

인체상피세포를 이용한 Vinyl acetate의 발암성 및 작용기전

조준현 · 김진수

경북대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2007;33:437-444)**HIGH DOSE EXPOSURES OF VINYL ACETATE INDUCE NEOPLASTIC TRANSFORMATION OF HUMAN EPITHELIAL CELLS IN CULTURE**

Jun-Hyun Cho, Chin-Soo Kim

Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Kyungpook National University

Vinyl acetate has been widely used for the manufacture of polyvinyl alcohol emulsion, which is primary ingredient of adhesive, paints, textile, paperboard coatings, etc. Since these products are plentiful and frequently used around us, workers and consumers are at health risk. International Agency for Research on Cancer (IARC) classified vinyl acetate as group 2B (possibly carcinogenic to humans). Among the organs targeted, the oral cavity is the most vulnerable organ affected by the carcinogenic effects of vinyl acetate. Since the origin of most of oral cancer is derived from the epithelial cells, it is important to understand the carcinogenic potential of vinyl acetate in human epithelial cells. Thus, the present study has attempted to utilize the immortalized human epithelial cell model to assess the carcinogenic potency of this chemical and to understand the underlying mechanisms.

Key words: Vinyl acetate, Neoplastic transformation, Human epithelial cell

I. 서 론

Vinyl acetate($\text{CH}_3\text{COOCH}=\text{CH}_2$)는 무색의 액체로, 이 물질의 중합체인 아세트산 비닐 수지는 접착제, 페인트, 의복, 종이코팅제 등 다양한 분야에 사용되는 유용한 산업 제품의 원료이며¹⁾, 연간 생산량은 일본의 경우 약 60만 톤에 이른다²⁾. 또한 vinyl acetate는 접촉 부위에 지속적으로 축적되는 경향이 있어, 이를 생산하는 노동자와 이물질이 포함된 제품을 사용하는 소비자들에 대한 건강 위해성이 꾸준히 제시되어 왔다. 특히 역학 조사 결과 이 물질을 합성하는 공장노동자의 경우 호흡기계암 발생률이 높은 것으로 나타났으며, 동물 실험에서도 다양한 부위에 종양을 유발하는 것으로 알려져 있다^{3,4)}.

구강은 비강, 인두, 후두 등의 상기도 부위와 함께 vinyl acetate에 가장 빈번하게 접촉되는 표적장기로 알려져 있어, vinyl acetate가 함유된 음용수를 이용한 동물 실험이 다양하게 이루어지고 있다. Vinyl acetate를 포함하는 음용수를 2년간 쥐(mice or rats)에 투여하여 연구한 동물 실험에서 구강암, 설암, 비강암

등이 증가하는 것으로 보고되었다^{5,7)}. 그러나 이러한 암 발생은 E. coli 등을 사용한 Ames test에서는 음성인⁸⁾ 반면 인체 입과선 세포에서는 sister chromatid exchange를 나타내었다⁹⁾. 따라서 발암성의 입증에 위하여 보다 다양한 인체세포 모델을 통한 발암성 평가가 요구되고 있다.

Vinyl acetate는 구강 상피세포에서 대사되어 acetaldehyde와 acetic acid로 분해되고 acetic acid는 세포 내에 축적되어 세포 내의 pH를 낮추며, 이때 생성된 수소이온(H^+)은 세포 사멸을 촉진하고, 결국 세포 사멸에 따른 보상 기전으로 상피세포 증식이 촉진되는 것으로 알려져 있다^{10,11)}. 이러한 상피세포의 증식 촉진은 vinyl acetate의 중요한 발암 기전으로 알려져 있으며, 대사산물인 acetaldehyde에 의해 생성된 formic acid 또한 세포 독성 및 유전자 독성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다¹²⁾.

이와 같이 vinyl acetate의 중요 발암 기전이 세포 증식 임에도 불구하고 인체 상피세포 증식에 관여하는 인자 및 세포 간의 신호 전달 기작의 연구는 지금까지 잘 알려져 있지 않다. 또한 발암물질이 작용하는 표적 세포가 동일한 상피세포 기원일지라도 동물의 종이나 발생부위에 따라 발암물질의 대사나 약동학적 작용이 서로 다를 수 있으므로, 인체 상피세포에 대한 vinyl acetate의 발암성 평가가 필요할 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에서는 Ad12-SV40 hybrid virus로 불멸화시킨 인체 상피세포 모델을 이용하여, 일상생활 중에 노출 빈도가 높은 vinyl acetate에 대한 발암 관련성을 평가하고, 이와 관련된 작용기전을 규명하고자 하였다.

김진수700-421 대구광역시 중구 삼덕동 2가
경북대학교 치과대학 구강악안면외과**Chin-Soo Kim**Dept. of OMF, School of Dentistry, Kyungpook National University,
2ga, Samduck-dong, Jung-gu, Daegu, 700-421, Korea
Tel: 82-53-420-5911 Fax: 82-53-420-5365
E-mail: kimcs@knu.ac.kr

II. 연구 재료 및 방법

1. 사용 시약 및 재료

Vinyl acetate는 Aldrich Chemical 사, 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate(TPA), agarose, 및 기타 시약들은 Sigma사 제품을 사용하였다. DMEM등 세포배양 관련 시약은 Gibco BRL사, western blot에 사용한 시약은 Bio Rad사, PKC isozyme antibody는 Transduction Laboratory사에서 구입하여 사용하였다.

2. 인체 상피 세포배양

실험에 사용된 세포는 37°C의 5% CO₂ incubator에서 배양하였고, 배양액은 DMEM에 EGF, FBS 10%, hydrocortisone (5ug/ml), antibiotics 등을 넣어 사용하였으며, 세포가 confluence를 이루는 시점에서 1:3으로 subculture하였다. 본 연구에는 Ad12-SV40에 의한 인체불멸화 상피세포 (RHEK-1)의 passage-65를 사용하였다.

3. Vinyl acetate 처리

Vinyl acetate는 PBS에 녹인 후 배양액에 농도 별로 투여하였다. 50% confluence를 보이는 인체상피세포에 vinyl acetate (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0, 10 mM)를 함유하는 배양액을 14일간 처리한 후 100% confluence를 이루는 시점에서 1:3의 비율로 subculture하였다.

4. Cell density 측정

세포의 contact inhibition의 변화를 측정하기 위해 5 × 10³ cells/cm²를 용기에 넣고 배양하였다. 배양액은 3일마다 새롭게 갈아주고 세포가 confluence한 상태에 도달하였을 때 단위 면적당 세포 수를 계산하였다¹³⁾.

5. Soft agar colony formation

Noble agar 1.2g에 dH₂O 35ml를 넣고 30분간 고압 멸균한 다음 15ml의 dH₂O와 FBS 25ml, 2X EMEM 50ml를 넣어 0.9% agar base를 만들었다. 5ml의 agar base를 petri dish에 넣은 다음 밤새 37°C incubator에 두었다. 0.9g Noble agar에 dH₂O 50ml를 넣어 30분간 고압 멸균한 다음, dH₂O 7.2ml, FBS 7.2ml 2X EMEM 14.4ml를 넣어 0.36% top agar를 만든 후, 준비된 base agar에 1 × 10⁴ cells/dish를 포함하는 top agar용액을 2ml씩 petri dish에 넣었다. 그 후 크기가 0.3mm이상인 colony수를 측정하여 처음 넣은 세포 수에 대한 백분율로 표시하였다¹³⁾.

6. Cell aggregation 측정

Soft agar assay와 같은 방법으로 Base agar를 만들어 5ml씩 Petri dish에 넣었다. 밤새 37°C incubator에 둔 다음, 10% FBS를 포함한 배양액에 10⁴ cells/dish로 세포를 접종한 후 4일이 지난 시점에서 배양액상에 성장하는 1mm보다 큰 colony의 크기 및 숫자를 측정하였다¹³⁾.

7. LDH assay

Vinyl acetate의 세포독성을 측정하기 위하여, lactate dehydrogenase(LDH)가 배양액으로 유리되는 양을 세포독성의 표식자로 이용하는 LDH assay를 실시하였다. 6-well 배양 용기에 농도가 서로 다른 vinyl acetate를 24시간 처리하여 배양액을 취한 후, 전체 활성 및 세포 배양액의 활성은 Promega사의 Kit를 이용하여 측정하였다. 용기에 남아있는 세포의 총 LDH활성은 0.5% Triton x-100을 이용하여 세포를 녹인 후 측정하였다. LDH값은 전체 LDH 활성 중 배양액에 유리된 LDH 활성을 퍼센트로 나타내었다.

8. RT-PCR

Total RNA를 추출한 다음, 1μg의 total RNA에 oligo d(T) primer를 넣고 60°C에서 5분간 두어 poly A+를 얻었다. 30μl RT mix(0.1M DTT, RNA guard, RT-buffer, dNTP, dH₂O, RT)를 각 sample에 넣은 다음, 37°C에서 60분, 70°C에서 10분 둔 다음 얼음위에 놓았다. cDNA과정이 끝나면 2.5 μl of cDNA에 47.5 μl of PCR mix[PCR-buffer, dH₂O, Taq.pol, 5' -primer, 3' -primer, dNTP-mix(³²P - labelled)]를 넣은 다음 primer에 따라 annealing temperature 및 cycle #를 최적 수준으로 정하였다. 10% PAGE에 전기영동하고 gel dryer로 말린 후, X-ray cassette에 넣어 영하 75°C 보관 후 현상하였다¹⁴⁾.

9. Western blot

PKC isoform의 단백질 수준을 측정하기 위해 원심분리기로 membrane fraction과 cytosolic fraction으로 분리한 다음, PKC isoform 각각의 항체를 사용하였다.

Cell lysate(20μg)를 전기영동한 다음 Nitrocellulose paper를 Bio Rad사의 semi-dry cell에 넣고 15V로 30분 동안 blotting하였다. Blot이 끝난 paper에 PKC isoform 항체를 적정비율로 희석한 용액으로 반응시키고, 2차 항체를 처리한 후 Pierce사의 Superfluoro system으로 측정하였다.

10. 성적 검증

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

III. 결 과

1. Vinyl acetate 의 인체 상피세포 발암화 용량 반응

서로 다른 용량의 vinyl acetate를 인체 상피세포에 14일간 투여한 후 saturation density, soft agar colony formation, 및 cell aggregation assay를 실시하였다.

Saturation density의 경우 대조군(2.1±0.08)에 비해 10µM군(2.5±0.10), 100µM군(2.8±0.04), 200µM군(3.8±0.08)에서는 용량에 따른 증가를 보였으며, 800µM군과 1000µM군에서는 각각 1.8배 및 1.6배로 나타나 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다.

Soft agar colony formation 의 경우 용량의존적인 반응을 나타내지 않았으며, 1000µM군에서 1.6배의 증가를 보였으나 통계적으로 유의한 수준은 아니었다.

Cell aggregation 의 경우, 전체 용량 범위 내에서 유의할 만한 colony 형성 변화를 관찰할 수 없었다. 발암화 관찰을 위해 적용된 용량은 µM수준에서 mM수준까지 매우 높은 농도였으며, contact inhibition의 지표인 saturation density에서만 고용량(800

µM 및 1000µM)군에서 유의한 변화를 보였다(Table 1).

14일간 인체 상피세포에 서로 다른 용량의 vinyl acetate를 처리한 후, 세포의 passage에 따라 나타나는 foci의 발현 정도를 측정하였다. Foci는 손상된 세포군이 동종세포 확장(Clonal expansion)을 통해 군집을 이루는 세포군으로, 발암성이 높을수록 낮은 passage에서 나타난다. Saturation density 측정 시 통계학적으로 유의한 반응을 나타낸 800µM군과 1000µM군에서 foci 출현이 관찰되었다. 특히 800µM군의 경우 passage-7에서 foci가 나타나기 시작하여 passage-8에서는 foci가 더욱 증가하였으며, 최고 용량인 1000µM군보다 일찍 foci의 발현이 관찰되어 saturation density에서 나타난 발암화 패턴과 일치하였다(Table 2).

2. Vinyl acetate와 TPA의 상호작용

Vinyl acetate의 발암성에 발암촉진제(promoter)로 잘 알려진 TPA가 미치는 영향을 관찰하였다. Saturation density를 측정할 결과 TPA를 단독으로 투여할 때 보다 vinyl acetate를 동시투여할 경우 값이 더욱 증가하였으며 이러한 증가는 용량의존적이었다(Table 2, 3). TPA 100ng/ml와 vinyl acetate 400µM, 800µM

Table 1. Carcinogenic potentials of human epithelial cells after 14 day-treatment of vinyl acetate

Dose (uM)	Saturation density(× 10 ⁶ /cm ²)	Soft agar colony formation(%)	Cell aggregation(> 1 mm)*
Control	2.1 ± 0.08	0.08 ± 0.02	-
10	2.5 ± 0.10	0.11 ± 0.04	-
100	2.8 ± 0.04	0.08 ± 0.08	-
200	3.8 ± 0.08	0.17 ± 0.04	-
00	3.4 ± 0.11	0.11 ± 0.05	-
800	3.8 ± 0.09*	0.14 ± 0.09	-

* ; P < 0.05 as compared to control cells

± ; + : > 5 colony, ++ : > 10 colony

The data are mean ± SD with 3 different counts.

Table 2. Morphological alteration of human epithelial cells treated with vinyl acetate by passage levels*

Passage	Cumulative no. of days in culture after transfection	Dose(uM)						
		Control	10	100	200	400	800	1000
1	14
4	39
5	46
6	53
7	59	+	.
8	65	++	+

± ; + : moderate, ++ : severe

및 1000 μ M을 동시 투여 시에는 아무것도 투여하지 않은 대조군에 비해 1.8배, 2.1배, 2.3배로 나타나 모두 통계적으로 유의한 증가를 보였다(Table 3).

Soft-agar formation의 경우 TPA 단독 투여 시 값의 증가가 나타나지 않았으나 Vinyl acetate 400 μ M이상의 농도를 동시 투여 시 증가 추세를 나타내었다(Table 2, 3). Vinyl acetate 400 μ M, 800 μ M 및 1000 μ M 동시 투여 군에서 대조군에 비해 2.1배, 2.6배, 2.3배로 나타나 모두 통계적으로 유의한 증가를 보였다(Table 3).

Vinyl acetate와 TPA의 상호작용을 passage별로 측정하기 위하여, passage에 따른 foci의 출현을 관찰하였다. Foci의 출현농도는 400 μ M군에서부터 시작되었으며 출현 시기는 800 μ M군에서 가장 빨랐다. 800 μ M군의 경우 passage-5(노출 후 46일 경과)에서 foci의 출현이 시작되었으며, passage-8(노출 후 65일 경과)에서는 foci의 출현이 더욱 늘어나 세포형태의 변화를 뚜렷이 관찰할 수 있었다. 또한 1000 μ M군에서도 passage-7부터 foci 출현이 시작되어, passage-8에서는 800 μ M군과 같은 수준의 세포 변형을 나타내었다(Table 4).

3. Vinyl acetate의 세포 독성

Vinyl acetate가 인체 불멸화 세포에 미치는 세포독성을 측정하기 위하여 vinyl acetate 용량별로 lactate dehydrogenase (LDH)가 배양액내로 유리되는 농도를 측정하여 %로 표시하였다.

1 μ M에서 1000 μ M까지 노출시킨 결과 세포독성은 뚜렷하지 않았으나, 800 μ M군 및 1000 μ M군에서는 유의한 수준의 증가를 나타내어, 이들 농도에서는 인체상피세포에 어느 정도 세포독성이 나타나는 것으로 판단되었다(Fig. 1).

4. 성장인자에 미치는 영향

Fibronectin의 mRNA 변화를 RT-PCR로 분석한 결과 고용량인 1000uM군에서 증가를 보였으며, TGF- α 의 mRNA도 최고 용량인 1000uM군에서 증가하는 경향을 보였으나 200 μ M군 및 800 μ M군에서는 증가하지 않았다(Fig. 2, 3).

Table 3. Carcinogenic potentials of human epithelial cells after 14 day-co-treatment of vinyl acetate and TPA(100ng/ml)

Dose (uM)	Saturation density($\times 10^3/cm^2$)	Soft agar colony formation(%)	Cell aggregation(> 1 mm)*
control	2.5 \pm 0.08	0.08 \pm 0.020	-
TPA only	2.8 \pm 0.06	0.11 \pm 0.007	-
10	2.4 \pm 0.12	0.10 \pm 0.014	-
100	2.8 \pm 0.22	0.12 \pm 0.005	-
200	3.4 \pm 0.18	0.18 \pm 0.084	-
400	4.6 \pm 0.09*	0.17 \pm 0.009*	-
800	5.2 \pm 0.36*	0.21 \pm 0.012*	++
1000	5.8 \pm 0.23*	0.18 \pm 0.022*	+

*; P < 0.05 as compared to control cells
 ±; +: > 5 colony, ++: > 10 colony

Table 4. Morphological alteration of human epithelial cells treated with vinyl acetate by passage levels*

Passage	Cumulative no. of days in culture after transfection	Dose(uM)							
		Control	TPA only	10	100	200	400	800	1000
1	14
4	39
5	46	+	.
6	53	+	.
7	59	+	+
8	65	+	++	++

±; +: moderate, ++: severe

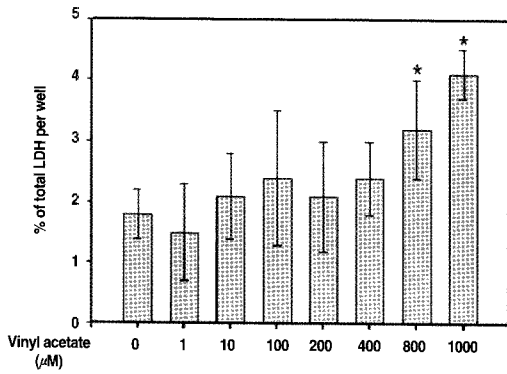


Fig. 1. % of total LDH released following vinyl acetate exposure for 48hrs. Values are means of three separate experiments.

5. PKC isozyme에 미치는 영향

PKC- α 및 PKC- ϵ 을 western blot으로 분석한 결과 PKC- α 의 경우 cytosol fraction에서는 변화가 없었으나, membrane fraction에서는 1000 μ M 노출에서 PKC 단백질의 증가가 나타났다. 이는 PKC 단백질이 cytosol에서 membrane 쪽으로 이동하여 DAG 등과 결합하는 활성형으로 전환되었음을 의미한다. PKC- ϵ 의 경우 cytosol fraction 및 membrane fraction 모두에서 vinyl acetate 노출에 의한 PKC 단백질의 변화가 관찰 되지 않았다 (Fig. 4, 5).

IV. 고 찰

Vinyl acetate는 일상생활용품의 제조와 밀접한 관계가 있고, 우리 주변에서도 널리 사용되고 있어서 인체 접촉 가능성이 높은 물질이다¹⁾. 특히 이 물질은 흡입이나 섭취 등을 통하여 우

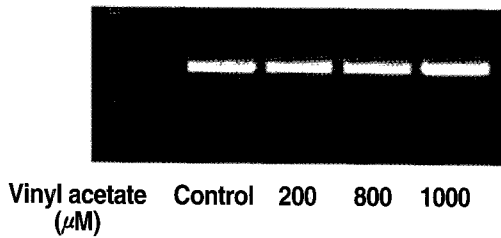


Fig. 2. RT-PCR analysis of fibronectin in human epithelial cells following vinyl acetate exposure for 24hrs.

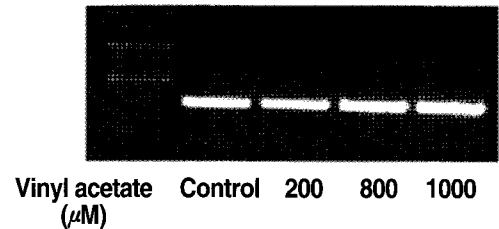


Fig. 3. RT-PCR analysis of TGF- α in human epithelial cells following vinyl acetate exposure for 24hrs.

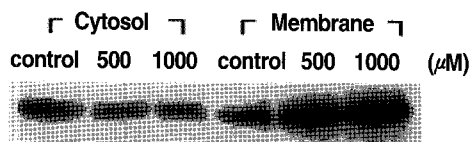


Fig. 4. Western blot analysis of PKC- α following vinyl acetate exposure for 30min.

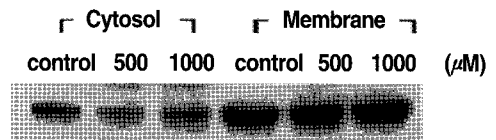


Fig. 5. Western blot analysis of PKC- ϵ following vinyl acetate exposure for 30min.

리 몸에 노출되기 때문에, 구강을 포함한 상부 소화기관과 상기도 부위가 민감한 표적으로 알려져 왔다¹⁵⁾. 최근 연구에 의하면 구강, 식도, 비강 등의 상기도 관련 부위 중에서도 음용수에 의한 vinyl acetate의 접촉이 최초로 일어나는 구강부위가 발암성이 가장 높은 것으로 나타났다⁷⁾. Vinyl acetate에 의해 영향을 받은 구강조직은 기저세포 증식, 편평상피세포 증식, 상피세포 이행성 등의 전암병소 단계를 거쳐 편평상피세포암이 발생하는 것으로 알려져 있다⁷⁾.

국제 암 기구(IARC)는 vinyl acetate를 Group 2B 발암물질로 분류하는데, 그 근거로 다음의 3가지를 제시하고 있다¹⁾. 첫째, vinyl acetate에 의해 발생하는 암에 대한 인체 역학조사 결과의 부족, 둘째, 흡입을 통한 비강 암의 증가 자료 이외의 다른 암에 대한 자료의 부족, 셋째, vinyl acetate의 대사물질인 acetaldehyde가 동물실험에서 암을 일으키는 물질이라는 점 등이다. 이들 세 가지를 고려하여 국제 암 기구(IARC)는 1995년 vinyl acetate를 인체발암가능물질(possibly carcinogenic to human)로 분류하였다. 그 이후 동물 실험 연구들은 구강이 vinyl acetate의 가장 뚜렷한 표적장기임을 보고하고 있어 vinyl acetate에 의한 발암성의 관심은 구강암으로 옮겨가는 추세이다.

Vinyl acetate는 point mutation을 측정하는 Ames test에서 음성을 나타내지만, 대사물질인 acetaldehyde는 DNA와 단백질을 연결하는 요소로 알려져 있어, acetaldehyde가 DNA의 형태를 변화시킴으로써 암을 일으키는 것으로 알려져 있다¹⁶⁾.

Vinyl acetate가 carboxylesterase에 의해 분해 되는 과정에서 생성되는 acetaldehyde, acetate, proton 등이 vinyl acetate에 의한 발암 기전에 중요한 역할을 한다. vinyl acetate는 가수분해를 통해 acetate와 vinyl alcohol로 분해 되고, vinyl alcohol은 carboxylesterase에 의해 acetaldehyde가 되며, 이는 NAD+의존적인 산화과정을 통해 proton을 생산 한다¹²⁾. 특히 vinyl acetate의 대사에 관여하는 carboxylesterase는 구강 상피세포에 존재하며, 이 효소를 발현하는 조직의 특성에 따라 acetaldehyde 등의 발암물질이 생산되므로, 조직 특성에 따른 carboxylesterase의 분석이 요구된다^{17,18)}.

Acetaldehyde의 생성은 세포의 독성과도 밀접한 관계를 가지고 있다. 대사과정에서 생성된 proton의 증가는 pH를 저하시키고, pH의 저하는 세포증식인자(mitogen)로 작용하여 손상된 세포의 증식을 촉진하는 것으로 알려져 있다¹⁹⁾. 따라서 pH값 저하에 따른 proton 증가가 암을 촉진하는 역할을 하는 것으로 추정된다. 이러한 pH값의 저하는 용량 의존적이어서 특정 농도 이상에서 발암 반응을 나타내는 역치를 가지고 있을 것으로 예상된다. Vinyl acetate는 인체 발암의 개연성을 암시하는 Group 2B로 분류되지만, 지금까지 인체상피세포 모델을 이용한 발암성 분석은 보고 된 바가 없었기에 본 연구에는 Ad12-SV40 hybrid virus로 불멸화시킨 인체 상피세포 모델을 이용하여 실험하였다. 이 불멸화 상피세포는 nude mice에 주사 시 발암성을 나타내지는 않으나, 지속적으로 배양이 가능해 발암성이 의심되는 물질을 평가하는데 효율적인 세포체계이다²⁰⁾.

본 연구결과 vinyl acetate의 발암성은 용량 의존적인 경향을

나타내었으며, vinyl acetate 단독 노출의 경우, 고용량인 800 μ M 군 및 1000 μ M군에서 contact inhibition을 평가하는 saturation density가 증가 하였다. 그러나 anchorage independence 및 cellular adhesion을 평가하는 soft agar colony formation이나 cell aggregation은 변화를 보이지 않았다. 따라서 vinyl acetate는 3대 세포 발암화 지표 중 한가지에서만 반응을 나타내어 인체 세포에서의 발암성이 낮을 것으로 추정된다. 또한 본 연구에 사용된 노출 농도는 micro molar 수준으로 일상적으로 노출되는 용량 보다 매우 높다. 따라서 vinyl acetate는 다른 화학 발암물질보다 역가 (potency)가 낮을 것으로 생각된다.

Vinyl acetate의 인체세포 발암성의 정성적인 판단과 더불어 정량적인 판단을 하기 위해 vinyl acetate의 용량에 따른 세포의 passage별 foci의 출현 시기를 관찰하였다. Foci도 saturation density에서와 마찬가지로 800 μ M이상의 고농도에서 나타났으며, foci 출현 시기는 800 μ M군에서는 passage-7이었고, 1000 μ M군에서는 passage-8이었다. 특히, 800 μ M군보다 최고농도인 1000 μ M군에서 foci의 출현시기가 오히려 늦어진 것은 고용량의 vinyl acetate에서 세포 독성이 존재할 가능성을 제시하고 있다.

Vinyl acetate의 발암 기전은 다단계 과정을 거치는 것으로 알려져 있으며⁴⁾, 발암물질에 의해 세포가 손상된 후, 발암 촉진 물질에 의해 손상된 세포가 지속적으로 자극을 받음으로써 암이 발생하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 가장 잘 알려진 발암 촉진 물질인 TPA를 동시에 투여함으로써, TPA에 의한 vinyl acetate의 발암화 증진여부를 판단하고자 하였다. 그 결과 vinyl acetate를 단독으로 투여한 경우 보다 vinyl acetate와 TPA를 동시에 투여한 경우에 모든 발암화 지표가 용량의 존적인 증가를 보였다. 또한 발암화 지표의 변화가 나타나는 vinyl acetate의 노출 용량도 더욱 낮아져, TPA가 vinyl acetate의 발암 역가를 상승시킨 것으로 나타났다. TPA는 발암을 촉진하는 작용을 하므로, 먼저 vinyl acetate에 의한 세포의 손상(initiation)이 이루어지고, 그 후 vinyl acetate에 의해 손상된 세포에 TPA가 발암 촉진 작용을 함으로써 발암 지표의 증가가 나타난 것으로 추정할 수 있다.

Vinyl acetate의 용량에 따른 passage별 foci의 출현시기 측정에서도, vinyl acetate를 단독 투여했을 때 보다 vinyl acetate와 TPA를 동시에 투여했을 때 foci의 출현 시기가 훨씬 빨라진 결과를 보여, TPA에 의한 발암촉진작용이 이 세포 체계에서 존재함을 알 수 있다.

따라서 vinyl acetate는 인체세포 발암 역가는 낮은 편이지만, 세포손상을 일으키는 발암 촉발(initiation)에 민감하게 작용하는 것으로 짐작할 수 있으며, vinyl acetate에 의해 손상된 세포의 증식에 TPA가 관여하여 발암을 촉진(promotion)하는 다단계 발암작용기전을 가지고 있을 것으로 추정된다.

세포독성 또한 세포의 발암화 과정에 매우 중요한 역할을 한다. 손상된 조직을 치유하는 과정에서 나타나는 보상기전인 세포증식과 그에 따른 DNA복제 과정 등은 발암 과정에서 핵심적인 부분으로 알려져 있다. 그 예로 chloroform에 의해 간 조직이 손상된 후 이를 보상하기 위해 일어나는 세포 증식은 간

암을 일으키는 발암기전이 된다²⁰. 즉 세포독성에 의한 세포증식은 세포분열과 DNA복제를 비정상적으로 증가시킴으로써 발암의 위험을 증가시킨다. 본 연구에서는 vinyl acetate의 농도가 800 μ M인 군과 1000 μ M인 군에서 세포독성을 보였으며, 이러한 세포독성은 인체세포 발암화 지표의 변화와도 일치함을 나타내었다. 따라서 본 연구에서 나타난 세포 발암화에는 세포독성에 의한 세포증식 관련 발암기전이 관여하고 있을 것으로 추정된다.

또, 조직의 세포증식에 대한 보상 현상인 세포사멸(apoptosis)은 세포증식과 균형을 이루어 정상적인 조직의 활동을 보장하는 기능이다. 그러나 발암성이 있는 손상된 세포에서 이러한 세포사멸이 일어나지 않을 경우, 손상된 세포가 정상적인 세포보다 상대적으로 증식에 유리한 위치에 있게 된다. 따라서 세포사멸의 변화는 암조직의 지속적인 성장에 중요한 역할을 한다. 본 연구에서 세포사멸 현상을 관찰해본 결과 1000 μ M군에서도 세포사멸 현상은 나타나지 않았다(data not shown). 본 연구에 사용된 세포가 세포사멸의 작용에 민감하지 않은 불멸화 세포인 점은 본 연구의 제한점으로 생각된다. 세포사멸 기전의 중요성 등을 감안 할 때 일차적인 상피세포를 대상으로 새로운 연구가 필요하리라 생각된다.

Vinyl acetate의 발암기전에는 사이토카인, 신호전달 관련 인자, 성장인자 등이 관여하는 것으로 알려져 있다¹⁹. 이 중 중앙 발생 관련 신호전달인자인 protein kinase C(PKC)는 인산화 과정을 통한 세포 증식에 중요한 역할을 한다. PKC는 특정단백질의 serine기와 threonine기를 인산화 시키는 역할을 하며, 세포의 성장 및 분화와 관련된 필수적인 기능을 조절 한다²⁰. PKC는 11개의 subspecies로 구성되어 있고, 활성의 특성에 따라 크게 3가지로 분류하는 데 classic PKC, new PKC 및 atypical PKC 등이다. Classic PKC는 α , β I, β II, γ isoform으로 Ca²⁺과 diacylglycerol (DAG)에 의존적이며, new PKC는 δ , ϵ , η , θ isoform으로 DAG에는 의존적이나 Ca²⁺에는 비의존적이다. 또한 Atypical PKC는 λ , μ , ζ isoform으로 Ca²⁺, DAG 모두에 비의존적이다. 그리고 이들 PKC isozyme들의 세포내 분포 및 기능이 세포 종류에 따라 서로 다르므로 PKC isozyme의 특이반응을 분석하면 발암화에 대한 PKC의 역할을 입증할 수 있다. 구강암의 경우 암의 종류에 따라 특정한 PKC isozyme 활성이 증가하거나 감소하는 것으로 알려져 있는데, 예를 들면 salivary adenoid cystic carcinoma(SACC)에서는 PKC- α , PKC- β II 등의 활성이 감소하고²², squamous cell carcinoma(SCC)의 경우에는 PKC- α , PKC- β , PKC- γ 등의 활성이 증가한 것으로 보고 된 바 있다²³.

본 연구결과 vinyl acetate의 농도가 1000 μ M인 실험 군에서 PKC- α 가 cytosol에서 cell membrane으로 이동한 것으로 관찰되어 세포내 PKC- α 의 작용이 영향을 받은 것으로 나타났으나, PKC- ϵ 은 cell membrane으로 이동하지 않은 것으로 관찰되었다. 따라서 이러한 PKC isozyme의 특이적인 반응이 세포 발암화에 관여할 것으로 추정된다. 그러나 PKC isozyme의 기능과 분포는 세포 종류나 실험 조건에 따라 매우 다양하므로, PKC isozyme의 역할 규명을 위해 다양한 조건과 실험체계에서 추가

적인 연구가 필요 할 것으로 생각된다.

Fibronectin은 암세포의 응집력, 이동 및 분포에 중요한 역할을 하는 세포외 기질로 알려져 있다²⁴. 본 연구에서는 1000 μ M 군에서 fibronectin이 증가 하는 것으로 나타났다. 이러한 fibronectin의 증가는 고용량인 경우에 vinyl acetate가 saturation density, soft agar colony formation, cell aggregation 등과 같은 여러 발암지표에 영향을 주고 있음을 뒷받침해 주는 자료로 생각된다. 그러나 fibronectin이 vinyl acetate의 발암성 지표로 활용되기 위해서는 보다 낮은 농도에서 다양한 발암물질을 동시에 투여하여 그 변화를 검증해 볼 필요가 있을 것이다.

TGF- α 는 상피세포 증식에 관여하며, 상피세포 발암화에도 밀접한 관계를 가지고 있다²⁵. 특히 vinyl acetate의 주요 발암화 기전이 세포 증식임을 고려 할 때²⁶ TGF- α 는 다른 성장인자보다 중요한 역할을 할 것으로 사료된다. 본 연구결과 고용량인 800 μ M군 및 1000 μ M군에서 TGF- α 가 증가하였다. 이 결과는 vinyl acetate 농도가 800 μ M 이상인 고용량에서 세포독성에 대한 보상기전으로 세포증식이 이루어지며, 이 과정에 TGF- α 가 관여한다는 것을 나타낸다. 이는 고용량의 vinyl acetate에 의한 발암화에 세포증식기전이 관여함을 추정 할 수 있는 증거로 생각된다.

본 연구에서는 상대적으로 높은 농도인 800 μ M군과 1000 μ M군에서, vinyl acetate의 인체세포 발암성이 관찰되었다. 이를 고려할 때, vinyl acetate는 알려진 다른 화학적 발암물질에 비해 발암성 역가는 매우 낮은 것으로 판단된다. 또한 vinyl acetate의 발암성이 micro molar 또는 milli molar 수준인 점은 우리 생활주변에서 노출 될 수 있는 수준이 이보다 훨씬 낮다는 점에서 vinyl acetate가 원료인 일상용품의 사용에 따른 발암위험성은 매우 낮을 것으로 사료된다. 하지만 vinyl acetate와 관련된 물질이 우리 주변에 널리 퍼져있고 이들에 인체가 지속적으로 노출되므로 vinyl acetate의 세포증식과 관련된 발암 작용기전과 다른 발암물질의 발암촉발기전의 상호작용에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. 본 연구는 vinyl acetate의 발암성 연구에 인체 상피세포 모델을 사용함으로써 vinyl acetate의 발암성을 이해하는데 기여하리라 사료된다.

V. 결 론

Vinyl acetate는 일상생활용품의 제조와 밀접한 관계가 있고, 우리 주변에서도 널리 사용되고 있어서 인체 접촉 가능성이 높은 물질이다. 국제 암 기구는 vinyl acetate를 인체 발암 가능 물질인 Group 2B로 분류하고 있으며, 음용수를 통한 vinyl acetate의 접촉이 최초로 일어나는 구강이 표적장기로 알려져 있다. 구강암의 90% 이상은 구강점막을 구성하는 상피세포가 기원인 편평상피세포암(squamous cell carcinoma)이다.

Vinyl acetate는 인체에서 암을 일으킬 개연성이 있는 물질로 분류되지만, 지금까지 인체상피세포 모델을 이용한 발암성 연구는 보고 된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 불멸화된 인체 상피 세포 모델을 이용하여 vinyl acetate에 대한 발암 잠재력을

평가하고, 이와 관련된 작용기전을 규명함으로써 일상생활 중에 노출이 빈번한 vinyl acetate의 인체 발암관련성을 분석하고자 하였다.

Vinyl acetate의 세포 발암성 평가에서는 milli molar 수준에서 saturation density의 증가를 보였으며, foci의 출현 시기는 passage-7이었다. TPA와 동시 투여 시 세포 발암화 지표인 saturation density, soft agar colony formation 및 cell aggregation이 모두 증가하였으며, foci의 출현 시기도 passage-5로 앞당겨져 두 물질 간의 상호작용이 존재함을 확인하였다.

발암 세포 증식에 원인을 제공하는 세포독성을 분석하기 위해 LDH assay를 실시한 결과, 800µM군 및 1000µM군에서 세포 독성을 나타내었다. 이 농도는 세포 발암화 지표를 상승시킨 농도와도 일치하므로, vinyl acetate의 세포독성이 발암기전에 관여한 것으로 추정된다. 1000µM군에서 TGF-α 및 fibronectin의 증가가 나타났으며 PKC-α는 활성을 보인 반면 PKC-ε에서는 활성이 나타나지 않았다.

본 연구에서 상대적으로 높은 농도인 800µM군 및 1000µM군에서 vinyl acetate의 발암화 현상이 관찰된 점 등을 고려할 때, 이미 알려진 다른 화학적 발암물질의 발암성과 비교 시 vinyl acetate의 발암성 역가는 매우 낮을 것으로 판단된다. 즉 vinyl acetate 농도 800µM 이상은 우리 생활주변에서 노출 될 수 있는 수준 보다 훨씬 높은 농도이므로, 일상용품의 사용에 따른 발암위험성은 매우 낮을 것으로 사료된다. 하지만 vinyl acetate와 관련된 물질이 우리주변에 널리 퍼져 있고, 이들로부터 인체가 지속적으로 노출되므로, vinyl acetate가 가지고 있는 세포 증식 관련 발암작용기전이 다른 발암물질과 어떤 상호작용을 하며, 발암촉발에 어떻게 기여하는 지 앞으로 많은 연구가 필요할 것으로 판단된다. 본 연구는 vinyl acetate의 발암성 연구에 인체 상피세포 모델을 사용함으로써 vinyl acetate의 인체 발암성을 이해하는데 기여하리라 사료된다.

참고문헌

1. International Agency for Research on Cancer(IARC). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 63, Dry Cleaning, Some Chlorinated Solvents and Other Industrial Chemicals. Lyon: IARC, 443-465, 1995.
2. Chemical Products Handbook-14102. Tokyo: The Chemical Daily Co. 471-472, 2002.
3. Waxweiler RJ, Smith AH, Falk H, Tyroler HA: Excess lung cancer risk in a synthetic chemicals plant. Environ Health Perspect 1981;41:159-165.
4. Bogdanffy MS, Dreef-Van der Meulen HC, Beems RB, Feron VJ, Cascieri TC, Tyler TR, Vinegar MB, Rickard RW: Chronic toxicity and oncogenicity inhalation study with vinyl acetate in the rat and mouse. Fundam Appl Toxicol 1994;23:215-229.
5. Maltoni C, Ciliberti A, Lefemine G, Soffritti M: Results of a long-term experimental study on the carcinogenicity of vinyl acetate monomer in mice. Ann NY Acad Sci 1997;837:209-238.
6. Minardi F, Belpoggi F, Soffritti M, Ciliberti A, Lauriola M, Cattin E, Maltoni C: Results of long-term carcinogenicity bioassay on vinyl acetate monomer in Sprague-Dawley rats. Ann NY Acad Sci 2002;982:106-122.
7. Umeda Y, Matsumoto M, Yamazaki K, Ohnishi M, Arito H, Nagano

- K, Yamamoto S, Matsushima T: Carcinogenicity and chronic toxicity in mice and rats administered vinyl acetate monomer in drinking water. J Occup Health 2004;46:87-99.
8. Brams A, Buchet JP, Crutzen-Fayt MC, Meester C De, Lauwerys R, Leonard A: A comparative study, with 40 chemicals, of the efficiency of the Salmonella assay and the SOS Chromotest (kit procedure). Toxicol Lett 1987;38:123-133.
9. Jantunen K, Maki-Paakkanen J, Norppa H: Induction of chromosome aberrations by styrene and vinyl acetate in cultured human lymphocytes: Dependence on erythrocytes. Mutat Res 1986;159:109-116.
10. Bogdanffy MS, Valentine R: Differentiating between local cytotoxicity, mitogenesis, and genotoxicity in carcinogen risk assessments: the case of vinyl acetate. Toxicol Lett 2003;140:83-98.
11. Nakamoto T, Wagner M, Melvin JE, Bogdanffy MS: Vinyl acetate induces intracellular acidification in mouse oral buccal epithelial cells. Toxicol Lett 2005;158:116-126.
12. Casanova-Schmitz N, David RM, Heck Hd' A: Oxidation of formaldehyde and acetaldehyde by NAD⁺-dependent dehydrogenases in rat nasal mucosal homogenates. Biochem Pharmacol 1984;33:1137-1142.
13. Rhim JS: Neoplastic transformation of human epithelial cells *in vitro*. Anticancer Res 1989;9:1345-1366.
14. Yang JH, Vogel C, Abel J: A malignant transformation of human cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exhibits altered expression of growth regulatory factors. Carcinogenesis 1999;21:13-18.
15. Morris JB, Symanowicz P, Sarangapani R: Regional distribution and kinetics of vinyl acetate hydrolysis in the oral cavity of the rat and mouse. Toxicol Lett 2002;126:31-39.
16. Kuykendall JR, Taylor ML, Bogdanffy MS: Cytotoxicity and DNA-protein crosslink formation in rat nasal tissues exposed to vinyl acetate are carboxylesterase mediated. Toxicol Appl Pharmacol 1993;123:283-292.
17. Bogdanffy MS, Randall HW, Morgan KT: Histochemical localization of aldehyde dehydrogenase in the respiratory tract of the Fischer-344 rat. Toxicol Appl Pharmacol 1986;82:560-567.
18. Bogdanffy MS, Randall HW, Morgan KT: Biochemical quantitation and histochemical localization of carboxylesterase in the nasal passages of the Fischer-344 rat and B6C3F1 mouse. Toxicol Appl Pharmacol 1987;88:183-194.
19. Columbano A, Ledda-Columbano GM, Coni P, Pichiri-Coni M, Curto M, Pani P: Chemically induced cell proliferation and carcinogenesis: differential effect of compensatory cell proliferation and mitogen-induced direct hyperplasia on hepatocarcinogenesis in the rat. In: Butterworth BE, Slaga TJ, Farland W, McClain M (Eds.), Chemically Induced Cell Proliferation: Implications for Risk Assessment. Wiley-Liss, New York, 217-225, 1991.
20. Butterworth BE, Bogdanffy MS: A comprehensive approach to integration of toxicity and cancer risk assessments. Reg Toxicol Pharmacol 1999;29:23-36.
21. Nishizuka Y: Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular response. FASEB J 1995;9:484-496.
22. Sun C, Zong Z, Wang Y, Wang Z Yu B: Expressions of five protein kinase C isoforms in salivary adenoid cystic carcinoma. Hua Xi Kou Qiang yi Xue Za Zhi 2000;18:237-9.
23. Martinez-Gimeno C, Diaz-Meco MT, Dominguez I, Moscat J: Alterations in levels of different protein kinase C isoforms and their influence on behavior of squamous cell carcinoma of the oral cavity: epsilon PKC, a novel prognostic factor for relapse and survival. Head Neck 1995;17:516-25.
24. Dufour, S, Duband JL: The role of fibronectin in embryonic cell migration. Trends Genet 1988;4:198-203.
25. Yang JH, Rhim JS: TCDD; molecular Mechanism of carcinogenesis and its implication of human *in vitro* model. Crit Rev Oncol Hematol 1995;18:111-127.
26. Bogdanffy MS, Plowchalk DR, Sarangapani R, Starr TB, Andersen ME: Mode of action-based dosimeters for interspecies extrapolation of vinyl acetate inhalation risk. Inhal Toxicol 2001;13:377-396.