

한국인에서 구강상피세포를 이용한 발암물질 대사효소의 유전자 다형성에 관한 연구

연세대학교 치과대학 구강생물학교실, 구강과학 연구소, BK21 의과학 사업단, ¹고려대학교 통계학과

최민아 · 박해준 · 정원윤 · 이재원¹ · 이정복¹ · 박광균

Genetic Polymorphisms of Carcinogen-Metabolizing Enzymes from Oral Epithelial Cells of Healthy Koreans by Mouthwash Method

Min-Ah Choi, Hae-Joon Park, Won-Yoon Chung, Jae Won Lee¹,
Jung-Bok Lee¹ and Kwang-Kyun Park

Department of Oral Biology, Oral Science Research Center and BK 21 Project for
Medical Science, Yonsei University College of Dentistry, Seoul 120-752, Korea

¹Department of Statistics, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Xenobiotic-metabolizing machinery contains two main types of enzymes: the phase I enzymes mediating oxidative metabolism, cytochrome P450 (CYPs) and phase II conjugating enzymes involved in detoxification, glutathione-S-transferase (GSTs). Genes that encode these enzymes are polymorphic, and such polymorphisms are associated with the susceptibility to the hazardous action of chemicals such as carcinogens in some individuals. Moreover, genetic polymorphisms of xenobiotic-metabolizing enzymes have been shown considerable ethnic differences in gene structure and allelic distribution. In this study, we investigated the polymorphic genotypes of *CYP1A1* (*MspI* and exon 7 polymorphisms), *CYP2E1* and *GSTM1* from oral epithelial cells of 225 healthy Koreans collected by mouthwash method. The genomic DNA was purified by phenol-chloroform extraction and the genotypes of *CYP1A1*, *CYP2E1* and *GSTM1* were determined by polymerase chain reaction-based assay. *CYP1A1* *MspI* genotypes m1/m1, m1/m2 and m2/m2 were found in 36.3%, 55.7% and 8.0% of healthy Koreans and exon 7 genotypes were 16.8% for ile/ile, 74.8% for ile/val and 8.4% for val/val. The frequency of *CYP1A1* m1/m2 was higher in Koreans than Europeans as compared with the previous studies. *CYP1A1* ile/val genotype in Koreans was found to be significantly high in comparison with Japanese as well as Europeans and Caucasian. The c1/c1, c1/c2 and c2/c2 genotypes of *CYP2E1* were observed as 53.3%, 43.8% and 2.9%. The presence of c2 allele was significantly more frequent in Koreans (24.3%) than in Swedish (5.0%), European-American (1.0%) and African-American (4.0%). *GSTM1* wild and null genotypes were found in 39.0% and 61.0%, respectively and this was not significantly different from other ethnic

group. Taken together, these results demonstrate that the distribution of genetic polymorphisms in Koreans are different from that in other races or ethnic group. Our results also indicate that the mouthwash method was more effective and easier in large community-based studies.

Key Words: Xenobiotic-metabolizing enzyme, CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, Genetic polymorphism

서 론

생체는 문명의 발달과 더불어 많은 종류의 유해물질에 노출되며, 이 물질들 중 일부는 세포 내에 쉽게 축적되어 제거가 되지 않을 경우 독성을 나타내거나 세포를 손상시키는 것으로 알려져 있다. 생체는 이와 같은 외부유입물질(xenobiotics)에 대한 방어기전으로 물질을 제거하거나 해독하는 기전을 가지고 있는데, 이는 주로 외부유입물질을 인식하고 이를 수용성 형태로 변화시켜 쉽게 배설되도록 하는 외부유입물질 대사효소(xenobiotic-metabolizing enzyme)가 담당한다.¹⁾

외부유입물질 대사에 참여하는 효소반응은 두 단계로 나눌 수 있다. 발암물질을 포함한 대부분의 외부유입물질들은 일차적으로 cytochrome P450 (CYP)와 같은 제1상 효소에 의해 가수분해되거나 산화·환원되어 1차 대사산물로 활성화되며, 반응성이 높은 1차 대사산물은 glutathion-S-transferase (GST)와 같은 제2상 효소에 의해 메틸화(methylation), 글루쿠로노이드화(glucuronidation), 황산염화(sulfation), 축합(conjugation) 등의 과정을 거쳐 2차 대사산물로 해독된다. 만약 해독되지 못하는 경우, 생성된 친전자성 1차 대사산물은 세포내 DNA와 반응하여 부가체(DNA adducts)를 형성한다.²⁾ DNA 부가체에 의해 변형된 염기나 뉴클레오타이드가 수복효소에 의하여 제거되지 못하면 DNA 복제 과정을 거쳐 최종적으로는 유전자에 돌연변이가 일어나는데 이러한 과정을 다단계 발암과정에서는 발암개시단계라고 한다.³⁾ 따라서 대사효소에 의한 외부유입물질의 생물전환(biotransformation)은 환경 발암물질의 발암활성에 중요한 역할을 하며, DNA와 반응하는 최종 발암물질의 농도

는 활성화와 해독화 속도에 의해 결정된다.

외부유입물질의 생물전환은 상호개인간 커다란 차이가 있는 것으로 보고되어 있는데 이러한 차이가 나타나는 것은 외부유입물질을 활성화 혹은 해독화 하는 대사효소의 활성을 결정하는 유전자 다형성의 차이 때문인 것으로 생각하고 있다.⁴⁾ 이러한 유전자 다형성의 차이가 발암물질에 대한 개개인의 발암감수성과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다.⁵⁾ 최근까지 보고된 외부유입물질 대사효소의 유전자 다형성에 대한 연구 결과들에서 유전자 다형성이 인종과 민족에 따라 상당한 차이가 있는 것으로 조사되었고, 발암물질을 비롯한 외부유입물질의 유해작용에 대한 감수성에서도 인종과 민족에 따라 상당한 차이를 보일 것으로 생각하고 있다.⁶⁻²¹⁾ 따라서, 미국, 일본을 비롯한 선진국에서 관찰된 암 발생과 발암물질 대사효소의 유전자 다형성에 대한 연구 결과를 한국인에게 그대로 적용할 수는 없다. 따라서 한국인에서도 유전자 다형성을 조사하여 외부유입물질의 유해작용에 대한 감수성을 예측할 수 있는 자료를 확보하는 것이 중요하다. 또한 외부유해물질에 노출되었을 때 개개인의 감수성은 선천적 및 후천적 인자에 따라 서로 다르게 나타나며, 환경 인자와 개개인의 감수성 사이에 복잡한 상호작용이 일어나는 것으로 알려져 있다.²²⁾

본 연구에서는 건강한 한국인에서 외부유해물질의 활성화 및 해독화에 관여하는 CYP1A1, CYP2E1와 GSTM1의 유전자 다형성을 조사하였다. 상대적으로 외부유해물질에 대한 노출이 적어 대사효소의 유전자내에 환경에 의한 변화가 적을 것으로 생각되는 초등학생과 건강한 대학생을 대상으로 대사효소의 유전자 다형성을 조사하였다. 또

한 구강세정으로 수집한 구강탈락상피세포를 이용하여 유전자 다형성을 조사한 본 연구방법이 유전자 다형성에 대한 신뢰할 수 있는 결과를 주는 유용한 방법인지를 조사하였다.

대상 및 방법

1) 연구대상 및 재료

구강검사를 통해 건강하고 구강 내에 악성 병변이 없는 서울시내 초등학교 150명(10~14세)과 대학생 75명(20~29세)으로부터 구강세척을 통해 구강탈락 상피세포를 얻었다(Table 1). 양치 후 1시간이 경과한 모든 지원자에게 20 ml의 가글액(Listerine®, Warner-Lambert Consumer Healthcare, NJ, USA)으로 1분간 힘차게 구강세척을 하게 한 후 세척액을 용기에 모았다. 2,700 rpm에서 15분간 원심분리한 후, 침전물에 25 ml의 TE 완충액 [10 mM Tris (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)]을 가하여 현탁시키고 다시 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 세척한 구강탈락 상피세포를 DNA 추출에 사용하였다.

2) DNA 추출

구강탈락 상피세포에 700µl의 lysis buffer [10 mM Tris (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0), 0.1 M NaCl, 2% SDS]와 35µl의 proteinase K (20 mg/ml)를 가하여 세포를 잘 현탁시킨 후 58°C의 수조에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 8,000 rpm에서 2분간 원심분리를 하고 상등액을 새로운 미세 원심분리관으로 옮겼다. 같은 부피의 phenol-chloroform을 넣어 DNA를 추출하였다. 14,000 rpm에서 2분간 원심분리하고 같은 부피의 클로로포름

분간 원심분리 하였다. 상등액에 1/10배의 3 M NaOAc, 두 배 부피의 99% 에탄올을 가한 후 -20°C에서 2시간 동안 침전시켰다. 14,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후, 70% 에탄올로 세척하고 speed-vac system AES1010 (Savant Instruments Inc., NY, U.S.A.)에서 30분간 건조하였다. 건조한 DNA를 TE buffer에 용해시켜 260 nm와 280 nm에서 농도와 순도를 측정하였다.

3) 종합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)

PCR은 Gene-Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer, Cetus Corp., Norwalk, CT, USA)을 사용하여 수행하였다. PCR 반응 혼합물은 genomic DNA 1µg, upstream과 downstream primer를 각각 20 pmole, dNTP 1.25 mM, 5 U/µl의 *Taq* 종합효소 (Perkin-Elmer, Cetus Corp., Norwalk, CT, USA)를 가하여 반응 총량을 30µl로 하였다. Primer는 모두 TaKaRa Custom DNA사 제품(TaKaRa Shuzo Co., Ltd., Shiga, Japan)을 사용하였다.

4) *CYP1A1 MspI* (T→C transition) 다형성

MspI (PCR-restriction nuclease)에 대한 유전자 다형성은 Hayashi 등의 방법으로 조사하였다.²³⁾ Primer는 upstream 5'-CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT-3', downstream 5'-TAGGAGTCTTGTCTCATGCCT-3'을 사용하였다. PCR은 초기 denaturation을 95°C에서 4분간 1회 시행하고, denaturation을 95°C에서 1분, annealing을 65°C에서 1분, extension을 72°C에서 1분의 반응으로 30회 반복한 후, 최종 annealing과 extension을 각각 65°C에서 1분, 72°C에서 8분간 시행하였다. 반응산물을 *MspI* 제한효소로 37°C에서 2시간 동안 가수분해 한 다음 ethidium bromide (EtBr)가 든 1.8% agarose gel 상에서 전기영동하고 UV transilluminator에서 결과를 관찰하였다. 결과해석은 반응산물이 340 bp에서 나타나는 것을 동형접합체(homozygous wild genotype, ml/ml), 140 bp와 200 bp에서 나타나는 것을 돌연변이체 (homozygous variant genotype or mutant, m2/m2), 140 bp, 200 bp, 340 bp에서 나타나는 것을 이형접합체(heterozygote, m1/m2)라 판정하였다(Fig. 1A).

Table 1. Characteristics of population in the study group

	Male	Female	Total
Adolescence ¹⁾	57	93	150
Adult ²⁾	47	28	75
Total	104	121	225

¹⁾ < 18 years

²⁾ ≥ 18 years

을 넣고 10초 동안 교반한 후 14,000 rpm에서 4

5) *CYP1A1* ile/val 다형성(A→G transition)

CYP1A1 gene의 exon 7에서 A가 G로 염기가 전위(transition)되는 ile/val 다형성은 대립유전자-특이 중합효소 연쇄반응 증폭방법(allele-specific PCR amplification)을 통해 분석하였다.^{6,24)} Primer는 2A 5'-AAGACCTCCCAGCGGGCAAT-3' (wild type upstream), 2G 5'-AAGACCTCCCAGCGGGCAAC-3'

TCCACCCCTCT-3' (downstream)을 사용하였다. PCR 반응은 초기 denaturation을 94°C에서 1분 30초간 1회 시행하였고, 이후부터는 denaturation을 94°C에서 1분, annealing을 70°C에서 1분 30초, extension을 72°C에서 1분 30초간의 반응을 25회 반복하고, 최종 annealing과 extension을 각각 70°C에서 1분, 72°C에서 8분간 시행하였다. 반응산물을 EtBr이 든 1.8% agarose gel에 전기영동 한 후 UV trans-

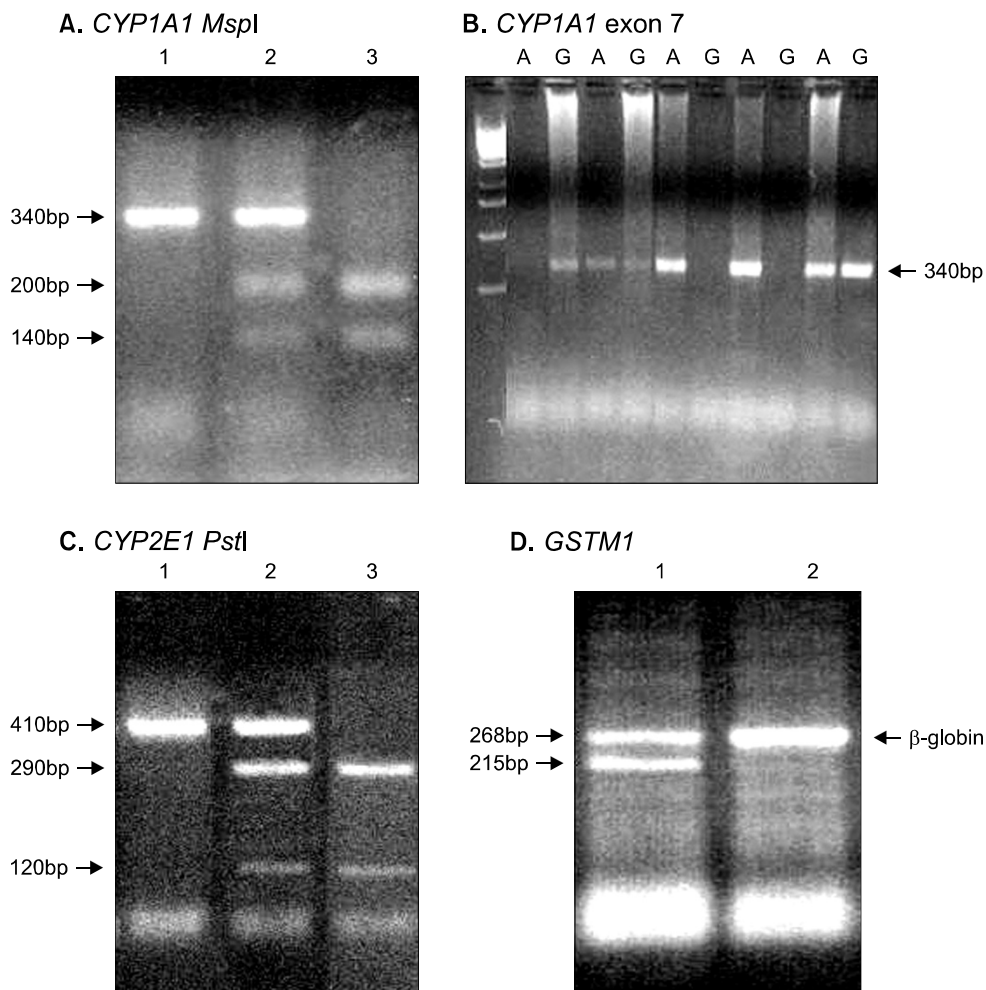


Fig. 1. Genotyping of the *CYP1A1*, *CYP2E1* and *GSTM1*. A. Lane 1, homozygous wild genotype, m1/m1; Lane 2, heterozygote, m1/m2; Lane 3, homozygous variant genotype, m2/m2. B. Lane A, homozygous wild genotype, ile/ile; Lane G, homozygous mutant genotype, val/val; heterozygote shows bands in both of Lane A and G. C. Lane 1, homozygous wild genotype, c1/c1; Lane 2, heterozygote, c1/c2; Lane 3, homozygous mutant genotype, c2/c2. D. Lane 1, wild type; Lane 2, null type. (mutant type upstream), C 5'-GAAAGGCTGGG- illuminator에서 관찰하였다. 전기영동 결과, 322

bp의 반응산물이 wild type primer (2A)로 증폭한 곳에서만 나타나면 A-대립유전자 동형접합체(homozygous wild genotype, ile/ile), mutant type primer (2G)로 증폭한 곳에서만 반응산물이 나타나면 G-대립유전자 동형접합체(homozygous mutant genotype, val/val), 양쪽 모두에서 반응산물이 보이면 이형접합체(heterozygote, ile/val)로 판독하였다(Fig. 1B).

6) *CYP2E1* *PstI* 다형성

CYP2E1 유전자의 5' flanking 부위에 *PstI* 절단 부위를 가지는 다형성으로서 중합효소 연쇄반응-제한효소(PCR-restriction nuclease) 가수분해 분석법을 사용하였다.²⁵⁾ 사용한 primer는 upstream strand 5'-TTCATTCTGTCCTTCTAACTGG-3', downstream strand 5'-CCAGTCGAGTCTACATTGTCA-3'를 사용하였다. PCR 반응은 초기 denaturation을 95°C에서 4분간 1회 시행하였고, 이후부터는 denaturation을 95°C에서 1분, annealing을 55°C에서 1분, extension을 72°C에서 1분의 반응을 25회 반복하고, 최종 annealing과 extension을 각각 55°C에서 1분, 72°C에서 7분간 시행하였다. 반응산물을 *PstI* 제한효소로 37°C에서 2시간 동안 가수분해 한 후 EtBr이 든 1.8% agarose gel에 전기영동하고 UV transilluminator에서 관찰하였다. 반응산물이 410 bp에서만 나타난 것을 동형접합체(homozygous wild genotype, c1/c1), 290 bp와 120 bp 위치에 나타난 것을 돌연변이체(homozygous mutant genotype, c2/c2)로, 410 bp, 290 bp, 120 bp에서 반응산물이 나타나는 것은 이형접합체(heterozygote, c1/c2)로 판독하였다(Fig. 1C).

7) *GSTM1* gene loci의 결손(deletion) 분석

*GSTM1*의 genotype은 반응산물의 유무로 분류되는데, primer로는 upstream strand 5'-GAAGGTG-GCCTCCTCCTTGG-3', downstream strand 5'-AAT-TCTGGATGTAGCAGAT-3'를 사용하였다.²⁶⁾ Null type을 확인하기 위해 internal standard로 항상 268 bp에서 DNA band를 나타내는 β -globin을 사용하였다. β -globin의 primer는 upstream strand 5'-CAACTTCATCCACGTTTACC-3', downstream strand 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'를 사용하였다. PCR 반응은 초기 denaturation을 94°C에서 4분

간 1회 시행하였고, 이후부터는 denaturation을 94°C에서 1분, annealing을 63°C에서, 1분, extension을 72°C에서 1분의 반응을 30회 반복하였다. Final annealing과 extension은 각각 63°C에서 1분, 70°C에서 10분간 시행하였다. 반응산물을 EtBr이 든 1.5% agarose gel에 전기영동하고 UV transilluminator에서 관찰하였다. 먼저 268 bp에서 β -globin의 band가 나타났는지를 확인한 후, 215 bp에서 반응산물이 나타난 경우를 wild type, 반응산물이 나타나지 않은 경우를 null type으로 판독하였다(Fig. 1D).

8) 통계처리

한국인에서 남성과 여성, 성인과 초등학생간의 각 유전자 다형성의 발현빈도를 비교하기 위하여 카이제곱 통계량(Chi-squared test) 또는 피셔의 정확검정법(Fisher's exact test) 및 유의확률(p-value)을 이용하여 통계 분석하였다.

결 과

1) *CYP1A1* *MspI* genotype (T→C transition)의 분포

건강한 한국인의 구강상피세포에서 *CYP1A1* *MspI* genotype의 분포를 조사한 결과, 이형접합체(m1/m2)의 발현빈도가 55.7%로 가장 높았고 동형접합체(m1/m1)와 돌연변이체(m2/m2)의 발현빈도는 각각 36.3%와 8.0%로 조사되었다(Fig. 2A). *CYP1A1* *MspI* genotype의 발현빈도를 성별(p=0.4033)과 연령($\chi^2=10.5427$, p=0.0051)에 따라 비교하였을 때, 여성과 초등학생에서 다른 유전자형에 비해 이형접합체가 높게 나타났다(Table 2).

2) *CYP1A1* exon 7 genotype (ile/val)의 분포

구강상피세포에서 *CYP1A1* exon 7 (ile/val) genotype의 분포는 이형접합체(ile/val)의 발현빈도가 74.8%로 높게 나타났으며, 동형접합체(ile/ile)와 돌연변이체(val/val)유전자형의 빈도는 각각 16.8%와 8.4%로 나타났다(Fig. 2B). 이 결과에서 성별($\chi^2=4.3563$, p=0.1133)과 연령($\chi^2=7.7891$, p=0.0204)에 따라 *CYP1A1* exon 7 genotype의 분포를 살펴본 결과, 초등학생보다 성인에서 이형접합체가 더 높

Table 2. Distribution of *CYP1A1* (*MspI*), *CYP1A1* exon7 (ile/val), *CYP2E1* (*PstI*), *GSTM1* genotypes in Koreans

Genotype	<i>n</i> ¹⁾	Sex		Age		
		Male	Female	Adolescence ²⁾	Adults ³⁾	
<i>CYP1A1</i> (<i>MspI</i>)	m1/m1	41 (36.3) ⁴⁾	22 (41.5)	19 (31.7)	15 (23.4)	26 (53.1)
	m1/m2	63 (55.7)	26 (49.1)	37 (61.7)	43 (67.2)	20 (40.8)
	m2/m2	9 (8.0)	5 (9.4)	4 (6.7)	6 (9.4)	3 (6.1)
		p=0.4033 ⁵⁾		χ ² =10.5427, p=0.0051 ⁶⁾		
<i>CYP1A1</i> (exon 7)	ile/ile	22 (16.8)	6 (10.3)	16 (21.9)	16 (20.5)	6 (11.3)
	ile/val	98 (74.8)	45 (77.6)	53 (72.6)	52 (66.7)	46 (86.8)
	val/val	11 (8.4)	7 (12.1)	4 (5.5)	10 (12.8)	1 (1.9)
		χ ² =4.3563, p=0.1133 ⁶⁾		χ ² =7.7891, p=0.0204 ⁶⁾		
<i>CYP2E1</i> (<i>PstI</i>)	c1/c1	56 (53.3)	32 (61.5)	24 (45.3)	22 (43.1)	34 (63.0)
	c1/c2	46 (43.8)	19 (36.5)	27 (50.9)	26 (51.0)	20 (37.0)
	c2/c2	3 (2.9)	1 (1.9)	2 (3.8)	3 (5.9)	0 (0)
		p=0.2722 ⁵⁾		p=0.0193 ⁵⁾		
<i>GSTM1</i>	wild	62 (39.0)	35 (45.5)	27 (32.9)	34 (38.2)	28 (40.0)
	null	97 (61.0)	42 (54.5)	55 (67.1)	55 (61.8)	42 (60.0)
		χ ² =2.6199, p=0.1055 ⁶⁾		χ ² =0.0532, p=0.8175 ⁶⁾		

¹⁾Numbers of subjects.

²⁾< 18 years

³⁾≥ 18 years

⁴⁾Numbers in parentheses, percentages.

⁵⁾Fisher's exact test

⁶⁾Chi-squared test

은 빈도로 관찰되었다(Table 2).

3) *CYP2E1 PstI* genotype 및 allele의 분포

CYP2E1 PstI genotype의 분포는 동형접합체(c1/c1)가 53.3%, 이형접합체(c1/c2)가 43.8%, 돌연변이체(c2/c2)는 2.9%로 나타났다(Fig. 2C). 성별(p=0.2722)과 연령(p=0.0193)에 따라 *CYP2E1 PstI* 다형성을 비교하여 본 결과 남성과 성인에서 동형접합체가 이형접합체보다 더 높은 빈도로 나타났다(Table 2). Allele의 빈도를 조사한 결과, wild type (c1)은 75.7%, mutant-type (c2)은 24.3%로 관찰되었다.

4) *GSTM1* genotype의 분포

*GSTM1*의 genotype의 분포는 wild type이 39.0%, null type이 61.0%로 나타났다(Fig. 2D). 이 결과를

성별(χ²=2.6199, p=0.1055)과 연령(χ²=0.0532, p=0.8175)에 따라 비교해 보았을 때 여성과 초등학교에서 wild type이 null type에 비해 현저히 높게 관찰되었고 남성과 성인에서도 wild type이 더 높은 비율로 관찰되었다(Table 2).

고 찰

생체변형 효소들은 외부유입물질의 대사에 중요한 역할을 하며, 사람에서 생체변형 효소들의 수준과 활성은 상호 개체간 차이를 나타내는 것으로 알려져 있다. 이들 생체변형 효소의 여러 가지 다형성이 보고되어 있으며, 유전자 다형성에 따라 효소의 발현이나 기능이 변화되어 발암물질을 포함한 외부유입물질의 활성 및 해독을 증가 또는 감소시킬 수 있다. 따라서, 생체변형 효소의

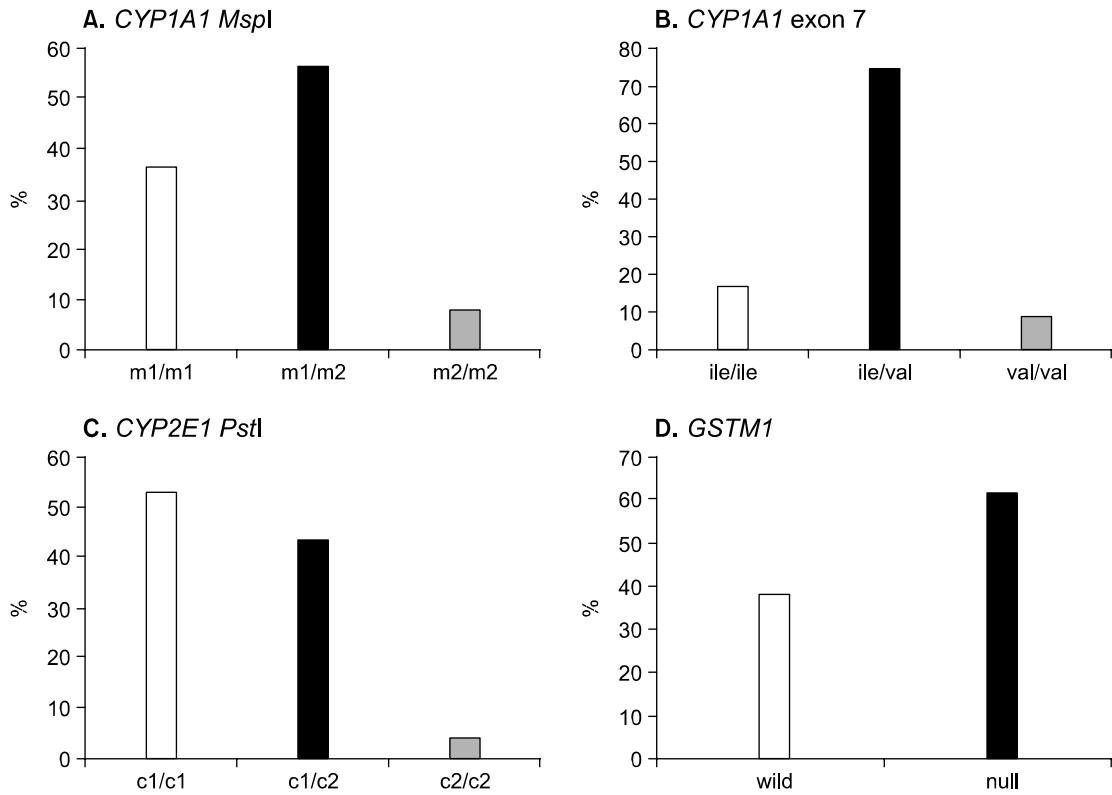


Fig. 2. Distribution of *CYP1A1*, *CYP2E1* and *GSTM1* genotypes in healthy Koreans. A. m1/m1, homozygous wild genotype; m1/m2, heterozygote; m2/m2, homozygous variant genotype. B. ile/ile, homozygous wild genotype; ile/val, heterozygote; val/val, mutant genotype. C. c1/c1, homozygous wild genotype; c1/c2, heterozygote; c2/c2, homozygous mutant genotype. D. wild, wild type with band of 215bp; null, null type.

유전자 다형성은 암에 대한 감수성과 밀접한 관련이 있는 것으로 생각된다.

Cytochrome P450 (CYP)는 화학발암물질을 배설 형태로 전환하는 정상적인 과정 동안에 DNA를 손상시키는 중간산물을 생성할 수 있다. Poly-aromatic hydrocarbons를 대사하는 CYP1A1은 정상적으로 유도되는 효소로서 사람의 간에서 20배, 폐에서 50배까지 유도될 수 있는데 이러한 유도능은 사람에 따라서 다르며, 폐암에 대한 위험도와 관련이 있는 것으로 알려져 있다.²⁷⁾ CYP2E1은 에탄올에 의해 유도되며 *N*-nitrosamines의 활성화에 중요한 역할을 하는 효소이다. 제 2상 효소인 GST는 친전자성 물질과 친핵성인 환원된 glutathione간에 축합을 촉매하는 효소로서 DNA에 결합하는 친전자성 물질을 해독한다. GSTM1의 유

전자에 결손이 일어나면 해독능이 결핍되어 암에 대한 감수성이 증가하는 것으로 생각하고 있다.

신진 각국에서는 화학물질에 의한 암 발생 시, 외부유입물질 대사효소의 발현양이 개인별로 차이를 보이는 것에 착안하여 개인별 대사능과 발암감수성에 대한 상관관계를 조사하고자 하는 연구가 유전자 수준에서 활발히 진행되었다. 그 결과 발암물질 대사능과 발암감수성간에 높은 상관관계가 있음이 보고되었으며,^{9~14)} 발암감수성과 밀접한 관련이 있는 대사효소의 유전형 결정법을 찾기 위한 연구가 진행되어 왔다. 그러나, 각 인종이나 민족에 따라 물질 대사능이 서로 다르게 나타나며, 발암 감수성 또한 서로 다르게 나타나고 있어 이들의 외부유입물질의 유전자 다형성 결과를 한국인의 발암물질 대사효소의 유전자 다

형성에 그대로 적용시킬 수는 없다. 뿐만 아니라, 이들 발암물질 대사효소의 유전자 다형성은 발암물질에 노출된 시간과 양, 그리고 성별에 따라 다형성에 차이가 있는 것으로 알려져 있다.²⁷⁾

따라서, 본 연구에서는 발암물질에 노출된 시간과 양이 상대적으로 적을 것으로 생각되는 초등학생 150명과 건강한 대학생 75명에서 구강 세정으로 구강탈락 상피세포를 수집하고, 구강탈락 상피세포로부터 DNA를 분리하여 발암물질 대사효소인 CYP1A1, CYP2E1과 GSTM1에 대한 유전자 다형성을 조사하였다. 본 연구를 통해 건강한 한국인의 유전자 다형성에 대한 자료를 확보함으로써 발암물질에 노출정도 및 시간에 따른 유전자 다형성의 변화와 발암감수성간의 상관성을 조사하는데 도움이 될 것으로 생각한다.

CYP1A1 MspI genotype의 분포를 조사한 결과, 전체적으로 이형접합체(m1/m2)가 가장 높은 빈도로 나타났으며, 여성과 초등학생에서 이형접합체의 빈도가 61.7%와 67.2%로 상대적으로 높게 관찰되었다. CYP1A1 MspI genotype은 핀란드,⁶⁾ 스웨덴,⁷⁾ 노르웨이⁸⁾ 같은 북유럽인, 코카시안⁹⁾과 일본인¹⁰⁾에서는 동형접합체가 더 높은 빈도로 나타나는 것으로 보고되어 있는데 한국인에서는 이형접합체가 더 높은 빈도로 관찰되었다. CYP1A1 ile/val genotype의 분포는 성별과 연령에 관계없이 이형접합체(ile/val)가 매우 높은 빈도로 나타났다. 코카시안¹⁴⁾이나 유럽인^{7,12)}에서는 ile/val genotype의 빈도(0.9~1.8%)가 낮고 동형접합체의 빈도(84.3~93.6%)가 높은 것으로 보고되어 있으며, 같은 동양권인 일본인¹⁵⁾에서도 동형접합체(65.1%)가 이형접합체(30.2%)보다 높은 빈도로 관찰되었다. 그러나, 한국인에서는 이형접합체의 빈도(74.8%)가 더 높게 나타났다. CYP2E1 PstI genotype은 동형접합체(c1/c1)와 이형접합체(c1/c2)가 53.3%와 43.8%로 비슷한 빈도로 관찰되었으며, 남성과 성인에서는 동형접합체가 더 높은 빈도로 관찰되었고, allele의 빈도는 wild type (c1)이 75.7%, mutant (c2)가 24.3%로 관찰되었다. 이러한 genotype과 allele의 빈도는 유럽인¹⁶⁾이나 미국인¹⁷⁾보다 중국인^{18,19)}과 일본인²⁰⁾에서 돌연변이체가 더 많이 나타나는 것으로 보고되어 있는데 같은 동남아시아권인 한국인에서도 비슷한 양상을 보였다. 한국인에서 GSTM1

genotype의 분포는 null type이 61.0%로 wild type보다 많은 것으로 나타났다. GSTM1 다형성은 인종에 따라 다양한 분포를 보이는데 GSTM1의 null type은 인도인²⁸⁾에서 낮은 수치를 보였고 일본인¹⁰⁾에 비해 한국인과 대만인^{19,28)}에서 다소 높게 나타났다. 특히, CYP의 유전자 다형성에서 초등학생과 성인간에 유의적인 차이가 있는 것으로 관찰되었는데, 외부 환경이나 발암물질에 노출된 시간이 많아짐에 따라 유전자 다형성에 변화가 생길 수 있음을 보여주는 결과로 생각된다.

이상의 결과로부터 한국인의 유전자 다형성이 북유럽인, 미국인, 코카시안과 차이가 있으며, 같은 아시아권인 일본인이나 중국인과도 차이가 있음을 알 수 있다.

지금까지는 유전적 다형성 조사에 필요한 DNA를 얻기 위해 주로 혈액에서 분리한 백혈구²⁹⁾나 조직³⁰⁾을 이용하였는데, 이 방법은 다량의 DNA를 얻을 수는 있지만, 주사 바늘을 혈관에 찔러야 하고, 불편할 뿐만 아니라 혈액 매개 전염원에 노출될 위험이 있었다. 또한 지원자나 환자가 검체를 직접 획득할 수 없고 의사나 간호사의 도움을 받아야만 가능한 제한점이 있다. 그러나 본 연구에서 사용한, 구강세정 시 탈락되는 구강탈락 상피세포로부터 DNA를 분리하여 발암물질 대사효소의 유전적 다형성을 조사하는 방법은 검체의 수집과 보관이 간단하여 지원자가 스스로 시료를 모을 수 있는 장점을 가지고 있으며, 혈액¹¹⁾을 사용한 연구결과와 일치된 결과를 보이는 것으로 확인되어 유전자 다형성 연구에 매우 유용할 것으로 생각된다.

결 론

한국인 초등학생 150명과 대학생 75명으로부터 구강세정으로 얻은 구강상피세포에서 외부유입물질 대사효소의 유전자 다형성 분포를 조사한 결과, CYP1A1 MspI genotype의 분포는 동형접합체(m1/m1)가 36.3%, 이형접합체(m1/m2)가 55.7%, 돌연변이체(m2/m2)가 8.0%로 나타났으며, CYP1A1 exon 7 (ile/val) genotype의 분포는 이형접합체(ile/val)가 74.8%, 동형접합체(ile/ile)와 돌연변이체(val/val)는 각각 16.8%와 8.4%로 나타났다. CYP1A1

MspI genotype은 서양인과 달리 한국인에서는 이형접합체가 더 많으며, *CYP1A1* exon 7 다형성도 한국인에서는 이형접합체가 높게 나타났는데 서양인은 물론 같은 동양권인 일본인과의 차이가 있었다. *CYP2E1 PstI* genotype의 분포는 동형접합체(c1/c1)가 53.3%, 이형접합체(c1/c2)가 43.8%, 돌연변이체(c2/c2)는 2.9%로 나타났으며, allele 빈도는 wild type (c1)이 75.7%, mutant (c2)가 24.3%로 나타났고, *GSTM1* genotype 분포는 wild type이 39.0%, null type이 61.0%로 나타났다. *CYP2E1 PstI* 다형성은 미국인이나 유럽인에 비해 돌연변이체가 높게 나타났으나 동남아시아인들과 유사한 분포를 보였으며, *GSTM1* 다형성은 외국인에 비해 null type이 다소 많은 것으로 나타났다. 따라서 한국인에서 *CYP1A1*, *CYP2E1* 및 *GSTM1* 다형성은 다른 인종이나 민족과 차이가 있으며, 구강 탈락상피세포를 이용한 유전자 다형성 조사를 통해 신뢰할 수 있는 연구결과를 얻을 수 있음을 확인하였다.

감사의 글

이 논문은 2000년도 연세대학교 학술연구비의 지원에 의하여 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- Lang M, Pelkonen O. Metabolism of xenobiotics and chemical carcinogenesis. *IARC Sci Publ* 1999; 148: 13-22.
- Perera FP, Weinstein IB. Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *Carcinogenesis* 2000; 21: 517-525.
- Fryer AA, Jones PW. Interactions between detoxifying enzyme polymorphisms and susceptibility to cancer. *IARC Sci Publ* 1999; 148: 303-322.
- Wormhoudt LW, Commandeur JNM, Vermeulen NPE. Genetic polymorphisms of human *N*-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione *S*-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: Relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Crit Rev Toxicol* 1999; 29: 59-124.
- Taningher M, Malacarne D, Izzotti A, Ugolini D, Parodi S. Drug metabolism polymorphisms as modulators of cancer susceptibility. *Mutat Res* 1999; 436: 227-261.
- Hivonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Karjalainen A, Antilla S, Vainio H. Point mutational *MspI* and Ile-Val polymorphisms closely linked in the *CYP1A1* gene: lack of association with susceptibility to lung cancer in a Finnish study population. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1992; 1: 485-489.
- Alexandrie A-K, Sundberg MI, Seidegard J, Tornling G, Rannug A. Genetic susceptibility to lung cancer with special emphasis on *CYP1A1* and *GSTM1*: a study on host factors in relation to age at onset, gender and histological cancer types. *Carcinogenesis* 1994; 15: 1785-1790.
- Tefre T, Ryberg D, Haugen A, Nebert DW, Skaug V, Brogger A, Borresen AL. Human *CYP1A1* (cytochrome P₁-450) gene: Lack of association between the *MspI* restriction fragment length polymorphism and incidence of lung cancer in a Norwegian population. *Pharmacogenetics* 1991; 1: 20-25.
- Sivaraman L, Leatham MP, Yee J, Wilkens LR, Lau AF, Marchand LL. *CYP1A1* genetic polymorphisms and in situ colorectal cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 3692-3695.
- Kihara M, Kihara M, Noda K. Risk of smoking for squamous and small cell carcinomas of the lung modulated by combinations of *CYP1A1* and *GSTM1* gene polymorphisms in a Japanese population. *Carcinogenesis* 1995; 16: 2331-2336.
- Tanimoto K, Hayashi S-I, Yoshiga K, Ichikawa T. Polymorphisms of the *CYP1A1* and *GSTM1* gene involved in oral squamous cell carcinoma in association with a cigarette dose. *Oral Oncol* 1999; 35: 191-196.
- Hong Y-S, Chang J-H, Kwon O-J, Ham Y-A, Choi J-H. Polymorphism of the *CYP1A1* and glutathione-*S*-transferase genes in Korean lung cancer patients. *Experi Mole Med* 1998; 30: 192-198.
- Drakoulis ND, Cascorbi I, Brockmoller CR, Roots GI. Polymorphisms in the human *CYP1A1* gene as susceptibility factors for lung cancer: exon-7 mutation (4889 A to G), and a T to C mutation in the 3'-flanking region. *Clin Invest* 1994; 72: 240-248.
- Hamada GS, Sugimura H, Suzuki I, Nagura K, Kiyokawa E, Iwase I, Tanaka M, Takahashi T, Watanabe S, Kino I, Tsugane S. The heme-binding region polymorphism of cytochrome P4501A1 (*Cyp1A1*), rather than the *RsaI* polymorphism of *IIE1* (*CypIIE1*), is associated with lung cancer in Rio de Janeiro. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1995; 4: 63-67.

- 15) Ambrosone CB, Freudenheim JL, Graham S, Marshall JR, Vena JE, Brasure JR, Laughlin R, Nemoto T, Michalek AM, Harrington A, Ford TD, Shields P. Cytochrome P4501A1 and glutathione S-transferases (M1) genetic polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk. *Cancer Res* 1995; 55: 3483-3485.
- 16) Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Watanabe J, Hayashi S-I. The CYP1A1 gene and cancer susceptibility. *Crit Rev Oncol Hematol* 1993; 14: 77-87.
- 17) Persson I, Johansson I, Bergling H, Dahl M-L, Seidegard J, Rylander R, Rannug A, Hogberg J, Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphism of cytochrome P4502E1 in a Swedish population: relationship to incidence of lung cancer. *FEBS Lett* 1993; 319: 207-211.
- 18) Stephens EA, Taylor JA, Kaplan N, Yang CH, Hsieh LL, Lucier GW, Bell DA. Ethnic variation in the CYP2E1 gene, polymorphism analysis of 695 African-Americans, European Americans and Taiwanese. *Pharmacogenetics* 1994; 4: 185-192.
- 19) Chao Y-C, Young T-H, Chang W-K, Tang H-S, Hsu C-T. An investigation of whether polymorphisms of cytochrome P4502E1 are genetic markers of susceptibility to alcoholic end-stage organ damage in Chinese populations. *Hepatology* 1995; 22: 1409-1414.
- 20) Yu M-W, Gladek-Yarborough A, Chiamprasert S, Santella RM, Liaw Y-F, Chen CJ. Cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase M1 polymorphisms and susceptibility to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1995; 109: 1266-1273.
- 21) Watanabe J, Hayashi S, Nakachi K, Imai K, Suda Y, Sekine T, Kawajiri K. Pst I and Rsa I RFLPs in complete linkage disequilibrium at the CYP2E gene. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 7194.
- 22) Autrup H. Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutat Res* 2000; 464: 65-76.
- 23) Hayashi S, Watanabe J, Nakachi K, Kawajiri K. Genetic linkage of lung cancer-associated MspI polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P4501A1 gene. *J Biochem* 1991; 110: 407-411.
- 24) Hayashi S, Watanabe J, Nakachi K, Kawajiri K. PCR detection of an A/G polymorphism within PstI of the CYP1A1 gene. *Nucleic Acids Res* 1991; 17: 4797.
- 25) Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K. Genetic polymorphisms in the 5' flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450II E1 gene. *J Biochem* 1991; 110: 559-565.
- 26) Daekin M, Elder J, Hendrickse C, Peckham D, Baldwin D, Pantin C, Wild N, Leopard P, Bell DA, Jones P, Duncan H, Brannigan K, Alldersea J, Fryer AA, Strange RC. Glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cancer: studies of interactions with GSTM1 in lung, oral, gastric and colorectal cancers. *Carcinogenesis* 1996; 17: 881-884.
- 27) Mollerup S, Ryberg D, Hewer A, Phillips DH, Haugen A. Sex differenced in lung CYP1A1 expression and DNA adduct levels among lung cancer patients. *Cancer Res* 1999; 59: 3317-3320.
- 28) Kouri RE, McKinney CE, Slomiany DJ, Snodgrass DR, Wray NP, McLemore TL. Positive correlation between high aryl hydroxylase activity and primary lung cancer as analyzed in cryopreserved lymphocytes. *Cancer Res* 1982; 45: 5030-5037.
- 29) Hung HS, Chuang J, Chien YC, Chern HD, Chiang CP, Kuo YS, Hildesheim A, Chen CJ. Genetic polymorphisms of CYP2E1, GSTM1, and GSTT1; Environmental factors and risk of oral cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1997; 6: 901-905.
- 30) Lazarus P, Sheikh SN, Ren Q, Schantz SP, Stern JC, Richie J, Jr., Park JY. p53, but not p16 mutations in oral squamous cell carcinoma are associated with specific CYP1A1 and GSTM1 polymorphic genotypes and patient tobacco use. *Carcinogenesis* 1998; 19: 509-514.