

## Dimethylnitrosamine이 투여된 Hamster 간 속의 아미노산 분석

김수경<sup>†</sup> · 정하승\* · 박택규\*\*

삼일제약 중앙연구소

\*동남보건전문대학 임상병리과

\*\*전국대학교 화학과

(1994. 3. 14. 접수)

### Analysis of amino acids in the liver of Hamster treated with Dimethylnitrosamine

Soo Gyung Kim<sup>†</sup>, Ha Seung Jung\*, Taek Kyu Park\*\*

Samil Research Institute, Samil Pharm. Co. LTD., Ansan 425-090, Korea

\*Department of Clinical Pathology, DongNam Health Junior College, Suwon 440-714, Korea

\*\*Department of Chemistry, KonKuk University, Seoul 133-701, Korea

(Received Mar. 14, 1994)

**요약** : 화학 발암제인 dimethylnitrosamine(DMN)을 Hamster에 구강투여하였을 때 간의 아미노산 조성에 미치는 영향을 규명하기 위하여 reversed phase liquid chromatography법으로 아미노산을 정량하였다. DMN을 투여한 실험군의 간에서의 아미노산의 농도는 대조군에 비해 aspartic acid, glycine, glutamine, histidine, proline, tyrosine, leucine 등은 약 2배, valine, tryptophan은 약 3배, phenylalanine은 약 10배 증가하였고, threonine은 23%로 감소하였으며, serine, alanine, arginine, methionine, isoleucine, lysine은 큰 변화가 없었다.

**Abstract** : The effect of the chemical carcinogen dimethylnitrosamine(DMN) on the composition of amino acids of the liver in hamsters orally administered with DMN was studied by using the reversed phase high performance liquid chromatography technique.

In the liver, the concentration of aspartic acid, glycine, glutamine, histidine, proline, tyrosine and leucine were increased ca. 2-fold of those observed in liver of control group, valine and tryptophan were increased ca. 3-fold, phenylalanine was markedly increased ca. 10-fold, whereas the concentration of threonine was decreased, serine, alanine, arginine, methionine, isoleucine and lysine were unchanged, respectively.

**Key words** : DMN, Amino acids, reversed phase HPLC

#### I. 서론

Dimethylnitrosamine(DMN)은 단백질 합성을 저해하고 간의 피사를 일으키며, 간, 신장, 폐에 암을 일

으키는 강력한 화학 발암 물질로 알려져 있다.<sup>1</sup> 자연계에 존재하는 발암 물질<sup>2</sup>에는 aflatoxin B1, safrole 등이 있고, 합성된 화학 발암 물질에는 N-nitro-N-methylurea, dimethylnitrosamine과 같은 nitrosamine류

<sup>3-8</sup>, N-methyl 4-aminobenzene, benzo(a)pyrene과 같은 aromatic compound류<sup>9, 10</sup>, vinyl chloride, nitrogen mustard와 같은 alkylating agent<sup>11-13</sup> 등이 있다. 이러한 발암 물질들은 우리 환경과 음식물에 널리 퍼져있으며 동물과 사람에게서 carcinogen으로 작용한다.<sup>14</sup>

화학물질에 의한 발암화 작용은 반응성이 강한 화학 물질이 DNA에 결합하여 세포 유전자에 비가역적 변화를 가져오는 initiation 단계와 tumor 수를 증가시키고, 잠복기간을 단축시키는 promotion 단계 및 종양 세포가 분화되고 증식되는 progression의 단계를 거쳐 진행된다.<sup>15</sup>

화학 발암제 중에서 DMN은 DNA에 알킬기를 첨가하는 화학 물질로 발암작용을 일으키기 위하여 생체 내에서 oxidase에 의해 dealkyl화되어 monoalkyl 유도체를 생성하고, 이것은 친핵체 염기에 결합하는 carbonium 이온( $CH_3^+$ )을 생성한다. carbonium 이온은 강한 친전자체로서 세포내 RNA, DNA 및 protein의 nucleophilic site인 N, O, S 원자와 공유결합을 형성하며, tumor 형성 개시에 있어서 genotoxic carcinogen으로 작용한다. DMN의 메틸기가 염기에 결합 가능한 위치는 adenine에서는 N-1, N-3, N-7, guanine에서는 N-3, N-7, O-6, cytosine에서는 N-3, O-2, thymine에서는 N-3, O-2, O-4이다.<sup>16, 17</sup>

DNA 분자 중에 메틸화된 염기가 있을 때 DNA의 복제는 잘못된 염기와 짝짓게 된다. 예를 들면, O<sup>6</sup>-methylguanine은 DNA가 복제될 때 cytosine 대신 thymine과 염기쌍을 이루게 되고, 그 다음 DNA 복제 때는 thymine이 adenine과 쌍을 이루게 된다. 즉, guanine이 adenine으로 바뀌게 되는 G → A 염기전이를 유도하게 된다.<sup>18, 19</sup>

이와 같이 잘못 짝지어진 DNA가 수복되지 못하면 DNA 일부분의 전이나 재배열로 유전자에 영향을 미치게 된다. 이러한 DNA 일부분의 전이나 재배열, 삽입 또는 결실과 같은 변화가 일어나면 단백질의 아미노산 배열 순서를 전달하고, 규정하는 mRNA에 변형된 정보가 전사되고, 이 전사된 mRNA의 codon은 활성 아미노산을 리보솜으로 운반하는 tRNA에 전달된다. 이때 변형된 codon으로 인해 아미노산이 바뀌게 된다.<sup>20</sup>

따라서, 본 연구에서는 간에 강력한 발암성을 나타

내는 것으로 알려져 있는 DMN을 hamster에 구강투여하였을 때 간의 아미노산 조성의 변화가 있을 것으로 생각되어 다음과 같은 실험을 하였다.

아미노산의 정량을 하기 전에 DMN에 의한 간의 손상 정도를 예측하기 위해 혈액에서의 백혈구의 변화를 조사하였고, reversed phase liquid chromatography를 이용하여 간의 아미노산을 정량 분석하였다.<sup>21-23</sup>

## II. 실험

### 1. 실험재료

실험 동물은 생후 3~4주령의 Syrian Golden hamster를 사용하였으며, 실험군에는 DMN을 50ppm으로 식수에 희석하여 4주 동안 자유로이 섭취하도록 하였으며, DMN을 공급하지 않은 것을 대조군으로 하였다. 대조군과 실험군의 간을 채취하여 실험 재료로 사용하였다.

백혈구 수 측정을 위한 혈액은 심장에서 채혈하여 혈액 응고 방지제로 처리한 병에 채취하여 4℃에 보관하였고, 2g의 간에 perchloric acid 3mL를 가하여 homogenizer로 마쇄한 다음 10000xg에서 10분간 원심분리하여 상등액을 -20℃에서 보관하여 사용하였다.

### 2. 시약의 제조

#### 2. 1. 백혈구의 감별계수 시약 제조

Wright stain(BDH Co.), glycerin(Wako Co.), methanol(Merck Co.)를 사용하였으며, 염색시약은 Wright stain 0.3g과 glycerin 3mL를 막자사발에 넣고 잘 갈아서 알맹이가 없게 한 다음 methanol을 서서히 첨가하여 100mL가 되도록 하였다. 세척 용액은  $KH_2PO_4$  6.63g,  $NaHPO_4$  2.56g을 1L의 증류수에 녹인 후 2M  $H_3PO_4$ 로 pH 6.4가 되도록 조정하여 사용하였다.

#### 2. 2. 아미노산 정량 시약

Aspartic acid, serine, glycine, histidine, threonine, alanine, arginine, proline, tyrosine, valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine, tryptophan, lysine, EDTA는 Sigma제를 사용하였고, Acetonitrile은 Merck제를 사용하였다.

각 amino acid 시약은 10mM로 만들어 표준 용액으로 사용하였으며, 이동상은 다음과 같이 제조하였다.

A용액 : 0.07M CH<sub>3</sub>COONa 용액을 2M CH<sub>3</sub>COOH 로 pH 6.5가 되도록 조정하였으며, acetate buffer와 acetonitrile의 비를 975 : 20 (V/V)로 혼합하고, A용액 995mL에 0.01M EDTA 250 $\mu$ L를 첨가하였다.

B용액 : Acetonitrile : Deionized Water : MeOH = 354 : 400 : 119 : (V/V/V)로 하여 사용하였다.

### 3. 기기

Homogenizer는 Biospec사 biohomogenizer를 사용하였고, 현미경은 Olympus (Model BH-2)를 사용하였으며, 자동혈구계산기는 Coulter counter S puls II를 사용하였으며, HPLC는 Beckman사의 UV detector, autosampler, temperature control heater 등을 사용하였고, 시료 유도체화를 위해서 Waters사의 Pico-Tag Vacuum Work Station을 사용하였다.

### 4. 혈액의 백혈구 수 측정

혈액 응고 방지제로 처리한 병에 혈액을 채취하여 잘 혼합한다. 혼합된 혈액을 자동 혈구 계산기로 흡입시켜 총 백혈구 수를 측정하였고, differential count (감별계수)를 하기 위해 slide 위에 잘 혼합된 혈액을 1방울 떨어뜨리고, smear하여 말린 다음 wright stain 으로 염색하여 현미경으로 감별계수를 하였다.

### 5. Amino acid 정량

간 2g을 5% perchloric acid 용액 3mL에 넣은 다음 4°C에서 마쇄하여 10000 $\times$ g로 10분 동안 원심분리한 후 상등액을 취하였다. 이 상등액은 Millipore Millex HV Filter (0.45 $\mu$ m)로 여과하여 사용하였으며, MeOH 350 $\mu$ L, H<sub>2</sub>O 50 $\mu$ L, triethylamine 50 $\mu$ L, phenylisothiocyanate (PITC) 50 $\mu$ L을 혼합하여 유도체 시약을 만들었다. 간을 전처리하여 얻은 시료 및 표준 용액 25 $\mu$ L에 유도체 시약 25 $\mu$ L을 첨가하고 Vortex mixer로 충분히 혼합한 다음 20분간 방치하였다. vacuum station에서 40분간 완전히 건조한 후 시료 tube를 꺼내어 이동상 A용액 400 $\mu$ L를 가하고 초음파로 용해시켰으며, 용해된 시료를 0.45 $\mu$ m filter로 여과한 다음 HPLC에 주입하였다.

아미노산은 reversed phase liquid chromatography 방법으로 정량하였으며, 분석 조건은 Table 1과 같고, 이

Table 1. Operating condition for the assay of amino acids by HPLC

Column	Pico-Tag (4 $\mu$ m, 3.9 $\times$ 300mm)
Temperature	40°C
Detector	UV detector (UV 254nm)
Sensitivity	0.05 AUFS
Mobile Phase	A : 0.07M acetate buffer : Acetonitrile (975 : 20, v/v) B : Acetonitrile : H <sub>2</sub> O : MeOH (354 : 400 : 119, v/v/v)
Injection volume	20 $\mu$ L
Run time	60min

동상은 Henrikson<sup>23</sup> 법을 이용하였다. 아미노산의 농도는 다음과 같이 환산하였다.

Amino acid 농도 ( $\mu$ mol/L)

$$= \frac{\text{Sample peak area}}{\text{Standard peak area}} \times \text{Standard 농도} \times \text{회석배수} \quad (\mu\text{mol/L})$$

### III. 결과 및 고찰

Hamster는 DMN을 투여하기 시작하여 2주일이 경과하면서 1~2마리씩 죽기 시작하였고, 대조군의 체중은 55g에서 90g으로 증가하였으나, 실험군에서는 50g에서 61g으로 정상적인 체중 증가를 나타내지 않았다. 또한 실험군의 복강 내에는 맑은 수액 또는 적갈색의 혈액 내용물이 들어 있는 복수가 생성되었으며, DMN을 투여하지 않은 대조군과 DMN을 투여한 실험군의 간을 육안상으로 비교하였을 때, 실험군에서는 출혈성 적색 반점이 나타났고, 유백색의 단단한 돌출 부위가 관찰되었다.

DMN에 의한 간 손상 정도를 예측하기 위해 혈액을 smear하여 백혈구를 감별계수(differential count)한 결과는 Table 2와 같다. 총 백혈구 수는 대조군에서는 5.9 $\pm$ 1.56 thous/L로 나타났고, 실험군에서는 10.6 $\pm$ 1.22 thous/L로 대조군보다 현저한 증가를 나타냈다. 백혈구의 감별계수에서 segmented neutrophil (SEG)의 수는 대조군에서 2294개로 나타났고, DMN을 투여한 실험군에서는 6245개로 대조군보다 증가하였다. Monocyte는 대조군에서 370개로 나타났고, 실험군에

Table 2. Change of the number of white blood cell

Group	W B C			
	Total (thous/L)	SEG(%) (2294)	LYMPO (%) (3256)	MONO (%) (370)*
Control	5.9±1.56	38.8±3.96 (2294)	55.0±5.52 (3256)	6.3±2.28 (370)*
DMN	10.6±1.22	59.0±6.98 (6254)	24.3±3.88 (2579)	16.7±7.59 (1767)

Control : Not administered with DMN

DMN : Administered with DMN

\* : Number of cell / mL

thous / L : Thousand / L

WBC : White blood cell

SEG : Segmented neutrophil

MONO : Monocyte

LYMPHO : Lymphocyte

Each value represents the mean ±S.D. of five hamsters

서는 1767개로 대조군보다 급격히 증가하였다. 한편, lymphocyte는 대조군에서 3256개로 나타났고, 실험군에서는 2579개로 대조군보다 감소 현상을 나타내었다. 또한, 실험군에서는 미성숙 세포가 출현하였다. 이와 같이 SEG와 monocyte가 증가하고, 미성숙 세포가 나타나는 현상은 일반적으로 약물 및 종양에 의한 간 조직의 괴사 및 간경변, 악성 종양 때문인 것으로 알려져 있다.<sup>2,5</sup>

화학발암제인 DMN 투여로 손상된 간에서의 아미노산 조성의 변화를 알기 위해서 간의 아미노산을 추출하여 분석하였으며, standard amino acid chromatogram은 Fig. 1과 같고, 대조군과 실험군의 amino acid chromatogram은 Fig. 2, Fig. 3과 같다.

DMN을 투여한 실험군 간에서의 amino acid 농도 변화는 Table 3과 같이 나타났으며, 실험군에서의 아미노산의 농도를 대조군과 비교하면 aspartic acid는 4.0±0.71μmol/L에서 6.4±1.19μmol/L, glycine은 22.3±4.05μmol/L에서 54.7±18.8μmol/L, glutamine은 7.9±1.37μmol/L에서 14.5±2.20μmol/L, histidine은 3.5±0.93μmol/L에서 7.4±2.53μmol/L, proline은 5.8±0.54μmol/L에서 11.7±3.47μmol/L,

Table 3. Change of amino acids concentration in liver

Amino Acid	Concentration(μmol/L)	
	Control	DMN
Aspartic acid	4.0±0.71*	6.4±1.19(160)**
Serine	4.3±0.38	4.7±1.53(111)
Glycine	22.3±4.05	54.7±18.8(245)
Glutamine	7.9±1.37	14.5±2.20(183)
Histidine	3.5±0.93	7.4±2.53(208)
Threonine	142.7±14.4	2.6±4.50( 23)
Alanine	51.0±8.50	51.2±6.67(100)
Arginine	0.0±0.00	0.0±0.00( 0)
Proline	5.8±0.54	11.7±3.47(204)
tyrosine	0.2±0.01	0.3±0.19(155)
Valine	1.5±0.52	5.2±1.66(349)
Methionine	0.8±0.08	0.7±0.43( 99)
Isoleucine	1.9±0.55	2.1±1.08(111)
Leucine	0.9±0.27	2.0±0.50(230)
Phenylalanine	5.2±0.54	52.8±9.86(1021)
Tryptophan	21.5±7.56	75.8±17.5(323)
Lysine	4.9±2.14	5.6±1.41(115)

Control : Not administered with DMN

DMN : Administered with DMN

\* : Mean ±S.D.

\*\* : Numbers in parentheses, relative value to the value of control group(%)

Each value represents the mean ±S.D. of five hamsters

tyrosine은 0.2±0.01μmol/L에서 0.3±0.19μmol/L, valine은 1.5±0.52μmol/L에서 5.2±1.66μmol/L, leucine은 0.9±0.27μmol/L에서 2.0±0.50μmol/L, phenylalanine은 5.2±0.54μmol/L에서 52.8±9.86μmol/L, tryptophan은 21.5±7.56μmol/L에서 75.8±17.5μmol/L로, 대조군의 아미노산의 농도를 100으로 하였을 때 aspartic acid는 160%, glycine은 245%, glutamine은 183%, histidine은 208%, proline은 204%, tyrosine은 155%, valine은 349%, leucine은 230%, phenylalanine은 1021%, tryptophan은 323%로 증가를 나타내었다. 한편, threonine은 142.7±14.4μmol/L에서 32.6±4.50μmol/L로 대조군보다 23%로 감소하였으며, serine, alanine, arginine, methionine, isoleucine, lysine은 큰 변화가 없었다.

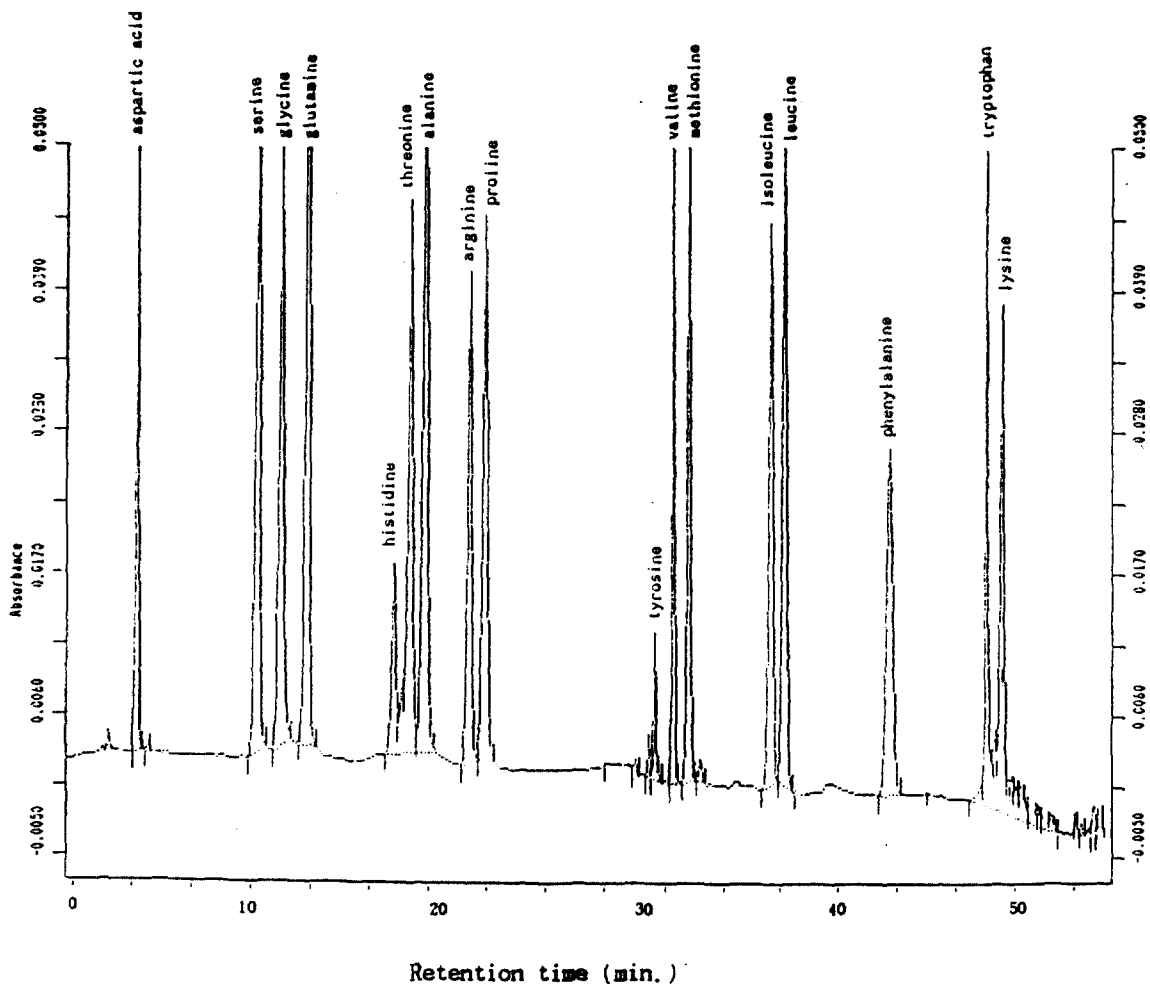


Fig 1. Chromatogram of standard amino acids.

Condition : Reversed phase liquid chromatography on Pico-Tag of a standard amino acid. A linear gradient (50 min) was used with a flow rate of 1 mL/min. The initial eluant consists of  $\text{CH}_3\text{COONa}$  : acetonitrile (975 : 20 v/v), pH 6.5. The final eluant was acetonitrile :  $\text{H}_2\text{O}$  : methanol (354 : 400 : 119 v/v/v), overall pH 6.5. AUFS was 0.05 ( $A_{254}$ ).

이상의 결과로부터 화학 발암제인 DMN의 투여에 의한 간에서의 phenylalanine의 농도는 대조군에 비해 실험군에서 10배 증가하였으며, 이것은 tumor marker로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

#### 참고문헌

1. J. K. Lin, *Clin. Biochem.*, **23**, 67(1990).
2. J. M. Cullen, B. H. Ruebner, L. S. Hsieh and D. P. Hsieh, *Cancer Res.*, **47**, 1913(1987).
3. J. Sahn, E. Turkigton, D. L. Pointe and B. Strauss, *Biochemistry*, **28**, 2836(1989).
4. B. L. Gaffney, L. A. Marky and R. A. Jones, *Biochemistry*, **23**, 5686(1984).
5. G. Wade, R. Mandel and H. Ryser, *Cancer Res.*, **47**, 6606(1987).
6. M. W. Kalnik, P. F. Swann and D. J. Patel, *Biochemistry*, **28**, 170(1989).
7. A. Buchmann, M. Schwarz, F. Oesch and W. Kunz,

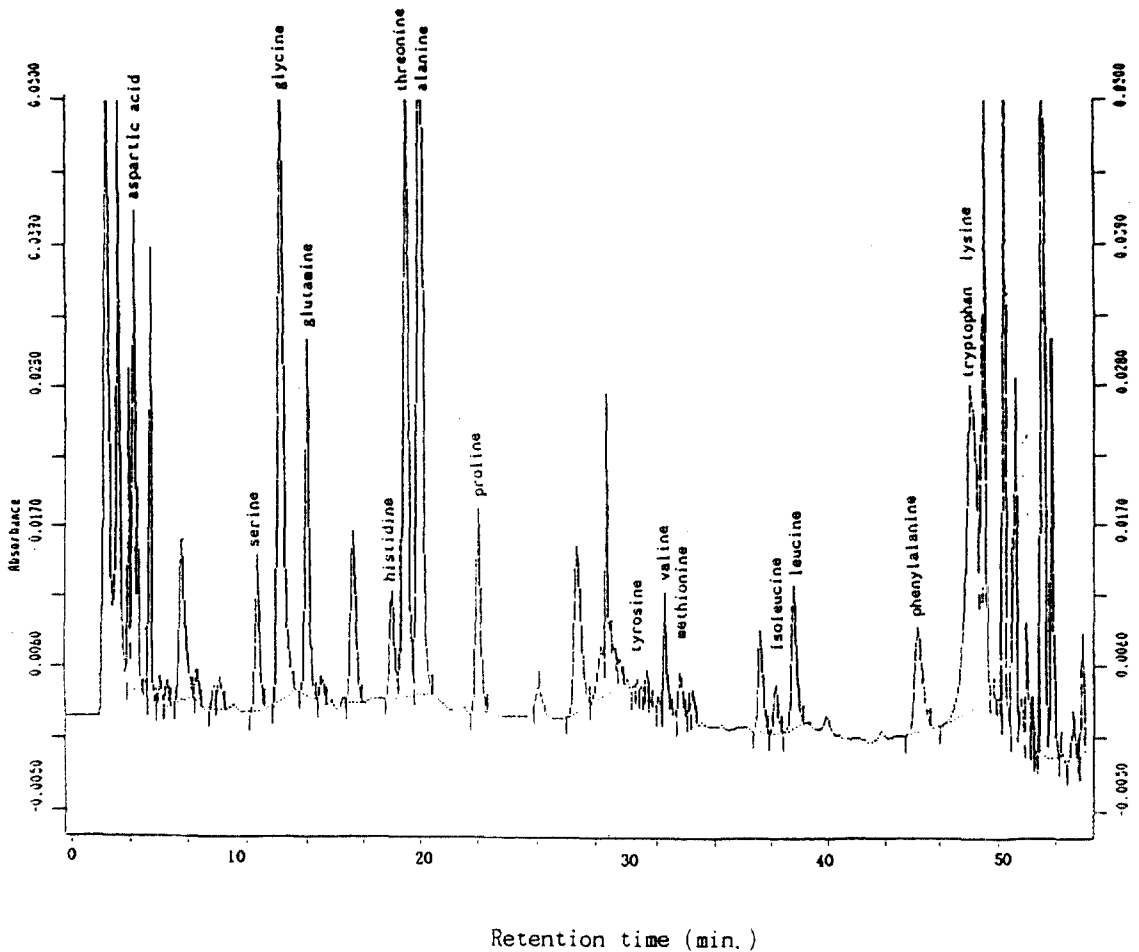


Fig 2. Chromatogram of amino acids in liver of control group.  
Condition : Same as those given for Fig. 1.

- Cancer Res.*, **47**, 2911(1987).
8. W. Lijinsky, R. M. Kovatch and C. W. Riggs, *Cancer Res.*, **47**, 3968(1987).
  9. H. Ernst, M. Emura, B. Bellman, D. Seinsch and H. Mohr, *Cancer Res.*, **47**, 5112(1987).
  10. E. Scherer, *Biochemica et Biophysica Acta*, **738**, 219(1984).
  11. D. Simha, V. A. Palejwala and M. Z. Humavun, *Biochemistry*, **30**, 8727(1991).
  12. Z. Livneh, *J. Biol. Chemistry*, **216**(23), 9526(1986).
  13. J. Y. Hong, J. Pan, Z. Dong and C. S. Yang, *Cancer Res.*, **47**, 5948(1987).
  14. E. C. Miller, *Cancer Res.*, **38**, 1479(1978)
  15. E. Huberman, M. Mager and L. Sachs, *Nature*, **264**(25), 360(1976).
  16. V. M. Craddock and P. N. Magee, *Biochem. J.*, **100**, 724(1966).
  17. H. B. Borowski and R. W. Chambers, *Biochemistry*, **26**, 2465(1987).
  18. M. D. Topal, J. S. Eadie and M. Conrad, *J. Biol. Chemistry*, **261**(21), 9879(1986).
  19. J. S. Eadie, M. Conrad, D. Tootchen and M. B. Topa, *Nature*, **308**, 201(1984).
  20. D. Sagher and B. Strauss, *Biochemistry*, **22**, 4518(1983).
  21. E. Brown and R. Newton, *Anal. Biochem.*, **123**, 378(1982).
  22. H. Valdez and R. Kothari, *J. Chromatogr.*, **247**,

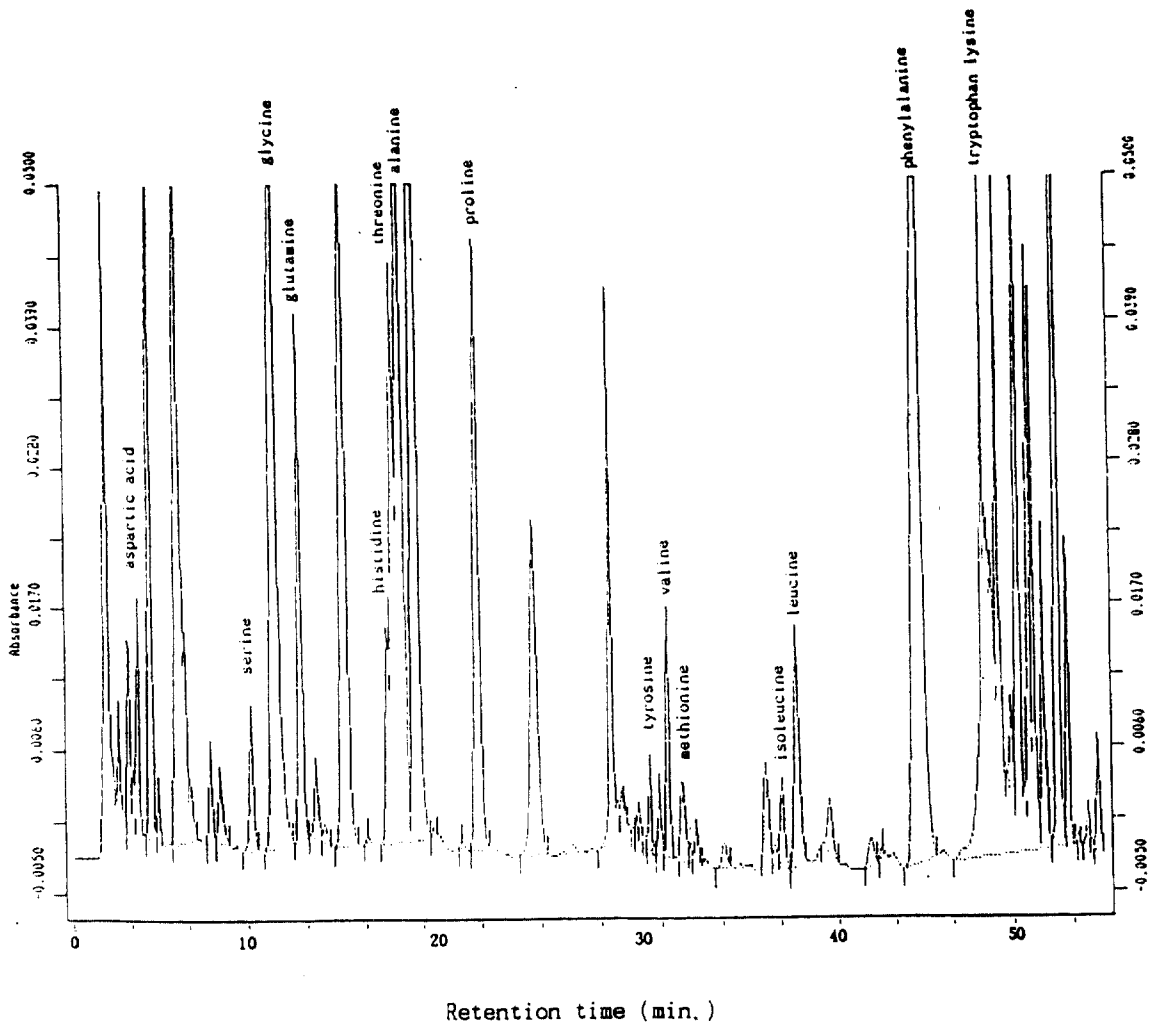


Fig 3. Chromatogram of amino acids in liver administered with DMN.

Condition : Same as those given for Fig. 1.

307(1982).

23. R. L. Henrikson and S. C. Meredith, *Anal. Chem.*,

136, 65(1984).