

녹차의 화학적 암 예방기전 연구: 녹차 飲用이 각 장기의 CYP1A에 미치는 영향

서울대학교 의과대학 예방의학교실 및 암연구소, ¹계명대학교 응용과학부,
²일본산업의과대학 산업보건학부 제2환경관리학과, ³산업의과대학 의학부 위생학교실

양미희 · 이인선¹ · 요시가와 마사히로²
아라시다니 케이이찌² · 가와모토 도시히로³

Effects of Green Tea-Drinking on CYP1As in Different Tissues

Mihi Yang^{1,2}, In-Seon Lee³, Masahiro Yoshikawa⁴,
Keiichi Arashidani⁴ and Toshihiro Kawamoto⁵

*Department of Preventive Medicine and Cancer Research Institute,
Seoul National University College of Medicine, Seoul 110-799, Korea*
¹*Department of Food Science and Technology, College of Natural Sciences,
Keimyung University, Daegu 704-701, Korea*
²*Department of Environmental Management, School of Health Sciences,
University of Occupational and Environmental Health, Japan,*
³*Department of Environmental Health, College of Medicine,
University of Occupational and Environmental Health,
Kitakyushu 807-8555, Japan*

To study chemopreventive mechanism of green tea (GT), we studied the effects of GT-drinking on hepatic, pulmonary, and renal CYP1As against 3-methylcholanthrene (MC), which is a CYP1A-inducing carcinogen. Pre- and concurrent 2% GT drinking (11 days) was conducted in arylhydrocarbon receptor (AR) responsive C57 BL/6 mice. As results, GT drinking reduced MC-induced pulmonary ethoxyresorufin-O-demethylase (EROD)-activity, which is a probe for total CYP1As-activity including CYP1A1 and 1A2. In contrast, GT drinking enhanced MC-induced hepatic EROD-activity. EROD activity in kidney was lower than those in lung or liver and GT drinking did not affect MC-induced renal EROD activity. These results suggest that the different effects of GT on CYP1As are diverse in different tissues. Arylhydrocarbon hydroxylase (AHH) activity, which is known to reflect CYP1A1 activity, was not different according to GT drinking in lung, liver, or kidney. Therefore, CYP1A2 or other microsomal enzymes rather than CYP1A1 might be affected by GT in lung, liver and kidney. However, the changes of EROD activity by GT were not confirmed with CYP1A antibody. Our results suggest that susceptibility to chemopreventive GT against CYP1A-biotransformed carcinogens might be different in different tissues.

Key Words: Green tea, CYP1A, Chemoprevention

서 론

생체 내 사이토크롬 P450 (cytochrome P450, CYP)는 체외에서 유입되는 생화학적 異物質의 대사에 관여하여 이물질의 체내독성을 무독화하는데 작용하는 한편, arylhydrocarbon, aromatic 또는 heterocyclic amine 등 대기오염물질 및 식품, 조리에서 유래한 발암물질에 대하여는 이를 대사하여 오히려 암화의 개시에 관여하는 것으로 알려져 있다.¹⁾ 한편, 녹차는 폐, 소화기, 간, 직장, 피부, 등 다양한 조직에서 항산화, 항암효과가 보고되었고,²⁾ epigallocatechin gallate 등 녹차에 함유된 polyphenol성분들은 *in vitro* 실험에서 CYP1A활성을 억제하고 이 기전(mechanism)이 녹차의 화학적 암 예방(chemoprevention)에 관여하는 것으로 추정되어 왔다.³⁾

또한 각 장기에서 CYP1A 발현정도가 다르고, CYP1A 유도물질의 수용체인 arylhydrocarbon receptor (AR)양이 폐, 간, 신장 등 조직에 따라 다르므로⁴⁾ 녹차투여에 따른 각 장기의 CYP1A 변화에도 차이가 있을 것으로 추정되어 녹차 음용 후 발암물질 노출에 대한 각 장기별 감수성을 연구하기 위한 지표로 CYP1A의 변화를 장기별로 조사하는 것이 녹차의 효과적 화학적 암 예방에 필요하다. 그러므로 본 연구는 녹차가 각 장기에 미치는 항 암기 전을 연구하기 위하여 AR 감수성이 높은 종인 C57 BL/6 생쥐에서 단기간(11일) 녹차 飲用이, CYP1A 유도 발암 물질인 3-methylcholanthrene (MC) 투여로 유도된 CYP1A에 미치는 영향을 폐, 간, 신장 등의 각 장기별로 조사하였다. 녹차로는 일본에서 시판 중인 다양한 녹차 중, 가장 많이 소모되고, 다른 차 종류에 비해 Vt C, Vt E, polyphenols이 많이 함유된 煎茶 (Sencha)⁵⁾를 사용하였다.

재료 및 방법

1) 시약

모든 화학시약은 특급시약을 사용하였고, resorufin, corn oil, tris base는 Sigma Co. (St Louis, MO, USA)에서, CYP1A western blot을 위한 항체

및 표준품은 Daiichi Pure Chem. (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. 기타 시약은 Wako Pure Chemical Industry Co. (Osaka, Japan)로부터 구입하였다.

2) 실험동물처치

젖을 띤 3주령의 수컷 C57BL/6 mice을 Seiwa animal lab. (Kitakyushyu, Japan)으로부터 구입하여 실험 전 한 주간을 실험실 내 적응시켰다. 위 실험동물은 각 플라스틱케이지에서 5마리씩 온도(섭씨 24±1도), 습도(55±5%), 조명(a diurnal cycle: 12 hr light~12 hr dark)의 통제를 받았으며 사육되었다. 한 케이지에 있는 5마리를 한 群으로 총 4군(대조군, C; MC 단독 투여군, M; 녹차 단독 투여군, G; 녹차와 MC 동시 투여군, GM)으로 수돗물을 C 및 M군에, 녹차를 G 및 GM 군에 각각 7일간 음용수로 주었다. 녹차는, 녹차(Yame-Sencha, Fukuoka, Japan) 1 g을 끓은 물을 약간 식힌 물(섭씨 70도) 50 ml에 넣어 20분 방치 후 여과한 뒤 투여하였다.⁶⁾ 일주일 후, 계속 같은 방법으로 음용수를 공급하며, MC (40 mg/kg body weight/day)를 M 및 GM군에, carrier인 corn oil을 C 및 G군에 4일간 복강 내 주사하였다. 마지막 주사 후 실험동물을 16시간 동안 금식시킨 후 cervical dislocation으로 희생시켰다. 4군을 한 셀(20마리)으로 3회 반복하여 3셀(60마리)에서 본 실험 결과를 얻었다.

3) 각 장기의 microsome 분리

냉각된 생리식염수를 이용하여 폐, 간, 신장을 관류하여 적출 후, 곧 드라이아이스에 냉각시켜 실험 전까지 섭씨 80도씨에서 보관하였다. 각 장기의 중량을 측정하고, 0.1 M KCl과 1.0 mM EDTA를 포함하는, 장기의 6배 용적의 ice cold tri-acetate buffer (pH 7.4)에 각 군의 각 장기를 풀(pool)로 하여 넣어 Van der Hoeven등의 법⁷⁾을 따라 microsome을 분리하였다. Microsomal protein의 농도는 Lowry법⁸⁾에 따라 정량하였다.

4) CYP1A효소 활성 정량

CYP1A1과 CYP1A2를 포함한 총 CYP1A의 활성은 ethoxyresorufin-O-demethylase (EROD) 활성으로, CYP1A1만의 활성은 arylhydrocarbon hydro-

xylase (AHH) 활성을 측정하였다.⁹⁾ 간단히 설명하면 AHH 활성은 Nebert 등의 법¹⁰⁾을 따라 50 μ mole tris-HCl (pH 7.5), 3 μ mole MgCl₂, 50~100 μ g microsomal protein 및 1.0 μ mole NADPH를 포함하는 반응혼합액 1 ml를 섞서 37도에서 5분간 preincubation 후, 기질인 80 nmole benzo(a)pyrene을 가하여 반응을 시작하였다. 형광 spectrophotometer (Hitachi, F4010)를 이용하여 생성된 3-OH-BAP를 emission, 522 nm; excitation, 394 nm에서 정량하였다.

EROD 활성은 Pohl 등의 법¹¹⁾을 따라 50 μ mole tris-HCl (pH 7.8), 150 μ mole KCl, 5 μ mole MgCl₂, 10 mmole dicumarol,¹²⁾ 약 50 μ g microsomal protein 및 0.5 μ mole NADPH를 포함하는 반응혼합액 1 ml에 기질 2 nmole ethoxyreso-rufin (in DMSO)을 가하여 반응을 시작하였다. 형광 spectrophotometer를 이용하여 생성된 resorufin을 emission, 591 nm; excitation, 535 nm에서 정량하였다.

각 반응의 incubation time은 5분으로 하였다. 각 효소활성반응조건은 미리 반응시간 및 microsome 농도와 효소활성의 검량선을 작성한 후, 직선관계가 있는 구간에서 진행하였다.

5) CYP1A 단백질발현 분석

CYP1A 단백질발현 양은 western blot¹³⁾으로 CYP1A를 분석하였다. 즉, CYP1A항체 제작사의 방법을 약간 수정하여, 각 장기의 microsome을 8% SDS-polyacrylamide gel에 적용하여 CYP1A 단백질 standard 및 rainbowTM colored protein-molecular weight

marker (Amersham Biosciences, UK)와 함께 전기영동하여 분리시킨 후, gel을 Tranblot SD (Bio-RAD)에 옮겨 nylon membrane (HybondTM-N, Amersham)에 blotting하였다. 위 nylon membrane을 10% (w/v) skim milk를 포함하는 tris-buffered saline (TBS)로 blocking 후, 일차 항체인 염소에서 만들어진 CYP1A1 및 CYP1A2 동시 항체인 anti-rat CYP1A1 serum과 incubation 후, TBS로 세척 후, 이차 항체인 peroxidase anti-goat IgG (H+L) (rb)와 incubation 후 다시 TBS로 세척한 뒤, 4-chloro-1-naphtol를 이용하여 발색시켰다.

6) 통계분석

처치군 간의 CYP1A 효소활성정도 및 단백질 발현량의 차이는 one way-anaylsis of variance (ANOVA)를 이용하여 분석하였다(JMP version 3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

결 과

1) 녹차 음용이 CYP1A효소활성에 미친 영향

Table 1은 녹차 음용이 CYP1A효소활성에 미친 영향을 나타내는데, 다른 장기에 비해 간에서 AHH 및 EROD활성이 높았고, MC 투여에 의해 신장, 폐, 간에서 오름 순으로 AHH 및 EROD활성이 유도되어 증가하였다. 그러나, 녹차 음용으로 폐에서는 대조군과 비교하여 약 60%의 EROD활성이 감소하였고, MC투여에 대하여서도 녹차 투

Table 1. Differences of CYP1A activity in different tissues according to GT drinking

Group	AHH			EROD		
	Lung	Liver	Kidney	Lung	Liver	Kidney
Control	4.4±1.5 [1]	567±83 [1]	N.D.	24±7 [1]	41±6 [1]	N.D.
G	4.5±1.4 [1]	649±223 [1]	N.D.	10±1 [0.4] ^a	60±8 [1.5] ^a	N.D.
M	14.8±7.0 [3]	11844±4310 [21] ^a	4.08±0.61 (1)	92±9 [4] ^a	2341±258 [57] ^a	1.89±0.11 (1)
GM	14.9±4.8 [3]	10218±1655 [18]	4.45±0.43 (1)	79±3 [3] ^{ab}	2939±186 [72] ^{ab}	1.91±0.38 (1)

Data represent mean (pmole/min/mg protein) standard deviation of enzyme-activity: G, green tea drinking group; M, MC exposed group; GM, green tea and MC treated group, [], ratio with respect to the control group; (), ratio with respect to the MC group N.D., non-detectible

^ap<0.05, compared to the control (water) group

^bp<0.05, compared to the MC treated group

여 시 약 25%의 EROD활성이 감소하였다. 한편, 간에서는 녹차 음용으로 EROD활성이 증가하여 대조군에 비해 1.5배, MC군에 대하여는 약 26% 높은 EROD활성을 보였다. 신장에서는 위 두 장기보다 AHH 및 EROD활성이 낮아 CYP1A의 발현이 약한 것으로 추정되며, 녹차 음용으로 인한 AHH 및 EROD의 활성에도 변화가 없었다. CYP1A 중 CYP1A1을 반영하는 AHH활성에서는 녹차 음용에 따른 유의적 변화가 없으므로, EROD는 CYP1A의 isozyme에 대한 선택성이 적고 총 CYP1A의 활성을 반영하므로, 녹차로 인한 EROD활성변화는 CYP1A1 이외의 CYP1A, 즉 CYP1A2 또는 기타 microsome효소의 유도에 의한 것으로 추정된다.

2) 녹차 음용이 CYP1A 단백질발현에 미치는 영향

이미 CYP1A활성이 각 장기에 따라 효소활성 정도 및 녹차로 인한 변화양상이 다름을 보았으므로, 그 기전을 효소의 근본 골격이 되는 CYP1A 단백질발현의 변화에서 유래한 것인지 살펴보았다. 그 결과(Fig. 1), MC노출로 인해 간에서 CYP1A apoprotein의 발현은 폐나 신장보다 약 30배 이상 유도되었고, MC노출에 대하여 녹차 음용은 각 장기에서 유의적인 CYP1A 단백질발현의 변화를 초래하지 않았다. 한편, 폐와 신장에서는 대조군 및 녹차 음용 군에서는 CYP1A 단백질 발현이 검출한계 이하로 측정할 수 없었다.

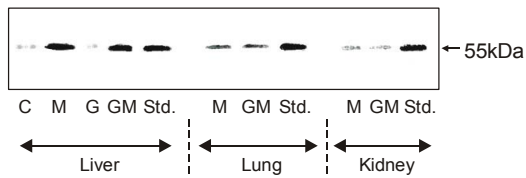


Fig. 1. Effects of green tea on CYP1A-protein level: Five g of protein in lung and kidney were loaded: 0.5µg in liver; C, control; M, 3-methylcholanthrene exposed group; G, green tea drinking group; GM, green tea and 3-methylcholanthrene exposed group; Std., standard of CYP1A protein from the manufacturer.

고 찰

환경 유래 발암물질에 대한 후보물질의 화학적 암 예방 효과를 조사 위하여 실험동물을 사용할 경우, 대부분 장기간, 막대한 연구비, 노동력을 필요로 하므로, 최근 단시간 내 화학적 암 예방 효과를 스크리닝하는 방법이 요구되고 있다. 이런 요구에 응답하는 단기간 화학적 암 예방효과의 생물학적 지표로써 CYP1A의 변화가 최근에 그 가능성을 시험받고 있다.¹⁴⁾ 특히, 녹차의 polyphenol 성분들은 CYP1A의 유도를 억제하므로,³⁾ 이 기전이 CYP1A에 의해 대사 되어 발암물질로 작용하는 발암원에 대하여 화학적 암 예방기전으로 거론되어 왔다. 또한, 최근 일본인구에서 하루 10잔 이상 녹차를 습관적으로 마시는 일본인에서 각 종 암의 발생이 적은 것으로 보고되어¹⁵⁾ 녹차 음용의 암 예방효과를 시사하고 있었다. 그러므로 본 연구는 단기간의 녹차 음용이 CYP1A에 미치는 영향을 조사하였고 또한, 어느 장기에 효과적으로 녹차가 발암 억제 효과를 갖는지 불분명하므로, bezo(a)pyrene 등 발암성 다환족 방향성 탄화수소의 표적기관인 폐, 異物質의 대사와 배설의 주요기관인 간과 신장 등 세 장기를 중심으로 녹차에 의한 CYP1A변화를 조사하였다. 그 결과, 표에서 보는 바와 같이 녹차 음용은 각 장기에서 CYP1A효소활성에 차이를 나타내었다. 그러므로, 녹차에 의한 각 장기별 화학적 예방의 감수성에는 차이가 있음이 확인되었다. 그러나, CYP1A가 발암화 작용 뿐 아니라, 항상성유지 등 생명유지에 필요한 효소 군으로 작용하므로 CYP1A유도 및 억제가 각각 다른 기전을 통하여 항암효과를 나타낼 수 있음도 고려되어야 한다.

한편, 녹차 음용에 따른 CYP1A효소활성의 변화는 CYP1A-apoprotein 수준에서는 그 경향이 완전히 일치하지 않았다. 즉, 대조군 및 녹차단독 투여 군에서 CYP1A protein 수준이 폐와 신장에서 검출한계 이하로 효소활성결과와 일치하나, 녹차 음용에 따른 EROD활성의 변화가 각 장기에서 다른 것은 단백질 수준에서는 확인할 수 없었다. 그러므로, 녹차로 인한 EROD활성의 변화는 CYP1A 단백질발현에 의한 것보다는 CYP의 기질특이성

이 그리 특이적이지 못한 점을 고려할 때, CYP1A 이외의 다른 microsome 효소가 녹차의 영향을 받았거나, 혹은 CYP1A apoprotein이 아닌 다른 인자 즉, CYP1A 효소활성에 영향을 주는 효소 구조 및 활성화에 관여하는 인자들이 녹차의 영향을 받은 것으로 추정할 수 있다. 그러므로, 가까운 장래, 보다 다양한 기질을 사용하여 보다 신뢰할 만한 CYP1A에 대한 활성분석법의 확립이 필요하다.

결론으로 단백질 수준에서는 확인되지 않았으나, CYP1A 효소활성을 중심으로 볼 때, 녹차에 의한 화학적 암 예방효과는 장기별로 다르며, 또한 녹차 중 어느 성분들이 나타내는 항암작용기전과 녹차 전체의 항암작용기전은 서로 다를 것으로 예상된다.

감사의 글

본 연구는 일본산업의대의 산업의학진흥연구비 및 과학기술부·한국과학재단 지정 계명대학교 전통 미생물자원 개발 및 산업화 연구센터의 지원에 의한 것입니다.

참고 문헌

- 1) Goldstein JA, Faletto MB. Advances in mechanisms of activation and deactivation of environmental chemicals. *Environ Health Perspect* 1993; 100: 169-176.
- 2) Yang CS, Wang Z. Tea and cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1038-1049.
- 3) Wang Z, Das M, Bickers DR, Mukhtar H. Interaction of epicatechins derived from green tea with rat hepatic cytochrome P-450. *Drug Metab Dispos* 1988; 16: 98-103.
- 4) Li W, Donat S, Dohr O, Unfried K, Abel J. Ah receptor in different tissues of C57BL/6J and DBA/2J mice: use of competitive polymerase chain reaction to measure Ah-receptor mRNA expression. *Arch Biochem Biophys* 1994; 315: 279-284.
- 5) Tomita I. Inhibition of mutation and tumor-promotion

- by tea. *Idenn* (in Japanese) 1989; 43: 10-11.
- 6) Xu Y, Ho C, Amin SG, Han C, Chung F. Inhibitor of tobacco-specific nitrosamine-induced lung tumorigenesis in A/J mice by green tea and its major polyphenol as antioxidants. *Cancer Res* 1992; 52: 3875-3879.
- 7) Van Der Hoeven TA, Coon MJ. Preparation and properties of partially purified cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase from rabbit liver microsomes. *J Biol Chem* 1974; 249: 6302-6310.
- 8) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
- 9) Tsyrllov IB, Goldfarb IS, Gelboin HV. Enzyme-kinetic and immunochemical characteristics of mouse cDNA-expressed, microsomal, and purified CYP1A1 and CYP1A2. *Arch Biochem Biophys* 1993; 307: 259-266.
- 10) Nebert DW, Gelboin HV. Substrate-inducible microsomal aryl hydroxylase in mammalian cell culture. *J Biol Chem* 1968; 43: 6242-6249.
- 11) Pohl RJ, Fouts JR. A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. *Anal Biochem* 1980; 107: 150-155.
- 12) Lubet RA, Nims RW, Mayer RT, Cameron JW, Schechtman LM. Measurement of cytochrome P-450 dependent dealkylation of alkoxyphenoxazones in hepatic S9s and hepatocyte homogenates: effects of dicumarol. *Mutat Res* 1985; 142: 127-131.
- 13) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 4350-4354.
- 14) Allen SW, Mueller L, Williams SN, Quattrochi LC, Raucy J. The use of a high-volume screening procedure to assess the effects of dietary flavonoids on human cyp1a1 expression. *Drug Metab Dispos* 2001; 29: 1074-1079.
- 15) Sueoka N, Suganuma M, Sueoka E, Okabe S, Matsuyama S, Imai K, Nakachi K, Fujiki H. A new function of green tea: prevention of lifestyle-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 928: 274-280.