 8개 식물체들로 부터의 phyto-extract mixture에 대한 유효함량(effective content)을 나타내었다.

니트로소모폴린 생성 억제능 실험에 사용된 morpholine(tetrahydro-1,4-oxazine), sodium acetate, KCN, chloramine-T, barbituric acid는 Sigma Co.(USA)에서, acetone은 Merck Co.(Germany)에서 구입하였다. 또한 CYP 활성 억제능 실험에서 효소가 유도된 간 추출물을 얻기 위하여 7주령의 웅성 Sprague Dawley rats에 CYP 유도물질로서 Aroclor 1254 (Supelco, USA)를 주사하였다. 실험동물은 (주)샘타코 바이오 코리아에서 구입하였다. 순수 정제된 CYP1A2의 활성도 억제능 실험을 위하여 RECO® System CYP1A2(PanVera Co, USA)을 이용하였다. 양성 대조군으로 사용된 가루녹차는 (주)태평양에서 구입하였다.

Phyto-extract mixture의 성분 분석

Phyto-extract mixture로부터 phenolic compound들을 함량은 high performance liquid chromatography(HPLC)법으로 분리·정량하였다⁽¹⁸⁾. 이때 사용한 high performance liquid chromatography(Young-Lin M930, Korea)의 조건은 칼럼: J'sphere ODS-H80 4.6×150 mm I.D.(YMC, Japan), 이동상: 20 mM KH₂PO₄/20 mM H₃PO₄ (pH 2.4): MeOH = 3:1(v/v), 유속: 1.0 mL/min, 주입량: 10 µL, 검출기: UV, 파장: 280 nm이었다.

니트로소모폴린(nitrosomorpholine) 생성 억제능 분석

아질산, 아질산 에스테르 또는 티오에스테르, 무수 아질산, 니트로실 할라이드, 니트로실 금속, 무기금속 아질산 복합체(inorganic metal nitrite complexes)와 같은 nitrosating agents가 아민 또는 다른 질소를 포함하는 화합물과 반응하여 발암성 물질인 니트로사민 또는 N-니트로소 화합물을 형성할 때 식물추출 혼합 제재인 phyto-extract mixture가 이러한 발암성 물질 형성을 억제하는지에 대해 알아보기 위하여 *in vitro* 실험을 수행하였다. 미국특허 제 5,087,671호⁽¹⁹⁾(polymers for scavenging nitrosating agents)를 참고하여 소변에서 니코틴 대사물질인 코티닌을 검출하는 DBA(Direct Barbituric Acid) 방법⁽²⁰⁾과 가스크로마토그래피의 전처리 방법을 본 실험에 응용하였다⁽²¹⁾.

본 실험에서는 천연식물성 제재인 phyto-extract mixture와 함께 대조군으로 비타민 C 및 가루녹차를 사용하였다. 각 반응시료의 농도는 2.5, 5, 10, 15, 20 mg/mL 이었으며, 모폴린을 첨가하지 않고 NaNO₂만 최종 200 mM되게 첨가한 것을 음성대조군(t₀)으로 설정하였다. 각 반응에서 NaNO₂를 첨가하지 않은 시료를 공실험(blank)으로 설정하였다.

각 반응시료를 농도별로 15 mL 튜브에 분주하고, 여기에 빙초산 1 mL씩 첨가하였다. 그리고 2 M NaNO₂를 100 µL씩 공실험구를 제외한 튜브에 첨가하고, 증류수로 최종부피가 2 mL이 되도록 하였다. 37°C에서 10분 동안 반응시킨 후, 모폴린을 176 µL 첨가하여 최종 모폴린 농도가 2 M이 되게 하였으며, 다시 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 그런 다음 5 N NaOH를 3.8 mL 첨가하여 pH 10~12로 맞추어 반응을 종결한 후, 상기 시료들을 DBA 방법으로 측정하였다. 먼저, 1.5 mL 튜브에 각 시료를 500 µL씩 첨가하고, 다시 250 µL의 4 M sodium acetate buffer(pH 4.7), 100 µL의 1.5 M KCN, 100 µL의 0.4 M chloramine-T, 500 µL의 78 mM barbituric acid(in acetone/water(50/50, v/v))를 순서대로 첨가하여, 10초간 잘 혼합하였다. 이 혼합물을 상온(22°C)에서 100 rpm으로 15분 동안 교반하여 반응시킨 다음, 여기에 100 µL의 1 M sodium metabisulfite를 넣어 반응을 종결시킨 뒤, 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

니트로소모폴린 생성율(NMOR %)은 다음과 같은 공식(1)으로 환산하였다.

$$NMOR(\%) = [(t_0 - \text{blank}) - (t_{30} - \text{blank})] \div (t_0 - \text{blank})$$

blank; 각 반응에서 nitrosating agents인 NaNO₂를 첨가하지 않은 시료

t₀; 모폴린을 첨가하지 않고 NaNO₂만 200 mM 첨가한 시료

t₃₀; 각 시료들의 니트로소모폴린 생성이 정상적으로 반응한 시료 (1)

CYP₄₅₀ 활성 억제능 분석

시험물질들에 의해 NNK 활성화에 관여하는 CYP 효소의 활성 억제 정도를 분석하고자, 먼저 Aroclor 1254를 Sprague-Dawley rats에 주사하여 간의 CYP 활성을 유도한 뒤, 간을 적출하였다. 다양한 시험물질에 대하여 7주령 수컷의 복강에 Aroclor 1254를 500 mg/kg 용량으로 주사하였고, 주사 5일 후 간을 적출하여 4°C의 0.15 M KCl 용액을 넣어 homogenizer로 균질 분쇄하였다. 다음 단계로 9000×g에서 10분 동안 균질액을 원심분리한 뒤, 상층액을 수거하여 이를 CYP 추출물로서 다음 실험 과정에 사용하였다. CYP2B1/2/4의 기질인 pentoxyresorufin(Sigma), CYP1A1의 기질인 ethoxyresorufin(Sigma) 및 CYP1A2의 기질인 methoxyresorufin(Sigma)을 이용하여 CYP의 활성도를 측정하였다. Phyto-extract mixture의 CYP 활성 억제능을 분석하기 위하여 phyto-extract mixture와 rat 간으로부터의 CYP 추출물, 그리고 각 CYP 효소들에 특이적인 기질들을 이용하였다. 대조군으로는 가루녹차를 이용하였으며 기질이 효소에 의해 분해될 때 나타나는 형광을 RF-5301 PC spectrofluorophotometer(Shimadzu, Japan)로 측정하여 효소 활성을 비교하였다. 각 반응에서 phyto-extract mixture 농도는 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/mL이 되도록 하였고, 간 적출액의 단백질 양은 500 µg/mL 이었다. 각 CYP 기질은 원액용액을 2.5 µM로 만든 뒤, 반응시에는 최종 25 nM이 되도록 처리하였다. 조효소로 사용한 β-NAD(Sigma)는 0.1 mM 되게 처리하였으며, 반응 완충용액으로는 50 mM Tris-HCl(pH 7.4)을 이용하여 최종 반응 부피가 1 mL이 되도록 하여, 37°C에서 20분 반응하였다. 반응을 종결하기 위하여 메탄올 2 mL를 첨가한 후, 2000 rpm에서 2분 동안 원심분리하여 상등액을 spectrofluorophotometer로 분석하여 CYP 효소 활성을 측정하였다. 또한, 순수 정제한 RECO® System CYP1A2를 이용하여 phyto-extract mixture 및 가루녹차에 의한 효소 활성 억제능을 분석하였다. 효소 혼합액의 조성은 0.5 µM CYP1A2, 0.2 µM NADPH P450 reductase, 0.5 µg/mL CHAPS, 0.1 µg/mL liposomes{dilauroyl phosphatidylcholine, dileoyl phosphatidylcholine, dilauroyl phosphatidylcholine(1:1:1)}, 3 mM reduced glutathione, 50 mM HEPES/KOH(pH 7.4)이었고, 완충용액으로는 1 M potassium/sodium phosphate를 사용하였다. 768 µL의 3차 멸균증류수, 126.7 µL의 CYP1A2 완충용액, 5.3 µL의 1 mM 메톡시레스루핀을 첨가한 950 µL의 용액을 37°C에서 미리 가온하였다. 완충용액과 85 µL의 기질 혼합액에 phyto-extract mixture 및 가루녹차를 최종농도가 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/mL이 되도록 5 µL씩 첨가하였고, 여기에 5 µL의 CYP1A2 효소 혼합액과 5 µL의 50 mM NADPH를 첨가한 뒤, 37°C에서 20분 동안 반응하였다. 반응 시료에 1 mL의 메탄올을 넣어 반응을 종결한 후, spectrofluorophotometer를 이용하여 효소 활성을 측정하였다.

항산화 효능 분석

항산화 효능 측정은 자유 라디칼인 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)와 SOD kit(Wako, Japan)을 이용한 O₂⁻ scav-

Table 2. The test method concerning O₂⁻ scavenging effect

Reagent	Tested item	Main test			Blank test
		Sample (S)	Blank (B1)	Sample blank (S-B1)	Reagent blank (B1-B1)
Sample		0.1 mL (sample)	0.1 mL (distilled water)	0.1 mL (sample)	0.1 mL (distilled water)
Color-forming solution		1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL
Enzyme solution		1.0 mL	1.0 mL	-	-
Blank solution		-	-	1.0 mL	1.0 mL
Absorbance		E _S	E _{B1}	E _{S-B1}	E _{B1-B1}

$$\text{SOD 활성치(저해율 \%)} = (E_{B1} - E_{B1-B1}) - (E_S - E_{S-B1}) / (E_{B1} - E_{B1-B1}) \times 100$$

enging 효과를 phyto-extract mixture과 다른 여러가지 시험물질들을 대상으로 실험하였다. DPPH의 scavenging 효과에 대한 실험방법은 다음과 같다. DPPH는 에탄올과 물을 2:1로 섞은 용매에 녹여 농도를 2×10⁻⁴ M로 고정시켜 사용하였다. 사용된 시험물질은 항산화제가 DPPH의 1/10 또는 그 이하가 함유되도록 제조하여 1.5 mL DPPH를 cuvette에 담고 항산화제 용액 1.5 mL을 넣고 잘 섞어주었다. 섞는 즉시 시간을 측정하여, 시간별 흡광도(523 nm)의 변화를 측정하여 분해율을 계산하였다.

SOD kit의 원리는 크산틴(xanthine)에 크산틴옥시다아제(xanthine oxidase)가 작용하면 O₂⁻가 생성된다. 생성된 O₂⁻는 공존하는 NO₂⁻-TB(nitrobluetetrazolium)를 환원하여 발색반응을 나타내지만 superoxide dismutase(SOD)나 생성된 O₂⁻ 제거능을 가진 물질로 인해 그 발색이 저해된다. 이로써 생성된 O₂⁻의 제거능을 측정할 수 있다. O₂⁻ scavenging 효과에 대한 실험방법은 다음과 같다. 각 시료 0.1 mL에 0.4 mM 크산틴/0.1 M 인산염 완충용액(pH 8.0) 1 mL에 0.048 unit/mL 크산틴옥시다아제 1 mL를 첨가하고 잘 혼합한 후 37°C에서 20분간 가온하고 69 mM sodium dodecyl sulfate 2 mL를 첨가하여 효소반응을 정지시킨 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 물을 대조군으로 비교하고, 효소와 시약의 공실험도 동일한 방법으로 측정하였다. 자세한 방법은 Table 2와 같다.

결과 및 고찰

Phyto-extract mixture의 성분 분석

본 실험은 체내 니코틴 및 담배의 유해성을 인식하여 이를 효과적으로 해독할 수 있는 카테킨(catechin)과 EGCG(epigallocatechin gallate)와 같은 phenolic compound들을 다량 함유한 녹차는 물론, 다양한 천연식물들을 이용하여, 담배의 유해성분에 대한 분해 및 생성 억제능이 뛰어난 혼합추출물을 제조하였다. Phyto-extract mixture 내에 함유되어 있는 유효성분을 분석하기 위하여, 녹차를 대조군으로 하여 HPLC를 이용하여 정량하였다(data not shown). 그 결과, 본 연구에서의 phyto-extract mixture에는 항산화 및 항돌연변이에 우수한 효능을 지니는 것으로 알려진 퀘르세틴(quercetin)이 56 ng/mg 함유되어 있는 반면, 가루녹차의 양이 5 mg에서도 퀘르세틴의 peak를 검출할 수 없었다. 또한 phyto-extract mixture에 EGCG 및 카테킨 등이 일반 녹차보다 2-3배 더 많이 함유되어 있는 것으로 분석되었다.

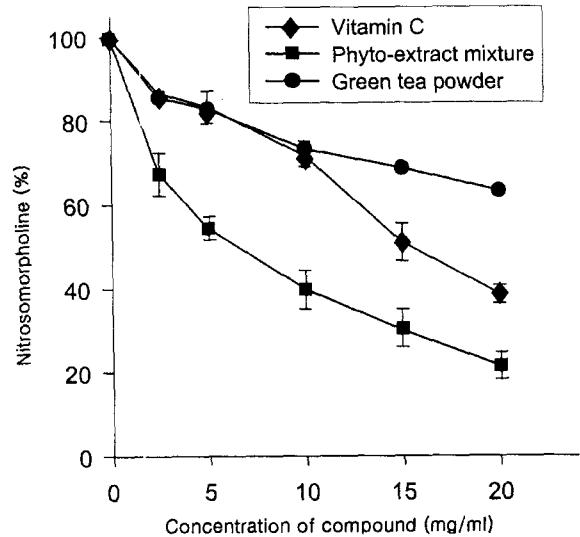


Fig. 2. Inhibitory effects of test samples on nitrosomorpholine (NMOR) formation from morpholine.

Nitromorpholine was measured by DBA method in the presence of vitamin C(◆), phyto-extract mixture(■), or green tea powder(●). The conversion of nitromorpholine from morpholine was inhibited about 75 by 20 mg/mL of phyto-extract mixture. Results are presented as means of duplicate experiments.

Phyto-extract mixture에 의한 니트로소모폴린 생성 억제

Fig. 2는 기능성 음료인 phyto-extract mixture의 처리 농도에 따른 니트로소모폴린 생성 억제능을 나타낸 것이다. 대조군으로는 감염에 대한 방어 기능을 맡고 있는 면역계와 신경 호르몬의 신호 전달계에서 중요한 기능을 수행하는 비타민 C, 그리고 다양한 임상적 효능이 검증된 가루녹차를 사용하였다. 실험 결과, 니트로소모폴린 생성 억제능에 대한 이들 물질의 우수성은 phyto-extract mixture>비타민 C>가루녹차의 순이었는데, phyto-extract mixture, 비타민 C 그리고 가루녹차를 각각 20 mg/mL으로 첨가한 반응에서 니트로소모폴린 생성률은 21.4±0.034%, 40±0.034%, 그리고 63.1±0.007%로서 phyto-extract mixture가 다른 시료들에 비해 2~3배정도 더 강한 니트로세이션 억제능을 보였다. 비록 이러한 결과가 *in vitro* 연구에 국한된 것이기는 하지만, phyto-extract mixture를 포함한 시험물질들이 *in vivo*에서도 위와 유사한 니트로사민 형성 억제능을 보일 것이라는 가능성을 보여주었다.

Rice-Evans 등⁽²²⁾은 음·식물 속의 phenolic compound들이

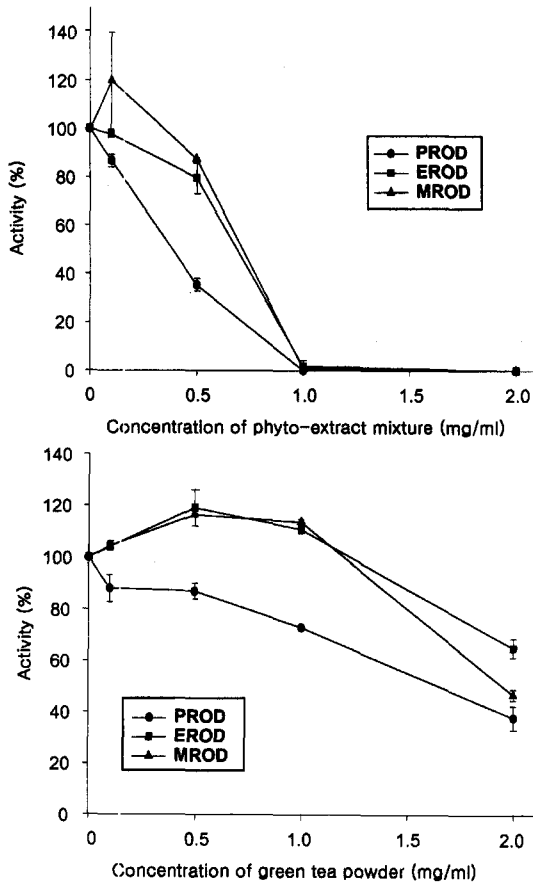


Fig. 3. Inhibitory effects of test samples on the activities of Cytochrome P450 enzymes in Sprague Dawley rat liver microsomes.

Cytochrome P450 enzymes were incubated with an NADPH generating system followed by an addition of phyto-extract mixture (A) or green tea powder (B) for the indicated concentrations. The employed substrates were as follows: PROD, pentoxoresorufin dealkylase(CYP2B1/2/4, ●); EROD, ethoxy-resorufin dealkylase (CYP1A1, ■); MROD, methoxyresorufin dealkylase(CYP1A2, ▲).

반응성이 강한 산소(reactive oxygen)를 효과적으로 처리한다고 하였고, Paya등⁽²³⁾은 phenolic compound들이 반응성이 강한 chlorine류를 효과적으로 처리한다고 보고한 바 있다. 이러한 기작은 항암작용의 가능성을 시사하는 것으로 주목받아오고 있는데, 이들 phenolic compound들은 또한 nitrite (e.g. HNO₂, NO₂)로부터 유래한 반응성이 강한 nitrogen류의 제거에도 관여하리라 사료된다. 특히, Pannala등⁽²⁴⁾은 몇몇 phenolic compound들이 peroxynitrite에 의한 tyrosine에 대해 강력한 억제제로 작용함을 *in vitro* 실험에서 보고한 바 있으며, 이들은 또한 phenolic compound들이 nitric oxide 자체도 제거한다고 보고하였다. 뿐만 아니라, ascorbic acid는 nitrosation 및 nitration 반응 억제제⁽²⁵⁾, 그리고 peroxynitrite에 의한 nitration 억제능을 지녀⁽²⁶⁾ *in vivo*에서 반응성이 강한 nitrogen류에 대한 주요 방어인자로 보고된바 있다. 그러나 ascorbic acid는 위와 같은 산성조건에서는 nitration 혹은 deamination의 억제능이 월등히 감소한다고 보고되었다⁽²⁷⁾.

본 연구에서 phyto-extract mixture는 단일의 식물추출(녹차)보다 월등히 높은 함량의 다양한 phenolic compound들을

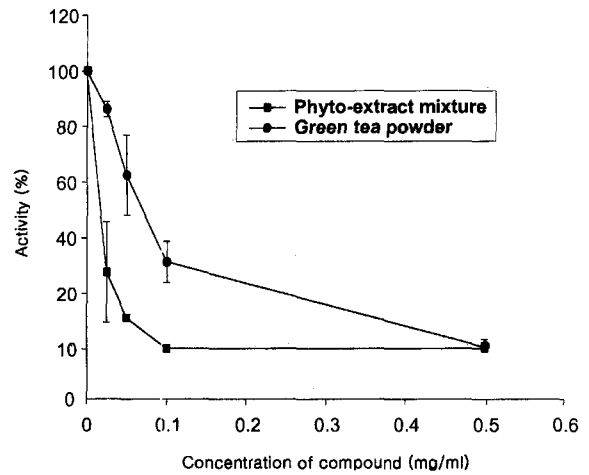


Fig. 4. Inhibitory effects of test samples on the activities of reconstituting purified cytochrome P450 1A2 enzymes.

CYPs were incubated with an NADPH generating system and the activity of the purified CYP1A2 in the presence of phyto-extract mixture(■), and green tea powder(●) of which concentration range is 0.1~0.5 mg/mL were analyzed. phyto-extract mixture of 0.1 mg/mL showed almost 99.9% inhibition efficiency against CYP 1A2. Results are presented as means of duplicate experiments.

함유하고 있음은 물론, 비타민 C를 포함하고 있다. 그러므로 대조군보다 2~3배 높은 니트로세이션 억제능을 보인 이유는 이들 성분들의 상승효과(synergy effect)와 추출 후, 보관에서 실험때 까지 각 성분들이 안정적으로 유지된 결과로 사료된다. 또한, 아직까지 규명되지 않은 기작을 통해 기존에 알려진 성분 혹은 미지 성분의 단독작용이나 상승작용 효과도 고려해 볼 수 있을 것으로 추정된다.

Phyto-extract mixture에 의한 CYP 효소 활성 억제

CYP 효소들은 간과 폐에서 해독작용에 관여하는 주요 효소이다. 간에는 여러 종류의 CYP 효소들이 각기 다른 기능을 가지고 있으며, 특히, CYP 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2D6, 2E1, 2F1 등은 니코틴을 코티닌으로 대사하는데 관여한다^(28,29). 동물실험에서 pro-carcinogen으로 자주 이용되는 NNK는 간과 폐에서 CYP 1A2, 2A6, 3A4에 의해 활성화된다. 본 연구에서는 phyto-extract mixture에 의한 CYP 효소 활성 억제능을 측정하고자 먼저, rats의 간에 Aroclor 1254(polychlorinated biphenyls)를 주사하여 CYP 효소의 활성을 유도한 뒤, 간을 추출함으로써 40 mg/mL의 간 추출 단백질을 얻었다. Fig. 3은 CYP 효소가 함유된 간 적출물과 시험물질, 그리고 CYP 기질인 펜톡시레스루핀, 메톡시레스루핀, 에톡시레스루핀과 함께 반응시켜 효소 활성을 분석한 결과로서 phyto-extract mixture는 가루녹차에 비해, 세 종류 CYP 기질들에서 거의 완벽한 CYP 효소 활성 억제능을 보였다. 다음으로 각 CYP 효소에 특이적인 기질을 통해 효소 phyto-extract mixture에 의한 CYP 효소 활성 억제능을 분석하기 위하여 NNK의 대사 활성화에 관여하는 CYP1A2 효소 활성 억제 실험을 수행하였다(Fig. 4). Phyto-extract mixture와 가루녹차에 의한 CYP1A2 효소 활성을 비교 분석한 결과, phyto-extract mixture는 0.1 mg/mL에서 거의 완전한 효소 활

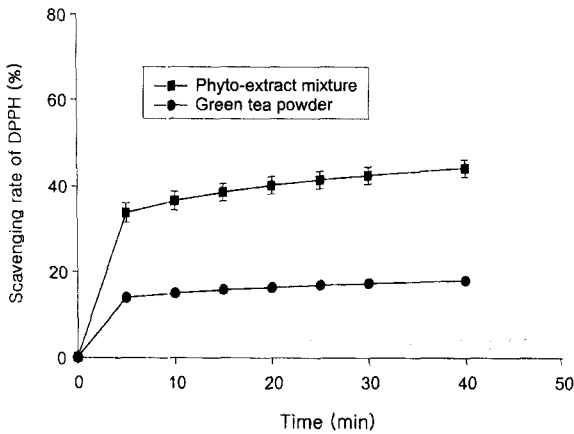


Fig. 5. Scavenging effects of test samples using DPPH.
The scavenging rate of DPPH for each test sample was measured at 523 nm with incubation time course in the presence of, phyto-extract mixture(■), or green tea powder(●). Each test sample showed fast scavenging activity against DPPH free radical during the first 5 min of the incubation period. Results are presented as means of duplicate experiments.

성 억제능을 나타내었으며, Fig. 3과 동일한 결과를 얻을 수 있었다. 그리고 순수 정제한 RECO® System CYP1A2를 이용하여 phyto-extract mixture 및 가루녹차의 CYP 효소 활성 억제능을 분석한 결과(Fig. 5), phyto-extract mixture(0.1 mg/mL)와 가루녹차(0.5 mg/mL) 모두 간 적출 단백질에서의 CYP 활성 억제능(Fig. 3, 4) 실험에서 보다 낮은 농도에서 효소 활성 억제능을 보였으며 phyto-extract mixture가 가루녹차보다 약 3-4배 더 높은 CYP 효소 활성 억제능을 나타내었다.

이처럼, 간 적출 단백질에서의 CYP 활성 억제능 실험보다 정제한 CYP1A2를 이용한 실험에서 낮은 농도의 phyto-extract mixture로 효소 활성 억제능이 현저했던 이유는 간 추출물의 경우, 여러 CYP 효소들에 대한 효소 활성 억제능을 측정하는 것이었고, phyto-extract mixture에 함유된 특정성분이 CYP1A2에 매우 특이적으로 작용함을 알 수 있을 뿐만 아니라, 다른 한편으로는 간 추출물에 있는 다른 성분들에 의해 측정이 간접받았을 가능성도 배제할 수 없다. 최근 연구에 따르면, 자연형의 dithioethiones와 합성 산물인 oltipraz(OPZ)가 aflatoxin B₁으로 유도된 간암 발생기전에 효과가 있는 것으로 알려졌는데⁽³⁰⁾, 특히, OPZ의 항암효과는 주로 glutathione S-transferases(GSTs)의 유도에 기인한다고 알려져 있다⁽³¹⁾. 또한 Langouët등⁽³²⁾은 인간의 간세포를 이용하여 OPZ의 CYP 효소 활성 억제능 효과를 보고한 바 있다. 특히, 여러 전구 발암물질들의 형성에 관여하는 CYP1A2와 3A4가 OPZ에 짧은 시간 노출 후, 크게 감소하였다고 보고하였다.

따라서, 본 연구에서의 phyto-extract mixture는 기존에 잘 알려진 다양한 항돌연변이 및 항암 효과를 지닌 성분들이 단일 식물 추출물에 비해 다량 함유되어 상기 연구보고들에서 얻어진 결과들과 동일한 양상으로 CYP 효소들의 활성을 효과적으로 억제하는 것으로 사료된다.

Phyto-extract mixture의 항산화 효능

최근까지 많은 병들의 원인이 불분명하게 남아있지만, 유

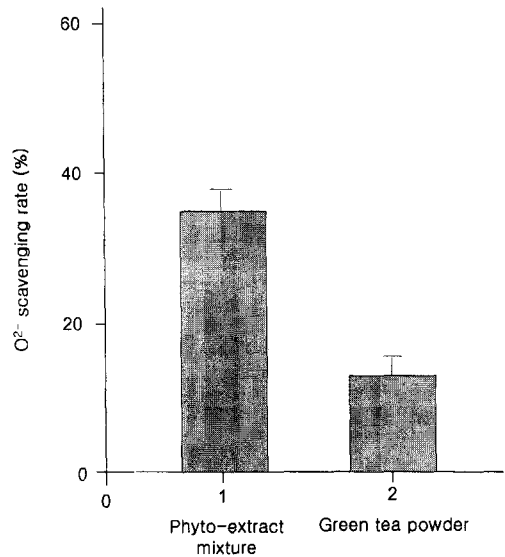


Fig. 6. Scavenging effects of various test samples using xanthine-xanthine oxidase-induced NO₂⁻BT chemiluminescence.
The xanthine-xanthine oxidase-induced NO₂⁻BT chemiluminescence method was employed to analyze scavenging effects of various test samples against the superoxide free radical. After reaction was completed, the absorbance of each reaction was measured at 560 nm. Control experiments were performed with 0.1 mL of distilled water. Results are presented as means of duplicate experiments.

독한 자유 라디칼들이 동맥경화⁽³³⁾, 혈관수축에 의한 국소빈혈⁽³⁴⁾, 염증⁽³⁵⁾, 발암⁽³⁶⁾, 류마티스성 관절염⁽³⁷⁾과 같은 넓은 범위의 병을 매개한다는 다양한 증거들이 알려져 왔다. 그러므로, 자유 라디칼 포착제(scavenger)는 자유 라디칼 수준을 감소시킴으로써 효과적인 예방제나 치료제로서 기대되어지고 있다.

본 실험에서는 phyto-extract mixture와 가루녹차의 자유 라디칼의 포착력과 O₂⁻ 제거능을 분석하기 위하여 각각 DPPH와 SOD kit를 이용하였다. 각 시험물질들의 자유 라디칼의 포착력을 분석한 결과, phyto-extract mixture는 가루녹차보다 약 2배 이상 높은 것으로 나타났으며(Fig. 6), O₂⁻ 제거 효능 역시 phyto-extract mixture가 가루녹차보다 2배 이상 높은 것으로 나타났는데(Fig. 7), 이는 각 시료의 자유 라디칼에 대한 포착력과 동일한 양상으로 나타났다. DPPH를 이용한 자유 라디칼 포착력은 DPPH에 시험물질들을 첨가한 5분 이내에 거의 모든 반응이 완료되었다. 이상의 phyto-extract mixture의 항산화 효능은 기존에 알려진 녹차보다 2배 이상 높았는데, 이는 녹차를 포함한 식물추출 혼합물인 phyto-extract mixture에 함유된 성분들에 의한 상승적 항산화 효능에 기인한 것으로 사료된다.

이전 보고에 따르면, 녹차는 반응성이 강한 산소 대사물질(reactive oxygen metabolites, ROM)에 의하여 유발되는 여러 독성효과들을 줄이며, 녹차 성분중 phenolic compound들이 superoxide anions에 대한 효과적인 포착제로서 역할을 수행하였다⁽³⁸⁾. 특히, phenolic compound들 중 flavonoid는 lipid peroxy radical species의 형성을 억제하고, LDL 산화의 억제제로서 작용하였다⁽³⁹⁾. 쥐에 NNK를 주입한 후, 녹차를 투여하면 폐암발생이 현저히 줄어드는데, 이와 같은 현상은

phenolic compound들이 ROM을 통하여 폐암발생에 대하여 효과를 나타내는 것으로 추정하고 있다⁽⁴⁰⁾. 또한 이 화합물들이 DNA 나선 절단(strand breakage, SB)을 억제하는 것으로 분석되었다. 녹차 내 주요 polyphenol인 EGCG는 폐선종(lung adenomas)의 발생과 산화적으로 변형된 DNA 염기인 8-hydroxydeoxyguanosine(8OHdG)의 형성을 억제하였다⁽⁴¹⁾. EGCG의 투여는 과산화수소수(H_2O_2)에 노출된 HeLa cell에서 8OHdG의 형성을 역시 억제하였다⁽⁴¹⁾. 반응성이 강한 산소 대사물질들이 암 발생에 대한 주된 요인이기 때문에, 본 연구에서의 phyto-extract mixture는 다량의 phenolic compound를 포함한 다양한 유효성분들을 함유하여, 흡연으로 노출된 사람의 폐세포에 대하여 항산화 효능을 나타내므로서, DNA-SB와 lipid peroxidation 산물의 형성을 줄여 주어 결국, 폐암 발생의 위험을 감소시킬 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 흡연에 의해 체내로 유입된 독성 물질들로 유발될 수 있는 폐암을 비롯한 각종 질병 기전을 *in vitro* 상에서 재현한 실험적 모델을 이용하여 8개의 식물로부터 추출한 phyto-extract mixture의 작용에 의하여, 체내 니코틴이 니트로사민으로의 전환되는 대사효율과 NNK의 활성화에 미치는 효과를 분석한 것이다. 이를 위해 *in vitro* 상에서 phyto-extract mixture에 의한 니트로소모폴린의 생성 억제와 CYP 효소 활성 억제를 분석하였다. Phyto-extract mixture에 의한 니코틴으로부터 니트로소모폴린이 생성되는 대사 억제능 실험 결과, phyto-extract mixture(75%)는 비타민 C(64%)와 가루녹차(37%) 보다 우수한 억제 효능을 나타내므로서, phyto-extract mixture는 니코틴으로 부터 유독한 중간 대사물질이 생성되는 경로를 효과적으로 억제시킬 수 있음을 알 수 있었다. 또한 간에서 NNK 활성화에 관여하는 CYP 효소들에 대한 phyto-extract mixture의 효소 활성 억제능 분석 결과, phyto-extract mixture이 가루녹차보다 NNK로부터 발암물질이 생성되는 경로를 효과적으로 억제시키는 것으로 분석되었다. 결론적으로 phyto-extract mixture는 흡연으로 체내에 유입된 니코틴이 NNK와 같은 강력한 발암 물질인 니트로사민 유도체로 전환되는 경로를 효과적으로 억제함으로써 암 발생을 효과적으로 낮출 수 있는 기능성 첨가제 혹은 식·음료로 활용될 수 있음을 *in vitro* 실험으로 증명하였다.

감사의 글

본 연구는 산자부에서 시행한 1998년 산자부공업기반기술 개발과제(A00982-5411-25-1-2)의 수행된 연구결과의 일부이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

문 헌

1. Eugene, J.M., Klaus, D.M., Dietrich, H., Thira, L., Maitree, S., Nimit, M. and Lee S.C. Volatile nitrosamines and tobacco-specific nitrosamines in the smoke of Thai cigarettes: a risk factor for lung cancer and a suspected risk factor for liver cancer in thailand. *Carcinogenesis*. 20: 133-137 (1999)

2. Magee, P.N. and Barnes, J.M. The production of malignant primary hepatic tumors in the rats by feeding dimethylnitrosamine. *Br. J. Cancer*. 10: 114-122 (1956)

3. Druckrey, H., Preussmann, R., Ivankovic, S. and Schmahl, D. Oranotrope Carcinogen Wirkungen bei 65 verschiedenen N-Nitrosoverbindungen an BD-ratten. (Organotropic carcinogenic effects of 65 different N-nitroso compounds on BD-rats) *Z. Krebsforsch.* 69: 103-201 (1967)

4. Preussmann, R. and Stewart, B.W. N-nitroso carcinogens. In *Chemical Carcinogenesis*, (Searle, C. E., Ed.) pp 643-828, American Chemical Society, Washington, DC. (1984)

5. Lijinsky, W. *Chemistry and Biology of N-Nitroso Compounds*, Cambridge University Press, Cambridge, England. (1992)

6. Bogovski, P. and Bogovski, S. Animal species in which N-nitroso compounds induce cancer. *Int. J. Cancer*. 27: 471-474 (1981)

7. Druckrey, H. and Preussmann, R. The formation of carcinogenic nitrosamines in tobacco, as an example. *Die Natur*. 49: 488-499 (1962)

8. Boyland, E., Roe, F.J.C. and Gorrod, J.W. Induction of pulmonary tumors in mice by nitrosocotinine, a possible constituent of tobacco smoke. *Nature* 202: 1126 (1964)

9. Boyland, E., Roe, F.J.C., Gorrod, J.W. and Mitchley, B.C.V. The carcinogenicity of nitrosoanabasine, a possible constituent of tobacco smoke. *Br. J. Cancer*. 18: 265-270 (1964)

10. Smith, P.A.S. and Loeppky, R.N. Nitrosative cleavage of tertiary amines. *J. Am. Chem. Soc.* 89: 1148-1152 (1967)

11. Klus, H. and Kuhn, H. Research on the non-volatile nitrosamines of tobacco alkaloids. *Fachliche Mitt.Austria Tabakwerke* 16: 307-317 (1975)

12. Hecht, S.S., Chen, C.B., Dong, M., Ornaf, R.M., Hoffmann, D. and Tso, T.C. Studies on nonvolatile nitrosamines in tobacco. *Beitr. Tabakforsch.* 9: 1-6 (1977)

13. Hecht, S.S., Chen, C.B. and Hoffmann, D. Synthesis of N-nitrosamino aldehydes. *Tetrahedron Lett.* 8: 593-596 (1976)

14. Hecht, S.S., Chen, C.B., Ornaf, R.M., Jacobs, E., Adams, J.D. and Hoffmann, D. Reaction of nicotine and sodium nitrite: formation of nitrosamines and fragmentation of the pyrrolidine ring. *J. Org. Chem.* 43: 72-76 (1978)

15. Hecht, S.S., Chen, C.B., Hirota, N., Ornaf, R.M., Tso, T.C. and Hoffmann, D. Tobacco specific nitrosamine: formation from nicotine *in vitro* and during tobacco curing and carcinogenicity in strain A/J mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 60: 819-824 (1978)

16. Hoffmann, D., Brunnemann, K.D., Prokopczyk, B. and Djordjevic, M.V. Tobacco-specific N-nitrosamines and areca-derived N-nitrosamines: chemistry, biochemistry, carcinogenicity, and relevance to humans. *J. Toxicol. Environ. Health* 41: 1-52 (1994)

17. Spiegelhalder, B. and Bartsch, H. Tobacco-specific nitrosamines. *Eur. J. Cancer Prev.* 5: 33-38 (1996)

18. Shao, W., Powell, C. and Clifford, M.N. The analysis by HPLC of green, black and pu'er teas produced in Yunnan. *J. Sci. Food Agric.* 69: 535-540 (1995)

19. Richard, N.L. and Yen, T.B. Polymer for scavenging nitrosating agents. United States Patent. Patent number, 5,087,671 (1992)

20. Barlow, R.D., Stone, R.B., Wald, N.J. and Puhakainen, E.J. The direct barbituric acid assay for nicotine metabolites in urine: a simple colorimetric test for the routine assessment of smoking status and cigarette smoke intake. *Clin. Chim. Acta.* 165, 45-52 (1987)

21. Joseph, D., Lajos, H., Nigel, H., Stanley, I.R. and Timothy, T. Electron-impact and chemical ionization detection of nicotine and cotinine by gas chromatography-mass spectrometry in rat plasma and brain. *J. Chromatogr.* 579: 93-98 (1992)

22. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol. Med.* 20: 933-956 (1996)

23. Paya, M., Halliwell, B. and Hoult, J.R.S. Interaction of a series of coumarins with reactive oxygen species. Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. *Biochem. Phar-*

- macol. 44: 205-214 (1992)
24. Pannala, A., Razaq, R., Halliwell, B., Singh, S. and Rice-Evans, C.A. Inhibition of peroxynitrite-dependent tyrosine nitration by hydroxycinnamates: nitration or electron donation? *Free Radical Biol. Med.* 24: 594-606 (1998)
 25. Bartsch, H., Ohshima, H. and Pignatelli, B. Inhibition of endogenous nitrosation. Mechanisms and implications in human cancer prevention. *Mutation Res.* 202: 307-324 (1988)
 26. Whiteman, M. and Halliwell, B. Protection against peroxynitrite-dependent tyrosine nitration and α_1 -antitrypsinase inactivation by ascorbic acid. A comparison with other biological antioxidants. *Free Radical Res.* 25: 275-283 (1996)
 27. Oldreive, C., Zhao, K., Paganga, G., Halliwell, B. and Rice-Evans, C. Inhibition of nitrous acid-dependent tyrosine nitration and DNA base deamination by flavonoids and other phenolic compounds. *Chem. Res. Toxicol.* 11: 1574-1579 (1998)
 28. Yamazaki, H., Inui, Y., Yun, C.H., Guengerich, F.P. and Shimada, T. Cytochrome P450 2E1 and 2A6 enzymes as major catalysts for metabolic activation of N-nitrosodialkylamines and tobacco-related nitrosamines in human liver microsomes. *Carcinogenesis* 13: 1789-1794 (1992)
 29. Code, E., Crespi, C., Penman, B., Gonzalez, F., Chang, T. and Waxman, D. Human cytochrome P450 2B6: interindividual hepatic expression, substrate specificity, and role in procarcinogen activation. *Drug Metab. Dispos.* 25: 985-993 (1997)
 30. Kensler, T.W., Groopman, J.D., Eaton, D.L., Curphey, T.J. and Roebuck, B.D. Potent inhibition of aflatoxin-induced hepatic tumorigenesis by the monofunctional enzyme inducer 1,2-dithiole-3-thione. *Carcinogenesis* 13: 95-100 (1992)
 31. Primiano, T., Egner, P.A., Sutter, T.R., Kelloff, G.F., Roebuck, B.D. and Kensler, T.W. Intermittent dosing with oltipraz: relationship between chemoprevention of aflatoxin-induced tumorigenesis and induction of glutathione S-transferases. *Cancer Res.* 55: 4319-4324 (1995)
 32. Langou t, S., Coles, B., Morel, F., Becquemont, L., Beaune, P., Guengerich, F.P., Ketterer, B. and Guillouzo, A. Inhibition of P4501A2 and P4503A4 by oltipraz results in reduction of aflatoxin B1 metabolism in human hepatocytes in primary culture. *Cancer Res.* 55: 5574-5579 (1995)
 33. Palinski, W., Rosenfeld, M.E., Yla, H.S., Gurtner, G.C., Socher, S.S., Butler, S.W., Carew, T.E., Steinberg, D. and Witztum, J.L. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 1372-1376 (1989)
 34. Hammond, B., Kontos, H. A. and Hess, M. L. Oxygen radicals in the adult respiratory distress syndrome, in myocardial ischemia and reperfusion injury, and in cerebral vascular damage. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 63: 173-187 (1985)
 35. Cheeseman, K.H. and Forni, L.G. An investigation of the novel anti-inflammatory agents ONO-3144 and MK-447 studies on their potential antioxidant activity. *Biochem. Pharmacol.* 37: 4225-4233 (1988)
 36. Weitzman, S.A., Weitberg, A.B., Clark, E.P. and Stossel, T.P. Phagocytes as carcinogen: malignant transformation produced by human neutrophils. *Science* 227: 1231-1233 (1985)
 37. Fantone, J.C. and Ward, P.A. Polymorphonuclear leukocyte-mediated cell and tissue injury: oxygen metabolites and their relations to human disease. *Human Pathol.* 16: 973-978 (1985)
 38. Sichel, G., Corsaro, C., Scalia, M., DiBilio, A.J. and Bonomo, R.P. *In vitro* scavenger activity of some flavonoids and melanins against O_2^- . *Free Radic. Biol. Med.* 11: 1-8 (1991)
 39. Salh, N., Miller, N., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G.P. and Rice-Evans, C. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and chain-breaking antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* 322: 339-346 (1995)
 40. Weitberg, A.B. and Corvese, D. Oxygen radicals potentiate the genetic toxicity of tobacco-specific nitrosamines. *Clin. Genet.* 43: 88-91 (1993)
 41. Xu, Y., Ho, C.-T., Amin, S.G., Han, C. and Chung, F.-L. Inhibition of tobacco specific nitrosamine-induced lung tumorigenesis in A/J mice by green tea and its major polyphenols as antioxidants. *Cancer Res.* 52: 3875-3879 (1995)

(2001년 8월 7일 접수)