

인체 세포 모델을 이용한 HPV-16과 NNK의 발암 잠재력에 관한 연구

양재호 · 이세영

대구효성가톨릭대학교 의과대학 약리학 교실

Carcinogenic Potentials of HPV-16 and NNK in Human in Vitro Model

Jae-Ho Yang and Se-Young Lee

Department of Pharmacology, School of Medicine,
Catholic University of Taegu-Hyosung, Taegu, 705-034, Korea
(Received October 4, 1996)
(Accepted October 18, 1996)

ABSTRACT : Carcinogenic potential of HPV-16 DNA and NNK in a human keratinocyte cell line was assessed to study effects of viral-chemical interaction. Human cells were transfected with HPV-16 DNA and 6 clonal cell lines were subsequently obtained. Clonal line-3 and -6 at passage 7 showed characteristics of tumor cells such as increases of saturation density, soft-agar colony formation, cell aggregation and foci appearance. Among cells treated with 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M or 1 mM of NNK for 4 weeks, 100 μ M treatment showed most tumorigenic characteristics at passage 7. These results indicate that either HPV-16 or NNK alone is tumorigenic in this in human in vitro model. When cells transfected with HPV-16 were subsequently exposed by 100 μ M NNK for 4 weeks, all the clonal cells except clone-1 showed higher levels of tumor cell characteristics than HPV-16 DNA or NNK exposure alone. Clonal line-6, the most tumorigenic cells, showed higher transcriptional level of fibronectin and lower level of TGF- β , as compared to control cells, suggesting that alteration of growth factor or extracellular matrix may play a role in carcinogenesis process induced by HPV-16 and NNK. Taken together, the present study indicates that viral-chemical interactions between HPV-16 DNA and NNK enhance carcinogenic potentials of human cells and implies that smoking among people infected with human papillomavirus may pose an additional risk of causing cancer.

Key Words : NNK, HPV-16, Carcinogenesis, Human in vitro model

I. 서 론

지금까지 많은 역학조사와 동물실험등을 통하여 흡연과 발암과의 상관성이 보고되어 왔으며 흡연은 폐암을 비롯한 식도암, 구강암, 후두암, 췌장암, 방광암, 자궁경부암등 인체의 여러 장기에서 암을 일으키는 위해 요인으로 알려져 왔다(Shopland *et al.*, 1991, Hecht *et al.*, 1978). 이러한 흡연의 인체 위해성은 흡연속에 6,000여종의 유해화학물질이 존재하며 이들중 40여종이 발암성을 가지고 있기 때문이다(Hoffman, 1990). 하지만 대부분의 흡연중에 포함된 발암물질은 산업장이나 오염된 대기중에도 존재하므로 여러 인체장기의 발암 현상이 반드시 흡연에 의해서 일어나는지에 대해서는 논란의 여지가 많다(Belinsky *et al.*, 1991). 따라서 흡연과 발암과의 특이적인 상관성을 명확히 밝히기 위해

흡연에만 존재하는 발암성 물질에 대한 발암의 기전을 이해하는일은 흡연에 의한 인체 위해성을 정확히 평가하고 이에따른 예방책을 세우는데 매우 필요하다고 생각된다.

NNK(4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone)는 tobacco alkaloid에서 추출된 흡연중에 특이적으로 존재하는 강력한 발암 물질이며 흡연중 가장 많은 형태의 Nitrosamine이다(Hecht *et al.*, 1988). NNK는 동물실험에서 강력한 발암물질로 알려져 있으며 역학조사결과 smokeless tobacco를 사용하는 사람에서 구강 및 후두암의 높은 발병률을 나타내는 원인으로 알려져 있다(Meanwell, 1988). 최근 여성의 흡연인구는 증가하는 추세에 있으며 자궁경부암 발생의 30%정도가 흡연에 기인하고 있다(Shopland, 1991). Human papillomavirus는 성생활이 활발한 성인에서 비교적 높게

감염되어 있으며 자궁경부암을 일으키는 최대의 위해 인자로 알려져 있다 (Zu Hausen, 1989). 특히 HPV-16 또는 HPV-18 DNA는 정상인체세포를 불멸화 시킬수 있으나 악성종양세포로 변형되는데에는 추가적인 환경요인이 요구된다 (Pecoraro *et al.*, 1989, Li *et al.*, 1992). 따라서 Human papillomavirus 감염과 흡연간의 암발생에 대한 상관관계를 연구하는것은 여성의 흡연 증가에 따른 여성 종양 발생 위해도를 평가할수 있는 계기를 마련할수 있으며 흡연과 함께 암을 일으키는데 기여하는 보조인자를 찾아내는데 중요한 역할을 할것으로 생각된다. 그러므로 본 연구는 virus 감염에 따른 흡연의 발암효과를 연구하여 흡연과 상호 작용하는 유해인자를 선별하고 이를 통하여 흡연에 의한 암 발생의 예방 및 진단에 기초가 되는 자료를 마련하고자 하였다.

본 연구는 HPV-16 DNA를 함유하는 인체상피세포에 NNK를 후차적으로 노출시킨 결과 단독 투여시보다 세포의 발암특성이 증가함을 보였으며 발암성을 나타낸 세포에서 fibronectin RNA의 증가 및 TGF- β_1 의 감소를 나타내었다.

II. 재료 및 방법

1. 인체세포의 발암성 평가

인체상피세포를 배양하고 tobacco-specific Nitrosamine인 NNK를 4주간 폭로 시킨 다음 foci형성, soft agar colony formation, cell aggregation 및 cell density측정을 통하여 인체세포가 NNK에 의해 발암특성을 획득하였는지 분석하였다. 또한 인체세포에 Human papillomavirus DNA type-16을 Ca⁺⁺-phosphate방법으로 transfection하고 G418으로 selection하여 HPV-16을 함유하는 clone을 만든 다음, 이들 각각 clone에 NNK를 4주 투여하고 세포의 발암특성을 분석하였으며 HPV-16을 함유하는 세포의 NNK 발암성과 모세포의 NNK 발암성을 비교하여 HPV-16과 흡연과의 상호 작용을 분석하였다.

2. 세포배양

일차상피세포로부터 Ad12-SV40에 의해 불멸화된 인체상피세포의 Passage-25단계의 세포를 사용하였다. 배양조건은 37°C, 5% CO₂ Humidified Incubator에서 배양되었으며 세포가 confluent를 이루는 시점을 기준으로 1:4로 subculture하였다. 배양액의 구성은

DMEM(Dulbeco's Minimal Essential Medium)에 Fetal bovine serum 10%, Hydrocortison(5 μ g/ml), Penicillin G(50 μ g/ml), Streptomycin(50 μ g/ml)을 첨가하여 사용하였다 (Yang *et al.*, 1992).

3. HPV-16 DNA 투입

50%정도의 confluency를 보이는 일차세포에 calcium-phosphate방법으로 HPV-16 DNA를 함유하는 pMHPV16d를 투입하였다. G418에 resistant한 cell colony를 cloning ring을 사용하여 분리한 다음 지속적으로 배양하였다.

4. Cell aggregation assay

Soft agar assay와 같은 방법으로 base agar를 만들어 5 ml씩 petri dish에 넣고, 밤새 37°C incubator에 둔 다음, 10% FBS를 포함한 배양액에 10⁵ cells/dish로 세포를 접종한 후 4일이 지난 시점에서 배양액상에 성장하는 1 mm이상 크기의 colony 숫자를 측정하였다 (Yang *et al.*, 1992).

5. Soft agar colony formation

Nobe agar 1.2 g에 dH₂O 35 ml을 넣고 30분간 autoclave한 다음 15 ml의 dH₂O와 FBS 25 ml, 2X EMEM 50 ml을 넣고 0.9% agar base를 만든다. 5 ml의 agar base를 petri dish에 넣은 다음 밤새 37°C incubator에 둔다. 0.9 g Noble agar에 dH₂O 50 ml을 넣어 30분간 autoclave한 다음 dH₂O 7.2 ml, FBS 7.2 ml 2X EMEM 14.4 ml을 넣어 0.36% top agar를 만든다. base agar에 1 \times 10⁴ cells/dish를 포함하는 top agar용액을 2 ml씩 petri dish에 넣는다. 그후 colony형성의 크기가 0.3 mm 이상인 colony수를 측정하였다 (Yang *et al.*, 1993).

6. Northern blot

세포에서 추출된 RNA를 분석하기 위하여 Formaldehyde agarose gel을 사용하였다. agarose, formaldehyde와 MOPS를 이용하여 1% agarose gel을 만들고 total RNA sample을 well당 10 μ g씩 넣는다. 50% Formamide로 3시간동안 prehybridization한 다음 밤새도록 DNA-probe를 함유한 hybridization용액으로 반응시킨다. Nitrocellulose paper를 꺼낸 다음 방사능 제거

를 위한 수차례 세척을 거친후 X-ray film이 있는 카세트에 넣고 -72°C에서 12시간 반응시켰다.

III. 결과 및 고찰

본 연구는 Ad12-SV40 hybrid virus에 의해 불멸화된 인체상피세포를 이용하여 흡연중에만 특이적으로 존재하는 NNK의 발암성을 연구하고자 하였다. 본 연구에 사용될 세포는 일차적인 인체상피세포의 표식자를 가지며 정상세포와 같은 평평한 형태를 유지하고 nude mouse에서 tumor를 일으키지 않는다 (Rhim *et al.*, 1985). 따라서 이 세포체계는 chemical carcinogen, oncogene, x-ray등 여러가지 발암물질의 발암화기전을 연구하는데 성공적으로 사용되어왔다 (Yang *et al.*, 1995) NNK는 흡연중에 있는 Nitrosamine중 가장 많이 함유되어 있는 물질로서 동물 실험에서 발암성을 나타낸바 있으며 흡연에 의한 발암연구에 가장 많이 이용되고 있다. 따라서 본 연구에서는 불멸화된 인체상피세포를 이용하여 흡연중에 특이적으로 존재하는 NNK의 발암성 및 Human papillomavirus와의 발암상승작용을 연구하기 위해 HPV-16 및 NNK에 대한 각각의 발암성 및 상승작용을 분석하였다.

인체세포에 HPV-16을 Calcium phosphate방법으로 transfection하고 G418으로 selection한 결과 6개의 clonal cell을 얻었다. 이들 세포군을 지속적으로 subculture하여 transfection한지 59일이 되는 passage 7 단계에서 발암의 세포학적 지표인 saturation density, soft-agar formation 및 cell aggregation을 측정하였다 (Table 1).

Saturation density는 clone-3 과 clone-6에서 각각 2배 및 1.8배 증가하였으며 soft-agar formation에서는 clone-3, clone-5 및 clone-6에서 각각 3.1배, 3.3배, 4배씩 증가하였다. cell aggregation에서는 clone-3, clone-5, clone-6에서 colony의 증가를 보였다. 세포의 발암화에 따른 anchorage-independence의 결과로 나타나는 foci의 출현시기는 clone-6의 경우 transfection후 52일이 지난 passage-6 에서 나타났으며 passage-7 에서는 clone-3 도 foci의 출현을 보였다. 따라서 clone-3 와 clone-6가 가장 높은 세포 발암성을 획득한것으로 생각된다. 이러한 연구 결과는 HPV-16이 인체세포의 발암화와 관련성이 있음을 보여주는 또 하나의 증거이다. NNK를 4주간 처리하고 지속적인 subculture를 거쳐 59일이 지난 passage-7에서 인체세포의 발암성을 분석한 결과 saturation density의 유의한 차이는 없었으나 soft-agar formation에서는 100 μ M 과 1 mM처리군에서 2.4배

Table 1. Properties of human keratinocytes transfected with HPV-16 at passage 7.

clone	saturation density ($\times 10^5/cm^2$)	soft agar colony formation	cell aggregation (>1 mm)**
control	2.2 \pm 0.03	0.08 \pm 0.01	-
C-1	1.9 \pm 0.12	0.09 \pm 0.05	-
C-2	2.0 \pm 0.43	0.12 \pm 0.03	-
C-3	4.5 \pm 0.40*	0.25 \pm 0.02*	+
C-4	2.5 \pm 0.24	0.15 \pm 0.07	-
C-5	2.8 \pm 0.42	0.27 \pm 0.06*	+
C-6	3.9 \pm 0.32*	0.34 \pm 0.09*	++

* : P < 0.05 as compared to control cells

** : - ; \leq 5 colonies, + ; 5 > colonies, ++ ; > 10 colonies

The data are mean \pm SD with 3 different counts.

Table 2. Characteristic of human cell at passage 7 after 4week treatment of NNK.

clone (μ m)	saturation density ($\times 10^5/cm^2$)	soft agar colony formation	cell aggregation** (size > 0.5 mm)
control	2.5 \pm 0.02	0.15 \pm 0.01	-
1	2.7 \pm 0.04	0.09 \pm 0.03	-
10	2.3 \pm 0.12	0.19 \pm 0.06	-
100	2.8 \pm 0.15	0.36 \pm 0.12*	+
1000	3.0 \pm 0.24	0.30 \pm 0.15	-

* : P < 0.05 as compared to control cells

** : - ; \leq 5 colonies, + ; 5 > colonies

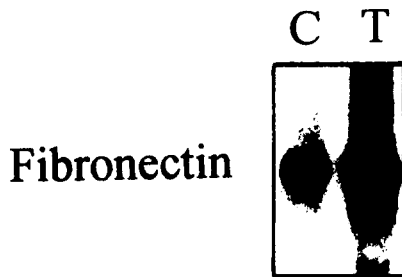
및 2.0배의 증가를 보였고 cell aggregation에서는 100 mM처리군에서만 colony수의 증가를 나타내었다 (Table 2). Foci의 출현시기는 100 nM NNK처리후 59일이 지난 passage-7이였으며 1 mM처리군은 66일이 지난 passage-8에서 foci를 보였다. 따라서 본 연구결과는 흡연중에 특이하게 존재하는 Nitrosamine인 NNK가 인체상피세포에서 발암성이 있음을 나타내는 증거를 제시하는 계기가 될것으로 사료되며 아울러 인체세포를 이용하여 NNK의 발암성을 나타내는데 관여하는 생체지표를 개발할수 있는 가능성을 제시하였다.

HPV-16의 transfection이후 얻은 6개의 clonal cell에서 가장 높은 발암성을 나타낸 NNK 100 μ M을 4주간 처리하여 세포의 발암성을 분석한 결과 c-3, c-4, c-5 및 c-6에서 saturation density가 1.7배, 1.4배, 1.5배, 1.9배씩 각각 증가하여 HPV-16의 transfection시 변화를 나타내지 않은 c-4 와 c-5세포군에서도 NNK투여로 세포의 발암성이 나타남을 보였다. 또한 soft-agar formation은 c-2, c-3, c-4, c-5 및 c-6에서 1.8배, 2.1배, 1.7배, 1.6배, 2배씩 각각 증가하였는데 c-2, c-4 및 c-5 세포군은 NNK의 후차적인 처리로 c-1을 제외한 모든 군에서 cell aggregation이 나타났으며 특히 c-3 및 c-6에서는 10개 이상의 군집세포가 관찰되었다. 이는 HPV-

Table 3. Properties of HPV-16 transfected human keratinocytes at passage 7 after 4 weeks treatment of 100 μ M NNK.

clone	saturation density ($\times 10^5/\text{cm}^2$)	soft agar colony formation	cell aggregation ($>1 \text{ mm}$)**
control (NNK treatment only)	2.5 ± 0.12	0.21 ± 0.4	+
C-1	2.1 ± 0.15	0.20 ± 0.01	-
C-2	2.9 ± 0.10	0.38 ± 0.02	+
C-3	$4.3 \pm 0.08^*$	$0.45 \pm 0.04^*$	++
C-4	$3.5 \pm 0.04^*$	$0.36 \pm 0.08^*$	+
C-5	$3.8 \pm 0.24^*$	$0.35 \pm 0.04^*$	+
C-6	$4.8 \pm 0.12^*$	$0.42 \pm 0.05^*$	++

* : P < 0.05 as compared to control cells

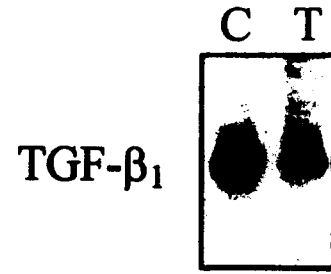
** : - ; ≤ 5 colonies, + ; $5 >$ colonies, ++ ; > 10 coloniesThe data are mean \pm SD with 3 different counts.**Fig. 1.** Northern analysis of fibronectin RNA level in control cells (C) and clonal cell-6 treated with NNK (T)

16에 의해 나타난 세포간의 응집력이 NNK의 투여로 더욱 증가함을 암시한다 (Table 3).

HPV-16과 NNK를 동시 노출시 foci가 나타나는 시기는 c-1을 제외한 모든 세포군에서 66일이 지난 passage-8이었으며 특히 HPV-16의 단독투여로 foci를 보이지 않았던 c-2, c-4 및 c-5세포군도 NNK투여후 foci를 나타낸점은 NNK의 후차적인 투여가 세포의 발암성을 증가시킨다는 증거로 생각된다.

Control세포와 HPV-16과 NNK에 의해 강한 발암성을 나타낸 c-6세포군의 fibronectin 전사를 비교한 결과 c-6에서 전사수준이 높게 나타났다 (Figure 1). fibronectin은 암 세포의 응집력 증가와 이동 및 분포에 중요한 역할을 하는 세포외 기질로 알려져있다 (Dufour *et al.*, 1988, Sheibani *et al.*, 1991). 이러한 fibronectin의 증가는 NNK 및 HPV-16 DNA에 의한 발암화 과정에 fibronectin이 관여함을 암시하는 증거로써 앞으로 NNK의 발암성과 fibronectin의 역할에 관한 더 많은 연구가 뒤따라야 할 것으로 보인다.

TGF- β_1 의 전사수준을 비교한 결과 control에 비해 발암성이 높은 c-6세포군에서 전사수준이 낮게 나타났다 (Figure 2). 이러한 결과는 NNK 와 HPV-16 DNA에 의

**Fig. 2.** Northern analysis of TGF- β_1 in control cells (C) and clonal cell-6 treated with NNK (T)

한 세포의 발암화 과정에서 TGF- β_1 의 감소가 관여되어 있음을 보여주는 증거로써 TGF- β_1 에 의한 인체세포의 성장억제현상의 저하가 암세포군의 확산 및 증식에 기여할것으로 추정된다 (Herbert *et al.*, 1990).

본 연구 결과 HPV-16 DNA는 인체상피세포에서 발암성을 나타내며 그 발암성은 NNK의 후차적인 노출에 의해 증가함을 보이므로써 Human papillomavirus와 tobacco중에 특이적으로 다량 존재하는 강력 발암물질인 NNK사이에 발암의 상승효과가 있음을 알수있다. 따라서 HPV-16에 감염되어있는 여성의 경우 흡연은 추가적인 발암 위해 요인으로 작용할수도 있음을 추정할 수 있다.

감사의 말씀

본 연구는 한국인삼연초연구원의 흡연위생에 관한 연구 지원 사업으로 이루어졌으며 이에 감사 드립니다

참고문헌

- Belinsky, S.A., Devereux, T.R. Maronpot, R.R. and Anderson, M.W. (1991): Role of Clara cells and type II cells in the development of pulmonary tumors in rats and mice following exposure to a tobacco-specific nitrosamine. *Exp. Lung Res.*, **17**, 263-278.
- Dufour, S. and Duband, J.L. (1988): The role of fibronectins in embryonic cell migration. *Trends Genet.*, **4**, 198-203.
- Hecht, S.S., Chen, C.H. Hirota, N., and Hoffman D. (1978): Tobacco-specific nitrosamine: formation from nicotine in vitro and during tobacco curing and carcinogenicity in strain-A mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **60**, 819-824.
- Hecht, S.S., and Hoffman, D. (1988): Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke. *Carcinogenesis*, **9**, 875-884..

- Herbert, C.D., Cao, Q.L. and Birnbaum, L.S. (1990): Role of transforming growth factor-beta in the proliferative effects of TCDD on human squamous carcinoma cells. *Cancer Res.*, **50**, 7190-7197.
- Hoffman, D. and Hecht, S.S. (1990): Advances in tobacco carcinogenesis. In; CS cooper. Handbook of experimental pharmacology, (Heidelberg Germany. Springer-Verlag), p. 63-102.
- Li, S.I., Kim, M.S., Cherrick, H.M. and Park, N.H. (1992): Sequential tumorigenic effect of HPV-16 and chemical carcinogens. *Carcinogenesis*, **13**, 1981-1987.
- Meanwell, C.A. (1988): The epidemiology of human papillomavirus infection in relation to cervical cancer. *Cancer Surv.*, **7**, 481-497.
- Pecoraro, G., Morgan, D. and Defendi, V. (1989): Differential effects of human papillomavirus types 6, 16, and 18 DNAs on immortalization and transformation of human cervical epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 563-567.
- Rhim, J.S., Jay, G., Arnstein, P., Price, F.M., Sanford, K.K., Aaronson, S.A. (1985): Neoplastic transformation of human epidermal keratinocytes by Ad 12-SV40 and Kirsten sarcoma viruses. *Science* **227**;1250-1252.
- Sheibani, N., Rhim, J.S. and Allen-Hoffman, B.L. (1991): Malignant human papillomavirus type 16-transformed human keratinocytes exhibit altered expression of extracellular matrix glycoprotein. *Cancer Res.*, **51**, 5967-5975.
- Shopland, D.R., Eye, H.J., Pechachek, T.F. (1991): Smoking-attributable cancer mortality in 1991; is lung cancer now the leading cause of death among smokers in the US? *J Natl Cancer Inst.*, **83**, 1142-1148.
- Yang, J.H., Thraves, P., Dritschilo, A., and Rhim, J.S. (1992): Neoplastic transformation of immortalized human keratinocytes by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Cancer Res.* **52**, 3478-3482.
- Yang, J.H., and Rhim, J.S. (1993): Characterization of TCDD-transformed human keratinocyte cell line. *Chemosphere* **27**, 407-411.
- Yang, J.H., and Rhim, J.S. (1995): 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin; molecular mechanism of carcinogenesis and its implication of human in vitro model. *Critical Reviews in Oncology and Hematology* **118**, 111-127.
- zu Hausen, H. (1989): Papillomaviruses as carcinoma viruses. *Adv. Viral Onc.*, **8**, 1-26.