

흡연특이성 N-NitrosamineO 인체상피세포의 발암화와 성장조절인자에 미치는 영향

김석순 · 김진수

경북대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract

EFFECTS OF CARCINOGENICITY AND GROWTH REGULATORY FACTORS IN HUMAN EPITHELIAL CELLS EXPOSED WITH TOBACCO-SPECIFIC N-NITROSAMINE

Seok-Soon Kim, Chin-Soo Kim

Department of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Kyungpook National University.

Since NNK is one of the most abundant tobacco-specific alkaloids and a strong carcinogenic nitrosamine, it has been used for evaluating a potential of carcinogenicity in the animal models. The present study has attempted to examine the potential of carcinogenicity of NNK in human epithelial cells, from which the cell type the most of cancers including oral cancer and nasal cavity cancer are originated. The cellular model used for the study is a human keratinocyte cell system immortalized by Ad12-SV40 hybrid virus. The cellular system has successfully been used for the carcinogenicity studies because of its limitless life span, epithelial morphology and non-tumorigenicity. When cells were treated with a variety of NNK concentrations, levels of saturation density and soft agar colony formation were increased in a dose-dependent fashion.

Colonies of large cell aggregates were above 5 at the higher doses. The results indicate that exposure of human cells with NNK induced loss of contact inhibition and increases of anchorage independence and cellular adhesion, which are typical characteristics of the neoplastically transformed cells. When cells were exposed with 100uM NNK for 2hr, mRNA levels of IL-1 and PAI-2 were increased in a dose-dependent manner, but expression of TGF-1 was not affected. While expression of growth regulatory factors were altered with a short-term exposure, there was no alteration of these factors in the NNK-transformed cells. However, mRNA levels of fibronectin were increased both in the short-term treatment and in the transformation. The results suggest that altered expression of extracellular matrix such as fibronectin following short-term exposure might be fixed in the genome and these altered properties be continuously transferred throughout the cell division. Western blot analysis showed a translocation of PKC- from cytosolic fraction to the particulate fraction, indicating a possible role of NNK in the signal transduction pathway. The present study provided an evidence that NNK in the smoking may be associated with epithelial origin cancer such as oral and nasal cavity cancers. In addition, this study suggested that altered expression of extracellular matrix and PKC may play an important role in the carcinogenic mechanism of NNK.

Key words : Carcinogenicity, Growth regulatory factors, Tobacco-specific N-nitrosamine

I. 서 론

지금까지 많은 역학조사와 동물실험 등을 통하여 흡연과 발암과의 상관성이 보고되어 왔으며 흡연은 구강암을 비롯하여 폐암, 식도암, 후두암, 췌장암, 방광암, 자궁경부암 등 인체의 여러 장기에서 암을 일으키는 위해요인으로 알려져 왔다¹⁾. 이러한 흡연의 인체 위해성은 흡연 속에 6,000여종의 유해화학물질이 존재

하며 이들 중 40여종이 발암성을 가지고 있기 때문이다^{2,3)}. 하지만 대부분의 흡연 중에 포함된 발암물질은 산업장이나 오염된 대기 중에도 존재하므로 여러 인체 장기의 발암현상이 반드시 흡연에 의해서 일어나는 지에 대해서는 논란의 여지가 많다. 따라서 흡연과 발암과의 특이적인 상관성을 명확히 밝히기 위해 흡연에만 존재하는 발암성 물질에 대한 발암의 기전을 이해하는 일은 흡연에 의한 인체위해성을 정확히 평가하고 이에 따른 예방책을 세우는 데 매우 요구되는 과제이다.

NNK(4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone)는 tobacco alkaloid에서 추출된 흡연 중에 특이적으로 존재하는 강력한 발암물질이며 흡연 중 가장 많은 형태의 nitrosamine이다⁴⁾. 또한 smokeless tobacco에 다량 함유되어 있어서 구강암의 발생과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구는 구강암을 비롯한 대부분 암의 발생 기원이 되는 인체상피세포 모델에 NNK를

김 석 순

706-808 대구광역시 수성구 만촌3동 1039-4번지

킴스치과

Seok-Soon Kim

KIMS Dental Clinic

1039-4 Manchon-3Dong Sooseong-Gu, Taegu, Korea

Tel : 82-53-753-2875 Fax : 82-53-751-2954

C/P : 011-502-2875 E-mail : ssk@ssk.or.kr

노출시켜 인체세포에서의 발암성을 검증하므로써 흡연과 발암과의 특이적인 상관성을 분석하고자 하였다. 본 연구에 사용되는 모델은 Ad12-SV40 hybrid virus에 의해 불멸화된 인체상피세포 모델로서 정상적인 형태를 유지하면서도 지속적인 배양이 가능하고 그 자체의 발암성도 가지고 있지 않아서 여러가지 발암물질의 연구에 사용되고 있다⁵⁾. 인체상피세포를 배양하고 NNK를 노출시킨 후 foci 출현 및 발암세포의 특성인 contact inhibition, anchorage independence, cellular adhesion 등을 cell density, soft agar colony formation, cell aggregation assay로 분석하므로써⁶⁾ NNK의 세포발암잠재력을 평가하고자 하였다. 또한 발암화과정에 나타나는 성장조절인자 및 신호전달기작 관련인자의 변화를 분석하여 NNK에 의한 발암기전을 이해할 수 있는 기초 자료를 제공하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 재료

세포배양에 사용된 DMEM을 비롯한 배양시약은 Gibco-BRL사 제품을, Reverse transcriptase, oligo(d)T 및 Taq polymerase는 Promega사, RNA inhibitor, RNAzol, hybridization sol은 Pharmacia사, PKC monoclonal antibody는 Signal transduction사 제품을 사용하였으며 그밖에 mRNA 분석관련 시약들은 Sigma사의 제품을 사용하였다.

2. 세포배양

일차상피세포로부터 Ad12-SV40에 의해 불멸화된 세포의 passage-25 단계의 세포를 배양하였다. 배양조건은 37°C, 5% CO₂ humidified incubator에서 배양되었으며 세포가 confluency를 이루는 시점을 기준으로 1 : 4로 subculture하였다. 배양액의 구성은 DMEM(Dulbeco's Minimal Essential Medium)에 Fetal bovine serum 10%, hydrocortisone (5ug/ml), penicillin G(50u/ml), streptomycin(50ug/ml)을 첨가하여 사용하였다⁷⁾.

3. Cell aggregation assay

Soft agar assay와 같은 방법으로 base agar를 만들어 5ml씩 petri dish에 넣는다. 밤새 37°C incubator에 둔 다음 10% FBS를 포함하는 배양액에 10⁶cells/dish로 세포를 접종한 후 4일이 지난 시점에서 배양액상에서 성장하는 1mm 이상 크기의 colony 숫자를 측정한다⁸⁾.

4. Soft agar colony formation

Noble agar 1.2g에 dH₂O 35ml을 넣고 30분간 autoclave한 다음 15ml의 dH₂O와 FBS 25ml, 2× EMEM 50ml을 넣어 0.9% agar base를 만든다. 5ml의 agar base를 petri dish에 넣은 다음 밤새 37°C

incubator에 둔다. 0.9g Noble agar에 dH₂O 50ml을 넣어 30분간 autoclave한 다음 dH₂O 7.2ml, FBS 7.2ml, 2× EMEM 14.4ml을 넣어 0.36% top agar를 만든다. 준비된 base agar에 1×10⁶cells/dish를 포함하는 top agar 용액을 2ml씩 petri dish에 넣는다. 그 후 colony 형성의 크기가 0.3mm 이상인 colony 수를 측정한다⁹⁾.

5. Saturation density

세포의 contact inhibition의 변화를 측정하기 위해 5×10⁵ cells/cm²를 petri dish에 넣고 배양한다. 배양액을 3일마다 새로 갈아주고 세포가 confluent한 상태에 도달했을 때 단위면적당 세포 수를 기록한다¹⁰⁾.

6. Cell fractionation

세포를 떼어낸 다음 cytosol fraction을 얻기위하여 100,000g로 1시간 동안 원심 분리 한다음 상층액을 걸어내어 cytosolic fraction으로 하고 침전물은 SDS를 포함하는 용액으로 30분간 4°C에 두었다가 15,000g로 원심 분리하여 상층액을 얻고 이를 membrane을 포함하는 particulate fraction으로 사용한다.

7. Western blot

Fibronectin의 변화를 보기 위해 전기영동하고 Bio-rad의 chamber를 사용하여 Nitrocellulose paper에 400mA로 4시간에 걸쳐 blotting한다. blot이 된 Nitrocellulose paper를 용도에 따라 chemiluminescent법을 이용하여 X-ray에 노출시킨다.

8. Northern blot

세포에서 추출된 RNA를 분석하기 위하여 formaldehyde agarose gel을 사용한다. Agarose, formaldehyde와 MOPS를 이용하여 1% agarose gel을 만들고 total RNA sample을 well 당 10ug씩 넣는다. 50% formaldehyde로 3시간 동안 prehybridization한 다음 밤새도록 DNA-probe를 함유한 hybridization용액으로 반응시킨다. Nitrocellulose paper를 꺼낸 다음 방사능 제거를 위한 수차례 세척을 거친 후 X-ray film이 있는 카세트에 넣고 -72°C에서 12시간 반응시킨다¹¹⁾.

9. RT-PCR

세포를 PBS(pH 7.2)로 세척한 후 chomczynski의 RNAzol B 방법에 의해 RNA를 분리하였다. 5μg의 total RNA를 13μl of DEPC-water에 넣은 다음 1μl의 oligo(dT)를 넣는다. 70°C에서 10분간 둔 후 급속히 water ice에 1분간 급냉시킨다. synthesis buffer 2μl, 1mM dNTP mix 1μl, 0.1mM DTT 2μl, Reverse transcriptase (22u/μl)를 넣는다. 잘 섞은 후 상온에서 10분간 둔다. 42°C 온조에서 50분간 진탕한 다음 70°C에서 15분간 진탕한다. 그리고 얼음에 둔다. 짧게 원

심분리한 다음 1 μ l의 RNase H를 튜브에 넣고 37°C에서 2분간 둔다. 이렇게 첫 번째 cDNA strand 작성이 완료되면 같은 튜브에 10x synthesis buffer 8 l, 물 68 l, Reverse primer (10 μ M) 1 μ l, Taq DNA polymerase(5u/ μ l) 1ml를 넣는다. 서서히 섞은 다음 승화방지를 위해 2방울 정도의 미네랄 oil을 떨어뜨린다. RNA/cDNA hybrid를 만들기 위해 94°C에서 5분간 둔 다음 PCR을 30회 실시한다. 미네랄 오일을 100 μ l의 chloroform으로 추출, 제거하고 수용층을 깨끗한 tube로 옮긴 다음 이 중 10 μ l를 1% agarose gel에 loading하였다⁸⁾.

III. 결 과

1. NNK에 의한 세포발암화 지표 변화

면적당 세포의 밀도를 측정하여 발암세포의 특성인 contact inhibition의 변화를 평가한 결과 100 μ M 처리군을 제외한 모든 처리군에서는 통계적으로 유의한 결과를 나타내지 않았으나 전체적으로는 용량 의존적인 증가추세를 보였다. 특히 가장 높은 농도인 1000 μ M 처리군에서는 약간 감소함을 나타내었다. Anchorage dependence를 측정하는 soft agar colony formation assay에서도 saturation density와 유사하게 용량에 따른 증가추세를 나타내었다. 그러나 100 μ M 처리군에서만 통계적으로 유의한 차이를 나타내었으며 1000 μ M 처리군에서는 약간 감소함을 나타내었다 (Table 1).

2. NNK에 의한 인체세포의 변형의 특성

인체상피세포를 NNK로 4주간 투여하고 지속적으로 계대배양한 결과 대조군의 세포는 정상적인 상피세포의 형태를 유지하는 반면 NNK의 투여군에서는 발암세포의 특성인 foci의 발현이 100 μ M 처리군의 계대배양 8단계에서부터 나타났으며 9단계에서는 100 μ M과 1000 μ M 모두에서 나타났다 (Fig. 1, Table 2).

Table 1. Characteristics of human epithelial cells at passage 8 after NNK exposure

Dose(μ M)	saturation density ($\times 10^5/cm^2$)	soft agar colony formation(%)	cell aggregatin (size>0.5mm)**
control	2.0 \pm 0.03	0.12 \pm 0.01	-
0.1	2.4 \pm 0.02	0.08 \pm 0.02	-
1	1.8 \pm 0.04	0.15 \pm 0.04	-
10	2.8 \pm 0.06	0.19 \pm 0.02	-
100	3.4 \pm 0.04*	0.28 \pm 0.03*	+
1000	2.8 \pm 0.14	0.22 \pm 0.08*	+

*p<0.05 as compared to control cells

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

The data are mean \pm SD with 3 different counts

3. NNK에 의한 성장조절인자의 변화

인체상피세포에 0.1% DMSO, 0.1, 1, 10, 100 μ M의 NNK를 2시간 폭로시킨 후 성장조절인자의 변화를 RT-PCR을 이용하여 분석한 결과 Interleukin-1의 mRNA 수준은 용량 의존적 증가를 나타내었다. 반면 TGF- β 1의 mRNA 수준은 100 μ M에서 감소를 나타내었으나 노출 용량에 따른 의존적인 반응을 나타내지 않았다. Plasminogen activator inhibitor(PAI-2)의 mRNA 수준은 용량 비례적인 증가를 보였으며 특히 1 μ M에서부터 뚜렷한 증가추세를 나타내었다(Fig. 2).

4. NNK에 의한 변형세포의 분석

정상형태의 대조군 세포와 100 μ M에 의해 발암성을 나타낸 세포를 Northern blot으로 비교분석한 결과 세포의 기질인 fibronectin의 mRNA 수준이 증가되었다. 이러한 증가는 2시간의 단기간 노출 후에도 나타났다(Fig. 3). 그러나 단기간 노출에서 나타난 성장조절인자의 변화는 발암화 세포에서는 나타나지 않았

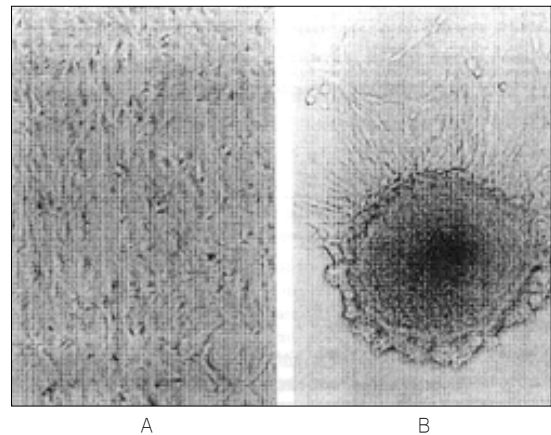


Fig. 1. Human epithelial cells treated with 100 μ M NNK for 4 weeks and subsequent 8 subcultures.

A : Control cells(X40)

B : NNK-transformed cells(X40)

Table 2. Morphological aletration of human cells after 4 weeks treatment of NNK

passage	cumulative no. of days in culture after treatment	Dose(μ M) control				
			1	10	100	1000
1	14
4	36
6	52
7	59
8	66	.	.	.	+	.
9	78	.	.	.	+	+

*+ : moderate appearance of foci

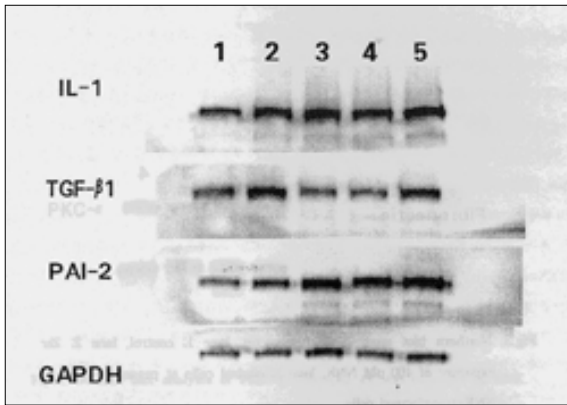


Fig. 2. RT-PCR analysis of growth regulatory factors following 2 hr exposure of NNK. lane 1: control, lane 2: 1 uM, lane 3: 10uM, lane 4: 100uM, lane 5: 1,000uM.

다(data not shown).

5. Protein kinase C에 미치는 영향

인체세포 모델에 0.1% DMSO, 10uM, 100uM의 NNK를 15분간 노출시키고 western blot을 실시한 결과 cytosol fraction의 PKC- α 는 용량 비례적으로 감소한 반면 세포막을 포함하는 particulate fraction의 PKC- α 는 증가하였다. PKC- α 의 translocation이 명확하게 일어나고 있음을 알 수 있다(Fig 4).

IV. 고 찰

흡연과 암에 관한 연구는 매우 다양하며 그 범위 또한 광범위하다. 그러나 흡연 중에 포함되어 있는 수 많은 유해물질은 대기 중이나 기타 유해작업환경 중에서도 존재하므로 흡연 중 어떤 성분이 암과 직접적인 관련성이 있는 지에 대해 많은 관심이 모아져 왔다. 흡연 중에 특이적으로 다량 존재하는 alkaloid 류인 NNK는 이러한 연구목적에 자주 사용되는 물질이다⁹. NNK를 포함하므로 흡연 특이성 alkaloid류는 폐암 및 구강암 등을 일으키는 것으로 알려져 있다³. 지금까지 알려진 NNK의 발암작용 기전은 DNA에 직접 작용하여 DNA adduct를 만들고 DNA의 single strand를 파괴하며 8-oxodeoxyguanine의 수준을 증가시키는 것으로 알려져 있다⁶. 이와 같은 NNK의 핵산과의 작용은 cytochrome P450에 의한 NNK의 대사물질에 의해 일어나는 데¹⁰ 설치류 실험 결과 이들 대사물질은 식도 및 비강의 점막세포에 직접 작용하는 것으로 알려져 있다^{11,12}. 최근에는 NNK의 대사물질이 비흡연자의 urine에서도 검출되어 간접 흡연의 피해가능성을 입증하는 자료로도 사용되었다¹³. NNK의 발암작용기전이 대사물에 의한 핵산의 직접작용인 유전자적 발암기전(genetic carcinogenesis)인 점은 잘 알려져 왔으나 발암화에 따른 성장조절인자의 역할에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구는 NNK에 의한 발암성의 표적세포 형태가 상피세포라는 점에 착안하여 인체상피세포모델을 이용한 발암기전 분석을 실시하고자 하였다. NNK를 노출시킨 결과 발암화 지표들의 용량의존적 변화가 일어났다.

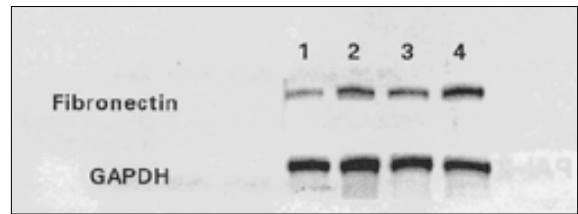


Fig. 3. Northern blot analysis of fibronectin. lane 1: control, lane 2: 2hr exposure of 100 uM NNK, lane 3: control cells at passage 9, lane 4: NNK-transformed cells.

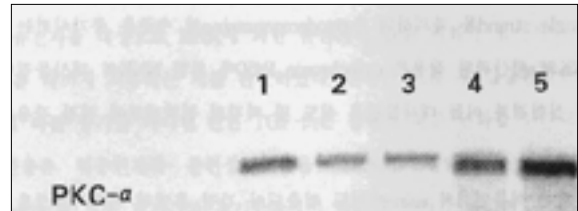


Fig. 4. Western blot analysis of PKC- α following 15 min exposure of NNK. Cytosolic fraction (lane 1: 0.1% DMSO, lane 2: 10uM, lane 3: 100uM) and particulate fraction (lane 4: 0.1% DMSO, lane 5: 10uM, lane 6:100uM).

Saturation density의 측정은 발암세포의 특성인 contact inhibition을 평가하는 방법으로서 용량의 증가에 따라 단위면적당 세포의 수가 증가함을 알 수 있다. 이러한 현상은 monolayer로 성장하는 정상적인 형태의 상피세포가 NNK의 노출에 의해 contact inhibition의 능력을 상실하고 multilayer에서도 자랄 수 있는 형질을 획득하였음을 의미한다. 가장 높은 농도의 처리군에서는 오히려 통계적 유의성이 사라지는 결과를 보였으나 이는 높은 용량의 독성에 따른 현상으로 추정된다. NNK에 의한 노출농도의 증가가 saturation density의 증가 추세로 이어지는 현상은 NNK의 세포 발암화를 입증하는 하나의 증거로 추정된다. 발암세포의 또 하나의 특성은 anchorage independence이다. 정상 형태의 상피세포는 정상적인 성장을 위해 배양용기의 접촉이 필요하나 발암화 상피세포는 용기표면에 부착되지 않고도 성장하는 anchorage independence의 특성을 획득한다¹⁴. 이러한 세포 특성의 변화를 관찰하기 위해 soft agar colony formation을 측정할 결과 100uM 처리군에서는 통계적 유의성을 나타내었으며 가장 높은 농도에서는 colony formation의 감소를 나타내었다. 이러한 감소현상은 고농도에 따른 독성의 영향으로 추정된다. NNK의 노출농도증가에 따른 colony formation의 증가 추세는 NNK에 의한 인체세포의 anchorage independence의 증가 추세를 의미하는 것으로서 NNK의 세포발암화를 확인할 수 있는 또 하나의 자료로 생각된다. 세포의 발암화는 세포간의 응집력을 증가시키는 경향이 있다. 이러한 응집력의 변화를 측정하기 위해 cell aggregation을 측정할 결과 높은 용량의 NNK에서는 응집력의 증가를 보였다. 이러한 결과는 saturation density와 colony formation의 결과를 뒷받침하므로 NNK의 인체 발암화 잠재력을 명확히 할 수 있는 자료로 사료된다. 발암물질에 의한 암의 생성은 그 물질에 의한 유전자적 손상이나 변화가 genome에 고착(fixation)되어 차 세대 세포분열로

이어질 때 이루어질 수 있다⁹. 따라서 본 연구는 화학적 발암화와 관련성이 있는 유전자를 대상으로 NNK에 의한 유전자의 발현변화가 일시적인지 또는 최초의 변화가 발암화에 이를 때까지 지속되는지를 관찰하였다. 단시간 노출 후 염증관련인자인 interleukin-1과 PAI-2는 용량에 따른 증가를 나타낸 반면 TGF-1은 용량에 따른 변화를 나타내지 않았다. 따라서 NNK의 초기 반응은 염증인자와 관련성이 있을 것으로 추정된다¹⁰. 그러나 NNK에 의해 발암성을 나타낸 세포를 분석한 결과 단기간 노출에 따른 interleukin-1 및 PAI-2의 변화는 나타나지 않았다. 성장인자와는 달리 세포의 기질인 fibronectin의 경우 단기간의 초기반응에서 나타난 증가가 발암화 후에도 나타나 이러한 세포의 인자는 NNK 노출 초기의 현상이 발암화까지 이어지고 있음을 암시하고 있다¹⁰. 따라서 NNK의 초기 반응에 따른 성장인자의 변화는 세포의 발암화까지 유지되는 현상이 아니며 세포의 기질의 경우에는 지속적으로 유지됨을 알 수 있다. 그러므로 화학물질에 의한 초기 반응을 발암의 기전으로 평가하는 데는 신중한 분석이 필요함을 제시하고 있다.

신호전달체계의 변화는 발암기전에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. NNK 노출에 따른 PKC- α 의 변화를 측정하고 결과 PKC- α 의 뚜렷한 translocation을 보였다. Protein kinase는 활성화 cytosol에서 membrane으로 옮겨가는 현상이 나타나므로 PKC의 활성화는 protein 양이 cytosol에서 particulate fraction으로 이동하는 정도로 측정할 수 있다. NNK의 용량 증가에 따른 cytosol의 양은 감소하는 반면 세포막을 포함하는 particulate fraction의 protein 양은 증가하였다. 따라서 흡연 등에 의한 이러한 PKC- α 의 활성화 지속될 경우 신호전달기작의 변화를 일으켜 발암을 초래하는 기전으로 작용할 수 있을 것으로 추정된다.

본 연구는 흡연 중에 특이적으로 다량 존재하는 NNK의 발암성을 입증하므로써 흡연이 암발생에 직접적으로 관여하고 있음을 보였으며 NNK에 의한 발암화 기전의 분석을 통하여 구강암과 같은 흡연 관련 암 발생기전의 이해증진에 기여할 것으로 사료된다.

V. 결 론

흡연 중에 특이적으로 존재하는 alkaloid 물질인 NNK의 발암성 및 발암화 기전을 분석하므로써 흡연에 의한 암 발생 관련성을 분석하고자 하였다. 구강암을 비롯한 대부분 암의 기원이 되는 세포형태는 상피세포이므로 인체 상피세포 모델을 사용하였다. NNK를 4주간 노출시킨 후 saturation density, soft-agar colony formation, cell aggregation을 측정한 결과, 세포 발암화의 특징인 contact inhibition의 감소, anchorage independence의 증가, 세포간의 응집력 증가가 각각 나타났다. 이러한 발암화 특성의 증가는 용량-의존적이었으며 100 μ M 처리 군에서 가장 명확히 나타났다. 인체 상피세포에 NNK를 단시간 투여하여 성장조절인자의 변화를 RT-PCR 방법으로 측정한 결과, interleukin-1 및 PAI-2 mRNA의 수준은 용량 의존적으로 증가한 반면 TGF-b1은 뚜렷한 변화를 나타내지 않았다. 가장 높은 세포 발암성을 나타낸 100 μ M 처리

군의 변형 세포와 대조군 세포를 비교 분석한 결과, 조사 대상 성장조절인자의 변화는 나타나지 않았으나 세포의 기질인 fibronectin의 mRNA 수준은 뚜렷이 증가하였다. 이러한 fibronectin의 mRNA 증가는 단시간 투여 후에도 나타났다. 따라서 NNK에 의한 성장조절인자의 초기 반응은 발암화 이후까지 지속되지 않는 반면 세포의 기질의 초기 변화는 발암화 이후까지도 지속되어 NNK의 세포 발암화 과정에 fibronectin이 관여함을 보였다. 따라서, 본 연구 결과는 화학적 발암물질에 의한 초기 반응을 발암기전으로 해석하는데 유전인자 특성에 따른 신중한 분석이 필요함을 암시하고 있다. NNK 노출에 의한 Protein Kinase C(PKC)의 작용을 분석한 결과 노출 용량 의존적으로 cytosol fraction에서 particulate fraction으로 이동되는 것이 관찰되어 NNK가 PKC의 활성화에도 관여함을 나타내었다. 본 연구는 흡연 중에 특이적으로 다량 존재하는 NNK의 발암성을 분석하여 흡연이 암 발생에 직접적으로 관여하고 있음을 입증하였으며 NNK에 의한 발암화 기전의 분석을 통하여 구강암과 같은 흡연 관련 암 발생 기전의 이해 증진에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Shopland, D.R., Eye, H.J., Pechacek, T.F.: Smoking-attributable cancer mortality in 1991; is lung cancer now the leading cause of death among smokers in the US? J Natl Cancer Inst., 83, 1142-1148, 1991.
2. Hoffman, D. and Hecht, S.S.: Advances in tobacco carcinogenesis. In: CS cooper. Handbook of experimental pharmacology, (Heidelberg Germany. Springer-Verlag), p. 63-102, 1990.
3. Hoffman D, Gupta PC, Scientific challenges in environmental carcinogenesis. Prev. Med. 25; 14-22, 1996.
4. Hecht SS. DNA adduct formation from tobacco-specific N-nitrosamine. Mutat. Res. 424; 127-147, 1999.
5. Rhim, J.S., Jay, G, Anrstein, P, Price, F.M., Sanford, K.K., Aaronson, S.A.: Neoplastic transformation of human epidermal keratinocytes by Ad12-SV40 and Kirsten sarcoma viruses. Science 1250-1252, 1985.
6. Yang, J.H., Thraves, P., Dritschilo, A., and rhim, J.S.: Neoplastic transformation of immortalized human keratinocytes by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Cancer Res. 52, 3478-3482, 1992.
7. Yang, J.H., and Rhim, J.S.: characterization of TCDD-transformed human human keratinocyte cell line. Chemosphere 27, 407-411, 1993.
8. Yang JH: Expression of dioxin-responsive genes in human endometrial cells in culture. Biochem. Biophys. res. Commun. 257, 259-263, 1999.
9. Hecht S.S., Chen, C.H. Jirota, N., and Hoffman D.: Tobacco-specific nitrosamine formation from nicotine in vitro and during tobacco curing and carcinogenicity in strain-A mice. J. Natl. Cancer Inst., 60, 819-824, 1978.
10. Hyun HT et al. Effects of intragastrically administered pycnogenol on NNK metabolism in F344 rats. Anticancer Res. 19; 2095-2099, 1999.
11. Belinsky, S.A., Devereux, T.R. Maronpot, R.R. and Anderson, M.W.: Role of Clara cells and type II cells in the development of pulmonary tumors in rats and mice following exposure to a tobacco-specific nitrosamine. Exp. Lung Res., 17, 263-278, 1991.
12. Grasso P, and Huang MT. Smokeless tobacco and oral cancer; an assessment of evidence derived from laboratory animals. Food Chem. Toxicol. 36; 1015-1029, 1999.
13. Carmella SG, Kresty LA, Zahng Z. Analysis of human urine for pyrimidine-N-oxide metabolite of NNK. Cancer Epidemiol.

- Biomarkers Prev. 6;113-120, 1997.
14. Yang, J.H., and Rhim, J.S.: 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin; molecular mechanism of carcinogenesis and its implication of human in vitro model. *Critical Reviews in Oncology and Hematology* 118, 111-127, 1995.
 15. Hecht, S.S., and Hoffman, D.: Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke. *Carcinogenesis*, 9, 875-884, 1998.
 16. Dufour, S. and Duband, J.L.: The role of fibronectins in embryonic cell migration. *Trends Genet.*, 4, 198-203, 1988.