

## Curcumin 유도체인 Tetrahydrocurcumin의 암예방 효과

가톨릭대학교 의과대학, <sup>1</sup>충북대학교 수의과대학 암예방연구소  
및 동물의학연구소, <sup>2</sup>서울대학교 수의과대학

박 철 범 · 김 대 중<sup>1</sup> · 이 준 섭<sup>2</sup>

### Cancer Prevention by Tetrahydrocurcumin, a Novel Hydrogenated Derivative of Curcumin, in an *in vivo* Medium-term Multiorgan Bioassay

Cheol Beom Park, Dae Joong Kim<sup>1</sup> and Joon Sup Lee<sup>2</sup>

Catholic University Medical College, Seoul 137-701; <sup>1</sup>Cancer Prevention, College of Veterinary Medicine & Research Institute of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763; <sup>2</sup>College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

The chemopreventive effects of tetrahydrocurcumin (THC), a newly synthesized derivative of curcumin, in an *in vivo* medium-term multiorgan carcinogenesis model were examined. One hundred sixteen male F344 rats were treated with diethylnitrosamine, azoxymethane, *N*-nitrosomethylbenzylamine or vehicles only at weeks 0, 1-2, and 3-5 respectively. Rats of group 1 and 2 were then given THC (0.5% or 0.25% in diet) for 33 weeks (7~40 wk), whereas rats of group 2 and 4 were given basal diet for 40 weeks (0~40 wk). All surviving animals were sacrificed at week 40 and the major organs, including the liver, lung, kidney, esophagus, and colon, were histologically examined. The incidences of lung and colon adenoma and adnocarcinoma combined in group 1 receiving 0.5% THC were significantly decreased as compared to the group 2 values ( $P < 0.05$ ). Also the incidences of lung adenomas in group 1 decreased as compared to the group 2 values ( $P < 0.05$ ). No effects were observed for liver and esophageal tumor incidences. The results suggest that THC exerts a chemopreventive effect on lung and colon carcinogenesis when given in the post-initiation stage to F344 rats.

**Key Words:** Multiorgan carcinogenesis, Tetrahydrocurcumin (THC), Chemoprevention

### 서 론

암역학연구와 실험동물을 통한 연구결과에 따르면 식생활습관이 암의 발달에 중요한 역할을

한다고 한다.<sup>1-3)</sup> 야채와 과일, 곡류성분, 식물성 화합물질 (phytochemicals), 약물등은 다양한 동물 모델의 다양한 단계에서 암을 억제시켰으며, 이중 몇 종류의 물질은 사람에게 대한 임상실험에서 암을 억제하는 것으로 보고되었다.<sup>4)</sup> Curcumin (dife-

- mammary cancer in rats. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1305-1311.
- 13) Sugiyama Y, Kawakishi S, Osawa T. Involvement of the beta-diketone moiety in the antioxidative mechanism of tetrahydrocurcumin. *Biochem Pharmacol* 1996; 52: 519-525.
  - 14) Kim JM, Araki S, Kim DJ, Park CB, Takasuka N, Baba-Toriyama H, Ota T, Nir Z, Khachik F, Shimidzu N, Tanaka Y, Osawa T, Uraji T, Murakoshi M, Nishino H, Tsuda H. Chemopreventive effects of carotenoids and curcumins on mouse colon carcinogenesis after 1,2-dimethylhydrazine initiation. *Carcinogenesis* 1998; 19: 81-85.
  - 15) Kawanishi T, Ohno Y, Takahashi A, Takainaka A, Kasuya Y, Omori Y. Substrate concentration dependency of *N*-nitrosodimethylamine and *N*-nitrosomethylbenzylamine metabolism in rat liver. *Carcinogenesis* 1985; 6: 823-827.
  - 16) Subramanian M, Sreejayan N, Rao MN, Devasagayam TP, Singh BB. Diminution of singlet oxygen-induced DNA damage by curcumin and related antioxidants. *Mutat Res* 1994; 311: 249-255.
  - 17) 서영준, 이종민. Dietary phytochemical을 이용한 화학적 암 예방과 그 작용 기전. *Environ Mutagen & Carcinogen* 1998; 18: 1-8.
  - 18) Chan MM, Huang HI, Fenton MR, Fong D. *In vivo* inhibition of nitric oxide synthase gene expression by curcumin, a cancer preventive natural product with anti-inflammatory properties. *Biochem Pharmacol* 1998; 55: 1955-1962.
  - 19) Oetari S, Sudibyo M, Commandeur JN, Samhoedi R, Vermeulen NP. Effects of curcumin on cytochrome P450 and glutathione S-transferase activities in rat liver. *Biochem Pharmacol* 1996; 51: 39-45.
  - 20) Goud VK, Polasa K, Krishnaswamy K. Effect of turmeric on xenobiotic metabolizing enzymes. *Plant Foods for Human Nutrition* 1993; 44: 87-92.
  - 21) Sreejayan N, Rao MN. Free radical scavenging activity of curcuminoids. *Arzneimittel-Forschung* 1996; 46: 169-171.
  - 22) Sreejayan N, Rao MN. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J Pharm Pharmacol* 1997; 49: 105-107.
  - 23) Huang TS, Lee SC, Lin JK. Suppression of c-jun/AP-1 activation by a inhibitor of tumor promotion in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5295-5296.
  - 24) Jee SH, Shen SC, Tseng CR, Chiu HC, Kuo ML. Curcumin induces a p53-dependent apoptosis in human basal cell carcinoma cells. *J Invest Dermatol* 1998; 114: 656-661.
  - 25) Kawamori T, Lubet R, Steele VE, Kelloff GJ, Kaskey RB, Rao CV, Reddy BS. Chemopreventive effect of curcumin, a naturally occurring anti-inflammatory agent, during the promotion/progression stages of colon cancer. *Cancer Res* 1999; 59: 597-601.
  - 26) Lu YP, Chang RL, Huang MT, Conney AH. Inhibitory effect of curcumin on 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced increase in ornithine decarboxylase mRNA in mouse epidermis. *Carcinogenesis* 1993; 14: 293-297.
  - 27) Ishizaki C, Oguro T, Yoshida T, Wen CQ, Sueki H, Iijima M. Enhancing effect of ultraviolet A on ornithine decarboxylase induction and dermatitis evoked by 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate and its inhibition by curcumin in mouse skin. *Dermatology* 1996; 193: 311-317.
  - 28) Ravindranath V, Chandrasekhara N. Metabolism of curcumin-studies with [<sup>3</sup>H]curcumin. *Toxicology* 1981; 22: 337-244.
  - 29) Holder GM, Plummer JL, Ryan AJ. The metabolism and excretion of curcumin (1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) in the rat. *Xenobiotica* 1978; 8: 761-768.
  - 30) Shankar TN, Shantha NV, Ramesh HP, Murthy IA, Murthy VS. Toxicity studies on turmeric (*Curcuma longa*): acute toxicity studies in rats, guineapigs & monkeys. *Indian J Experiment Biol* 1980; 18: 73-75.
  - 31) Bille N, Larsen JC, Hansen EV, Wurtzen G. Subchronic oral toxicity of turmeric oleoresin in pigs. *Food & Chem Toxicol* 1985; 23: 967-973.
  - 32) Thimmayamma BVS, Rao P, Radhaiah G. Use of spices and condiments in the diets of urban/rural families. *Ind J Nutr Diet* 1983; 20: 153-162.
-

ruoylmethane)은 심황 (*Curcuma longa* Lin.)의 뿌리 및 카레, 겨자 등의 주된 색소성분으로 고대로부터 식품의 향신료로 사용되어 왔으며, 염증이나 피부질환 등을 치료하기 위한 민간요법으로도 사용되어온 기록이 있다.<sup>5)</sup> 이와 같은 curcumin은 강력한 항산화작용을 갖고 있으며, 구조적으로 페놀계의 항산화제에 속한다. Curcumin은 살모넬라 균주를 사용한 돌연변이 시험에서 7,12-dimethylbenz[ $\alpha$ ]anthracene (DMBA)이나 benzo[ $\alpha$ ]pyrene (B[ $\alpha$ ]P)에 의한 변이를 억제하며, 림프종에서 암세포의 증식을 억제한다고 한다.<sup>6-8)</sup> 또한 curcumin은 마우스 피부에서 B[ $\alpha$ ]P가 독성물질로 전환되어 DNA에 손상을 주는 것을 막고, 피부암의 유발단계를 억제하는 것으로 보고되었다.<sup>9)</sup> 피부암의 촉진단계에서는 강력한 염증반응을 일으키는 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)가 작용하는데, curcumin은 TPA에 의한 염증반응 및 암발생의 촉진을 막는다고 한다. 또한 curcumin은 마우스의 섬유아세포에서 TPA에 의해서 형성되는 hydroxyl radical을 제거한다고 보고되었다.<sup>10)</sup> 그밖의 발암 실험에서 curcumin은 마우스의 전위암, 선위암, 대장암을 억제하는 것으로 보고되었고, 랫드에서는 대장암, 유방암 발생을 억제하는 효과가 있는 것으로 보고되었다.<sup>11,12)</sup>

Tetrahydrocurcumin (THC)은 curcumin과 그 화학적 구조가 유사하며 무색으로 극성을 띠지 않는 새로운 물질이다. 항산화작용이 강하여 지질과산화(lipid peroxidation)를 억제하는 능력이 curcumin보다 강력하다고 알려져 있다. THC는 curcumin의 대사산물의 하나로 생각되고 있으며, 체내에서 변화되는 것으로 보고된 바 있다.<sup>13)</sup> 또한 THC는 마우스의 피부암 발생을 억제하고 대장암의 전암병변인 대장이상선화소(aberrant crypt foci, ACF) 발생을 억제하는 것으로도 보고된 바 있다.<sup>14)</sup> 그러나 아직까지 THC가 대장과 피부 이외의 장기에서 암예방 효과를 나타내는지의 여부에 관련된 연구결과는 없다.

본 실험에서는 간암유발물질로는 diethylnitrosamine (DEN)을, 대장암 유발물질로는 azoxymethane (AOM)을, 식도암 유발물질로는 *N*-nitrosomethylbenzylamine (NMBA)을 각각 사용한 중기 다장기 발암성 시험법으로 curcumin의  $\beta$ -diketone 구조를

갖는 새로운 유도체인 tetrahydrocurcumin (THC)의 암예방 효과를 종합적으로 평가하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1) 실험동물

5주령의 특정병원체부재 F344 수컷 랫드 116마리를 Charles River Japan (Atsugi, Shizuoka, Japan)에서 구입하여 폴리카보네이트 케이지에 5마리씩 넣어서 1주일간 일본 국립암센터연구소(National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan) 동물실험실 환경에 적응시킨 다음 실험에 사용하였다. 실험실의 사육환경으로는 일본 표준 사육조건인 온도 ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ), 상대습도( $55 \pm 10\%$ ), 명암교대(12/12시간씩 명/암 교대)하에서 실험종료시까지 사육하였다. 그리고 사료와 음료수는 실험기간 중 자유로이 섭취할 수 있도록 하였다.

### 2) 실험설계 및 약물투여

(1) 발암물질 및 tetrahydrocurcumin의 제조: 발암물질인 diethylnitrosamine (DEN)과 azoxymethane (AOM)은 미국 Sigma Chemical사에서 구입하였으며, *N*-nitrosomethylbenzylamine (NMBA)은 *N*-methylbenzylamine을 일본 Tokyo Chemical사에서 구입하여 합성하였다.<sup>15)</sup> 간략히 합성방법을 기술하면, *N*-methylbenzylamine은 80%의 acetic acid에 녹인 다음, 이 수용액에 아질산 나트륨용액을 서서히 넣은 뒤 잘 저어서 황색의 기름성분을 분리하였다. 이 성분을 ether로 분리한 다음 5% sodium bicarbonate 및 물로 씻고 용매를 증발시켰으며, C18 reverse phase column (4.6×150 mm)을 사용하여 HPLC로 순도를 분석하여 95% 이상임을 확인하였다. Tetrahydrocurcumin (THC)(Fig. 1)은 일본 Nikken Fine Chemical사에서 순도 93% 이상 보증된 것을 공급받았다.

실험동물에는 실험동물용 MF분말사료(Oriental Yeast Co. Ltd., Tokyo, Japan)를 급여하였다. 시험물질인 THC를 매주 MF분말사료에 각각 0.25% 및 0.5%가 되도록 혼합하여 밀봉하여 냉장실에 보관하여 사용하였다.

(2) 실험군의 배치: 5주령의 특정병원체부재 F344 수컷 랫드 116마리를 4개군으로 나누어 제1

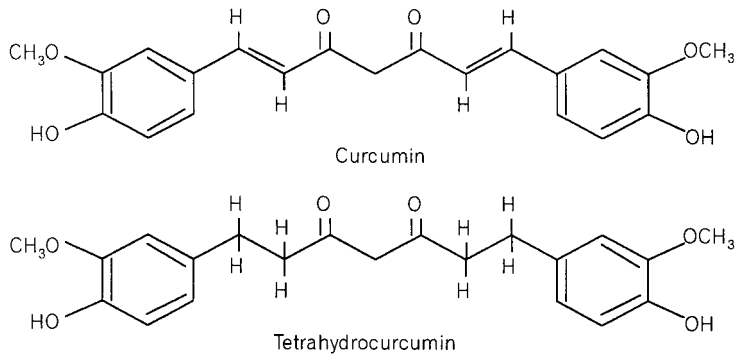


Fig. 1. Chemical structures of curcumin and tetrahydrocurcumin.

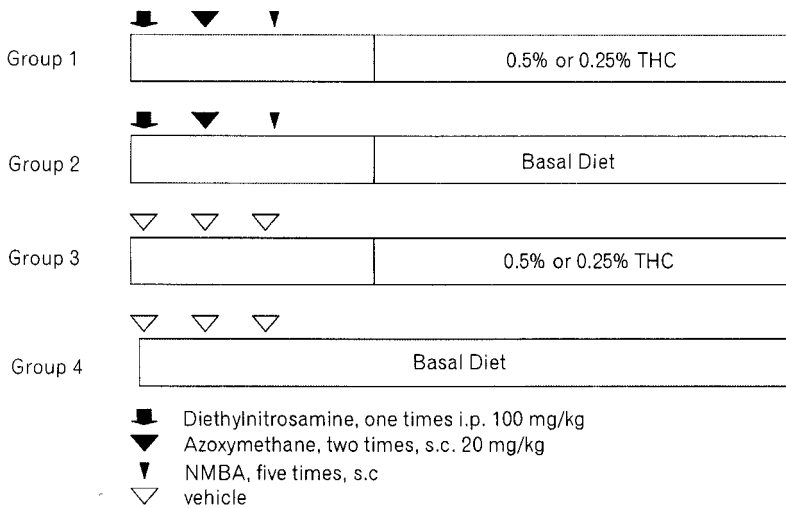


Fig. 2. Experimental protocol for colon carcinogenesis.

군에 50마리, 제2군에 36마리, 제3군에 20마리, 그리고 제4군에 10마리를 배치하였다. 제1군과 제2군은 여러 장기에 암을 유발시키기 위하여 간장 및 폐장 발암물질인 DEN을 실험개시일에 체중 kg당 100 mg씩 복강내로 1회 투여하였으며, 다음으로 대장 발암물질인 AOM을 실험개시 후 1주 및 2주에 체중 kg당 20 mg씩 머리등쪽 피하로 2회 투여하였다. 식도발암물질인 NMBA는 20%의 dimethyl sulfoxide에 용해하여 체중 kg당 0.5 mg씩 주당 5회씩 2주간에 걸쳐 피하로 총 10회 투여하였다(DEN+AOM+NMBA: DAN 투여군). 제3군과 제4군은 대조군으로 제3군에는 발암물질을 녹일 때 사용한 용매만을 제1, 2군에서와 같은 방법으로 투여하였다. 제4군에는 전 실험기간동안 기

본사료만을 급여하였다. THC의 투여는 고농도군(0.5%), 저농도군(0.25%)으로 나누어 제1군에는 각각 25마리씩, 제3군에는 각각 10마리씩 배치하여 실험개시 후 7주부터 실험종료시인 40주까지 33주간 사료에 섞어 급여하였다. 제2군에는 기초사료만을 실험 전 기간에 걸쳐 자유로이 급여하였다. 매2주 간격으로 실험동물의 체중을 측정하였고, 매5주 간격으로 사료소비량 및 음수소비량을 측정하였다. 하루에 한 번씩 임상관찰을 하였으며, 실험기간중의 빈사 또는 폐사하는 동물에 대하여는 즉시 부검하여 주요 장기의 병리 조직학적 검사를 실시하였다. 실험 개시 후 40주에 살아 있는 모든 랫드는 부검을 실시하였다(Fig. 2).

3) 조직처리

실험동물을 실험 시작 후 40주에 에테르 마취 하에 부검을 실시하고, 흉대동맥을 절단하여 방혈 시킨 다음 간장, 신장, 폐장, 식도, 전위부, 소장, 대장, 방광 등의 주요장기를 채취하여 육안적으로 관찰하였고, 병변부위는 세절하여 10% 중성완충 포르말린용액에 충분히 고정하였다. 고정이 끝난 조직은 잘 다듬어서 조직카셋트에 넣어서 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀에 포매하였으며, 조직절편기로 3 μm의 두께로 잘라서 hematoxylin 및 eosin (H&E)으로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

4) 통계학적 분석

체중 및 장기무게에 대한 각 군간의 통계학적 인 분석은 Dunnett's multiple comparison t-test를 사용하였다. 종양의 발생 빈도 및 마리당 발생개 수에 대한 결과의 통계학적 분석은 Chi-square test 나 cumulative Chi-square test를 사용하여 분석하였다. 모든 분석은 매킨토시용 SAS 통계프로그램 인 JMP software 프로그램을 이용하여 수행하였다.

결 과

1) 체중변화 및 장기의 변화

DAN 단독 투여군 및 DAN+0.5%THC, DAN+

0.25% THC 투여군에서 DAN을 투여하지 않은 0.5% THC, 0.25% THC 투여군 및 기본사료급여군에 비해서 체중의 증가율이 제4주부터 유의성 있게 감소하여 실험 종료시까지 계속되었다. DAN +0.5% THC, DAN+0.25% THC 투여군에서는 DAN 단독 투여군에 비해서 제14주부터 체중의 증체율이 유의성 있게 감소하였다(P<0.001, 0.5%; P<0.01, 0.25%). 그러나 발암물질을 투여하지 않은 경우에는 0.25% THC 투여군에서 보다 0.5% THC 투여군에서 체중이 증체율이 통계학적으로 유의성 있게 감소하였으며, 이러한 차이는 실험종료시까지 지속되었다.

DAN+0.5% THC 투여군에서 간장무게는 DAN 단독투여군의 간장무게에 비해서 유의성 있게 증가하였으며(P<0.05) 기본사료급여군에 비해서도 유의성 있게 증가하였다(P<0.05). 0.5% THC, 0.25% THC 투여군의 간장 중량은 기본사료급여군의 간장무게에 비해서 유의성 있게 증가하였다 (0.25%, P<0.01; 0.5%, P<0.001)(Table 1).

DAN+0.5% THC, DAN+0.25% THC 투여군의 체중에 대한 간장무게비는 DAN 단독투여군에 비해서 유의성 있게 증가하였으며(P<0.001), 기본 사료급여군에 비해서도 유의성 있게 증가하였다. 0.5% THC, 0.25% THC 투여군의 체중에 대한 간 장무게비는 기본사료투여군에 비해서 유의성 있게 증가하였다.

각 군간의 신장의 무기와 체중에 대한 무게비

Table 1. Body and organ weights in F344 rats treated with DAN followed by THC

Group	Treatment	Final body weight (g)	Organ weight (g)		Relative organ weight (g%)	
			Liver	Kidney	Liver	Kidney
I	DAN+0.5% THC	349.1 ± 22.3 <sup>†</sup>	10.53 ± 1.02*	1.69 ± 0.88	3.02 ± 0.23 <sup>†</sup>	0.61 ± 0.05
	DAN+0.25% THC	363.6 ± 17.5 <sup>†</sup>	10.36 ± 0.75	2.17 ± 0.17	2.85 ± 0.14 <sup>†</sup>	0.60 ± 0.03
II	DAN alone	376.8 ± 20.6	9.81 ± 0.80	1.69 ± 0.86	2.60 ± 0.15	0.56 ± 0.04
III	0.5% THC	376.8 ± 20.1 <sup>  </sup>	11.40 ± 0.89 <sup>  </sup>	2.16 ± 0.16	3.03 ± 0.18 <sup>  </sup>	0.57 ± 0.03
	0.25% THC	385.5 ± 21.4	11.09 ± 0.56 <sup>  </sup>	2.30 ± 0.11	2.74 ± 0.11 <sup>  </sup>	0.59 ± 0.03
IV	Control	386.7 ± 40.2	8.61 ± 1.49	2.11 ± 0.24	2.22 ± 0.30	0.55 ± 0.06

DAN represents "DEN+AOM+NMBA" treatment. THC was given in diet for 33 weeks.

Each value represents mean ± SD.

\*.†.‡ Significantly different from DAN alone group at P<0.05, P<0.01 or P<0.001, respectively.

||.¶ Significantly different from control group at P<0.01 or P<0.001, respectively.

**Table 2.** Incidences of colon tumors in F344 rats treated with DAN followed by THC

Group	Treatment	No. of rat	Incidences of tumor		
			AD	ADC	AD+ADC
I	DAN+0.5% THC	25	5 (20.0)	1 (4.0)	6 (24.0)*
	DAN+0.25% THC	25	3 (12.0)	5 (20)	8 (32.0)
II	DAN alone	36	11 (30.6)	6 (16.7)	17 (37.2)
III	0.5% THC	10	0	0	0
	0.25% THC	10	0	0	0
IV	Control	10	0	0	0

DAN represents "DEN+AOM+NMBA" treatment. THC was given in diet for 33 weeks.

AD: Adenoma, ADC: Adenocarcinoma

\*Significantly different from the values of the DAN alone group at P<0.05.

Values in parenthesis represent percentages.

**Table 3.** Multiplicities of colon tumors in F344 rats treated with DAN Followed by THC

Group	Treatment	No. of rat	Multiplicities (No. of tumor/rat)		
			AD	ADC	AD+ADC
I	DAN + 0.5%THC	25	0.27±0.13	0.07±0.14	0.33±0.19
	DAN + 0.25%THC	25	0.15±0.11	0.25±0.12	0.40±0.17
II	DAN alone	36	0.24±0.09	0.31±0.10	0.55±0.14
III	0.5% THC	10	0	0	0
	0.25% THC	10	0	0	0
IV	Control	10	0	0	0

DAN represents "DEN+AOM+NMBA" treatment. THC was given in diet for 33 weeks.

AD: Adenoma, ADC: Adenocarcinoma

Each value represents mean±SD.

**Table 4.** Incidences of lung tumors in F344 rats treated with DAN followed by THC

Group	Treatment	No. of rat	Incidences of tumor		
			AD	ADC	AD+ADC
I	DAN+0.5% THC	25	11 (44.0)*	2 (8.0)	13 (52.0)*
	DAN+0.25% THC	25	17 (68.0)	0	17 (68.0)
II	DAN alone	36	26 (72.2)	3 (8.3)	29 (80.6)
III	0.5% THC	10	0	0	0
	0.25% THC	10	0	0	0
IV	Control	10	0	0	0

DAN represents "DEN+AOM+NMBA" treatment. THC was given in diet for 33 weeks.

\*: Significantly different from the values of the DAN alone group at P<0.05.

Values in parenthesis represent percentages.

AD: Adenoma, ADC: Adenocarcinoma

는 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다.

## 2) 대장 조직병리학적 소견

대장점막에서 관찰된 대장암(선종 및 선암종)의 발생율은 Table 2와 3에서와 같다. DAN 단독투여군은 36마리 중 선종(adenoma)과 선암종이 각각 11마리와 6마리로 모두 17마리(37.2%)에서 대장암이 발생하였다(Fig. 3, 4). DAN+THC 투여군에서는 0.5% THC를 투여했을 때 각각 5마리와 1마

리로 모두 6마리(24.0%)에서 발생하여 DAN 단독투여군에 비해서 대장암 발생이 유의성 있게 감소하였다. 0.2% THC 투여군에서도 각각 3마리와 5마리로 모두 8마리(32%)가 발생하여 역시 DAN 단독투여군보다 감소하였으나 통계학적으로 유의성 있는 차이는 없었다.

1마리의 랫드당 선암과 선암종의 발생률은 각

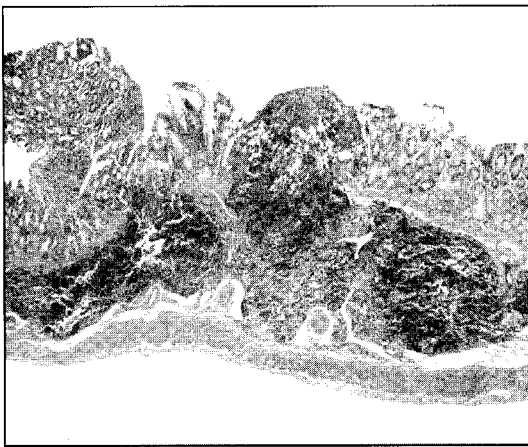


Fig. 3. Proliferated and displaced cancer cells in the mucosa of the colon of rat treated with DAN plus 0.5% THC in Group1. H&E stain.  $\times 100$ .

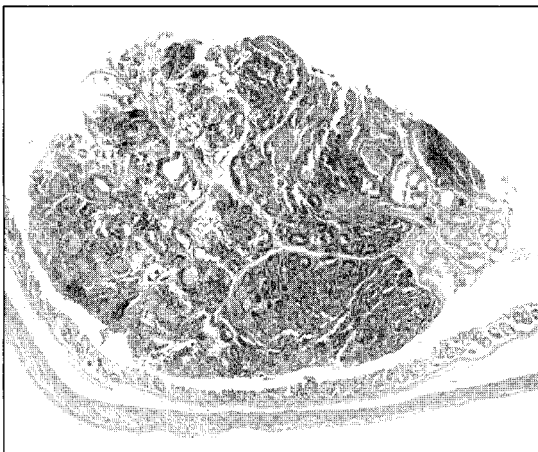


Fig. 4. Adenocarcinoma of the colon of rat treated with DAN alone Group 2. Note the infiltration of the numerous cancer cells and pleomorphism. H&E stain.  $\times 100$

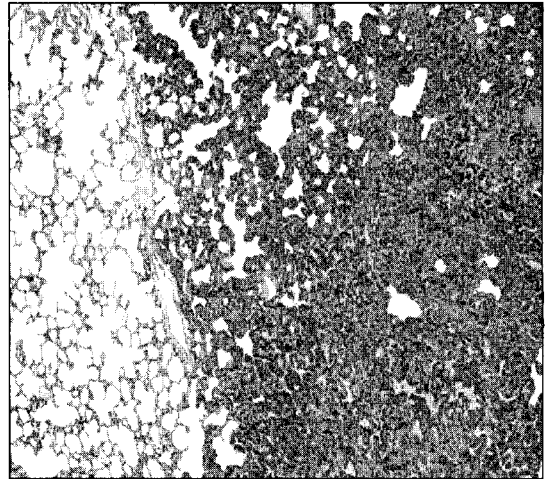


Fig. 5. Adenoma of the lung of rat treated with DAN alone in Group 2. Most of the alveolar lumen is obliterated by the proliferated alveolar epithelial cells. H&E stain.  $\times 100$ .

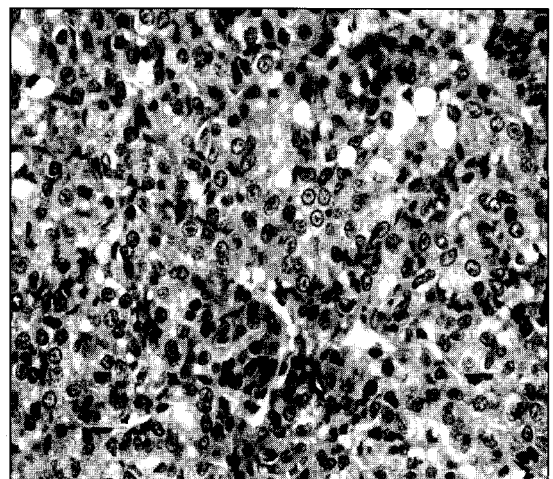


Fig. 6. Magnification of Fig. 5. Note the proliferated alveolar epithelial cells. H&E stain.  $\times 100$ .

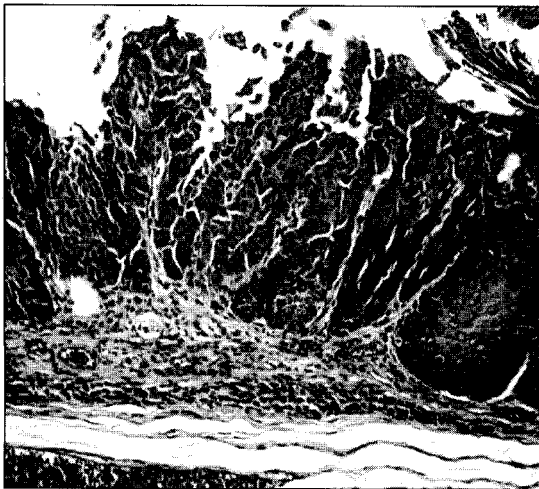
**Table 5.** Multiplicities of lung tumors in F344 rats treated with DAN followed by THC

Group	Treatment	No. of rat	Multiplicities (No. of tumor/rat)		
			AD	ADC	AD+ADC
I	DAN+0.5% THC	25	1.08±1.38	0.08±0.28	1.16±1.57
	DAN+0.25% THC	25	1.24±1.09	0	1.24±1.09
II	DAN alone	36	1.58±1.25	0.08±0.28	1.64±1.40
III	0.5% THC	10	0	0	0
	0.25% THC	10	0	0	0
IV	Control	10	0	0	0

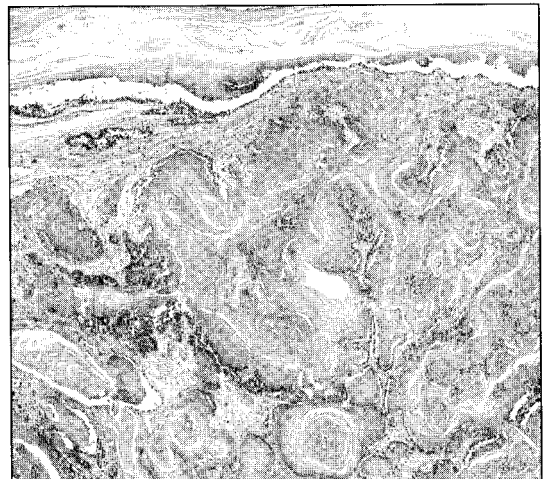
DAN represents “DEN+AOM+NMBA” treatment. THC was given in diet for 33 weeks.

AD: Adenoma, ADC: Adenocarcinoma

Each value represents mean±SD.



**Fig. 7.** Severe hyperplasia of the esophageal mucosa of rat treated with DAN plus 0.5% THC in Group 1. Note hyperplasia of epithelial cells and highly pronounced hyperkeratosis. H&E stain. ×100.



**Fig. 8.** Squamous cell carcinoma of the esophagus of rat treated with DAN alone in Group 2. Note keratinized epithelial pearls. H&E stain. ×100.

군간에서 유의성 있는 차이는 나타나지 않았다 (Table 3).

### 3) 폐 조직병리학적 소견

폐에서 관찰한 폐 선종과 선암종의 발생률은 Table 4에서와 같다. DAN 단독투여군에서 36마리 중 폐 선종과 폐 선암종이 각각 26마리(72.2%)와 3마리(8.3%)로 모두 29마리가 폐암에 걸려 80.6%의 발생률을 보였다(Fig. 5, 6). DAN+0.5% THC

투여군에서는 25마리 중 선종과 선암종이 각각 11마리와 2마리로 모두 13마리(52.0%)에서 발생하여 DAN 단독투여군에 비하여 유의성 있게 감소하였다. DAN+0.25% THC 투여군에서는 25마리 중 폐장선종만 17마리(68%)에서 발생하였으나 DAN 단독투여군과 비교하여 유의성 있는 차이는 없었다.

1마리의 랫드당 폐 선종 및 선암종의 발생률은 각 군간에서 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았다(Table 5).



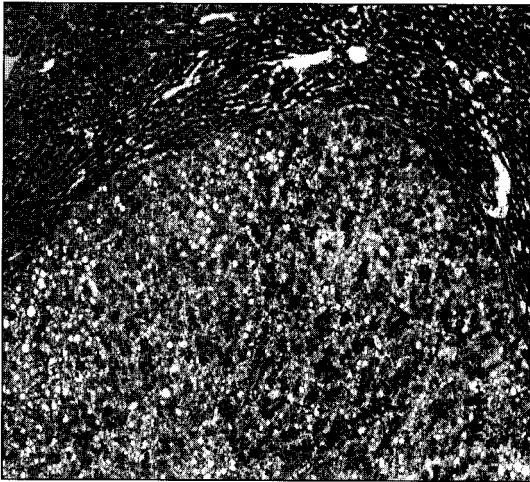


Fig. 9. Hepatocellular adenoma of the liver of rat given DAN plus 0.5% THC in Group 1. Note proliferation of cancer cells and slight compression of adjacent parenchyma. H&E stain.  $\times 200$ .

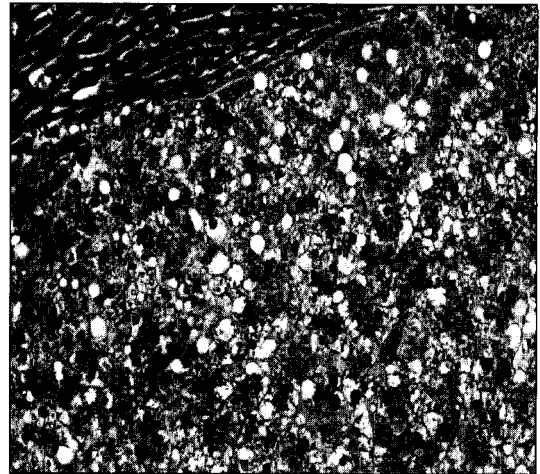


Fig. 10. Higher magnification of Fig. 9. Note many fat vacuoles in predominantly eosinophilic cells. H&E stain.  $\times 400$ .

#### 4) 식도, 간장 및 기타 장기의 조직병리학적 소견

DAN 단독투여군에서 36마리 중 유두종(papilloma)과 편평상피세포암종(squamous cell carcinoma)이 각각 4마리(11.1%)와 1마리(2.8%)로 모두 5마리가 식도암에 걸려 13.8%의 발생률을 보였다 (Fig. 7, 8). DAN+0.5% THC 투여군에서는 25마리 중 유두종만 4마리(16.0%)에서 발생하여 DAN 단독투여군에 비하여 유의성 있는 차이는 없었다. DAN+0.25% THC 투여군에서는 25마리 중 유두종과 편평상피세포암종이 각각 5마리(20.0%)와 3마리(12.0%)로 모두 8마리가 식도암에 걸려 32.0%의 발생률을 보여 다소 증가하는 경향을 보였으나 DAN 단독투여군과 비교하여 유의성 있는 차이는 없었다.

간세포 선종은 DAN 단독투여군에서 36마리 중 6마리에서 발생하여 16.7%의 발생률을 보였다 (Fig. 9, 10). DAN+THC 투여군은 0.5%와 0.25% THC 투여군에서 각각 16%와 8.0%씩 발생하여 DAN 단독투여군에 비하여 발생률은 감소하였으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다.

다른 장기에서의 암 발생은 DAN+THC 투여군에서 표피암 1예, 소장암 1예가 발생하였고, DAN

투여군에서는 표피암 2예, 소장암 1예 그리고 위암 1예가 발생하였다. THC 투여군의 대장, 폐, 간장, 식도 및 다른 주요장기에 대한 유독성은 관찰되지 않았다.

### 고 찰

DAN에 의한 중기 다장기 발암성 시험법에서 0.5% THC는 폐암 발생을 억제하였고, 대장암 발생에 있어서는 악성종양(선암종)의 발생률이 현저하게 감소하였다. 폐장에 대한 THC의 발암억제는 0.25%의 THC 투여군에서는 억제 경향을 보이며, 0.5%의 THC 투여군에서 더욱 효과가 있음을 알 수 있었다.

THC의 발암 억제기구에 대하여는 보고된 것이 없으나, 그러나 발암물질의 대사에 의한 활성화를 억제하거나 발암물질의 해독을 촉진하는 것으로 사료된다.<sup>16)</sup> Curcumin이나 tumeric은 *in vitro*에서 B[ $\alpha$ ]P의 대사적 활성화를 차단하고 또한 *in vivo*에서 B[ $\alpha$ ]P의 DNA adduct를 차단한다고 한다.<sup>17)</sup> Curcumin은 lipoxygenase과 cyclooxygenase (COX)를 통한 피부의 아라키돈산(arachidonic acid) 대사를 억제하고, 아라키돈산에 의한 염증반응을 억제한다. 또한 curcumin은 TPA나 AOM에 의한 염증반응억제, ornithine decarboxylase (ODC), tyrosine

protein kinase (TPK)같은 염증과 관련된 효소들의 활성억제, 그리고 마우스 피부에서의 암의 축진을 억제 및 대장의 전암병변의 생물지표에 대한 억제를 한다고 한다. ODC와 TPK는 암축진에 중요한 기능을 수행하는 것으로 알려졌다. 특히 ODC는 polyamine을 합성하고 TPK와 함께 세포증식과 관련된다고 한다. 한편 curcumin은 마우스에서 TPA에 의한 ODC의 활성을 억제하는데 이는 ODC의 mRNA를 파괴시키므로서 가능하다고 하였다.<sup>26,27)</sup> Curcumin은 nitric oxide (NO)생산을 촉매하는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)를 억제하는데, 이는 그 mRNA를 억제함으로써 이루어진다고 한다.<sup>18)</sup> Curcumin은 랫드 간세포내의 phase I 효소인 CYP (cytochrome P450), arylhydrocarbon hydroxylase 등의 기능을 억제하여, 이러한 효소에 의해서 활성화되는 B[a]P나 DMBA 등의 발암물질들이 출현하는 것을 차단하는 반면, Phase II 효소인 Glutathion-S-Transferase등을 활성화하여 독성물질인 free radical을 제거한다고 한다.<sup>19~22)</sup> THC는 curcumin의  $\beta$ -diketone 부위의 이중결합부위를 수소화 함으로써 만들어진 유도체이며, 이 차이가 THC가 curcumin보다 더 강력한 항산화 작용을 갖는다고 보고하였다.<sup>16)</sup> 또한 Curcumin 유도체들은 대부분 항염증 작용을 갖는다. 항산화 작용과 항염증 작용을 하는 화합물들은 TPA에 의한 암의 축진을 억제하고, 그와 관련된 생화학적인 인자들에 영향을 미친다고 한다. 그러나 Huang등은 THC가 curcumin보다 TPA에 의한 마우스의 피부 염증반응, ODC 활성 및 암의 축진에 대한 억제 효과가 약하였고, 이는  $\beta$ -diketone 부위의 이중결합부위가 없기 때문이라고 하였다. 반면, THC가 curcumin보다 AOM에 의한 대장암의 전암지표인 ACF의 발생을 억제하는데 효과가 있으며, 이는 세포증식의 억제와 관련된다고 하였다.<sup>14)</sup>

한편 Huang등은 curcumin이 TPA에 의해 발현되는 발암유전자 (oncogene)인 c-jun/AP-1의 활성을 억제한다고 하였다.<sup>23)</sup> 활성화라디칼에 의해 활성화되는 transcription factor인 NF- $\kappa$ B와 AP-1등의 활성을 억제한다고 하며, 아포토시스(apoptosis)는 암의 발생과 밀접한 관련이 있는데, curcumin이 사람 간암세포와 백혈병세포(hepatoma cell and leukemia cell)에서 발암억제유전자인 p53과 연관된

세포자연사를 촉진하며, 또한 인간의 basal cell carcinoma cells에서는 용량 및 시간 의존적으로 세포자연사를 촉진한다고 하였다.<sup>24)</sup> 최근에 curcumin은 대장암의 발암축진(progression)단계에서 억제효과가 있다고 보고되었으며, 이는 세포자연사의 촉진과 관련된다고 하였다.<sup>25)</sup> THC가 발암유전자나 발암억제 유전자와 관련되어서 어떠한 영향을 미치는가에 대한 연구보고는 없으며, 아포토시스를 촉진하는가에 대해서도 보고된바가 없으므로 이에 대한 연구가 필요하다고 하겠다.

한편, curcumin은 실험동물에 투여된 후 빠르게 흡수된 다음 대사되어 주로 담즙으로 분비되고 나머지가 요로 배출되어, 혈액 내에서는 검출되지 않는 반면, THC는 자주 검출되므로, curcumin이 장에서 흡수된 후 THC로 변환되는 것으로 추측되고 있다.<sup>28,29)</sup> 따라서 curcumin의 모든 생리학적 및 약리학적 작용은 THC를 통해서 이루어지는 것으로 추측되고 있다. Curcumin은 피부, 전위, 십이지장 그리고 대장 등의 암발생에서는 억제효과가 있는 반면, 폐암이나 유방암에서는 효과가 없는 것으로 알려져 있는데, 이는 체내에서의 낮은 활성 때문이라고 한다. 심황은 랫드, 개, 기니픽, 그리고 원숭이에서 수행된 장기 독성 시험에서 별다른 독성을 보이지 않았으며, 3대에 걸쳐서 수행된 시험에서도 발암성이나, 생식독성을 보이지 않았다고 한다.<sup>30,31)</sup> 다만, 돼지의 경우에 약간의 체중감소와 간장 및 갑상선의 무게가 증가하였다고 하였다. Curcumin이나 THC는 지금까지 장기 독성시험에 대한 자료가 아직은 미미하나, *in vitro* 시험 결과 특별한 독성이나 변이원성을 보이지 않았으며, 또한 많은 암예방 실험에서 별다른 독성이 없는 물질로 사람들이 고대로부터 섭취되어온 물질이다. 본 실험에서도 THC는 주요 장기에서 특별한 병변을 보이지 않았으나, 0.5% THC 투여군의 경우에 체중 감소가 관찰되었다. 또한 본 실험에서 THC 투여로 간장의 무게 및 체중에 대한 무게비가 증가하였는데, 이러한 변화가 THC에 의한 간장의 대사효소들의 활성과 관계가 있는 것인지, 어떤 미약한 독성을 갖고 있는 것인지에 대하여 알기 위해서는 보다 추가적인 연구가 필요하다고 하겠다. 사람의 경우에 심황의 섭취는 주로 카레나 겨자 및 식품에 첨가되는 황색

색소를 통해서 이루어지며, 하루에 약 600 mg (curcumin 10~30 mg)이 섭취한다는 보고가 있다.<sup>32)</sup> 따라서 이들 식품의 섭취와 암예방과 어떤 상관관계가 성립되는지에 대한 주의 깊은 역학적 연구가 긍정적으로 검토되고 있는 실정이다.

## 결 론

본 연구에서는 식품에서 유래된 항암물질인 curcumin의 새로운 유도체인 tetrahydrocurcumin (THC)이 랫드의 장기에 미치는 발암억제효과를 다장기 발암성 실험법으로 알아보기 위하여 수행하였다. 발암물질인 diethylnitrosamine (DEN), azoxymethane (AOM) 그리고 *N*-nitrosomethylbenzylamine (NMBA) [DAN]를 F344 랫드에 투여한 후 THC를 33주 동안 사료에 섞어서 급여한 다음 간장, 신장, 폐, 식도, 전위부, 소장, 대장 및 방광을 채취하여 조직표본을 제작해서 이들 장기에서의 암발생의 유무를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

DAN 다장기 발암성 시험법에서 고농도 THC는 체중 및 장기무게의 차이를 일으켰음에도 불구하고 사료소비량이나 음수소비량의 차이가 관찰되지 않았으며, 주요장기의 독성도 관찰되지 않았다. 또한 고농도의 THC는 폐암발생을 억제하였고, 대장암 발생빈도에 있어서는 고농도의 THC의 악성종양(선암종)의 발생빈도가 현저하게 감소하였다. 그러나 간장암 그리고 식도암 등의 발생빈도에는 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다.

본 연구에서 얻은 성적을 종합한 결과 THC는 폐암 예방효과가 있으며, 고농도의 THC는 대장암 억제작용을 나타내는 것으로 사료된다. 또한 THC는 특별한 독성을 나타내지 않은 점으로 미루어 보아 사람을 대상으로 하는 임상실험에서 사용이 가능한 물질로 사료된다. 따라서 curcumin의 대사활성물질인 THC는 인체에서의 암예방 효과가 기대되는 물질로 믿어진다.

## 감사의 글

본 연구 수행을 위하여 아낌없는 지원과 격려를 보내주신 일본 국립암센터연구소 실험병리 및

화학요법부 Hiroyuki Tsuda박사와 Nobuo Takasuka 박사에게 진심으로 감사를 드리며, 본 연구의 새로운 물질을 제공해 주신 일본 나고야대학 생명농학연구과의 Toshihiko Osawa박사에게 감사드립니다. 또한 이 논문은 2000년 충북대학교 발전기금재단의 연구활성화 연구지원에 감사드립니다.

## 참고 문헌

- 1) Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimate of avoidable risks of cancer in United States today. *JNCI* 1981; 66: 1191-1308.
- 2) Doll R. The lessons of life: keynote address to the nutrition and cancer conference. *Cancer Res* 1992; 52: 2024-2029.
- 3) Wattenberg LW. Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituent. *Cancer Res* 1993; 52: 2085-2091.
- 4) Kraemer KH, DiGiovanna JJ, Moshell AN, Tarone RE, Peck GL. Prevention of skin cancer in xeroderma pigmentosum with use of oral isotretinoin. *N Engl J Med* 1988; 318: 1633-1637.
- 5) Ammon HP, Wahl MA. Pharmacology of *curcuma longa*. *Planta Medica* 1991; 57: 1-7.
- 6) Josephy PD, Gruz P, Nohmi T. Recent advances in the construction of bacterial genotoxicity assays (review). *Mut Res* 1997; 386: 1-23.
- 7) Nagabhushan M, Amonkar AJ, Bhide SV. *In vitro* antimutagenicity of curcumin against environmental mutagens. *Food & Chem Toxicol* 1987; 25: 545-547.
- 8) Kuttan R, Bhanumathy P, Nirmala K, George MC. Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*). *Cancer Lett* 1985; 29: 197-202.
- 9) Huang MT, Wang ZY, Georgiadis CA, Laskin JD, Conney AH. Inhibitory effects of curcumin on tumor initiation by benzo[*a*]pyrene and 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene. *Carcinogenesis* 1992; 13: 2183-2186.
- 10) Shih CA, Lin JK. Inhibition of 8-hydroxydeoxyguanosine formation by curcumin in mouse fibroblast cells. *Carcinogenesis* 1993; 14: 709-712.
- 11) Huang MT, Lou YR, Ma W, Newmark HL, Reuhl KR, Conney AH. Inhibitory effects of dietary curcumin on forestomach, duodenal, and colon carcinogenesis in mice. *Cancer Res* 1994; 54: 5841-5847.
- 12) Pereira MA, Grubbs CJ, Barnes LH, Li H, Olson GR, Eto I, Juliana M, Whitaker LM, Kelloff GJ, Steele VE, Lubet RA. Effects of the phytochemicals, curcumin and quercetin, upon azoxymethane-induced colon cancer and 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene-induced