

# Nicotine 및 Tobacco-Specific Nitrosamine의 발암과정에 미치는 영향

강호일\* · 박미선 · 김옥희  
국립독성연구원

## Effects of Nicotine and Tobacco-Specific Nitrosamine on Carcinogenesis

Hoil Kang\*, Mi Sun Park, and Ok Hee Kim

National Institute of Toxicological Research, 5 Nokbun-dong, Eunpyung-ku, Seoul 122-704, Korea

(Received September 1, 2005 / Accepted September 17, 2005)

**ABSTRACT :** Nicotine has been implicated as a potential factor in the pathogenesis of human lung cancer, however its mechanism of action in the development of lung cancer remains largely unknown. To explore the role of nicotine in the development of lung cancer, we first investigated the effects of nicotine on the expression of tumor associated genes by treating Sprague-Dawley rats with nicotine (10 mg/kg) by gavage once daily for 10 days. We determined the expression of proteins and mRNAs of the ras, raf, myc, jun, fos oncogenes and p53, Rb tumor suppressor genes by Western and Northern blotting, respectively. We did not detect any changes on the levels of proteins and mRNAs of these tumor associated genes in the lung of Sprague-Dawley rats from 3 days to 12 weeks after the last treatment of nicotine, indicating that nicotine appears to have no effect on expression of these oncogenes and tumor suppressor genes at an early stage in multistage chemical carcinogenesis. In a second experiment, we investigated the possibility that 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) could be formed endogenously by treating with nicotine and sodium nitrite. We treated groups of Fischer 344 rats with nicotine (60 μmol/kg) and sodium nitrite (180 μmol/kg), nicotine, sodium nitrite and NNK (120 nmol/kg) alone by gavage once daily for 7 days, respectively and determined the 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), as an indicator of NNK formation, in the lungs of rats 24 hours and 48 hours after the last treatment by HPLC/ECD method. We detect increased level of 8-OHdG in the lungs of rats treated with NNK, but in the case of nicotine plus sodium nitrite, nicotine and sodium nitrite alone we could not detected any changes of 8-OHdG, respectively.

**Key words :** Nicotine, oncogene, tumor suppressor gene, 8-hydroxydeoxyguanosine, NNK

### 서론

최근의 분자역학 연구에 의하면 사람의 암의 대부분은 발암성 화학물질에 의하여 여러 단계의 복잡한 과정을 거쳐 발생되고 있으며 발암과정의 초기단계에 있어서 가장 중요한 것은 세포내 복수의 암유전자 및 암억제유전자 등이 주로 환경 중에 존재하는 발암성 화학물질에 의해 순차적으로 돌연변이 되어 최종적으로는 악성종양으로서 형질을 획득하는 것으로 생각되어지고 있다 (Day *et al.*, 1980).

실제로 우리 환경 중에는 다양한 종류의 발암물질이 존재하지만 그중에서도 담배에는 benzopyrene을 비롯하여 수천

종의 화학물질들이 함유되어 있고 (Adams *et al.*, 1987), 그중에서도 nicotine 유래의 tobacco-specific nitrosamine (TSNA)은 담배 중에 다량으로 존재할 뿐만 아니라 다양한 동물실험계에 조직특이적인 발암성을 나타내고 있는 사실 (Hecht *et al.*, 1987; Hoffman *et al.*, 1981; Rivenson *et al.*, 1988) 등으로 보아 흡연으로 인한 인간의 발암과정에도 대단히 중요한 관련을 가지고 있을 것으로 추정되어지고 있다.

현재까지 담배 중에서 발견된 TSNA는 약 7종류 보고되어 있으며, 이들 중에는 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL), N-nitrosanornicotine (NNN)등이 실험동물에 대한 발암성이 비교적 높은 것으로 알려져 있다 (Hecht *et al.*, 1988; Hoffman *et al.*, 1994). 그리고 사람

\*To whom correspondence should be addressed

에게는 흡연을 통해 담배중의 TSNA가 체내에 실제로 흡수 되는 것으로 보고되어져 있다 (Carmella *et al.*, 1993).

Nicotine은 *in vitro* 산성조건하에서 니트로화 반응을 통해 TSNA로 쉽게 NNK, NNN 및 4-(methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)butanol (NNA)로 변환되는 것이 알려져 있으며 (Hecht *et al.*, 1978), 이들 TSNA로의 변환되는 수율 및 니트로화 반응속도는 2급아민인 normicotine 혹은 anabasin보다 현저히 낮은 것으로 보고되어 있다 (Caldwell *et al.*, 1991; Mirvish *et al.*, 1977). 또한 담배중의 다른 alkaloid인 cotinine의 경우에도 니트로화 반응을 통해 4-(methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)butyric acid (iso-NNAC)로 쉽게 변환되는 것이 알려져 있다 (Djordjevic *et al.*, 1991). 또한 실제 동물을 사용한 *in vivo* 실험에서도 보통의 2급 아민과 nitrite를 동물에 투여할 경우 발암물질인 니트로스아민이 동물체내에서 생성되는 사실 (Mirvish *et al.*, 1975) 등으로 미루어 볼 때 사람 체내에서도 담배 중에 과량으로 존재하는 nicotine과 주로 야채 중에 많이 있는 질산염 섭취를 통해 생기는 nitrite가 위산 중에서 서로 반응하여 TSNA가 생성될 가능성은 그동안 충분히 제기되어 왔다 (Tricker *et al.*, 1988). 1997년 nicotine이 발암성과 직접적인 관련이 있다는 증거가 처음으로 미국 Minnesota Cancer Center의 S.S. Hecht 그룹에 의해 보고되었다 (Carmella *et al.*, 1997). Hecht 그룹은 nicotine과 sodium nitrite를 Fischer 344 랫드에 병용 투여하여 발암물질인 NNN이 랫드 체내에 실제로 생성되는 것을 확인하였으며 NNN과 구조적으로 유사하지만 NNN에 비해 훨씬 강력한 발암물질인 NNK도 동물체내에서 생성될 가능성을 시사하였다.

Nicotine은 그동안 인체에 주로 중독작용을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며 nicotine 투여로 인한 유전자 발현변화를 연구한 것은 지금까지 동물 신경세포의 일부 암유전자에 한하여 극히 제한적으로 보고되어져 있을 뿐 (Pelto-Hukko *et al.*, 1995; Ren *et al.*, 1992), 흡연으로 인한 폐암발생과정에 nicotine이 어떤 역할을 하는 지에 대해서는 체계적으로 조사되어 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 nicotine을 Sprague-Dawley 랫드에 투여한 후 폐 조직중의 대표적 암유전자인 ras, raf, myc, jun, fos 유전자와 암억제유전자인 p53, Rb 유전자의 발현변화를 조사함으로써 nicotine이 발암과정에 미치는 영향을 유전자 레벨에서 검토하고, nicotine을 sodium nitrite와 함께 Fischer 344 랫드에 투여했을 때 실제로 체내에서 TSNA인 NNK를 경유하여 DNA 부가체인 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)가 형성되는지 여부를 함께 검토하여 nicotine이 폐암발생과정에 미치는 영향에 대해 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 시료 및 시약

라세미체 (+/-) nicotine 및 nuclease P1, 8-OHdG는 Sigma Chemical 회사 (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며 NNK는 Chemsyn Science Laboratories 회사 (Lenexa, KS, USA), DNA purification kit는 Promega 회사 (Madison, WI, USA), RNazol B solution은 Biotecx Lab. 회사 (Houston, TX, USA)로부터 각각 구입하였다. Western blot 용 1차 항체로서 p53 monoclonal antibody, Rb polyclonal antibody, H-ras monoclonal antibody, raf polyclonal antibody, myc monoclonal antibody, jun polyclonal antibody, fos monoclonal antibody는 Santa-Cruz Biotechnology 회사 (Santa-Cruz, CA, USA)로부터 각각 구입하였다. Western blot 용 2차 항체인 horseradish peroxidase conjugated anti-mouse Ig와 Hybond N+ Nylon membrane, ECL Plus system, random primer labelling kit는 Amersham 회사 (Arlington Heights, IL, USA)로부터 구입하였으며 Northern blot용 c-myc, c-fos 및 Rb의 cDNA는 Oncogene Science 회사 (Cambridge, MA, England)로부터 각각 구입하였다. 그 외의 시약은 특급 시약을 사용하였다.

### 실험동물 및 사육조건

본 실험에 사용된 실험동물은 국립독성연구원 실험동물자원실에서 생산된 8~10주령의 암컷 Sprague-Dawley 랫드 및 Fischer 344 랫드를 사용하였다. 실험기간동안 폴리카보네이트 케이지에 각각 4~5마리씩 수용하였으며 소독된 동물용 사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험동물은 온도 23 +/- 2°C, 습도 55 +/- 10%, 12시간 명암주기 하에서 사육하였다.

### 시험물질의 조제 및 투여

Nicotine 및 NNK는 0.17 M 시트르산에 녹여 사용하였고 sodium nitrite는 증류수에 녹여 사용하였다. 첫번째 실험군으로서 nicotine 투여에 의한 암유전자 및 암억제유전자의 발현변화를 관찰하기 위해서 8주령의 암컷 Sprague-Dawley 랫드를 (1) 대조군 (시트르산만 단독투여) (2) 실험군 (니코틴만 단독투여)으로 나누어 수행하였다. 각 대조군과 실험군의 동물 수는 5마리로 하였으며 투여액은 10 ml/kg로 하였고 투여용량은 하루에 10 mg/kg로 그리고 투여일수는 10일간으로 하였다. 투여방법은 하루에 한 번 위내에 gavage 투여를 하였으며 nicotine 투여 후 바로 sodium nitrite를 투여하였다. 시험물질 투여 후 3일과 1주부터 11주까지 매주 부검하여 폐조직중의 단백질 및 mRNA를 추출하였다.

두번째 실험군으로서 nicotine과 sodium nitrite를 병용 투여한 후 NNK 생성여부를 확인하기 위해서 10주령의 Fischer 344 랫드를 (1) 대조군 (시트르산만 단독투여) (2) nicotine과 sodium nitrite를 병용투여한 군 (3) nicotine 단독투여군 (4) sodium nitrite 단독투여군 (5) NNK 단독투여군 (120 nmol/kg)으로 각각 나누어 수행하였다. 각 대조군과 실험군의 동물 수는 5마리로 하였으며 투여액은 10 ml/kg로 하였고 nicotine을 60 µmol/kg, sodium nitrite를 180 µmol/kg, NNK를 120 nmol/kg 용량으로 각각 7일간 투여하였다. 투여 방법은 하루에 한 번 위내에 gavage 투여를 하였으며 투여 후 1일과 3일 후에 부검하여 폐조직중의 DNA를 추출하였다.

#### 단백질 분리와 Western blot 분석

Sprague-Dawley 랫드 폐 조직 약 0.1 g을 homogenization buffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.5, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 100 mM PMSF, 20 U/ml aprotinin)를 첨가하여 균질액으로 한 후 10,000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 상등액을 취하였다. 단백질은 bovine serum albumin을 표준물질로 Bio-Rad protein assay kit를 사용하여 Bradford 법 (Bradford *et al.*, 1976)에 따라 정량하였다. 80 µg의 단백질을 분주한 후 2X SDS sample buffer를 넣고 100°C에서 5분간 가열한 후 시료로 사용하였다. 각 단백질은 7.5% 혹은 10% SDS polyacrylamide gel에서 100V로 전기영동한 후 nitrocellulose membrane으로 transfer 시킨 후 5% nonfat dry milk를 함유한 blocking solution에서 1시간동안 실온에서 반응시켰다. 1차 항체로는 2가지의 tumor suppressor 단백질 (p53, Rb) 및 5가지의 암유전자 단백질 (*jun*, *fos*, *myc*, *ras*, *raf*)에 대한 monoclonal antibody를 1 µg/ml로 희석하여 사용하였다. 1시간동안 실온에서 반응시킨 후 0.1% Tween 20을 첨가한 10 mM Tris-HCl/0.9% NaCl (TTBS)로 15분씩 3번 washing하였다. 그 다음 1:5,000으로 희석된 2차 항체 (horseradish peroxidase conjugated anti-mouse IgG)로 실온에서 1시간동안 반응한 후 TTBS로 3번 washing 하였다. 그리고 최종적으로 enhanced chemiluminescent system (ECL Plus system)을 이용하여 단백질의 발현정도를 정량하였다.

#### RNA 분리와 Northern blot 분석

Sprague-Dawley 랫드 0.1 g의 폐조직으로부터 RNAzol B solution을 이용하여 total RNA를 분리하였다. 20 µg의 RNA를 1% agarose/2.2 M formaldehyde/2 M MOPS gel에서 40V로 4시간 전기영동한 후 Hybond N +/- Nylon membrane으로 transfer 시켰다. UV crosslink 한 후 rapid

hybridization buffer로 30분간 45°C에서 pre-hybridization하였다. Probe로 사용할 *c-fos* 및 *c-myc* oligonucleotide는 [<sup>32</sup>P]-dCTP (250 µCi)로 random primer label kit으로 labeling시킨 후 QIAquick nucleotide removal kit (Germany)를 이용하여 unincorporated nucleotide를 제거하였다. 준비된 probe를 넣고 45°C에서 2시간동안 hybridization시켰다. 2X SSC/0.1% SDS solution으로 20분간 washing한 후 다시 0.7X SSC/0.1% SDS solution으로 15분간 washing하였다. X-ray film으로 exposure시킨 후 유전자 발현변화를 관찰하였다.

#### DNA 분리와 8-OHdG 분석

Fischer 344 랫드 폐조직중의 DNA를 추출하는 실험은 일반의 Phenol 추출과정 중에 생길 수 있는 DNA의 산화를 피하기 위하여 Wizard Genomic DNA Purification System로 분리하였다. 최종적으로 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.0)에 녹인 후 DNA (150 µg)에 nuclease P1 (7.5 U)을 가해 65°C, pH 5.0에서 30분간 반응시켜 모노뉴클레오티드로 가수분해하였다. 그 다음 Tris-HCl 용액으로 반응액의 pH를 8.0으로 조정하고 37°C에서 1시간동안 alkaline phosphatase (4.5 U)로 처리하여 phosphate 그룹을 제거한 후 HPLC/ECD 법으로 4종류의 뉴클레오시드 및 8-OHdG를 분석하였다. 본 실험에서 사용한 HPLC는 프랑스의 Gilson 회사의 제품 (model 805 solvent delivery pump, model 832 auto-sample injector 및 model VE 5/133 absorbance detector)을 사용하였고 ECD (electrochemical detector)는 미국의 ESA (model 5020)를 사용하였으며, 역상 column은 일본 YMC 회사의 C18 ODC H-80 (4.6×46 mm)을 사용하였다. 그리고 4종류의 뉴클레오시드 및 8-OHdG는 UV 254 nm 및 ECD 320 mV에서 각각 측정하였고 flow rate는 0.5 ml/min, mobile phase는 10 mM sodium acetate, 10% methanol로 하였다.

## 결 과

#### Nicotine 투여가 암유전자 및 암억제유전자 단백질 발현에 미치는 영향

Nicotine투여에 의한 암유전자 및 암억제유전자의 단백질 발현변화를 관찰하기 위해서 8주령의 암컷 Sprague-Dawley 랫드를 대조군과 실험군으로 나누어 nicotine을 10일 동안 연속적으로 투여한 후 3일과 1주부터 12주까지 매주 부검하여 폐조직중의 단백질을 추출하였다. Western blot 법으로 대표적 암유전자인 H-ras, raf, c-myc, c-jun, c-fos 단백질의 발현변화를 검색한 결과, 이들 5종의 단백질의 변화는

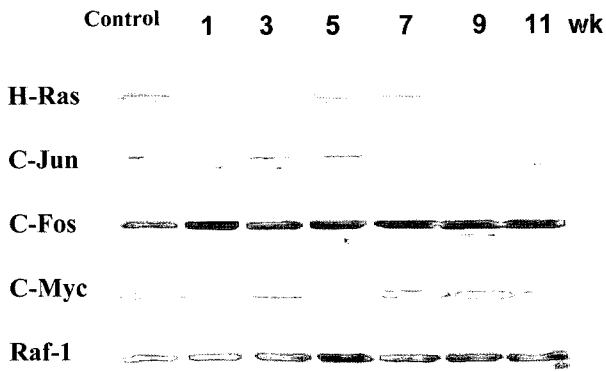


Fig. 1. Western blot analysis of the expression of oncoproteins, c-H-ras, c-raf, c-myc, fos, jun, respectively. Total proteins were extracted and analyzed, as described in Materials and methods.

투여 12주까지 별다른 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다 (Fig. 1). 또한 암억제유전자인 p53, Rb의 단백질도 마찬가지로 투여 12주까지 별다른 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다 (data not shown).

**Nicotine 투여가 암유전자 및 암억제유전자 mRNA 발현에 미치는 영향**

Nicotine 투여에 의한 암유전자 및 암억제유전자의 mRNA 발현변화를 관찰하기 위해서 8주령의 암컷 Sprague-Dawley 랫드를 대조군과 실험군으로 나누어 nicotine을 10 일 동안 반복 투여한 후 3일과 1주부터 12주까지 매주 부검하여 폐조직중의 total RNA를 추출하였다. Northern blot 방법으로 암유전자인 c-myc, c-jun 단백질과 암억제유전자인 p53 단백질을 분석한 결과 이들 3종의 암관련유전자 mRNA의 변화는 투여 12주까지 별다른 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다 (Fig. 2).

**Nicotine 및 sodium nitrite 병용투여가 발암물질 NNK 생성에 미치는 영향**

Nicotine 및 sodium nitrite 병용투여가 발암물질 NNK 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위해서 10주령의 암컷 F344 랫드를 대조군과 실험군으로 나누어 7일 동안 NNK 및 nicotine과 sodium nitrite를 단독 혹은 병용 투여하였다. 최종 nicotine 투여 24시간 및 48시간 후 부검하여 폐조직중의 DNA를 추출하였다. HPLC/ECD 방법으로 DNA 중의 8-OHdG를 분석한 결과 NNK 단독 투여군에서는 8-OHdG 레벨이 1.8배에서 2.3배 정도로 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였고 nicotine 투여 후 24시간에 비해 48시간의 경우 8-OHdG 레벨이 약간 감소하였다. 그러나 nicotine과 sodium nitrite를 단독 혹은 병용 투여한 그룹에서는 8-OHdG 레벨

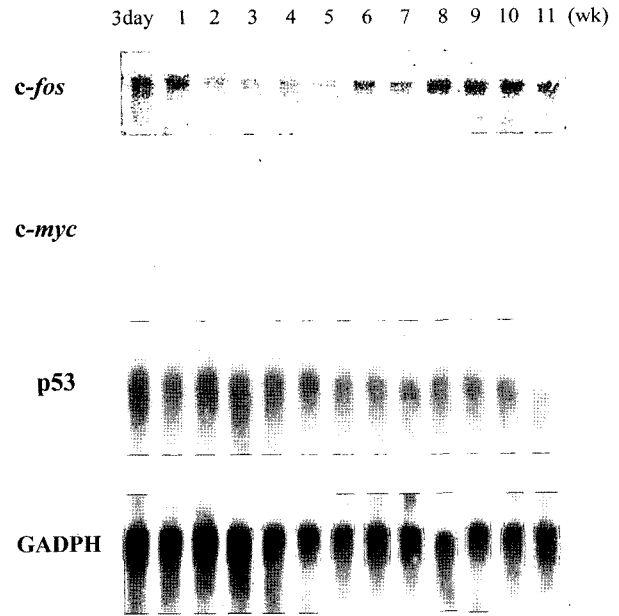


Fig. 2. Northern blot analysis of expression of mRNA for c-myc, jun oncogenes and Rb tumor suppressor gene, respectively. Total RNA were isolated and analyzed, as described in Materials and methods.

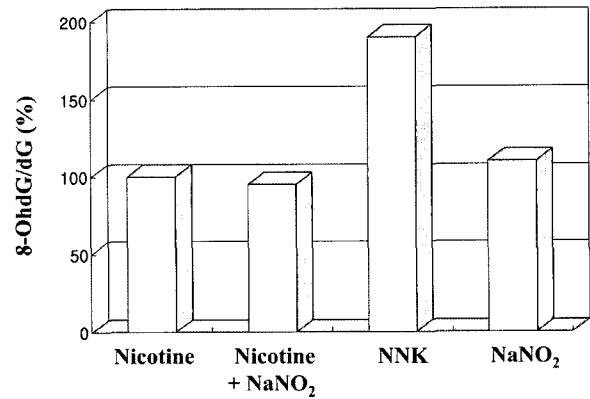


Fig. 3. Formation of 8-OHdG in the lung of Fischer 344 rats treated with nicotine, sodium nitrite and NNK, respectively. 8-OHdG were extracted and analyzed, as described in materials and methods.

의 변화가 없는 것으로 관찰되었다 (Fig. 3).

**고 찰**

최근의 역학조사에 의하면 흡연자의 암발생 위험도는 비흡연자에 비해 폐암의 경우 15배 이상, 위암이 4배 이상, 구강암이 6~15배, 췌장방광대장암이 3~7배, 후두암이 32배, 식도암이 2배 이상 높으며 심지어 혈액암인 백혈병도 비흡

연자에 비하여 매우 높은 발병율을 나타내는 것으로 보고되어져 있다. 흡연이 암을 일으키는 가장 큰 원인은 담배 중에 들어 있는 여러 종류의 발암성 화학물질이 주 원인인 것으로 추정되어지고 있으며 그동안의 연구결과로 보아 담배 중에는 약 4000 여종의 화학물질이 있는 것으로 추산되고 있다. 담배에만 들어 있는 TSNA는 동물을 이용한 발암실험에서 투여방법 및 경로 따라 식도 및 폐, 비강, 간, 식도 조직 등에 흡연과 관련된 각종 암을 일으키는 것으로 보고되어져 있다 (Hecht *et al.*, 1987; Hoffman *et al.*, 1981; Rivenson *et al.*, 1988). 이들 발암성 화학물질인 TSNA의 전구체로는 nicotine으로 알려져 있으며 담배 중에는 nicotine이 TSNA보다 수천에서 수만배 많이 존재하는 것으로 보고되어져 있다 (Anderson *et al.*, 1987). 최근 보건복지부의 통계자료를 보면 우리나라의 경우 흡연자의 수는 약 1100만명으로 추산되어지고 있는 점을 고려하여 볼 때 니코틴이 폐암발생과정에 어떠한 역할을 하는지에 대해 분자수준에서 기전을 연구하는 것은 독성병리학적으로 매우 중요한 연구과제라고 사료된다.

Nicotine은 흡연을 통해 체내에 흡수되어 폐조직을 비롯한 골격근, 뇌, 척수, 부신피질 등에 분포하고 있는 nicotine 수용체인 nicotine acetylcholine receptor (nAChRs)를 통하여 주로 중추신경계에 작용하는 것으로 보고되어져 있다 (Chini *et al.*, 1992). 그동안의 문헌보고에 의하면 신경세포에 nicotine을 처리한 후 암유전자의 발현변화를 연구한 것이 다수 보고되어 있고 (Pelto-Hukko *et al.*, 1995; Ren *et al.*, 1992), TSNA인 NNK를 마우스에 투여할 경우 초기에 정상 폐조직중에서 암유전자인 ras 및 myc 등이 과량으로 발현되는 연구보고도 있다 (Hu *et al.*, 1995). 그러나 nicotine 처리 후 폐조직중의 암관련유전자의 발현변화를 연구한 자료가 전혀 없는 점과 다단계 화학발암과정 중에 암유전자 및 암억제유전자가 이상발현 되는 점을 고려하여 본 연구에서는 우선 nicotine을 Sprague-Dawley 랫드를 대조군과 실험군으로 나누어 연속적으로 10일 동안 투여했을 때 정상 폐조직중에 암유전자 및 암억제유전자의 발현에 영향이 있는지에 대하여 검토하였다. Nicotine의 투여농도는 성인 (60 kg)이 피우는 하루 흡연량 (20 개피분)을 기준하여 30배로 하였으며 투여 3일후부터 12주까지 매주단위로 폐조직중의 대표적 암유전자인 H-ras, raf, c-myc, c-jun, c-fos 단백질과 암억제유전자인 p53, Rb 단백질을 분석하였다. 그 결과 이들 7종의 암관련유전자 단백질의 변화는 투여 12주 후까지 별다른 유의성 있는 변화가 없는 것으로 나타났으며 단백질 발현 분석에 사용한 동일한 조직에서 c-myc, c-jun 및 p53의 mRNA를 분석한 결과도 투여 12주 후까지 유의성 없게 나타나 단백질 발현 실험결과와 일치하는 것으로 나타났다. 이

러한 연구결과는 일부 암세포에 nicotine을 투여했을 때 암세포수가 증가하고 (Caffaneo *et al.*, 1993; Maneckjee *et al.*, 1990; Schaller *et al.*, 1994), 세포내 신호전달과정 및 다단계 화학발암과정중 발암촉진단계에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 protein kinase C (PKC)의 발현이 증가된다고 보고한 다른 연구결과 (Wright *et al.*, 1993)와 비교하여 볼 때 nicotine은 동물체내에서 이미 암화가 개시된 세포 (initiated cell)에는 발암촉진제 (tumor promoter)로서 작용할 가능성이 많지만 초기 정상 조직세포들에는 별다른 영향이 없는 것으로 사료된다. 그러나 본 실험에서 사용한 nicotine의 투여조건이 하루 투여용량으로서는 보통 성인의 30배에 상당하지만 투여기간이 비교적 짧고 투여후 12주 이상은 이들 암유전자 및 암억제유전자의 발현변화를 관찰하지 않아 향후 이에 대한 추가연구가 필요할 것으로 보여진다.

TSNA인 NNN, NNK 및 NNAL 등은 보통 *in vitro*에서 nicotine과 sodium nitrite를 산성조건에서 직접 반응시키거나 nicotine의 대사산물중 하나인 normicotine의 니트로화 반응을 통해 생성될 수 있음이 알려져 있다 (Caldwell *et al.*, 1991). 그리고 최근에 미국의 Hecht 그룹은 nicotine과 sodium nitrite를 F344 랫드에 병용 투여 시 체내에서 TSNA의 일종인 NNN이 생성될 수 있음을 보고한 점을 미루어 볼 때 nicotine과 sodium nitrite의 병용투여에 의해 NNN보다 훨씬 강력한 발암물질인 NNK도 동물체내에서 생성될 수 있을 것으로 예상되어지고 있다. 본 연구에서는 미국의 Hecht 그룹이 NNN을 검출하기 위해서 동물실험에 사용한 같은 실험조건하에서 NNK를 검출하고자 하였으나 NNK는 동물체내에서 반감기가 매우 짧은 것으로 보고되고 있어 NNK의 최종 대사산물중의 하나인 8-OHdG의 생성량을 NNK의 지표로 대신 측정하였다. 그 결과 NNK 단독투여군의 경우에는 8-OHdG 레벨이 대조군에 비해 1.8배에서 2.3배까지 현저하게 증가하였으나 nicotine 및 sodium nitrite를 각각 단독 혹은 병용 투여한 그룹에서는 8-OHdG 레벨의 유의한 변화를 관찰하지 못했다.

Nitrite 섭취량에 대한 조사한 그동안의 보고에 의하면 미국인의 경우 nitrite 섭취량은 보통 하루 4 mg 정도이며 이 nitrite는 주로 야채 중에 존재하는 nitrate로부터 체내에서 변환되어 생성되는 것으로 알려져 있다 (Marletta *et al.*, 1988). Nicotine 역시 직접 혹은 간접흡연을 통해 우리 환경 중에 쉽게 노출되어 있어 사람이 nicotine과 nitrite에 동시에 노출될 경우 위산의 도움으로 니트로화 반응을 통해 인체 내에서도 쉽게 TSNA가 생성될 가능성이 매우 높은 것으로 사료된다. 비록 본 연구를 통해 Fischer 344 랫드 체내에서 NNK의 생성 여부는 확인할 수 없었지만 최근에 미국의 Hecht 그룹에 의해 nicotine과 nitrite에 의해 발암물

질인 NNN이 발견된 사실을 고려하면 nicotine의 발암성에 대한 연구는 향후 체계적으로 지속되어야 할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 식품의약품안전청의 기본연구사업비로 수행되었음.

## 참고 문헌

- Adams, J.D., O'Mara-Adams, K.J. and Hoffmann, D. (1987): Toxic and carcinogenic agents in undiluted mainstream smoke and side stream smoke of different types of cigarettes. *Carcinogenesis*, **8**, 729-731.
- Anderson, R.A., Burton, H.R., Fleming, P.D., Hamilton-Kemp, T.R. and Gay, S.L. (1987): Effect of air-curing environment on alkaloid-derived nitrosamines in burley tobacco. IARC publications., **84**, 451-455.
- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Caffaneo, M.G., Codignola, A., Vicentini, L.M., Clementi, F. and Sher, E. (1993): Nicotine stimulates a serotonergic autocrine loop in human small-cell lung carcinoma. *Cancer Res.*, **53**, 5566-5568.
- Caldwell, W.S., Greene, J.M., Plowchalk, D.R. and deBethizy, J.D. (1991): The nitrosation of nicotine; a kinetic study. *Chem. Res. Toxicol.*, **4**, 513-516.
- Carmella, S.G., Akerkar, S. and Hecht, S.S. (1993): Metabolites of the tobacco-specific nitrosamine 4-(N-methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in smokers' urine. *Cancer Res.*, **53**, 721-724.
- Carmella, S.G., Borakhova, A., Desai, D. and Hecht, S.S. (1997): Evidence for endogenous formation of tobacco-specific nitrosamines in rats treated with tobacco alkaloids and sodium nitrite. *Carcinogenesis*, **18**, 587-592.
- Chini, B., Clementi, F., Hukovic, N. and Sher, E.L. (1992): Neuronal type-bungarotoxin receptors and  $\alpha$ -5 nicotine receptor subunit gene are expressed in neuronal and non-neuronal human cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**, 1572-1576.
- Day, N.E. and Brown, C.C. (1980): Multistage models and primary prevention of cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, **64**, 977-989.
- Djordjevic, M.V., Sigountos, C.W., Brunnemann, K.D. and Hoffmann, D. (1991): Formation of 4-(methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl) butyric acid in vitro and in mainstream cigarette smoke. *J. Agric. Fd. Chem.*, **39**, 209-213.
- Hecht, S.S., Chen, C.B., Orna, R.M., Jacobs, E., Adams, J.D. and Hoffmann, D. (1978): Reaction of nicotine and sodium nitrite; formation of nitrosamines and fragmentation of the pyrrolidine ring. *J. Org. Chem.*, **43**, 72-76.
- Hecht, S.S., Chen, C.B., Ohmori, T. and Hoffmann, D. (1987): Comparative carcinogenicity in F344 rats of the tobacco-specific nitrosamines, N'-nitrososornicotine and 4-(N-methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res.*, **40**, 298-302.
- Hecht, S.S. and Hoffmann, D. (1988): Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke. *Carcinogenesis*, **9**, 875-884.
- Hoffmann, D., Castonguay, A., Rivenson, A. and Hecht, S.S. (1981): Comparative carcinogenicity and metabolism of 4-(N-methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and N'-nitrososornicotine in syrian golden hamsters. *Cancer Res.*, **41**, 2386-2393.
- Hoffmann, D., Brunnemann, K.D., Prokopczyk, B. and Djordjevic, M.V. (1994): Tobacco-specific N-nitrosamines, chemistry, biochemistry, carcinogenicity and relevance to humans. *J. Toxicol. Environ. Health*, **41**, 1-52.
- Hu, G., Han, C., and Chen, J. (1995): Inhibition of oncogene expression by green tea and (-)-epigallo catechin gallate in mice. *Nutr. Cancer*, **24**, 203-209.
- Maneckjee, R. and Minna, J.D. (1990): Opioid and nicotine receptors affect growth regulation of human lung cancer cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **87**, 3294-3298.
- Marletta, M.A. (1988): Mammalian synthesis of nitrite, nitric oxide and N-nitrosating agents. *Chem. Res. Toxicol.*, **1**, 249-257.
- Mirvish, S.S. (1975): Formation of N-nitroso compounds; chemistry, kinetics and in vivo occurrence. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **31**, 325-351.
- Mirvish, S.S., Sams, J. and Hecht, S.S. (1977): Kinetics of nicotine and anabasine nitrosation in relation to N'-nitrososornicotine occurrence in tobacco and to tobacco-induced cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, **59**, 1211-1213.
- Pelto-Hukko, M., Dagerlind, A., Kononen, J. and Hokfelt, T. (1995): Neuronal regulation of c-fos, c-jun and jun B immediate early genes in rat adrenal medulla. *J. of Neurosci.*, **15**, 1854-1968.
- Ren, T. and Sagar, S.M. (1992): Induction of c-fos immunostaining in the rat brain after the systemic administration of nicotine. *Brain Res. Bull.*, **29**, 589-597.
- Rivenson, A., Hoffman, D., Prokopczyk, B., Amin, S. and Hecht, S.S. (1988): Induction of lung and exocrine pancreas tumors in F344 rats by tobacco-specific and Areca-derived N-nitrosamines. *Cancer Res.*, **48**, 6912-6917.
- Schaller, H.M. (1994): Carbon dioxide potentiates the mitogenic effects of nicotine and its carcinogenic derivative of NNK, in normal and neoplastic neuroendocrine lung cell via stimulation of autocrine and protein c-dependent mitogenic pathways. *Neuro. Toxicol.*, **15**, 877-886.
- Tricker, A.R., Haubner, R., Spiegelhalder, B. and Preussman, R. (1988): The occurrence of tobacco-specific nitrosamines in oral tobacco products and their potential formation under simulated gastric conditions. *Fd. Chem. Toxicol.*, **26**, 861-865.
- Wright, S.C., Zhong, J., Zheng, H. and Larrick, J.W. (1993): Nicotine inhibition of apoptosis a role in the tumor promotion. *FASEB. J.*, **7**, 1045-1051.