

화학적 발암화에 따른 Protein Kinase C의 발현 변화

변기정* · 홍락원 · 김진수

울산대학교병원 치과,* 경북대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract

EXPRESSION OF PROTEIN KINASE C ISOFORMS IN CHEMICAL CARCINOGEN-INDUCED NEOPLASTIC TRANSFORMATION OF HUMAN EPITHELIAL CELLS*

Ki-Jeong Byeon*, Lak-Won Hong, Chin-Soo Kim

*Dept. of Dentistry, Ulsan University Hospital**

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

Protein kinase C (PKC) is known to play a pivotal role in neoplastic transformation cells and its high expression is often found in a variety of types of tumors including oral cancer. While PKC is associated with the altered signal transduction pathway of the tumor cells, it is still unclear which isoform is involved in the carcinogenesis process. Since the cellular distributions and the roles of PKC are isoform-specific, it is very important to identify the specific target molecules to improve our understanding of the carcinogenesis processes. Thus, the present study attempted to perform chemical carcinogen-induced neoplastic transformation of human epithelial cells and analyze the specific isoform of PKCs involved in the cellular transformation. The study analyzed overall PKC responses upon MNNG(N-Methyl-N'-nitro-N-nitroso guanidine) exposure with [³H]PDBu binding assay. PKC translocation was observed at high doses of MNNG treatment in the presence of extracellular calcium. Such effects were not observed in the absence of extracellular calcium. Translocational effects with exposure of MNNG was further enhanced in the presence of hydrocortisone.

The result suggests that the type of PKC involved may be Ca²⁺-dependent classical isoform and steroid hormone enhances PKC activation. Among cPKC isoforms examined, only PKC- α and γ showed significant translocation of protein levels from cytosolic fraction to membrane fraction, as analyzed by immunoblot. PKC- ϵ in nPKC class showed an increased translocation, but other forms in this class did not show the effect. None of isoforms in aPKC class was affected by MNNG treatment. The study demonstrated that there was a certain specificity in the patterns of isoform induction following chemical carcinogen exposure and helped identify all the types of PKC isoforms expressed in human epithelial cells. It was revealed that PKC isoforms were activated in an early response to chemical carcinogen, suggesting that PKC be associated with carcinogenesis process from an early stage in this particular cell system. The study will contribute to improving our understanding of chemical-induced carcinogenesis in human cells and may provide a scientific basis to introduce the specific PKC inhibitors as an anticancer drug of epithelial cell-origin cancers including oral cancer.

Key word : Protein kinase C, Isoforms, Carcinogenesis

I. 서 론

암을 유발하는 물질은 바이러스 등에 의한 생물학적 발암 물질, 화학물질에 의한 화학적 발암물질 및 자외선 등에 의한 물리적 발암물질로 크게 분류할 수 있으며, 이들 중 화학적 발암물질은 지금까지 알려진 발암원 가운데 가장 많은 비중을 차지하고 있다¹⁾. 따라서 화학적 발암화 기전에 대한 이해는 암의 조기 발견 등에 필요한 생물학적 표식자 발견의 근본이 되는 과제이다.

이들 화학적 발암물질 중 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 대사물질이 발암성을 나타내어 체내의 대사물질이 암을 일으키는 데 직접적으로 관여함을 명백히 보여주는 좋은 예이다²⁾. 따라서 발암성 실험에서는 발암 물질이 complete carcinogen 혹은 procarcinogen인지에 따라 많은 변화가 있을 수 있다. 이러한 점에서 발암 물질인 MNNG(N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)는 대사효소에 의한 대사물질이 발암성을 나타내는 것이 아니라, MNNG 그 자체가 직접 DNA adduct를 형성하여 암을 일으키는 완전한 발암물질(complete carcinogen)로서 동물 모델에서 뿐만 아니라 세포모델에서도 강력한 발암성을 나타내어 화학적 발암화 연구에 널리 사용되고 있다³⁾.

지금까지 화학적 발암화의 기전은 여러 가지 측면에서 제시된 바 있으나 발암물질 및 실험형태에 따라 매우 다양한 특성을 가지고 있다. 이러한 발암화 기전 중 최근 많은 관심이 집중되는 Protein Kinase C (PKC)는 세포간의 신호전달기작 뿐만 아니라 세포의 성장이나 소멸에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

PKC는 특정단백질의 serine기와 threonine기를 인산화시키는 역할을 하며, 세포 성장 및 분화와 같은 세포의 필수적인 기능을 조절하고 세포간 신호전달체계에 중요한 역할을 한다⁴⁾. PKC는 11개의 subspecies로 구성되어 있고 활성특성에 따라 classical PKC, new PKC 및 atypical PKC로 크게 3종류로 분류된다. classical PKC는 α , β I, β II, γ isoform을 가지며 Ca^{2+} 과 diacylglycerol(DAG)에 모두 의존적이며, new PKC는 δ , ϵ , η , θ isoform으로 구성되며 Ca^{2+} 에는 의존적이지 않으나 DAG에는 의존적이고, atypical PKC는 λ , μ , ζ isoform으로 구성되며 Ca^{2+} 및 DAG 모두에 의존적이지 않다. PKC isoform들은 각각의 이러한 특성 외에도 세포내에 존재하는 분포도 서로 다르며, 세포의 성장조절 기능 외에도 hormone이나 신경전달물질의 분비, 유전자 발현 및 세포대사 등에도 관여한다. 또한 신경조직 내에 풍부하게 존재하여⁵⁾ 뇌와 같은 신경조직

에서 PKC의 역할은 매우 중요할 것으로 추정되어 왔으며, 특히 뇌종양인 astrocytoma의 경우 PKC의 활성도가 1000배 이상 증가한다고 보고된 바 있어⁶⁾, 이러한 PKC의 높은 활성도는 암세포의 성장과 상관관계가 있는 것으로 알려져 있다⁷⁾.

또한, 인체에서 발생하는 암의 세포형태는 대부분 상피세포로서 상피세포에 대한 발암화 연구는 중요한 의미를 갖는데 지금까지 인체상피세포에 대한 MNNG의 발암성은 검증된 바 있으나, 발암화 과정과 관련된 생화학적 변화의 분석은 잘 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구는 화학적 발암물질인 MNNG를 이용하여 인체상피세포 발암화에 기여하는 PKC isoform을 분석함으로써 화학적 발암화에 표적이 되는 분자를 확인하고 상피세포 기원의 발암화 기전 이해를 증진시키고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 사용 시약 및 재료

12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate(TPA), MNNG, agarose 및 기타 시약들은 Sigma사 제품을 사용하였으며 DMEM(Dulbecco's minimum essential media) 등 세포배양 관련시약은 Gibco BRL사, western blot에 사용한 시약은 Bio Rad사, [³H] phorbol ester은 Amersham사, PKC isozyme antibody는 Transduction Laboratory사에서 구입하였다.

2. 발암물질 처리

70% confluency를 보이는 인체상피세포에 MNNG (0.05% DMSO : Dimethyl sulfoxone, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0 μ g/ml)를 함유하는 배양액을 6일간 처리한 후 100% confluency를 이루는 시점에서 1 : 3의 비율로 계대배양하였다. 그 후 passage에 따라 세포 발암성을 분석하였다. PKC isoform의 변화 분석 및 phorbol ester binding assay는 MNNG를 15분간 처리한 후 실시되었다.

3. 인체 상피 세포배양

인체상피세포를 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 배양하였고, 배양액은 DMEM에 FBS(Fetal bovine serum) 10%, hydrocortisone (5 μ g/ml), antibiotics 등을 넣어 사용하였다. 세포가 confluency를 이루는 시점에서 1 : 3으로 계대배양하였다³⁾.

4. Soft agar colony formation.

Noble agar 1.2g에 dH₂O 35ml을 넣고 30분간 자동멸균소독한 다음 15ml의 dH₂O와 FBS 25ml, 2X EMEM(elementary modified essential media) 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 자동멸균소독한 다음 dH₂O 7.2ml, FBS 7.2ml, 2X EMEM 14.4ml을 넣어 0.36% top agar를 만든다. 준비된 base agar에 1×10⁴cells/dish를 포함하는 top agar용액을 2ml씩 petri dish에 넣는다. 그 후 0.3mm이상의 크기로 형성된 colony 수를 측정하였다¹⁾.

5. Cell density 측정

세포의 contact inhibition의 변화를 측정하기 위해 5×10³cells/cm²를 용기에 넣고 배양한다. 배양액은 3일마다 새롭게 갈아주고 세포가 confluent한 상태에 도달하였을 때 단위 면적당 세포 수를 계산하였다¹⁾.

6. Cell aggregation 측정

Soft agar assay와 같은 방법으로 Base agar를 만들어 5ml씩 Petri dish에 넣는다. 밤새 37°C incubator에 둔 다음, 10% FBS를 포함한 배양액에 10⁵cells/dish로 세포를 접종한 후 4일이 지난 시점에서 배양액상에 성장하는 1mm 이상 크기의 colony 숫자를 측정하였다¹⁾.

7. [³H] phorbol ester binding

12-well culture plate에서 배양된 세포를 Locke's buffer로 세척한 후 MNNG와 2nM [³H] PDBu(phorbol

ester diphenyl butyric acid)를 함유하는 Locke's buffer으로 15분간 배양한다. 배양액을 제거하고 완충액으로 3회 세척한 후 0.1M NaOH 1ml로 혼탁시킨 후 0.7ml를 9ml의 Ultima gold에 섞어 scintillation spectroscopy로 방사능을 측정하였다⁸⁾.

8. Western blot

PKC isoform의 세포내 단백질 수준을 측정하기 위해 원심분리기로 membrane fraction과 cytosolic fraction으로 분리한 다음 PKC isoform 각각의 항체를 사용한다. Cell lysate(20μg)를 전기영동한 다음 Nitrocellulose paper를 semi-dry cell (Bio Rad)에 넣고 15V로 30분 동안 blotting한다. blot이 끝난 paper에 PKC isoform antibody를 적정비율로 희석한 용액으로 반응시킨 후 이차항체를 처리한 후 Pierce사의 Superfluoro system으로 측정하였다⁹⁾.

9. 성적 검증

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

III. 성 적

1. MNNG에 의한 세포발암화 평가

MNNG로 6일간 처리하고 7회 연속 계대배양한 결과 0.01μg/ml 및 0.1μg/ml 투여군의 saturation density가 1.5배, 1.4배씩 각각 증가하였다. soft-agar colony formation의 경우도 0.01μg/ml 및 0.1μg/ml 투여군에서 2.1배 및 2.2배씩 각각 증가함을 보였다. 군집 세포의 크기가 1mm 이상인 colony를 측정한 결과 0.01g/ml에서 10개 이상, 0.1μg/ml에서는 5개 이상의 colony가 보였다(Table 1).

Table 1. Properties of human epidermal keratinocytes after 6-day treatment of MNNG and 7 subsequent subcultures

Dose(μg/ml)	Saturation density (×10 ⁵ /cm)	Soft-agar colony formation(%)	cell aggregation* (>1mm)
DMSO(0.05%) only	4.1±0.08	0.23±0.03	-
0.001	4.5±0.10	0.30±0.07	-
0.01	6.1±0.05*	0.48±0.04*	++
0.1	5.8±0.10	0.51±0.17*	+
1	4.8±0.12	0.33±0.11	-

* : p<0.05 as compared to control cells

± : - : ≤ 5 colonies, + : > 5 colonies, ++ : > 10 colonies

The data are mean ±SD with 3 different counts

종양세포의 군락인 foci가 나타나는 시기는 0.01 μ g/ml 투여군에서는 38일이 지난 passage-5, 0.1 μ g/ml 투여군에서는 47일이 지난 passage-6이었으며 그 밖의 다른 투여군에서는 59일이 지난 passage-8에서 경미한 foci의 증가를 나타내었다. 특히 0.01 μ g/ml 투여군은 passage가 증가함에 따라 뚜렷한 foci의 증가를 나타내었다 (Table 2).

2. MNNG투여 후 TPA처리에 따른 세포발암화 변화

MNNG를 6일간 투여한 후 10 μ g/ml의 TPA를 5일간 처리한 결과 0.01 μ g/ml 및 0.1 μ g/ml 투여군에서 saturation density의 증가가 1.8배, 1.9배씩 각각 나타났다. Soft-agar colony formation의 경우 0.001 μ g/ml 투여군에서는 2배의 증가를 나타냈으며 0.01 μ g/ml 및 0.1 μ g/ml에서는 3.0배, 2.8배의 증가를 나타내었다. cell aggregation은 0.001 μ g/ml에서 5개 이상의 colony를 보인 반면 0.01 μ g/ml 및 0.1 μ g/ml에서는 10개 이상의 colony를 나타내었다. DMSO만 처리된 control군과 가장 높은 양이 투여된 1 μ g/ml 투여군에서는 cell aggregation의 뚜렷한 변화가 없었다 (Table 3).

Foci의 출현 시기는 0.01 μ g/ml, 0.1 μ g/ml MNNG와

TPA를 처리 후 38일이 지난 passage-5에서 나타나기 시작했으며 0.001 μ g/ml과 1 μ g/ml 투여군에서는 각각 passage-7에서 foci가 나타났다. control군은 59일 지난 passage-8에서 경미하게 foci가 보였다. 0.01 μ g/ml 투여군에서는 passage 증가와 함께 foci의 수가 증가함이 관찰되었다 (Table 4).

3. MNNG에 의한 protein kinase C의 translocation 분석

인체상피세포에 0.001, 0.01, 0.1 및 1 μ g/ml의 MNNG를 투여하고 15분 뒤 PKC translocation을 [³H] phorbol ester binding assay로 분석한 결과 0.01 μ g/ml 및 0.1 μ g/ml에서 통계적으로 유의한 차이 (p<0.05)를 나타내었으며(Fig 1), 이와 같은 유의성은 세포의 칼슘이 없을 때는 나타나지 않았다(Fig 2).

0.1 μ g/ml hydrocortisone의 존재하에서 MNNG에 의한 PKC의 translocation을 측정된 결과 MNNG 0.1 μ g/ml, 1.0 μ g/ml 용량에서 membrane과 결합한 PKC의 양이 증가함을 나타내었다(Fig. 3).

Table 2. Morphological alteration of human epidermal keratinocytes treated with MNNG(μ g/ml)

Passage	Cumulative no. of days in culture after treatment	Dose (μ g/ml)				
		DMSO	0.001	0.01	0.1	1
1	10	°	°	°	°	°
4	25	°	°	°	°	°
5	38	°	°	+	°	°
6	47	°	°	+	+	°
7	53	°	°	++	+	°
8	59	°	+	++	++	+

† : + : moderate, ++ : severe

Table 3. Properties of human epidermal keratinocytes treated with MNNG and TPA(10 μ g/ml)

Dose(μ g/ml)	Saturation density ($\times 10^5/cm$)	Soft-agar colony formation(%)	Cell aggregation* (>1mm)
DMSO(0.05%) only	3.5 \pm 0.02	0.26 \pm 0.02	-
0.001	3.8 \pm 0.08	0.52 \pm 0.06*	+
0.01	6.4 \pm 0.04*	0.79 \pm 0.12*	++
0.1	6.9 \pm 0.12*	0.72 \pm 0.18*	++
1	4.5 \pm 0.06	0.29 \pm 0.03	-

* : p<0.05 as compared to control cells

± : - : \leq 5 colonies, + : $>$ 5 colonies, ++ : $>$ 10 colonies

The data are mean \pm SD with 3 different counts

Table 4. Morphological alteration of human epidermal keratinocytes treated with MNNG($\mu\text{g/ml}$) and TPA($10\mu\text{g/ml}$)

Passage	Cumulative no. of days in culture after treatment	Dose ($\mu\text{g/ml}$)				
		DMSO	0.001	0.01	0.1	1
1	10	o	o	o	o	o
4	25	o	o	o	o	o
5	38	o	o	+	+	o
6	47	o	o	+	+	o
7	53	o	+	++	+	+
8	59	+	+	++	++	+

† : + : moderate, ++ : severe

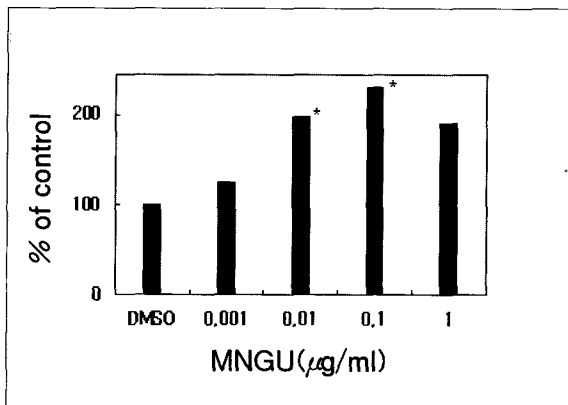


Fig. 1. Effects of dose-response on [^3H] phorbol ester binding by MNNG in human keratinocytes in culture in presence of extracellular calcium. * < 0.05

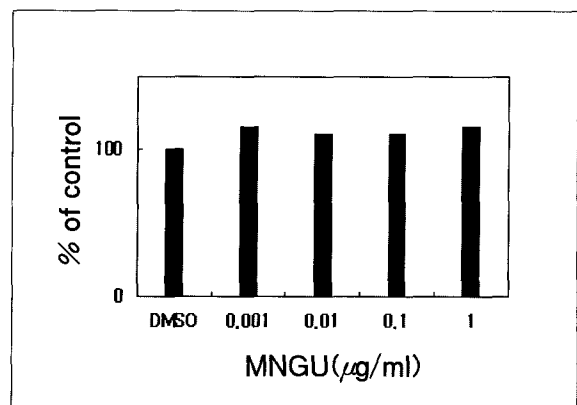


Fig. 2. Effects of dose-response on [^3H] phorbol ester binding by MNNG in human keratinocytes in culture in absence of extracellular calcium.

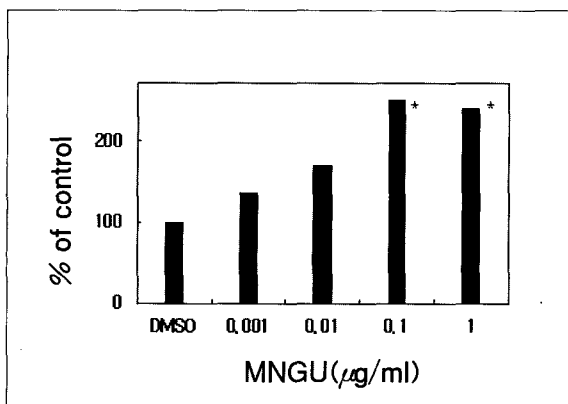


Fig. 3. Effects of dose-response on [^3H] phorbol ester binding by MNNG in human keratinocytes in culture in presence of hydrocortisone. * < 0.05

4. MNNG에 의한 cPKC의 활성화

cPKC인 α , βI , βII , γ isoform의 활성을 Western blot

을 통하여 분석하고 cytosol fraction에 대한 membrane fraction의 반응 단백질 양을 비율로 나타내었다. 발암물질에 노출되지 않은 정상상태에서 α , βI , βII , γ isoform의 membrane fraction protein량이 약간 높음을 알 수 있다 (Fig. 4).

0.01 $\mu\text{g/ml}$ MNNG를 15분간 처리 후 분석한 결과 α 및 γ 에서 membrane fraction의 증가를 나타내었으며 (Fig. 5), 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 α 및 γ 에서 각각 1.8배, 1.7배의 증가를 보였다 (Fig. 6). 그러나 최고 농도인 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 오히려 낮은 농도에 비해 membrane fraction으로 PKC 단백질의 이동이 감소하였다 (Fig. 7).

5. MNNG에 의한 nPKC의 활성화

nPKC인 δ , ϵ , θ isoform의 활성도를 cPKC와 같은 방법으로 분석한 결과 MNNG처리하지 않은 정상상태의 분포는 δ 및 θ 에서 membrane fraction protein의 양이 cytosol에 비해 낮았으며 ϵ 는 membrane protein양이 다소 높은 것으

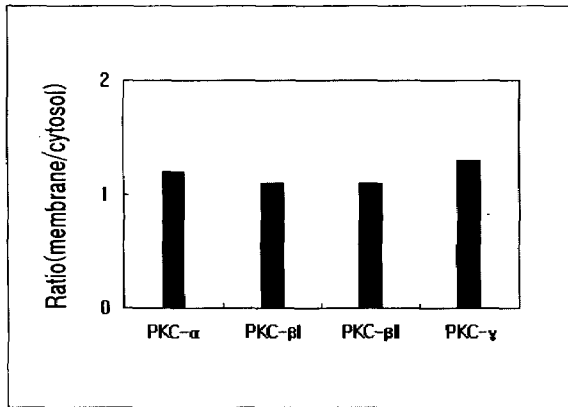


Fig. 4. Ratio between membrane and cytosolic fraction of classical PKC isoforms without MNNG treatment.

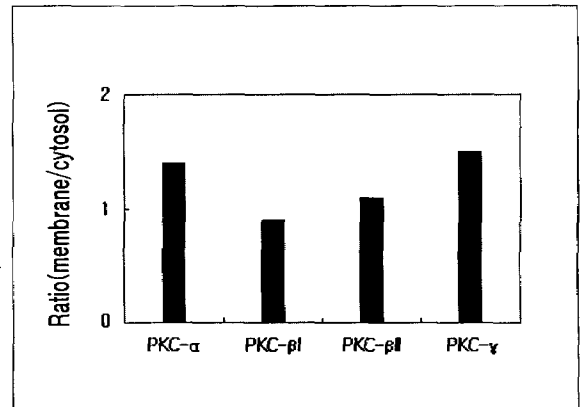


Fig. 5. Ratio between membrane and cytosolic fraction of classical PKC isoforms following 0.01 μg/ml MNNG treatment.

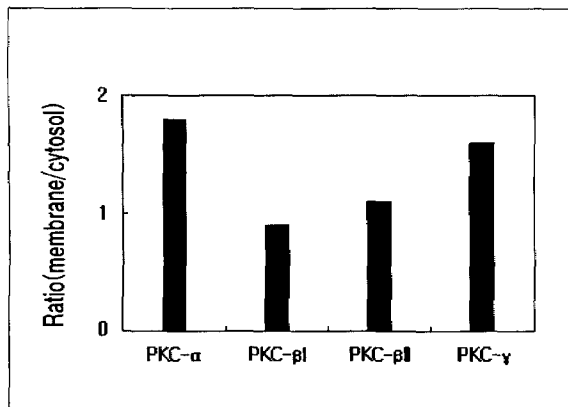


Fig. 6. Ratio between membrane and cytosolic fraction of classical PKC isoforms following 0.1 μg/ml MNNG treatment.

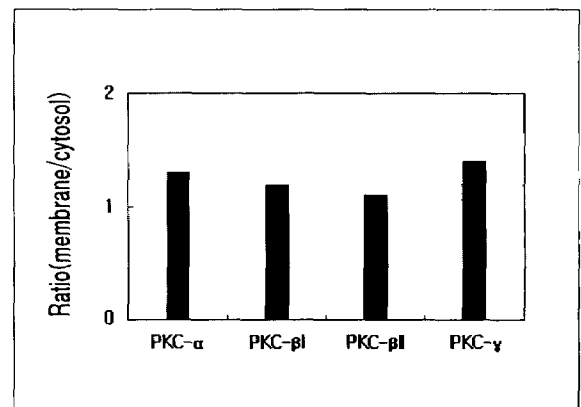


Fig. 7. Ratio between membrane and cytosolic fraction of classical PKC isoforms following 1.0 μg/ml MNNG treatment.

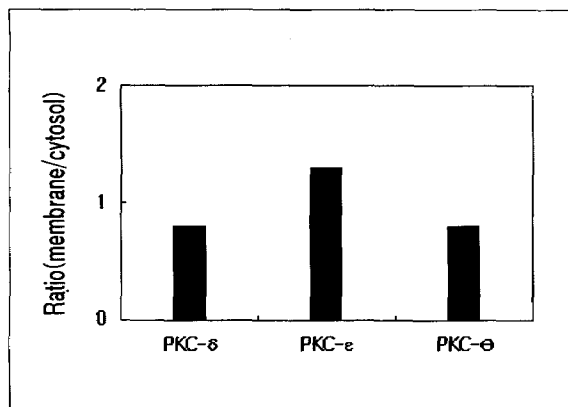


Fig. 8. Ratio between membrane and cytosolic fraction of new PKC isoforms without MNNG treatment.

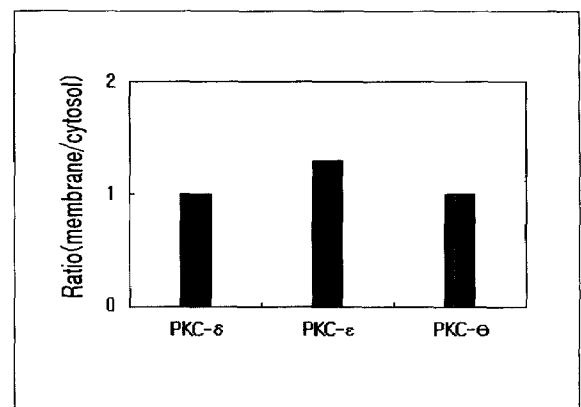


Fig. 9. Ratio between membrane and cytosolic fraction of new PKC isoforms following 0.01 μg/ml MNNG treatment.

로 나타났다 (Fig. 8). 0.01 μ g/ml에서는 basal level과 차이를 나타내지 않았으며(Fig. 9), 0.1 μ g/ml에서는 PKC- ϵ 의 membrane fraction이 1.8배 증가하였다. θ 및 δ 또한 약간의 증가를 나타내었다 (Fig. 10). 또한 1.0 μ g/ml 처리군에서는 cPKC와 마찬가지로 전반적인 membrane fraction으로의 translocation이 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig. 11).

6. MNNG에 의한 aPKC의 활성화

aPKC는 λ , μ , ζ isoform이 속해 있으며 cPKC와 같은 방법으로 분석한 결과 인체상피세포의 정상적인 세포내 분포는 λ 및 μ 의 경우 membrane/cytosol의 분포 비율이 거의

동등하거나 약간 membrane fraction에 치우쳐져 있으며, ζ form은 측정되지 않았다(Fig. 12).

MNNG 0.01 μ g/ml처리 시에는 분포에 변화를 거의 주지 않았으나 (Fig. 13), 0.1 μ g/ml 처리 시에는 μ isoform에서 약간의 증가가 있었고 (Fig. 14), 1.0 μ g/ml에서는 분포의 변화가 없었다 (Fig. 15).

7. 세포 발암화에 의한 PKC의 활성 평가

MNNG에 의한 세포의 발암화에 PKC가 어떻게 관여하는지를 분석하기 위해 MNNG단독 또는 MNNG와 TPA를 병행 투여한 세포군 중 가장 세포 발암화의 특성이 뚜렷한 군을 선정하여 PKC의 발현을 측정된 결과, MNNG 단독

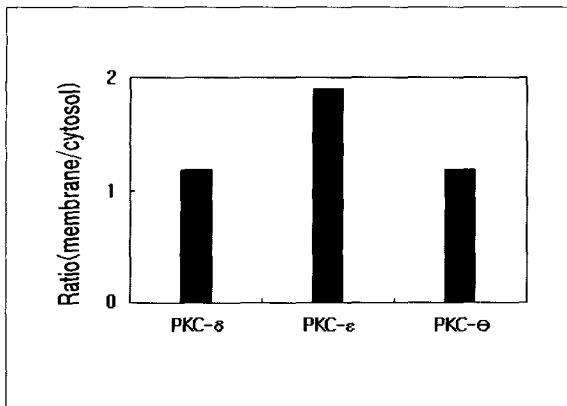


Fig. 10. Ratio between membrane and cytosolic fraction of new PKC isoforms following 0.1 μ g/ml MNNG treatment.

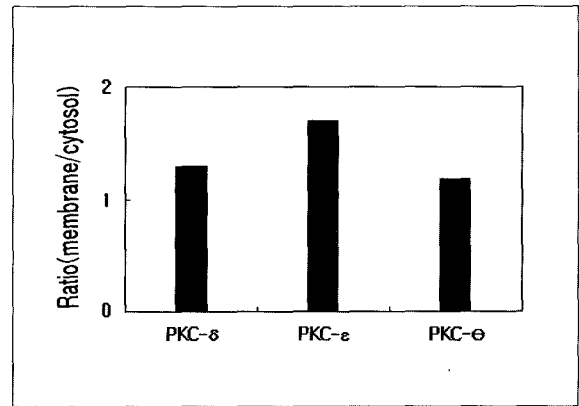


Fig. 11. Ratio between membrane and cytosolic fraction of new PKC isoforms following 1.0 μ g/ml MNNG treatment.

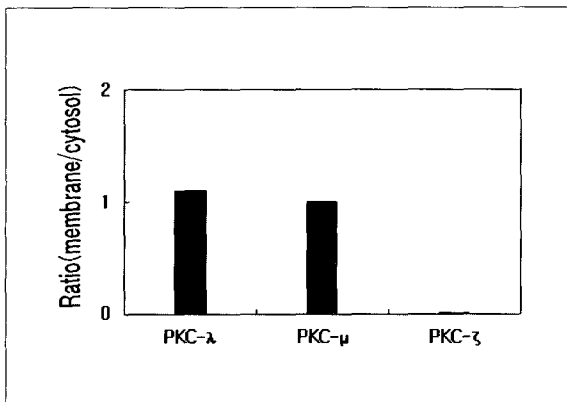


Fig. 12. Ratio between membrane and cytosolic fraction of atypical PKC isoforms without MNNG treatment.

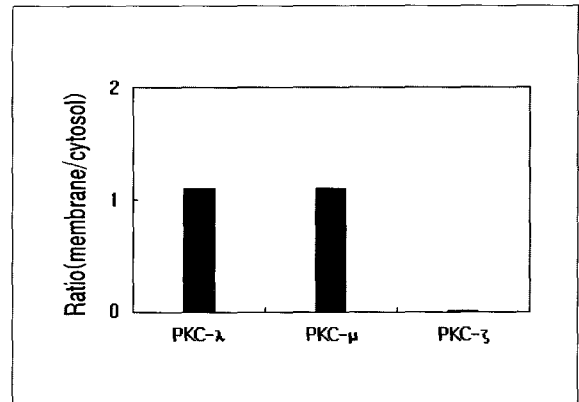


Fig. 13. Ratio between membrane and cytosolic fraction of atypical PKC isoforms following 0.01 μ g/ml MNNG treatment.

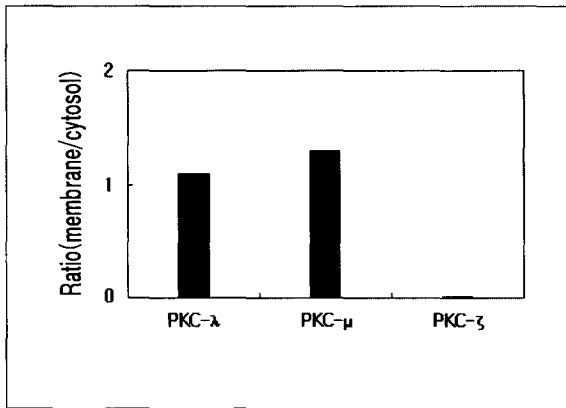


Fig. 14. Ratio between membrane and cytosolic fraction of atypical PKC isoforms following 0.1μg/ml MNNG treatment.

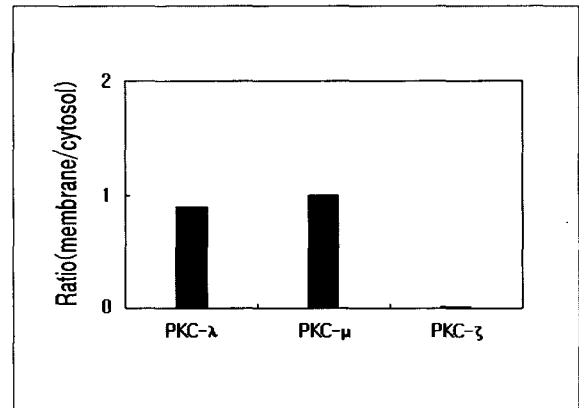


Fig. 15. Ratio between membrane and cytosolic fraction of atypical PKC isoforms following 1.0μg/ml MNNG treatment

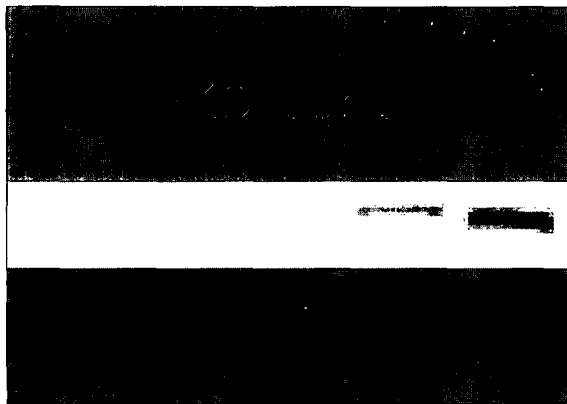


Fig. 16. Immunoblot analysis of PKC-alpha in the transformed cells. 1: 0.05%DMSO, 2: 0.01μg/ml MNNG only, 3: 0.01μg/ml MNNG only, 4: 0.01μg/ml MNNG+TPA, 5: 0.1μg/ml+TPA.

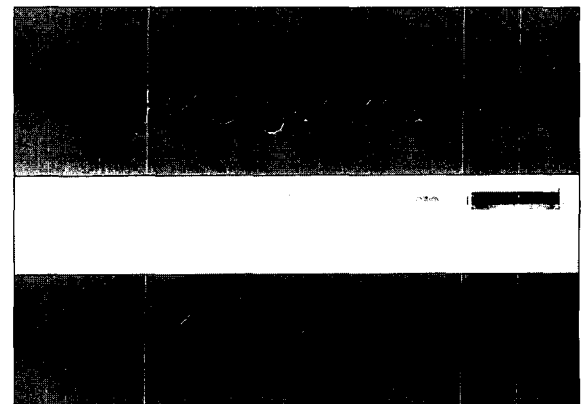


Fig. 17. Immunoblot analysis of PKC-gamma in the transformed cells. 1: 0.05%DMSO, 2: 0.01μg/ml MNNG only, 3: 0.01μg/ml MNNG only, 4: 0.01μg/ml MNNG+TPA, 5: 0.1μg/ml+TPA.

투여군에 비해 MNNG+TPA 처리군이 보다 높은 수준의 발현을 보였는데, 이들 중 MNNG 0.1μg/ml 및 TPA를 투여한 군에서 PKC-α 및 PKC-γ의 발현이 가장 높게 나타났다 (Fig. 16, 17).

IV. 고 찰

구강은 흡연이나 음주와 같은 화학적 발암물질이 쉽게 접촉할 수 있는 화학적 발암물질의 표적장기이며 구강암을 포함한 대부분의 암 발생의 근원이 되는 세포는 상피세포이다¹⁰⁾. 따라서 본 연구는 인체상피세포를 이용한 화학적 발암물질의 발암화 기전을 분석함으로써 구강암과 같은 상피세포 기원의 종양 발생기전을 이해하는 데 기여하고자 하였다.

지금까지 보편적으로 수용되는 발암과정은 다단계설이 지배적이다¹¹⁾. 따라서 대부분의 세포배양실험의 경우 일차세포(primary cell)는 발암물질에 의해 변형되지 않으나 무한한 생존기간을 얻은 불멸화 세포는 발암성을 나타낸다. 즉 세포가 염색체의 이상 등으로 지속적인 생존능력을 얻은 상태에서 외부로부터 발암물질의 침입은 세포내의 DNA 손상을 용이하게 고정시켜 세포의 발암화 현상이 증가하게 된다¹²⁾. 따라서 본 연구에서는 발암현상을 관찰할 수 있도록 장기배양의 배양이 가능하고 외부발암물질에 민감한 불멸화 세포를 이용하였다. 본 연구에 사용된 세포모형은 인체의 일차적인 상피세포를 Ad12-SV40로 불멸화시킨 세포로서 적절한 배양조건에서 지속적인 배양이 가능하며 정상적인 상피세포와 같은 표식자를 가지고 있다³⁾.

MNNG는 0.01μg/ml 투여군에서 saturation density,

soft agar colony formation, cell aggregation의 증가 및 foci의 조기 출현 등의 세포 발암성을 가장 뚜렷이 나타내었으며, 1 μ g/ml 투여군에서는 세포독성 등으로 인해 발암성의 표출이 억제된 것으로 추정된다. 본 실험 조건에서는 MNNG의 세포 발암성은 용량 의존적인 경향을 나타내었다.

MNNG는 세포의 DNA adduct를 일으키는 강력한 발암 유발물질(initiator)로 알려져 있다. 따라서 가장 널리 사용되는 발암촉진물질(promoter)인 TPA를 투여하여 인체 상피세포의 발암증진효과를 측정하였다. 0.01 μ g/ml 투여군에서 뿐만 아니라 0.1 μ g/ml군에서도 뚜렷한 세포발암성을 나타내었고 MNNG단독 투여시 보다 saturation density, soft agar colony formation, cell aggregation이 훨씬 증가함을 알 수 있었다. 또한 foci가 출현하는 시기도 단축되는 것으로 미루어 볼 때 본 연구에 사용된 세포모델의 발암 과정은 initiation을 거쳐 promotion되는 단단계 과정임을 알 수 있다. 특히 TPA의 처리시 MNNG를 처리하지 않은 군에서도 미약하나마 발암특성을 나타낸 것은 TPA의 역할이 세포 중에 상존하는 손상된 세포의 성장에 관여함을 암시하고 있다.

PKC는 세포의 성장, 신호전달에 매우 중요한 역할을 하며 PKC 활동의 변화는 세포발암화와 밀접한 관계를 가지고 있다¹³. 발암세포인 glioma cell의 경우 정상적인 astrocyte에 비해 1,000배 가량 PKC의 활성도가 높은 것으로 보고된 바 있다¹⁴. 또한 이러한 높은 PKC 활성도는 암세포의 성장과 상관성을 가지고 있으며 EGF, FGF, PDGF와 같은 성장인자에 의한 자극은 PKC 활성을 더욱 촉진시켜 세포성장을 더욱 활성화시킨다¹⁴. 이와 같이 PKC는 autocrine/paracrine factor에 의한 암세포의 성장에도 중요한 역할을 한다.

PKC의 활성은 cytosol에 있는 불활성 상태의 PKC 단백질이 세포막으로 이동하는(translocation) 양을 측정함으로써 평가할 수 있다. PKC가 세포막에 도달시 결합하는 물질은 DAG이므로 이와 유사한 구조의 phorbol ester를 투여하여 결합하는 양을 측정함으로써 세포막에 도달하는 PKC 양을 측정할 수 있다. 본 연구 결과 MNNG에 의한 PKC translocation은 용량 의존적이며 세포의 칼슘이 요구되는 것을 알 수 있었다(Fig. 1, 2). 이러한 세포의 칼슘에 의한 민감한 변화는 MNNG에 의한 PKC 활성에는 Ca²⁺ 의존적인 classical PKC isoform이 관여하고 있음을 암시하고 있다.

Hydrocortisone은 화학적 발암에 따른 암세포의 성장을 촉진시키는 것으로 알려져 있는데¹⁴ 0.1 μ g/ml hydrocortisone의 처리 결과 고농도 처리군에서 PKC의 translocation이 증가한 것은 corticosteroid에 의한 암세포의 증가에 PKC가 관여함을 보여주는 간접적인 증거로

사료된다(Fig. 3).

상피세포의 경우 corticosteroid는 confluency시 정상적인 세포의 분화를 촉진시키며, 암세포에서는 상대적으로 성장을 촉진시키는 것으로 알려져 있다¹⁵.

PKC isoform들의 각각에 대한 특이적 기질이 알려져 있지 않은 현시점에서 PKC isoform의 활성화를 측정하기 위해서는 immunoblotting으로 확인하는 방법은 가장 명확한 수단으로 생각된다⁹. 본 연구에서는 PKC의 cytosol fraction protein 양과 membrane fraction protein 양의 변화를 비율로 나타냄으로써 PKC isoform의 활성화를 효과적으로 판단할 수 있었다. PKC의 활성은 transient한 경우가 대부분이어서 발암화의 초기 단계에 PKC의 영향은 PKC와 발암화의 관련성을 추정하는 데 중요한 자료로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 MNNG를 15분간 노출시킨 후 PKC의 변화를 관찰하였는데, classical PKC의 경우 basal level에서는 모든 isoform들이 membrane fraction이 약간 높았으나 0.1 μ g/ml처리 군에서는 PKC- α 및 PKC- γ 가 뚜렷한 translocation을 보여 화학적 발암화의 초기단계부터 PKC의 활성이 시작됨을 나타내었다. 이러한 PKC의 활성은 세포성장조절의 긴밀한 항상성에 변화를 가져와 발암화와 같은 neoplastic transformation의 근원이 될 수 있음을 암시한다. 특히 PKC- γ 는 학습이나 기억 등에 중요한 역할을 하는 isoform이며 뇌세포에 매우 풍부한 PKC isoform으로 알려져 있다¹⁶.

new PKC는 칼슘에 의존적이지 아니면서 DAG에 의존적인 isoform들이다. 이들 중 PKC- ϵ 은 0.1 μ g/ml처리시 1.9배의 증가를 보였다. PKC- ϵ 은 NIH3T3와 같은 rodent fibroblast에서는 oncogene으로 작용하여 c-raf-1을 증가시키고 나아가 MAP Kinase를 활성화시키는 isoform으로 알려져 있다^{17,18}. 따라서 PKC- ϵ 의 증가는 인체 상피세포의 화학적 발암화의 초기단계의 세포조절작용을 이해하는 데 중요한 역할을 할 것으로 사료된다. 최근 보고에 의하면 PDGF receptor를 통한 PKC- ϵ 의 활성은 PLC- γ 의 작용 통로와 관련성이 있어서 PLC의 대사물인 PIP2가 PKC- ϵ 의 활성에 관여할 것으로 추정된다¹⁹. PKC- ϵ 의 과다활성은 PKC \rightarrow c-Raf-1 \rightarrow MEK1 \rightarrow MAP Kinase (Erk 1 and 2)로 가는 경로의 활성을 의미하므로 세포의 증식과 발암화 변화를 촉진시키는 원인으로 생각된다.

MNNG에 의한 atypical PKC의 변화는 감지되지 않았는데 이는 화학적 발암물질에 대한 PKC isoform의 특이성이 존재한다는 증거로서 발암화 연구에 PKC isoform 각각의 특이성 연구가 수행되어야 함을 암시하고 있다. 또한 MNNG에 의해 뚜렷한 발암특성을 나타낸 세포군에 대해 PKC발현을 분석한 결과 PKC- α 와 PKC- γ 에서 지속적인 발현의 증가가 관찰되었다. 이는 초기 단계의 PKC발현변화가 발암화가 이루어지는 시점까지 지속되고 있음을 암시

하는 자료로서 앞으로 유전자발현 변화에 대한 많은 연구의 필요성을 제시하고 있다. 본 연구는 화학적 발암물질인 MNNG가 인체발암화에 관여함을 재차 확인하면서 초기 과정에 관여하는 PKC isoform의 변화를 분석함으로써 total PKC활성이 아닌 isoform각각에 대한 변화를 확인하였다는 점에서 앞으로 인체상피세포 기원의 암생성 기전 연구에 기여할 것으로 사료된다. 또한 각각의 PKC isoform들은 세포내 분포 뿐만 아니라 기능에서도 서로 많은 차이를 보여 정확한 발암기전의 이해 뿐만 아니라 특이성 PKC inhibitor 등을 이용한 항암제의 개발에도 기초정보를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구 결과는 화학적 발암화에 관한 새로운 생화학적 정보를 제공할 수 있고 구강암과 같은 상피세포 기원의 암을 조기 발견할 수 있는 생물학적 표식자를 개발하는 데에도 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

V. 요약

구강은 흡연이나 음주와 같은 화학적 발암물질이 쉽게 접촉할 수 있는 화학적 발암물질의 표적장기이며 구강암을 포함한 대부분의 암 발생의 근원이 되는 세포는 상피세포이다. 따라서 본 연구는 인체상피세포를 화학적 발암물질인 MNNG에 노출시켜 발암화를 유도하고 이에 따른 작용 기전을 분석함으로써 구강암과 같은 상피세포 기원의 종양 발생기전을 이해하는 데 기여하고자 하였다.

인체 상피세포에 0.001 μ g/ml에서 1 μ g/ml 용량의 MNNG를 투여한 결과 용량 의존적인 세포발암성을 나타내었으며 0.01 μ g/ml 투여군이 가장 높은 암세포의 지표인 saturation density, soft agar colony formation, cell aggregation 등에서 MNNG의 단독 투여시보다 높은 발암성을 나타내었으며 최초의 foci출현시기도 단축되었다. 이와같은 결과는 Phorbol ester binding assay에서도 나타나 세포 발암화 촉진에 PKC활성이 관여함을 추정할 수 있다. PKC translocation 현상은 세포의 칼슘이 있을 경우에만 나타나 MNNG에 의한 PKC활성에 classical PKC가 관여함을 추정할 수 있었다. MNNG에 대한 초기 반응으로 cPKC의 경우 PKC- α 와 PKC- γ 가 고농도에서 활성의 증가를 보였으며 nPKC의 경우 PKC- ϵ 가 뚜렷한 활성을 보여 이들 isoform이 MNNG에 의한 발암화 초기 단계에 관여함을 암시하였다. 반면 aPKC는 어느 형태도 MNNG에 반응하지 않아 화학적 발암화 과정에 isoform의 특이성이 존재함을 입증하였다. MNNG에 의해 발암화 특성을 나타낸 세포는 PKC- α 및 PKC- γ 의 지속적인 활성 증가를 나타내어 발암의 초기단계부터 지속적인 활성을 유지하고 있는 isoform으로 추정된다. 본 연구결과 인체상피

세포의 모든 PKC isoform에 대한 발현을 분석하고 화학적 발암화에 관여하는 isoform을 선별해냄으로써 특정한 inhibitor 등을 사용한 발암화 억제제의 개발에 필요한 기초자료를 제공하였을 뿐만 아니라 구강암과 같은 상피세포 기원의 암발생 기전을 이해하는 데 기여할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Rhim JS: Neoplastic transformation of human epithelial cells in vitro. *Anticancer Res.* 9:1345-1366, 1989.
- Conney AH: induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic carbons. *Cancer Res.* 42:4875-4917, 1982.
- Rhim JS, Fujita J, Arnstein P and Aaronson SA: Neoplastic conversion of human epidermal keratinocytes by Ad12-SV40 virus and chemical carcinogens. *Science.* 232:385-388, 1986.
- Nishizuka Y: Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular response. *FASEB J* 9: 484-496, 1995.
- Saito N, Itouji A, Totani Y, Osawa I, Koide H, Fujisawa N, Ogita K and Tanaka C: Cellular and intercellular localization of epsilon-subspecies of protein kinase C in the rat brain: presynaptic localization of epsilon-subspecies. *Brain Res.* 607:214-248, 1993.
- Riedel G: Protein kinase C: a memory kinase? *Prog. Neuropsychopharmacol. & Biol. Psychiat.* 21:373-378, 1997.
- Sharif TR and Sharif M: Overexpression of protein kinase epsilon in astroglial brain tumor derived cell lines and primary tumor samples. *Int J. Oncol.* 15(2):237-243, 1999.
- Kodavanti PRS, WardTR, McKinneyJD, Waller CL and Tilson HA: Increased [3 H] phorbol ester binding in rat cerebellar granule cells and inhibition of 45 Ca $^{2+}$ sequestration in rat cerebellum by polychlorinated diphenyl ether congeners and analogs: structure-activity relationships. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 138:251-256, 1996.
- Yang, JH and Kodavanti, PRS: Possible molecular targets of halogenated aromatic hydrocarbons in neuronal cells. *BBRC.* 277: 265-272, 2001.
- Rhim JS, Jay G, Arnstein P, Price FM, Sanford KK and Aaronson SA: Neoplastic transformation of human epidermal keratinocytes by Ad12-SV40 and Kirsten sarcoma virus. *Science* 227:1250-1252, 1985.
- Farber E: The multiple nature of cancer. *Cancer Res.* 44:4217-4223, 1984.
- Chang SE: In vitro transformation of human epithelial cells. *Biochem. Biophys. ACTA.* 832:161-194, 1986.
- Hama T, Huang KP and 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* 83:2353-2357, 1986.
- Yang JH, Thraves P, Dritschilo A and Rhim JS: Neoplastic transformation of immortalized human keratinocytes by TCDD. *Cancer Res.* 52:3478-3482, 1992.
- McLean JS, Franc MC and Mackie AC: Phenotypic modification of human glioma and non-small cell lung carcinoma by glucocorticoids and other agents. *Anticancer Res.* 6:1101-1106, 1986.
- Jacobson JL and Jacobson SW: Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls in utero. *N.*

- Eng. J. Med. 335: 783-789, 1996.
17. Cacace AM, Guadagno SN, Krauss RS, Fabbro D and Weinstein IB: The epsilon isoform of protein kinase C is an oncogene when overexpressed in rat fibroblasts. *Oncogene* 8 : 2095-2104, 1993.
 18. Perletti GP, Folini M, Lin HC, Mischak H, Piccinini F and Tashjian A: Overexpression of protein kinase C epsilon is oncogenic in rat colonic epithelial cells. *Oncogene* 12:847-854, 1996.
 19. Moriya S, Kazlauskas A, Akimoto K, Hirai S, Mizuno K, Takenawa T, Fujui Y, Watanabe Y, Ozaki S and Ohno S: Platelet derived growth factor activates protein kinase C epsilon through redundant signaling pathways involving phospholipase C gamma or phosphatidylinositol 3 -kinase. *Nat l Acad Sci USA* 93: 151-155, 1996.

저자연락처

우편번호 700-422
대구광역시 중구 동인동 2-101
경북대학교 치과대학 구강악안면외과학교실
김진수

원고 접수일 2001년 05월 18일
게재 확정일 2001년 07월 02일

Reprint requests

Chin-Soo Kim
Dept. of OMFS, College of Dentistry, Kyungpook National Univ
#2-101, Dongin-Dong, Jung-Gu, Taegu 700-422, Korea
Tel. 82-53-420-5911~12 Fax. 82-53-426-5365

Paper received 18 May 2001
Paper accepted 2 July 2001