

흰쥐에 Vitamin Antioxidant 투여가 2-Acetylaminofluorene hydroxylation에 미치는 발암 억제 작용*

이화여자대학교 의과대학 생화학교실
성 낙 응 · 홍 영 숙

= ABSTRACT =

Inhibition of Carcinogenic Effects of N-Hydroxy-2-acetylaminofluorene by Vitamin Antioxidants

Nak-Eung Sung and Young-Sook Hong

Department of Biochemistry College of Medicine Ewha Womans University

The principal role of cytochrome P-450 in many other mixed function oxidase reactions including hydroxylations or oxidative dealkylations of various drugs, fatty acids, steroids, pesticides, and carcinogens. In order to elucidate the effect of various vitamin antioxidants on hepatic microsomal cytochrome P-450 and AAF hydroxylation, vitamin antioxidants, including vitamin A acetate, L-ascorbic acid and DL- α -tocopherol were administered to rats.

The results of this study show that the inhibition of cytochrome P-450 level and AAF hydroxylation by vitamin antioxidants may be related to their ability to prevent the in vivo activation of AAF to carcinogenic N-hydroxylation.

Vitamin antioxidants, because of their effectiveness in inhibiting chemical carcinogenesis, may become useful chemoprophylactic agents against environmental carcinogens.

서 론

최근 역학부문에서 사람에게 가장 중요한 암의 원인은 환경을 오염시킨 화학물질이라는 것을 밝혔으며 모

* 이 논문은 중앙암연구소의 연구비에 의하여 수행된 것임.

든 암의 80~90%는 환경에 원인이 있다고 하였다¹⁾²⁾. 환경에서 오염된 화학물질이 궁극적인 발암물질로 작용하기 위해서는 반드시 대사적으로 활성화가 되어야 하며 이런 활성화를 돕는 enzyme이 cytochrome P-450이다. 이 cytochrome P-450은 간조직 microsome 내에 mixed function oxidase의 한 구성성분

으로 electron transfer로 작용한다³⁾. 그러므로 각종 간질환이 있을 때는 cytochrome P-450을 포함하는 이 효소계의 활성이 저하되므로 각종 약물, steroid 화합물 및 지방산 등에 대한 대사장애를 동반하게 된다⁴⁾.

흰쥐의 간조직 microsome 內 약물대사 효소의 활성을 변화시키는 요인으로는 주위환경, 호르몬, 약물, 식이 및 영양상태로 알려져 있다.

Vitamin A는 gastrointestinal과 respiratory system에서 anticarcinogenic activity를 갖는다는 보고들이 많이 있다^{5) 6) 7)}. 또한 화학물질에 의하여 유도된 skin bladder 및 colon 종양에 대하여 역시 anticarcinogenic activity가 있다는 보고도 있다^{8) ~ 13)}. 그리고 vitamin A 결핍 식이로 사육한 실험동물에서 화학물질에 의한 carcinogenesis에 대한 감수성이 증가한다고 하였고 또한 폐암이 증가한다고 하였다^{14) 15)}. 그리고 vitamin C도 실험동물과 인체에서 cancer의 예방과 억제하는 데 vitamin A와 같은 역할을 한다고 보고하였다^{16) 17) 18)}.

Slaga와 Brachen¹⁹⁾은 생쥐에서 polycyclic aromatic hydrocarbon에 의해서 유도된 skin tumorigenesis에 vitamin E와 ascorbic acid가 효과적인 억제제임을 보고한 바 있다.

본 실험에서는 간암을 일으키는 강력한 화학물질, 즉 aromatic amine의 일종인 2-acetylaminofluorene (AAF)을 모델화합물로 해서 vitamin A, ascorbic acid 그리고 DL- α -tocopherol을 in vivo로 투여한 흰쥐에서 hepatic cytochrome P-450 활성의 변화와 이 효소에 의한 AAF의 ring-hydroxylation과 N-hydroxylation을 측정하여 vitamin antioxidant가 간암물질의 활성화 과정을 억제하는 지를 규명하고자 이 실험을 시도하였다.

실험재료 및 방법

1) 시 약

α -tocopherol, vitamin A acetate, ascorbic acid 및 N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine은 E. Merk 제를 사용하였다. 2-acetylaminofluorene (SP. radioactivity 6.7 mci/mmol)은 Tracer Lab. (Waltham, Mass, USA)에서 구입하였다. NADPH, HEPES, bovine serum albumin, catalase, ovalbumin, chymotrypsinogen, myoglobin, coomas-

sie blue 및 N-methylene-bisacrylamide는 Sigma Co. (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. U.S.A.)를 사용하였다. β -naphthoflavone은 Aldrich Co. (Milwaukee Wis.)의 시약은 reagent grade를 사용하였다.

2) 실험동물 및 실험군

전 실험을 통하여 체중 150g 내외의 웅성 흰쥐(wistar strain)를 사용하였으며 각 실험군은 5마리의 흰쥐를 사용하였다.

대조군은 체중 kg 당 2ml의 생리식염수를 7일간 복강내로 주사하였다. Ascorbic acid는 10mg 및 100mg/100g 체중을 7일간 복강내로 주사하였다.

Corn oil은 체중 kg 당 2ml를 2주간 복강내로 주사하였다. Vitamin A는 200 I.U., 2,000 I.U. 및 10,000 I.U./100g 체중을 2주간 복강내로 주사하였다. α -Tocopherol은 12mg 및 120mg/100g 체중을 2주간 복강내로 주사하였다. β -Naphthoflavone은 8mg/100g 체중당 1회 복강내로 주사하였다. Cobaltous chloride는 4mg/100g 체중당 2회 근육주사하였다.

이상의 동물들을 24시간 금식시킨 후 간을 절제하여 microsome을 분리하였다. Microsomal cytochrome P-450은 Omura와 Sato²⁰⁾ 방법에 의하여 측정하였으며, 단백질은 Lowry 등²¹⁾의 방법으로 측정하였다. 2-Acetylaminofluorene (AAF)의 hydroxylated metabolite는 ethyl ether를 사용하여 추출하고 N-과 ring-hydroxy-AAF는 paper chromatography로 분리하고 liquid scintillation counter로 radioactivity를 측정 정량하였다²²⁾. 또한 이들 실험군의 microsomal fraction 속에 cytochrome P-450의 multiple form을 측정하기 위하여 6 M urea-7.5% polyacrylamide slab gel 상에서 Laemmli²³⁾ 방법에 따라 전기영동하였으며 coomassie blue로 염색된 polyacrylamide gel들은 520nm에서 scanning하였다.

실험 성적

1) Vitamin antioxidant을 흰쥐에 투여하였을 때 cytochrome P-450 활성의 변화

Table 1에서 보는 바와 같이 대조군에 비하여 vitamin A 200 I.U. 투여군은 13%, 2,000 I.U. 투여군은 54%, 그리고 10,000 I.U. 투여군은 52% 감소하였다. Ascorbic acid 10mg 투여군은 4% 및 100mg 투여군은 56% 감소하였고, 그리고 α -tocopherol 12mg

Table 1. The level of liver microsomal cytochrome P -450 in rats

Group	Cytochrome P -450	
	(nmoles /0.1ml liver microsomes)	(nmoles /mg protein)
Saline	12.474 ± 0.421	4.494 ± 0.003
Corn oil	17.931 ± 0.560	6.462 ± 0.020
Vitamin A 200 I. U.	7.082 ± 0.071**	5.633 ± 0.035**
2,000 I. U.	6.594 ± 0.060**	3.010 ± 0.041**
10,000 I. U.	7.023 ± 0.092**	3.392 ± 0.027**
Vitamin C 10 mg	7.586 ± 0.102**	4.323 ± 0.045**
100 mg	5.785 ± 0.085*	1.998 ± 0.007*
Vitamin E 12 mg	9.005 ± 0.091**	3.432 ± 0.013**
120 mg	8.750 ± 0.072**	5.010 ± 0.023**

Each value represents mean ± S.D. of 6 experiments

* Significantly different from control value P < 0.001

** Significantly different from control value P < 0.05

Table 2. The level of liver microsomal cytochrome P -450 by β-naphthoflavone and cobaltous chloride pretreated rats

Group	Cytochrome P -450	
	(nmoles /0.1ml liver microsomes)	(nmoles /mg protein)
Saline	12.474 ± 0.421	4.494 ± 0.003
Corn oil	17.931 ± 0.560	6.462 ± 0.020
β-naphthoflavone	11.198 ± 0.102	11.803 ± 0.011*
β-naphthoflavone + Vitamin A	10.119 ± 0.336	5.362 ± 0.043**
β-naphthoflavone + Vitamin C	3.800 ± 0.336**	4.221 ± 0.024**
β-naphthoflavone + Vitamin E	18.407 ± 0.550	9.031 ± 0.009**
Cobaltous chloride	3.938 ± 0.031*	1.754 ± 0.023*
Cobaltous chloride + Vitamin A	4.420 ± 0.010	2.721 ± 0.007
Cobaltous chloride + Vitamin C	2.747 ± 0.010	1.213 ± 0.010
Cobaltous chloride + Vitamin E	2.610 ± 0.412	1.582 ± 0.008

Each value represents mean ± S.D. of 6 experiments

* Significantly different from control value P < 0.001

** Significantly different from β-naphthoflavone P < 0.05

투여군은 47 % 및 120mg 투여군은 23 % 감소로 12 mg 투여군보다 오히려 적게 감소하였다.

Cytochrome P -450의 유도물질인 β-naphthoflavone과 억제물질인 cobaltous chloride를 투여하였을 때 cytochrome P -450의 활성은 table 2와 같다. β-Naphthoflavone만 투여하였을 때는 대조군에 비하여 83 % 증가하였다. β-Naphthoflavone과 2,000

I.U.의 vitamin A를 함께 투여한 군은 55 %, 100mg의 ascorbic acid와 함께 투여한 군은 64 %, 그리고 12mg의 α-tocopherol과 함께 투여한 군은 24 %로 β-naphthoflavone만 투여한 군에 비하여 감소되었다.

Cobaltous chloride만 투여한 군의 cytochrome P -450 활성은 61 % 감소되었다. 그리고 cobaltous chloride와 vitamin A, ascorbic acid 및 α-tocoph-

Table 3. Effects of vitamins on Ring -and N-Hydroxylation of AAF by rat liver microsomes

Group		nmoles of hydroxy AAF formed /30min. /mg protein	
		Ring -OH AAF	N -OH AAF
Saline		0.472 ± 0.077	0.303 ± 0.016
Corn oil		1.090 ± 0.108	0.345 ± 0.003
Vitamin A	200 I.U.	0.818 ± 0.297*	0.290 ± 0.020
	2,000 I.U.	0.948 ± 0.060*	0.273 ± 0.029*
	10,000 I.U.	0.850 ± 0.079*	0.228 ± 0.011*
Vitamin C	10 mg	0.326 ± 0.195	0.236 ± 0.020
	100 mg	0.775 ± 0.021	0.385 ± 0.113
Vitamin E	12 mg	0.872 ± 0.081*	0.248 ± 0.025*
	120 mg	0.491 ± 0.039	0.214 ± 0.013*

Each value represents mean ± S.D. of 6 experiments

* Significantly different from control value P < 0.05

Table 4. Effects of vitamins on Ring -and N-Hydroxylation of AAF by liver microsomes from β-naphthoflavone and cobaltous chloride pretreated rats

Group		nmoles of hydroxy AAF formed /30min. /mg protein	
		Ring -OH AAF	N -OH AAF
Saline		0.472 ± 0.077	0.303 ± 0.016
Corn oil		1.090 ± 0.108	0.345 ± 0.003
β-naphthoflavone		31.693 ± 0.440*	6.731 ± 0.207*
β-naphthoflavone + Vitamin A		24.404 ± 0.340**	3.567 ± 0.102**
β-naphthoflavone + Vitamin C		34.625 ± 0.701	3.602 ± 0.363**
β-naphthoflavone + Vitamin E		23.453 ± 0.363**	4.442 ± 0.430**
Cobaltous chloride		0.897 ± 0.021	0.322 ± 0.016
Cobaltous chloride + Vitamin A		0.710 ± 0.053	0.486 ± 0.080
Cobaltous chloride + Vitamin C		1.392 ± 0.017	1.091 ± 0.079
Cobaltous chloride + Vitamin E		21.763 ± 0.058	3.515 ± 0.051

Each value represents mean ± S.D. of 6 experiments

* Significantly different from control value P < 0.001

** Significantly different from β-naphthoflavone P < 0.05

erol을 함께 투여한 군에서는 cobaltous chloride 만 투여한 군에 비하여 의의있는 변화가 없었다.

2) 흰쥐에서 vitamin antioxidant 들이 AAF hydroxylation 에 미치는 영향

Vitamin antioxidant 들을 in vivo 로 주사한 후 AAF 의 ring -hydroxylation 과 N -hydroxylation 은 table 3에서 보는 바와 같다.

200I.U. vitamin A 투여군은 25 %와 16 %, 2,000 I.U. 투여군은 13 %와 21 % 및 10,000I.U. 투여군은 22 %와 34 % 감소하였다. 10mg 의 ascorbic acid 투여군은 30 %와 13 % 감소하였고 100mg 투여군은 오히려 증가하였다. 12mg 의 α-tocopherol 투여군의 AAF 의 ring -hydroxylation 은 증가하였으나 N -hydroxylation 은 감소하였고 120mg 투여군 역시 AAF

의 ring-hydroxylation은 4% 증가하였으나 N-hydroxylation은 38% 감소하였다. AAF의 ring-hydroxylation 과정은 비활성과정 즉 monophenol로 glu-

curonylate와 sulfate에 ester 결합하여 담즙이나 소변으로 배설된다²⁴⁾. 그러나 α -tocopherol은 vitamin A나 ascorbic acid가 N-hydroxylation 과정을 억

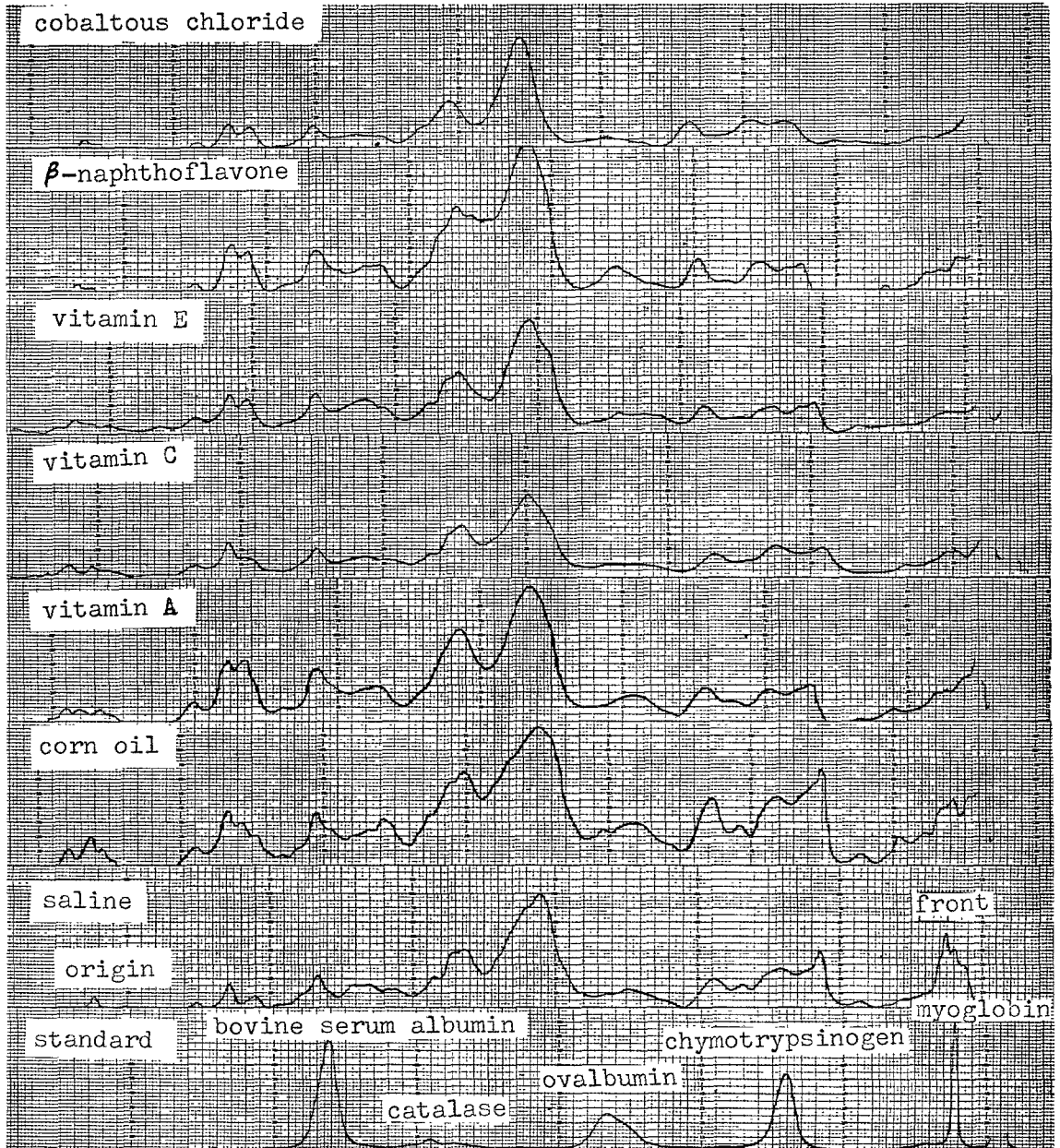


Fig. 1. Scan of 9.5% polyacrylamide-SDS-6M urea vertical slab gel electrophoresis of microsomal proteins from vitamin A, vitamin C, vitamin E, β -naphthoflavone, and cobaltous chloridetreated rats. Coomassie blue-staining and scanning were performed as described in materials and methods. Molecular weight markers for bovine serum albumin (68,000 daltons), ovalbumin (43,500 daltons), chymotrypsinogen (23,240 daltons), and myoglobin (17,000 daltons) are shown by arrows.

제하는 것보다도 가장 많은 양을 억제하였다. 또한 vitamin A 와 α -tocopherol 은 농도가 높을수록 N-hydroxylation 과정을 더 많이 억제함을 볼 수 있었다.

Cytochrome P-450 유도물질인 β -naphthoflavone 을 투여하였을 때 AAF 의 ring-hydroxylation 과 N-hydroxylation 이 현저히 증가되었다(Table 4).

β -Naphthoflavone 과 vitamin A 를 함께 투여한 군의 AAF ring-hydroxylation 과 N-hydroxylation 은 각각 23% 와 47% 감소되었다. Vitamin C 와 함께 투여한 군은 ring-hydroxylation 이 9% 증가하였고 N-hydroxylation 은 46% 감소하였다. 그리고 vitamin E 와 함께 투여한 군은 26% 와 34% 감소하였다. 그러나 cytochrome P-450 억제물질인 cobaltous chloride 를 투여하였을 때 AAF ring-hydroxylation 과 N-hydroxylation 은 대조군보다 약간 증가하였다. Vitamin A 및 vitamin C 와 함께 투여한 군의 AAF ring-hydroxylation 과 N-hydroxylation 은 약간 증가하였다. Vitamin E 와 함께 투여한 군은 현저히 증가하였다. 이런 현상은 아마도 cobaltous chloride 는 cytochrome P-450 억제물질이지만 vitamin E 와 함께 투여하면 약물 상호작용이 있기 때문이라고 추측된다.

3) Vitamin A acetate, ascorbic acid 및 DL- α -tocopherol 이 rat hepatic microsomal cytochrome P-450 apoprotein 에 미치는 영향

Vitamin antioxidant 들을 투여한 microsomal protein 을 6 M urea-7.5% polyacrylamide slab gel electrophoresis 로 cytochrome P-450 apoprotein 의 multiple form 을 관찰한 결과는 Fig. 1 과 같다.

Cytochrome P-450 apoprotein 은 분자량이 50,000 ~ 58,000 범위내에서 4 개의 band 를 확인할 수 있었으며 이는 Mackinone²⁵⁾ 의 결과와 일치하는 것이다. 4 개의 band 는 분자량이 큰 것부터 band I, II, III 및 IV 로 편의상 표시하였다. Vitamin A 투여군은 corn oil 을 투여한 대조군에 비교하여 전체적으로 band I 과 IV 가 감소하였다. Ascorbic acid 를 투여한 군에서도 전체적인 band 의 양이 감소하고 특히 band II 와 IV 가 현저히 감소하였다. α -tocopherol 을 투여한 군에서는 band II 와 IV 가 감소하였다. β -Naphthoflavone 투여군은 전체적으로 band 의 양이 증가하였으나 특히 band II, III 와 IV 가 현저히 증가하였다. Cobaltous chloride 투여군은 band 의 양이 전체적으로 감소하였고 특히 band I 이 현저히 감소하였고 band II 와 IV 는 전혀 나타나지 않았음을 관찰하였다.

이상과 같이 vitamin antioxidant 을 투여하였을 때 cytochrome P-450 의 apoprotein 이 선택적으로 상설됨을 관찰할 수 있었다.

고 찰

1) Vitamin A acetate, ascorbic acid 및 DL- α -tocopherol 에 의한 흰쥐 간조직 microsomal cytochrome P-450 활성의 변화

간조직 microsomal cytochrome P-450 은 hydroxylation 을 촉매할 뿐만 아니라 vitamin antioxidant 들의 microsomal biotransformation 에 유관한 것이 밝혀진 바 있다²⁶⁾. 본 실험에서도 vitamin antioxidant 로 vitamin A acetate, ascorbic acid 및 DL- α -tocopherol 을 흰쥐에 투여하였을 때 microsomal cytochrome P-450 활성이 유의있게 감소하였다. Cytochrome P-450 의 활성은 이른바 mixed function oxidase system 으로서 기능을 실증해 주는 것으로서 vitamin antioxidant 의 투여는 mixed function oxidase system 의 활성을 감소시켰으며 이런 억제효과는 그들의 산화방지제로서의 성질에 의함을 암시하는 것이다.

β -Naphthoflavone 을 투여하였을 때 cytochrome P-450 활성이 대조군에 비하여 현저히 증가하였다. 이와같이 β -naphthoflavone 은 microsomal 효소계의 활성을 증가시키는 유도물질임을 확인할 수 있었다. β -Naphthoflavone 과 vitamin antioxidant 들을 함께 투여하였을 때 β -naphthoflavone 에 의하여 유도된 cytochrome P-450 의 함량이 저해됨을 관찰하였다. 이와같이 vitamin antioxidant 들은 대조군 뿐만 아니라 유도물질에 의해 증가된 효소를 억제시키는 역할을 하였다. 또한 cobaltous chloride 를 투여하였을 때 cytochrome P-450 의 활성이 현저히 감소하였다. 이는 cobaltous chloride 가 cytochrome P-450 의 강력한 저해제임을 알 수 있었다. 그러므로 cobaltous chloride 와 vitamin antioxidant 들을 함께 투여하였던 바 cytochrome P-450 의 활성이 더욱 감소되었으나 vitamin A 의 경우에는 약간 증가되었다. 이와같이 vitamin antioxidant 들의 투여는 hemoprotein 인 cytochrome P-450 의 합성을 저해하는 것을 알 수 있었다.

2) Vitamin A acetate, ascorbic acid 및 DL- α -tocopherol 투여가 AAF hydroxylation 에 미치는 영향

약물과 steroid 및 화학 발암물질은 주로 microsome의 hemoprotein 성분인 cytochrome P-450 oxidase의 활성을 촉진시킴으로서 간조직 microsome의 기질 신진대사를 증가시킨다는 보고가 많이 있다^{27) 28)}. 그리고 cytochrome P-450 활성의 변화는 발암원인 AAF의 hydroxylation 과정에 영향을 미치는 것으로도 알려져 있다^{29) 30)}. 또한 합성된 여러 산화방지제가 실험동물에서 화학물질에 의해 유도된 발암현상을 억제함이 보고된 바 있다³¹⁾. 최근 vitamin A와 합성된 vitamin A 유사품⁷⁾, ascorbic acid와 DL- α -tocopherol¹⁹⁾들이 실험동물에서 여러 종류의 화학물질에 의한 종양 생성을 효과적으로 억제하는 것이 입증되었다.

본 실험에서 vitamin A와 acetate, ascorbic acid와 DL- α -tocopherol을 투여하였던 바 흰쥐 간조직 microsome에 의해서 aromatic amide인 AAF N-hydroxylation을 약 30% 억제함을 나타냈다. 이와같은 결과는 Hong 등²⁶⁾이 in vitro로 이들 vitamin antioxidant를 투여했을 때 AAF의 N-hydroxylation이 90% 이상 감소됨을 보고한 바와 비교하여 낮은 값이었으나 in vitro 즉 incubation medium으로 투여했을 때는 투여된 전량이 억제작용을 할 수 있는 반면에 in vivo로 투여한 경우는 체내에서 흡수와 배설작용으로 투여한 전량이 억제작용에 참여할 수 없기 때문이라고 사료된다. 그리고 vitamin antioxidant들과 cytochrome P-450 유도물질인 β -naphthoflavone을 함께 투여했을 때 β -naphthoflavone에 의한 AAF의 N-hydroxylation 증가량의 약 50% 정도가 억제되었다.

이런 결과는 vitamin A acetate, ascorbic acid 및 DL- α -tocopherol을 투여했을 때 microsomal mixed function oxidase system에 대한 이들 vitamin의 산화방지제 성질 때문이라는 것을 제시해 준다.

3) Cytochrome P-450 apoprotein의 polyacrylamide gel electrophoresis

많은 보고들은 hepatic microsomal cytochrome P-450의 multiple form의 존재와 이들의 특이한 기질특이성을 보고하였다^{32) 33)}. 분자량이 47,000~59,000 daltons 사이인 cytochrome P-450 hemoprotein의 subunit가 이미 알려져 있다³⁴⁾.

본 실험에서도 7.5% SDS-polyacrylamide slab gel system에서 분자량이 50,000~58,000 daltons 범위의 단백질임이 확인되었으며 이들 단백질은 4개의 band를 갖고 있음을 확인하였다. 이런 결과는 Mac-

kinnone 등의 보고와 일치하는 것이다²⁵⁾.

본 실험은 vitamin A acetate, ascorbic acid 및 DL- α -tocopherol 투여가 cytochrome P-450 apoprotein의 multiple form의 증감과 AAF hydroxylation에 대한 특이성의 가능성을 밝히기 위한 것이다. antioxidant들을 투여했을 때 band 전체가 감소되었으며, 특히 band II와 IV가 공통으로 현저히 감소되는 사실을 알 수 있었다. 또한 β -naphthoflavone 투여는 전체적인 band가 증가되었고 cobaltous chloride는 전체적인 band가 감소하였으며 특히 band II와 IV가 나타나지 않았다. 그러므로 cytochrome P-450은 발암성 물질의 활성화와 관계가 많으며 특히 cytochrome P-450 apoprotein의 band II와 IV가 관제되는 것이 아닌 가 생각된다. 이와같이 cytochrome P-450 apoprotein의 multiple form의 존재는 약리학적으로 서로 다른 반응을 나타낸다는 결론을 얻었다.

본 실험에서 cytochrome P-450의 multiple form의 존재는 기질에 대한 특이성이 AAF의 hydroxylation 반응을 감소시키거나 증가시키는 독특한 molecular form을 준다는 것을 제시하는 것이다. 또한 독특한 cytochrome P-450 apoprotein의 변화는 cytochrome P-450의 활성과 기능면을 증가 또는 감소시키는 것까지도 관련되어 있다.

결 론

Aromatic amine의 일종인 2-acetylaminofluorene은 간암을 일으키는 강력한 화학물질이다. 이를 모델 화합물로 해서 vitamin A acetate, ascorbic acid 그리고 DL- α -tocopherol을 in vivo로 투여한 흰쥐에서 hepatic cytochrome P-450 활성의 변화와 이 효소에 의한 AAF의 ring-hydroxylation과 N-hydroxylation을 측정하여 이와같은 vitamin antioxidant들이 간암물질의 활성화 과정을 억제하는 지를 관찰하고 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) Vitamin antioxidant들은 흰쥐 간조직 microsome의 cytochrome P-450 활성을 감소시킨다. β -Naphthoflavone과 vitamin antioxidant들을 함께 투여했을 때는 β -naphthoflavone만 투여했을 때보다 cytochrome P-450 활성이 감소되었다. 그러나 cobaltous chloride와 vitamin antioxidant들을 함께 투여했을 때는 cobaltous chloride만 투여했을 때와 비교하여 cytochrome P-450 활성의 변화가 별로 없었다.

2) Vitamin antioxidant 들의 투여로 mixed function oxidase system 에 의한 AAF 의 hydroxylation 은 N-hydroxy AAF 형성을 감소시킨다. β -Naphthoflavone 의 투여는 hydroxylation 을 증가시키고 이에 vitamin antioxidant 를 함께 투여했을 때는 AAF 의 hydroxylation 을 감소시킨다. Cobaltous chloride 투여는 AAF 의 hydroxylation 을 감소시킨다.

3) Polyacrylamide-SDS-6 M urea slab gel electrophoresis 결과 cytochrome P-450 apoprotein 은 band I, II, III 및 IV의 4개로 나타났으며 vitamin antioxidant 들을 투여하였을 때는 band II와 IV가 감소되었다. β -Naphthoflavone 투여군은 4개의 band 모두가 증가되었고 cobaltous chloride 투여군은 4개의 band 중 band II와 IV가 감소되었다.

-References -

- 1) Higginson, J.: In Environment and Cancer, 24th symp. Fundam Cancer Res., 69-92, Baltimore: Williams & Wilkins, 1972.
- 2) Higginson, J., Muir, Cos.: In Cancer Medicine, ed. J. F. Holland, E. Frei III, 241-306, Philadelphia: Lea and Febiger, 1973.
- 3) Miller, E. C., J. A. Miller. : In Molecular Biology of cancer ed. H. Busch, New York; Academic, 377-402, 1974.
- 4) Mackinnon, A. M. and F. R. Simon: Pharmacological reversal of cholestasis-associated decrease in hepatic cytochrome P-450, Biochem. Pharmacol. 24, 748-749, 1975.
- 5) Bollag, W.: Vitamin A and vitamin A acid in the prophylaxis and therapy epithelial tumors, Intern. J. Vitamin Res. 40, 299-313, 1970.
- 6) Watlenberg, L. W.: Inhibition of carcinogenic and toxic effects of polycyclic hydrocarbons by phenolic antioxidants and ethoxyquin, J. Natl. Cancer. Inst. 48, 1425-1431, 1972.
- 7) Sporn, M. B., Dunlop, N. M., Newton, D. L. and Smith, J. M.: Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). Fed. Proc. 35, 1332-1338, 1976.
- 8) Davies, R. E.: Effect of vitamin A on 7,12-Dimethyl-benz(α)anthracene-induced papillomas in rhino mouse skin, cancer. Res. 27, 237-241, 1967.
- 9) Newberne, P. M. and Suphakarn, V.: Preventive role of vitamin A in colon carcinogenesis in rats. Cancer, 40, 2553-2556, 1977.
- 10) Bollag, W.: Therapy of chemically induced benign and malignant epithelial tumors by vitamin A acid (retinoic acid), European J. Cancer, 8, 689-693, 1972.
- 11) Bollag, W.: Prophylaxis of chemically induced epithelial tumors with an aromatic retinoic acid analog European J. Cancer, 11, 721-724, 1975.
- 12) Sporn, M. B.: Retinoids and Carcinogenesis Nutr. Rev., 35, 65-69, 1977.
- 13) Verma, A. K., and Boutwell, R. K.: Vitamin A acid (Retinoic acid), a potent inhibitor of 12-O-tetra-decanoylphorbol-13-acetate-induced ornithine decarboxylase activity in mouse epidermis, Cancer Res., 37, 2196-2201, 1977.
- 14) Genta, V. M., Kaufaman, D. G., Harris, C. C., Smith, J. M., Sporn, M. B. and Saffiotti, U.: Vitamin A deficient enhances binding of benzo(α)pyrene to tracheal epithelial DNA, Nature, Lond., 247, 48-49, 1974.
- 15) Saffiotti, U., Moniesano, R., Sellakumar, A. R. and Borg, S. A.: Experimental cancer metaplasia and squamous cell tumors, Cancer, 20, 857-864, 1967.
- 16) Cameron, E., Pauling, L. and Leibowitz, B.: Ascorbic acid and cancer, A Review, Cancer Res., 39, 663-681, 1979.
- 17) Schlegel, J. U., Pipkin, G. E., Nishimura, R., and Schultz, G. N.: Role of vitamin C in prevention of bladder tumor formation, J. Urol. 103, 155-159, 1970.
- 18) Shamberger, R. J.: Increase of peroxidation in carcinogenesis, J. Natl. Cancer Inst., 48, 1491-1497, 1972.
- 19) Slaga, T. J. and Bracken, W. M.: The effects of antioxidants on skin tumor initiation and aryl hydrocarbon hydroxylase, Cancer Res.,

- 37, 1631-1635, 1977.
- 20) Omura, T. and Sato, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes: I. evidence for its hemoprotein nature, *J. Biol. Chem.*, 239, 2370-2378, 1964.
 - 21) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951.
 - 22) Lotlikar, P. D., Wertmar, K. and Luha, L.: Role of mixed function amine oxidase in N-hydroxylation of 2-AAF by hamster liver microsomal preparations, *Biochem. J.*, 136, 1137-1140, 1973.
 - 23) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685, 1970.
 - 24) Lotlikar, P. D., Hong, Y.S. and Baldy, W. J.: Cytochrome P-450 dependent N-hydroxylation of 2-acetylaminofluorene biological oxidation of nitrogen (Gorrod, J. W. ed.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 185-193, 1978.
 - 25) Mackinnon, A. M., Sutherland, E. and Simon, F. R.: Qualitative alteration in hepatic microsomal cytochrome P-450 apoproteins associated with bile duct ligation and the administration of ethinyl estradiol and phenobarbital, *Biochem. Pharmacol.*, 27, 29-35, 1978.
 - 26) Hong, Y. S., Sung, N. E., Lotlikar, P. D.: Effects of vitamin antioxidants on hydroxylation of 2-acetylaminofluorene by rat liver microsomes, *Korean J. Biochem.*, 12, 19-23, 1980.
 - 27) Conney, A.H.: Pharmacological implication of microsomal enzyme induction, *Pharmacol. Rev.*, 19, 317-366, 1967.
 - 28) Gelboin, H. V.: Mechanisms of induction of drug metabolism enzymes. In *fundamentals of drug metabolism and drug disposition* (La Du B. N. Mandel, H. G. and Way, E. L. eds.), pp 279-307, Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1971.
 - 29) Kaplan, E., Gutmann, H. R. and Emory, T.H. Microsomal metabolism of arylamides by the rat and guinea pigs, *Biochem. Pharmacol.*, 27, 1581-1589, 1978.
 - 30) Thorgeirsson, S. S., Atlas, S. A., Boobis, A. R. and Felton, J. S.: Species differences in the substrate specificity of hepatic cytochrome P-448 polycyclic hydrocarbon treated animals, *Biochem. Pharmacol.*, 28, 217-226, 1979.
 - 31) Wattenberg, L. W.: Inhibitors of chemical carcinogenesis, *Adv. Cancer Res.*, 26, 197-226, 1978.
 - 32) Comai, K. and Gaylor, J. L.: Existence and separation of three forms of cytochrome P-450 from rat liver microsomes, *J. Biol. Chem.*, 248, 4947-4955, 1973.
 - 33) Welton, A. F. and Aust, S.D.: Multiplicity of cytochrome P-450 hemoproteins in rat liver microsomes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 56, 898-906, 1974.
 - 34) Welton, A. F., O'Neal, F.O., Chaney, L.C. and Aust, S.D.: Multiplicity of cytochrome P-450 hemoprotein in rat liver microsomes, *J. Biol. Chem.*, 250, 5631-5639, 1975.
-