식품의 암예방 활성 측정을 위한 실험모델의 평가

전향숙 · 김현정
안정성연구팀

1. 서 언

최근 건강유지의 핵심은 발병 후 치료보다는 예방에 있음을 인식하게 되었고, 특히 암 및 노화 분야에서는 주요 주제로 대두되고 있다. 암(cancer)의 시작은 일회성의 병적인 사건보다는 매우 오랜 시간 동안 이루어지는 점진적이며 단계적인 일련의 현상에 기인하며, 세포의 유전적, 생화학적 변화를 포함한 이상현상이 오랜 기간동안 지속됨으로써 암화(carcinogenesis)가 일어나는 것으로 생각되고 있다. 따라서 이와 같이 건강한 세포가 병적인 세포로 진행되는 중간에 병적인 변화를 미리 예방, 지연 또는 중지시킬 수 있는 기회가 존재하며 이를 이용하여 다양한 차원에서 암예방에 관한 연구가 진행되고 있다. 이중 천연 또는 합성 화합물을 이용하여 암화 중 전암단계(precancerous stage)에서 암의 진행을 예방, 차단 또는 역전하고자 하는 방법을 화학적 암예방(chemoprevention)이라고 하며 이와 관련한 효과적인 물질탐색에 많은 노력이 기울여지고 있다. 특히 여러 가지 식품 원료중 식물은 유망한 암예방 물질의 급원이며 아직 미발견된 후보물질이 많이 존재할 것으로 추정된다. 식물의 경우 보수적인 추정치로 250,000종이 존재하며, 이미 활성이 있다고 알려진 식품성분이나 식품도 존재하기 때문에 이들로부터 적당한 생물활성을 선별하고 검증할 수 있는 평가 방법이 필요하다.

암예방 활성 측정법은 사용목적, 시험방법, 시험기간 등에 따라 다양하게 분류할 수 있으나 한 예로써, 시험관에서 행해지는 *in vitro* 시험법과 동물을 이용하여 행해지는 *in vivo*시험법으로 대별하여 구분할 수 있다. 후자와 비교해 전자의 경우 시험의 간편성, 비용, 시간 등의 측면에서 장점이 있으나 한 개체 내에서 일어나는 길항 작용을 모두 대별하기 어려운 단점이 있다. 따라서 *in vitro* 방법의 경우 대응되는 *in vivo* 모델에서의 연구결과와의 상관성이 제시되어야 하며 상호 보완할 수 있는 방안도 필요하다. 그러나 현재 암예방 활성에 있어서 *in vitro* 및 *in vivo* 방법간의 상관성뿐만 아니라 각 방법의 장단점을 포함한 정확한 평가가 이루어지고 있지 않아 실험자가 적합한 방법을 선정하는데 어려움이 있다. 이에 본 총설에서는 식품성분의 암예방 활성과 관련된 측정법을 논하고 방법간의 상관성 및 장단점 등을 분석, 제시하고자 한다.

2. 암예방 활성 측정법의 분류

일반적으로 "assay"라고 함은 시험법으로 신뢰성, 재현성, 높은 감도가 요구되며 무엇보다도 예견을 할 수(predictive) 있어야 한다. 분류하는 사람에 따라 다를 수 있으나 편의상 암예방 활성 측정법의 분류는 사용 목적에 따라 전선별(prescreen), 선별(screen), 모니터(monitor), 이차시험(secondary

Table 1. Roles of bioassays used for measurement of cancer chemopreventive activity

Step used	Definition	Consideration & description
Prescreen	An assay applied to large numbers of initial samples to determine whether or not they have any cancer preventive activity of the desired type.	- must have high capacity - must have low cost - must give rapid answer - need not be quantitative - for discarding inert materials and for providing an enriched feedstock for the screen
Screen	An assay which is used to select materials for detailed individual study(secondary testing).	- for selection to a manageable number for secondary testing
Monitor	An assay used to guide fractionation of a crude material towards isolation of the pure bioactive compounds.	- must be fast, cheap and high capacity - must be readily available to the chemist
Secondary testing (detailed evaluation)	Careful, detailed testing of lead compounds in multiple models and test conditions to select candidates for development toward clinical test.	- characteristically, low capacity, expensive and slow assay
Clinical trials	Phase I(toxicology study, preclinical trial) Phase II(limited trials to evaluate activity against specific cancers) Phase III(larger trials against a greater variety of cancers to compare the activity of the new agent with standard therapy)	- chosen for phase III, if agents show activity in phase II.

testing), 임상시험(clinical trial)으로 나누거나 (Table 1), 시험 도구에 따라 시험관에서 행해지는 *in vitro*("in glass"를 뜻함, 이하 시험관내로 표현함)시험법과 동물을 이용하여 행해지는 *in vivo*("in life"를 뜻함, 이하 생체내로 표현함)시험법으로 대별하여 구분할 수 있다. 또한 시험기간에 따라 크게 장기(long-term) 시험법과 단기(short-term) 시험법으로, 사용되는 마커(marker)에 따라 유전적, 세

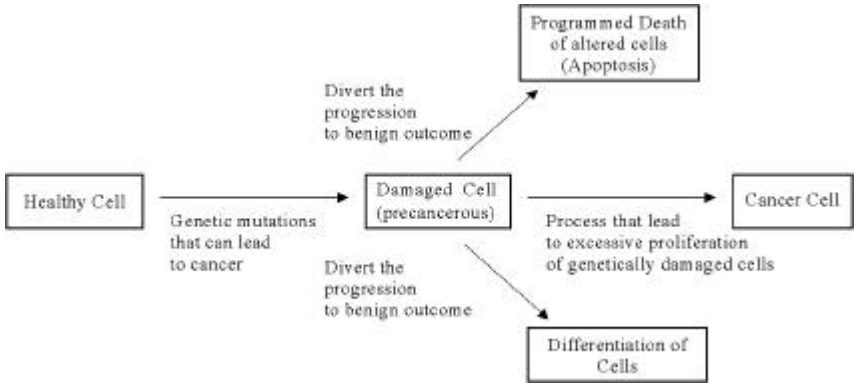

Fig. 1. Progression to cancer.

Progression to cancer can be avoided in two basic ways. Some chemopreventive supplements are intended to halt the progression, either before or after genetic mutations cause a cell to become precancerous. Another approach relies on agents that divert the progression to a benign outcome, such as the death(apoptosis) or differentiation of precancerous cells.

포적, 조직적, 생화학적 및 약리적 시험법으로, 암의 진행이나 작용기전과 관련하여 발암원-차단 활성(carcinogen-blocking activity), 항증식/진행 활성(antiproliferation/antiprogression activity), 항침윤/전이(antiinvasion/antimetastasis activity)활성 시험법으로, 작용 표적(target)에 따라 세포의 성장 및 분열 관련 활성, 신혈관생성(angiogenesis) 및 전이(metastasis) 활성 시험법 등으로 분류할 수 있다. 본 총설에서는 시험 도구에 따라 시험관내 시험법과 생체내 시험법으로 대별하여 크게 구분한 다음 일차적으로 암의 진행이나 작용기전을 고려하고 이차적으로 사용목적 및 마커를 고려하여 암예방 활성 측정을 위한 여러 가지 실험모델들을 평가하였다.

3. 시험관내 시험법

암의 진행은 시간성을 가지고 점진적으로 진행되며(Fig. 1) 이를 막는 방법은 크게 두 가지 경로로

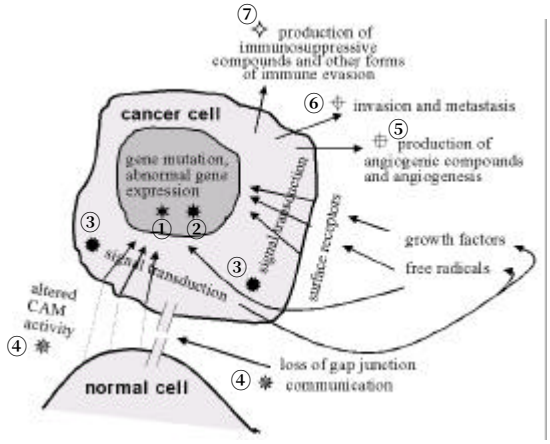

Fig. 2. Procancer event in cell.

나눌 수 있는데 세포를 precancerous cell로 암화시키는 유전적 돌연변이 단계를 중지시키는 경우와 이미 손상된 precancerous cell을 apoptosis 등 세포 사멸을 통하여 제거하거나 분화를 통해 암화를 억제하는 방법이 있다. 이를 좀 더 세분화하여 살펴보기 위하여 시간적인 개념을 배제하고 세포수준에

Table 2. Comparision of molecular versus cellular assays

Factor	Molecular assay	Cellular assay
Target	Single subcellular target	Any target inhibiting cell growth
Assay capacity needed	Very high	Moderate to high
Number of leads found	Few but specific	Many leads but most not of interest
False positives	Agents that don't enter cells or not metabolised rapidly	Wide variety of toxins
False negatives	All compounds working by other mechanisms	Few

서 일어날 수 있는 암과 관련된 현상들을 나타내어 본다면 Fig. 2와 같이 7가지로 요약될 수 있을 것이다. 즉, 이러한 현상들에 대해 유전적으로 불안정성을 주는 돌연변이나 비정상적인 유전자 발현을 감소시키고(①,②), 비정상적인 신호전달과정(signal transduction)을 억제하고(③), 세포부착물질이나 gap junction의 기능을 조절하여 정상적인 세포간 전달을 유도시키고(④), 혈관신생성을 억제하고(⑤), 전이나 침윤을 억제하거나(⑥), 면역반응의 회복을 유도함에(⑦) 의해 암을 예방할 수 있을 것이다. 한편, 암예방 활성을 나타내는 물질들의 작용기전을 고려한 측정법들은 크게 발암원-차단 활성과 항증식/진행 활성과 관련되어 있으므로 암예방 활성법에 대한 고려도 이러한 맥락에서 이루어져야 한다. 우선 발암원-차단 활성의 경우 발암원의 섭취, 형성 및 활성화, 불활성화 또는 해독화, 발암원과 DNA의 결합억제, DNA의 수복(repair)등이 포함된다. 항증식/진행 활성의 경우는 telomerase활성 저해, apoptosis의 유도, 신호전달과정, 호르몬 또는 성장인자의 조절, polyamine 대사의 저해, 말단분화(terminal differentiation)의 유도, 면역반응 및 발암억제기능의 회복, 세포간 정보교환의 증진, 기저막 붕괴 및 신혈관 생성 억제 등이 포함된다.

식품원료로부터 암예방 후보물질을 선별하거나 기알려진 물질의 암예방 활성을 검증하거나 기전을 연구하는 등 연구자의 사용목적에 따라 시험관내 시험법의 선택이 달라질 것이다. 일반적으로 암예방 활성물질을 선별하기 위한 시험관내 시험법은 다시 크게 세포 시험법(cellular assay)과 분자 시험법(molecular assay)으로 나누어 볼 수 있다. 세포 시험법은 세포 그 자체를 사용하는 한편, 분자 시험법은 효소, 수용체, DNA 등 isolated system을 사용하며 이들 시험법의 몇 가지 특징을 비교하면 Table 2와 같다. 즉, 분자시험법은 높은 특이성을 가지고 있으나 선별률은 아주 낮으며, 세포내로 흡수되지 않거나 대사가 신속하게 이루어지는 물질들은 의양성의 결과를, 다른 기전에 의해 활성을 나타내는 물질인 경우는 의음성 결과를 초래할 수 있다. 반면, 세포시험법은 어떤 물질이 활성물질로 선별될 확률은 매우 높으나 목적 활성이 아닌 세포의 소기관 등에 영향을 줄 수 있어 의양성 결과를 얻기 쉬운 단점이 있다.

1. 암세포 독성 시험법(assays for cytotoxic potential)

(1) 수립된 세포주의 이용

식품으로부터 후보 항종양 화합물을 분리하고 동정하는 일을 수행하는 대부분의 연구 프로그램들은 bioassay-directed fractionation에 의존한다. 여기에서 항종양이라 함은 생체내 종양 모델(tumor) 시스템에 대해 효과가 있는 것으로써, 숙주와 비교해 종양에 대해 선택성이 있다는 것을 함축한다. 반면, 항암(anticancer)은 인간에 있어서 질병상태의 치료에 효과가 있는 것으로써, 본고에서 항암 활성은 human trial에 의해서 입증된 것으로 정의한다. 이러한 용어를 잘못 사용하는 예로써 시험관내에서 세포주에 대해 성장저해를 항암효과(anticancer effect)라고 보는 것은 부적절한데 이것은 거의 독성을 나타내는 현상이라 보여진다. 세포주를 대상으로 활성을 측정하기 위해, P388이나 KB 세포가 먼저 사용되기 시작하였는데, 이 방법은 여러 농도의 시험물질을 세포에 처리한 후 48시간 내지 72시간 후에 세포의 성장을 평가하는 것이다. 결과는 세포수를 세거나 단백질 농도 등을 정량한 다음 세포성장을 50% 저해하는데 요구되는 농도인 EC_{50}(concentration required to inhibit cell growth by 50%)로 나타낸다. 그러나 비록 이러한 방법이 새로운 구조를 가진 세포독성 화합물을 분리하는데는 유효한 것으로 나타났지만, 종종 암세포에서 활성이 있는 화합물이 그 암세포를 이식시킨 생체내 마우스 모델에서는 활성이 없는 경우가 있다. 대개의 경우, 분리된 물질들은 단지 독성이 있는 것들이며, 다른 단점으로는 화합물 또는 추출물이 cytotoxic(세포독성이 있는)한 것인지, cytostatic(세포성장을 멈추는)한 기전인지를 분명하게 구별할 수 없다는 것이다.

미국 국립 암연구소(NCI)는 세포독성 potential이 높은 화합물 또는 추출물을 human cell panel에 대해서 평가하는 프로그램을 사용해오고 있다. 목적은 사람의 1차 종양에서 단일형태로 유래된 세포주에 대해 선택적인 세포독성을 보이는 일련의 화합물을 발견하자는데 있다. 이와 같이 인간의 종양에서 유래된 일련의 세포들을 사용하는 것은 이론적 가치 이외에도 무흉선(athymic) 마우스에 고형암을 유도시키는 것으로도 사용할 수 있다는 실용적인 측면도 있다.

특히 특이성을 나타내는 화합물은 특이 암 형태의 예방이나 치료에 유용하다. 그러나 이러한 임상적인 결과에 상관없이 선택적인 세포독성의 개념은 한 종양형태로부터 다른 종양 형태로 분화하는 세포 특이적인 수용체(receptor)의 존재를 암시한다. 특이성을 보이는 화합물의 발견은 종양 특이적인 예방물질의 개발 전략에 있어서 기념비적인 것이며, 한 세포 형태에 특이적인 세포독성 화합물은 적당한 subcellular target을 확인하는데 매우 유용할 것이다. 따라서 바람직한 특이성을 나타내는 화합물들은 종양 특이 수용체 부위(tumor-specific receptor site)를 추적하는데 유용한 수단으로서 이용될 수 있다.

화학요법적인 접근방법에 의해 해결될 수 있는 악성종양(malignancy)이 어떤 독특한 생화학적 요소와 관련성이 있는 경우는 극히 드물다. 그러나 tyrosinase는 melanocyte와 관련성이 있으며, melanoma가 일반적으로 tyrosinase 활성을 나타내는 것을 인식하는 것이 중요하다. 따라서 tyrosinase에 의한 반응 형태와 quinone moiety에 의해 작용하는 항종양 물질들을 주목함에 의해 melanoma에 특이적인 암예방물질을 개발하는 것도 가능하다. 암예방 활성을 나타내는 물질을 개발함에 있어서 유용한 것은 인간 유래의 melanoma 세포모델을 수립하는 것이다. Pezzuto 등(1988)은 23종 인간 유래 melanoma 세포들의 tumorigenicity와 doubling time 등 특성을 조사하고 tyrosinase 수준을 측정하였다. 따라서 이러한 결과를 바탕으로 Kern 등은(1988) tyrosinase 대사에 의존적인 독성을 나타내는 천연물을 동정한 바 있다.

수립된 세포주를 이용한 최종 세포독성의 측정은 일반적으로 세포의 성장이나 사멸정도를 평가하는데, MTT[3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphe

nyltetrazolium bromide], MTS[(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, Owen's reagent)] 등의 tetrazolium계 물질이 생존 세포의 효소작용에 의해 환원되어 formazan으로 침전되는 정도를 흡광도로 측정하는 방법, SRB와 같이 단백질에 결합하는 특성을 지닌 물질을 이용하여 단백질을 측정하여 세포성장을 추산하는 방법(미국 국립 암연구소에서 암예방 또는 치료 물질의 대량 검색시 이용하는 방법), lactate dehydrogenase(LDH)와 같이 세포막을 통과하지 못하나 세포막에 손상을 입게되면 막 투과성이 변화하여 세포막으로 LDH가 방출되는 원리를 이용하거나 ^{51}Cr이 방출되는 원리를 이용하여 세포가 사멸된 정도를 측정하는 ^{51}Cr-방출 시험법 등이 있다.

(2) 기타 세포 이용 시험법

인간의 종양간세포(tumor stem cell)는 일반적으로 종양을 새롭게 하고 병의 전이를 촉진하는 자손 세포(descendent cell)를 발생시키는 종양내의 세포로 인식된다. 세포독성 화학요법에 대한 가장 바람직한 대상은 neoplasia로 발달되고 전파시키는데 기여하는 일련의 세포군일 것이므로 초대 인간 종양 세포를 배양한 다음 여러 물질들에 대한 감수성을 평가하는 시도들이 소개되었다. 그러나 이러한 접근방법 자체는 굉장히 좋으나 clinical setting이나 실험실에서는 성공적이지 못한 것으로 나타났다.

Corbett 등(1986)은 대표적인 인간 고형암(폐, 대장, 췌장) 세포주와 murine leukemia 세포주(P388 또는 L1210)를 soft agar medium에서 동시에 plating하여 세포독성을 평가하는 방법을 제시하였다. 이 방법은 종전에 항생제의 항균효과를 평가하기 위해 도입하였던 Kirby-Bauer disc diffusion 법의 원리와 유사한 것으로 광학현미경에 의해 시험물질에 의해 유도된 zone을 산출하여 고형암과 murine leukemia간에 250 unit(25 ㎛ zone이 1unit임) 이상의 차이를 보이는 경우 선택적으로 효과가 있는 것으로 간주되었다. 이러한 시험법을 이용하여 좋은 결과를 보인 예는 flavone acetic acid이다. 이 방법의 경우, 물질의 확산을 제어할 수 없다는 단점이 있으나 대량의 시료들을 단시간내 평가할 경우에는 매우 경제적인 방법인 것으로 보인다.

최근에 다수의 특이 유전자의 발현이 인간의 암과 관련이 있는 것으로 알려졌다. 대표적인 예로는 *ras*, *myc*, *abl*, *erb-b* 및 *src* 유전자 등이 포함된다. 이러한 oncogene nucleic acid의 이용이 가능하게 되어 모세포주를 transfection시키는 것이 비교적 간편하게 되었다. 따라서 표면상으로는 단지 하나의 oncogene이 있고 없음에 따라 달라지는 세포주 batteries를 쉽게 만드는 일이 가능하게 되었다. 이러한 세포주 대비 타 세포주중 어느 한가지를 효과적으로 저해하는 것은 oncogene의 발현이나 기능을 선택적으로 저해한다는 것 즉, 종양 특이성을 나타낸다는 것을 함축한다. 이러한 접근의 한 예로 인간 bronchial epithelial cell을 Harvey *ras* oncogene으로 transfection시킨 세포주와 정상 인간 bronchial epithelial cell과의 감수성이 비교되었다. 그러나 일차 bronchial epithelial cell의 성장속도는 transfection시킨 세포주의 성장속도에 비해 늦기 때문에 다양한 처리 시간이 요구되고 이에 수반되어 다양한 성장과 발현 시간이 요구되기 때문에 진정한 특이성을 확립하는 것은 어려울지 모른다. 그럼에도 불구하고 이러한 접근방법은 미래에 많이 이용되어질 것으로 예상되는 흥미로운 접근방법이다.

암의 종류에 따라 성장이나 유지에 요구하는 조건이 다르나 일반적으로 표준 환경조건에서 시험관내 시험을 수행하는 것이 보통이다. Sartorelli(1988)는 고형암의 경우 저산소 조건을 선호하므로 호기적인 조건과 저산소 상태(95% nitrogen/5% CO2)의 조건하에서 더 큰 활성을 나타내는 물질을 찾음으로써 고형암을 예방하거나 치료할 수는 물질을 개발할 가능성이 높다고 하였다. 기존 항암제중 저산소 상태에서 선택적인 독성을 나타내는 것으로는 mitomycin C가 있다. 그러나 이 경우 중요한 기술적인 문제중 하나는 저산소 또는 호기 상태에서 시험

물질들을 처리하는 동안 세포간에 생존율이나 성장에 있어서 유의적인 차이가 없어야 한다는 것이다.

2. 발암원-차단 활성 (carcinogen-blocking activity)

(1) Gene mutation

유전독성은 어떤 물질이 유전자 또는 유전자의 담체인 염색체에 미치는 상해작용을 말하는 것으로 OECD에서 정한 유전독성시험은 ①포유동물 골수세포 염색체이상시험, ②포유동물 세포를 이용한 시험관내 유전자 돌연변이시험, ③초파리를 이용한 반성열성치사시험, ④설치류를 이용한 우성치사시험, ⑤포유동물세포를 이용한 시험관내 자매염색분체교환시험, ⑥*Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 유전자 돌연변이시험, ⑦*Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 유사분열 재조합시험, ⑧포유동물세포를 이용한 체외 DNA 손상, 수복, 부정기 DNA 합성시험, ⑨포유동물 정원세포의 염색체 이상 시험, ⑩마우스 스포트 시험, ⑪마우스를 이용한 유전성전좌시험, ⑫포유동물 간세포를 이용한 생체내 부정기 DNA 합성시험 등이 있다. 우리나라의 경우 식품의약안전청 고시 제1999-61호로 의약품 등의 독성시험 기준에서 박테리아를 이용한 복귀돌연변이 시험, 포유류 배양세포를 이용한 체외(시험관내) 염색체이상 시험 또는 마우스 림포마 tk 시험, 설치류 조혈세포를 이용한 생체내 소핵시험의 세가지시험을 최소한 실시하여야 하는 것으로 정하고 있다.

이 가운데 식품을 포함한 천연물로부터 암예방 활성을 선별하거나 모니터하는데 널리 사용되어 온 시험관내 시험법이 Ames 시험이다. Ames 시험에서는 histidine 요구성 균주로서 frameshift allele *his* D3052를 가지고 있는 *Salmonella typimurium* TA98와 base-substitution allele *his*G46을 가지고 있는 TA100을 주로 사용하게 되는 데 시험하는 화합물에 의하여 돌연변이가 일어날 경우 배지 중 histidine이 존재하지 않더라도 생육이 가능한 원리를 이용하여 시험 물질의 돌연변이원성 및 항돌연변이원성을 시험할 수 있다. 이 경우 target organism으로 사용하는 박테리아가 화합물의 산화를 촉매 할 수 없기 때문에 시험하고자 하는 화합물의 대사적 활성화를 위하여 Aroclor 1254로 전 처리한 랫드 간으로부터 얻은 간대사 효소원을 외부로부터 첨가해 주어야 한다. 그런데 정상적인 생체내에서는 cytochrome P450 I family가 5% 미만인 반면 Aroclor 1254로 전처리한 간 분획의 경우 P450 I 이 50%를 넘기 때문에 Ames 시험을 통한 변이원성 시험에서 양성반응을 나타낸 경우일지라도 생체내에서 같은 수준으로 반응성 산물이 생성될 것으로 가정할 수는 없다. 실제로 처리하지 않은 동물의 activation system은 aromatic amines와 polycyclic aromatic hydrocarbons등 인간과 동물에 대해 발암원으로 작용하는 것으로 알려진 화합물에 대해 양성 반응을 나타내지 못한다. 또한 procaryotic 박테리아를 사용하기 때문에 인간과 같은 eucaryotic에서의 대사를 정확하게 대별하기 어려운 단점이 있다. 뿐만 아니라 시험대상 물질이 추출물일 경우 histidine이 혼재할 가능성이 높아 의양성 결과를 얻기 쉬우며, 시험대상 물질이 항균활성을 보이는 경우 의음성 결과를 초래할 수 있다는 단점이 지적되고 있다. 그러나 이 방법은 비교적 간편하고 신속하며 다량의 시료를 검색하기 용이하므로 일차적인 스크리닝 방법으로는 널리 이용되고 있다. 몇 가지 화합물에 대한 Ames 시험에서의 변이원성 결과와 설치류에서의 발암성 결과에 대한 비교는 다음의 Table 3과 같다.

(2) 기타 DNA와의 상호작용의 측정

기존 알려진 항종양 물질들은 DNA와의 상호작용에 의해 작용하는 것으로 알려진 바, chlorambucil, cyclophosphamide, melphalan, streptococin과 같은 알킬화제, bleomycin, doxorubin, mithramycin 등의 항종양 항생제 등이 이러한 작용기전을 따르는 것으로 알려져 있다.

약 83종 화합물에 대한 랫드 간 DNA adduct

Table 3. Mutagenicity and carcinogenicity characteristics of the compounds employed in the present study

Compound	Mutagenicity in the Ames test	Carcinogenicity in Rodent bioassay
Anthracene	−	−
1-Aminoanthracene	+	+
2-Aminoanthracene	+	+
Fluorene	−	−
2-Acetylfluorene	NAD	NAD
2-Aminofluorene	+	+
2-Acetylaminofluorene	+	+
Biphenyl	−	−
2-Aminophenyl	?+	−
3-Aminophenyl	−	?+
4-Aminophenyl	+	+
Naphthalene	−	−
1-Naphthylamine	?+	−
2-Naphthylamine	+	+

?+ : possibly a weak mutagen or carcinogen
NAD : No available data

결과와 hepatocarcinogenic potency에 대한 장기 시험(longterm bioassay결과를 비교한 결과 매우 높은 정량적 상관성이 관찰된 바 있다. 특히, 여러 polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs) 및 alkylating agents의 발암성과 DNA adduct 정도가 밀접한 연관성이 있다는 결과가 널리 발표되고 있다. DNA adduction은 발암물질의 활성화 및 해독화 과정을 모두 반영하기 때문에 암예방 활성물질을 탐색하거나 연구하는데 있어 매우 적절한 지표로 보고되고 있다.

그러나 DNA 시료중 adduct의 농도는 생성속도, 수복 또는 세포 사멸에 의한 제거 및 DNA 복제(adduct가 형성되어 있지 않은 새로 복제된 DNA)에 의한 희석 등의 균형에 따라 달라진다. 발표된 연구결과는 대부분 발암원을 1회 처리한 결과로서 발암원을 처리한 후 adduct 생성량을 분석하기까지의 시간에 따라 adduct level과 종양 발생 빈도사이의 관계가 달라지므로 보다 정량적인 자료를 제공하고 있다고 보기는 어렵다. 심지어 7,12-dimethylbenz[a]anthracene(DMBA)에 만성적으로 노출된 경우 최초의 유두종(papilloma)이 발생하기까지의 시점과 adduct 생성량과의 상관성을 분석한 결과, 일

반적으로 예상하는 것과는 달리 잠복기가 가장 짧은 처리구에서 adduct 생성량은 가장 낮게 나타나는 결과를 보여주고 있다. 이는 왕성한 세포분열에 의하여 adduct 생성량이 희석되었기 때문으로 해석된다. 따라서 시험관내 활성 측정의 지표로서 DNA adduct 형성량을 선정할 경우 세포 분열 속도를 아울러 고려해야 할 것이라고 사료된다.

DNA와 반응성이 있는 발암원은 보통 여러 개의 adduct를 형성하는데, 그 숫자는 aromatic amine의 경우에서처럼 몇 개에서부터 dimethylnitrosamine에서 유도된 methyl diazonium ion(CH_3-$N^+ \equiv N$)과 같은 methylating agent의 경우는 십 여개에 달하고 있다. 여러 발암원 처리 농도와 adduct 형성량과의 상관관계와 비교하였을 때 랫드 간의 경우 50% hepatocellular incidency를 나타낼 때 발암원에 의한 adduct 농도는 10^8 nucleotides 당 aflatoxin B_1, tamoxifen, 2-amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]-quinoline(IQ), 2-amino-3, 8-dimethylimidazo[4,5-f]-quinoxaline(MeIQx), 2,4-diaminotoluene과 dimethylnitrosamine의 순서대로 53-2083 개로 나타났고, 마우스 간의 경우 ethylene oxide, dimethylnitrosamine, 4-aminobiphenyl 및 2-acetylaminofluorene의 순서대로 812-5543 개로 나타나는 등 adduct 생성량의 분포범위가 좁아, 발암성에 대한 좋은 지표로 사용될 수 있음을 시사하고 있다.

프로파지(prophage)의 유도로 용원성 반응(lysogenic response)을 야기시키는 원리에 기초한 시험법들을 이용하여 핵산과의 상호작용에 의해 작용하는 많은 암예방 물질들을 선별하고 모니터하고 있다. 즉, *Escherichia coli* K12 *envA uvrB*(lamda) 시험균주를 이용하여 plaque형성 균수를 계수하는 "inductest", β-galactose 산물인 *lacZ* 유전자를 융합시킨 시험균주를 이용하여 이 효소의 기질분해 반응을 흡광도로써 측정하는 "SOS chromotest"를 비롯한 유사 시험관내 시험법이 많이 이용되고 있다. 이러한 시험법과 유사하게 수복능이 결여된 변이주와 해당 야생 균주를 사용하여 DNA 손상에 대한 감수성의 차이를 측정하는 'rec-assay' 등도 암예방 물질들을 선별하는데 사용되었다.

또한 DNA 절단능이 있는 물질의 경우 cccDNA (covalently closed circular DNA)와 반응시키면 DNA I형이 DNA II형으로 변화하고, 변화된 DNA를 전기영동상에서 관찰하는 원리를 이용한 'DNA cleavage assay'도 DNA와 상호작용하는 물질을 선별하기 위해서 사용되었다. 비교적 최근에는 DNA 손상을 가진 세포는 전기영동시 세포중앙에서부터 혜성(comet) 모양의 긴 꼬리를 가지게 되는데서 이름 붙여진 'comet assay'를 이용하여 DNA의 손상정도나 손상 회복능을 평가하는데 사용되고 있다. 이외에 DNA와 상호작용하는 암예방 활성 물질을 선별 및 모니터하기 위해서 topoisomerase I 및 II의 활성을 측정하고 있다. 즉, 이 효소들은 DNA가 과도하게 꼬이도록 하거나 DNA 가닥이 풀리도록 촉진함으로써 DNA를 변환시키는데 일반적으로 암세포에는 topoisomerase I 및 II 효소가 정상세포보다 상대적으로 많이 분포되어 있으므로 이 효소를 저해함에 의해 암예방 활성이나 부작용이 적은 항암제를 개발할 수 있다고 사료된다.

(3) 발암물질 대사 효소계

발암원 중 상당수는 자체로는 반응성이 없어 독성을 나타내지 않으나, 체내에서 활성화 효소계에 의해 극성 기(polar group)가 분자내로 유입되어 수용성이 증가된다. 그 후 glucuronide 또는 glutathione 등 체내 거대분자와 결합함으로써 수용성 포접화합물을 형성하고 즉시 체외로 배출된다. 이러한 일련의 반응을 통하여 발암원은 체외로 배출되나 그 과정 중 모화합물보다 독성이 강한 중간 생성물이 생성되기도 한다. 이러한 과정에 있어서 일차적으로 발암원의 독성을 증가시키는 활성화 반응(제 1상계 반응)이 억제되거나, 생체 내 거대분자와 결합시킴으로써 체외로의 배출을 용이하게 하는 해독화 반응(제 2상계 반응)이 증가될 경우 궁극적으로는 발암물질의 작용을 약화시켜 암예방 효과를 나타낼 것으

로 기대된다.

제 1상계 반응은 주로 산화과정이나, 환원, 가수분해, epoxide의 수화, 탈수소반응 등도 포함되며, 이 과정을 통해 친유성(lipophilic)인 발암물질의 수용성이 증가하고 제 2상계 반응의 기질이 될 수 있도록 한다. 제 1상계 효소 중 발암원의 대사에서 중요한 역할을 하는 cytochrome P450은 epoxidation, hydroxylation, *N*-dealkylation, *O*-dealkylation, *S*-dealkylation, *S*-oxidation, *N*-oxidation, *P*-oxidation, desulfuration, dehalogenation, nitro reduction, azo reduction 등 다양한 반응에 관여하며 각 종(species)마다 존재하는 각각의 isozyme은 대부분은 일련의 유사한 물질에 대해 비특이적인 성질을 나타낸다. Benzo[a]pyrene을 예로 들면 cytochrome p450 1A1 및 1A2에 의하여 대사적으로 활성화됨으로써 benzo[a]-pyrene-(+)-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide (BPDE)으로 전환되어 DNA와 N-deoxyguanosine을 형성하여 궁극적 발암원으로 작용하며, Chun 등은 *allium*속 식물의 암예방 작용 기작 중 일부분으로서 cytochrome p450 1A1 및 1A2의 저해효과를 제안한 바 있다.

제 1 상계 반응에 의하여 반응성이 증가된 독성이물질의 대사산물은 glutathione, glucuronide 등 생체 내 거대분자가 결합(conjugation)되는 제 2 상계 반응에 의해 체외로 배출된다. Glutathione conjugation, glucuronidation, glucosidation, sulfation, acetylation, methylation, amino acid conjugation등이 대표적인 결합반응(conjugation reaction)이다. 발암원에 노출되면 생체는 발암원의 독성을 최소화하고 화학적 스트레스로부터 세포를 보호하기 위한 자체적인 방어 시스템의 일환으로 oxidative stress나 heat shock stress등에 대한 반응과 유사하게 제 2상계 효소계가 유도된다. Glutathione S-transferase나 NAD(P)H:quinone reductase등이 anti-neoplastic효과를 나타내는 암

Table 4. Effects of oral administration of allyl methyl trisulfide on the activity of glutathione S-transferase in A/J mice

Material Administered[a,b]	Forestomach		Lung	
	No. of tumors per mouse[c] in forestoma tumor	GST activity (μmol/min/mg protein)	No. of tumors per mouse in pulmonary adenoma	GST activity (μmol/min/mg protein)
None	2.9±0.5	0.97±0.03	24±1.8	0.302±0.020
Cottonseed oil	3.7±0.4		18±2.0	
Allyl methyl trisulfide	1.0±0.1[d]	1.56±0.05[d]	19±1.8[d]	0.476±0.019[d]

[a]: Allyl methyl trisulfide (15 μmol) in 0.2 ml cottonseed oil, cottonseed oil, or nothing was given by oral intubation 96 and 48 hours before oral administration of benzo[a]pyrene (2 mg) in 0.2 ml cottonseed oil. This sequence was repeated at 2-week intervals twice.

[b]: For GST induction study, Cottonseed oil (0.2ml) with the allyl methyl trisulfide was administered by oral intubation twice, 48 hours apart. The mice were killed 48 hours after the last administration. Controls received cottonseed oil only.

[c]: No. of tumors in the entire group divided by the number of mice in the group.

[d]: Significance of $p<0.005$. (Sparnins et al, 1986)

예방 제제의 주된 작용 기작으로 밝혀짐에 따라 이러한 제 2상계 효소의 유도가 암예방 제제의 효율성을 평가하기 위한 적절한 biomarker로 평가받고 있으며, 실제로 여러 phytochemical에 의한 GST 또는 QR 활성 유도효과가 보고되고 있다. 역학조사 결과 *allium* 속 식물의 섭취와 위암 발생율이 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있는데, garlic oil의 성분인 sulfur-containing compounds 중 allyl methyl trisulfide의 경우 benzo[a]pyrene에 의한 암발생을 효과적으로 억제하는 결과가 보고되고 있으며, GST 활성을 효과적으로 증가시켜 암예방 효과의 주요 기작으로 작용함을 나타내고 있다 (Table 4).

(4) 기 타

전사인자는 유전자의 조절부위에 결합하여 직접적으로 유전자의 전사를 개시하는 작용을 한다. 암세포에서는 apoptosis는 피하면서, 증식이나 침윤, 전이되게 하기 위해 전사인자의 양이나 활성화가 비정상적으로 유지되는 것으로 알려져 있다. 한 예로 *fos*, *jun* 과 *myc*과 같은 oncogene은 fos, jun 및 myc 단백질을 과도하게 생산하며, 이러한 단백질들은 세포주기를 시작하게 하는 유전자들의 발현을 개시하게 하는 전사인자로 작용한다. 따라서 이러한 전사인자들을 정상적으로 조절하는 물질을 탐색하는 것은 암예방에 있어 매우 중요할 것이다. 현재 알려져 있는 전사인자들의 종류는 매우 많지만, 암에서 역할을 하는 것으로 p53 단백질, NF-κB(nuclear factor-kappa B) 및 AP-1(activator protein-1)을 대표적으로 들 수 있다. 예를 들어 p53 단백질은 다양한 유전자의 조절부위에 결합하여 소위 다기능 전사인자로 역할을 하는데, 특히 *p21* 유전자의 조절부위에 결합하여 세포의 증식을 조절하게 된다. NF-κB나 AP-1 역시 apoptosis, 암세포 침윤, 신혈관형성, 감염 등의 여러 과정뿐만 아니라 세포

Table 5. Effect of PCA on AOM-induced colon carcinogenesis in male F344 rats

			Large intestinal tumor			
	PCA (ppm)		*Incidence(%)*			ODC activity* (pmol $^{14}CO_2$/ h/mg of protein)
AOM	Initiation	Postinitiation	*Adenoma*	*Adenocarcinoma*	Multiplicity*	
+	-	-	10	75	1.3±1.2	170±56
+	250	-	5	40	0.6±0.8†	130±41
+	500	-	5	55	0.7±0.8	98±44
+	1000	-	9	30†	0.5±0.7†	53±5†
+	-	250	20	40	0.8±1.0	144±65
+	-	500	15	40	0.6±0.8†	99±42
	-	1000	9	22†	0.3±0.6†	92±35†
	1000	1000	0	0	0	85±38
	-	-	0	0	0	86±8

PCA : Protocatechuic acid; AOM: amoxymethane; ODC : ornithine decarboxylase
* values are mean ± SD.
† Significantly diffenent from AOM alone group ($P<0.05$)(Ayrton et al 1990)

증식에서 매우 중요한 역할을 수행하는 다기능 전사 인자들이다. 한편, redox signal이 이러한 전사인자들을 활성화시키는데 작용하기 때문에 항산화 작용을 하는 여러 물질들도 암예방에서 매우 중요하게 인식되고 있다. 따라서 식품원료로부터 암예방 물질을 탐색하고 나아가 작용양식을 살펴보기 위해 p53 단백질, NF-κB 및 AP-1의 저해활성과 항산화 활성을 측정하고 있으며, 많은 phytochemical들이 이러한 활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다.

3. 항증식/진행 활성(antiproliferation/antiprogression activity)

(1) Polyamine 대사 저해 활성

Putrescene, spermidine 등과 같은 polyamine은 세포분화와 분열을 조절하는데 관여하는 물질로 종양세포에서 그 농도가 높아 종양의 촉진에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 인식되고 있다. 따라서 종양세포의 증식을 억제하는 물질을 발견하기 위하여 polyamine 생합성을 저해하는 물질을 탐색하고 있다. 이를 위해 polyamine의 생합성 과정에 관여하는 ornithine decarboxylase, spermidine(또는 spermine) synthetase, S-adenosylmethionine decarboxylase, aminopropyltransferase 등의 효소활성이나 polyamine transport를 저해하는 활성을 평가하고 있다.

Ornithine decarboxylase(ODC)는 L-ornithine을 putrescine으로 전환시키는 polyamines(putrescine, spermidine, spermine 등) 합성에 관여하는 첫 번째 효소이자 반응 속도를 좌우하는 효소이다. ODC에 의해 생성되는 polyamines은 DNA, RNA, phospholipids와 같은 거대분자와 쉽게 결합하여 DNA의 복제(replication), 전사(transcription), 번역(translation)에 영향을 주어 세포의 증식과 분화에 매우 중요한 역할을 담당하므로 polyamine 생합성 경로는 암예방에 있어서 중요한 지표로 작용한다. 발암원, tumor promoters, oncogenes 등에 반응하여 ODC의 transcription이 증가한다고 알려져 있으며, 이런 ODC의 유도는 암 촉진단계에 있어서 매우 중요한 역할을 하고 있음을 시사한다.

인간과 설치류의 구강(oral cavity), 간, 결장 등 여러 장기에서 발생한 암에서 ODC 활성과 polyamine 수준이 증가되는 것이 관찰되었고 ODC가 세포 증식에 중요한 역할을 하는 polyamines 농도 조절의 주요 핵심 부분이기 때문에 ODC를 저해하는 물질이 화학적 암예방제의 중요한 후보가 될 수 있다. 실제로 α-difluoromethylornithine(DFMO)등과 같은 특이적인 저해제를 이용하여 ODC 활성을 저해시켰을 때 구강, 결장, 간, 및 위 등에서 형성된 종양이 감소되었다. Tanaka 등은 발암원으로서 amoxymethane을 사용하였을 때, ODC 저해제로서 protocatechuic acid의 발암 억제 효과를 연구한 바, 다음의 Table 5에 나타낸 바와 같이 대장암의 발생 빈도와 ODC 활성은 밀접한 상관성을 나타내어 암 발생시 multiplicity와 ODC 활성간에는 0.74의 높은 상관성을 보이고 있다.

시험관내에서 ODC 활성 측정은 mouse epidermal 308 세포(ME 308 cells)에 TPA (12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate) type의 발암물질과 시험하고자 하는 시료를 처리하고 배양한 후 세포 내 ODC 활성 측정을 위하여 L-[1-^{14}C]ornithine을 기질로 하여 반응시켜 발생하는 [^{14}C]CO_2를 포집하여 scintillation counter에서 방사능을 측정하고 단백질 함량으로 보정한 다음 $^{14}CO_2$/mg protein으로 나타낸다. 이 방법은 종양세포의 증식을 억제하는 물질을 탐색하는데 유용한 방법이나 방사선 동위원소를 사용해야 하는 제약이 따른다.

(2) 신호전달과정(signal transduction)의 조절

세포간의 정보교환은 신경전달물질, 호르몬, 성장

인자와 같은 외부인자들에 의한 신호가세포막에 존재하는 특이적인 수용체에 의해 인식되어 야기되는 신호전달과정을 통하여 세포안으로 전달되고 증폭됨으로써 이루어진다. 이러한 일련의 신호전달과정은 단백질 분자간 네트워크가 역동적이고 정교하게 조절됨으로써 가능한데, 이러한 신호전달과정의 이상은 암의 직, 간접적인 원인이 된다. 따라서 신호전달과정에 관여하는 cyclic AMP 농도, PKC(protein kinase C) 활성 저해, PTK(protein tyrosine kinase) 활성 저해, ras cascade 저해 활성 등을 측정하여 암예방 물질의 탐색을 시도하고 있다.

(3) 세포간 전달(cell-to-cell communication)의 조절

세포간 전달은 세포에 결합된 표면 단백질인 세포부착분자(cell adhesion molecules, CAMs)나 이웃하고 있는 세포와의 직접적인 통로인 gap junction을 통하여 역동적이고 복잡하게 이루어진다. 암세포는 주위 세포로부터 떨어져나가 암세포의 증식이나 활성을 규제하는 신호로부터 독립하려고 하는 동시에 주위세포에 '죽지 말라'는 신호를 보내려는 특징이 있기 때문에 많은 연구자들이 암예방을 위해 세포간 전달을 조절할 수 있는 물질을 탐색하고 있다. 이중 gap junction은 2개 세포의 세포막이 특수한 형태적 접합을 하고 있는 부분으로 gap junction 채널은 거의 모든 동물조직에서 세포간의 직접적인 물질이동을 담당하므로 세포의 성장, 분화 및 발달과 밀접한 연관성을 띠고 있다. 이러한 gap junction 채널의 활성변화는 sucrose의 permeability 특성을 기초로 하는 'transport specific density gradient'법을 이용하여 측정하고 있으며, 인삼 사포닌, flavonoid 및 organosulfur 화합물들은 gap junction 채널의 기능을 개선시키는 것으로 알려져 있다. 또한 식품성분이 세포부착분자에 미치는 영향은 세포부착분자의 발현 정도를 직접적으로 측정하며, vitamin D_3, resveratrol, quercetin 등과 같은 phytochemical들이 세포부착분자로 알려진 integrin이나 selectin의 발현을 억제하는 것으로 알려져 있다.

(4) 항유사분열 및 항분화 활성

미세소관(microtubule)은 세포의 유사분열시 염색체가 극으로 이동하는데 관여하는 세포골격을 구성하는 요소이다. 따라서 미세소관의 기능을 변화시키는 물질은 세포의 유사분열에 영향을 주어 증식에도 변화를 주게 되므로 이 점에 착안하여 항유사분열 활성을 측정하고 있다. 천연물 유래 항암제인 vincristine과 taxol도 항유사분열 활성이 높은 것으로 알려져 있다. 일반적으로 항유사분열 활성의 측정은 미세소관을 이루고 있는 단백질인 tubulin을 분리하여 microtubule assembly reaction을 light-scattering 방법에 의해 측정한다.

미국 국립 암연구소에서는 항유사분열 물질을 전선별하는 시험방법으로 astrocytoma bioassay를 사용하고 있다. 이 방법을 간단히 설명하면, 배양한 astrocytoma 세포에 dibutyryl cyclic-AMP를 1시간 동안 처리하면 광학현미경으로도 식별가능한 형태학적 변화를 관찰할 수 있다. 즉, fibroepithelial 형태에서 astrocyte 형태로 바뀌는데 여기에 항유사분열 활성을 가지는 물질을 처리할 경우 용량-의존적으로 형태가 다시 바뀐다. 이 시험법은 항유사분열 물질에 특이적으로 반응하는 것으로 알려져 있으며, 결과를 얻는데 약 2시간 정도가 소요되기 때문에 신속하게 활성을 측정할 수 있다는 장점이 있다. 이러한 시험법을 사용하여 *Combretum caffrum*으로부터 combretastatin이 분리된 바 있다. 그 밖에 microtubule assembly를 저해하는 활성 물질을 선별하거나 평가하기 위해 사용되는 다른 시험법으로는 sea urchin(*Strongylocentrotus purpuratus*) embryo assay가 있으며, sea urchin 대신에 starfish(*Asterina pectinifera*)를 사용하기도 한다. 이 방법은 성적으로 성숙한 sea urchin 암

수로부터 정자와 난자를 얻어서 수정을 시킨 다음 시험물질을 처리하여 광학현미경으로 무작위로 선택한 500-600개의 수정란에 대하여 대조군 대비 시험물질 처리군의 절단된 정도 (%)를 관찰하는 것이다.

비정상적인 세포 분화로 인해 악성 종양이 유도되기 때문에 악성 세포들이 정상적인 형질을 표현할 수 있도록 자극하는 분화인자를 탐색하는 것이 암예방활성 물질을 탐색하는데 있어서 중요할 것이다. 세포분화를 야기시키는 물질들에 의해 쉽게 분화가 되는 것으로 알려진 세포주(HL-60, fibroblast, keratinocyte, teratocarcinoma, neuroblastoma melanoma 등)를 이용하여 세포 분화를 관찰할 수 있다. 세포분화 인자들은 세포의 glucocorticoid 및 prolactin 수용체, 메틸화 양상, NADase 활성, 세포의 항원성, 세포주기 등 여러 parameter들을 변화시키므로 사용 세포주의 분화특성에 따라 측정 parameter를 디자인하여 측정할 수 있다.

(5) 신혈관형성(angiogenesis) 억제 활성

종양조직내에서는 성장하는 세포들에게 영양소를 공급하고 전이되기 위해서 신혈관 형성이 활발하다는 것은 널리 알려진 사실이다. 신혈관형성이 유도되는 기전으로는 혈관내피세포의 수용체에 혈관신생인자가 작용하여 혈관내피세포를 증식시키는 기전과 세포외 기질 분해효소를 분비하여 혈관내피세포에 이동하는 기전, 혈관내피세포의 부착 등에 관여하는 기전 등이 알려져 있다. 종양의 팽창과 악성종양의 형성을 저해하기 위해서는 신혈관형성이 억제되어야 하므로 천연물로부터 관련 활성을 탐색하는 시도가 이루어지고 있다.

신혈관형성 억제 활성을 측정하는 방법으로는 암컷 마우스의 피하에 시험물질과 신혈관형성 유도제로서 Matrigel을 주사한 다음 Matrigel-induced neovascularization 정도를 평가하는 방법과 혈관내피세포의 증식 억제능을 평가하는 방법 및 CAM (chick chorioallantoic membrane) assay 등이 있다.

(6) Apoptosis 유도 활성

세포 예정사(programmed cell death)라고도 불리우는 apoptosis는 조직의 항상성(homeostasis)을 유지하는데 매우 중요하다. 초기에는 탈수에 의해 세포크기가 줄어들며 세포막에 bleb이 생기는 등의 변화가 보이며, 세포 내 칼슘의 농도가 증가한다. 중기에는 DNA가 180 - 200 bp정도의 단편화가 이루어져 DNA 전기영동상 laddering되는 양상을 보인다. 말기에는 세포막의 기능이 완전히 소실되며 주위의 세포에 의해 포식되는 과정을 거친다. 세포막에서 일어나는 외부 인자에 대한 반응부터 세포물질의 분해를 주관하는 effector 물질분비 등 일련의 과정에는 caspase라는 aspartate-specific cysteine protease가 관여하고 있으며 이 단백질은 활성이 없는 proenzyme상태로 합성되어 적절한 신호에 의해 활성화된다. 따라서 apoptosis를 유발시키는 물질의 경우 생체의 항상성 유지뿐만 아니라 전암세포가 침윤성 암으로 발전하기 전에 세포의 사멸을 유도함으로써 조직의 암화를 예방하는 역할을 한다.

Apoptosis 검색법에는 세포의 형태변화를 관찰하는 방법과 DNA fragmentation을 감지하는 방법 등 크게 두 가지가 있다. 세포 형태 변화의 경우 세포수축(cell shrinkage)을 관찰하는 경우와 nucleic acid 염색시약으로 농축된 핵을 염색하는 방법이 있는데 모두 조직을 처리하는 과정에서 형태학적 특징이 변화할 수 있으며, 재현성 있는 결과를 얻기 위해서는 실험자의 숙련된 솜씨가 요구되는 단점이 있다. DNA fragmentation을 측정하기 위해서는 TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling)법이 널리 사용되는데 형태학적 관찰이나 2차 biomarker에 대한 항체 염색 등의 방법과 병행하여 이용된다. 그러나 TUNEL은 노동 집약적이며, TdT polymerase를 침투시키는데 필수적인 protease digestion과정 중 artifacts가 형성되기 쉬운 단점이 있다. 무엇보다 DNA fragmentation이 일어나기 전 단계의 초기 apoptosis를 감지하기 어렵고,

손상된 DNA를 포함하고 있는 necrotic cells를 검출하는 등의 단점이 있다. 최근 caspase가 작용하여 절단된 산물의 N- 및 C-terminal에 대한 항체를 이용한 검출법이 고안되었는데 약 70여개의 항체 중 poly-ADP ribose polymerase(PARP)에 대한 항체가 널리 이용되고 있다. 이와 같이 apoptosis 검출법은 시료의 특성 또는 조직 특이적인 변수에 따라 적용방법을 달리할 수 있으며 apoptotic signaling 경로에 따라 시료 중 특정 지표의 존재 여부가 달라지므로 모든 경우에 보편적으로 적용할 만한 방법이 아직 개발되고 있지는 않다. 그러나 anti-PARP 등 면역화학적 방법에 의하여 caspase 활성을 측정할 수 있으며, TUNEL assay로는 DNA fragmentation을 측정할 수 있으므로 이와 같은 몇 가지 방법들을 병행하여 측정함으로써 이러한 단점을 극복할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 형태변화를 관찰함으로써 apoptosis를 재확인할 수 있을 것이다.

(7) Telomerase 억제 활성

Telomerase는 telomere의 3'말단에 telomeric 잔기(TTAGGG)를 부가하는 ribonucleoprotein계 효소로 immortal cell, cancer cell 및 germ cell에서 특별하게 발현되어 DNA 복제 동안에 짧아진 telomere를 보충하여 telomere 길이를 안정화시키는 역할을 한다. Telomere는 세포의 노화를 감지하고 결국 replicative senescence나 프로그램된 세포 사멸의 신호를 주는 이른바 mitotic clock으로 작용하는 것으로 알려짐에 따라 암세포에서 telomerase 활성은 종양의 발달 및 전개에 필수적인 단계로 여겨지고 있다. 또한 대부분의 암세포에서는 telomerase 활성이 관찰되나 premalignent cell 이나 germ cell, hematopoietic stem cell등 몇가지 경우를 제외하고는 정상세포에서는 활성이 나타나지 않으므로 암의 진단 및 관리 측면에서 새로운 지표로 인식되고 있다.

동물실험 및 폐경기 여성을 대상으로 한 연구에서 유방암에 대한 저해제로 알려진 4-(hydroxyphenyl) retinamide(4-HPR)을 처리하고 N-methyl-N-nitrosourea(MNU)에 의해 유발된 암세포의 telomerase 활성을 조사한 결과 4-HPR 처리 기간이 증가함에 따라 암세포에서의 telomerase 활성이 점진적으로 감소하였고, 아울러 유방암 세포의 증식능 자체도 감소하였다. 흡연환자의 폐암 발생에 대한 4-HPR의 예방 효과에 대한 연구에서도 telomerase 활성이 지표 활성으로써 평가되고 있다. 또한 동물 실험 및 역학조사 결과 암예방 작용이 뛰어난 것으로 알려진 차의 catechin 중 epigallocatechin gallate(EGCG)의 경우 living cell 및 cell-free system에서 telomerase 활성을 직접적으로 강하게 저해하는 것으로 조사되었으며, 인간 유래의 대표적인 암세포주인 U937 monoblastoid leukemia cells와 HT29 colon adenocarcinoma cells의 지속적인 성장을 억제하는 것으로 나타나 telomerase 활성 저해능이 암예방 작용의 주된 기작 중 하나임이 밝혀지고 있어 telomerase 활성은 암의 진단 및 관리뿐만 아니라 암예방 활성 평가에 있어서 유용한 biomarker로 사용될 가능성이 높은 것으로 생각된다.

일반적으로 normal somatic cell에서는 telomerase 활성이 관찰되지 않으며 cancer cell 에서는 telomerase 활성이 관찰되므로 telomerase에 대한 저해 활성을 암예방 활성의 지표로 사용할 경우 정상적인 세포에는 영향을 주지 않고 암세포에만 선별적인 작용이 가능하며, 암의 종류와 무관하게 모든 암세포에서 telomerase 활성이 관찰되므로 암의 종류와 상관없이 예방이 가능한 장점이 있다. 그러나 임파구나 마크로파지 및 생식세포에서도 telomerase 활성이 관찰되므로 telomerase inhibitor만을 지표로 하여 암예방 활성 소재를 탐색할 경우, 이들 세포에 대해서도 저해 효과를 나타낼 수 있다. 또한 recombination 등 다른 방식에 의해 telomere-salvaging pathway가 활성화되는 빈도가 높을 경우 암세포에 대한 선별성이 낮아질 가능성이 있는 단점이 있다. 대표적인 telomerase 활성 측정법으로는 telomere repeat amplification protocol

(TRAP) assay법이 있는데, dNTPS(α-^{32}P-GTP), TRAP buffer, TS oligo, Taq polymerase를 세포/조직 추출물과 반응시켰을 때 telomerase 활성이 있을 경우 TTAGGG잔기가 부가되며 이를 PCR로 증폭시켜 반응 산물을 분석함으로써 1/1,000,000의 감도로 telomerase 활성을 검출할 수 있다.

4. 기 타

종양이 그 원발부위에서 여러 경로를 따라 신체의 다른 부위에 이식되어 정착, 증식하는 상태를 전이(metastasis)라고 한다. 전이는 일반적으로 암이라고 부르는 악성종양의 특징 중 하나이기 때문에 악성종양의 예방이나 치료제 개발을 위해 많은 실험실에서 항전이 물질을 탐색하고 있다. 항전이 활성을 평가하기 위해서 사용되는 방법으로는 전이상태에 있는 종양 세포들이 혈소판 응집을 유도한다는 것에 착안하여 시험물질에 의해 유도되는 혈소판응집 저해 활성이 측정되고 있다. 인간의 태반에서 얻어진 amnion membrane을 통한 종양세포이동을 측정하거나 polycarbonate membrane을 통한 invasion이 저해되는 정도를 측정함으로써 시험물질에 의한 항전이 활성을 평가하고 있다. 또한 천연물로부터 항전이 활성을 탐색하기 위해 종양세포의 전이에 관여하는 것으로 알려진 효소인 collagenase의 활성을 측정하고 있다.

몇 가지 면역학적 요인들이 항종양 및 항바이러스 반응과 관련이 있는 것으로 알려져 있어 이와 관계된 면역반응의 회복을 유도함에 의해 암을 예방할 수 있을 것이다. 이에 임파구의 활성화를 측정하거나, γ-interferon, interleukin 1과 같은 임포카인의 유도능을 평가하거나 자연살해세포의 활성화능을 측정함에 의해 면역활성을 평가하고 있다. 또한 종양성장이나 세포증식 억제 및 면역반응억제와 관련이 있는 prostaglandin 농도가 정상세포에 비해 종양세포에서 높은 것으로 알려져 있으므로 arachidonic acid를 prostaglandin으로 변환시키는 효소인 cyclooxygenase 활성을 측정함에 의해 종양의 진행을 예방하는 물질을 선별하거나 분리하는데 이용하고 있다. 이 밖에도 serine protease, thio protease, aminopeptidase A, B, esterase 등 많은 protease 활성의 저해가 암의 치료와 관련이 있는 것으로 알려져 protease활성 저해 물질들을 천연물로부터 탐색하고 있다.

4. 생체내 시험법

암예방 활성을 측정하기 위한 생체내 종양 모델로는 자연발생적(spontaneous)으로 유발된 종양모델, 실험적으로 유발한 종양모델, 종양을 이식한 모델 등이 사용된다. 이러한 실험모델은 여러 가지 물질의 암예방 활성을 선별하는데 사용될 수 있으며, 다른 한편으로는 암예방 활성을 자세하게 연구하기 위해서 사용될 수 있다.

1. 자연발생적 종양 모델

선별목적을 위해서는 특정 종양 형태에 초점을 맞추지 않은 상태에서 암예방 활성을 측정해도 무방하므로 자연발생적인 실험모델을 일차적으로 사용할 수 있다. 보통 50수의 수컷 및 암컷을 2-3 용량수준으로 대조군과 함께 사용한다. 용량은 독성을 나타내지 않는 범위내에서 2배 혹은 그 이하의 용량이어야 한다. 총 종양 빈도수, 특이 종양 빈도수, 종양 발생 시간이 조사된다. 종양은 신생이상증식(neoplastic) 상태를 판정하기 위하여 조직학적 조사에 의해 양성인지 악성인지를 명백하게 밝혀야한다.

종양의 자연발생이 인간의 상황과 더 잘 부합되기 때문에 자연발생적 종양 모델을 사용하는 것이 종양유발 모델보다 실생활을 더 잘 모방하는 것이라 할 수 있겠다. 이 모델의 사용시 동물들은 고용량의 발암원을 투여받지 않아 좀더 우호적인 모델이라 생각할 수도 있겠으나 종양 발생율이 매우 낮으며, 바람직한 결과를 얻기 위해서는 동물의 수를 많이 사용

해야 한다. 또한 대장, 폐 췌장, 전립선 종양과 같이 인간에게서 흔한 종양이 자연발생적 종양 모델에서는 잘 발생되지 않으며, 전이가 잘 일어나지 않고, 비교적 긴 잠복기를 보이며, 발생시 다양성(mutiplicity)를 보이며, 연령과 관계된 다른 자연발생적 종양뿐만 아니라 만성질환과 상호작용할 수 있기 때문에 대표성이 떨어진다는 단점이 있다.

2. 화학적 종양 유발 모델

암예방 활성이 특이 기관에 대해 나타날 것으로 추정되는 경우, 선별을 위해 더 적합한 모델은 종양 유발 모델이다. 보통 이런 연구들은 기간 및 경비 측면에서 경제적이며 나중에도 같은 시스템을 사용하여 정밀하게 조사할 수 있다.

일반적으로 물질들은 시험관내 시험에서 암예방 활성이 선별되며, 여기에서 얻은 정보에 따라 암화과정중 어느 단계에서 암예방 활성이 나타나는지 조사하기 위해 좀 더 잘 정립된 연구설계가 요구된다. 이런 경우 개시 시기나 기간이 정확하게 알려져 있고, 이상증식(hyperplastic), 전신생이상증식(pre-neoplastic), 양성 및 악성 손상의 발달 정도가 잘 정립되어 있는 종양 유발 모델이 사용된다. 인간에게서 흔한 종양에 대해 폐(햄스터), colorectal(랫드, 마우스), 유방(랫드), 피부(마우스) 췌장(햄스터, 랫드), 전립선(랫드), 방광(마우스)종양 등 실험적인 모델이 개발되어 있다. 또한 구강, 식도, 뼈, 부신, 난소, 갑상선, 고환, 신장, 간, 자궁내막 등 다른 기관이나 조직의 종양 모델도 개발되어 있어 이용가능하다.

미국 국립 암연구소(NCI) 화학적 암예방 신약 프로그램(chemoprevention drug development programme)에서는 용량확인 시험을 통해 식이의 2% 수준 이내에서 최대내성용량(maximum toleated dose, MTD)의 0.4 및 0.8 용량수준이 보통 사용된다. 최대내성용량은 투여 6주후 최종 무게 또는 무게 증가분의 10% 감소를 넘지 않는 최고 용량으로 정의된다. 투여 스케줄은 ① 초기 발암원 투여 1주일 전에 시작하여 연구 종료시까지, ② 발암원을 투여하는 동안(보통 4주) 1주일 전에만 1회 투여, ③ 4주 혹은 그 이상 동안 발암원을 투여한 다음 4주 동안 등으로 다양하다. 미국 국립 암연구소에서는 화학적으로 유발한 종양모델을 주로 사용하고 있는데 예를 들면, 햄스터 기관(trachea)에 대해 N-methyl N-nitrosourea(MNU), 햄스터 폐에 대해 N-nitrosodiethylamine(DEN), 랫드 대장에 대해 azoxymethane(AOM), 마우스 대장에 대해 methylazoxymethane(MAM), 마우스 피부에 대해 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate(TPA)로 촉진시킨 7,12-dimethylbenz(alpha)anthracene, 마우스 방광에 대해 N-butyl N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine(BBN) 등이다. 이러한 모델들은 144개 물질들을 대상으로 시험하여 검증되었다. 일반적으로 유발 종양 모델이 자연발생적 종양 모델보다 선호되는 경향이다.

지금까지 인간에 대한 어떤 화합물의 발암성을 예측하는 방법으로는 설치류를 이용하여 2년간 시험하는 장기 생체내 시험법(long-term *in vivo* test)이 가장 신빙성이 높은 방법으로 여겨져 왔다. 그러나 이와 같은 방법은 비용과 시간이 많이 소요되며 시설이 잘 갖춰져야 하고 실험자의 숙련도가 높아야 하는 단점이 있다. 이에 많은 시료에 대한 선별 방법으로 Ames 시험법 등 여러 단기 시험관내 시험법(short-term *in vitro* test)이 제안되고 있으나 이들 방법은 신속하고 경제적인 반면 의양성(false-negative) 또는 의음성(false-positive) 결과가 나타나는 빈도가 높고 표적 기관에 특이적(target-organ specific)으로 나타나는 화합물의 발암성 또는 암촉진 활성(promotion activity)을 결정하기 어려워 시험의 유효성이 제한되는 단점이 있다. 따라서 장기 발암성 시험과 단기 검정법 사이의 공백을 연결하고자 발암물질에 대한 신속검색법으로 male F344 rats를 이용한 몇 가지 중기 시험법(medium-term bioassay)이 개발되었다.

많은 발암원들이 간에서 발암성을 나타낸다는 사실에 근거하여 간을 모델로 한 중기 시험법(liver

Table 6. Results for 250 chemicals in the medium-term liver bioassay

	Mutagenicity(Ames test)			
	+	−	?	Total
Hepatocarcinogens	30/31 (97)[a]	26/31 (84)[b]	0/0 (0)	56/62 (90)
Non-hepatocarcinogens	7/25 (28)	3/14 (21)	0/2 (0)	10/41 (24)
Non-carcinogens	0/6 (0)	2/37 (5)[c]	0/2 (0)	2/45 (5)
Unknown	3/13 (23)	22/61 (36)	9/28 (32)	34/102 (33)
Total	40/75 (53)	53/143 (37)	9/32 (28)	102/250 (41)

[a]: 4,4'-Diaminodiphenylmethane(DDPM) was negative.
[b]: Clofibrate, di(2-ethylhexyl)adipate(mouse), di(2-ethylhexyl)phthalate, trichloroacetic acid(mouse), and tamoxifen were negative.
[c]: Malathion and vinclozolin were positive, although they have been reported not to be carcinogenic in either rats or mice.

medium-term bioassay)이 제안되었는데 초기에는 마커로 hyperplastic liver module 및 γ-glutamyltranspeptidase positive focus가 사용되었으나 Ito 등에 의해 제안된 간 중기 실험 모델에서는 glutathione S-transferase placental form (GST-P) positive focus를 지표로 사용하여 분석하였으며, 아세톤으로 고정시킨 파라핀 블록의 단면에서 면역조직화학적으로 쉽게 염색되는 등 결과의 정확성 및 경제성 측면에서 우수한 것으로 보고되고 있다. Table 6은 250 개의 화합물에 대한 중기 시험 결과와 Ames 시험 및 장기 발암성 시험 결과를 비교한 것이다. 간암 유발물질 중 Ames 시험 결과 돌연변이원성을 나타내었던 화합물은 총 31개 중 97%인 30개 화합물이 GST-P foci positive 결과를 나타내었으며, 돌연변이원성을 나타내지 않았던 화합물은 31개 중 84%인 26개 화합물이 양성으로 나타나 장기 발암성과는 평균 90%의 높은 상관성을 보이고 있다.

반면, 간 이외의 기관에 작용하는 발암원(non-hepatocarcinogens)의 경우 전체 41개 화합물 중 24%인 10개 화합물만이 GST-P foci 결과에서 양성을 나타내어 중기 간 모델은 간에 대한 발암성 화합물의 신속 검출에 적합한 방법임을 나타내고 있다.

간 이외의 장기에 대한 발암성 측정을 위해서는 multi-organ 모델이 제안되었다. 이 때의 시험방법으로는 MNU를 반복적으로 처리하는 방법, 2,2'-dihydroxy-di-n-prophylnitrosamine(DHPN), N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine(EHEN) 및 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl(DMAB)등 발암성을 나타내는 조직이 다른 일련의 화합물들을 처리하는 방법, 또는 DEN, MNU, BBN, DHPN 및 1,2-dimethylhydrazine(DMH)등 5가지 화합물을 처리하여 발암성을 시험하는 방법이 제안되고 있으며, 24-36주 이내에 표적기관에서의 발암성 및 항발암성을 측정할 수 있다.

한편, 간 중기 시험법은 화합물의 발암성 측정에 이용될 뿐 아니라 발암원과 시험하고자 하는 화합물을 동시에 처리한 후 biomarker인 GST-P foci 생

Table 7. Chemicals that demonstrated inhibition in the medium-term liver bioassay (the Ito test).

Compound	Carcinogenicity	Ames test
AF-2	+	+
* Butylated hydroxyanisole	+	−
* Caffeic acid	+	−
* Catechol	+	−
Clofibrate	+	−
Di(2-ethylhexyl)phthalate	+	−
* Hydroquinone	+	−
* Sesamol	+	−
Tamoxifen	+	?
Acetaminophen	−	−
Benzoin	−	−
DEF	−	?
EPN	−	−
* Esculin	−	?
* Gallic acid	−	−
* α-Tocopherol	−	−
* *o*-Aminophenol	?	−
* *t*-Butylhydroquinone	?	−
* Chlorophyllin, sodium copper	?	−
Diphenyl	?	−
Esfenvalerate	?	−
Ethyl alcohol	?	−
* Eugenol	?	−
* Ferulic acid	?	?
Glyoxal	?	+
Harman	?	−
Hickory extract	?	?
Indomethacin	?	−
Linoleic acid hydroperoxide	?	+
* *p*-Methylphenol	?	−
Methyltestosterone	?	?
Theobromine	?	−

*: antioxidant

성정도를 평가함으로써 시험하는 화합물의 암예방 활성의 측정에도 이용될 수 있다. 14종의 항산화제를 포함한 약 30여종 화합물에 대해 대표적인 단기 시험관내 시험법인 Ames 시험에 의한 돌연변이 억제활성과 간 중기 시험법을 이용하여 측정한 암예방 활성에 대한 결과는 Table 7에 나타낸 바와 같다.

3. 종양 이식 모델

암예방 활성 측정시 종양 이식 모델의 사용은 거

의 시도되지 않았다. 그러나 과거에는 주로 방사선 조사에 의해서 면역성이 결핍된 실험동물을 얻었던 것과 비교하여 현재 T-세포 결핍 동물 또는 B-세포와 T-세포 결핍동물의 사용이 가능해 졌기 때문에 종양이식에 대한 관심이 증가하고 있다. 종양 이식 모델의 장점은 종양의 성장이나 투여용량을 적절하게 표준화할 수 있다는 것이며, 특히 T-세포 결핍 랫드나 마우스를 사용할 경우 이식된 종양의 거동을 관찰하기에 좋다. 그러나 면역성의 결핍은 종양의 성장뿐 아니라 다른 생리학적 기능에도 영향을 주기 때문에 종양 조절 인자들을 연구하는데 제한적으로 이용되고 있는 것으로 보인다.

이상적인 종양 모델은 조직학적으로 인간의 종양과 차이가 없어야 하고, 종양의 성장 패턴이나 속도 및 전이 패턴이 같아야 한다. 또한 종양 발생율, 잠복기 측면에서 재현성이 있어야 하며 경제적이고 잘 검증이 되어 있어야 할 것이다. 이러한 측면에서 인간의 종양을 접종한 무흉선(athymic) 마우스가 사용되고 있다.

5. 결 언

암은 단일 질병으로서 가장 중요한 사망원인으로 전세계적으로 연간 600명 이상이 암으로 사망한다고 한다. 따라서 암을 정복하고자 전세계적으로 노력을 아끼지 않고 있지만 현재로서는 치료보다 예방이 중요한 것으로 인식되고 있다. 식품의 섭취와 암의 발생과는 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있을 뿐만 아니라 민간 전승적으로 암을 예방하는데 효과적이라고 알려진 천연 성분들로 인하여 식품을 포함한 천연물들은 암예방 연구에 있어서 관심이 대상이 되고 있다. 그러나 정상세포가 변이과정을 거쳐 악성종양으로 발전하는데 적어도 수년에서 30여 년이 소요된다는 점에서 시사되듯이 발암의 원인 및 진행과정은 복잡하며 기전조차 분명하게 밝혀져 있지 않다. 따라서 암예방 활성을 평가하는 방법도 매우 다양하므로(Fig. 3), 평가법에 대한 확실한 이해는 향후 암예방 물질의 탐색 및 개발 측면 뿐만 아니라 기존 제품에 대한 효능을 평가하는데 있어서 필수적이라 할 수 있겠다.

6. 참고문헌

1. Arif, J. A., Gupta, R. C. : Effect of inducer and inhibitor probes on DNA adduction of benzo[a]pyrene and 2-acetylaminofluorene and their roles in defining bioactivation mechanism(s). *Int. J. Oncol.*, 8, 681-685 (1996)
2. Ayrton, A. D., Mcfarlane, M., Walker, R.,

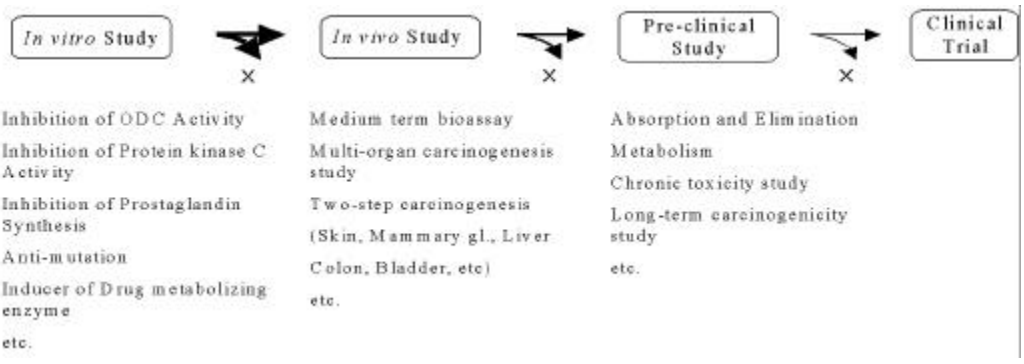

Fig. 3. Schematic diagram for detection and development of chemopreventive agents

Neville, S., Ioannides, C. : The induction of P450 I proteins by aromatic amines may be related to their carcinogenic potential. *Carcinogenesis*, 11: 803-809 (1990)

3. Bednarek, A., Shilkaitis, A., Green, A., Lubet, R., Kelloff, G., Christov, K., Aldaz, C. M. : Suppression of cell proliferation and telomerase acticvity in 4-(hydroxyphenyl)retinamide-treated mammary tumors. *Carcinogenesis*, 20(5), 879-883 (1999)
4. Bello-Fernandez C., Packham, G., Cleveland, J. L. : The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of *c*-Myc. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 90 : 7804-8 (1993)
5. Buss, P, Caviezel, M., Lutz, W.K. : Linear dose-response relationship for DNA adducts in rat liver from chronic exposure to aflatoxin B1, Carcinogenesis 11, 2133-2135 (1990)
6. Chun, H. S., Kim, H. J., Choi, E. H. : Modulation of cytochrome P450-mediated bioactivation of benzo[a]pyrene by volatile allyl sulfides in human hepatoma cells. *Biosci. Biotech. Biochem*. 65: 2205- 2212 (2001)
7. De Long, M. J., Prochaska, H. J., Talalay, P. : Induction of NADP(H):quinone reductase in murine hepatoma cells by phenolic antioxidants, azo dyes, and other chemoprotectors: a model system for the study of anticarcinogens. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (Wash.), 83: 787-791 (1986)
8. Gavrieli, Y,. Sherman, Y. Ben-Sasson, S. A. : Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.*, 119 : 493-501 (1992)
9. Guengerich, F. P. : Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem. Res. Toxicol.*, 4, 391-407. (1991)
10. Hayes, J. D., Pulford, D. J. : The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST* and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 30, 445-600 (1995)
11. Hodgson, E., Levi, P. E. (1994) Introduction to biochemical toxicology, Hodgson, E.(ed.), Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut, 75-132.
12. Ito, N., Imaida, K. : Strategy of research for cancer-chemoprevention. Teratogenesis, Carcinogenesis, and *Mutagenesis*, 12, 79-95 (1992)
13. Kelloff G.J., Sigman C.C., Hawk E.T., Johnson K.M., Crowell J.A., Guyton K.Z. : Surrogate end-point biomarkers in chemopreventive drug development. IARC Sci. Publ. 15413-15426 (2001)
14. Lutz, W. K. : In vivo covalent binding of organic chemicals to DNA as a quantitative indicator in the process of chemical carcinogenesis, *Mutat. Res.* 65, 289-356 (1979)
15. Mori, H., Tanaka, T. Sugie, S., Yoshimi, N. Kawamori, T., Hirose Y., Ohnishi M. : Chemoprevention by naturally occurring and synthetic agents in oral, liver, and large bowel carcinogenesis. *J. Cell Biochem. Suppl*. 2735-41 (1997)
16. Naasani, I., Seimiya, H., Tsuruo, T. : Telomerase inhibition, telomere shortening, and senescence of cancer cells by tea catechins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 249: 391-396 (1998)

17. Nicholson, D. W. : Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptosis. Cell Death Differ. 6: 1028-1042 (1999)
18. Ottender, M., Luts, W.K. : Correlation of DNA adduct levels with tumor incidence: carcinogenic potency of DNA adducts. *Mutat. Res.*, 424 : 237-247 (1999)
19. Pegg A. E. : Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy. *Cancer Res.*, 48 : 759-774 (1988)
20. Phillipson, C. E., Ioannides, C. : Activation of aromatic amines to mutagens by various animal species including man. *Mutat. Res.*, 124: 325-336 (1983)
21. Phillipson, C. E., Ioannides, C. : Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to mutagens in the Ames test by various animal species including man. *Mutat. Res.*, 211: 147-151 (1989)
22. Riss, T. L. Apoptosis as a biomarker in chemoprevention trials. *Urology* 57(Suppl 4), 141-142 (2001)
23. Sallmann, F.R., Bourassa, S., Saint-Cyr, J., Poirier, G.G. : aracterization of antidies specific for the caspase cleavage site on poly(ADP-ribose) polymerase: specific detection of apoptotic fragments and mapping of the necrotic fragments of poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem. Cell Biol.*, 75(4): 451-6 (1997)
24. Soria, J. C., Moon, C., Wang, L., Hittelman, W. N., Jang, S. J., Sun, S. Y, Lee, J. J., Liu, D,. Kurie, J. M., Morice, R. C., Lee, J. S., Hong, W. K., Mao, L. : Effects of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide on hTERT expression in the bronchial epithelium of cigarette smokers. J. Natl. Cancer Inst., 93, 1257-1263 (2001)
25. Sparnins, V. L., Mott, A. W., Barany, G., Wattenberg, L. W. : Effects of allyl methyl trisulfide on glutathione S-transferase activity and BP-induced neoplasia in the mouse. *Nutrition and Cancer*, 8: 211-215 (1986)
26. Tanaka, T., Kojima, T., Kawamori, T., Mori, H. : Chemoprevention of digestive organs carcinogenesis by natural product protocatechuic acid. *Cancer*, Supplment, 75, 1433-1439 (1995)
27. Tsuchida, S., Kimura J. Hayakari, M., Ishikawa T. : Usefulness of glutathione S-transferase as a tumor marker. *Rinsho Byori*, 45, 1125-1132 (1997)
28. Verma A. K., Boutwell R. K. : Vitamine A acid (retinoic acid): a potent inhibitor of 12-*O*-tetradecanoylphobol-13-acetate-induced ornithine decarboxylase activity in mouse epidermis. *Cancer Res.* 37 : 2196-2201 (1977)