

한국인에서 구강상피세포를 이용한
발암물질 대사효소의 유전자 다형성

연세대학교 대학원

치 의 학 과

박 해 준

한국인에서 구강상피세포를 이용한
발암물질 대사효소의 유전자 다형성

지도 박 광 균 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2000년 12월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

박 해 준

박해준의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2000년 12월 일

감사의 글

본 논문을 완성함에 있어 시종 간곡하신 지도와 노고를 아끼지 않으신 박광균 교수님께 머리 숙여 감사드립니다. 또한 이승일 교수의 따뜻한 격려와 김진 교수님의 마음 넓은 배려에 감사드립니다. 아울러 많은 조언을 주신 차인호 교수님, 유윤정 교수님, 서정택 교수님의 후배에 대한 사랑에 감사드립니다. 실험을 도와준 최민아 선생님, 사진작업을 도와준 조장기 선생님께 감사드리며 구강생물학교실원 여러분들께 사의를 표합니다.

오늘이 있기까지 저를 지켜봐 주신 부모님과 장인 장모님께 감사드리며 사랑하는 아내와 준영, 소현과 이 기쁨을 나누고 싶습니다. 이 논문이 두 딸들에게 앞으로의 학업에 작은 본보기가 되었으면 더 이상 바랄게 없겠습니다.

2000년 12월

저자 씀

차 례

국문요약	iv
제1장 서 론	1
제2장 연구대상 및 방법	9
2.1 연구대상	9
2.2 연구방법	9
2.2.1 조직채취	9
2.2.2 DNA 추출과정	9
2.2.3 유전자형 분석시험 (Genotyping Assays)	10
제3장 연구결과	17
3.1 CYP1A1 유전자분석 : <i>Msp</i> I 다형성 (T to C transition) 분포 ...	17
3.2 CYP1A1 유전자분석 : Exon 7 다형성 (ile/val) 분포	18
3.3 CYP2E1 유전자분석 : <i>Pst</i> I 다형성 분포	19
3.4 GSTM1 유전자분석	20
제4장 총괄 및 고찰	22
제5장 결 론	28
참고문헌	30
ABSTRACT	42

표 차 례

Table 1. Characteristics of study population	9
Table 2. Distribution of CYP1A1 genotypes (<i>Msp</i> I) in Koreans	18
Table 3. Distribution of CYP1A1 exon 7 (ile/val) genotypes in Koreans	19
Table 4. Distribution of CYP2E1 (<i>Pst</i> I) genotypes in Koreans	20
Table 5. Distribution of GSTM1 genotypes in Koreans	21
Table 6. Distribution of CYP1A1 genotypes (<i>Msp</i> I) in healthy controls (%)	24
Table 7. Distribution of CYP1A1 genotypes (ile/val) in healthy controls (%)	25
Table 8. Distribution of CYP2E1 <i>Pst</i> I allele frequencies in healthy controls (%)	26

그림차례

Fig. 1. Structural organization and polymorphic sites of the human CYP1A1 gene	3
Fig. 2. Interrelationship between genetic polymorphisms and clinical diseases	7
Fig. 3. CYP1A1 <i>Msp</i> I polymorphism	12
Fig. 4. CYP1A1 exon 7 polymorphism	13
Fig. 5. CYP2E1 <i>Pst</i> I polymorphism	15
Fig. 6. Genotyping of GSTM1 gene	16
Fig. 7. Distribution of CYP1A1 genotypes (<i>Msp</i> I) in Koreans	17
Fig. 8. Distribution of CYP1A1 exon 7 (ile/val) genotypes in Koreans	18
Fig. 9. Distribution of CYP2E1 (<i>Pst</i> I) genotypes in Koreans	19
Fig. 10. Distribution of GSTM1 genotypes in Koreans	20

국문요약

한국인에서 구강상피세포를 이용한 발암물질 대사효소의 유전자 다형성

한국인에서 발암물질 대사효소의 유전자 다형성 분포를 조사하고 구강 세척법에 의해 탈락되는 상피세포를 이용한 유전자 다형성 조사법을 확립하고자 이 실험을 행하였다. 57 명의 청소년과 75 명의 성인을 대상으로 구강상피세포를 수집하여 genomic DNA를 분리하고 PCR 방법을 통해 CYP1A1의 *Msp* I 다형성, A to G transition 다형성을 관찰하고 CYP2E1의 *Pst* I 다형성과 GSTM1의 유전자 결손여부를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. CYP1A1 *Msp* I 다형성 유전자형의 분포는 이형접합체 (m1/m2)의 발현빈도가 55.9 %로 가장 높았고 동형접합체 (m1/m1), 돌연변이체 (m2/m2)의 발현빈도는 각각 36.6 %, 7.5 % 였다.

2. CYP1A1 A to G transition 다형성 유전자형의 분포는 이형접합체 (ile/val)의 발현빈도가 81.8 %로 가장 높았고, 동형접합체 (ile/ile)와 돌연변이체 (val/val) 유전자형의 발현빈도는 각각 9.1 %로 나타났다.

3. CYP2E1 *Pst* I 유전자형의 분포는 동형접합체 (c1/c1)의 발현빈도가 54.4%, 이형접합체 (c1/c2)는 42.7 %, 돌연변이체 (c2/c2)는 2.9 %로 나타났다.

4. GSTM1 유전자형 분포는 wild type이 39 %, null type이 61 %로 나타났다.

5. CYP1A1 *Msp* I 다형성 관찰결과 서양인에서는 동형접합체가 많은 반면 한국인에서는 이형접합체가 더 많은 것으로 나타났다.

6. CYP1A1 A to G transition 다형성 관찰결과 한국인에서 특이적으로 이형접합체가 80 % 이상으로 높게 나타났으며 이는 같은 동양권인 일본인 과도 차이가 있었다.

7. 한국인을 포함한 동남아시아인의 CYP2E1 *Pst* I 다형성은 미국인이 나 유럽인에 비해 들연변이체가 높게 나타났다.

8. 한국인의 GSTM1 다형성은 외국인에 비해 결손형이 다소 많은 것으로 나타났다.

9. 탈락상피세포를 이용한 실험결과는 이전에 혈액이나 구강조직을 이용한 실험결과와 유사하였다.

이상의 결과로 보아

한국인의 발암물질 대사효소의 유전자 다형성 분포는 다른 민족이나 인종과는 차이를 보였다. 탈락상피세포를 이용한 발암물질 대사효소의 유전자 다형성 분포는 혈액을 이용한 이전의 연구결과와 유사하였으며 많은 사람을 대상으로 하는 연구에서는 구강세척법을 사용하는 것이 유용한 것으로 사료된다.

핵심되는 말 : 발암물질 대사효소, CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, 구강세척법, 유전자 다형성

한국인에서 구강상피세포를 이용한 발암물질 대사효소의 유전자 다형성

< 지도 박 광 균 교수 >

연세대학교 대학원 치의학과

박 해 준

제1장 서 론

화학물질에 의해 암이 유발될 수 있다는 것은 이미 오래 전부터 알려진 사실이다. 1761년 John Hill은 코담배를 과도하게 이용하는 사람에서 비암이 발병함을 관찰하였고 (Redmond Jr., 1970), 1775년 Percivall Pott는 굴뚝청소부로 어린 시절을 보낸 사람에게서 음낭 피부암 빈도가 높다고 보고하였다. 1875년 독일의 von Volkman은 coal tar 접촉으로 인해 발생하는 피부암에 대하여 보고하였으며, 1876년 Scotland의 Bell은 shale oil에서 기인하는 paraffin cancer에 대해 보고하였다. 1895년 Rehn은 aniline 염색직공들에서 방광암 발생을 보고하였다. 이처럼 생체는 문명의 발달과 더불어 많은 종류의 유해물질에 노출되게 되었다 (Ruddon, 1995). 이 물질들 중 많은 것들은 아주 작고 소수성이기 때문에 세포내 쉽게 축적되고, 제거가 되지 않을 경우 빠른 시간 내에 독성을 나타내거나 세포를 죽게 하는 농도에 도달한다. 생체는 이런 상황에 대한 방어기전으로 외부유입물질 (xenobiotics)을 제거하거나 해독하는 기전을 발전시켰다. 이는 주로 효소에 의해 이루어지는데, 효소는 외부유입물질을 인식하고 이를 수용성 형태로 변화시키므로써 쉽게 배설이 되게 한다 (Lang 및 Pelkonen, 1999).

외부유입물질 대사의 효소반응은 두 단계로 나눌 수 있다. 많은 화합물들은 일차적으로 cytochrome P450 (CYP)과 같은 I 상 효소에 의해 가수분해, 환원, 산화작용으로 1차 대사산물을 형성한다. 이렇게 형성된 1차 대사산물은 불활성화 효소로 알려진 glutathion S -transferase (GST), UDP-glucuronosyltransferase 및 N-acetyltransferase (NAT)같은 II 상 효소에 의해 메틸화 (methylation), 글루쿠로나이드화 (glucuronidation), 황산염화 (sulfation), 축합 (conjugation) 등의 과정으로 2차 대사산물을 형성한다. 이렇게 인체 내에 생성된 1, 2차 대사산물들은 각각의 단계에서 소변, 대변 및 담즙을 통해서 체외로 대부분 배설된다. 그러나 배설되지 못하고 남아 있는 화합물들은 숙주세포를 죽이거나, DNA에 손상을 주어 유전자 발현, 세포증식, 세포분화를 왜곡시킨다. 그 기전은 비정상적인 DNA 메틸화, 산화적 손상 (oxidative damage), nitrogen oxide와 nitrate의 대사에 영향, 수용체와 전사인자의 활성화, cyclin이나 다른 세포주기 단백질의 활성화 등을 통하여 일어난다 (Wormhoudt, 1999).

I 상 효소중 가장 대표적인 것이 cytochrome P450 효소계이다. 이는 포유류의 적혈구세포와 근육세포를 제외한 모든 세포에 존재하는 heme 단백질군을 일컫는 말로 주작용은 외부로부터 들어온 물질을 활성화 혹은 비활성화 시키고, 경우에 따라 매우 반응성이 높은 물질로 전환시킨다. 또한 steroid hormone의 생성과 지방산의 대사에도 관련이 있는 것으로 알려져 있다 (Okita 및 Masters, 1997). 담배나 매연, 음식물 등에 포함된 많은 환경 전발암물질은 CYP에 의해 활성화되어 반응성이 강한 친전자성 중간체가 된다. CYP는 여러 효소의 상과 (superfamily)로 진화 관련성에 의해 몇 개의 과 (family)로 나누어지는데 이는 아미노산의 구조와 같은 개체유전자의 상동성 (homology)에 의해 결정된다. 지금까지 CYP1A1, CYP2A1, CYP3A3, CYP4B1, CYP7, CYP11A1, CYP17, CYP19, CYP21A2, CYP27

등 10개의 과와 16개의 아과 (subfamily)가 알려져 있다 (Kawajiri 및 Fujii-Kuriyama, 1991). 그 중에서 CYP1A1은 발암물질로 알려진 polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)의 활성화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Nebert 등, 1991).

CYP1A1 유전자는 15번 염색체에 존재하며 단백질은 512개 아미노산으로 구성된다. 주로 폐와 임파구, 태반에 많이 존재하는 extrahepatic 효소이다. 종양감수성 (cancer susceptibility)과 관련하여 세 가지의 유전자 다형성이 많이 연구되고 있다 (Fig. 1). 즉 3' noncoding 부위에서 *Msp* I 다형성 (Spurr 등, 1987), exon 7의 heme binding 부위에서 adenine이 guanine으로 하나의 염기가 치환되는 ile-val 다형성 (Hayashi 등, 1991b), African-American에서만 나타나는 threonine이 cytosine으로 치환되는 *Msp* I 제한효소 절편길이 다형성 (restriction fragment length polymorphism; RFLP)으로 intron 7에서 나타나는 것이다 (Crofts 등, 1993). 또한 최근에 exon 7에 4887 위치에서 cytosine이 adenine으로 치환되는 변이가 발견되었다 (Cascorbi 등, 1996).

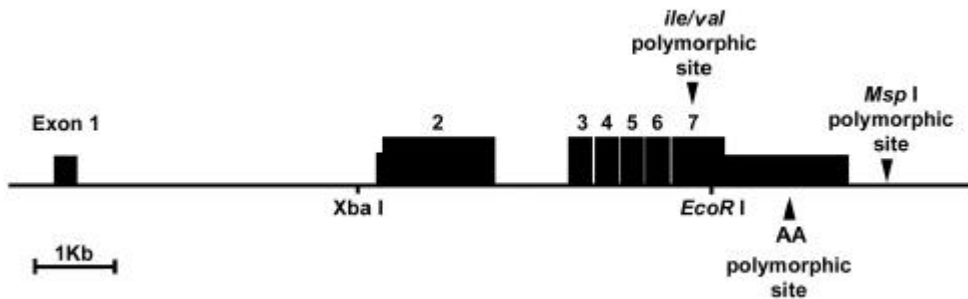


Fig. 1. Structural organization and polymorphic sites of the human CYP1A1 gene. (Kawajiri, 1999)

CYP1A1 *Msp*I 다형성에서 돌연변이 인자는 CYP1A1의 높은 유도능을 보였고 (Petersen 등, 1991), 이 유전자에 의해 유도되는 PAH의 대사효소인 aryl hydrocarbon hydroxylase가 높은 활성을 보였다 (Kiyohara 등, 1996). CYP1A1 *Msp*I 다형성은 동양인에서 돌연변이 인자가 폐암과 관련 있는 것으로 보고되었으나 (Kawajiri 등, 1993) 다른 인구집단에서는 유사한 관련성이 보고되지 않았다 (Hivonen 등, 1992; Alexandrie 등, 1994; Drakoulis 등, 1994).

CYP1A1 유전자의 exon 7에서 4889 위치의 한 염기에서의 차이가 PCR 직접 염기 서열분석 (direct sequencing)에 의해 발견되었다 (Hayashi 등, 1991b). 이는 HR2 부위의 462번째 잔기에서 isoleucine이 valine으로 치환된다. 이 다형성은 RFLP 방법으로는 알아낼 수 없는데 이는 적절한 절단부위가 없기 때문이다. 따라서 유전자-특이 중합효소연쇄반응 증폭방법 (allele-specific PCR amplification)이나 (Hayashi 등, 1991b), single strand conformational polymorphism (SSCP) 방법이 사용된다 (Kawajiri 등, 1996). 이 두 가지 방법의 결과는 직접 염기 서열분석에 의해서 서로 일치함이 증명되었다 (Kawajiri, 1999).

CYP 효소계에 속하는 CYP2E1은 *N*-nitrosamines, aniline, vinyl chloride, urethane 같은 작은 분자량을 가진 발암물질의 활성화에 관여한다 (Guengerich 등, 1991). CYP2E1 동위효소는 10번 염색체에서 발견되고 11413 bp로 구성되며 9개의 exon을 가진다. 에탄올에 의해 유도되고 분자량이 작은 소수성 (hydrophobic) 화합물이 좋은 기질이 된다. 가장 많이 연구되는 다형성은 5' flanking 부위의 *Pst*I / *Rsa*I 과 intron 6에서의 *Dra*I 다형성이다 (Uematsu 등, 1991b). *Pst*I 과 *Rsa*I 다형성은 모두 5' 전사 조절 부위에서 관찰되고 높은 상호관련성으로 인해 5' flanking 부위에서 나타나는 하나의 다형성으로 명명된다 (Errico 등, 1999). *Pst*I / *Rsa*I 다형

성은 유전자의 전사 활성을 변화시키는 것으로 나타났다 (Watanabe 등, 1990). Mutant genotype은 homozygous wild type과 비교했을 때 10배나 높은 유전자 발현의 증가를 보였다 (Hayashi 등, 1991a).

II 상 효소에 속하는 GST는 친전자성 외부유입물질에 glutathione이 축합되는 것을 매개한다 (Hayes 및 Pulford, 1995). 그 결과 I 상 효소에 의해 활성화된 발암물질을 비활성화 시키고 체외로의 배출을 용이하게 한다 (Armstrong, 1997). 따라서 화학 발암과정에서 중요한 방어기전으로 작용한다. 사람의 조직 세포액에서 발현되는 것으로서 가장 많이 연구되는 것은 alpha, mu, theta, pi이다 (Pickett 및 Lu, 1989; Board 등, 1990; Pemble 등, 1996). 암발생과 관련하여 GSTM1, GSTT1 다형성이 많이 연구되고 있다. GSTM1 null 유전형은 단백질이 발현되지 않는 것으로 Board가 처음 보고하였다 (1981). GSTM2-GSTM5가 간 이외의 조직과 세포주에서 발견되는데 비해 GSTM1은 간, 위, 뇌 등에서 발현되고 인종간에 발현빈도의 차이가 매우 크다 (Nakajima 등, 1995). 인구집단에서 null genotype 외에 두 가지의 mutant 형태 (GSTM1a-1a, GSTM1b-1b)가 존재하는데 이들은 catalytic activity에서 차이를 보이지 않았다 (Castonguay, 1983).

이런 발암물질 대사효소는 그 활성도와 발현 정도가 개인간에 차이가 있었다. 예를 들면 polyester 공장에서 일하는 20명의 근로자의 styrene 대사물질의 뇨 배출을 검사한 결과 한 검체에서만 대사물질이 검출되었다 (Hallier 등, 1995). 직업적으로 ethylene oxide에 노출된 97명의 남녀에서 말초단핵세포에서의 ethylene oxide에 의한 DNA 손상을 조사한 결과 67%에 달하는 감수성균에서 비감수성균에 비해 5배나 높은 DNA 단일가닥 절단 (single strand break)을 관찰하였다 (Fuchs 등, 1994). 또한 숯불에 구운 고기를 섭취한 후 백혈구에서 PAH-DNA 부가물 형성정도와 소변으로 1-hydroxypyrene glucuronide 배설을 관찰하였더니 개인간에 명백한 차이

가 있었다 (Kang 등, 1995).

흡연, 환경화학물질, 방사능, 음식성분, 바이러스 같은 암을 유발하는 특정 인자들이 확인됨에 따라 암의 발생이 주로 외적인 요인들에 의해 결정되는 것으로 생각하였으나 분자생물학적 역학조사를 통하여 발암물질에 대한 개개인의 감수성이 중요하고 여기에는 유전적 요인들이 관여한다는 것을 알게되었다. 분자역학 연구 (molecular epidemiologic study)를 통해 혈액세포, 탈락세포, 조직이나 체액을 이용해서 노출정도, 전임상효과 (preclinical effect), 감수성을 알아낼 수 있는 생체지표를 늘려가고 있다. 이런 생체지표들은 암 역학 연구에서 특정 암의 원인을 이해하고 결과를 설명하는데 필요하다 (Fig. 2). 또한 암 예방이나 치료를 평가하고 초기의 악성변이를 감지하는 데 도움을 준다 (Schwartz, 2000). 환경에 대응한 물질대사효소의 유전자단계에서 체세포 변이를 대사성 다형성 (metabolic polymorphism)이라 하는데 이것에 의해 개개인의 발암 감수성 (cancer susceptibility)이 차이가 있는 것으로 알려졌다. 예를 들면 benzo[a]pyrene (BP)이 발암물질로서 작용하기 위해서는 benzo[a]pyrene diolepoxide (BPDE)로 전환되어야 하는데 그 대사과정에서 개체간, 인종간에 CYP의 유도정도가 다르고 방어효소인 GST의 활성도에도 차이가 있으므로 동일량의 BP에 노출되었다하더라도 BPDE의 최종생성량은 다르게되어 생체내 DNA, 단백질, 지질을 손상시키는 량에 차이를 가져오게 된다. 결국 개인별로 발암물질 노출에 대한 위험도가 다르게 된다 (Fryer 및 Jones, 1999).

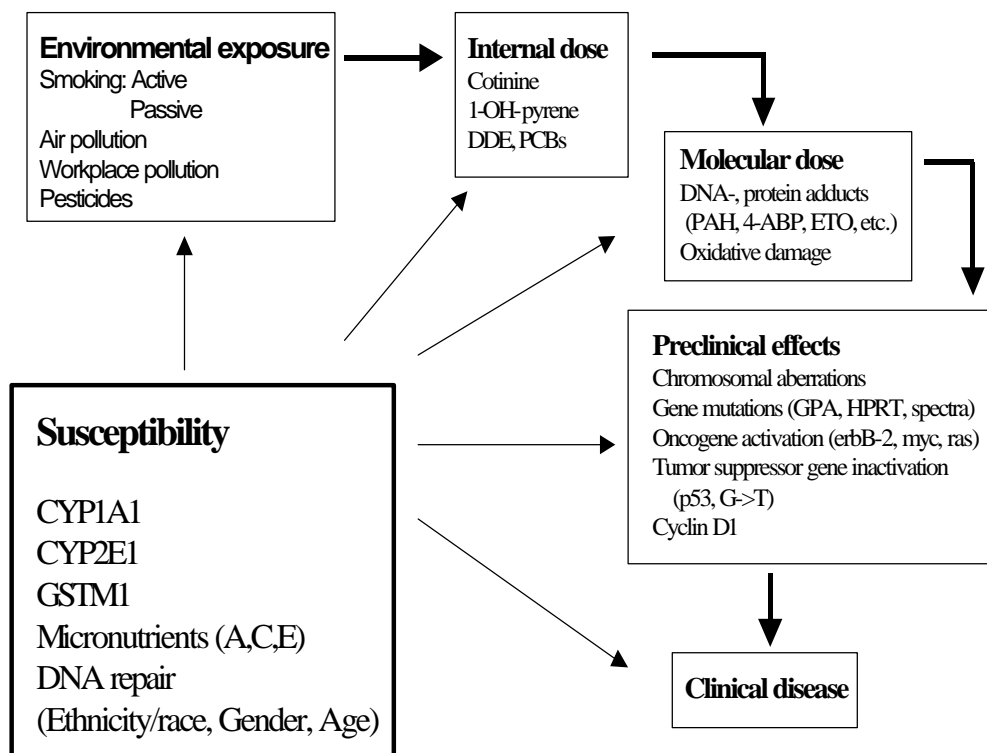


Fig. 2. Interrelationship between genetic polymorphisms and clinical diseases (Perera and Weinstein, 2000)

이처럼 발암물질에 노출되었을 때 개개인이 암에 걸릴 위험도는 선천적, 후천적 인자에 따라 다양하며 다단계로 진행되는 암 발생과정에서 환경적 인자와 개개인의 감수성 사이에 복잡한 상호작용이 일어난다. 개인의 감수성에 속하는 것으로 발암물질에 대한 대사과정의 차이, DNA 수복, protooncogene이나 암 억제유전자의 기능, 개인간의 영양, 호르몬, 면역학적인 차이를 들 수 있다 (Perera 및 Weinstein, 2000).

미국, 일본을 비롯한 선진국에서는 암 발생과 발암물질 대사효소의 유전적 차이를 관련짓는 많은 연구들이 이루어지고 있으나 그 연구 결과를 우리나라 사람에게 그대로 적용하는 것은 곤란하다. 왜냐하면 인종, 민족간에 발암물질 대사효소의 다형성 분포의 차이가 있을 뿐만 아니라 생활 환경 및 식이 습관이 서로 다르기 때문이다. 우리 나라에서 발암물질 대사효소 다형성에 대한 연구는 시작단계이며 앞으로 많은 자료의 확보가 필요하다.

PCR 방법을 통한 genomic DNA의 유전자분석은 대부분 채혈을 통한 백혈구에서 많은 량의 genomic DNA (약 100 μ g from a 10 ml blood sample)를 추출한다. 하지만 이 방법은 혈관에서 혈액을 채취해야하기 때문에 피검자에게 불편감을 주며 혈액을 통한 병원균 감염의 위험이 있고 채혈을 위한 숙련된 전문인력이 필요한 단점이 있다. 이에 비해 구강세척법은 간편한 방법으로 다량의 DNA를 얻을 수 있는 장점이 있다고 보고되었다 (Annette 및 Loic 1998). 이 연구에서는 구강세척법으로 얻은 탈락상피세포를 이용한 유전자 다형성 조사법이 혈액이나 조직에서 DNA를 추출하는 다형성 조사법을 대체할 수 있는지를 알아보기 위해 이전에 발표된 한국인을 대상으로 혈액이나 구강조직을 이용한 실험결과와 비교하여 보았다.

이 연구의 목적은 한국인에서 발암물질 대사효소인 CYP1A1, CYP2E1, GSTM1의 유전자 다형성분포를 조사하고, 구강세척법에 의해 탈락되는 구강상피세포를 이용한 유전자 다형성 조사법을 확립하는 데 있다.

제2장 연구대상 및 방법

2.1 연구대상

전신적으로 건강하고 구강내에 악성 병변이 없는 서울시내 초등학교 57명, 치과대학 재학생 75 명을 대상으로 하였다 (Table 1).

Table 1. Characteristics of study population

	male	female	total
Adolescence ^a	18	39	57
Adult ^b	47	28	75
Total	65	67	132

^a < 18 years, ^b ≥ 18 years.

2.2 연구방법

2.2.1 조직채취

참여자의 구강세척을 통해 점막세포를 얻었다. 참여자는 양치 후 1 시간 경과 시 20 ml의 가글액 (Listerine[®], Warner-Lambert Consumer Healthcare, NJ, USA)을 입에 담고 1 분간 힘차게 세척한 후 용기에 뱉었다. 즉시 다음 과정을 진행하든지 나중에 추출을 하기 위해 -20 °C에 보관하였다.

2.2.2 DNA 추출과정

참여자로부터 수거한 시료가 든 50 ml tube를 2700 rpm에서 15 분간 원심분리하였다. 상등액은 따라 버리고 효소완충용액 (TE buffer) 25 ml를

넣고 교반 한 뒤 3000 rpm에서 15 분간 원심분리 하였다. 상등액은 버리고 침전물을 700 μl 의 lysis buffer [10 mM Tris (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0), 0.1 M NaCl, 2% SDS]에 현탁시킨 후 35 μl 의 proteinase K (20 mg/ml)가 든 미세원심분리관으로 옮겼다. 시료를 잘 섞고 58 $^{\circ}\text{C}$ 의 물 항온기에서 2 시간동안 온침시켰다. 8000 rpm에서 2 분간 원심분리 후 상등액을 새로운 미세원심분리관에 옮겼다. 같은 부피의 phenol-chloroform을 넣고 DNA를 추출했다. 14,000 rpm에서 2 분간 원심분리하고 같은 부피의 chloroform을 넣고 10 초동안 교반한 후 14,000 rpm에서 4 분간 원심분리 하였다. 상등액과 3 M NaOAc, 두 배 부피의 100 % ethanol을 넣고 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2 시간동안 침전시켰다. 14,000 rpm에서 15 분간 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. 70 % ethanol로 세척하고 Automated environmental speedvac system AES1010 (Savant Instruments Inc., NY, U.S.A.)에서 30 분간 건조했다. 결정을 30 μl 의 효소완충용액으로 현탁시키고 이중에서 4 μl 를 취하여 75 배 희석용액을 만든 다음 자외선분광측정기를 이용하여 DNA를 정량하였다.

2.2.3 유전자형 분석시험 (Genotyping Assays)

2.2.3.1 중합효소 연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

중합효소 연쇄반응은 Hayashi 등 (1991c)의 방법에 따랐고 Gene-Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer, Cetus Corp., Norwalk, CT, U.S.A)을 사용하였다. 반응 혼합물은 genomic DNA 1 μg , 20 pmole의 각 시발체 (primer), 20 pmole의 dNTP 2.5 mM, 5 U/ μl 의 *Taq* 중합효소 (Perkin-Elmer, Cetus Corp., Norwalk, CT, U.S.A), 10 x buffer 3 μl , MgCl_2 1.6 μl , 멸균수 19 μl 를 반응시켰다. 시발체는 모두 TaKaRa Custom DNA사 제품을 사용하였다.

2.2.3.2 CYP1A1 유전자분석: *Msp*I (T to C transition) 다형성

중합효소 연쇄반응-제한효소 (PCR-restriction nuclease) 가수분해 분석법을 사용하였다 (Hayashi 등, 1991b). 시발체는 sense strand 5'-CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT-3', antisense strand 5'-TAGGAGTCTTGTCATGCCT-3'을 사용하였다. PCR과정은 초기변성 (initial denaturation)을 95 °C에서 4 분 시행하고, 변성 (denaturation); 95 °C에서 1 분, 시발체 결합 (annealing); 65 °C에서 1 분, DNA합성 (extension); 72 °C에서 1분의 반응을 30 회 반복하고 말기 시발체결합 (final annealing)을 65 °C에서 1 분, 말기 DNA합성 (final extension)을 72 °C에서 8 분 시행하였다. 반응산물을 *Msp*I 제한효소로 37 °C 항온기에서 2 시간동안 가수분해 한 다음 ethidium bromide (EtBr)가 든 1.8 % agarose gel 상에서 전기영동한 후 UV light 상에서 관찰하였다. 결과해석은 동형접합체 (homozygote, m1/m1)인 경우 반응산물이 340 bp에서만 나타나고, 돌연변이체 (mutant, m2/m2)인 경우 140 bp와 200 bp에서, 이형접합체 (heterozygote, m1/m2)인 경우 140 bp, 200 bp, 340 bp에서 반응산물이 나타났다 (Fig. 3).

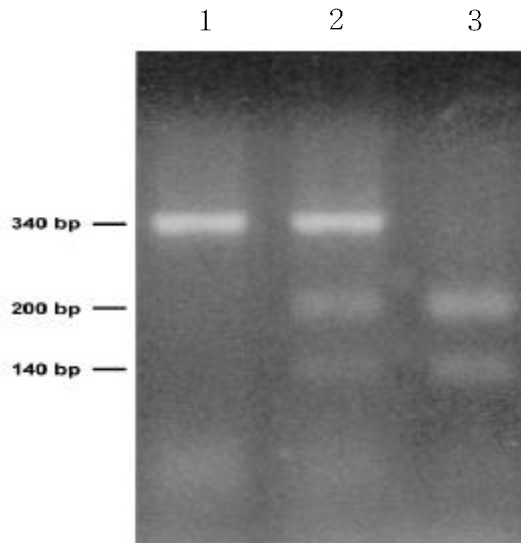


Fig. 3. CYP1A1 *Msp* I polymorphism. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) of PCR-amplified fragments obtained with *Msp* I. Samples were analyzed by 1.8 % agarose gel electrophoresis. Three possible genotypes are shown. Lane 1 represents wild type homozygote (m1/m1); Lane 2, heterozygote (m1/m2); Lane 3, mutant homozygote (m2/m2).

2.2.3.3 CYP1A1 유전자 분석: ile/val 다형성 (A to G transition)

CYP1A1 gene 의 exon 7에서 A to G transition 다형성은 대립유전자-특이 중합효소 연쇄반응 증폭방법 (allele-specific PCR amplification)을 사용하였다 (Hirvonen 등, 1992). 시발체는 2A 5'-AAGACCTCCCAGCGGGCAAT-3' (wild type sense), 2G 5'-AAGACCTCCCAGCGGGCAAC-3' (mutant type sense), C 5'-GAAAGGCTGGGTCCACCCTCT-3' (antisense)을 사용하였다. PCR 과정은 초기변성을 94 °C에서 1 분 30 초 시행하였고, 변성; 94 °C에서 1 분, 시발체결합; 70 °C에서 1 분 30 초,

DNA합성; 72 °C에서 1 분 30 초의 반응을 25 회 반복하고 말기 시발체결합을 70 °C에서 1 분, 말기 DNA합성을 72 °C에서 8 분 시행하였다. 반응산물을 EtBr가 든 1.8 % agarose gel 상에서 전기영동한 후 UV light 상에서 관찰하였다. 322 bp에서 반응산물이 확인되었는데 wild type 시발체 (2A)로 증폭한 곳에서만 나타나면 A 대립유전자 동형접합체 (ile/ile), mutant type 시발체 (2G)로 증폭한 곳에서만 반응산물이 나타나면 G대립유전자 동형접합체 (val/val), 양쪽모두에서 반응산물이 보이는 경우를 이형접합체 (ile/val)로 판독하였다 (Fig. 4).

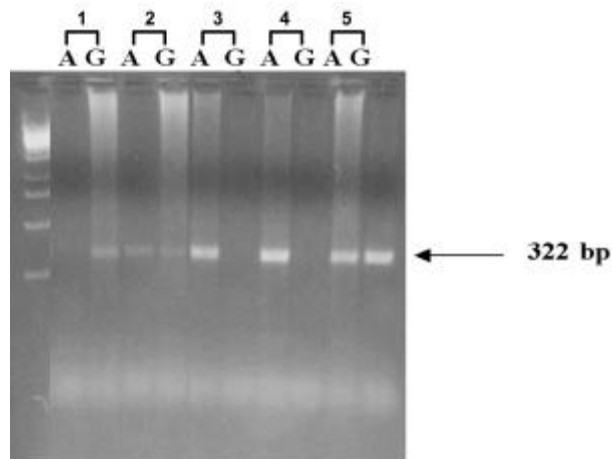


Fig. 4. CYP1A1 exon 7 polymorphism. The point mutation at position 462 resulting in a change from isoleucine (ile) to valine (val) in CYP1A1 was studied by allele-specific PCR. Lane A, wild type specific amplification; Lane G, mutation specific amplification. Presence of the 322 base pair (bp) fragment in Lane G indicates the replace mutation of ile for val in exon 7. Sample 3, 4 indicate wild type homozygote (ile/ile); Sample 1, mutant homozygote (val/val); Sample 2, 5 heterozygote (ile/val).

2.2.3.4 CYP2E1 유전자분석: *Pst* I 다형성

CYP2E1 유전자의 5' flanking 부위에 *Pst* I 제한위치를 가지는 다형성이 다. 중합효소 연쇄반응-제한효소 (PCR-restriction nuclease) 가수분해 분석법을 사용하였다 (Hayashi 등, 1991a). 사용한 시발체는 sense strand 3'-TTCATTCTGTCTTCTAACTGG-3', antisense strand 5'-CCAGTCGAGTCTACATTGTCA-3'를 사용하였다. PCR 과정은 초기변성을 95 °C에서 4 분 시행하였고, 변성; 95 °C에서 1 분, 시발체결합; 55 °C에서 1 분, DNA합성; 72 °C에서 1 분의 반응을 25 회 반복하고, 말기 시발체결합을 55 °C에서 1 분, 말기 DNA합성을 72 °C에서 7 분 시행하였다. 반응산물을 *Pst* I 제한효소로 37 °C 항온기에서 2 시간동안 가수분해 한 다음 EtBr가 든 1.8 % agarose gel 상에서 전기영동 한 후 UV light 상에서 관찰하였다. 동형접합체 (c1/c1)인 경우 반응산물이 410 bp에서만 나타났고 돌연변이체 (c2/c2)는 290 bp와 120 bp 위치에, 이형접합체 (c1/c2)는 410 bp, 290 bp, 120 bp에서 반응산물이 나타났다 (Fig. 5).

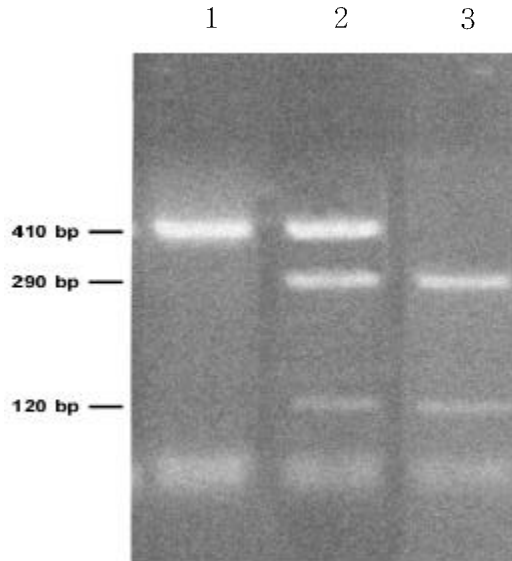


Fig. 5. CYP2E1 *Pst* I polymorphism. RFLP of PCR-amplified fragments obtained with *Pst* I. Samples were analyzed by 1.8 % agarose gel electrophoresis. PCR product (410 bp) was digested into 290 and 120 bp. Lane 1 represents wild type homozygote (c1/c1); Lane 2, heterozygote c1/c2; Lane 3, mutant homozygote (c2/c2).

2.2.3.5 GSTM1 gene loci의 결손 (deletion) 분석

GSTM1의 genotyping은 반응산물의 유무로 분류되는데 sense strand 5'-GAAGGTGGCCTCCTCCTTGG-3', antisense stand 5'-AATTCTGG ATGTAGCAGAT-3'를 사용하였다 (Daekin 등, 1996). Null type의 경우 실제로 전기영동이 된 결과인지를 확인하기 위해 internal standard로 항상 268 bp에서 DNA band를 보이는 β -golbin을 사용하였다. β -golbin의 시 발체는 sense strand 5'-CAACTTCATCCACGTTACACC-3', antisense strand 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'를 사용하였다. PCR 과정은 초기변

성을 94 °C에서 4 분 시행하였고, 변성; 94 °C에서 1 분, 시발체 결합; 63 °C에서 1 분, DNA합성; 72 °C에서 1 분의 반응을 30 회 반복하였다. 말기 시발체결합을 63 °C에서 1 분, 말기 DNA합성을 70 °C에서 10 분 시행하였다. 반응산물을 EtBr가 든 1.5 % agarose gel 상에서 전기영동하고 UV light 상에서 관찰하였다. 먼저 268 bp에서 β -globin의 band가 나타났는지를 확인하고, 215 bp에서 반응산물이 나타난 경우를 wild type, 반응산물이 나타나지 않은 경우를 null type으로 판독하였다 (Fig. 6).

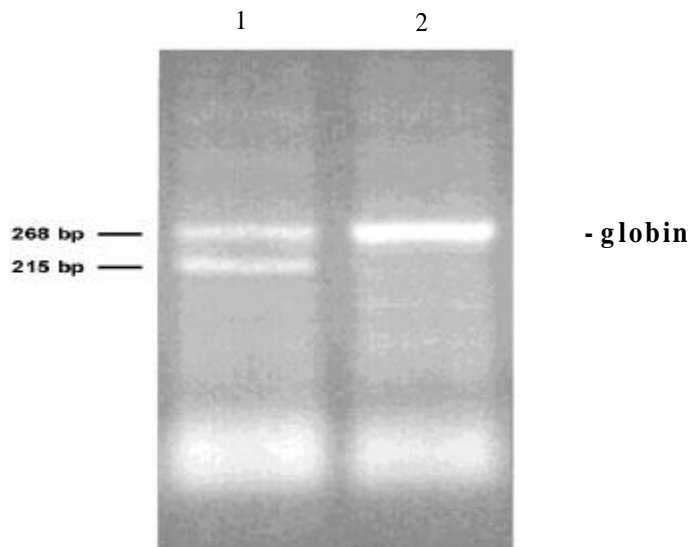


Fig. 6. Genotyping of GSTM1 gene. PCR products from coamplification of GSTM1 (215 bp) and β -globin (268 bp) were subjected to electrophoresis on an 1.5 % agarose gel. A 268 bp DNA fragment corresponding to the β -globin gene product provides an internal positive control for each reaction. The absence of a 215 bp band (lane 2) indicates the GSTM1 null genotype.

제3장 연구결과

3.1 CYP1A1 유전자분석 : *Msp*I 다형성 (T to C transition) 분포

CYP1A1 *Msp*I 다형성 유전자형의 분포는 이형접합체 (m1/m2)의 발현빈도가 55.9 %로 가장 높았고 동형접합체 (m1/m1), 돌연변이체 (m2/m2)의 발현빈도는 각각 36.6 %, 7.5 %였다 (Fig. 7).

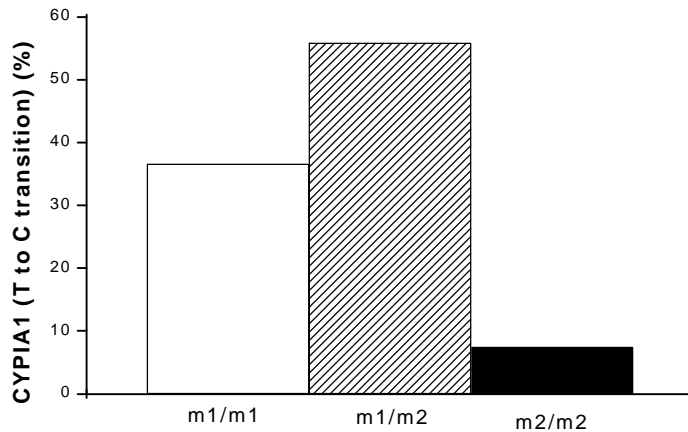


Fig. 7. Distribution of CYP1A1 genotypes (*Msp*I) in Koreans

CYP1A1 *Msp*I 다형성분포를 나이와 성별로 구분해서 보면 다음과 같다 (Table 2).

Table 2. Distribution of CYP1A1 genotypes (*Msp*I) in Koreans

		m1/m1 % (N)	m1/m2 % (N)	m2/m2 % (N)
Total	93	36.6 (34)	55.9 (52)	7.5 (7)
Male	45	44.4 (20)	46.7 (21)	8.9 (4)
Female	48	29.2 (14)	64.6 (31)	6.3 (3)
Adolescence ^a	44	18.2 (8)	72.7 (32)	9.1 (4)
Adult ^b	49	53.1 (26)	40.8 (20)	6.1 (3)

^a < 18 years, ^b ≥ 18 years.

3.2 CYP1A1 유전자분석 : Exon 7 다형성 (ile/val) 분포

CYP1A1 exon7 (ile/val) 다형성 유전자형의 분포는 이형접합체 (ile/val)의 발현빈도가 81.8 %로 가장 높았고, 동형접합체 (ile/ile)와 돌연변이체 (val/val) 유전자형의 빈도는 각각 9.1 %로 나타났다 (Fig. 8).

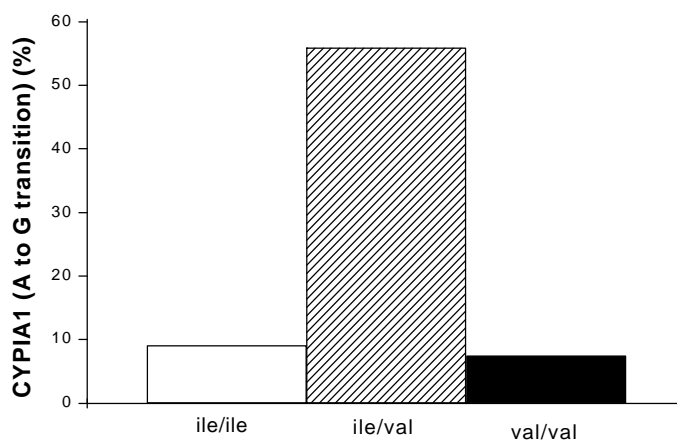


Fig. 8. Distribution of CYP1A1 exon 7 (ile/val) genotypes in Koreans

CYP1A1 exon 7 다형성분포를 나이와 성별로 구분해서 보면 다음과 같다 (Table 3).

Table 3. Distribution of CYP1A1 exon 7 (ile/val) genotypes in Koreans

		ile/ile % (N)	ile/val % (N)	val/val % (N)
Total	110	9.1 (10)	81.8 (90)	9.1 (10)
Male	53	7.5 (4)	79.2 (42)	13.2 (7)
Female	57	10.5 (6)	84.2 (48)	5.3 (3)
Adolescence ^a	57	7.0 (4)	77.2 (44)	15.8 (9)
Adult ^b	53	11.3 (6)	86.8 (46)	1.9 (1)

^a < 18 years, ^b ≥ 18 years.

3.3 CYP2E1 유전자 분석: Pst I 다형성 분포

CYP2E1 Pst I 유전자형의 분포는 동형접합체 (c1/c1)가 54.4 %, 이형접합체 (c1/c2)가 42.7 %, 돌연변이체 (c2/c2)는 2.9 %로 나타났다 (Fig. 9).

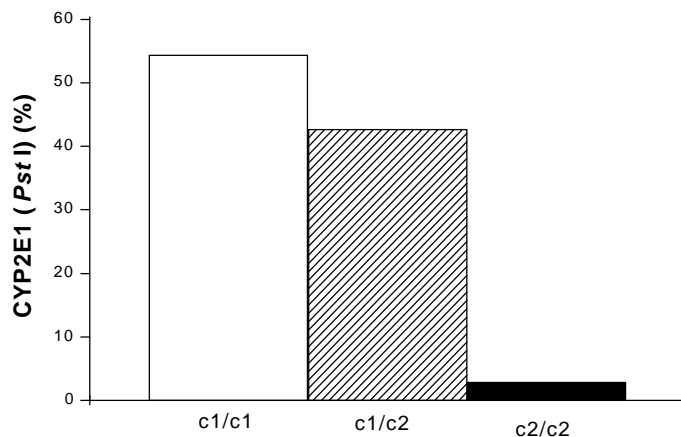


Fig. 9. Distribution of CYP2E1 (Pst I) genotypes in Koreans

CYP2E1 *Pst* I 유전자형 다형성분포를 나이와 성별로 구분해서 보면 다음과 같다 (Table 4).

Table 4. Distribution of CYP2E1 (*Pst* I) genotypes in Koreans

		c1/c1 % (N)	c1/c2 % (N)	c2/c2 % (N)
Total	103	54.4 (56)	42.7 (44)	2.9 (3)
Male	52	61.5 (32)	36.5 (19)	1.9 (1)
Female	51	47.1 (24)	49.0 (25)	3.9 (2)
Adolescence ^a	49	44.9 (22)	49.0 (24)	6.1 (3)
Adult ^b	54	63.0 (34)	37.0 (20)	0 (0)

^a < 18 years, ^b ≥ 18 years.

3.4 GSTM1 유전자분석

GSTM1의 유전자형의 분포는 wild type이 39 %, null type이 61 %로 나타났다 (Fig. 10).

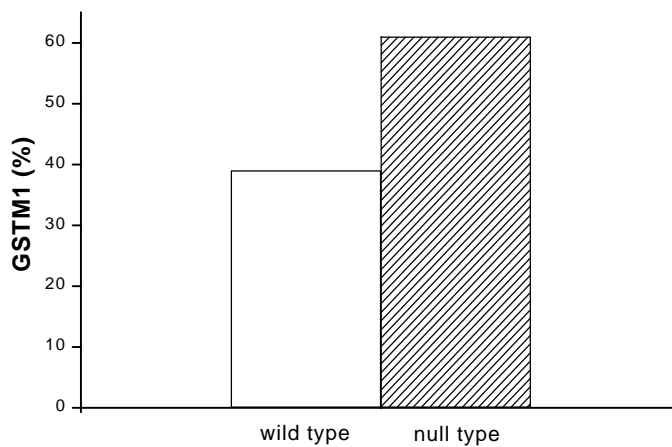


Fig. 10. Distribution of GSTM1 genotypes in Koreans

GSTM1 유전자형 다형성분포를 나이와 성별로 구분해서 보면 다음과 같다 (Table 5).

Table 5. Distribution of GSTM1 genotypes in Koreans

		wild % (N)	null % (N)
Total	123	39.0 (48)	61.0 (75)
Male	61	44.3 (27)	55.7 (34)
Female	62	33.9 (21)	66.1 (41)
Adolescence ^a	53	39.6 (21)	60.4 (32)
Adult ^b	70	38.6 (27)	61.4 (43)

^a < 18 years, ^b ≥ 18 years.

제4장 총괄 및 고찰

지난 수 십 년간 암을 연구하는데 많은 노력과 경제적인 투자를 하였음에도 불구하고 발병률과 사망률의 감소는 매우 더디게 진행되고 있으며, 그나마 이런 결과도 치료법의 발전에 의한 것이라기보다 금연운동, 근로작업장의 환경개선, 식생활 개선 등을 통한 예방효과에 기인한 것으로 여겨진다 (Bailar 및 Gornik, 1997; Pisani 등, 1993). 따라서 암의 위험으로부터 벗어나는 가장 좋은 방법은 예방하는 것이다. 암의 위험을 줄일 수 있는 효과적인 방법은 발암물질의 수를 감소시키고 노출되는 정도를 감소시키는 것이다 (Tomatis 등, 1997).

최근까지도 암과 관련된 역학적 연구는 유해물질의 노출과 그 결과, 즉 암 발생간의 관계만을 연구하는데 한정되고 개인의 감수성에 의한 조절(modulation)은 제대로 평가되지 않았다 (Perera 및 Weistein, 2000). 최근 몇 년 내 환경적 요소와 개인의 감수성간의 관련성에 대해 많은 연구가 이루어지고 있다. 암역학 연구에 대사성 다형성 연구를 포함시키는 것은 세가지 이유에서 중요하다. 첫째 화학물질에 의해 유도되는 암발생에 보다 민감한 집단을 구별 지우므로써 암역학 연구의 효용성을 증가시키고, 둘째는 원인물질의 대사에 관련된 대사효소에 대한 지식을 통해 발암가능성이 의심되는 물질의 역할을 확실히 알 수 있게된다. 셋째는 적은 량의 노출과 관련하여 개인의 감수성을 고려한 암발생 위험을 평가하고 노출정도의 허용 가능한 한계치를 결정할 수 있다 (Vineis 등, 1999).

이 연구에서 이용한 구강세척법에 의해 채집한 시료 중에서 일부는 유전자 분석에 실패하였다. CYP1A1 *Msp*I의 경우 전체 132 명중 93 명 (70.5 %)에서, CYP1A1 A to G transition의 경우는 110 명 (83.3 %), CYP2E1은 103 명 (78 %), GSTM1은 108 명 (81.8 %)에서 결과를 관찰할

수 있었다. 유사한 방법을 이용한 Annette와 Loic (1998)의 실험에서는 CYP1A1 *Msp* I 인 경우 98 %, CYP1A1 A to G transition의 경우 92 %, GSTM1인 경우 98 % 성공률을 보였는데 이 결과와는 차이가 있었다. 그 원인은 실험에서 선택한 시발체 영역 내에 돌연변이가 일어난 경우를 생각할 수 있다. 즉 이 실험에서 사용한 시료중 평균 10 % 이상이 사용된 시발체에 의해 반응 산물을 얻을 수 없었는데 이는 우리나라 사람에서 특이한 유전자 다형성이 존재할 수 있는 가능성을 암시한다. 따라서 이 부위에서 우리나라 사람에서만 있을 수 있는 유전자 다형성이 연구되어야 할 것이다. 사용한 가글액도 약간의 차이가 있었다. 즉 Annette와 Loic (1998)의 실험에서는 가글액의 alcohol 함량이 21.6 %인데 비해 이 실험에서 사용한 가글액은 26.9 %로 alcohol 함량이 다소 높았다. Alcohol이 든 가글액을 사용하는 것이 생리식염수를 사용하는 것보다 세균에 의한 오염을 억제할 수 있는 유리한 점이 있는 반면 적정수준 이상의 alcohol 농도는 외부조건에 민감한 DNA 증폭과정의 특성상 좋지 않은 영향을 주었을 가능성이 있다.

결과관정이 가능한 93 명을 대상으로 CYP1A1 *Msp* I 다형성분포 분석 결과 이형접합체 (m1/m2)의 빈도가 가장 크게 나타났다. 18 세 전후의 비교에서 18 세 이전에서 이형접합체의 빈도가 72.7 %로 매우 높았고 18세 이후에서는 오히려 동형접합체 (m1/m1)의 빈도가 가장 높게 나타났다. 이 결과가 한국인에서 CYP1A1 *Msp* I 분포양상이 변화하고 있는 것인지는 더 많은 비교자료가 필요할 것 같다. 남녀간의 비교에서는 수치에서 약간의 차이를 보였지만 전체적인 분포양상은 유사하였다. 실험결과를 이전에 발표된 국내외 논문의 연구결과와 비교하여 인종, 민족간의 차이를 보았다 (Table 6).

Table 6. Distribution of CYP1A1 genotypes (*Msp*I) in healthy controls (%)

population	sampling	N	m1/m1	m1/m2	m2/m2	reference
Swedish	blood	329	83.9	15.8	0.3	Alexandrie (1994)
Finlander	blood	121	78.5	19.8	1.7	Hirvonen (1992)
Norwegian	blood	212	78.8	20.3	0.9	Tefre (1991)
Caucasian	blood	47	49.0	47.0	4.0	Sivalaman (1994)
Japanese	blood	185	43.8	38.4	17.8	Kihara (1995)
Japanese	blood	100	62	30	8	Tanimoto (1999)
Korean	blood	63	46	49	5	Hong (1998)
Korean	oral mucosa	50	16	68	16	차 인호 (2000)
Korean	epithelium	93	36.6	55.9	7.5	

스웨덴, 핀란드, 노르웨이 같은 북유럽인에서는 동형접합체가 80 % 전후로 높게 나타났고 돌연변이체는 1 % 전후로 나타났다. 코카시안과 일본인에서 동형접합체가 더 많은 반면 한국인에서는 이형접합체가 더 많은 것으로 나타났다. 이 결과는 한국인에서 혈액을 이용한 Hong 등 (1998)의 연구결과, 구강조직을 이용한 차 (2000)의 연구결과와 유사하였다.

CYP1A1 ile-val 다형성은 *Msp*I 다형성과 밀접한 관계가 있고 (Nakachi 등, 1995) 일본인에서 흡연과 관련된 편평세포암과 높은 연관성을 보였다 (Hayashi 등, 1991c). 이 결과는 코카시안이나 북유럽인을 대상으로 한 연구결과와는 일치하지 않는데 이는 코카시안이나 북유럽인에서는 ile-val 다형성의 빈도가 아주 낮기 때문에 이 다형성이 폐암발생의 위험인자로 작용할 가능성이 낮아서 인 것으로 생각된다. 한국인에서 ile-val 다형성은 이형접합체의 발현빈도가 81.8 %로 높게 나타났다. 이 경향은 18세 전후, 남녀간의 비교에서도 유사하게 나타났다. 인종간의 비교에서 서양인에서는 동형접합체의 빈도가 절대적으로 높은 반면 한국인에서 특징적으

로 이형접합체의 빈도가 높게 나타났다. 이는 이전에 한국인을 대상으로 혈액을 이용한 Hong 등 (1998)의 연구결과, 구강조직을 이용한 차 (2000)의 연구결과와도 일치하였다. 같은 동양권인 일본인과 비교했을 때도 뚜렷한 차이가 있는 것으로 보아 같은 인종이라도 민족간에 차이가 있음을 확인하였다 (Table 7).

Table 7. Distribution of CYP1A1 genotypes (ile/val) in healthy controls (%)

population	sampling	N	ile/ile	ile/val	val/val	reference
Swedish	blood	329	93.0	7.0	0	Alexandrie (1994)
German	blood	171	93.6	11	0	Drakoulis (1994)
Brazilian	blood	108	84.3	13.9	1.8	Hamada (1995)
Caucasian	blood	228	85.5	13.6	0.9	Ambrosone (1995)
Japanese	blood	358	65.8	30.2	4.7	Kawajiri (1993)
Korean	blood	63	3	95	2	Hong (1998)
Korean	oral mucosa	50	10	88	2	차 인호 (2000)
Korean	epithelium	110	9.1	81.8	9.1	

CYP2E1 *Pst* I / *Rsa* I 다형성은 wild genotype이 폐암 특히 편평세포암종, 소세포암종과 관련이 있는 것으로 즉 위험이 더 높은 것으로 보고되었다 (El-zein 등, 1997). 암발생 위험이 유전자의 발현이 아닌 single polymorphism과 연계되어있기 때문에 genotype-based study를 한다. 한국인에서 *Pst* I 다형성 분포는 wild type이 75.7 %, mutant type이 24.3 %로 나타났다. 18 세 전후, 남녀간의 비교에서는 전체 집단의 분포와 유사한 양상을 보였다. 인종간의 차이를 보면 *Pst* I 다형성은 미국인이나 유럽인에 비해 일본인과 중국인에서 돌연변이체가 많이 나타나며 같은 동남아시아권인 한국인도 이와 비슷한 분포를 보였다 (Table 8).

Table 8. Distribution of CYP2E1 *Pst* allele frequencies in healthy controls (%)

population	sample	N	wild(c1)	mutant(c2)	reference
Swedish	blood	148	95	5	Persson (1993)
European-American	blood	126	99	1	Stephens (1994)
African-American	blood	449	96	4	Stephens (1994)
Chinese	blood	100	75	25	Chao (1995)
Taiwanese	blood	150	79.7	20.3	Yu (1995)
Japanese	blood	202	80.7	19.3	Watanabe (1990)
Korean	periodontal tissue	148	74.7	25.3	김정숙 (2000)
Korean	epithelium	103	75.7	24.3	저자

GSTM1 가
 null type 가
 (Seidegard , 1990; Zhong , 1991; Nakajima , 1995; McWilliams , 1995).

(Bell , 1993; Daly , 1993). GSTM1

null type 61 % wild type

Hong (1998), (1999)

. 18 ,

null type 6:4

가

null

type

(Table 9).

Table 9. Distribution of GSTM1 genotypes in healthy controls (%)

population	sample	N	GSTM1 (wild)	GSTM1 (null)	reference
American	blood	42	52	48	Trizna (1995)
Caucasian	buccal cell	133	51.1	48.9	Park (1997)
Caucasian	blood	40	45.2	54.8	Daekin (1996)
Indian	epithelium	82	82.9	17.1	Nair (1999)
Japanese	blood	100	58	42	Tanimoto (1999)
Taiwanese	blood	123	41.5	58.5	Hung (1997)
Taiwanese	blood	150	36.7	63.3	Yu (1995)
Korean	blood	90	51.1	48.9	박수경 (1999)
Korean	blood	63	48	52	Hong (1998)
Korean	epithelium	108	39	61	저자

제5장 결 론

18 세 전후의 한국인 132 명을 대상으로 구강세척법에 의해 탈락된 구강상피세포를 이용하여 발암물질 대사효소의 유전자 다형성분포를 알아본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. CYP1A1 *Msp* I 다형성 유전자형의 분포는 이형접합체 (m1/m2)의 발현빈도가 55.9 %로 가장 높았고, 동형접합체 (m1/m1)는 36.6 %, 돌연변이체 (m2/m2)는 7.5 %였다.

2. CYP1A1 exon 7 다형성 유전자형의 분포는 이형접합체 (ile/val)의 발현빈도가 81.8 %로 가장 높았고, 동형접합체 (ile/ile)와 돌연변이체 (val/val)는 각각 9.1 %로 나타났다.

3. CYP2E1 *Pst* I 유전자형의 분포는 동형접합체 (c1/c1)가 54.4 %, 이형접합체 (c1/c2)가 42.7 %, 돌연변이체 (c2/c2)는 2.9 %로 나타났다.

4. GSTM1 유전자형의 분포는 wild type이 39 %, null type이 61 %로 나타났다.

5. CYP1A1 *Msp* I 다형성 관찰결과 서양인에서는 동형접합체가 많은 반면 한국인에서는 이형접합체가 더 많은 것으로 나타났다.

6. CYP1A1 A to G transition 다형성 관찰결과 한국인에서 특이적으로 이형접합체가 80 % 이상으로 높게 나타났으며 이는 같은 동양권인 일본인 과도 차이가 있었다.

7. 한국인을 포함한 동남아시아인의 CYP2E1 *Pst* I 다형성은 미국인이 나 유럽인에 비해 돌연변이체가 높게 나타났다.

8. 한국인의 GSTM1 다형성은 외국인에 비해 null type이 다소 많은 것으로 나타났다.

9. 탈락상피세포를 이용한 실험결과는 이전에 혈액이나 구강조직을 이용한 실험결과와 유사하였다.

이상의 결과에서 한국인에서 발암물질 대사효소인 CYP1A1, CYP2E1, GSTM1의 유전자 다형성분포는 다른 인종이나 민족과는 차이가 있는 것으로 나타났다. 탈락상피세포를 이용한 연구결과는 한국인을 대상으로 혈액이나 조직을 이용한 이전의 연구결과와 유사하게 나타났다. 따라서 많은 사람을 대상으로 하는 대사효소의 다형성 연구에서는 혈액이나 조직을 이용하는 것보다 구강세척법을 사용하는 것이 유용하리라 생각된다.

참고문헌

- 김정숙. 2000. 한국인 치주조직에서 흡연물질 대사효소의 유전자 다형성. 박사학위 논문, 연세대학교 대학원, 서울.
- 박수경, 강대회, 유근영, 이승준, 김영철, 강한성, 서준석, 안세현, 노동영, 최국진. 1999. 한국인 유방암에서 GSTM1, T1 유전자 다형성의 역할에 관한 환자-대조군 연구 (preliminary report). J. Korean Cancer Assoc., 31: 653-662.
- 차인호. 2000. 한국인 구강 편평상피세포암종에서 Glutathione S-transferase와 CYP1A1 유전자의 다형성. 박사학위 논문, 고려대학교 대학원, 서울.
- Alexandrie, A-K., Sundberg, M. I., Seidegard, J., Tornling, G., and Rannug, A. 1994. 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, 15: 1785-1790.
- Ambrosone, C. B., Freudenheim, J. L., Graham, S., Marshall, J. R., Vena, J. E., Brasure, J. R., Laughlin, R., Nemoto, T., Michalek, A. M., Harrington, A., Ford, T. D., and Shields, P. 1995. Cytochrome P4501A1 and glutathione S-transferases (M1) genetic polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk. Cancer Res. 55: 3483-3485.
- Annette, L., and Loic, L. M. 1998. A simple mouthwash method for obtaining genomic DNA in molecular epidemiological studies. Cancer Epidemiol. Biomark. Prav., 7: 719-24.

- Armstrong, R. N. 1997. Structure, catalytic mechanism and evolution of the glutathione transferases. *Chem. Res. Toxicol.* 10: 2-18.
- Bailar III, J. C., and Gornick, H. L. 1997. Cancer undefeated. *N. Engl. J. Med.*, 336: 1569-1574.
- Bell, D. A., Taylor, J. A., Paulson, D. F., Robertson, C. N., Mohler, J. L., and Lucier, G. W. 1993. Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 85: 1159-1164.
- Board, P. G. 1981. Biochemical genetics of glutathione S-transferase in man. *Am. J. Hum. Genet.*, 33: 36-43.
- Board, P., Coggan, M., Johnston, P., Ross, V., Suzuki, T., and Webb, G. 1990. Genetic heterogeneity of the human glutathione-S-transferases, a complex of gene families. *Pharmacol. Ther.* 48: 357-369.
- Cascorbi, I., Brockmoller, J., and Roots, I. 1996. A C4887A polymorphism in exon 7 of human CYP1A1: Population frequency, mutation linkages, and impact on lung cancer susceptibility. *Cancer Res.* 56: 4965-4969.
- Castonguay, A., Stoner, G. D., Schut, H. A. J., and Hecht, S. S. 1983. Metabolism of tobacco-specific N-nitrosamines by cultured human tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 6694-6697.
- Chao, Y-C., Young, T-H., Chang, W-K., Tang, H-S., and Hsu, C-T. 1995. An investigation of whether polymorphisms of cytochrome P4502E1 are genetic markers of susceptibility to alcoholic end-stage organ damage in Chinese populations, *Hepatology* 22: 1409-1414.

- Crofts, F., Cosma, G. N., Currie, D., Taioli, E., Toniolo, P., and Garte, S. 1993. A novel CYP1A1 gene polymorphism in African-Americans. *Carcinogenesis*, 14: 1729-1731.
- Daekin, M., Elder, J., Hendrickse, C., Peckham, D., Baldwin, D., Pantin, C., Wild, N., Leopard, P., Bell, D. A., Jones, P., Duncan, H., Brannigan, K., Aldersea, J., Fryer, A. A., and Strange, R. C. 1996. Glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cancer: studies of interactions with GSTM1 in lung, oral, gastric and colorectal cancers. *Carcinogenesis*, 17: 881-884.
- Daly, A. K., Thomas, D. J., Cooper, J., Pearson, W. R., Neal, D. E., and Idle, J. R. 1993. Homozygous deletion of gene for glutathione S-transferase M1 in bladder cancer. *Br. Med. J.*, 307: 481-482.
- Drakoulis, N. D., Cascorbi, I., Brockmoller, C. R., and Roots, G. I. 1994. 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. Investig.*, 72: 240-248.
- Errico, A., Malats, N., Vineis, P., and Boffetta, P. 1999. "Review of studies of selected metabolic polymorphisms and cancer" In *Metabolic polymorphisms and susceptibility to Cancer*. Lyon, IARC Scientific Publications, Vol. 148.
- El-zein, R. A., Zwishenberger, J. B., Abdel-Rahman, S. Z., Snakar, A. B., and Au, W. W. 1997. Polymorphism of metabolizing genes and lung cancer histology: prevalence of CYP2E1 in adenocarcinoma. *Cancer Letters*, 112: 71-78.

- Fryer, A. A. and Jones, P. W. 1999. "Interactions between detoxifying enzyme polymorphisms and susceptibility to cancer" In Metabolic polymorphisms and susceptibility to Cancer. Lyon, IARC Scientific Publications, Vol. 148.
- Fuchs, J., Wullenweber, U., Hengstler, J. G., Bienfait, H. G., Hiltl, G., and Oesch, F. 1994. Genotoxic risk for humans due to work place exposure to ethylene oxide, remarkable individual differences in susceptibility. Arch. Toxicol. 68: 343-348.
- Guengerich, F. P., Kim, D. H., and Iwasaki, M. 1991. Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. Chem. Res. Toxicol., 4: 168-179.
- Hallier, E., Goergens, H. W., Karels, H., and Golka, K. 1995. A note on individual differences in the urinary excretion of optical enantiomers of styrene metabolites and of styrene-derived mercapturic acids in humans. Arch. Toxicol. 69: 300-305.
- Hamada, G. S., Sugimura, H., Suzuki, I., Nagura, K., Kiyokawa, E., Iwase, I., Tanaka, M., Takahashi, T., Watanabe, S., Kino, I., and Tsugane, S. 1995. The heme-binding region polymorphism of cytochrome P4501A1 (Cyp1A1), rather than the *Rsa* I polymorphism of IIE1 (CypIIE1), is associated with lung cancer in Rio de Janeiro. Cancer Epidemiol. Biomark. Prev., 4: 63-67.
- Hayashi, S-I., Watanabe, J., and Kawajiri, K. 1991a. Genetic polymorphisms in the 5' flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450 IIE1 gene. J. Biochem., 110: 559-565.

- Hayashi, S-I., Watanabe, J., Nakachi, K., and Kawajiri, K. 1991b. Genetic linkage of lung cancer-associated *Msp* I polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P4501A1 gene. *J. Biochem.*, 110: 407-411.
- Hayashi, S-I., Watanabe, J., Nakachi, K., and Kawajiri, K. 1991c. PCR detection of an A/G polymorphism within exon 7 of the CYP1A1 gene. *Nucleic Acids Res.*, 17: 4797.
- Hayes, J. D., and Pulford, D. J. 1995. The glutathione-S-transferase supergene family: Regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30(6): 445-600.
- Hill, J. 1761. *Caution against the immoderate use of snuff*, London, R Baldwin.
- Hivonen, A., Husgafvel-Pursiainen, K., Karjalainen, A., Antilla, S., and Vainio, H. 1992. Point mutational *Msp* I 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.*, 1; 485-489.
- Hong, Y-S., Chang, J-H., Kwon, O-J., Ham, Y-A., and Choi, J-H. 1998. Polymorphism of the CYP1A1 and glutathione-S-transferase genes in Korean lung cancer patients. *Experimental and Molecular Medicine*, 30: 192-198.
- Hung, H-C., Chuang, J., Chien, Y-C., Chern, H-D., Chiang, C-P., Kuo, Y-S, Hildesheim, A., and Chen, C-J. 1997. Genetic polymorphisms of CYP2E1, GSTM1, and GSTT1; Environmental factors and risk of oral cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 6: 901-905.

- Kang, D. H., Rothman, N., Poirier, M. C., Greenberg, A., Hsu, C. H., Schwartz, B. S., Baser, M. E., Groopman, J. D., Weston, A., and Strickland, P. T. 1995. Interindividual differences in the concentration of 1-hydroxypyrene-glucuronide in urine and polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in peripheral white blood cells after charbroiled beef consumption. *Carcinogenesis*. 16: 1079-1085.
- Kato, S., Shields, P. G., Caporaso, N. E., Hoover, R. N., Trump, B. F., Sugimura, H., Weston, A., and Harris, C. C. 1992. Cytochrome P450 II E1 genetic polymorphisms, racial variation, and lung cancer risk. *Cancer Res.*, 52: 6712-6715.
- Kawajiri, K. 1999. "CYP1A1" In *Metabolic polymorphisms and susceptibility to Cancer*. Lyon, IARC Scientific Publications, Vol. 148.
- Kawajiri, K., and Fujii-Kuriyama, Y. 1991. P450 and human cancer. *Jpn. J. Cancer Res.*, 82: 1325-1335.
- Kawajiri, K., Nakachi, K., Imai, K., Watanabe, J., and Hayashi, S-I. 1993. The CYP1A1 gene and cancer susceptibility. *Crit. Rev. Oncol. hematomol.*, 14: 77-87.
- Kawajiri, K., Watanabe, J., and Hayashi, S-I. 1996. Identification of allelic variants of human CYP1A1 gene. *Methods Enzymol.*, 272: 226-232.
- Kihara, M., Kihara, M., and Noda, K. 1995. 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*, 16: 2331-2336.

- Lang, M., and Pelkonen, O. 1999. "Metabolism of xenobiotics and chemical carcinogenesis" In *Metabolic polymorphisms and susceptibility to Cancer*. Lyon, IARC Scientific Publications, Vol. 148.
- McWilliams, J. E., Sanderson, B. J. S., Harris, E. L., Richert-Boe, K. E., and Henner, W. D. 1995. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) deficiency and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 4: 589-594.
- Nair, U. J., Nair, J., Mathew, B., and Bartsch, H. 1999. Glutathione S-transferase M1 and T1 null genotypes as risk factors for oral leukoplakia in ethnic Indian betel quid/tobacco chewers. *Carcinogenesis*, 20: 743-748.
- Nakachi, K., Hayashi, S-I., Kawajiri, K., and Imai, K. 1995. Association of cigarette smoking and CYP1A1 polymorphisms with adenocarcinoma of the lung by grades of differentiation. *Carcinogenesis*, 16: 2209-2213.
- Nakajima, T., Elovaara, E., Anttila, S., Hirvonen, A., Camus, A-M., Hayes, J. D., Ketterer, B., and Vainio, H. 1995. Expression and polymorphism of glutathione S-transferase in human lungs: risk factors in smoking-related lung cancer. *Carcinogenesis*, 16: 707-711.
- Nebert D. W., Nelson, D. R., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Feyereisen, R., Fujii-Kuriyama, Y., Gonzalez, F. J., Guengerich, F. P., Gunsalus, I. C., Johnson, E. F., Loper, J. C., Sato, R., Waterman, M. R., and Waxman, D. J. 1991. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol.*, 10: 1-14.

- Okita, R. T., and Masters, B. S. S. 1997. Biotransformation: The Cytochromes P450. Chap 23 In Textbook of Biochemistry. Devlin, T. M., edi., 4th edi., New York, Wiley-Liss.
- Park, J. Y., Muscat, J. E., Ren, Q., Schantz, S. P., Harwick, R. D., Stern, J. C., Pike, V., Richie, Jr., J. P., and Lazarus, P. 1997. CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms and oral cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 6: 791-797.
- Pemble, S. E., Wardle, A. F., and Taylor, J. B. 1996. Glutathione s-transferases class kappa: characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue. *Biochem. J.* 319: 749-754.
- Percivall Pott. 1775. Chirurgical observations relative to the contact, the polypus of the nose, the cancer of the scrotum, the different kinds of ruptures, and the mortification of the toes and feet. London; Hawes, Clark and Collins.
- Perera, F. P., and Weistein, I. B. 2000. Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *Carcinogenesis*, 21: 517-525.
- Persson, I., Johansson, I., Bergling, H., Dahl, M-L., Seidegard, J., Rylander, R., Rannug, A., Hogberg, J., and Ingelman-Sundberg, M. 1993. Genetic polymorphism of cytochrome P4502E1 in a Swedish population: relationship to incidence of lung cancer. *FEBS Lett.* 319: 207-211.
- Petersen, D. D., Mckinney, C. E., Ikeya, K., Smith, H. H., Bale, A. E., McBride, O. W., and Nebert, D. W. 1991. Human CYP1A1 gene: Cosegregation of the enzyme inducibility phenotype and an RFLP. *Am. J. Hum. Genet.*, 48: 720-725.

- Pickett, C. B., and Lu, A. Y. H. 1989. Glutathione S-transferases : Gene structure, regulation, and biological function. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 743-764.
- Pisani, P., Parkin, D. M., and Ferlay, J. 1993. Estimates of the worldwide mortality from eighteen major cancers in 1985. Implications for prevention and projections of future burden. *Int. J. Cancer.* 55: 891-903.
- Raunio, H., Husgafvel-Pursiainen, K., Anttila, S., Hietanen, E., Hiroven, A., and Pelkonen, O. 1995. Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility- a review. *Gene*, 159: 113-121.
- Rehn, L. 1895. Blasengeschwulste bei fuchsin-arbeitern (Bladder tumors in Fuchsin workers). *Arch. Klin. Chir.* 50: 588-600.
- Redmond, Jr. D. E. 1970. Tobacco and cancer : the first clinical report, 1761. *New England J. Med.* 282: 18-23.
- Ruddon, R. W. 1995. Cause of cancer. In *Cancer biology*. 3rd ed. New York, Oxford, Oxford University Press.
- Schwartz, J. L. 2000. Biomarkers and molecular epidemiology and chemoprevention of oral carcinogenesis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 11: 92-122.
- Seidegard, J., Pero, R. W., Markowitz, M. M., Roush, G., Miller, D. G., and Beattie, E. J. 1990. Isoenzyme(s) of glutathione transferase (class Mu) as a marker for susceptibility to lung cancer : a follow up study. *Carcinogenesis*, 11: 33-36.

- Sivaraman, L., Leatham, M. P., Yee, J., Wilkens, L. R., Lau, A. F., and Marchand, L. L. 1994. CYP1A1 genetic polymorphisms and in situ colorectal cancer. *Cancer Res.*, 54: 3692-3695.
- Spurr, N. K., Gough, A. C., Stevenson, K., and Wolf, C. R. 1987. *Msp*-I polymorphism detected with a cDNA probe for the P-450 I family on chromosome 15. *Nucleic Acids Res.*, 15: 5901.
- Stephens, E. A., Taylor, J. A., Kaplan, N., Yang, C. H., Hsieh, L. L., Lucier, G. W., and Bell, D. A. 1994. Ethnic variation in the CYP2E1 gene, polymorphism analysis of 695 African-Americans, European Americans and Taiwanese. *Pharmacogenetics* 4: 185-192.
- Tanimoto, K., Hayashi, S-I., Yoshiga, K., and Ichikawa, T. 1999. Polymorphisms of the CYP1A1 and GSTM1 gene involved in oral squamous cell carcinoma in association with a cigarette dose. *Oral Oncol.*, 35: 191-196.
- Tefre, T., Ryberg, D., Haugen, A., Nebert, D. W., Skaug, V., Brogger, A., and Borresen, A. L. 1991. Human CYP1A1 (cytochrome P₁-450) gene: Lack of association between the *Msp*I restriction fragment length polymorphism and incidence of lung cancer in a Norwegian population. *Pharmacogenetics* 1: 20-25.
- Tomatis, L., Huff, J., Hertz-Picciotto, I., Sandler, D. P., Bucher, J., Boffeta, P., Axelson, O., Blair, A., Taylor, J., Stayner, L., and Barrett, J. C. 1997. Avoided and avoidable risks of cancer. *Carcinogenesis*, 18: 97-105.
- Trizna, Z., Clayman, G. L., Spitz, M. R., Briggs, K. L., and Goepfert, H. 1995. Glutathione S-transferase genotypes as risk factors for head and neck cancer. *Am. J. Surg.*, 170: 499-501.

- Uematsu, F., Kikuchi, H., Abe, T., Motomiya, M., Ohmachi, T., Sagami, I., and Watanabe, M. 1991a. *Msp* I polymorphism of the human CYP2E gene. *Nucleic Acids Res.*, 19: 5797.
- Uematsu, F., Kikuchi, H., Motomiya, M., Abe, T., Sagami, I., Ohmachi, T., Wakui, A., Kanamaru, R., and Watanabe, M. 1991b. Association between restriction fragment length polymorphism of the human cytochrome P450IIE1 gene and susceptibility to lung cancer. *Jpn. J. Cancer Res.*, 82: 254-256.
- Uematsu, F., Kikuchi, H., Ohmachi, T., Sagami, I., Motomiya, M., Kamataki, T., Komori, M., and Watanabe, M. 1991c. Two common RFLPs of the human CYP2E gene. *Nucleic Acids Res.*, 19: 2803.
- Vineis, P., Malat, N., and Boffetta, P. 1999. "Why study metabolic susceptibility to cancer?" In *Metabolic polymorphisms and susceptibility to Cancer*. Lyon, IARC Scientific Publications, Vol. 148.
- Watanabe, J., Hayashi, S-I., Nakachi, K., Imai, K., Suda, Y., Sekine, T., and Kawajiri, K. 1990. *Pst* I and *Rsa* I RFLPs in complete linkage disequilibrium at the CYP2E gene. *Nucl. Acids Res.* 18: 7194.
- Wormhoudt, L. W., Commandeur, J. N. M., and Vermeulen, N. P. E. 1999. Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione-S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: Relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.*, 29(1); 59-124.
- Yu, M-W., Gladek-Yarborough, A., Chiamprasert, S., Santella, R. M., Liaw, Y-F., and Chen, C. J. 1995. Cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase M1 polymorphisms and susceptibility to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 109: 1266-1273.

Zhong, S., Howie, A. F., Ketterer, B., Taylor, J., Hayes, J. D., Beckett, G. J., Wathen, C. G., Wolf, C. R., and Spurr, N. K. 1991. Glutathione S-transferase mu locus: use of genotyping and phenotyping assays to assess association with lung cancer susceptibility. *Carcinogenesis*, 12: 1533-1537.

ABSTRACT

Genetic polymorphisms of carcinogen metabolizing enzymes in Koreans using epithelial cells falling off during mouthwash

Hae Joon Park

*Department of Oral Biology,
Yonsei University College of Dentistry*

(Directed by Prof. **Kwang Kyun Park**, D.D.S., M.S.D., Ph. D.)

The xenobiotic-metabolizing machinery contains two main types of enzymes : the phase enzymes mediating oxidative metabolism and phase conjugating enzymes involved in detoxification. Genes that encode these enzymes have polymorphisms. There have been a series of reports on the association of a genetic polymorphism at carcinogen metabolizing enzymes with cancer susceptibility.

The purpose of this study is to investigate the polymorphism distribution pattern of carcinogen metabolizing enzyme, CYP1A1, CYP2E1, GSTM1 genotype in Koreans and to establish the genetic polymorphism study method using exfoliated epithelial cell.

132 subjects of 57 adolescence and 75 adults participated in this study. All participants vigorously gargled with 20 ml of undiluted commercial mouthwash in the mouth for 60 secs and expelled the liquid into a collection tube. DNA was isolated from the buccal cells with a

rapid method using proteinase K digestion, phenol-chloroform extraction, and ethanol precipitation. With these genomic DNA samples, PCR based assay was performed and the polymorphisms of CYP1A1 (*Msp* , A to G transition), CYP2E1 (*Pst*) and GSTM1 genes were observed.

The results are as follows;

1. In CYP1A1 *Msp* polymorphism in Koreans, heterozygote (m1/m2) was prevalent with 55.9%, followed by wild type homozygote (m1/m1) with 36.6% and mutant type homozygote (m2/m2) with 7.5%.
2. In CYP1A1 A to G transition in exon 7 polymorphism, heterozygote (ile/val) was predominant with 81.8% and wild type homozygote (ile/ile), and mutant type homozygote (val/val) were 9.1% respectively.
3. In CYP2E1 *Pst* polymorphism, wild type homozygote (c1/c1) accounted for 54.4%, heterozygote (c1/c2), 42.7% and mutant type homozygote (c2/c2), 2.9%.
4. In GSTM1 polymorphism, wild type accounted for 39% and null type accounted for 61%.
5. In CYP1A1 *Msp* polymorphism, heterozygote was prevalent in Koreans while homozygote was prevalent in westerners.
6. The result showed that heterozygote was prevalent (higher than 80%) in CYP1A1 A to G transition polymorphism especially in Koreans, which was distinctive from the Japanese of the same ethnic group.
7. Mutant type heterozygote was more prevalent in CYP2E1 *Pst* polymorphism in Southeast Asians including Koreans, compared to

Americans or Europeans.

8. Null type was more prevalent in GSTM1 polymorphism in Koreans, compared to other races or ethnic groups.

9. The results of the experiment used exfoliated epithelial cell were similar to those of previous researches which used blood or oral tissues.

To sum it up, the distribution of genetic polymorphisms in Koreans was different from that of other races or ethnic group. The results of the experiments used exfoliated epithelial cell were similar to those of previous researches which used blood or oral tissues. Therefore, mouthwash procedure is considered to be more effective and easier for large community-based studies.

Key words : carcinogen metabolizing enzyme, CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, mouthwash, genetic polymorphism