

Urethane으로 유발된 생쥐 폐샘암종 발생과정에서 세포주기 관련인자(Cyclin D1, p21, and p27)에 대한 비소의 효과

임성혁 · 정지훈 · 견종만* · 박언섭*·#
중앙대학교 의과대학 약리학교실, *병리학교실
(Received January 6, 2006; Revised April 5, 2006)

Effects of Arsenic Trioxide on Cell Cycle Related Proteins (Cyclin D1, p21, p27) Expression During Urethane-induced Lung Carcinogenesis in Mice

Sung Hyuk Yim, Ji Hoon Jeong, Jong Man Gyeon and Eon Sub Park*·#

Department of Pharmacology and

*Department of Pathology, School of Medicine, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

Abstract — The present study investigated an effect of arsenic trioxide on the urethane-induced lung carcinogenesis in mice. To understand its carcinogenesis, we examined proliferating cell nuclear antigen (PCNA), apoptotic index as well as cell cycle-related proteins (cyclin D1, p21, and p27). Urethane was injected intraperitoneally in ICR mice, and then they were sacrificed at 5, 15, or 25 weeks following treatment of arsenic trioxide. Arsenic trioxide was given with tap water at a concentration of 1 mg/l (low-dose) and 5 mg/l (high-dose) for 25 weeks. During the carcinogenesis, sequential histological changes from hyperplasia to adenomas, and ultimately to overt carcinomas were noted. The development of hyperplasias, adenomas, and carcinomas in the lung were slightly increased by the treatment of low-dose arsenic trioxide. However, there is no correlation between dose and tumor multiplicity. The administration of low-dose arsenic trioxide, significantly increased the tumor size. The proliferative index observed on 5 weeks after significantly increased. Cyclin D1 and p21 protein, cell cycle related proteins, were more significantly increased in hyperplasia and adenoma in low dose arsenic treated group than urethane alone group. The p27 protein expression did not show any significantly changes with arsenic treated or untreated group. Low dose exposure to arsenic trioxide resulted in increased expression of cyclin D1 and p21 protein. The present results indicate that low-dose treatment of arsenic trioxide, but not high dose of it, partly modulate the cellular proliferation, cyclin D1, and p21 protein expression, and that this effect may contribute to accelerated development of lung adenocarcinomas in urethane-induced mice.

Keywords □ lung carcinogenesis, urethane, arsenic trioxide, cell cycle related proteins

산업화에 의한 대기오염, 흡연인구의 증가 등으로 최근 우리나라에서도 서양에서와 마찬가지로 폐암종의 발생빈도가 매년 증가하는 추세에 있다. 폐에서 발생하는 악성 종양 중 대부분(90~95%)은 기관-기관분지에서 발생하는 상피성 암종으로, 그 중에서 샘암종은 상대적으로 젊은 나이, 비흡연자, 그리고 여성에게 발생빈도가 높다. 또한 샘암종은 병리학적으로 대부분 말초 폐실질에서 발생하기 때문에 단순 흉부 방사선검사와 객담세포검사로 조기에 진단하기가 어렵고, 종양의 생물학적 특성상 주

위 폐조직으로 침윤성 증식과 혈행성 전이가 빈번해 예후가 불량하다.¹⁾ 따라서 샘암종의 발생과 진행을 억제시키는 새로운 치료법을 시험하기 위해 많은 연구가 시행되고 있는데, 그중에서 실험적 모델을 통한 비교연구가 동적인 개념으로의 종양의 평가에 효과적이다.

실험적 폐암종 모델로는 생쥐 복강 내에, 담배에 함유되어 있는 nitrosamine 계열의 4-(methyl-nitrosamino)-12-(3-pyridyl)-1-butanone이나 알킬화 발암제인 urethane(ethyl carbamate) 등을 투여하는 방법이 가장 널리 사용되고 있는데, urethane을 이용한 실험적 폐 샘암종 모델은 샘암종의 전구병변으로 간주되고 있는 비정형성 증식, 샘종의 발생에 이어 인체에서 발생하는 샘암종과 형태학적으로 유사한 병변이 초래되어 이상적 모델로 이용

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-820-5679 (팩스) 02-813-5397
(E-mail) esp@cau.ac.kr

되고 있다.^{2,3)} Urethane에 의한 발암 기전은 대사산물에 의한 폐상피세포 DNA 손상에 따른 유전자 돌연변이와 수반된 종양 유전자의 발현과 조절유전자의 소실 등으로 요약된다.⁴⁾

화학적 발암물질에 의해 악성으로 형질전환된 세포의 핵심적 특징은 지속적이며 자율적인 증식과 사망회피가 동반되며, 여기에는 암세포내 세포주기의 진행과 증식에 관여하는 신호전달체계와 세포자멸사 조절에 이상이 있기 때문으로 해석된다.⁵⁾ 형태학적으로 세포증식능을 측정하는 방법은 다양하지만 파라핀 포매조직을 이용하여야 하는 경우 면역조직화학염색으로 증식세포핵항원(proliferating cell nuclear antigen, 이하 PCNA)을 측정하는 방법이 가장 많이 이용되고 있다.⁶⁾ 세포자멸사의 확인에는 일반 H-E 염색에서 특징적인 형태소견과 더불어 분절된 DNA를 제자리에서 표지시켜 검출하는 TUNEL(Tdt-mediated dUTP-biotin nick labeling) 방법을 이용하여 측정할 수 있다.⁷⁾

종양형성에 관여하는 세포주기조절인자로 촉진인자인 cyclin 계열 단백질과 이들과 결합하여 활성을 나타내는 촉매단위인 cyclin dependant kinase(CDK)와 억제인자인 cyclin dependent kinase inhibitor(CDKI) 등이 있는데, 이러한 세포 주기 조절인자의 이상이 다양한 종양의 발생과 진행과정에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.⁸⁾ Cyclin계열 단백질 중에서 가장 대표적인 것이 cyclin D1 단백질로, 이 단백질의 작용기전은 세포증식을 조절하는 감시관문으로 가장 중요한 단계인 G1/S기의 이행단계에 작용하는 주조절단위로 이 단백질의 이상발현은 조절되지 않는 세포성장을 초래해 종양의 발생에 관여한다.⁹⁾ CDKI의 cip/kip 군에 속해 있는 p27^{Kip1} 단백질의 주 작용은 일종의 종양억제 유전자로 cyclin D1-CDK4 복합체와 결합하여 CDK의 활성을 억제해서 G1기에서 S기로 이행하는 과정을 차단함으로써 세포분열을 중단시키는 기능을 한다.¹⁰⁾ 또한 p21^{waf1/cip1} 단백질은 cyclin D1-CDK4 복합체를 비활성화 시켜 세포주기를 G1기에서 머물게 하여 세포주기를 억제한다.¹¹⁾

비소(Arsenic)는 다양한 형태의 화합물로 구성된 금속물질로 미국의 자료에 의하면 유해 환경오염물질 관리 우선순위 1순위에 분류되어 있다.¹²⁾ 비소에 의한 인체의 유해성은 피부질환, 신경계통, 소화기장애 등 다양하며 최근에는 폐암을 비롯한 피부암, 방광암 등을 일으킬 수 있는 인간발암물질로 IARC category A로 분류되어 주목받고 있다.¹³⁾ 그렇지만 비소는 급성골수백혈병에서 항암요법에 저항이 있는 경우 대체 치료제로서의 역할과 더불어,^{14,15)} 최근에는 유방암, 간암, 췌장암 등 일부 고형성 암종에서 항암효과의 가능성 등¹⁶⁻¹⁸⁾ 발암원성 작용뿐만 아니라 악성 종양의 치료효과에 대한 이중적인 약리작용을 보여주고 있다.

이에 본 연구에서는 ICR 계의 생쥐 복강 내 urethane 투여 후 발생하는 폐암종의 형태변화를 관찰한 다음, 저농도 비소(As_2O_3 1 mg/l)와 고농도 비소(5 mg/l) 투여가 폐암종의 발생 및 진행과정에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 이들 비소 투여가 종양형

성과 관련이 있는 세포증식능(PCNA)과 세포자멸사, 세포주기 조절인자단백(Cyclin D1, p21^{waf1/cip} 그리고 p27^{Kip1})에 어떠한 변화를 초래하는지 알아보고자 하였다.

실험 방법

실험동물 및 시약

실험동물은 생후 5주 된 ICR 계 수컷 생쥐(Samtaco Bio Korea), 150마리를 사용하였고, 사료는 시판 고형사료(삼양사료 주식회사, 한국)를 사용하였다. 실험동물은 생쥐용 cage에 10마리씩 넣어 환경 적응을 위해 실험 1주일 전부터 동일 조건 하에서 미리 사육시켰다. Urethane과 비소(As_2O_3)는 Sigma 회사(Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA) 제품을 구입하여 사용하였다.

실험동물의 구분과 실험방법

실험동물 150마리를 각각 정상대조군 30마리, 실험대조군으로 urethane 단독 투여 군 40마리, 실험군으로 urethane 투여 후 저농도(1 mg/l)와 고농도(5 mg/l) 비소를 각각 병행하여 음용시킨군 80마리(1 mg/l 40마리, 5 mg/l 40마리) 등 무작위로 4개의 군으로 배분하였다. 실험은 urethane(2.5 mg/gm)을 1주에 2번 연속적으로 복강내 3회 주입 후, 비소(저농도 : 1 mg/l, 고농도 5 mg/l)를 염산에 녹인 후 완충용액으로 pH를 조절하여 수돗물에 섞어 투여하였고 대조군과 urethane 투여군은 실험군과 동일한 사료와 수돗물만 공급하였다.

병리조직검사

실험시작 후 5주, 15주에 각각 대조군과 실험군 모두 10마리씩, 그리고 실험이 종료되는 25주에는 생존해 있는 모든 동물의 경추를 탈골시키고 개복한 후 양측 폐를 절제하여 무게를 측정하였다. 그 후 기관지에 10% 중성포르마린을 주입하여 폐를 팽창시킨 후 고정시킨 다음 통상적인 방법으로 파라핀으로 포매 후 5 μm 두께의 조직표본을 만들어 헤마토틴린과 에오신 염색하여 관찰하였다. 실험이 종료된 25주군 폐병변의 형태학적 소견은 Foley(1991) 등의 판정기준에 따라 이행성 증식증, 샘종, 그리고 샘암종으로 분류하였다. 또한 화상분석기(Media Cybernetics, Optimas V6.2)를 이용하여 양측 폐에 있는 병변의 수와 크기를 측정하였다.

면역조직화학염색

파라핀 포매조직을 5 μm 두께로 박절하여 슬라이드에 부착시키고, 파라핀을 제거한 후 통상적인 방법으로 알코올로 함수와정을 거친 다음, 감추어진 항원을 노출시키기 위해 citric acid 완충액에 넣고 고압극초단파(750 w)에서 20분간 처리하였다. 실온

에서 30분간 식힌 다음 Tris 용액으로 세척하고 avidin-biotin complex 방법을 이용하여 일련의 통상적인 방법으로 면역조직화학적 염색을 시행하였다. 일차항체는 Cyclin D1 (Neomarkers Co, Fremont, U.S.A., mouse monoclonal, 1:100), p21, p27 항체(Santa Cruz Inc, U.K., mouse monoclonal, 1:100)를 실온에서 2시간 반응시켰다. 발색제는 3-amino-9-ethyl carbazol(AEC)을 사용하였고 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하여 글리세린으로 봉입한 다음 현미경으로 관찰하였다. 면역조직화학 염색의 음성대조군은 폐 조직에서 일차항체를 처리하지 않은 것을 이용하였다. Cyclin D1, p21, p27항체에 대한 염색의 판정은 각 군의 양측 폐에서 관찰된 증식중, 샘중, 그리고 샘암종을 구성하는 핵에 갈색으로 진하게 염색된 것을 양성으로 판독하였으며, 각 병변 당 4부위에서 관찰하여 백분율을 구하였다.

세포증식능과 세포자멸사의 측정

세포증식능은 mouse monoclonal anti-PCNA 항체(Novocastra Co, U.K., 1:1000)을 사용하여 파라핀 포매조직에서 avidin-biotin 복합체를 이용한 면역조직화학 염색을 시행하였다. 세포자멸사는 TUNEL(terminal deoxynucleotidyl transferase mediated cUDP nick end labeling) 방식을 이용하여 Tdt DAB in situ apoptosis detection kit(Travigen, USA)제품을 사용하였다. 양성 세포의 확인은 현미경 고배율(×400) 시야에서 1000개의 세포 중 핵에 양성반응을 보이는 세포를 세어 백분율(%)로 나타내었다.

통계 처리

실험적 폐 샘암종 발생과정에서 urethane 투여군, 그리고 urethane 투여 후 저농도와 고농도 비소를 병행 투여한 군에 따른 종양의 발생빈도와 크기는 *t*-test를 이용하였으며, 세포증식능과 세포자멸사의 빈도는 Student *t*-test를 이용하였다. 또한 각

군에서의 p21, p27 발현에 대한 빈도도 Student *t*-test를 이용하였으며, P값이 0.05 미만인 경우 통계적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

실험 결과

실험동물 폐의 무게

생쥐의 폐 무게는 정상대조군에 비해 urethane과 비소를 병행 투여한 군에서 시간경과에 따라 통계적으로 유의하게 증가하였다($P < 0.01$). Urethane 투여 후 비소를 병행 투여한 군의 비교에서 저농도 비소(1 mg/l)를 투여한 군이 고농도(5 mg/l) 투여군 보다 폐 무게가 증가하는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 1).

병리조직학적 소견

Urethane과 urethane 투여 후 비소(저농도 1 mg/l; 고농도

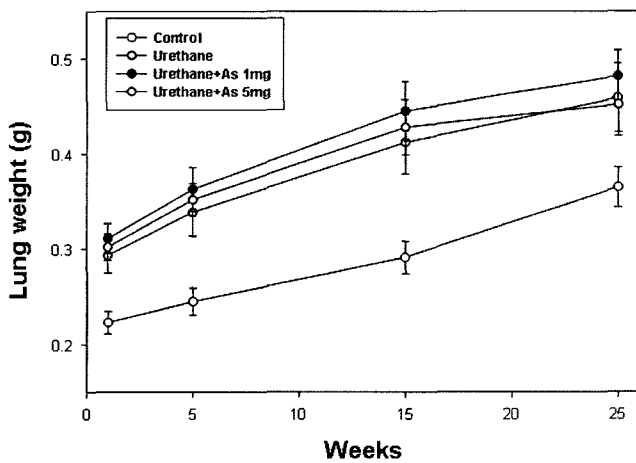


Fig. 1 - Effect of long-term arsenic trioxide administration on lung weight in urethane-induced lung carcinogenesis.

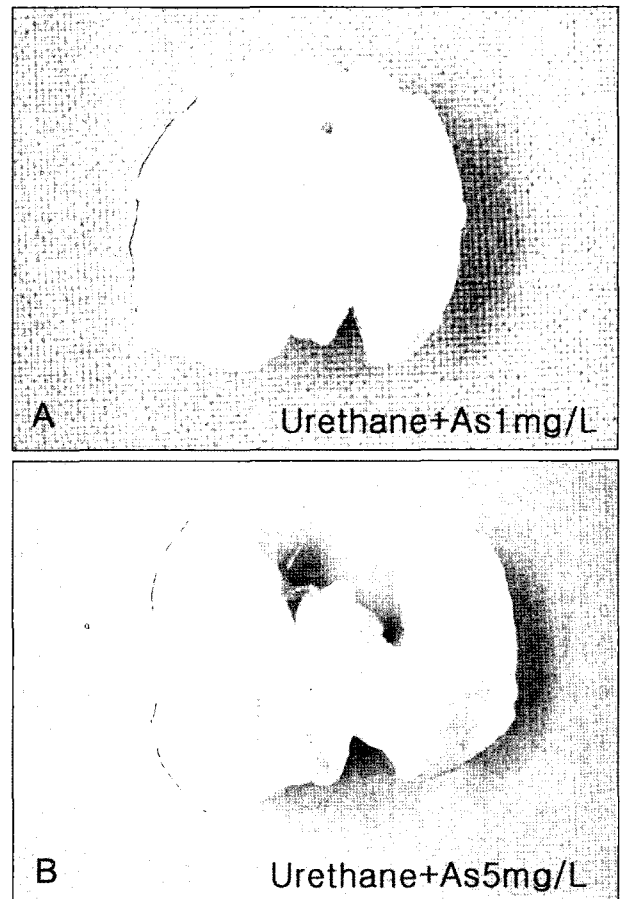


Fig. 2 - Gross morphology of lung tumor in ICR mice treated with urethane and arsenic trioxide. Multiple large nodular masses at 25 weeks in low dose arsenic trioxide (1 mg/l) group (Fig. 2A) and relatively small nodules in high doses (5 mg/l) group (Fig. 2B).

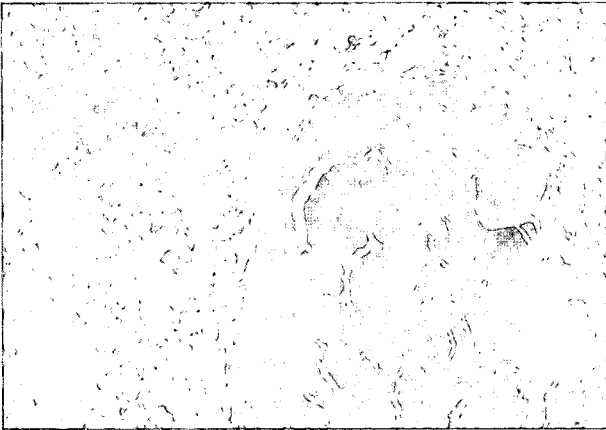


Fig. 3 - Adenoma appeared in lung lesion by urethane.

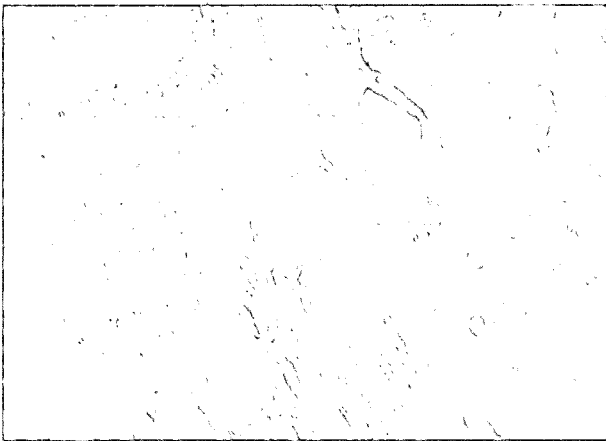


Fig. 4 - Infiltrating adenocarcinoma appeared in lung lesion by urethane.

5 mg/l)를 병행 투여한 후 나타난 생쥐 폐의 형태적 변화를 5주, 15주, 그리고 25주 후에 관찰하였다. 실험이 종료된 25주 후에 관찰된 폐의 육안소견은 urethane 투여 후 저농도 비소를 병행 투여군이 고농도 비소 투여군에 비하여 폐의 결절의 크기가 작게 관찰되었다(Fig. 2A, Fig. 2B). 조직학적 소견으로 urethane 투여 5주 후에는 폐포내 정상 상피세포의 두배 이상이며 농염된 핵과 핵소체가 보이는 이형성 증식세포가 부분적으로 관찰되었

다. 15주에서는 세포가 숫적으로 밀집하여 치밀하거나 유두상 구조를 만들면서 주위를 압박하는 선종이 출현하였고(Fig. 3), 실험이 종료된 25주 후에는 비정형 유사분열과 세포의 이형성이 현저하며, 주변으로 침윤성 증식을 보이는 샘암종이 관찰되었다(Fig. 4). 25주 후에 관찰한 실험군 소견은 부분적으로 다른 양상을 보였다. 즉, urethane 투여 후 저농도 비소를 병행 투여한 군에서 상대적으로 비정형성 증식, 선종, 그리고 샘암종이 urethane 단독 투여군 보다 수의 크기가 증가하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다. 그렇지만 샘암종의 크기는 통계적으로 유의하게 증가하였다($P < 0.05$). 고농도 비소를 투여한 군에서는 오히려 urethane 단독 투여군에 비해 오히려 폐병변의 수와 크기가 감소하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 나타나지 않았다. 조직학적 소견은 <Table I>에 제시하였다.

세포증식능과 세포자멸사 지수

Urethane과 urethane에 각각 저농도와 고농도 비소를 병행 투여 후 초기 5주 경과한 다음 관찰한 생쥐 폐 세기관지 상피세포에서의 세포증식능 지수는 urethane 단독 투여군에서 $0.43 \pm 0.04\%$, 저농도 비소투여군 $0.54 \pm 0.01\%$, 그리고 고농도 투여군에서 $0.44 \pm 0.03\%$ 로 저농도 투여군에서만 통계적으로 유의하게 증가하였다(Fig. 5, Table II, $P < 0.05$).

25주 후에 관찰한 샘암종에서의 세포자멸사 양성세포는 특정 부위에 편재되지 않고 흩어져서 관찰되었다. 세포자멸사 지수는 urethane 단독 투여군에서 $5.21 \pm 0.68\%$, 저농도 비소 병행 투여군에서 $5.64 \pm 0.87\%$, 고농도 비소 투여군에서는 $4.92 \pm 0.74\%$ 로 증가 또는 감소하는 경향을 보였으나 통계적 유의성이 없었다(Fig. 6, Table II).

면역조직화학 염색에 의한 Cyclin D1, p21, p27 발현양상

Urethane과 urethane 투여 후 저농도와 고농도 비소를 25주간 병행 투여한 다음 발생된 전암성 및 샘암종 병변에서 cyclin D1의 발현빈도는 urethane 단독 투여군에 비해 저농도 비소를 병행 투여한 군에서 증식증과 샘암종에서 통계적으로 유의하게 증가하였다(Fig. 7A, $P < 0.05$). p21 단백질발현은 urethane 투여군

Table I - Lung lesion in mice after 25 weeks treated with urethane and arsenic trioxide

Treatment	No. of mouse	Tumor multiplicity and volume (mm ²)/mouse		
		Hyperplasia	Adenoma	Adenocarcinoma
Urethane only	10	3.78 ± 1.64	8.55 ± 1.87	0.33 ± 0.39
		$0.06 \pm 0.03 \text{ mm}^2$	$0.78 \pm 0.76 \text{ mm}^2$	$8.41 \pm 4.15 \text{ mm}^2$
Urethane+As 1 mg/l	10	4.71 ± 1.49	9.16 ± 1.72	0.43 ± 0.53
		$0.05 \pm 0.02 \text{ mm}^2$	$0.72 \pm 0.91 \text{ mm}^2$	$16.61 \pm 5.76 \text{ mm}^2*$
Urethane+As 5 mg/l	8	3.66 ± 1.21	7.14 ± 1.46	0.26 ± 0.41
		$0.06 \pm 0.02 \text{ mm}^2$	$0.47 \pm 0.41 \text{ mm}^2$	$7.13 \pm 3.42 \text{ mm}^2$

* $P < 0.05$; As, arsenic trioxide.

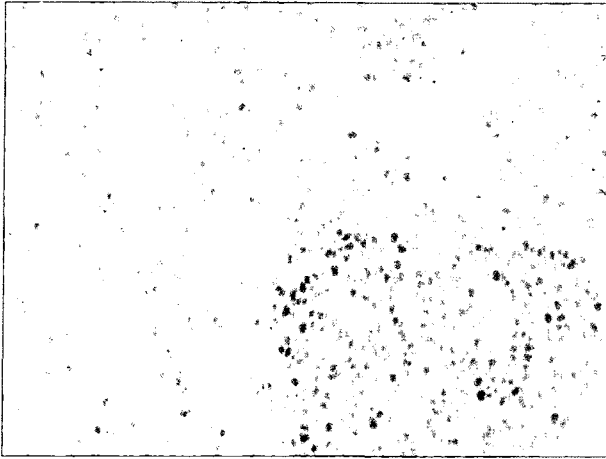


Fig. 5 – Immunohistochemical reactivity for PCNA in alveolar epithelial hyperplasia (×100).

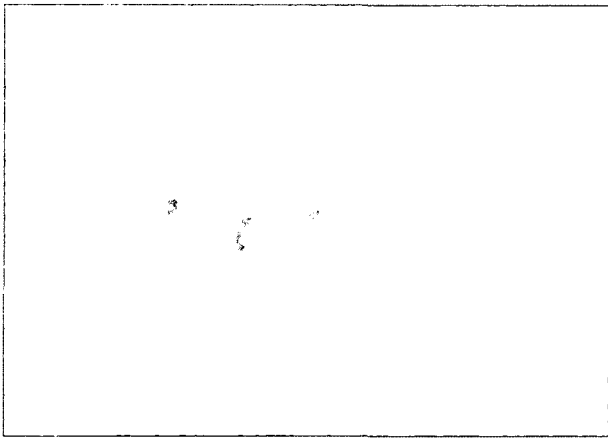


Fig. 6 – TUNNEL stain shows occasional nuclear staining in adenocarcinoma of lung (×200).

Table II – Early (5 weeks) PCNA and late (25 weeks) apoptotic labeling index in mouse treated with urethane alone and with co-exposure to urethane and arsenic trioxide

Treatment	Proliferation index (%) (No. of mouse=10)	Apoptotic index (%) (No. of mouse=10)
Urethane only	0.43±0.04	5.21±0.68
Urethane+As 1 mg	0.54±0.01*	5.64±0.87
Urethane+As 5 mg	0.44±0.03	4.92±0.74

*P<0.05; As, arsenic trioxide.

보다 저농도와 고농도 비소 투여군의 초기 비정형성 증식증에서 통계적으로 유의하게 감소하였으나(Fig. 7B, P<0.05), 샘종과 샘암종에서는 차이가 없었다. p27 단백질발현은 증식증, 샘종, 그리고 샘암종의 일련의 과정에서 지속적으로 증가하였으나 실험대조군과 실험군 모두에서 비소처리에 대한 영향은 나타나지 않았다. 위 결과를 전체적으로 도식화하여 보면 Fig. 8과 같은 결과

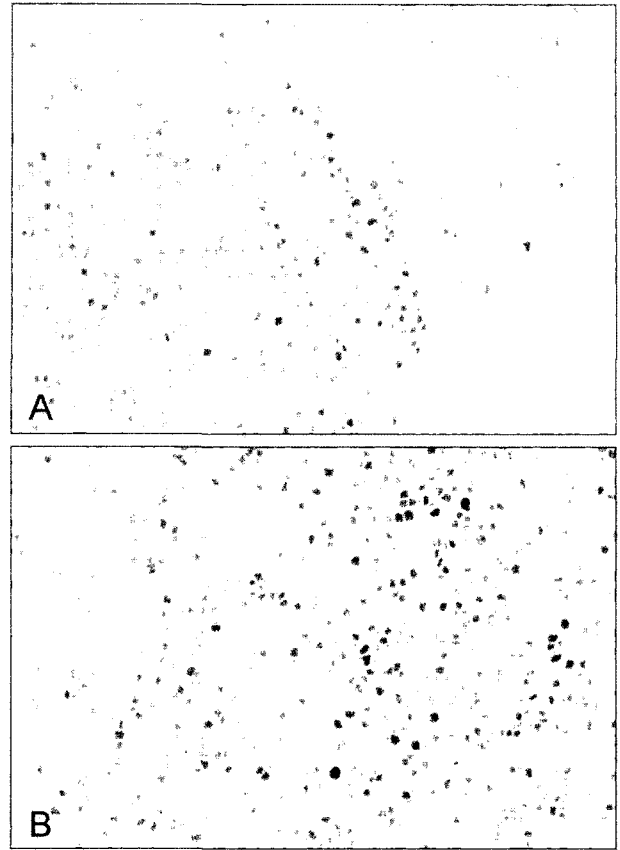


Fig. 7 – Immunohistochemical reactivity for cyclin D1 (A) and p21 (B), showing positive nuclear staining.

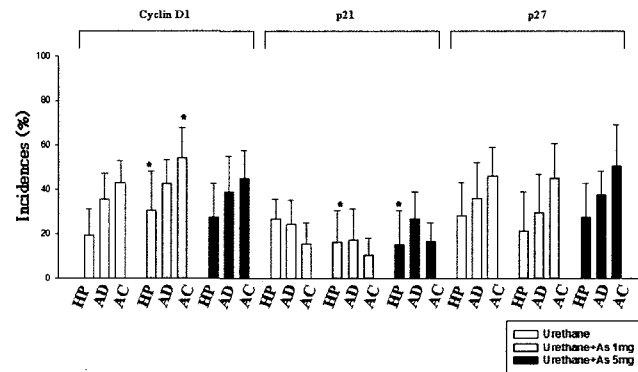


Fig. 8 – Expression of cyclin D1, p21, and p27 protein in mouse lung lesions after 25 weeks treated with urethane alone and with co-exposure to urethane and arsenic trioxide (*P<0.05).

가 나왔다.

고 찰

화학적 발암물질에 의한 세포의 암화과정은 매우 역동적인 과정으로 보통 발암개시, 촉진 및 진행 등의 다단계로 구분된다. 알

킬화 발암물질인 urethane(ethyl carbanate)은 표적세포의 DNA에 직접 작용하여 돌연변이를 유발하는 유전자 독성물질로 ICR계 생쥐 복강내에 투여하면 시간경과에 따라 폐포상피세포의 증식, 샘종을 거쳐 인체에서 발생하는 샘암종과 형태적으로 유사한 병변이 초래되어 널리 사용되고 있다.³⁾ 본 연구서는 실험대조군으로 5주령 된 생쥐 한 마리당 urethane 60 mg을 1주에 2회씩 3회 복강 내 투여하고, 동시에 실험군은 저농도 비소(1 mg/l)와 고농도 비소(5 mg/l)를 지속적으로 음용시켜 urethane에 의한 생쥐의 폐 샘암종 발생과정에서 비소의 효과에 대해 살펴보았다. 본 실험에서 urethane을 복강 내 투여 후 생쥐 폐에서 관찰된 형태적 소견은 5주부터 부분적으로 폐포 내벽을 따라 경도의 이행성을 보이는 상피세포가 증식하였고, 15주 후에는 일부에서 주변 폐 실질을 압축시키는 샘종의 출현과 더불어 점차 진행하여, 25주 이후에서 주변으로 침윤성 양상을 보이는 샘암종이 관찰되었다. 비소가 암 발생과정에서 역할은 발암원으로서의 비소의 작용과 더불어 일부에서 발암억제효과에 대한 연구결과 등 상반된 의견이 있다.^{13,16,18)} 최근에는 문헌상 urethane에 의한 실험적 폐섬암종 유발은 보통 urethane의 농도를 5 주령 생쥐 한 마리당 12 mg(0.5 mg/gm of body weight) 투여할 경우 30주 이후에서 출현하는 것으로 보고되어 있으나,¹⁹⁾ 본 실험에서는 생쥐 한 마리당 5배 높은 60 mg(2.5 mg/gm of body weight)을 투여하였다. 이는 폐섬암종 유발기간을 단축시켜 비소의 발암촉진 또는 억제과정을 중점 분석하려는 의도 때문이었다.

발암과정에서 비소의 역할은 직접적으로 3가 비소(arsenic trioxide)에 노출된 쥐의 상피세포(TRL-1215)의 DNA hypomethylation을 초래해 종양유전자인 c-myc과 c-Ha-ras의 과발현을 초래해 악성종양으로의 형질전환이 일어난다는 보고와 더불어,²⁰⁾ 비소 자체의 발암원성 보다 다른 발암원과 공동작용을 하며, 주 기능은 DNA 손상 시 복구를 억제하여 항구적인 DNA 손상을 초래해 발암과정에 간접적으로 작용한다는 의견이 있다.²¹⁾ 본 연구에서 Urethane 투여 25주경과 후 살펴본 생쥐 폐 병변은 비정형성 증식증, 샘종, 그리고 샘암종이 혼재하여 출현하였는데 비소를 지속적으로 음용시킨 군에서 urethane 단독 투여군에 비해 폐병변의 출현빈도와 크기가 다른 양상을 보였다. 즉, 저농도 비소(1 mg/l) 병행 투여군에서 폐병변의 수가 증가하는 경향을 보였고, 특히 샘암종의 크기는 통계적으로 유의하게 증가하였다. 반면 고농도 비소(5 mg/l) 투여군에서는 통계적 유의성은 없었지만 폐병변이 urethane 단독 투여군에 비해 감소하는 양상을 보였다. 따라서 비소투여 자체는 폐암 발생 및 진행과정에서 urethane의 발암효과를 상승시킨다고 볼 수 있다. 그렇지만 고농도에서 오히려 종양발생을 억제시킨 점으로 미루어 발암상승작용은 농도 의존적이 아닌 것으로 추측되었다.

일반적으로 종양의 형성에 가장 기본적인 요소로 세포의 증식과 세포자멸사의 수적인 불균형이 필수적이다. 세포증식에 관여

하는 PCNA는 핵 내 펩티드인 DNA polymerase-8에 대한 보조 단백질로 세포주기 G1 후기에서 증가하여 S기에 최대에 이르기 때문에 증식세포의 특징적인 표지자가 될 수 있고, 후향적으로 파라핀 포매조직으로도 측정이 가능하기 때문에 널리 사용되고 있다.²²⁾ 본 실험에서 urethane 투여 후 초기 5주 경과한 폐포 및 세기관지에서의 PCNA 지수는 $0.43 \pm 0.04\%$ 이었고, urethane과 비소를 동시 투여한 군 중 저농도 비소를 투여한 군에서 $0.54 \pm 0.01\%$ 로 나타나 urethane 단독 투여군에 비해 유의하게 증가하였다. 그렇지만 고농도 투여군에서는 $0.44 \pm 0.03\%$ 으로 대조군과 차이가 없었다. 따라서 저농도 비소투여는 샘암종 발생과정의 초기에 세포증식을 촉진시키는 역할이 있는 것으로 생각되었다. 이러한 연구결과는 인체에 발생하는 식도암세포주(SHEE85)에 저농도(0.5 M/l)비소를 투여할 경우 세포증식이 일어나며, 고농도(5 M/l)에서는 세포증식 보다는 세포자멸사가 초래되며 그 기전은 반응성 산소종의 증가와 세포내의 항산화제의 감소에 기인한다는 Shen *et al.*²³⁾의 연구와 부분적으로 일치하였다. 그렇지만 Siu *et al.*¹⁸⁾은 인체 간암세포주인 HepG2에 arsenic trioxide를 2 M 투여하였더니 시간 의존적으로 세포증식이 억제되었고, 또한 Oketani *et al.*²⁴⁾은 인체의 간암세포주인 SK-Hep-1, HepG2에서 3가 비소를 처리 처리하였더니 농도 의존적으로 세포증식이 억제되었다는 상반된 보고가 있다. 이러한 점으로 보아 세포증식에 대한 비소의 작용은 세포의 유형마다 다르게 작용한다고 추측되었다.

종양형성에 세포자멸사의 역할은 일반적으로 세포자멸사를 촉진시키는 유전자와 억제시키는 유전자들 사이에 균형이 깨지면 세포자멸사가 억제되며, 결과적으로 발암원에 의해 항구적인 DNA가 손상된 세포가 증식되어 종양이 발생하는 것으로 보고되어 있다.²⁵⁾

세포자멸사 작용에 대한 비소의 역할은 일부 고형암에서 혈관형성을 억제하고, c-Jun NH2-terminal kinase 의존성 세포자멸사를 초래하는 것으로 보고되어 있다.^{26,27)} 또한 췌장암 세포주인 MiaPaCa2와 PANC-1에 arsenic trioxide를 처리하였더니 caspase-3, caspase-7, 그리고 caspase-9이 활성화되고, Bcl-2와 Mcl-1 단백질 시간 의존적으로 감소하였고 Bax 단백질은 증가하여 세포자멸사를 촉진시킨다고 하였다.¹⁷⁾ 세포자멸사의 다른 기전으로 arsenic trioxide는 DNA 대사의 중요 단계에서 DNA 형태를 변화시키는 효소인 topoisomerase I에 작용하여 topoisomerase I-DNA 복합구조를 유도시켜 염색질의 분절과 핵 응축을 초래해 세포의 apoptosis에 관여한다.²⁸⁾ 그렇지만 diethylnitrosamine으로 유발한 간암조직에 As₂O₃를 고용량(5 mg/kg)을 복강 내 투여하였더니 간 조직내 세포자멸사와 피사가 유발되었으나 저용량(1 mg/kg) 투여시 세포자멸사만 초래되었고, 그 기전은 bcl-2/bax 발현의 억제와, 세포주기의 G2/M 기를 선택적으로 정지시켰다는 상반된 보고를 하였다.²⁹⁾ 본 실험에서 세포자멸사는

urethane 단독 투여군에 비해 urethane 투여 후 저농도 비소를 투여 한 군에서 증가하는 양상을 보였다. 그렇지만 고농도 투여 군에서는 대조군에 비해 오히려 감소하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다($P > 0.05$). 이러한 결과는 Maeda *et al.*³⁰⁾이 안드로젠에 비존인 인체 전립샘 세포주인 PC-3, DU-145, 그리고 TSU-PR1를 누드생쥐의 전립샘에 접종 후 복강으로 비소(As_2O_3)를 투여하였더니 고용량(5 mg/kg) 투여군에서는 아포프토시스가, 저용량(2 mg/kg) 투여군에서는 세포자멸사가 촉진되어 종양세포의 성장이 억제되었고, 그 기전은 MAP-kinase, 반응성 산소종, 그리고 caspase-3의 활성이라는 보고와 부분적으로 일치하였다. 따라서 비소의 세포자멸사과정에 대한 역할은 추가적인 검증이 필요할 것으로 생각된다.

세포주기 조절인자에 대한 연구로 정상 세포주기의 조절붕괴가 암 발생의 중요한 과정이라고 알려졌고, 실제로 세포주기 조절에 관여하는 여러 구성성분의 이상이 폐암종을 비롯한 여러 암종에서 보고되고 있다. 세포주기에 관여하는 cyclin계열 단백질 중에서 cyclin D1은 G1기의 진행에 필수적인 세포주기조절단백이며 폐암종을 비롯한 인체의 다양한 암종에서 유전자의 증폭으로 인하여 그 발현이 증가되었고, 종양세포주를 이용한 연구에서도 과발현이 암의 발생 기전에 관여함이 확인 되었다.^{31,32)}

비소가 세포주기인자에 미치는 영향은 신세포암 세포주에서 cyclin D1뿐만 아니라 cyclin E, cyclin A 단백질 발현을 억제시키며,³³⁾ Li *et al.*¹⁷⁾의 보고에 의하면 인형 췌장암 세포주에 3가 비소를 처리하였더니 p21 발현은 증가하였으나, cyclin D1과 cyclin A의 발현은 감소하였다고 하였다. 또한 인형 상피양세포암 A431 세포주에 3가 비소를 처리하였더니 세포내 c-Src/EGFR/ERK 신호전달계의 Sp1 결합부위에 작용하여 p21(WAF1/CIP)를 발현시키는 것으로 알려져 있다.³⁴⁾ 그렇지만 Cui *et al.*³⁵⁾은 10 ppm 농도로 비소를 음용시켰더니 1개월 이후 간에서 cyclin D1과 p27^{Kip1} 유전자 mRNA의 발현이 증가되었고, Vogt *et al.*²¹⁾은 저용량으로 장기간 인체 섬유아세포에 비소를 노출시켰더니 cyclin D1의 발현이 증가되었고, radiation에 의해 유도된 p21 단백질 발현이 감소되었다고 하였다. 또한 Park *et al.*³⁶⁾은 인형 골수종 세포주에서 3가 비소를 처리하였더니 p21 mRNA와 단백질 양은 증가하였으나 p27^{Kip1}은 변화가 없었다 하였다. 본 연구에서 urethane 투여에 의한 샘암종 발생과정에서 cyclin D1의 발현은 저농도 비소 투여군에서 통계적으로 유의하게 샘암종 발생 초기인 비정형성 증식증 및 샘암종에서 증가하였고, p21 단백질 발현 역시 저농도와 고농도 비소 투여군의 초기 증식증에서 통계적으로 유의하게 증가하였다. 또한 p27^{Kip1} 단백질 발현은 비소 투여 여부에 관계없이 변화가 없었다. 이처럼 연구자에 따라 세포주기관련 단백질의 발현이 서로 상반된 결과로 미루어 종양세포주에서 비소의 효과는 세포주에 따라 다양성이 있을 것으로 추측되며, 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

이와 같은 결과를 종합해 볼 때 고농도 비소투여에 비해 저농도 비소 투여는 urethane에 의한 샘암종 발생과정에서 초기에 PCNA 증식지수를 증가시키고, 세포주기조절인자인 cyclin D1과 p21의 발현에 영향을 주며, 그리고 p53 발현을 통해 샘암종의 진행에 영향을 주는 것으로 생각되었다.

본 연구에서 비소섭취량을 직접 실험동물 위에 주입하는 방법이 비소의 투여량을 균등하게 할 수 있다는 점에서 이상적이지만 실험동물 수와 기간에 따라 현실적으로 제한이 있었다. 따라서 발달과정에서의 역할과 투여비소의 적정농도 등은 추가적 실험이 필요하리라 생각된다.

결 론

Urethane으로 유도된 생쥐 폐샘암종 발생과정에서 비소(저농도 1 mg/l : 고농도 5 mg/l)의 영향에 대해 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Urethane에 의한 폐암종의 발생과정에서 전암성 병변과 샘암종은 저농도 비소 투여에서 증가하는 경향을 보여주었으나, 고농도에서는 오히려 감소하는 경향을 보였다.

2. 저농도 비소투여는 샘암종 발생 초기에서 세포의 증식지수를 유의하게 증가시켰으나 apoptosis 지수와는 관련이 없었다.

3. Cyclin D1 단백질 발현은 저농도 비소를 병행 투여한 군에서 urethane 단독 투여군에 비해 증식증과 샘암종에서 통계적으로 유의하게 증가하였다($p < 0.01$). p21 단백질 발현은 urethane 투여군 보다 저농도와 고농도 비소 투여군의 증식증에서 통계적으로 유의하게 감소하였으나($p < 0.05$), 샘종과 샘암종에서는 차이가 없었다. p27 단백질 발현은 비소투여와는 상관관계가 없었다.

이상에서 urethane에 의한 생쥐 폐암종 발생에 대하여, 저농도 비소투여는 초기 단계에서 증식세포지수의 증가, 세포주기 인자 중 cyclin D1과 p21 단백질 발현을 증가시켜 폐암종의 발생을 증가시키는 효과가 있다고 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2005년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임.

문 헌

- 1) Zang, E. A. and Wynder, E. L. : Cumulative tar exposure. A new index for estimating lung cancer risk among cigarette smokers. *Cancer* **70**, 69 (1992).
- 2) Foley, J. F., Anderson, M. W., Stoner, G. D., Gaul, B. W., Hardisty, J. F. and Maronpot, R. R. : Proliferative lesions of the mouse lung: progression studies in strain A mice. *Exp. Lung Res.* **17**, 157 (1991).

- 3) Malkinson, A. M. : Primary lung tumors in mice: an experimentally manipulable model of human adenocarcinoma. *Cancer Res.* **52**, 2670s (1992).
- 4) Re, F. C., Manenti, G., Borrello, M. G., Colombo, M. P., Fisher, J. H., Pierotti, M. A., Della Porta, G. and Dragani, T. A. : Multiple molecular alterations in mouse lung tumors. *Mol. Carcinog* **5**, 155 (1992).
- 5) Hartwell, L. H. and Kastan, M. B. : Cell cycle control and cancer. *Science* **266**, 1821 (1994).
- 6) Robbins, B. A., de la Vega, D., Ogata, K., Tan, E. M. and Nakamura, R. M. : Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **111**, 841 (1987).
- 7) Gavrieli, Y., Sherman, Y. and Ben-Sasson, S. A. : Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* **119**, 493 (1992).
- 8) Lu, X., Toki, T., Konishi, I., Nikaido, T. and Fujii, S. : Expression of p21WAF1/CIP1 in adenocarcinoma of the uterine cervix : a possible immunohistochemical marker of a favorable prognosis. *Cancer* **82**, 2409 (1998).
- 9) Muller, H., Lukas, J., Schneider, A., Warthoe, P., Bartek, J., Eilers, M. and Strauss, M. : Cyclin D1 expression is regulated by the retinoblastoma protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2945 (1994).
- 10) Ponce-Castaneda, M. V., Lee, M. H., Latres, E., Polyak, K., Lacombe, L., Montgomery, K., Mathew, S., Krauter, K., Sheinfeld, J., Massague, J. and *et al.* : p27^{Kip1} : chromosomal mapping to 12p12-12p13.1 and absence of mutations in human tumors. *Cancer Res.* **55**, 1211 (1995).
- 11) Gartel, A. L., Serfas, M. S. and Tyner, A. L. : p21--negative regulator of the cell cycle. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **213**, 138 (1996).
- 12) ATSDR fact sheets on hazardous substances. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. *Public. Health Rep.* **116**, 271 (2001).
- 13) Abernathy, C. O., Liu, Y. P., Longfellow, D., Aposhian, H. V., Beck, B., Fowler, B., Goyer, R., Menzer, R., Rossman, T., Thompson, C. and Waalkes, M. : Arsenic: health effects, mechanisms of actions, and research issues. *Environ. Health Perspect.* **107**, 593 (1999).
- 14) Muller, S., Miller, W. H. Jr. and Dejean, A. : Trivalent antimonials induce degradation of the PML-RAR oncoprotein and reorganization of the promyelocytic leukemia nuclear bodies in acute promyelocytic leukemia NB4 cells. *Blood* **92**, 4308 (1998).
- 15) Soignet, S. L., Maslak, P., Wang, Z. G., Jhanwar, S., Calleja, E., Dardashti, L. J., Corso, D., DeBlasio, A., Gabrilove, J., Scheinberg, D. A., Pandolfi, P. P. and Warrell, R. P. Jr. : Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. *N. Engl. J. Med.* **339**, 1341 (1998).
- 16) Chen, Z., Chen, G. Q., Shen, Z. X., Sun, G. L., Tong, J. H., Wang, Z. Y. and Chen, S. J. : Expanding the use of arsenic trioxide: leukemias and beyond. *Semin. Hematol.* **39**, 22 (2002).
- 17) Li, X., Ding, X. and Adrian, T. E. : Arsenic trioxide induces apoptosis in pancreatic cancer cells via changes in cell cycle, caspase activation, and GADD expression. *Pancreas* **27**, 174 (2003).
- 18) Siu, K. P., Chan, J. Y. and Fung, K. P. : Effect of arsenic trioxide on human hepatocellular carcinoma HepG2 cells: inhibition of proliferation and induction of apoptosis. *Life Sci.* **71**, 275 (2002).
- 19) Chung, J. H., Jang, J. J., Lee, M. J. and Ham, E. K. : Altered retinoblastoma protein expression and proliferative activity in urethane induced mouse lung tumorigenesis. *Cancer Res. and Treatment* **34**, 258 (2002).
- 20) Zhao, C. Q., Young, M. R., Diwan, B. A., Coogan, T. P. and Waalkes, M. P. : Association of arsenic-induced malignant transformation with DNA hypomethylation and aberrant gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10907 (1997).
- 21) Vogt, B. L. and Rossman, T. G. : Effects of arsenite on p53, p21 and cyclin D expression in normal human fibroblasts -- a possible mechanism for arsenite's comutagenicity. *Mutat. Res.* **478**, 159 (2001).
- 22) Kelman, Z. : PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* **14**, 629 (1997).
- 23) Shen, Z. Y., Zhang, Y., Chen, J. Y., Chen, M. H., Shen, J., Luo, W. H. and Zeng, Y. : Intratumoral injection of arsenic to enhance antitumor efficacy in human esophageal carcinoma cell xenografts. *Oncol. Rep.* **11**, 155 (2004).
- 24) Oketani, M., Kohara, K., Tuvdendorj, D., Ishitsuka, K., Komorizono, Y., Ishibashi, K. and Arima, T. : Inhibition by arsenic trioxide of human hepatoma cell growth. *Cancer Lett.* **183**, 147 (2002).
- 25) Cox, L. S. : Multiple pathways control cell growth and transformation: overlapping and independent activities of p53 and p21Cip1/WAF1/Sdi1. *J. Pathol.* **183**, 134 (1997).
- 26) Lew, Y. S., Brown, S. L., Griffin, R. J., Song, C. W. and Kim, J. H. : Arsenic trioxide causes selective necrosis in solid murine tumors by vascular shutdown. *Cancer Res.* **59**, 6033 (1999).
- 27) Li, D., Du, C., Lin, Y. and Wu, M. : Inhibition of growth of human nasopharyngeal cancer xenografts in SCID mice by arsenic trioxide. *Tumori.* **88**, 522 (2002).
- 28) Sordet, O., Liao, Z., Liu, H., Antony, S., Stevens, E. V., Kohlhagen, G., Fu, H. and Pommier, Y. : Topoisomerase I-DNA complexes contribute to arsenic trioxide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **279**, 33968 (2004).

- 29) Zhang, T., Wang, S. S., Hong, L., Wang, X. L. and Qi, Q. H. : Arsenic trioxide induces apoptosis of rat hepatocellular carcinoma cells *in vivo*. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **22**, 61 (2003).
- 30) Maeda, H., Hori, S., Nishitoh, H., Ichijo, H., Ogawa, O., Kakehi, Y. and Kakizuka, A. : Tumor growth inhibition by arsenic trioxide (As_2O_3) in the orthotopic metastasis model of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res.* **61**, 5432 (2001).
- 31) Hinds, P. W., Dowdy, S. F., Eaton, E. N., Arnold, A. and Weinberg, R. A. : Function of a human cyclin gene as an oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 709 (1994).
- 32) Schauer, I. E., Siriwardana, S., Langan, T. A. and Sclafani, R. A. : Cyclin D1 overexpression vs. retinoblastoma inactivation: implications for growth control evasion in non-small cell and small cell lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7827 (1994).
- 33) Park, M. J., Park, I. C., Bae, I. J., Seo, K. M., Lee, S. H., Hong, S. I., Eun, C. K., Zhang, W. and Rhee, C. H. : Tetraarsenic oxide, a novel orally administrable angiogenesis inhibitor. *Int. J. Oncol.* **22**, 1271 (2003).
- 34) Liu, Z. M. and Huang, H. S. : As(2)O(3)-induced c-Src/EGFR/ERK signaling is via Sp1 binding sites to stimulate p21(WAF1/CIP1) expression in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Cell Signal.* **18**, 244 (2006).
- 35) Cui, X., Li, S., Shraim, A., Kobayashi, Y., Hayakawa, T., Kanno, S., Yamamoto, M. and Hirano, S. : Subchronic exposure to arsenic through drinking water alters expression of cancer-related genes in rat liver. *Toxicol. Pathol.* **32**, 64 (2004).
- 36) Park, W. H., Seol, J. G., Kim, E. S., Hyun, J. M., Jung, C. W., Lee, C. C., Kim, B. K. and Lee, Y. Y. : Arsenic trioxide-mediated growth inhibition in MC/CAR myeloma cells via cell cycle arrest in association with induction of cyclin-dependent kinase inhibitor, p21, and apoptosis. *Cancer Res.* **60**, 3065 (2000).