

## 항산화 및 해독화 효소의 발현 유도를 통한 화학암예방

발암기전 및 분자 암예방 국가지정연구소, 서울대학교 약학대학

나 혜 경 · 이 정 상 · 서 영 준

### Role of Antioxidant/Phase II Enzyme Induction in Cancer Chemoprevention

Hye-Kyung Na, Jeong-Sang Lee and Young-Joon Surh

*National Research Laboratory of Molecular Carcinogenesis and Chemoprevention,  
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea*

One of the rational and effective strategies for chemoprevention is the blockade of DNA damage caused by carcinogenic insult. This can be achieved either by reducing the formation of reactive carcinogenic species or stimulating their detoxification. A wide spectrum of xenobiotic metabolizing enzymes catalyze both phase I (oxidation and reduction) and phase II biotransformation (conjugation) reactions involved in carcinogen activation and/or detoxification. Several antioxidant-response element (ARE)-regulated gene products, such as glutathione *S*-transferase, NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, UDP-glucuronosyltransferase, glutamate cysteine ligase, and heme oxygenase-1, are known to mediate detoxification and/or to exert antioxidant functions thereby protecting cells from genotoxic damage. The transcription of ARE-driven genes is regulated, at least in part, by nuclear transcription factor erythroid 2 p45-related factor 2 (Nrf2), which is sequestered in cytoplasm by Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1). Exposure of cells to ARE inducers results in the dissociation of Nrf2 from Keap1 and facilitates translocation of Nrf2 to the nucleus, where it heterodimerizes with small Maf protein, and binds to ARE, eventually resulting in the transcriptional activation of Nrf2-regulated genes. The Nrf2-Keap1-ARE signaling pathway can be modulated by several upstream kinases including phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase C, and mitogen-activated protein kinases. Selected Nrf2-Keap1-ARE activators, such as oltipraz, sulforaphane, 6-methylsulphonylhexyl isothiocyanate, curcumin, caffeic acid phenethyl ester, diallyl-trisulfide, etc., are potential chemopreventive agents. This mini-review will focus on a chemopreventive strategy directed towards protection of DNA and other important cellular molecules by inducing *de novo* synthesis of phase II detoxifying or antioxidant genes via the Nrf2-ARE core signaling pathway.

**Key Words:** Chemoprevention, Antioxidant-response element (ARE), Electrophile-response element (EpRE), Nuclear transcription factor erythroid 2 p45-related factor 2 (Nrf2), Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), Phase II detoxifying or antioxidant enzymes

## 서 론

지난 이삼십여 년 동안 암을 유발하는 발암유전자(oncogene)와 종양억제 유전자(tumor suppressor gene)들이 속속 발견되고 그 기능이 밝혀지면서, 인체암의 발생 및 진행과정을 분자수준에서 이해하는데 일대 변혁이 일게 되었다. 그럼에도 불구하고 암은 여전히 완치가 어려운 질병으로 인식되고 있다. 세계보건기구의 최근 통계자료에 의하면 전세계적으로 연간 약 1천만 명 이상의 새로운 암환자가 발생하는 것으로 알려져 있다. 우리나라에서도 이미 암은 전체성인 사망요인 중 으뜸을 차지하고 있다.

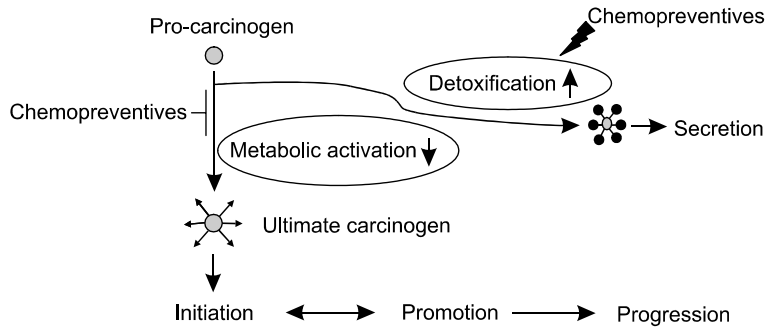
일찍이 Richard Doll과 Richard Peto는 인체암의 약 35% 정도가 우리가 섭취하는 음식과 관계있다고 보고한 바 있다.<sup>1)</sup> 조리과정 중 또는 식품의 대사과정 중 유래한 몇몇 발암(의심)물질들을 실험동물에 투여 시 종양이 발생되고, 암세포의 증식 및 전이가 촉진되기도 하나, 우리가 섭취하는 음식에는 역으로 암의 발생이나 암화과정을 억제할 수 있는 성분들도 다수 포함되어 있다. 여러 임상, 역학, 기초 연구를 통해 과일과 채소의 섭취가 특정 암의 발생률에 역비례 관계가 있다는 증거가 계속 축적되고 있다.

우리가 일상적으로 섭취하는 야채나 과일 중에는 항산화 비타민 외에, 식물유래 화학물질인 “파이토케미칼” (Phytochemical; ‘phyto-’라는 접두사는 희랍어로 식물을 의미하는 단어에서 유래)들이 다수 함유되어 있다. 파이토케미칼들 중에는 비록 영양적인 가치는 적더라도 오히려 암예방 효과는 기존의 항산화 비타민들 보다 탁월한 것이 다수 있다. 최근 식품에 들어있는 파이토케미

칼이나 기타 독성이 없는 화학물질들 또는 이들 혼합체들을 이용하여 정상세포의 암화과정을 억제, 지연 또는 역전시킴으로써 보다 적극적으로 암에 대한 위험을 줄이려는 “화학적 암예방(cancer chemoprevention)”이 많은 관심을 끌고 있다.<sup>2~5)</sup> 안전한 화학물질을 사용하여 정상세포가 암세포로 전환되지 못하도록 사전에 방지하는 화학적 암예방은 암정복을 위해 상당히 효과적인 전략으로 대두되고 있다.

다단계 발암과정은 크게 개시(initiation), 촉진(promotion) 그리고 진행 (progression)과정으로 구분된다. 복잡한 암화과정을 지나치게 단순화시킨 것이라 생각할 수도 있겠지만, 암예방을 위한 전략 수립에는 상당히 유용하다. 일찍이 미네소타대학의 Lee Wattenberg박사는 화학적 암예방 물질들을 그 작용단계에 따라 차단물질 (blocking agents) 과 억제물질(suppressing agents) 두 종류로 분류하였다.<sup>6,7)</sup> 차단물질은 발암물질이 표적세포에 도달하는 것을 원천적으로 봉쇄하거나, 대사활성화(metabolic activation)를 거쳐 표적세포의 DNA를 공격하여 구조적 손상과 돌연변이를 유발하는 것을 억제하는 능력을 가지며, 한편 억제물질은 이미 개시화된 세포가 촉진 및 진행단계를 거쳐 양성암과 악성암으로 각각 발전되어 가는 과정을 저해하는 화합물로 정의하였다.

지금까지 확인된 식품 중의 주요 암예방 성분들은 위에서 언급한 암의 개시, 촉진, 진행의 다단계 과정 중 특정 단계에서 발암억제 기능을 수행하는 것으로 밝혀졌다. 본 총설에서는 발암물질의 대사활성 및 해독화에 있어 중요한 역할을 하는 항산화/해독화 효소들의 발현 조절기전을 알아보고, 이들 효소들의 발현 유도를 통한 파이토케미칼들의 암예방 효과를 살피고자 한다.



**Fig. 1.** Stimulation of detoxification or inhibition of metabolic activation of pro-carcinogens as an effective strategy for cancer chemoprevention.

### 발암물질의 대사활성화 및 해독화

다단계 발암과정은 통상 개시(initiation), 촉진(promotion) 그리고 진행(progression)과정으로 구분한다(Fig. 1). 암 개시는 발암물질이 DNA와 반응하여 유전자 변이를 초래하는 비가역적 과정이다. 화학발암제의 경우 대부분 그 자체로는 발암성을 나타내지 못하나 cytochrome P450 (CYP 효소) 등의 산화효소들이 촉매하는 생체대사 과정을 거쳐 친전자성 반응물질로 활성화된다. 이들 친전자성 대사산물들은 생체내에 존재하는 친핵성 물질인 DNA와 반응하여, 부가물(DNA adduct)를 형성함으로써 돌연변이 및 유전독성을 유발할 수 있다. 이로 인한 DNA 손상이 수복되지 않으면 DNA 복제(replication) 과정 중에 돌연변이가 일어나고 암개시화 세포(initiated cell)가 생성된다. 암개시화된 세포는 이후 반복적으로 종양 촉진제에 노출되지 않는 한 암세포로 전환될 수 있는 잠재력만을 가지고 있게 된다.

친전자성을 갖는 발암물질이나 그 대사체들에 대한 보호 기전으로 우리 몸은 microsomal epoxide hydrolase, glutathione S-transferase (GST), NAD(P)H: quinone oxidoreductase (NQO1), glutamate cysteine ligase (GCL), UDP-glucuronosyltransferase (UGT), heme oxygenase-1 (HO-1)과 같은 Phase II 해독화 효소들의 발현을 유도한다.<sup>8~12)</sup> 이들 효소는 간 조직을 비롯한 체내 여러 조직에 존재하는 중요한 약물대사 효소로서, 발암원을 포함한 외인성 독성 화학물질들을 해독화한다. Phase II 해독화 효소 유도는 스트레스에 대한 중요한 방어반응으로, 친

전자성 독성물질들이나 그 대사산물이 세포 내의 DNA 손상을 유발하기 전에 이들을 세포로부터 제거함으로써 발암개시과정을 차단하는데 중요한 역할을 담당한다. 역으로 Phase II 해독화 반응에 관련된 효소들의 불완전한 발현은 각종 암에 대한 위험성을 증가시킨다. 아울러 대표적 Phase II 해독화 효소인 GST의 특정 동종효소의 유전자 돌연변이가 각종 암에 대한 risk를 높이는 것으로 알려져 있다. N-acetyltransferase의 경우도 그 유전적 단일염기 다형성이 대장암 및 방광암의 개체간 감수성 차이와 관련이 있다는 임상적, 역학적 증거들이 축적되어 있다.

최근 보고에 따르면, 몇몇 식이성분들은 세포방어(cytoprotective) 기능을 강화시키며, 이로 인해 외부 독성물질과 발암물질에 의해 유도된 세포 손상을 막음으로써 암의 개시를 막는다는 연구 결과가 있다.<sup>13~15)</sup> 예를 들어, 녹차의 주 항산화 성분으로 알려진 EGCG와 토마토의 붉은 색소인 라이코펜은 세포내에 축적되는 활성산소종을 소거하여 세포내 DNA 손상을 막는다. EGCG를 포함한 녹차의 폴리페놀계 화합물들의 활성산소 제거능력은 항산화 비타민들보다 훨씬 탁월한 것으로, 흡연 후 녹차를 마신 사람들이 흡연 후 커피를 마시는 사람들에 비해 염색체 손상을 훨씬 적게 받는 것으로 나타났다. 토마토를 재료로 한 음식을 먹는 경우 전립선암을 비롯한 유방암에 걸릴 위험도가 덜한 것으로 판명되었다. 고추의 매운 성분인 캡사이신은 위암 유발물질인 나이트로소아민의 대사활성을 억제하며, 마늘의 아릴설파이드, 양배추의 인돌카비놀과 브로커리의 설포라판, 호두의 엘라직산 등은 발암물질의 대사활성화

를 방지하거나 또는 이미 형성된 활성물질의 해독화를 촉진함으로써 암의 개시화를 억제하는 것으로 알려졌다(Fig. 1).

항산화/해독화 효소의 발현조절 기전

1) 전사인자 Nrf2

발암원을 포함한 외인성 독성 화학물질들은 GST와 NQO1과 같은 Phase II 효소들에 의해 해독화 된다. 이 해독화 효소 시스템은 산화적 스트레스를 유발할 수 있거나 친전자성을 갖는 독성 물질들이 세포 내에서 DNA에 손상을 주기 전에 이들을 세포로부터 제거하는 역할을 한다. 항산화 물질은 활성산소종을 제거할 뿐만 아니라 Phase II 해독화 효소들을 포함한 기타 생체방어 단백질들의 발현을 유도한다. NQO1, HO-1, 및 GST와 같은 항산화/해독화 효소들의 유전자 5' 부분(flanking region)에는 antioxidant-responsive element (ARE)이 포함되어 있으며, Nrf, Jun, Fos, Fra, Maf 그리고 Ah receptor를 포함한 많은 basic leucine zipper (bZIP) 전사 인자들이 ARE에 결합하여 항산화 및 해독화 효소를 비롯한 다양한 stress-response 단백질들의 발현을 조절한다.<sup>16,17)</sup>

bZIP family 전사 인자 중, 특히 nuclear factor erythroid 2 p45 -related factors (Nrf2)는 small Maf family와 heterodimer를 형성하여 ARE sequence에 결합함으로써 생체방어를 위한 유전자 발현을 개시한다(Fig. 2).<sup>18)</sup> 모든 항산화/해독화 효소의 발현이 ARE 유도물질에 의해 유도되진 않지만, ARE consensus sequence가 항산화/해독화 효소 발현에 있어 필수적 인자임이 보고되었다.<sup>19)</sup> 항산화/해독화 효소의 발현이 ARE를 매개로 한 Nrf2의 활성화를 통해 유도됨은 이 전사인자를 인위적으로 knockout 시킨 *Nrf2*-null mice를 이용한 연구에서 잘 설명되고 있다. Nrf2 전사인자가 발현되지 않는 *Nrf2*-null mice는 GCL, GST, HO-1, NQO1 그리고 UGT와 같은 유전자들의 발현이 억제됨으로써 산화적 스트레스와 발암물질에 대한 방어능력이 현저히 감소되어 암화과정에 대한 감수성이 증가함이 관찰되었다.<sup>20,21)</sup> 즉 *Nrf2*-null mice에 대표적인 발암원인 벤조파이렌(benzo[a]pyrene)을 처리하였을 때 전위(forestomach)에 많은 수의 종양이 생성되었으며, 이러한 현상은 Phase II 해독화 효소를 유도하는 대표적 화학적 암예방제인 oltipraz 투여에 의해서도 억제되지 못하였다.<sup>22)</sup> *Nrf2*-null mice는 아플라톡신(aflatoxin B<sub>1</sub>)과 같은 발암물질

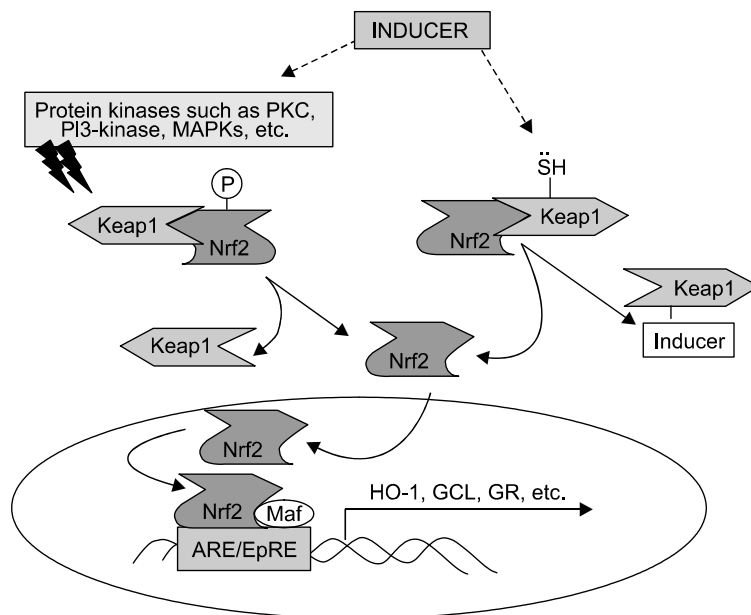


Fig. 2. Signaling pathways involved in the ARE-mediated Phase II antioxidant/detoxifying gene induction through activation of Nrf2.

을 해독화시키는 능력 또한 결여되어 있으며, 아세트아미노펜에 의해 유도되는 간독성과 저 산소 시 유발되는 폐독성(plumunary toxicity)에도 더 민감하게 반응하였다.<sup>23)</sup> HO-1은 Nrf2에 의해 그 합성이 유도되어 생체내 산화적 스트레스에 대응하는 대표적 항산화 효소이다. L929 세포에 Nrf2의 dominant-negative mutant를 stable transfection 시켰을 때 여러 독성물질들에 의한 HO-1의 발현이 유도되지 않았다.<sup>24)</sup> Nrf2-null mice의 섬유아세포는 wild-type 세포에 비해 글루타치온 생합성 효소의 mRNA 가 오직 15%만 발현됨이 보고되었다.<sup>25)</sup> 한편, Nrf2를 인체 간암 세포주(HepG2)에 과발현시켰을 경우에 ARE의 전사활성이 보다 증가되었으며, 이 활성화는 ROS generator인 tert-butylhydroquinone에 의해 더욱 증가함이 보고되었다.<sup>26)</sup> 이런 보고들을 종합해 볼 때 항산화/해독화 효소 발현 조절에 있어, 전사인자인 Nrf2가 중요한 역할을 담당함을 알 수 있다.

(2) Nrf2의 조절기전: 항산화/해독화 효소의 발현에 있어 Nrf2의 역할은 *de novo synthesis*를 통한 Nrf2의 합성보다는 세포내의 분포상태에 의해 조절된다.<sup>27)</sup> 세포질내 액틴에 결합된 단백질인 Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)은 생리적으로 정상적인 상태에서는, bZIP 단백질들을 붙잡아두는 'docking site'라는 것이 밝혀졌다. 예를 들면 Keap1은 전사인자인 Nrf2를 세포질 내에 가두어 핵내로의 이동을 방해함으로써 그 Nrf2의 전사 활성을 억제한다. 세포가 항산화제나 Phase II 해독화 효소들의 생성을 유도하는 물질들을 어떻게 인

식하는지는 명확하게 밝혀지지 않고 있다. Keap1-Nrf2 복합체는 친전자체나 활성산소종을 감지함으로써 산화-환원 신호전달 체계를 인식하는데 중요한 역할을 담당한다.<sup>28)</sup>

비록 항산화/해독화 효소의 유전자 발현을 유도하는 다양한 물질들의 대부분은 항산화제로 존재하지만, 세포내 환경에 따라 활성산소종을 발생시키거나, 또는 산화-환원 사이클링을 통해 친전자성을 갖는 활성중간체로 쉽게 변환되어 대사될 수 있다. 그러므로 ARE를 친전자체 반응 요소(electrophile response element, EpRE)라 부르는 것이 더 정확한 명명일지도 모른다. ARE의 전사활성은 다양한 화학물질 즉 Michael reaction acceptors, diphenols, isothiocyanates, peroxides, mercaptans, trivalent arsenicals, heavy metals, dithiolethiones 등에 의해 유도된다.<sup>29)</sup> 마우스에서 분리된 Keap1은 25개의 시스테인 잔기를 가지고 있으며 Nrf2는 7개의 시스테인 잔기를 가지고 있다.<sup>30)</sup> 이처럼 친전자성을 갖는 화학물질이나 활성산소종들이 Keap1의 시스테인잔기와 반응하여 thiol기를 산화시키거나 공유결합을 함으로써 부가물을 형성할 수 있다.<sup>30)</sup> 시스테인 잔기의 변화(modification)로 인해 Keap1으로부터 분리된 Nrf2는 핵으로 이동하여 ARE/EpRE에 결합함으로써 Phase II 해독화 또는 항산화효소의 전사를 활성화시킬 것으로 생각된다(Fig. 2). 이러한 가설을 뒷받침하는 결과로서, 시스테인 잔기와 반응할 수 있는 dimethyl maleate같은 sulphhydryl-reactive agent들은 Keap1과 Nrf2 결합을 약화시켜서 Nrf2를 유리시킨다.

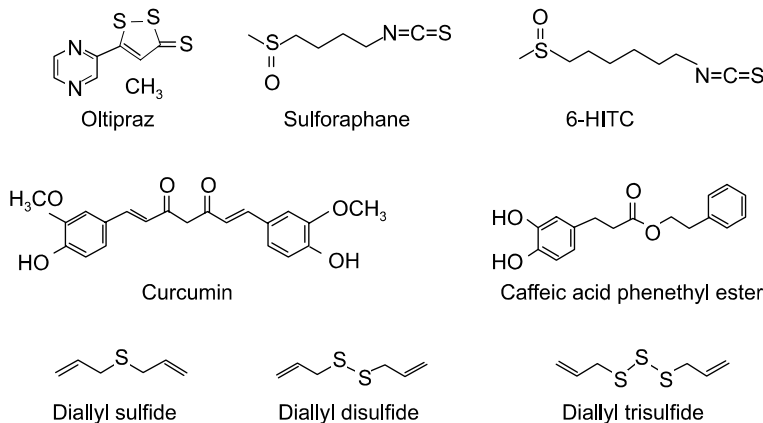


Fig. 3. Chemical structures of selected chemopreventive agents capable of inducing Phase II detoxifying enzymes.

이러한 측면에서, Keap1의 시스테인 잔기는 세포 내 산화-환원 상태의 분자 센서(molecular sensor)로서, 세포의 항산화 방어 또는 친전자성 독성물질들의 해독화에 관계하는 유전자들이 필요시 적절히 발현될 수 있도록 하는데 중요한 역할을 담당할 것으로 생각된다.

한편 Nrf2는 26S proteasome에 의해 분해되며, 생리적으로 정상인 상태에서 Nrf2의 turnover 속도는 빠르나 항산화 유도물질에 의해 자극된 상태에서는 turnover 속도가 느려지며, Nrf2의 turnover 속도는 Keap1에 의해 조절된다고 한다.<sup>31~33)</sup>

(3) Nrf2 조절하는 상위 신호전달체계: Nrf2의 핵내로의 이행에 Keap1의 thiol 그룹의 직접적인 산화 또는 공유결합을 통한 변화(covalent modification) 외에 post-transcriptional modification이 관여한다. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), protein kinase C (PKC), c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) 그리고 extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)와 같은 인산화 효소들은 Nrf2의 serine과 threonine 잔기를 인산화함으로써 Keap1으로부터 Nrf2를 방출하는데 관여한다(Fig. 2).<sup>34,35)</sup> 한편 PKC는 직접적으로 Nrf2에 존재하는 Serine 40을 인산화함으로써 Keap1으로부터 Nrf2를 분리시키며, p38 MAPK는 세포의 종류에 따라 핵으로의 Nrf2의 이동을 촉진 또는 억제한다고 보고되었다.<sup>36,37)</sup> 아울러 활성산소종에 의해 활성화된 PI3K는 actin microfilaments를 depolymerization 시킴으로써 Nrf2의 핵으로의 이동을 촉진시킨다.<sup>38)</sup> 또한 PI3K에 의해 인산화된 CCAAT/enhancer-binding protein-β (C/EBP-β)는 핵내로 이동하여 xenobiotic-response element (XRE) 내에 위치한 C/EBPβ-response element (CRE)에 결합한다.<sup>39)</sup> PI3K의 약물학적 억제제와 Nrf2의 dominant negative mutant로 transfection한 세포에서 PI3K에 의한 ARE의 활성이 억제됨을 통해 ARE의 활성화에 PI3K가 관여함이 제시되었다.<sup>40)</sup>

MAPKs 외에 p160을 포함한 cyclic AMP-response element binding protein (CBP)/p300와 같은 co-activator 또한 Nrf2의 활성조절에 관여한다. 한편 ERK와 JNK의 활성화가 전사개시복합체에 co-activator를 recruit 함으로써 Nrf2의 전사활성을 증가시킨다는 보고도 있다.<sup>41)</sup>

### 파이토케미칼에 의한 항산화/해독화 효소 발현 조절 기전

Nrf2를 매개로한 ARE 또는 EpRE의 활성화가 발암물질과 산화적 스트레스에 대한 항산화/해독화 효소 발현에 필수적임을 증명하는 많은 연구들이 수행되었다. 암예방 효과가 뛰어난 화학물질 중에는 항산화/해독화 효소의 발현을 조절하는 대표적인 물질들이 다수 있다(Fig. 3). Oltipraz, [5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithio-3-thione]는 1,2-dithiol-3-thione 계열의 화합물로서 일찍이 디스토마치료(antischistosomal) 약물로 사용되었으나 이후 ARE에 의해 조절되는 효소들을 유도하여 실험적으로 유도된 종양발생을 억제하는 효과도 갖는 것으로 알려졌다.<sup>42,43)</sup> 중국의 Qidong 지방에서 실시한 human intervention trials에 따르면 oltiprez를 경구 투여시 aflatoxin B1의 대사 활성화가 억제되고, 해독화된 대사 산물의 생성이 증가되었다.<sup>44)</sup> 또한 oltipraz는 PI3K의 활성과 Nrf2활성을 매개로 GSTA2와 이것의 mRNA 발현을 유도하였다.<sup>39)</sup>

인체 간암 HepG2세포에서 녹차추출물에 의한 Phase II 해독화효소 발현유도에 ERK2, immediate-early response 유전자인 c-Jun과 c-Fos 뿐만 아니라 JNK1의 활성화가 관여하며, 이는 ARE를 통해 매개됨이 ARE-reporter 유전자를 이용한 실험을 통해 확인되었다.<sup>45)</sup> 브로콜리에 들어있는 주요한 isothiocyanate인 sulforaphane [1-isothiocyanato-(4R,S)-(methyl-sulfinyl)butane]은 ARE에 의해 조절되는 효소들의 강력한 유도물질로서 MAPK/Nrf2/ARE 활성을 통해 항산화/해독화 효소 발현을 유도하였다.<sup>46,47)</sup> 또한 Sulforaphane은 Keap1의 thiol modification을 통해 Nrf2의 활성화를 유도하였다.<sup>30)</sup> Oligonucleotide microassay에 의한 유전자발현의 분석 프로파일에서 sulforaphane은 Nrf2-wild-type 마우스의 소장에서 NQO1, GST, 그리고 GCL의 발현을 상승시켰지만, Nrf2-null mice에서는 이러한 효소들의 발현이 저하되었다.<sup>48)</sup> 아울러 sulforaphane은 랫드에서 azoxymethane에 의해 유도된 colonic aberrant crypt foci의 형성을 억제하며, 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene에 의해 유도된 유방암(mammary tumors)의 빈도(incidence), 수(mul-

tiplicity) 그리고 크기를 감소시켰다.<sup>49,50</sup> Sulforaphane은 benzo[a]pyrene에 의한 전위(forestomach)의 종양생성은 억제한 반면, *Nrf2 null mice*에서 benzo[a]pyrene에 의해 유도된 tumor의 생성은 억제하지 못하였다.<sup>51</sup> 위의 결과들을 종합해 볼 때 sulforaphane에 의한 항산화/해독화 효소의 발현은 *Nrf2* 활성화를 통해 이루어지며, 발암과정에 대한 보호작용을 나타내는데 관여함을 알 수 있다. 또한 sulforaphane과 구조적으로 유사한 일본 고추냉이인 와사비의 성분인 6-methylsulphinylhexyl isothiocyanate (6-HITC)가 GST의 유도물질임이 밝혀졌다.<sup>52</sup> 6-HITC는 RL-34 세포주에서 *Nrf2*의 핵내로의 이동과 잇따른 ARE의 활성화를 촉진함으로써, GST 동종효소들의 발현을 강력히 유도하였다. 6-HITC을 마우스에 먹였을 때, sulforaphane보다 훨씬 더 많은 항산화/해독화 효소들이 발현된 반면, *Nrf2*을 발현하지 못하는 *Nrf2-null mice*에서는 이들 해독화 효소들의 발현이 훨씬 감소되었다.<sup>21,51</sup>

인도전통 식품인 카레의 노란색소인 curcumin [1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione] 과 벌꿀집의 성분 중 하나인 caffeic acid phenethyl ester (CAPE)의 항암효과 및 항염증 효과는 이미 여러 문헌을 통해 보고되었다.<sup>53,54</sup> 이들 두 물질은 *Nrf2-Keap1* 결합을 약화시켜 *Nrf2*의 핵내로의 이동을 유도하였으며 이로 인해 HO-1의 효소 활성 및 발현 증가를 유도하였다.<sup>55</sup> Curcumin은 p38 MAPK를 활성화 하였으며, curcumin에 의한 HO-1 발현에 p38 MAPK가 관여함을 p38 MAPK 저해제인 SB203580이 curcumin에 의한 ARE 활성을 억제한다는 사실을 통해 확인하였다.<sup>55</sup> 다른 실험에서도 curcumin은 *Nrf2*의 핵내로의 이동, ARE-DNA 결합활성 그리고 GCL의 발현을 증가시켰다.<sup>56</sup> Curcumin과 CAPE에 의한 *Nrf2*의 핵내로의 이행은 이들 파이토키말들에 공통적으로 존재하는  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketone 구조가 Keap1에 위치한 cysteine thiol기의 구조를 변경시킬 수 있는 Michael reaction acceptor로 작용할 수 있기 때문인 것으로 사료된다.

마늘은 위암, 간암, 피부암, 자궁암, 유방암 등 다양한 인체암에 대한 암예방 효과가 있는 것으로 알려졌다.<sup>57~62</sup> 마늘의 암 예방효과는 주로 마

늘의 활성성분인 황화합물(organosulfur compound)로서 S-allyl cysteine과 같은 수용성 황화합물과 diallylsulfide (DAS), diallyldisulfide (DATS) 그리고 diallyltrisulfide (DATS)와 같은 지용성 화합물들이다. 이들 황화합물에 의한 Phase II 약물대사효소 유도가 마늘의 암예방효과와 상관관계가 있음이 보고되었다.<sup>62</sup> DATS와 DATS는 GST, GR, NQO1과 같은 Phase II의 해독화 효소의 발현 증가를 유도하였으며,<sup>63~65</sup> 간암세포인 HepG2 세포에서 NQO1과 HO-1의 발현을 유도하였다.<sup>66</sup> 다른 황화합물에 비해 DATS는 강력하게 이들 효소의 발현을 유도하였으며, ARE 전사활성을 통해 *Nrf2*의 세포내 축적을 유도하였다. DATS에 의한 *Nrf2*의 활성화에 다양한 MAPKs들이 관여했는지의 여부를 확인한 결과 DATS는 ERK, JNK와 p38 MAPK의 활성을 유도하였으나, 이들 MAPKs 억제제는 DATS에 의해 유도되는 활성화된 ARE를 억제하지 못하였으며, 아울러 PKC 억제제, PKG 억제제, PKA 억제제 모두 DATS에 의해 활성화된 ARE를 차단하지 못하였다. 이에 반해  $Ca^{2+}$ /calmodulin dependent protein kinase의 억제제는 DATS에 의한 ARE의 활성을 40% 정도 차단하였다.<sup>66</sup> 위의 결과로부터 DATS에 의한 NQO1과 HO-1 유도에 세포내 칼슘의 농도가 중요한 역할을 하는 것으로 사료되나 다른 세포신호물질의 작용 가능성을 배제할 수 없으며, 마늘의 황화합물의 구조가 해독화 효소의 발현 조절에 영향을 미칠 것으로 생각된다.

## 맺 음 말

인체암의 발생 및 진행과정을 분자수준에서 이해하는 일대 변혁을 통해, 다단계 발암과정을 단계별로 저해하려는 화학적 암예방이 암을 정복하는 새로운 전략으로 관심을 끌고 있다. 독성물질을 비롯한 발암물질의 해독화에 항산화/해독화 효소가 관여하므로, 이들 효소들의 발현을 유도하거나 활성을 증가시킴으로써 발암물질의 해독화 과정을 촉진시키는 것은 화학적 암예방의 중요한 부분이라 할 수 있다. 이런 측면에서 항산화/해독화 효소의 발현을 조절하는 중요한 조절인자로서 *Nrf2*의 역할은 화학암예방에 있어 중요한 분자 타겟으로 인식되게 되었으며, 다양한 암예방물질들

이 Nrf2 활성화를 통해 항산화/해독화 효소의 발현을 유도하여 발암과정을 억제한다는 연구결과들이 속속 보고되고 있다.<sup>67)</sup> 그러나 항산화/해독화 효소의 발현조절 기전에 Nrf2 이외의 다른 전사인자들에 대한 연구는 미비한 실정이다. 발암과정 중 가역적인 단계인 촉진과정을 억제하는 것이 실리적이 될 수도 있겠지만, 항산화/해독화 효소의 효과적인 발현 유도를 통해 발암물질에 의한 과도한 DNA 손상을 원천적으로 막을 수 있다면 이 또한 근본적인 암예방 전략이라 할 수 있겠다. 특히 유전적으로 DNA 손상 수복능이 결여되어 있거나 발암물질의 대사활성화 효소가 과도하게 발현된 사람들의 경우 후자의 접근 방식은 암에 대한 risk를 줄이는데 상당한 효과를 발휘할 수 있을 것이다.

### 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 기초과학연구사업 중 젊은 과학자 연구활동 사업의 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

### 참 고 문 헌

- 1) Armitage P, Doll R. A two-stage theory of carcinogenesis in relation to the age distribution of human cancer. *Br J Cancer* 1957; 11: 161-169.
- 2) Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Rev Cancer* 2003; 3: 768-780.
- 3) Sporn MB, Suh N. Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer. *Nature Rev Cancer* 2002; 2: 537-543.
- 4) Lippman SM, Hong WK. Cancer prevention science and practice. *Cancer Res* 2002; 62: 5119-5125.
- 5) Sporn MB. Carcinogenesis and cancer: different perspectives on the same disease. *Cancer Res* 1991; 51: 6215-6218.
- 6) Wattenberg LW. Chemoprevention of cancer. *Cancer Res* 1985; 45: 1-8.
- 7) Manson MM, Gescher A, Hudson EA, Plummer SM, Squires MS, Prigent SA. Blocking and suppressing mechanisms of chemoprevention by dietary constituents. *Toxicol Lett* 2000; 112-113: 499-505.
- 8) Benson AM, Hunkeler MJ, Talalay P. Increase of NAD(P)H:quinone reductase by dietary antioxidants: possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 5216-5220.
- 9) Cha YN, Heine HS. Comparative effects of dietary administration of 2(3)-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole and 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluene on several hepatic enzyme activities in mice and rats. *Cancer Res* 1982; 42: 2609-2615.
- 10) Benson AM, Cha YN, Bueding E, Heine HS, Talalay P. Elevation of extrahepatic glutathione S-transferase and epoxide hydratase activities by 2(3)-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole. *Cancer Res* 1979; 39: 2971-2977.
- 11) Primiano T, Kensler TW, Kuppusamy P, Zweier JL, Sutter TR. Induction of hepatic heme oxygenase-1 and ferritin in rats by cancer chemopreventive dithiolethiones. *Carcinogenesis* 1996; 17: 2291-2296.
- 12) Alam J, Camhi S, Choi AM. Identification of a second region upstream of the mouse heme oxygenase-1 gene that functions as a basal level and inducer-dependent transcription enhancer. *J Biol Chem* 1995; 270: 11977-11984.
- 13) Zhang Y, Gordon GB. A strategy for cancer prevention: stimulation of the Nrf2-ARE signaling pathway. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 885-893.
- 14) Benson A.M, Batzinger RP, Ou SY, Bueding E, Cha YN, Talalay P. Elevation of hepatic glutathione S-transferase activities and protection against mutagenic metabolites of benzo(a)pyrene by dietary antioxidants. *Cancer Res* 1978; 38: 4486-4495.
- 15) Wilkinson Jt, Clapper ML. Detoxication enzymes and chemoprevention. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 216: 192-200.
- 16) Rushmore TH, Morton MR, Pickett CB. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem* 1991; 266: 11632-11639.
- 17) Lee JM, Calkins MJ, Chan K, Kan YW, Johnson JA. Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *J Biol Chem* 2003; 278: 12029-12038.
- 18) Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236: 313-322.



- 19) Nioi P, McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence. *Biochem J* 2003; 374: 337-348.
- 20) Chanas SA, Jiang Q, McMahon M, McWalter GK, McLellan LI, Elcombe CR, Henderson CJ, Wolf CR, Moffat GJ, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase Gsta1, Gsta2, Gstm1, Gstm2, Gstm3 and Gstm4 genes in the livers of male and female mice. *Biochem J* 2002; 365: 405-416.
- 21) Ramos-Gomez M, Kwak MK, Dolan PM, Itoh K, Yamamoto M, Talalay P, Kensler TW. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 3410-3415.
- 22) Ramos-Gomez M, Dolan PM, Itoh K, Yamamoto M, Kensler TW. Interactive effects of nrf2 genotype and oltipraz on benzo[a]pyrene-DNA adducts and tumor yield in mice. *Carcinogenesis* 2003; 24: 461-467.
- 23) Enomoto A, Itoh K, Nagayoshi E, Haruta J, Kimura T, O'Connor T, Harada T, Yamamoto M. High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. *Toxicol Sci* 2001; 59: 169-177.
- 24) Alam J, Stewart D, Touchard C, Boinapally S, Choi AM, Cook JL. Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem* 1999; 274: 26071-26078.
- 25) Chan JY, Kwong M. Impaired expression of glutathione synthetic enzyme genes in mice with targeted deletion of the Nrf2 basic-leucine zipper protein. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1517: 19-26.
- 26) Nguyen T, Huang HC, Pickett CB. Transcriptional regulation of the antioxidant response element. Activation by Nrf2 and repression by MafK. *J Biol Chem* 2000; 275: 15466-15473.
- 27) Numazawa S, Yoshida T. Nrf2-dependent gene expressions: a molecular toxicological aspect. *J Toxicol Sci* 2004; 29: 81-89.
- 28) Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 1999; 13: 76-86.
- 29) Prestera T, Holtzclaw WD, Zhang Y, Talalay P. Chemical and molecular regulation of enzymes that detoxify carcinogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 2965-2969.
- 30) Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Yamamoto M, Talalay P. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 11908-11913.
- 31) Nguyen T, Sherratt PJ, Huang HC, Yang CS, Pickett CB. Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26S proteasome. *J Biol Chem* 2003; 278: 4536-4541.
- 32) McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J Biol Chem* 2003; 278: 21592-21600.
- 33) Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, O'Connor T, Yamamoto M. Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells* 2003; 8: 379-391.
- 34) Huang HC, Nguyen T, Pickett CB. Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 12475-12480.
- 35) Yu R, Lei W, Mandlekar S, Weber MJ, Der CJ, Wu J, Kong AT. Role of a mitogen-activated protein kinase pathway in the induction of phase II detoxifying enzymes by chemicals. *J Biol Chem* 1999; 274: 27545-27552.
- 36) Huang HC, Nguyen T, Pickett CB. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J Biol Chem* 2002; 277: 42769-42774.
- 37) Yu R, Mandlekar S, Lei W, Fahl WE, Tan TH, Kong AT. p38 mitogen-activated protein kinase negatively regulates the induction of phase II drug-metabolizing enzymes that detoxify carcinogens. *J Biol Chem* 2000; 275: 2322-2327.
- 38) Kang KW, Lee SJ, Park JW, Kim SG. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates nuclear translocation of NF-E2-related factor 2 through actin rearrangement in response to oxidative stress. *Mol Pharmacol* 2002; 62: 1001-1010.
- 39) Kang KW, Cho IJ, Lee CH, Kim SG. Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase-dependent CCAAT/

- enhancer binding protein beta activation in the induction of glutathione S-transferase by oltipraz. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 53-66.
- 40) Lee JM, Hanson JM, Chu WA, Johnson JA. Phosphatidylinositol 3-kinase, not extracellular signal-regulated kinase, regulates activation of the antioxidant-responsive element in IMR-32 human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 20011-20016.
- 41) Katoh Y, Itoh K, Yoshida E, Miyagishi M, Fukamizu A, Yamamoto M. Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes Cells* 2001; 6: 857-868.
- 42) Petzer JP, Navamal M, Johnson JK, Kwak MK, Kensler TW, Fishbein JC. Phase 2 enzyme induction by the major metabolite of oltipraz. *Chem Res Toxicol* 2003; 16: 1463-1469
- 43) Kensler T, Styczynski P, Groopman J, Helzlsouer K, Culphey T, Maxuitenko Y, Roebuck BD. Mechanisms of chemoprotection by oltipraz. *J Cell Biochem* 1992; 161: 167-172.
- 44) Wang JS, Shen X, He X, Zhu YR, Zhang BC, Wang JB, Qian GS, Kuang SY, Zarba A, Egnor PA, Jacobson LP, Munoz A, Helzlsouer KJ, Groopman JD, Kensler TW. Protective alterations in phase 1 and 2 metabolism of aflatoxin B<sub>1</sub> by oltipraz in residents of Qidong, People's Republic of China. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 347-354.
- 45) Chen C, Yu R, Owuor ED, Kong AN. Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death. *Arch Pharm Res* 2000; 23: 605-612.
- 46) Ye L, Zhang Y. Total intracellular accumulation levels of dietary isothiocyanates determine their activity in elevation of cellular glutathione and induction of Phase 2 detoxification enzymes. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1987-1992.
- 47) Kong AN, Owuor E, Yu R, Hebbbar V, Chen C, Hu R, Mandelkar S. Induction of xenobiotic enzymes by the MAP kinase pathway and the antioxidant or electrophile response element (ARE/EpRE). *Drug Metab Rev* 2001; 33: 255-271.
- 48) Thimmulappa RK, Mai KH, Srisuma S, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S. Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res* 2002; 62: 5196-5203.
- 49) Zhang Y, Kensler TW, Cho CG, Posner GH, Talalay P. Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3147-3150.
- 50) Chung FL, Conaway CC, Rao CV, Reddy BS. Chemoprevention of colonic aberrant crypt foci in Fischer rats by sulforaphane and phenethyl isothiocyanate. *Carcinogenesis* 2000; 21: 2287-2291.
- 51) Fahey JW, Haristoy X, Dolan PM, Kensler TW, Scholtus I, Stephenson KK, Talalay P, Lozniewski A. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 7610-7615.
- 52) Morimitsu Y, Nakagawa Y, Hayashi K, Fujii H, Kumagai T, Nakamura Y, Osawa T, Horio F, Itoh K, Iida K, Yamamoto M, Uchida K. A sulforaphane analogue that potentially activates the Nrf2-dependent detoxification pathway. *J Biol Chem* 2002; 277: 3456-3463.
- 53) Chun KS, Keum YS, Han SS, Song YS, Kim SH, Surh YJ. Curcumin inhibits phorbol ester-induced expression of cyclooxygenase-2 in mouse skin through suppression of extracellular signal-regulated kinase activity and NF- $\kappa$ B activation. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1515-1524.
- 54) Grunberger D, Banerjee R, Eisinger K, Oltz EM, Efros L, Caldwell M, Estevez V, Nakanishi K. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia* 1988; 44: 230-232.
- 55) Balogun E, Hoque M, Gong P, Killeen E, Green CG, Foresti R, Alam J, Motterlini R. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem J* 2003; 371: 887-895.
- 56) Dickinson DA, Iles KE, Zhang H, Blank V, Forman HJ. Curcumin alters EpRE and AP-1 binding complexes and elevates glutamate-cysteine ligase gene expression. *FASEB J* 2003; 17: 473-475.
- 57) Dausch JG, Nixon DW. Garlic: a review of its relationship to malignant disease. *Prev Med* 1990; 19: 346-361.
- 58) Hsing AW, Chokkalingam AP, Gao YT, Madigan MP, Deng J, Gridley G, Fraumeni JF Jr. Allium vegetables and risk of prostate cancer: a population-based study. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 1648-1651.
- 59) Steinmetz KA, Kushi LH, Bostick RM, Folsom AR, Potter JD. Vegetables, fruit and colon cancer in the Iowa Women's Health Study. *Am J Epidemiol* 1994; 139: 1-15.

- 60) Buiatti E, Palli D, Decarli A, Amadori D, Avellini C, Bianchi S, Biserni R, Cipriani F, Cocco P, Giacosa A, et al. A case-control study of gastric cancer and diet in Italy. *Int J Cancer* 1989; 44: 611-616.
- 61) You WC, Blot WJ, Chang YS, Ershow A, Yang ZT, An Q, Henderson BE, Fraumeni JF Jr, Wang TG. Allium vegetables and reduced risk of stomach cancer. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81: 162-164.
- 62) Yang CS, Chhabra SK, Hong JY, Smith TJ. Mechanisms of inhibition of chemical toxicity and carcinogenesis by diallyl sulfide (DAS) and related compounds from garlic. *J Nutr* 2001; 131: 1041S-1045S.
- 63) Hatono S, Jimenez A, Wargovich MJ. Chemopreventive effect of S-allylcysteine and its relationship to the detoxification enzyme glutathione S-transferase. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1041-1044.
- 64) Wu CC, Sheen LY, Chen HW, Tsai SJ, Lii CK. Effects of organosulfur compounds from garlic oil on the antioxidation system in rat liver and red blood cells. *Food Chem Toxicol* 2001; 39: 563-569.
- 65) Singh SV, Pan SS, Srivastava SK, Xia H, Hu X, Zaren HA, Orchard JL. Differential induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase by anti-carcinogenic organosulfides from garlic. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 244: 917-920.
- 66) Chen C, Pung D, Leong V, Hebbar V, Shen G, Nair S, Li W, Tony Kong AN. Induction of detoxifying enzymes by garlic organosulfur compounds through transcription factor Nrf2: effect of chemical structure and stress signals. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 1578-1590.
- 67) Lee JS, Surh YJ. Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Cancer Lett* 2005; in press.
-