

## 단백질 분해효소억제제를 이용한 담배의 품질평가

손형욱, 임홍빈, 이영구, 이동욱, 김용태

한국인삼연초연구소 화학부

## Evaluation of Cigarette Quality by Use of $\alpha_1$ -Protease Inhibitor

H. O. Sohn, H. B. Lim, Y. G. Lee, D. W. Lee and Y. T. Kim

Division of Chemical Research, Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea

### ABSTRACT

Current studies indicated that emphysema in smokers might be due, in part, to the local suppression of  $\alpha_1$ -protease inhibitor( $\alpha_1$ -PI) in lung by reactive oxygen species in cigarette smoke or smoke-activated lung neutrophiles.

In the present works, we examined the possibility that a measure which inactivated  $\alpha_1$ -PI by cigarette smoke could be an alternative method to evaluate the cigarette quality. In order to determine the inactivation of  $\alpha_1$ -PI, trypsin inhibitory capacity(TIC) was assayed. A rapid loss of  $\alpha_1$ -PI activity occurred when  $\alpha_1$ -PI solutions was exposed the gas phase or total particulate matter(TPM) obtained from various brands. The inactivation of  $\alpha_1$ -PI by gas phase was dependent upon the number of puffs and the age of the smoke. However, that by TPM was rather decreased since 2 puffs and also showed no more change over 24hrs after exposing. Inactivation of  $\alpha_1$ -PI determined by our suggested method(5 puffs, 24hours of aging after exposing) using various commercial cigarettes exhibited that high tar brands has inactivated it more strongly than low tar cigarettes. But the ability of some brands to inactivate  $\alpha_1$ -PI does not correlate with the content of tar or nicotine.

These results suggest that the degree of  $\alpha_1$ -PI inactivation by cigarette smoke may be a useful index for the evaluation of cigarette quality and that it should be also contribute to the manufacture of less hazardous cigarettes.

### 서론

담배는 남녀노소 및 종족에 관계없이 전인류가

애호하는 공통적인 기호품이다. 기술의 발달과 더불어 다양한 욕구의 변화에 따라 수많은 종류의 담배가 개발되고 있으며 특히 기능성 담배의 개발은

담배산업의 새로운 전망을 보이고 있다. 이러한 다양화에 따라 담배의 품질평가에 있어서도 고유의 특성을 정확히 비교, 평가할 수 있는 새로운 방법이 요구된다.

또한 담배 연기는 CO, benzopyrene 등 유해화합물 이외에도 아직까지 밝혀지지 않은 많은 성분들로 구성된 복잡한 물질이다. 따라서 담배의 품질을 비교함에 있어 단지 이들 단일 성분들만의 분석으로 평가한다는 것은 오류를 범할 수가 있으므로 전연기성분이 생체에 미치는 영향을 평가할 수 있는 생물학적 분석방법의 도입이 절실히 요구된다.

흡연으로 인하여 생체가 손상을 받기 가장 쉬운 부위는 폐와 기도이며 특히 흡연으로 인한 폐기종은 생체내 단백질 분해효소억제제( $\alpha_1$ -PI)가 활성산소에 의해 불활성화 되기 때문이라고 보고된 바 있다<sup>1)</sup>. 즉 담배연기에 의해 활성화된 다형질핵 백혈구와 폐포의 대식세포로부터 superoxide나 hydrogen peroxide와 같은 활성산소종이 생성되며 이들에 의해 단백질분해효소억제제가 불활성화되어<sup>2-4)</sup> 단백질분해효소와의 평형이 깨어지게 되고 상대적으로 활성이 증가된 단백질 분해효소에 의해 폐가 손상을 입게 된다<sup>5)</sup>. 이외에도 담배연기중의 NO나 ubiquinone과 같은 화합물에 의해서도 직접 활성산소가 생성될 수 있기 때문에<sup>6,7)</sup> 연기에 의한 단백질 분해효소 억제제의 활성억제는 전연기성분이 생체에 미치는 영향을 평가할 수 있는 좋은 지표가 될 수 있다.

본 연구실에서는 이미 담배연기중에 활성산소종들의 생성을 확인하였으며 이는 담배의 종류에 따라 그 정도가 각기 다르게 나타났다<sup>8)</sup>. 따라서 담배연기에 의한  $\alpha_1$ -PI의 불활성화 정도를 측정하여 담배품질 평가 방법으로 활용할 수 있는 생물학적 분석방법을 정립하고자 이 연구를 시도하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

#### 1) 시료

시판중인 국산 및 외산 담배와 본 연구소에서

제조한 시제품 담배를 상대습도 57%에서 48시간 이상 조화시켜 시료로 사용하였다.

#### 2) 시약 및 기기

$\alpha_1$ -protease inhibitor( $\alpha_1$ -PI), Na-Benzoyl-DL-Arginine-p-Nitroanilide(BAPNA), trypsin, triethanolamine, glutathione, catalase, SOD 등은 Sigma chemical company에서 구입하여 사용하였으며 기타 다른 시약은 특급을 사용하였다.

담배연소를 위해 자동직연장치(Heinr, Borg-walt, RM, 1/G, West Germany)를 사용하였으며 효소의 활성도 측정을 위하여 Varian사의 Carry 17D spectrophotometer를 사용하였다.

#### 2. 실험방법

본 실험에 사용된 모든 담배는 자동직연장치를 이용하여 CORESTA 표준조건에 따라 연소시키고 whole smoke와 기체상은  $\alpha_1$ -PI가 함유된 buffer 용액(0.025mg/ml, ice cold 0.2M triethanolamine buffer, pH 7.8) 10ml에 직접 포집하였으며 전연기응축물(TPM)은 cambridge filter에 포집한 후  $\alpha_1$ -PI용액 10ml에 담그어 sonication 후 여과하여 실온에 보관하면서 시료로 사용하였다.

Trypsin 활성도는 Witt 등<sup>9)</sup>의 방법에 따라 pH 8.2에서 측정하였는데, native  $\alpha_1$ -PI용액 및 담배연기를 포집한  $\alpha_1$ -PI용액 1.8ml에 trypsin용액(0.25mg/ml of 0.001N HCl) 200 $\mu$ l를 첨가하여 37°C에서 5분간 incubation 한 다음 BAPNA용액(1mg/ml) 1ml와 반응시켜 405nm에서 5분간 흡광도변화를 측정하였다.

이때 trypsin inhibitory capacity(TIC)는 native  $\alpha_1$ -PI와 시료의 trypsin 활성도의 차이를 가지고 계산하였으며 native  $\alpha_1$ -PI의 TIC를 100%로 취하였다.

## 결 과

### 1. 담배연기에 의한 $\alpha_1$ -PI의 불활성화

그림 1에서처럼 puff수가 증가함에 따라 gas phase에서는  $\alpha_1$ -PI의 활성이 감소되어 한개피 연소시 70%까지 불활성화되었으며 이는 비교적

puff수와 정량적인 관계를 보였다. TPM의 경우 gas phase와는 달리 초기 1, 2 puff에서  $\alpha_1$ -PI가 70% 정도 불활성화되나 4 puff 이상에서는 오히려  $\alpha_1$ -PI의 활성이 증가되어 50% 정도의 일정수준을 유지하였다. 한편 whole smoke의 경우 puff수가 증가함에 따라  $\alpha_1$ -PI의 불활성화도 증가되다가 5 puff이상에서는 거의 일정한 수준을 유지하였으며 그 정도는 gas phase에 의한 것보다 훨씬 적었다.

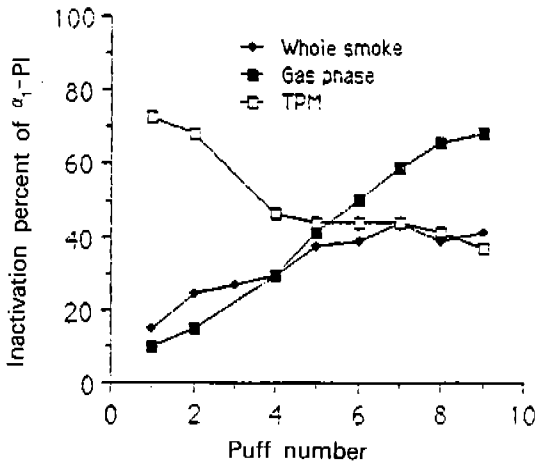


Fig. 1. Effect of cigarette smoke puff number on the inactivation of  $\alpha_1$ -PI.

또한 담배를 dose response가 있는 5 puff까지 연소시킨후 시간이 경과함에 따른 단백질분해효소 억제제의 활성을 측정 한 결과는 그림 2와 같았다. Gas phase, TPM 및 whole smoke에서 모두  $\alpha_1$ -PI가 빠른 속도로 불활성화되었으며 24시간 이후 수일에 걸쳐 계속적으로 완만하게 불활성화되었다. Gas phase의 경우 elastase를 사용하였을 때 1분 이내에  $\alpha_1$ -PI가 급속하게 불활성된다는 보고<sup>10)</sup>와는 달리 초기에  $\alpha_1$ -PI의 불활성화가 매우 적었다. 한편 Whole smoke의 경우 gas phase와 경시적 변화양상은 비슷하였으나  $\alpha_1$ -PI의 불활성화 정도는 다소 낮았다. 이는 앞의 결과와 함께 TPM중 어떤 성분들이 gas phase와 복합적으로 작용하여  $\alpha_1$ -PI의 불활성화를 어느 정도 상쇄해 주는 효과가 있음을 시사한다.

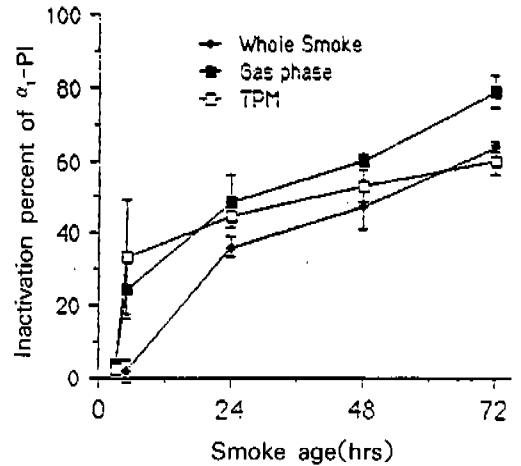


Fig. 2. Effect of cigarette smoke age on the inactivation of  $\alpha_1$ -PI.

이상의 결과로부터  $\alpha_1$ -PI를 이용하여 담배품질 평가를 위해서는 담배를 5 puff까지 연소시켜 그 연기에 직접 노출된  $\alpha_1$ -PI용액을 실온에서 24시간 방치시켜 비교적 완만하게 불활성화가 일어나는 시점에서 TIC를 측정하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

## 2. 제품담배와 $\alpha_1$ -PI의 불활성화

Tar함량과  $\alpha_1$ -PI의 불활성화정도의 관계를 알아보기 위하여 현행 담배중 비교적 저tar인 한라산

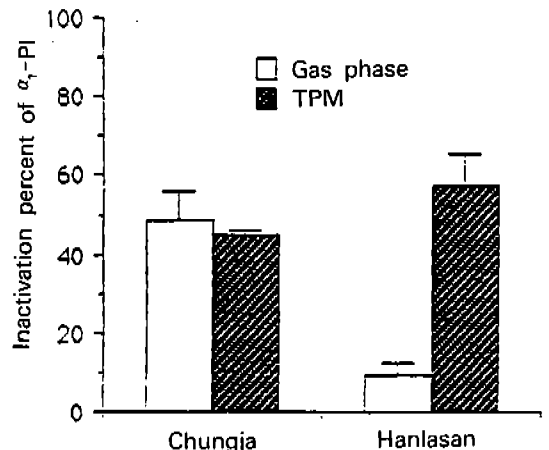


Fig. 3. Comparison of  $\alpha_1$ -PI inactivation by high tar and low tar cigarettes.

담배와 이와는 반대로 tar, nicotine 함량이 많은 청자를 5 puff 연소시켜 실온에서 24시간 방치한 후  $\alpha_1$ -PI의 불활성화를 측정하였다. 그 결과 gas phase의 경우 청자가 한라산보다 5배나 더 많이  $\alpha_1$ -PI를 불활성화시켰다(Fig. 3). 한편 TPM에서는  $\alpha_1$ -PI의 불활성이 저타르인 한라산에서 고타르인 청자보다 더 높았으나 gas phase에서처럼 큰 차이는 없었다. 이 결과는 tar 함량이 많은 담배가  $\alpha_1$ -PI를 더 많이 불활성화시키는 것으로 보인다.

위의 결과를 확인하기 위하여 tar와 nicotine 함량이 다양한 여러 종의 국산 및 외산 담배를 가지고  $\alpha_1$ -PI의 불활성화를 측정하였다(Fig. 4). 그 결과는  $\alpha_1$ -PI의 불활성화가 tar나 nicotine의 함량과 상관성이 있다는 보고<sup>13)</sup>와는 달리 거의 상관성이 없었다.

Gas phase의 경우 대체로 tar 함량이 증가할수록  $\alpha_1$ -PI의 불활성화가 증가되는 경향을 보였다(Fig. 5). 그러나 N처럼 tar 함량이 많지만  $\alpha_1$ -PI의 불활성이 매우 적은 경우와 C와 같이 이와는 정반대의 결과도

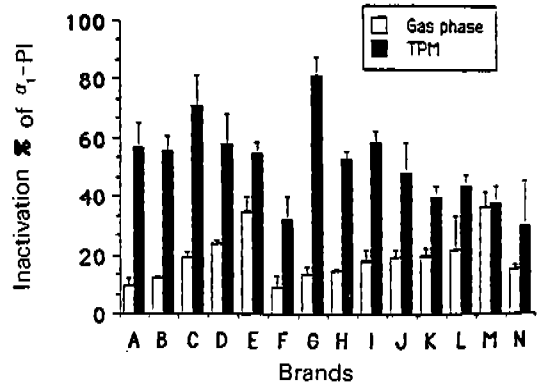


Fig. 4. Comparison of  $\alpha_1$ -PI inactivation by brand of cigarettes.

보였다. 또한 nicotine의 함량과 비교해 볼때 N과 I처럼 거의 상관성이 없는 결과를 나타내었다(Fig. 6). TPM의 경우 tar 함량이 증가함에 따라  $\alpha_1$ -PI의 불활성이 줄어드는 경향이 있었으나 그 차이가 유의성이 없었으며 nicotine의 함량과도 거의 상관성이 없었다.

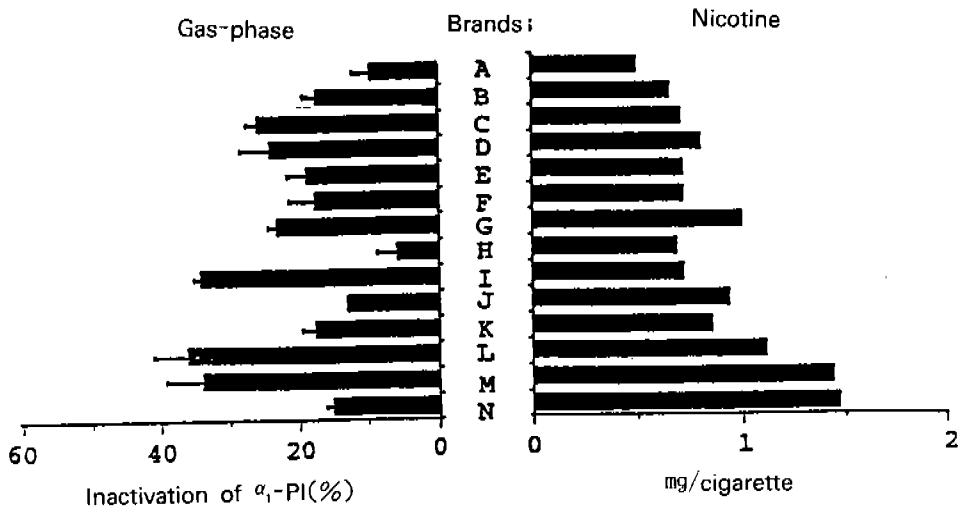


Fig. 5. Comparison of inactivation of  $\alpha_1$ -PI by gas phase cigarette smoke and tar contents.

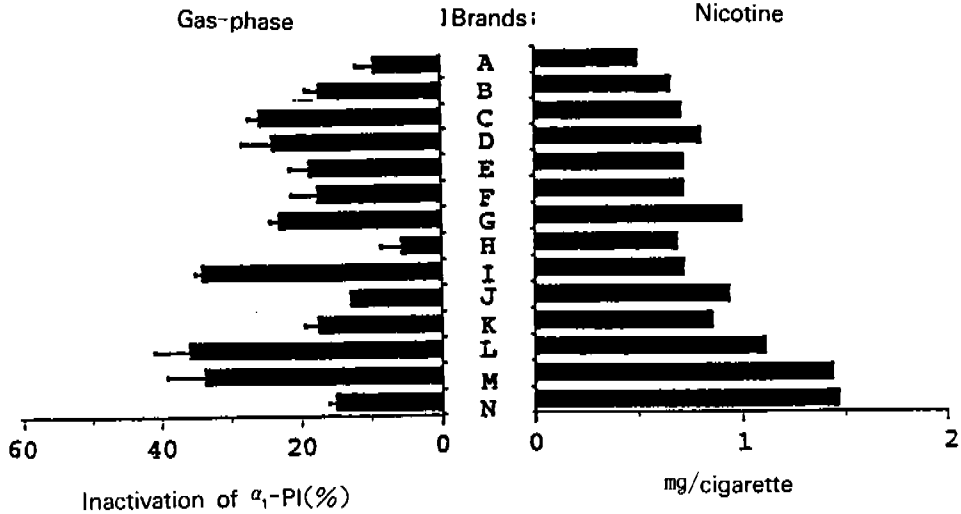


Fig. 6. Comparison of inactivation of  $\alpha_1$ -PI by gas phase cigarette smoke and nicotine contents.

3. 흡착제 종류에 대한  $\alpha_1$ -PI의 불활성화

충진제가 서로 다른 삼중필터 시제품에 대한  $\alpha_1$ -PI의 불활성화 정도를 비교한 결과(Table 1) 충전제간 유의성은 없으나 active carbon이나 silica gel 충전 filter담배가 zeolite나 polyethylene glycol 충전 filter담배보다  $\alpha_1$ -PI의 불활성화가 다소 적었다.

4. Free radical scavenger 탐색 및 활용성 검토

담배연기중 반응성이 큰 free radical들을 제거할 수 있는 ascorbic acid등 항산화제 및 free radical scavenger들을  $\alpha_1$ -PI용액에 첨가하여 이들에 의한  $\alpha_1$ -PI의 보호효과를 조사하였다.

그 결과 그림 7과 같이 NAC, ascorbic acid 및

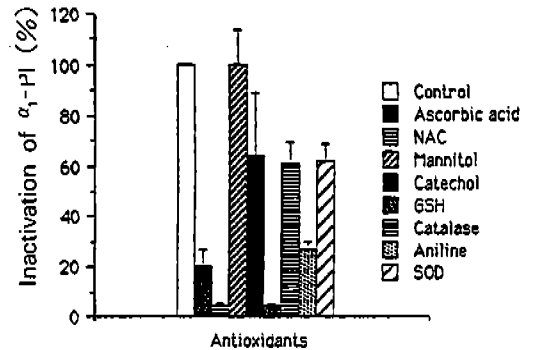


Fig. 7. Protection effect of antioxidants and free radical scavengers against inactivation of  $\alpha_1$ -PI by gas phase cigarette smoke.

Table 1. Comparison of  $\alpha_1$ -PI inactivation by various adsorbent triple filter of cigarettes.

Adsorbent	Inactivation of $\alpha_1$ -PI*
Zeolite	48.4 ± 6.7
Active carbon	35.4 ± 5.5
Silica gel	39.2 ± 3.4
Polyethylene glycol	48.2 ± 4.8

\* Inactivation of  $\alpha_1$ -PI by gas phase cigarette smoke

glutathione이  $\alpha_1$ -PI의 불활성화를 현저하게 감소시켰으며 catalase, SOD 그리고 aniline도 어느 정도 보호효과를 보여주었다. 비록 이는 *in vitro*의 경우이나 담배 filter등에 유용한 free radical scavenger들의 적용가능성을 시사해 준다.

## 고 찰

$\alpha_1$ -PI는 폐조직에 있는 호구성 백혈구 elastase의 주된 regulator이다.

흡연과 관련하여  $\alpha_1$ -PI에 영향을 줄 수 있는 활성산소의 생성은 두 가지로 생각할 수 있다. 즉 한 가지는 흡연으로 인해 폐조직의 자극으로 유도되는 대식세포로부터 생성되는 것으로서 이는 많은 양의 elastase의 분비를 수반하기 때문에 폐조직 손상에 매우 큰 영향을 줄 수 있다<sup>12,13)</sup>. 다른 하나는 연기 중에서 직접 생성되는 것으로서 특히 gas phase에 있는 여러 가지 산화제들과 더불어 생체조직은 물론 담배의 맛에 영향을 줄 수 있는 중요한 요소이다. 그러나 이들에 대한 전체적인 정량이나 양의 변화를 측정할 수 있는 방법은 없다. 저자들은 이러한 흡연과 호흡기계의 생리적인 기능을 이용하여 제조 담배의 품질을 평가할 수 있는 새로운 방법을 모색하였다.

$\alpha_1$ -PI는 elastase, trypsin, serine protease등 여러 가지 단백질분해효소의 활성을 억제하지만 elastase에 대한 작용이 생리적인 의미가 가장 크다. 그러나 저자들은 elastase 대신 trypsin을 사용하였는데 이는 elastase의 정제가 어렵고 가격 또한 비싼 반면 trypsin저해능의 측정은 비교적 손쉽고 그 비용 또한 저렴하기 때문이다.  $\alpha_1$ -PI가 trypsin에 대한 선택성이 elastase에 비해 다소 낮기는 하나 그 불활성화 양상이 elastase와 유사하며 더우기 trypsin저해능의 90%가  $\alpha_1$ -PI에 의존하므로<sup>14)</sup> 이를 평가함에 있어 큰 무리가 없을 것으로 사료된다.

담배연기의 puff수 및 노출시간 경과에 따른  $\alpha_1$ -PI 불활성화의 결과는 매우 흥미있는 변화를 보여주었다. Whole smoke, gas phase 및 TPM 모두에서 적어도 5 puff(high tar)까지는 양호한 dose response를 나타내어 정량범위로서의 가능성을 보였다.

또한 담배연기에 의한  $\alpha_1$ -PI의 불활성화가 장시간에 걸쳐 지속적이며 linear하게 나타났다. 한편 gas phase가 가장 빨리 그리고 가장 많이  $\alpha_1$ -PI의 활성을 억제하였으며 TPM은 상대적으로 낮았고 전연기에 의한  $\alpha_1$ -PI의 불활성화도 gas phase보다 낮았다.

이는  $\alpha_1$ -PI의 active center에 있는 methionine이 산화적 손상을 받아 sulfoxide나 sulfone의 형태로 불활성화된다는 보고를<sup>15)</sup> 참조해 볼때 TPM의 환경이 gas phase와는 달리 환원적인 조건이어서 TPM함량의 증가가  $\alpha_1$ -PI에 크게 영향을 미치지 못하거나 TPM중 어떤 성분(들)이 gas phase에서의 free radical반응을 막아주는 것으로도 해석된다. 전연기성분이 gas phase보다 억제효과가 적은 것도 이 사실을 뒷받침하는 좋은 증거가 될 수 있다. 그러나 이에 대해서는 더 많은 연구가 필요하다.

$\alpha_1$ -PI의 불활성화를 이용한 이 방법은 품질평가 측면에서 몇가지 의의있는 시도로 사료된다. 첫째, 몇 개피의 담배로 측정이 가능하다는 점이다. 이는 수십 개피를 태워 얻은 TPM 혹은 gas phase에서 얻은 결과에 비해 매우 간단한 방법이기 때문이다. 둘째는 전연기성분에 대한 평가가 가능하다는 점이다. 이는  $\alpha_1$ -PI에 영향을 줄 수 있는 화합물들이 여러 source로부터 생성될 수 있으나 이를 종합적으로 평가할 수 있다는 점이다. 여러 가지 시판담배에 대하여 측정된  $\alpha_1$ -PI의 불활성성을 tar나 nicotine의 함량과 비교해보면 일관된 상관성을 보이지 않았다. 이는 두 가지로 생각될 수 있다. 하나는 염조나 다른 담배구성성분의 차이에 의해 연소시 활성산소나 nitric oxide등 hydroxyl radical을 생성할 수 있는 성분들의 차이로 볼 수 있으며 다른 하나는 filter흡착능 차이로 볼 수 있다. 어떤 원인에 기인되었든간에  $\alpha_1$ -PI의 억제정도는 생체에 보다 직접적인 방법으로 품질을 평가할 수 있는 새로운 방법으로 활용될 수 있음을 보여준다.

세제는 담배 filter의 개발등 제조담배에 응용할 수 있는 점이다. 최근 연기성분을 선택적으로 흡착할 수 있는 filter개발에 많은 노력을 기울이고 있다. 이들중 항산화 filter담배는 연기중의 산화제를 제거해주는 것으로서 각광을 받고 있다. 그러나 이들의 제거 정도를 aldehyde등을 측정하여 비교

하는데 이들은 자극성등 맛에 영향을 주는 중요한 산화제들이지만 수분과의 반응성이 크기 때문에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH 및 NO등에 비해 직연위생상의 의미는 훨씬 약하다.

따라서 이 방법을 활용하여 산화제를 잘 capture할 수 있는 물질을 선별하여 이를 담배 filter에 응용하면 애연가의 건강을 보호할 수 있는 담배제조에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 결 론

담배연기는 α<sub>1</sub>-PI를 빠른 속도로 불활성화시키며 담배의 종류 그리고 filter의 종류에 따라 그 정도가 달리 나타났다. 이는 전연기성분이 생체에 미치는 효과를 간접적으로 측정할 수 있는 간단하고 신속한 방법으로 흡연가의 건강 측면에서 담배의 품질을 평가할 수 있는 유용한 지표가 될 수 있을 것으로 사료된다.

또한 담배연기중 산화제를 감소시킬 수 있는 항산화제 filter의 개발에 활용될 수 있으며 이와같은 신제품 개발을 통해 덜 해로운 담배제조에 일조할 수 있을 것으로 기대된다.

## 참 고 문 헌

1. Aaron Janoff, American Physiological Society : 285-293(1983).
2. Hunninghake, G. W. and Crystal, R. G., Am Rev Respir Dis : 833-838(1983).
3. Church, D. F. and Pryor, W. A., Environmental Health Perspectives 64 : 111-126(1985).
4. Pryor, W. A., Pulmonary Emphysema and Proteolysis : 369-392(1986).
5. Aaron Janoff, Am Rev Respir Dis 132 : 417-433(1985).
6. Coagrove, J. P., Borish, E. T., Church, D. F., and Pryor, W. A., Biochem Biophys Res Commun, 132 : 390-396(1985).
7. Pryor, W. A., Uehara, K., and Church, D. F., J Am Chem Soc, 106 : 5073-5079(1984).
8. Lim, H. B., Kim, S. Y., Moon, J. Y., Lee, D. W., and Kim, Y. T., J Korean Soc Tobacco Sci, 12(1) : 19-27(1991).
9. Witt, I. and Lill, H., Methods of Enzymatic Analysis 3rd ed 5 : 448-455(1968).
10. Pryor, W. A., Dooley, M. M., and Church, D. F., Biochemical and Biochemical Research Communications, 122(2) : 676-681(1984).
11. Cohen, A. B. and James, H. L., Am Rev Respir Dis, 126 : 25-30(1982).
12. Janoff, A., Annu Rev Med, 36 : 207-216(1985).
13. Janoff, A., J Appl Physiol, 55 : 285-293(1983).
14. Talamo, R. C., Bruce, R. M., Berninger, R. W., Pierce, J. A., Brant, L. J., and Duncan, D. B., Alpha<sub>1</sub>-Antitrypsin Laboratory Manual : 21-29(1978).
15. Johnson, D. and Travis, J., the Journal of Biological Chemistry 254(10) : 4022-4026(1979).