

## 흡연특이성 발암물질이 특정 Protein Kinase C Isoform에 미치는 영향

강형석\* · 고무성\* · 박기성\* · 이 섭\* · 전상훈\* · 권오춘\*

### Effects of Tobacco-Specific Carcinogen on Protein Kinase C Isoforms

Hyung Seok Kang, M.D.\*, Moo Sung Ko, M.D.\*, Ki Sung Park, M.D.\*  
Sub Lee, M.D.\*, Sang Hoon Jheon, M.D.\*, Oh Choon Kwon, M.D.\*

**Background:** Cigarette smoking is the leading cause of the lung cancer. However, mechanism of action underlying the carcinogenesis in the lung still remains to be elucidated. The present study attempted to look into the carcinogenic potential of tobacco-specific nitrosamine, NNK (4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone) and the effects of protein kinase C (PKC) isoforms in an immortalized human epithelial cell model. **Material and Method:** Immortalized human epithelial cells were exposed with NNK and examined for its carcinogenic potential as measured by saturation density, soft-agar colony formation, and cell aggregation assay. The specific isoform of PKCs involved in the cellular transformation was analysed through western blot with monoclonal antibody and measured separately in cytosolic fraction and membrane fraction. **Result:** Human epithelial cells exposed with NNK showed prominent carcinogenic potential in saturation density, soft agar colony formation, and cell aggregation assay. PKC isoform analysis results are as follows: PKC- $\alpha$  showed significant translocation of protein levels from cytosolic fraction to membrane fraction, as analyzed by immunoblot. PKC- $\epsilon$  showed a dose-dependent increase of translocation. PKC- $\lambda$  was not affected by NNK treatment. **Conclusion:** The study demonstrated that there was a certain specificity in the patterns of isoform induction following chemical carcinogen exposure. Thus, it is suggested that identification of specific isoform be a clue to find target molecules in the carcinogenesis.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2003;36:666-673)

- Key words:** 1. Lung neoplasms  
2. Carcinogens  
3. Tobacco  
4. Protein kinase C  
5. Cell signaling proteins

### 서 론

NNK (4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone)는 tobacco alkaloid에서 추출된 흡연 중에 특이적으로 존재하는 강력한 발암 물질이며 흡연 중 가장 많은 형태의 Nitro-

samine이다[1]. NNK는 동물실험에서 강력한 발암물질로 알려져 있으며 역학조사결과 smokeless tobacco를 사용하는 사람에서 구강 및 후두암의 높은 발병률을 나타내는 원인으로 알려져 있다.

MNNG (N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)는 DNA ad-

\*대구가톨릭대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, School of Medicine, Catholic University of Daegu, Daegu, Korea

논문접수일 : 2003년 2월 25일, 심사통과일 : 2003년 7월 25일

책임저자 : 권오춘 (705-053) 대구광역시 남구 대명 4동 3056-6, 대구가톨릭대학교 의과대학 흉부외과학교실

(Tel) 053-650-4566, (Fax) 053-629-6963, E-mail: ockwon@cataegu.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

duct를 형성하여 암을 일으키는 완전한 발암물질(complete carcinogen)로서 동물 모델에서뿐만 아니라 세포모델에서도 강력한 발암성을 나타내어 화학적 발암화 연구에 널리 사용되고 있다[2]. 또한, 인체에서 암이 나타나는 세포형태는 대부분 상피세포로서 상피세포에 대한 발암화 연구는 중요한 의미를 갖는다. 지금까지 화학적 발암화의 기전은 여러 가지 측면이 제시된 바 있으나 발암물질 및 실험형태에 따라 매우 다양한 특성을 가지고 있다. 이러한 발암화기 전 중 최근 많은 관심이 집중되는 분야는 Protein Kinase C (PKC)로서 세포간의 신호전달기전뿐만 아니라 세포의 성장이나 소멸에도 중요한 역할을 한다[3].

PKC는 특정단백질의 serine기와 threonine기를 인산화시키는 역할을 하며 세포 성장 및 분화와 같은 세포의 필수적인 기능을 조절하고 세포간 신호전달체계에 중요한 역할을 한다[1]. 따라서 뇌와 같은 신경조직 내의 PKC의 역할은 매우 중요할 것으로 추정되어 왔다. 특히 뇌종양인 astrocytoma의 경우 PKC의 활성도가 1000배 이상 증가한다고 보고된 바 있다[4]. 또한 이러한 PKC의 높은 활성도는 암세포의 성장과 상관관계가 있는 것으로 알려져 있다.

지금까지 인체상피세포에 대한 NNK의 발암성은 검증된 바 있으나 발암화 과정과 관련된 생화학적 변화의 분석은 잘 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구는 화학적 발암물질인 NNK를 이용하여 인체상피세포 발암화를 유발시키고 이 과정의 초기에 관여하는 PKC isoform을 분석함으로써 화학적 발암화에 표적이 되는 분자물질을 확인하고 상피세포 기원의 발암화 기전 이해를 증진시키고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1) 사용 시약 및 재료

NNK, hydrocortisone, agarose 및 기타 시약들은 sigma사 제품을 사용하였으며 DMEM (Dulbeccos modification of Eagles edium) 등의 세포배양관련 시약은 Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA)사, western blot에 사용한 시약은 Bio Rad (Santacruz, CA, USA)사, PKC isozyme antibody는 Transduction Laboratory (Lexington, KY, USA)사에서 구입하였다.

### 2) 발암물질 처리

70% confluency를 보이는 인체상피세포에 NNK (0.05% DMSO; dimethyl sulfoxide 1, 10, 100, 1000 uM)를 함유하는 배양액을 5주간 처리한 후 100% confluency를 이룬 시

점에서 1 : 4의 비율로 subculture하였다. 그 후 Passage에 따라 세포 발암성을 분석하였다. PKC isoform의 분석은 NNK를 15분간 처리한 후 실시되었다.

### 3) 인체 상피 세포배양

세포 배양 조건은 37°C의 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하고 배양액을 DMEM에 Fetal Bovine Serum (FBS) 10%, hydrocortisone (5 ug/ml), antibiotics 등을 넣어 배양하였다. 세포가 confluency를 이루는 시점에서 1 : 3으로 subculture 하였다[2].

### 4) Soft agar colony formation.

Noble agar 1.2 g에 dH<sub>2</sub>O 35 ml을 넣고 30분간 autoclave한 다음 15 ml의 dH<sub>2</sub>O와 FBS 25 ml, 2X EMEM (Minimum Essential edium Eagles with Earles Salts) 50 ml을 넣어 0.9% agar base를 만든다. 5 ml의 agar base를 petri dish에 넣은 다음 밤새 37°C incubator에 둔다. 0.9 g Noble agar에 dH<sub>2</sub>O 50 ml을 넣어 30분간 autoclave한 다음 dH<sub>2</sub>O 7.2 ml, FBS 7.2 ml, 2X EMEM 14.4 ml를 넣어 0.36% top agar를 만든다. 준비된 base agar에 1 × 10<sup>4</sup> cells/dish를 포함하는 top agar용액을 2 ml씩 petri dish에 넣는다. 그후 colony 형성의 크기가 0.3 mm 이상인 colony수를 측정하였다[5]. 이것은 각 passage별로 나타나는 colony 수와 최초배양세포수의 백분율로 나타내었다.

### 5) Cell density 측정

세포의 contact inhibition의 변화를 측정하기 위해 5 × 10<sup>3</sup> cells/cm<sup>2</sup>를 용기에 넣고 배양한다. 배양액은 3일마다 새롭게 갈아주고 세포가 confluent한 상태에 도달하였을 때 단위 면적당 세포 수를 계산하였다[5].

### 6) Cell aggregation 측정

Soft agar assay와 같은 방법으로 Base agar를 만들어 5 ml씩 Petri dish에 넣는다. 밤새 37°C incubator에 둔 다음, 10% FBS를 포함한 배양액에 10<sup>5</sup> cells/dish로 세포를 접종한 후 4일이 지난 시점에서 배양액상에 성장하는 1 mm 이상 크기의 colony의 크기 및 숫자를 측정하여[5] <5 colonies는 -, ≥5 colonies는 +, ≥10 colonies는 ++로 판정하였다.

### 7) Morphological alteration

Foci의 생성량은 passage 수에 따라 +; moderate, ++;

**Table 1.** Properties of human epidermal keratinocyte after 5-week treatment of NNK and 7 subsequent subcultures

| Dose (uM)         | Saturation density ( $\times 10^5/cm$ ) | Soft-agar colony formation (%) | Cell aggregation** (> 1mm) |
|-------------------|---|--------------------------------|----------------------------|
| DMSO (0.05%) only | 3.1 $\pm$ 0.04                          | 0.13 $\pm$ 0.03                | -                          |
| 1                 | 3.5 $\pm$ 0.15                          | 0.15 $\pm$ 0.03                | -                          |
| 10                | 4.1 $\pm$ 0.18                          | 0.28 $\pm$ 0.02*               | +                          |
| 100               | 5.8 $\pm$ 0.13*                         | 0.21 $\pm$ 0.14                | +                          |
| 1000              | 4.8 $\pm$ 0.12                          | 0.23 $\pm$ 0.17                | -                          |

\*:  $p < 0.05$  as compared to control cells; \*\*: -, <5 colonies, +;  $\geq 5$  colonies; ++,  $\geq 10$  colonies; The data are mean SD with 3 different counts. NNK=4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone; DMSO=dimethyl sulfoxide.

severe순으로 나타내었으며 passage는 세포가 100% confluency를 나타내는 시점에서 1 : 4비율로 subculture하였다.

### 8) Western blot

PKC isoform의 세포 내 단백질 수준을 측정하기 위해 원심분리기로 membrane fraction과 cytosolic fraction으로 분리한 다음 PKC isoform 각각의 antibody를 사용하였다. Cell lysate (20  $\mu$ g)를 전기영동한 다음 Nitrocellulose paper를 semi-dry cell (Bio Rad)에 넣고 15 V로 30분 동안 blotting하였다. blot이 끝난 paper에 PKC isoform antibody를 적정비율로 희석한 용액으로 반응시킨 후 2nd antibody를 처리한 후 Pierce사의 Superfluoro system으로 측정하였다[6]. PKC의 활성은 cytosol에서 membrane으로 이동(translocation)한 protein의 양으로 나타내었다.

### 9) 성적 검증

유의성 검증은 Student's t-test로 실시하였으며 유의도는  $p < 0.05$ 로 하였다.

## 결 과

### 1) NNK에 의한 세포발암화 평가

NNK를 5주간 처리하고 7회 연속 subculture한 후 Saturation Density (SD)를 측정한 결과 11 uM 및 10 uM에서는 변화를 나타내지 않았으나 100 uM에서는 1.9배의 증가를 보여 통계적 유의성이 있는 증가를 보였다( $p < 0.05$ ). 1

**Table 2.** Morphological alteration of human epidermal keratinocyte treated with NNK (uM)

| Passage | Cumulative no. of days in culture after treatment | Dose (uM) |   |    |          |
|---------|---|-----------|---|----|----------|
|         |   | DMSO      | 1 | 10 | 100 1000 |
| 1       | 14  | .         | . | .  | .        |
| 4       | 25  | .         | . | .  | .        |
| 5       | 35  | .         | . | .  | .        |
| 6       | 45  | .         | . | +  | +        |
| 7       | 52  | .         | . | +  | +        |
| 8       | 59  | .         | + | +  | ++ +     |

+, moderate; ++, severe; NNK=4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone; DMSO=dimethyl sulfoxide.

mM에서는 통계적 유의성은 없었으나 1.5배의 증가를 보였다. Soft-agar colony formation (SA)의 경우에는 10 uM에서 2.2배의 증가를 보여 통계적으로 유의한 증가를 보였으며( $p < 0.05$ ) 100 uM과 1 mM에서는 통계적 유의성은 없으나 1.6배 및 1.8배의 증가를 각각 나타내었다. 군집 세포의 크기가 1 mm 이상인 colony를 측정할 결과 10 uM 및 100 uM에서 5개 이상의 colony가 보였으며 그 밖의 다른 농도에서는 뚜렷한 증가가 없었다(Table 1).

종양세포의 군락인 foci가 나타나는 시기는 10 uM 및 100 uM 투여군에서 45일이 지난 passage-6이었으며 그 밖의 다른 투여군은 59일이 지난 passage-8에서 경미한 foci의 증가를 나타내었다. 특히 100 uM 투여군은 passage가 증가함에 따라 뚜렷한 foci의 증가를 나타내었다(Table 2).

### 2) NNK투여 후 hydrocortisone처리에 따른 세포발암화 변화

NNK와 hydrocortisone (10 ug/ml)를 5주간 처리한 후 Saturation Density를 분석한 결과 10 uM, 100 uM 및 1 mM 투여군에서 1.7배, 2.0배 및 1.7배의 증가를 보였다( $p < 0.05$ ). Soft-agar colony formation의 경우 1 uM 투여군을 제외한 10 uM, 100 uM 및 1 mM에서 2.4배, 3.3배 및 2.6배의 증가를 각각 나타내었다( $p < 0.05$ ). Cell aggregation은 10 uM 및 1 mM에서 5개 이상의 colony를 보인 반면 100 uM에서는 10개 이상의 colony를 나타내었다. 그 밖의 투여군에서는 cell aggregation의 뚜렷한 변화가 없었다(Table 3).

Foci의 출현 시기는 100 uM 투여군에서 38일이 지난 passage-5부터 나타나기 시작했으며 10 uM 투여군에서는

**Table 3.** Properties of human keratinocyte treated with NNK and hydrocortisone (10 ug/ml)

| Dose (uM)         | Saturation density ( $\times 10^5/cm$ ) | Soft-agar colony formation (%) | Cell aggregation** (>1 mm) |
|-------------------|---|--------------------------------|----------------------------|
| DMSO (0.05%) only | 3.2 $\pm$ 0.05                          | 0.16 $\pm$ 0.02                | -                          |
| 1                 | 3.8 $\pm$ 0.04                          | 0.12 $\pm$ 0.06                | -                          |
| 10                | 5.4 $\pm$ 0.02*                         | 0.39 $\pm$ 0.12*               | +                          |
| 100               | 6.5 $\pm$ 0.10*                         | 0.52 $\pm$ 0.18*               | ++                         |
| 1000              | 5.5 $\pm$ 0.16*                         | 0.42 $\pm$ 0.03*               | +                          |

\*:  $p < 0.05$  as compared to control cells; \*\*: -, <5 colonies; +;  $\geq 5$  colonies; ++;  $\geq 10$  colonies; The data are mean SD with 3 different counts. NNK=4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone; DMSO=dimethyl sulfoxide.

**Table 4.** Morphological alteration of human keratinocyte treated with NNK (uM) and hydrocortisone (10 ug/ml)

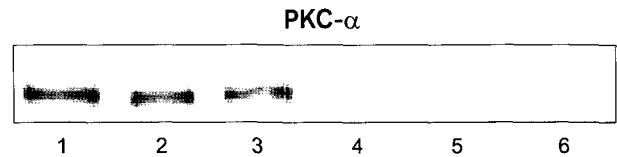
| Passage | Cumulative no. of days in culture after treatment | Dose (uM) |   |    |     |      |
|---------|---|-----------|---|----|-----|------|
|         |   | DMSO      | 1 | 10 | 100 | 1000 |
| 1       | 12  | .         | . | .  | .   | .    |
| 4       | 24  | .         | . | .  | .   | .    |
| 5       | 35  | .         | . | .  | +   | .    |
| 6       | 45  | .         | . | +  | +   | .    |
| 7       | 48  | .         | + | +  | +   | +    |
| 8       | 54  | +         | + | ++ | ++  | ++   |

\*: +; moderate; ++; severe; NNK=4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone; DMSO=dimethyl sulfoxide.

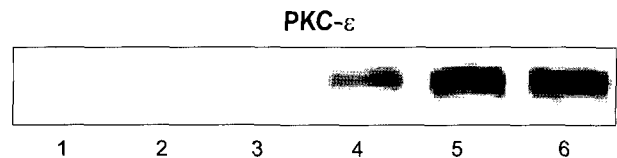
passage-6에서 foci가 나타났다. 1 uM 및 1 mM에서는 48일이 지난 passage-7부터 foci의 출현을 보였다. Control군은 54일이 지난 passage-8에서 경미하게 foci가 보였다. 100 uM 투여군에서는 passage 증가와 함께 foci의 수가 증가함이 관찰되었다(Table 4).

### 3) NNK에 의한 PKC- $\alpha$ 의 활성화

cPKC인  $\alpha$ ,  $\beta I$ ,  $\beta II$ ,  $\gamma$  isoform의 활성을 Western blot을 통하여 분석한 결과 PKC- $\alpha$ 를 제외한 다른 이성질체에서는 변화가 명확하지 않았다. PKC- $\alpha$ 는 NNK 10 uM 및 100 uM 투여 후 용량-비례적으로 cytosol에서 membrane으로



**Fig. 1.** Translocation of PKC- $\alpha$  from cytosole to membrane fraction in human epithelial keratinocytes following NNK exposure for 15min. Cytosole; 1) control, 2) 10 uM, 3) 100 uM. Membrane; 4) control, 5) 10 uM, 6) 100 uM cytosole. PKC=protein kinase C; NNK=4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone.



**Fig. 2.** Translocation of PKC- $\epsilon$  from cytosole to membrane fraction in human epithelial keratinocytes following NNK exposure for 15min. Cytosole; 1) control, 2) 10 uM, 3) 100 uM. Membrane; 4) control, 5) 10 uM, 6) 100 uM cytosole. PKC=protein kinase C; NNK=4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone.

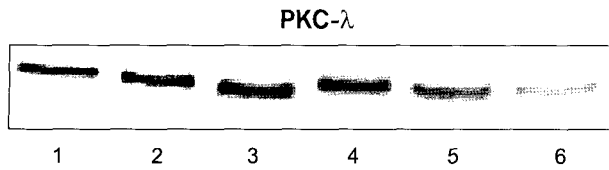
protein이 이동하였다. 세포의 특성상 cytosol의 농도가 membrane보다 더 높게 발현되었다(Fig. 1).

### 4) NNK에 의한 PKC- $\epsilon$ 의 활성화

nPKC를 대표하여 PKC- $\epsilon$ 의 활성을 분석한 결과 membrane protein량이 cytosol 보다 높은 것으로 나타났다. 10 uM 및 100 uM 투여군에서 용량에 따른 cytosol fraction의 감소 및 membrane fraction의 증가가 뚜렷하게 나타나 용량의존적 형태의 PKC활성을 나타내었다(Fig. 2).

### 5) NNK에 의한 PKC- $\lambda$ 의 활성화

aPKC는  $\lambda$ ,  $\mu$ ,  $\zeta$ , isoform이 속해 있으며 cPKC와 같은 방법으로 분석한 결과 인체상피세포의 정상적인 세포 내 PKC- $\lambda$ 의 경우 membrane/cytosol의 분포 비율이 거의 동등하거나 약간 membrane fraction에 치우쳐 있는 것으로 나타났다. PKC- $\lambda$ 는 10 uM 및 100 uM 투여군에서 cytosol과 membrane fraction의 protein이동을 보이지 않았다(Fig. 3).



**Fig. 3.** Translocation of PKC- $\lambda$  from cytosole to membrane fraction in human epithelial keratinocytes following NNK exposure for 15min. Cytosole; 1) control, 2) 10  $\mu$ M, 3) 100  $\mu$ M. Membrane; 4) control, 5) 10  $\mu$ M, 6) 100  $\mu$ M cytosole. PKC=protein kinase C; NNK=4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone.

## 고찰

폐암은 한국인에게 호발하는 암 중의 하나로 현재까지는 조기발견에 따른 수술 이외에는 효과적인 치료방법이 없어 사망률이 매우 높은 암이다. 특히 폐암은 흡연이라는 잘 알려진 원인이 있어 그에 따른 분자생물학적 변화에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 대부분의 암 발생의 근원이 되는 세포는 상피세포이다[7]. 따라서 본 연구는 인체상피세포를 이용한 화학적 발암물질의 발암화기전을 분석함으로써 폐암과 같은 상피세포 기원의 중앙 발생기전을 이해하는 데 기여하고자 하였다.

지금까지 많은 역학조사와 동물실험 등을 통하여 흡연과 발암과의 상관성이 보고되어 왔으며 흡연은 폐암을 비롯한 식도암, 구강암, 후두암, 췌장암, 방광암, 자궁경부암 등 인체의 여러 장기에서 암을 일으키는 위해 요인으로 알려져 왔다[8]. 이러한 흡연의 인체 위해성은 담배연기 속에 6,000여종의 유해화학물질이 존재하며 이들 중 40여종이 발암성을 가지고 있기 때문이다[9]. 하지만 대부분의 담배연기 중에 포함된 발암물질은 산업장이나 오염된 대기 중에도 존재하므로 여러 인체장기의 발암현상이 반드시 흡연에 의해서 일어나는지에 대해서는 논란의 여지가 많다. 따라서 흡연과 발암과의 특이적인 상관성을 명확히 밝히기 위해 흡연에만 존재하는 발암성 물질에 대해 발암의 기전을 이해하는 일은 흡연에 의한 인체 위해성을 정확히 평가하고 이에 따른 예방책을 세우는 데 매우 필요하다.

암을 유발하는 물질은 바이러스 등에 의한 생물학적 발암물질, 화학물질에 의한 화학적 발암물질 및 자외선 등에 의한 물리적 발암물질로 크게 분류할 수 있다. 이들 중 화학적 발암물질은 지금까지 알려진 발암원 가운데 가장 많은 비중을 차지하고 있다[5]. 따라서 화학적 발암화기

전에 대한 이해는 암의 조기 발견 등에 필요한 생물학적 표식자의 발견에 근본이 되는 과제이다.

최근에 보편적으로 수용되는 발암과정은 다단계설이 지배적이다[10]. 따라서 대부분의 세포배양실험의 경우 일차적인 세포는 발암물질에 의해 변형되지 않으나 무한한 생존기간을 얻은 불멸화세포에는 발암성을 나타낸다. 세포 불멸화에 따른 세포수명의 연장이 발암물질에 의한 염색체의 손상을 고정시킬 수 있는 충분한 시간을 제공한다. 즉 세포가 염색체의 이상 등으로 지속적인 생존능력을 얻은 상태에서 외부적인 발암물질의 침입은 세포 내의 DNA의 손상을 용이하게 고정시켜 세포의 발암화를 표현하게 된다[11].

따라서 본 연구에서는 발암현상을 관찰할 수 있도록 장기간의 배양이 가능하고 외부발암물질에 민감한 불멸화세포를 이용하고자 하였다. 본 연구에 사용된 세포모델은 인체의 일차적인 상피세포를 Ad12-SV40로 불멸화시킨 세포로서 적절한 배양 조건에서 지속적인 배양이 가능하며 정상적인 상피세포와 같은 형태를 가지고 있다[7].

환경요인에 의한 암의 발생빈도는 전체의 약 70~90%에 이르고 이 중 30% 정도는 담배나 담배 관련제품의 이용에 기인한다고 알려져 있다[12]. 담배에는 약 6,000여종의 화합물들이 함유되어 있으며 이중 약 50여종의 화합물들이 발암원으로 밝혀졌다[1]. 여기에는 cadmium, arsen, nikel 등의 중금속, benzo[a]pyrene (B[a]P), benz[a]anthracene 등의 polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)뿐 아니라 N-nitrosodimethylamine (NDMA) 혹은 N-nitrosodiethylamine (NDEA)와 같은 nitroso 화합물들이 포함되어 있다[13]. 이와 같은 화합물들 중에 담배에만 특이적으로 존재하는 nitroso 화합물을 tobacco-specific N-nitrosamine (TSNA)이라고 하고 여기에는 N'-nitrosornicotine (NNN), 4-(nitrosomethylamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), N'-nitrosoanabasine (NAB) 그리고 N'-nitrosoanantabine (NAT) 등이 있다. 이중 NNN과 NNK는 TSNA의 대표적인 물질로 rat에서 이들의 발암원성은 이미 보고된 바 있다[1]. 따라서 흡연에 의한 발암성의 지표로 흡연 중에 특이적으로 존재하는 강력한 발암물질인 NNK를 이용하여 흡연에 따른 폐암의 발생과 그 기전에 관한 연구를 시도하였다.

NNK 10  $\mu$ M 및 100  $\mu$ M 투여군에서 saturation density, soft agar colony formation, cell aggregation 및 foci의 출현 시기 등의 세포 발암성을 뚜렷이 나타내었으며 1000  $\mu$ M (1 mM)에서는 세포독성 등으로 발암성의 표출이 억제된 것으로 추정된다. 본 실험에서 NNK의 발암성은 일정한 농도

이상에서 발암성이 나타나 발암화에 용량-의존적인 역치가 존재함을 보였다.

인체상피세포에 대한 steroid 호르몬의 작용은 매우 다양하다. Steroid는 인체상피세포의 성장 및 세포의 접착력을 증가시키지만 고농도로 밀집된 상태에서는 세포의 분화에 관여하고 있다. 특히 hydrocortisone은 인체상피세포에서 세포의 상태에 따라 성장촉진 및 분화를 반복하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 hydrocortisone의 세포에 대한 선별적인 성장촉진 현상이 발암에 미치는 현상을 조사하고자 하였다. hydrocortisone의 농도를 증가시킨 결과 SD 및 SA에서 NNK 단독투여 시보다 더욱 강력한 발암특성을 나타냈으며 foci의 출현시간도 45일에서 35일로 단축되었다. 이러한 현상은 hydrocortisone이 세포가 confluent한 상태에서는 정상세포의 분화를 촉진시키고 subculture 후에는 세포의 성장을 촉진시켜 상대적으로 비정상세포의 성장을 선별적으로 촉진시킨 결과에 의한 것이라 추측된다[14]. 따라서 hydrocortisone과 같은 steroid hormone에 의한 발암 촉진 현상은 앞으로 더 많은 연구가 요구되는 분야이며 아울러 세포배양실험을 통한 발암물질의 검출 시험 시 적절한 농도의 hydrocortisone사용은 대상물질의 발암 감수성을 높여 실험체계의 효율성을 증가시킬 수 있을 것으로 생각한다.

PKC는 세포의 성장, 신호전달에 매우 중요한 역할을 하며 PKC 활동의 변화는 세포발암화와 밀접한 관계를 가지고 있으며, 발암세포인 glioma cell의 경우 정상적인 astrocyte에 비해 1,000배 가량 PKC의 활성도가 높은 것으로 보고된 바 있다[15]. 또한 이러한 높은 PKC 활성도는 암세포의 성장과 상관성을 가지고 있으며 Epidermal growth factor (EGF), Fibroblast growth factor (FGF), Platelet-derived growth factor (PDGF)와 같은 성장인자에 의한 자극은 PKC 활성을 더욱 촉진시켜 세포성장을 더욱 활성화시킨다[3]. 이와 같이 PKC는 autocrine/paracrine factor에 의한 암세포의 성장에도 중요한 역할을 한다.

PKC의 활성은 cytosol에 있는 불활성 형태의 PKC protein이 활성형으로 변화한 후 membrane으로 이동(translocation)하는 양을 측정함으로써 평가할 수 있다. PKC가 membrane에 도달 시 결합하는 물질은 DAG이므로 이와 유사한 구조의 phorbol ester를 투여하여 이와 결합하는 양을 측정함으로써 membrane에 도달하는 PKC의 양을 측정할 수 있다.

PKC 각각에 대한 특이적 기질이 알려져 있지 않은 현 시점에서 PKC isoform의 활성화를 immunoblotting으로 확인하

는 방법은 가장 명확한 수단으로 생각된다[16]. 따라서, 본 연구에서는 PKC의 cytosol fraction protein 양과 membrane fraction protein 양의 변화를 각각 monoclonal antibody로 immunoblotting하여 PKC isoform의 활성화를 효과적으로 판단할 수 있었다. PKC의 활성은 transient한 경우가 대부분이어서 발암화의 초기 단계에 PKC의 영향은 PKC와 발암화의 관련성을 추정하는 데 중요한 자료라고 생각한다. 따라서, 본 연구에서는 NNK를 15분간 노출시킨 후 PKC의 변화를 관찰하였다. PKC- $\alpha$ 에서는 basal level에서 cytosol fraction이 약간 높았다. 10  $\mu$ M 및 100  $\mu$ M 처리 군에서는 PKC- $\alpha$ 의 membrane fraction의 뚜렷한 증가를 보여 화학적 발암물질의 초기단계부터 PKC의 활성이 시작됨을 나타내었고 이러한 활성은 용량-의존적인 형태를 유지하였다. 이와 같은 PKC의 활성은 세포성장조절의 긴밀한 항상성에 변화를 가져와 발암화와 같은 neoplastic transformation의 근원이 될 수 있음을 암시한다.

New PKC는 칼슘에 의존적이 아니면서 DAG에 의존적인 isoform들이다. 이 군에 속하는 PKC- $\epsilon$ 은 basal level에서 membrane fraction의 양이 훨씬 많음을 보였으며 NNK 처리 시 용량-의존적으로 cytosol fraction의 감소 및 membrane fraction의 증가를 뚜렷하게 보여 PKC가 cytosol에서 membrane으로 이동하여 활성을 나타냄을 알 수 있다. PKC- $\epsilon$ 은 NIH3T3와 같은 rodent fibroblast에서는 oncogene으로 작용하여 c-raf-1을 증가시키고 나아가 MAP (mitogen-activated protein) Kinase를 활성화시키는 isoform으로 알려져 있다[17]. 따라서 PKC- $\epsilon$ 의 활성증가는 인체 상피세포의 화학적 발암화의 초기단계의 세포조절작용을 이해하는 데 중요한 역할을 할 것으로 생각한다. 최근 보고에 의하면 PDGF receptor를 통한 PKC- $\epsilon$ 의 활성은 PLC (phospholipase C)- $\gamma$ 의 작용 통로와 관련성이 있어서 PLC의 대사물인 PIP<sub>3</sub> (phosphatidylinositol 3)가 PKC- $\epsilon$ 의 활성에 관여할 것으로 추정된다[18]. PKC- $\epsilon$ 의 과다활성은 PKC→c-Raf-1→MEK1→MAP Kinase (Erk 1 and 2)로 가는 경로의 활성을 의미하므로 지속적으로 이러한 overexpression 유지 시 세포의 증식과 발암화 변화를 촉진시키는 원인으로 생각된다.

많은 종류의 polychlorinated aromatic hydrocarbons (PAHs)들은 자체적으로는 발암성을 나타내지 않으나 그 대사물질이 발암성을 나타내는 경우가 흔하다. Benzo-(a)pyrene을 비롯한 여러 가지의 방향족 물질은 산화된 대사물이 발암성을 나타내어 체내의 대사기능이 암을 일으키는 데 직접적으로 관여함을 명백히 보여주는 좋은 예이다[16].

NNK에 의한 PKC- $\lambda$ 의 변화는 감지되지 않았는데 이는 화학적 발암물질에 대한 PKC isoform의 특이성이 존재한다는 증거로서 발암화 연구에 PKC isoform 각각의 특이성 연구가 수행되어야 함을 암시하고 있다. 특히, 본 연구모델에서 PKC- $\lambda$ 가 감지된 점은 앞으로 PKC- $\lambda$ 의 연구에 본 세포 모델의 활용성을 제시하고 있다.

## 결 론

본 연구는 화학적 발암물질인 NNK가 인체발암화에 관여함을 재차 확인하면서 초기 과정에 관여하는 PKC isoform의 변화를 분석함으로써 total PKC활성이 아닌 isoform 각각에 대한 변화를 확인하였다는 점에서 앞으로 인체상피세포 기원의 폐암 생성 기전 연구에 기여할 것으로 생각한다. PKC isoform은 세포 내 분포뿐만 아니라 각각의 기능에도 많은 차이를 보여 정확한 발암기전의 이해뿐만 아니라 특이성 PKC inhibitor 등을 이용한 항암제의 개발에도 기초정보를 제공할 수 있을 것으로 생각한다.

본 연구 결과는 화학적 발암화에 관한 새로운 생화학적 정보를 제공할 수 있고 폐암과 같은 상피세포 기원의 암을 조기발견할 수 있는 생물학적 표식자를 개발하는 데도 활용될 수 있을 것이다.

## 참 고 문 헌

- Hoffmann D, Rivenson A, Amin S, Hecht S. Dose response study of the carcinogenicity of tobacco N-nitrosamines in F344 rats. J Cancer Res Clin Oncol 1984;108: 81-6.
- Rhim JS, Fujita J, Arnstein P, Aaronson SA. Neoplastic conversion of human epidermal keratinocytes by Ad12-SV40 virus and chemical carcinogens. Science 1986;232:385-8.
- Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular response. FASEB J 1995;9:484-96.
- Riedel G. Protein kinase C: a memory kinase? Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiat 1997;21:373-8.
- Rhim JS. Neoplastic transformation of human epithelial cells in vitro. Anticancer Res 1989;9:1345-66.
- Yang JH, Kodavanti PRS. Possible molecular targets of halogenated aromatic hydrocarbons in neuronal cells. BBRC 2001;277:265-72.
- Rhim JS, Jay G, Arnatein P, Price FM, Sanford KK, Aaronson SA. Neoplastic transformation of human epidermal keratinocytes by Ad12-SV40 and kirsten sarcoma virus. Science 1985;227:1250-2.
- Belinsky SA, Devereux TR, Anderson MW. Role of clara cells and type II cells in the development of pulmonary tumor in rats and mice following exposure to tobacco-specific nitrosamines. Exp Lung Res 1991;17:263-78.
- Hoffmann D, Brunnenmann KD, Prokopczyk B, Djordjevic M. Tobacco-specific N-nitrosamines and areca-derived N-nitrosamines: Chemistry, biochemistry, carcinogenicity, and relevance to humans. J Toxicol Environ Health 1994;41: 1-52.
- Doll R. Strategy for detection of cancer hazards to man. Nature 1997;265:589-97.
- Farber E. The multiple nature of cancer. Cancer Res 1984; 44:4217-23.
- Chang SE. In vitro transformation of human epithelial cells. Biochem Biophys Acta 1986;832:161-94.
- Perletti GP, Folini M, Lin HC, Mischak H, Piccinini F, Tashjian A. Overexpression of protein kinase C epsilon is oncogenic in rat colonic epithelial cells. Oncogene 1996;12: 847-54.
- McClean JS, Franc MC, Mackie AC. Phenotypic modification of human glioma and non-small cell lung carcinoma by glucocorticoids and other agents. Anticancer Res 1986; 6:1101-6.
- Hama T, Huang KP, Guroff G. Protein kinase C as a component of a nerve growth factor-sensitive phosphorylation system in PC 12 cells. Proc Natl Acad Sci USA 1986;83:2353-7.
- Sharif TR, Sharif M. Overexpression of protein kinase epsilon in astroglial brain tumor derived cell lines and primary tumor samples. Int J Oncol 1999;15(2):237-43.
- Cacace AM, Guadagno SN, Krauss RS, Fabbro D, Weinstein IB. The epsilon isoform of protein kinase C is an oncogene when overexpressed in rat fibroblasts. Oncogene 1993;8:2095-104.
- Moriya S, Kazlauskas A, Akimoto K, et al. Platelet derived growth factor activates protein kinase C epsilon through redundant signaling pathways involving phospholipase C gamma or phosphatidylinositol 3-kinase. Natl Acad Sci USA 1996;93:151-5.

=국문 초록=

배경: 폐암의 주된 원인으로 알려진 흡연은 그 악성세포 발현기전이 아직 정확히 규명된 바 없다. 이에 저자들은 흡연에 의한 발암성의 지표로 흡연 중에 특이적으로 존재하는 강력한 발암물질인 NNK (4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone)를 이용하여 흡연에 따른 폐암의 발생과 그 protein kinase C (PKC) isoform과 관련된 기전에 관한 연구를 시도하였다. 대상 및 방법: 인체 상피세포를 NNK에 노출시킨 후 saturation density, soft agar colony formation, cell aggregation 및 foci의 출현 등의 양상을 파악하여 세포 발암성 여부를 관찰하였으며 NNK를 15분간 노출시킨 후 PKC의 변화는 세포 내 PKC isoform의 양을 cytosolic fraction과 membrane fraction으로 분리하여 측정하여 분석하였다. 결과: NNK 투여군에서 saturation density, soft agar colony formation, cell aggregation 및 foci의 출현 시기 등의 세포 발암성을 뚜렷이 나타내었으며 PKC isoform 분석의 경우 PKC- $\alpha$ 의 membrane fraction의 뚜렷한 증가를 보였으며 이러한 활성은 용량-의존적인 형태를 유지하였다. PKC- $\epsilon$ 은 NNK 처리 시 용량-의존적으로 cytosol fraction의 감소 및 membrane fraction의 증가를 뚜렷하게 보였고 NNK에 의한 PKC- $\lambda$ 의 변화는 감지되지 않았다. 결론: 본 연구는 화학적 발암물질인 NNK가 인체발암화에 관여함을 재차 확인하면서 초기 과정에 관여하는 PKC isoform의 변화를 분석함으로써 total PKC활성이 아닌 isoform각각에 대한 변화를 확인하였다는 점에서 앞으로 인체상피세포 기원의 폐암 생성 기전 연구에 기여할 것으로 생각한다.

- 중심 단어 : 1. 폐암  
2. 발암물질  
3. 담배  
4. 단백 키나제 C  
5. 형질발현 단백질