

Hydroquinone이 인체 상피세포의 발암화에 미치는 영향

손정희 · 김진수¹

서울위생치과병원, ¹경북대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실

Abstract

EFFECTS OF HYDROQUINONE ON NEOPLASTIC TRANSFORMATION OF HUMAN EPITHELIAL CELLS IN CULTURE

Jung-Hee Sohn, Chin-Soo Kim¹

Seoul Adventist Dental Hospital, Seoul, Korea

¹Department of oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Kyungpook National University, Daegu, Korea

Components of dental resin-based restorative materials are reported to leach from the filling materials even after polymerization. Hydroquinone (HQ) is one of the major monomers used in the dental resin and is known as a carcinogen. Thus, carcinogenic risk of HQ leaching from the dental resin becomes a public health concern. The present study attempted to examine the carcinogenic potentials of HQ on the human epithelial cell, which is the target cell origin of the most of oral cancers.

Cytotoxicity of HQ was observed above 50 μ M as measured by LDH assay, indicating a relatively low toxicity of this substance in human epithelial cells. The parameters of neoplastic cellular transformation such as cell saturation density, soft agar colony formation and cell aggregation were analyzed to examine the carcinogenic potential of HQ. The study showed that 2-week exposure of HQ showed the tendency of increase in the saturation density and the significant enhancement of soft agar colony formation at the highest dose, 50 μ M only. It is suggested that HQ has a weak potential of carcinogenicity. When cells were treated with HQ and TPA, a well-known tumor promoter, the parameters of neoplastic cellular transformation was significantly increased. This result indicates that the potential risk of carcinogenicity from HQ is largely dependent upon the presence of promoter.

Exposure of 50 μ M HQ increased the time-dependent apoptosis as measured by the ELISA kit. This concentration coincides with a dose of neoplastic transformation, indicating a possible link between apoptosis and HQ-induced cellular transformation. Hydroquinone generated Reactive Oxygen Species (ROS) which was evidenced by the treatment of antioxidants such as trolox and N-acetyl cysteine and the GSH depleting agent, BSO.

Antioxidants blocked the generation of ROS and the GSH depleting agent, BSO dramatically increased the ROS production. Since HQ is known to increase ROS production thru activation of transcriptional factor such as c-Myb and Pim-1, it is speculated that ROS generation by HQ plays a role in the activation of oncogene, which may lead to neoplastic transformation. In addition, ROS is involved in the alteration of signal transduction, which regulates the apoptosis in many cellular systems.

Thus, ROS-mediated apoptosis may be involved in the HQ-induced carcinogenic processes. Protein kinase C (PKC) is known to play pivotal roles in neoplastic transformation of cells and its high expression is often found in a variety of types of tumors including oral cancer. PKC translocation of PKC- α was observed following HQ exposure. Altered signaling system may also play a role in the transformation process.

Taken together, HQ leached from the dental resin does not pose a significant threat as a cancer causing agent, but its carcinogenic potential can be significantly elevated in the presence of promoter. The mechanism of HQ-induced carcinogenesis involved ROS generation, apoptosis and altered signaling pathway. The present study will provide a valuable data to estimate the potential risk of HQ as a carcinogen and understand mechanism of HQ-induced carcinogenesis in human epithelial cells.

Key words: Hydroquinone, Carcinogenicity

I. 서 론

치과용으로 사용되는 합성수지는 오랜 기간에 걸쳐 구강 내로 유출되며 이러한 유출 현상은 구강내의 pH, 타액의 성분 및 타액량 등에 의해 영향을 받는다.¹⁻⁴⁾ Hydroquinone (HQ)은 치과용 합성수지를 구성하는 중요한 성분으로 지금까지 치과용 재료 영역에서 널리 사용되고 있으며 비록 폴리머형태를 유지하더라도 구강내에서 유출이 일어나는 것으로 확인된 바 있다.⁵⁾ HQ를 비롯한 치과용수지 성분들은 세포독성, 유전독성 및 에스트로겐 활성 등을 일으키는 것으로 알려져 왔지만,⁶⁾ 구강내에서 HQ의 실질적인 유출이 일어난 것이 확인된 것은 최근의 일이기 때문에 HQ의 구강내 독성에 관한 연구는 매우 미흡하다. 따라서 HQ의 장기적이고 지속적인 노출에 의한 구강내 상피세포에 대한 독성연구가 시급한 실정이다.

HQ는 DNA와 쉽게 adduct를 형성하여 유전독성을 일으키는 대표적인 벤젠 대사물질로 알려져 있다.⁷⁾ HQ에 의한 c-Myb, Pim-1 과 같은 전사인자(transcriptional factor)의 과다 발현은 발암화와 밀접한 관계를 가지고 있으며 활성기 산소의 생성 및 증가에도 관여한다.⁸⁻¹⁰⁾ 그 밖에도 HQ는 면역체계 활성을 억제하고 세포사멸화(apoptosis)에 영향을 주며 세포 간의 신호전달 기작 변화에도 관여하는 것으로 알려져 있다.¹¹⁾ 특히 gap junction protein간의 신호전달 억제에 암을 일으키는 중요한 기전의 하나로 추정된다.¹²⁾

HQ에 대한 발암성 연구는 매우 다양하나 대부분은 조혈 기관과 관련된 것이며 고형암에 대한 연구는 매우 빈약한 실정이다.¹³⁾ 대부분의 구강암은 편평상피세포암(squamous cell carcinoma)과 같은 고형암이며 구강점막층을 구성하고 있는 상피세포가 주요 표적이다. 따라서 HQ에 의한 구강암 관련성을 연구하기 위해서는 편평상피세포암의 기원이 되는 상피세포 모델을 이용한 연구가 요구된다. 그러므로 본 연구에서는 인체 피부조직에서 유래된 각질형성세포(keratinocyte) 모델을 사용하였다. 인체 피부조직 유래 상피세포는 치과용 재료의 생물학적 영향을 평가하는데 사용

되고 있을 뿐만 아니라 구강 각질형성세포 모델과 유사점이 많은 동시에 취급이 용이해 구강세포모델의 대용으로도 활용되고 있다.^{14,15)} 본 연구에서 사용된 불멸화 인체상피세포 모델은 정상적인 세포 특성을 유지하면서도 지속적으로 배양이 가능하여 지금까지 화합물의 발암잠재력을 평가하는데 다양하게 활용되었을 뿐만 아니라,^{16,17)} 또한 치과용 합성수지의 구강 내 유출과 같은 장기적인 노출에 의한 발암성을 효율적으로 평가하는데 유용하게 사용될 수 있는 세포모델이다.

따라서 본 연구에서는 불멸화 인체상피세포에 치과용 합성수지에서 구강 내 유출이 확인된 HQ를 노출시켜 HQ의 발암 잠재력을 평가하고 그 작용기전을 확인하고자 세포사멸화, 활성기 산소 생성, 신호전달기작, 염증관련인자 등의 관련성을 연구하였으며, 또한 치과용 재료에 대한 위해성 평가의 기초 자료를 제공하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 사용 시약 및 재료

Hydroquinone (HQ), hydroquinone monoethyl ether (MEHQ), TPA, agarose, 및 기타 시약들은 Sigma-Aldrich사 제품을 사용하였고 DMEM 등 세포배양관련 시약은 Gibco BRL사, Reactive oxygen species의 평가와 관련된 시약은 Promega사를 이용하였다.

2. 인체 상피 세포배양

세포 배양 조건은 37°C의 5% CO₂ incubator 에서 배양하고 배양액 DMEM에 EGF, FBS, 하이드로코티존(5 µg/ml), 항생제 등을 넣어 사용하였다. 세포가 confluence를 이루는 시점에서 1:3으로 계대 배양하였다. 본 연구에는 Ad12-SV40에 의한 인체불멸화 상피세포(RHEK-1)의 passage-94를 사용하였다.

3. LDH assay (HQ 및 MEHQ의 인체세포독성 시험)

세포에 HQ 및 MEHQ를 24시간 처치하고 원심 분리하여 세포와 세포배양액을 분리하였다. 분리된 세포는 Triton X-100을 최종 1%의 농도로 가하고 30분간 방치하여 용해시켰다. 세포배양액과 세포 용해체 각각에 4.6 mM pyruvic acid 100 μ l와 0.4 mg/ml β -NADPH 100 μ l를 넣고 혼합하여 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. Lactate dehydrogenase (LDH) 유리는 세포배양액과 세포 용해체에서 측정된 각각의 LDH 활성도를 용량으로 보정하여 총 LDH에서 유리된 LDH의 백분율로 나타내었다.

4. 화학물질의 처리

70% confluence를 보이는 인체상피세포에 hydroquinone (1, 5, 10, 30, 50 μ M)을 함유하는 배양액을 14일간 단독 처리하거나 TPA (100 ng/ml)와 함께 처리하였다. 세포가 100% confluence를 이루는 시점에서 1:3의 비율로 계대 배양하였다. 그 후 Passage에 따라 세포 발암성을 분석하였다. 세포사멸화 측정에는 hydroquinone을 12, 24, 48시간 처리하였으며 활성기 산소 생성, 염증인자 변화 분석에는 hydroquinone을 24시간 처리하였다.

5. Cell density 측정

세포의 contact inhibition의 변화를 측정하기 위해 5×10^3 cells/cm²를 용기에 넣고 배양하였다. 배양액은 3일마다 새롭게 갈아주고 세포가 confluence한 상태에 도달하였을 때 단위 면적당 세포 수를 계산하였다.¹⁹⁾

6. Soft agar colony formation.

Noble agar 1.2 g에 dH₂O 35 ml을 넣고 30분간 고압멸균 소독한 다음 15 ml의 dH₂O와 FBS 25 ml, 2X EMEM 50 ml을 넣어 0.9% agar base를 만들었다. 5 ml의 agar base를 Petri dish에 넣은 다음 밤새 37°C incubator에 두었다. 0.9 g Noble agar에 dH₂O 50 ml을 넣어 30분간 고압멸균 소독한 다음 dH₂O 7.2 ml, FBS 7.2 ml 2X EMEM 14.4 ml을 넣어 0.36% top agar를 만들었다. 준비된 base agar에 1×10^4 cells/dish를 포함하는 top agar용액을 2 ml씩 Petri dish에 넣었다. 그 후 colony형성의 크기가 0.3 mm 이상인 colony수를 측정하였다.¹⁹⁾

7. Cell aggregation 측정

Soft agar assay와 같은 방법으로 Base agar를 만들어

5 ml 씩 Petri dish에 넣었다. 밤새 37°C incubator에 둔 다음, 10% FBS를 포함한 배양액에 10^5 cells/dish로 세포를 접종한 후 4일이 지난 시점에서 배양액상에 성장하는 1 mm 이상 크기의 colony 크기 및 숫자를 측정하였다.¹⁹⁾

8. Apoptosis 분석

Cell death detection ELISA Plus kit (Roche, Germany)을 이용하여 세포사멸을 측정하였다. 50 μ M의 HQ를 24시간 노출시킨 후 배양액을 걸어내고 lysis buffer로 30분간 세척시킨 후 1.5 ml의 Effendorf tube에 옮기고 200 g로 10분간 원심 분리하였다. oligonucleosome을 포함하고 있는 상층액을 취한 후 microplate reader로 405 nm에서 DNA fragmentation을 측정하였다.

9. ROS (Reactive Oxygen Species) assay

DCFH-DA는 지질 친화성 물질로서 세포내에 잘 침투되며 침투된 이 화합물은 세포내에서 ROS 등에 의해 형광물질인 DCF로 변화된다. 따라서 DCF의 측정을 통해 세포내 ROS의 활동을 측정하는 방법으로 널리 사용되고 있다. 12-well culture plate의 세포에 hydroquinone을 24시간 노출시킨 후 lock's buffer로 세척하고 형광물질인 DCFH-DA를 15분간 암실에서 처리한 후 다시 세척하고 NaOH를 넣어 cell lysis한 다음 luminescence spectrometer를 사용하여 excitation 488 nm, emission 525 nm에서 측정하였다. 그 밖의 자세한 절차는 Fonnum¹⁸⁾의 방법을 적용하였다.

10. Immunoblot assay

PKC isoform의 세포내 단백질 수준을 측정하기 위해 원심분리기로 membrane fraction과 cytosolic fraction으로 분리한 다음 PKC isoform 각각의 antibody를 사용하였다. 세포 용해체(20 μ g)를 전기 영동한 다음 Nitrocellulose paper를 semi-dry cell (Bio Rad)에 넣고 15V로 30분 동안 blotting하였다. blot이 끝난 paper에 PKC isoform antibody를 적정비율로 희석한 용액으로 반응시킨 후 2nd antibody를 처리한 후 Pierce사의 Superfluoro system으로 측정하였다.

11. RT-PCR

total RNA를 추출한 다음 1 μ g의 total RNA에 oligo d(T) primer를 넣고 60°C에서 5분간 두어 poly A⁺를 얻었다. 30 μ l RT mix (0.1 M DTT, RNA guard, RT-buffer,

dNTP, dH₂O, RT)를 각 sample에 넣은 다음 37℃에서 60분, 70℃에서 10분 둔 다음 얼음위에 두었다. cDNA과정이 끝나면 2.5 μl of cDNA에 47.5 μl of PCR mix [PCR-buffer, dH₂O, Taq.pol, 5'-primer, 3'-primer, dNTP-mix를 넣은 다음 primer에 따라 Annealing temp 및 cycle 수를 최적정 수준으로 정하였다. 10% PAGE에 전기영동하고 gel dryer로 말린 후 X-ray cassette에 넣어 영하 75℃ 보관 후 현상하였다.

12. 성적 검증

유의성 검증은 Student's t-test로 실시하며 유의도는 $P < 0.05$ 로 하였다.

Ⅲ. 성 적

1. HQ 및 MEHQ의 인체세포 독성 평가

Monoethyl ether hydroquinone (MEHQ)은 치과용 합성수지의 안정제로 사용되는 monomer로서 HQ와 유사한 용도로 사용된다. 따라서 HQ와 MEHQ의 세포독성 평가를 통하여 본 실험에 가장 적합한 물질과 실험용량을 선택하고자 LDH assay를 실시하였다. HQ의 경우 0.01 μM부터 200 μM에 걸쳐 24시간 노출 후 LDH를 측정하고 50 μM부터 200 μM까지 유의한 수준의 증가를 나타내었다(Fig 1). 0.1 μM에서 200 μM의 MEHQ를 24시간 노출 후 LDH를 측정하고 HQ와 유사한 반응을 나타내었다(Fig

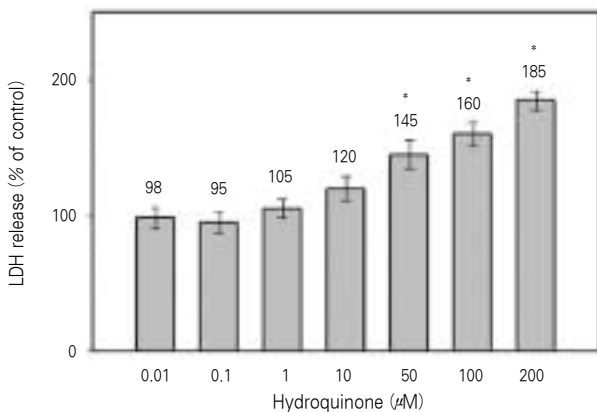


Fig. 1. LDH assays for the cytotoxicity of hydroquinone (HQ) exposed to human epithelial cells in culture. The cells were incubated with HQ for 24hours, after which LDH activity was measured at 340 nm by spectrophotometer as described in materials and methods. Values represent the mean \pm SD of triplicate determinations.

2). 본 연구에서는 HQ와 MEHQ간의 세포독성 차이가 현저하게 차별화 되지 않음으로 발암성에 대한 연구가 비교적 잘 이루어져 있는 HQ를 실험물질로 선정하였다. 이 결과를 바탕으로 인체 세포에 치명적인 영향을 주지 않으면서 발암성 등을 관찰 할 수 있는 1, 5, 10, 30, 50 μM HQ를 실험 노출 용량으로 설정하였다.

2. 인체세포 발암화 평가

세포독성이 없는 용량 내에서 나타나는 인체 세포의 발암화를 평가하기 위해 세포 발암화의 지표로서 cell saturation density, soft-agar colony formation 및 cell aggregation의 분석을 사용하였다. 이들 지표는 contact inhibition, anchorage independence, cell adhesion 등의 발암 세포 특성을 각각 나타냄으로 세포의 발암화를 예측하는 방법으로 널리 사용되고 있다.¹⁷⁾

본 실험에서는 HQ를 14일간 투여한 후 Saturation density, Soft-agar Colony formation 및 Cell aggregation 분석을 실시하였다. Saturation density의 경우 용량에 따른 변화가 미미하였는데, 50 μM에서는 유의한 수준은 아니었으나 높게 나타나는 경향을 나타내었으며 Soft agar colony formation의 경우 용량 의존적인 반응을 나타내지 않았으며 50 μM에서 2.75배의 유의한 증가를 나타내었고 Cell aggregation의 경우, 전체 용량 범위 내에서 유의할 만한 colony 형성 변화를 관찰할 수 없었다(Table 1).

14일간 HQ를 처리한 후 세포를 passage하는 정도에 따라 나타나는 foci의 발현정도를 측정하였다. foci는 손상된

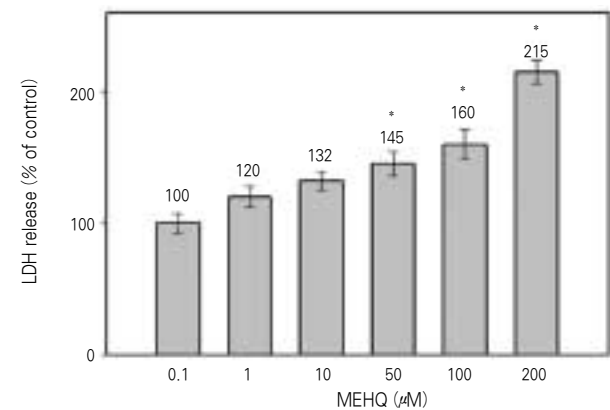


Fig. 2. LDH assays for the cytotoxicity of monoethyl ether hydroquinone (MEHQ) exposed to human epithelial cells in culture. The cells were incubated with MEHQ for 24hours, after which LDH activity was measured at 340 nm by spectrophotometer as described in materials and methods. Values represent the mean \pm SD of triplicate determinations.

세포군이 동종 세포확장(Clonal expansion)을 통해 군집을 이루는 세포군으로서 이것의 출현은 발암성이 높을수록 빠른 passage에서 나타난다. Foci의 첫 출현은 계대배양 후 48일이 지난 passage-7에서 나타났으며 농도는 10 μ M와 50 μ M이었다. 62일이 경과한 passage-9에서는 모든 용량에서 foci가 출현했으며 고용량인 50 μ M에서 foci의 크기 및 숫자가 뚜렷이 증가하였다. 이렇게 고용량에서만 세포발암성의 증가를 나타낸 것은 saturation density, soft agar colony formation 실험의 결과인 낮은 발암화 패턴과 유사하여 HQ의 미약한 세포발암성을 보여주었다(Table 2).

HQ의 발암성에 발암촉진제(promoter)로 잘 알려진 TPA가 미치는 영향을 관찰하였다.

Saturation density의 경우 HQ를 단독 처리하였을 때는

유의한 수준의 증가가 없었으나 TPA와 병용 투여시는 대조군에 비해 30 μ M에서는 1.41배, 50 μ M에서는 2.11배의 유의한 증가를 보였다. 또한 soft agar colony formation에서는 10 μ M, 30 μ M 및 50 μ M에서 2.57배, 3.42배, 4.42배의 증가를 각각 보였다. 이러한 결과 역시 HQ를 단독으로 투여시보다 더 낮은 용량에서 더 큰 폭으로 증가하여 HQ와 TPA사이에 상호작용이 존재함을 알 수 있었다(Table 1, 3).

HQ와 TPA의 상호작용을 passage별로 측정하기 위하여 passage에 따른 foci의 출현을 관찰하였다. Foci의 출현은 노출 후 40일이 경과한 passage-6의 30 μ M부터 시작되었으며 44일이 경과 한 passage-7에서는 TPA가 노출된 전 용량에서 foci가 발현하였으며 고용량에서 foci의 크기 및 숫자는 다소 증가하였다. 54일이 지난 passage-9에서는

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

Dose (μ M)	Saturation density ($\times 10^5/cm^2$)	Soft agar colony formation (%)	Cell aggregation (> 1 mm) [†]
Control	3.2 \pm 0.02	0.08 \pm 0.02	-
1	3.1 \pm 0.04	0.08 \pm 0.01	-
5	3.5 \pm 0.08	0.12 \pm 0.04	-
10	3.8 \pm 0.07	0.13 \pm 0.06	-
30	3.8 \pm 0.06	0.11 \pm 0.04	-
50	5.2 \pm 0.12	0.22 \pm 0.08*	-

*: P < 0.05 as compared to control cells

†: +: > 5 colony, ++: > 10 colony

The data are mean \pm SD with 3 different counts.

Table 2. Morphological alteration of human epithelial cells treated with Hydroquinone by passage levels

Passage	Cumulative no. of days in culture after transfection	Dose (μ M)					
		Control	1	5	10	30	50
1	14
3	21
5	38
6	42
7	48	.	.	.	+	.	+
9	62	+	+	+	+	+	++

+: moderate, ++: severe

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

Dose (μ M)	Saturation density ($\times 10^5/cm^2$)	Soft agar colony formation (%)	Cell aggregation (> 1 mm) [†]
Control	3.4 \pm 0.06	0.07 \pm 0.02	-
TPA only	3.8 \pm 0.02	0.09 \pm 0.01	-
1	3.8 \pm 0.07	0.10 \pm 0.01	-
5	3.7 \pm 0.04	0.09 \pm 0.02	-
10	4.2 \pm 0.09	0.18 \pm 0.03*	+
30	4.8 \pm 0.12	0.24 \pm 0.04*	+
50	7.2 \pm 0.10*	0.31 \pm 0.03*	++

*: P < 0.05 as compared to control cells

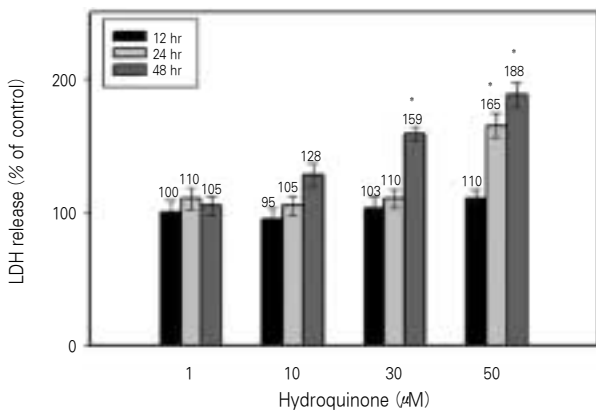
†: +: > 5 colony, ++: > 10 colony

The data are mean \pm SD with 3 different counts.

Table 4. Morphological alteration of human epithelial cells treated with Hydroquinone and TPA (100 ng/ml) by passage levels

Passage	Cumulative no. of days in culture after transfection	Dose (μM)						
		Control	TPA only	1	5	10	30	50
1	14
3	21
5	36
6	40	+	+
7	44	.	+	+	+	+	++	++
9	54	+	+	+	+	+	++	++

+ : moderate, ++ : severe

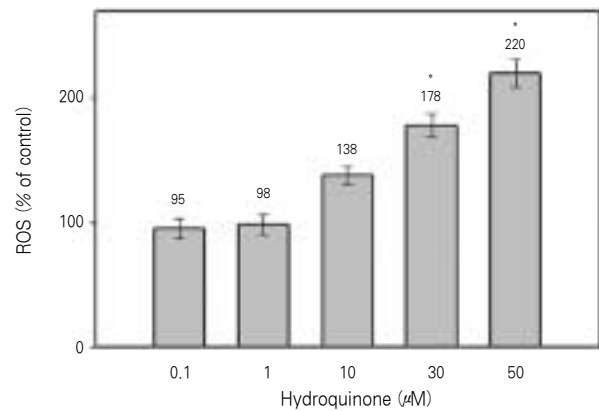
**Fig. 3.** Apoptotic effects of human epithelial cells following 50 μM hydroquinone exposure for 12, 24, 48hrs. Apoptotic cells were measured by the cell death detection ELISA Plus (Roche, Mannheim, Germany). Values represent the mean \pm SD of triplicate determinations.

control을 포함한 모든 용량에서 foci가 나타나 세포발암성의 한계 지점에 도달하였다. 이 결과는 TPA와 동시 노출시 foci의 출현 시기가 앞당겨 지는 것을 확인함으로써 TPA와 HQ 사이의 세포 발암화 상호작용이 있음을 입증하였다 (Table 4).

3. 세포사멸화(apoptosis)에 미치는 영향

인체상피세포의 발암화기전은 정상적인 세포의 사멸화과정을 억제하여 발암세포에 상대적으로 증식에 유리한 환경을 제공하는 것이 포함되어 있다. 따라서 HQ처리시 나타나는 세포사멸화 관련 인자의 분석을 통하여 발암화에 미치는 영향을 분석하고자하였다. DNA-histone 항체를 이용한 ELISA분석을 통하여 DNA fragmentation을 평가하였다.

HQ를 12, 24, 48시간 노출 후 용량별 및 시간별 DNA fragmentation변화를 측정된 결과 1 μM 에서는 아무런 변화가 나타나지 않았으나 10 μM 부터 50 μM 까지는 노출 시간 의존형의 증가를 나타내었다. 특히 50 μM 에서는 48시

**Fig. 4.** Effects of ROS generation with exposure to hydroquinone for 24hrs. DCFH-DA was measured by luminescence spectrometer as described in materials and methods. Values represent the mean \pm SD of triplicate determinations.

간 노출 후 1.88배의 증가를 나타내었다(Fig. 3). 이러한 결과는 HQ가 50 μM 이라는 다소 높은 농도에서 노출시간 의존적 세포사멸 효과를 일으킴을 입증하는 자료로서 HQ에 의한 용량 및 시간에 따른 반응 관계를 설정하는데 중요한 자료가 될 것으로 사료된다.

4. 활성기 산소(ROS)의 생성

HQ는 벤젠의 대사물질 형태로서 활성기 산소 발생이 발암화의 주요기전으로 추정되고 있다.¹⁰⁾ 그러나 대부분의 연구는 조혈세포 모델 등에서 이루어진 반면 편평상피세포와 같은 고형암에서 ROS 생성은 잘 확인되어 있지 않다. 따라서 ROS의 생성과 발암화 기전을 분석하기위해 ROS의 생성을 화학적으로 분석하였다. 10 μM 이하에서는 유의한 수준의 ROS생성 증가가 나타나지 않았으나 30 μM 와 50 μM 에서는 1.78배 및 2.20배의 증가를 각각 보였다(Fig. 4). ROS의 생성은 다른 요인에 의해서도 일어날 수 있으므로 본 결과에서 나타난 증가가 HQ의 노출에 의한 것인지를 확

Table 5. Experimental conditions of RT-PCR analysis

Gene	Primer Sequence 5' → 3'	T (°C)	Number of cycle
IL-1	F: ATGGCGAGAAGTACCTAAGCT	58	28
	R: ACACAAATTGCATGGTGAAGT		
IL-6	F: ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGC	62	25
	R: GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG		
TNF- α	F: ATGAGCACAGAAAGCATGATC	60	30
	R: TACAGGCTTGTCACCTCGAATT		
GAPDH	F: GCACAGTCAAGGCCGAGAAT	58	25
	R: GCCTTCTCCATGGTGGTAA		

인 할 필요가 있다. 따라서 ROS의 차단제인 trolox, N-acetyl cysteine (NAC) 전처리 한 후 ROS의 생성이 억제 되는지를 분석하였다. 50 μ M HQ 단독 처리 시 2.05배의 증가를 보였으나 trolox 및 NAC 전처리 시 ROS증가는 억제되었다. 또한 ROS의 생성이 HQ에 의한 것임을 확인하기 위해 GSH의 고갈 인자인 buthionine sulfoximine (BSO)를 처리시 ROS생성은 HQ단독 처리보다 1.77배 증가하였다(Fig. 5). 이러한 결과는 HQ가 인체 상피 세포내에서 ROS의 생성 및 증가를 일으키는 증거로 판단된다.

5. 신호전달체계에 미치는 영향

HQ의 발암화 기전에는 gap junction protein의 억제와 같은 신호전달기작이 관여하고 있다.¹²⁾ 본 연구에서는 protein kinase C (PKC)에 관한 영향을 분석하여 HQ가 인체 세포에 미치는 영향을 규명하고자 하였다. PKC는 제2차 신호전달물질의 변화에 따라 민감하게 활성의 변화를 나타

내며 이를 통하여 세포간의 신호전달기작 조절에 중요한 역할을 하는 효소이다. 본 연구에서는 immunoblot 방법을 이용하여 각각의 PKC 이성질체의 활성을 측정함으로써 HQ가 인체세포의 신호전달기작에 미치는 영향을 분석하였다.

PKC- α 의 경우 cytosol fraction에서는 변화가 없었으나 membrane fraction에서는 50 μ M 노출에서 PKC 단백질의 증가가 나타났다. 이는 PKC 단백질이 cytosol에서 membrane 쪽으로 이동하여 DAG등과 결합하는 활성형으로 전환되었음을 의미함으로 30, 50 μ M 노출에 의한

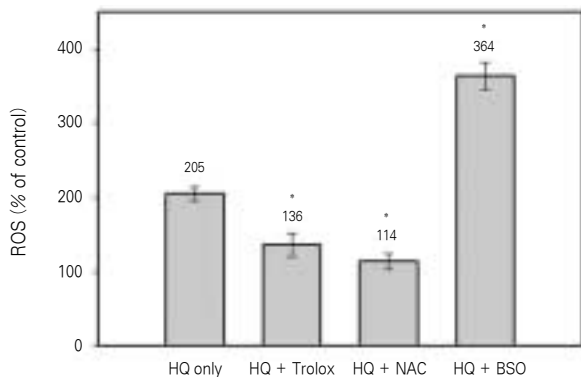


Fig. 5. Effects of ROS inhibitors and enhancer following exposure to hydroquinone for 24hrs. Trolox, N-Acetyl Cysteine (NAC) and BSO were treated 1 hr prior to hydroquinone exposure. DCFH-DA was measured by luminescence spectrometer as described in materials and methods. Values represent the mean \pm SD of triplicate determinations.

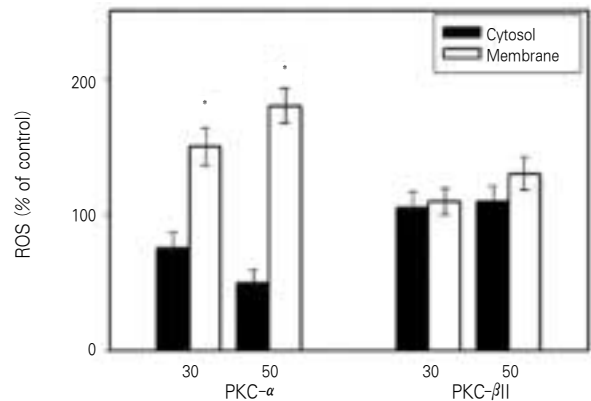
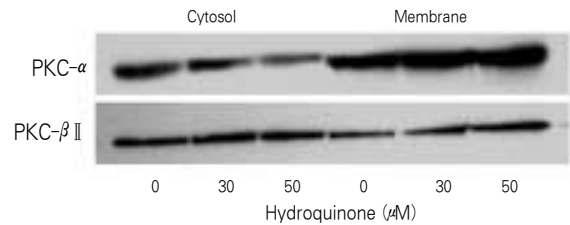


Fig. 6. Western blot analysis of PKC isozymes following hydroquinone exposure. Representative immunoblot profiles of PKC- α and - β II in cytosolic and membrane fractions were presented. Each band was quantified by densitometric analysis and the corresponding histogram was constructed as % of control. The values are means \pm SD from three separate experiments. Statistical significance was set to * P < .05.

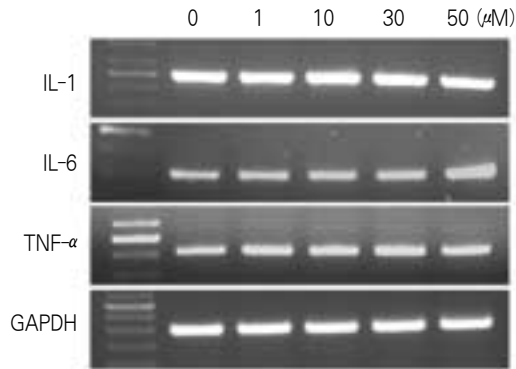


Fig. 7. RT-PCR analysis of interleukin-1, -6 and TNF- α following hydroquinone exposure. RT-PCR analysis was performed as described in materials and methods. The representative bands of each gene following the triplicate experiments were presented.

PKC- α 의 활성증가를 나타낸다. PKC- β II의 경우 cytosol 및 membrane fraction에서 HQ 노출에 의한 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 6).

6. 염증인자 및 성장관련인자의 변화

HQ에 의한 세포독성 이외의 염증 및 성장관련성을 평가하기 위하여 RT-PCR을 통한 interleukin-1, -6 및 TNF- α 의 mRNA 변화를 분석하였다. 고용량인 50 μ M의 경우에서만 IL-6의 변화가 나타난 반면 다른 용량과 인자에서는 변화를 보이지 않아 상대적으로 HQ의 염증유발 효과는 낮은 것으로 추정되었다(Fig. 7).

IV. 고 찰

치과용 합성수지를 구성하는 성분들은 시간이 지남에 따라 구강내로 유리될 수 있으며 유리된 물질들은 점막 자극, 상피 세포 증식, 구강 과민 반응 등을 나타내는 것으로 알려져 있다. 특히 치과용 합성수지의 중요한 성분으로 널리 사용되고 있는 Hydroquinone (HQ)은 최근의 분석보고서를 통해 구강 내로 유출되고 있음이 확인되었다.⁵⁾ 따라서 HQ의 구강내 위해성에 대한 우려가 현실화되고 있다. 치과용 합성수지 구성성분의 구강내 유출은 오랜 시간을 두고 서서히 일어날 수 있기 때문에 장기간 노출에 따른 구강암 등과 같은 질병 발생이 우려된다. HQ는 발암성이 있는 물질로 알려져 있지만 지금까지는 주로 혈액암 등에 국한되어 연구되어 왔고 구강암과 같은 고형암에 대한 관련성은 알려져 있지 않다. 본 연구는 HQ에 의한 구강암 가능성을 인체상

피세포를 이용하여 분석하고 이와 관련된 기전을 밝힘으로써 구강암 발생원인 규명과 이해력 향상에 기여하고자하였다.

본 연구결과 saturation density, soft agar colony formation 및 cell aggregation의 측정에서 saturation density 경우에는 50 μ M에서 약 1.62배의 증가를 보이며, soft agar colony formation에서 50 μ M에서만 유의한 수준의 증가를 나타내었고, cell aggregation에는 영향을 주지 않았다. 또한 HQ의 인체세포 발암성을 판단하기 위해 세포 계대배양에 따른 foci의 출현 시기를 관찰한 결과 50 μ M의 passage-7에서 처음 나타나기 시작하였다. saturation density에서와 마찬가지로 foci의 출현시기도 고농도에서만 관찰 되었다. passage-9에서는 모든 용량에서 foci가 나타났는데 이러한 현상은 foci의 출현이 발암성을 가름할 수 있는 한계를 초과한 것을 의미한다. 따라서 고용량을 제외한 낮은 농도에서는 세포발암화의 지표에 증가를 보이지 않아 HQ의 인체상피세포에 대한 발암력은 낮은 것으로 판단된다. 또한 본 실험에 사용된 농도가 합성수지에서 유리 될 것으로 추정되는 용량보다 훨씬 높다는 점에서 일상적인 구강 내 HQ의 노출에 따른 발암성은 매우 낮은 것으로 추정된다. 그러나 구강 내 노출이 오랜 시간을 두고 지속적으로 일어난다는 점에서 발암 가능성이 없다고 추론하기에는 부족한 점이 많으며 고용량에서 발암성을 보인 것은 주변 환경에 따라 발암성의 변화가 올 수 있음을 암시한다.

HQ와 같은 화학적 발암물질은 다단계 과정을 거쳐서 암을 일으키는 것으로 알려져 있다.²⁰⁾ 따라서 발암을 일으키는 물질이 DNA의 손상을 주면 이러한 손상된 유전자 정보를 다음 세대의 세포로 전달되는 과정을 촉진시키는 발암 촉진제의 역할이 매우 중요한 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 HQ의 발암성이 매우 낮으나 주변환경에 존재하는 발암촉진제 등과 함께 노출 시 HQ에 의한 발암화가 증가 될 수 있는지를 확인 하고자 하였다. 이를 위하여 발암 촉진제로 잘 알려진 TPA를 동시에 노출 시키고 발암화 지표를 분석한 결과 모든 지표에서 상승이 일어나 발암촉진제에 의한 상승작용이 존재함이 확인되었다. 특히 발암성의 상승은 LDH assay에서 세포독성을 나타낸 50 μ M에서 더욱 뚜렷하였는데 이것은 세포독성과 관련성이 있을 것으로 추정된다. 따라서 고용량에 의해 손상된 세포가 TPA와 같은 발암 촉진 물질에 의해 지속적으로 증식되어 세포 발암화 지표의 상승을 가져온 것으로 추정된다. 따라서 본 연구를 통하여 HQ자체의 발암력은 매우 미약하나 그 발암성을 촉진 시킬 수 있는 주변 환경의 물질에 의해 예상 밖의 발암력을 발휘 할 수 있음을 암시하고 있다. 특히 페놀류 화합물과 HQ 사이에는 발암력의 상승작용이 있는 것으로 알려져 있으며 구강세척제 등 일부 치과 영역에서 사용되고 있는 제제의 성분에 따라 HQ의 발암성에도 영향을 미칠 수 있음

을 의미한다.^{21,22)} 따라서 앞으로 치과영역에서 사용되는 재료 중 HQ와의 상호작용이 있는 물질을 확인하여 구강암 등을 예방하기 위하여 HQ와 병용사용을 금지하여야 할 것으로 사료된다.

LDH assay 결과 50 μ M에서는 세포독성을 나타내었다. 본 실험에 사용된 용량 중 유일하게 세포독성을 나타내는 용량이다. 또한 이 용량은 HQ 단독 투여에 따른 발암성을 나타낸 유일한 용량이기도 하다. 따라서 이 결과는 세포독성이 발암화 과정에서 매우 중요한 역할을 하고 있음을 입증하는 자료이다. 조직 손상을 치유하는 과정에서 나타날 수 있는 보상 기전에 의한 세포 증식 및 손상되기 쉬운 DNA복제 과정 등은 발암 과정에서 핵심적인 부분으로 알려져 있다. 클로로포름에 의해 간 조직이 손상되면 이를 보상하기 위해 일어나는 세포 증식은 간암을 일으키는 발암기전이 된다²³⁾. 즉 조직 손상을 보상하기 위한 세포분열의 비정상적인 증가가 발암 위험을 증가시키는 DNA복제의 원인이 될 수 있다. 따라서 본 연구에서 나타난 HQ의 세포 발암화에는 세포독성에 의한 세포증식관련 발암기전이 관여하고 있을 것으로 추정된다.

세포사멸화(apoptosis)는 세포 증식과 균형을 이루며 정상적인 조직의 활동을 보장하는 기능이다. 세포사멸화가 손상된 발암 가능한 세포에서 일어나지 않을 경우 손상된 세포가 상대적으로 정상적인 세포에 비해 증식에 유리한 위치에 있게 된다. 따라서 세포사멸화의 변화는 암조직의 지속적인 성장에 중요한 역할을 할 수 있다. 본 연구에서 세포사멸화를 측정하여 본 결과 30 μ M 과 50 μ M에서 노출 시간 의존적인 증가가 나타났다. 따라서 HQ는 고용량에서 세포 발암화 지표의 변화와 함께 세포사멸의 변화에도 영향을 주는 것으로 판단된다.

성기산소(ROS)는 DNA adduct를 형성하는 등 DNA 손상에 직접적으로 관여하여 발암화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 특히 ROS는 신호 전달 체계를 변환시키기에 따른 다양한 세포 조절의 변화를 가져오는 것으로 알려져 있다. ROS는 ERK-1,-2, Jun NH2-terminal kinase, MAPK 등의 신호 전달 체계의 활성화를 통한 세포 사멸화에도 관여하고 있다.²⁷⁾ 본 연구는 HQ가 ROS의 생성에 관여하고 있음을 확인하였다. Trolox, NAC와 같은 항산화물에 의한 ROS의 차단 효과와 BSO와 같은 GSH 고갈 유발 물질에 따른 ROS의 급격한 증가는 HQ가 인체 세포에서 ROS를 효율적으로 생성함을 입증하는 결과로서 ROS생성이 인체세포 발암화 과정의 시발점이 될 수 있음을 암시하고 있다. 또한 ROS의 생성은 세포사멸화(apoptosis)와도 밀접한 관계가 있으므로 HQ에 의한 세포사멸화의 증가는 ROS와 관련성이 높을 것으로 추정된다.²⁸⁾ ROS의 생성은 세포사멸화와 같은 세포의 후기 조절에 영향을 줄 수 있으므로 HQ에 의한 ROS 생성이 신호 전달 체계의

변환을 일으키고 이에 따른 세포 조절의 변화가 세포사멸화를 유발 시킬 가능성이 높다. HQ는 c-Myb 및 Pim-1 과 같은 전사인자의 활성을 증가시키고 이로 인하여 ROS 생성이 증가되는 것으로 알려져 있다.⁸⁾ 따라서 HQ에 의한 ROS의 생성 증가는 단순한 유리기(free radical)의 증가 뿐 만 아니라 c-Myb와 같은 종양인자(oncogene)의 과다 발현이 발암화에 관여 되어 있음을 의미한다. 하지만 이와 같은 현상이 인체상피세포에서도 일어나는지 확인 하기 위하여 앞으로 보다 정확한 ROS 억제제 등의 사용을 통해 입증 되어야 할 것이다.

protein kinase C(PKC)는 인산화 과정을 통한 세포 증식 및 종양 발생과 관련된 신호전달인자에서 중요한 역할을 한다. PKC는 특정단백질의 serine기와 threonine기를 인산화 시키는 역할을 하며 세포 성장 및 분화와 같은 세포의 필수적인 기능을 조절한다.²⁴⁾ PKC는 11개의 subspecies로 구성되어 있고 활성특성에 따라 크게 3가지로 분류하는 데 classic PKC, new PKC 및 atypical PKC이다. classic PKC는 α , β I, β II, γ isoform으로서 Ca^{2+} 과 diacylglycerol(DAG)에 의존적이며 new PKC는 δ , ϵ , η , θ isoform 이 이에 속하며 Ca^{2+} 에는 의존적이지 않으며 DAG에 의존적이다. atypical PKC는 λ , μ , ζ isoform이며 Ca^{2+} , DAG 모두에 의존적이지 않다. 이러한 PKC isozyme들은 세포내에 존재하는 부분의 분포 및 기능이 세포에 따라 서로 다르다. 그러므로 PKC의 역할을 입증하기 위해서는 PKC isozyme 특이적인 반응이 분석되어야한다. 특히 구강암의 경우 특정한 PKC isozyme의 관련성이 있는 것으로 알려져 있으며 salivary adenoid cystic carcinoma (SACC)에서는 PKC- α , PKC- β II등의 활성이 감소하고²⁵⁾ oral cavity carcinoma의 경우 PKC- α , PKC- β , PKC- γ 등이 증가한 것으로 보고 된 바 있다.²⁶⁾ 본 연구결과 PKC- α 의 경우 50 μ M의 membrane fraction에서 PKC 단백질의 이동이 관찰되어 높은 용량의 노출시 PKC- α 의 작용에 영향을 주는 것으로 나타났다. 그러나 PKC- β II의 경우 PKC 단백질의 세포막으로의 이동은 관찰 되지 않아 특정 isozyme의 특이적인 반응이 세포 발암화에 관여할 것으로 추정된다. 그러나 PKC isozyme의 기능은 세포의 형태나 실험 조건에 따라 매우 다양하므로 PKC의 역할 규명을 위해 다양한 조건과 실험체계에서 서로 다른 PKC isozyme에 대한 연구가 앞으로 필요 할 것이다.

HQ의 독성에는 성장인자 및 염증인자가 관여하고 있다. RT-PCR 분석 결과 고용량인 50 μ M의 경우에서만 IL-6의 변화가 나타난 반면 다른 용량과 인자에서는 변화를 보이지 않아 상대적으로 HQ의 염증유발 효과는 낮은 것으로 추정되며 앞으로 보다 다양한 사이토카인에 대한 발현 연구가 요구된다.

본 연구는 치과용 합성수지 구성성분의 유출에 따른 인체

상피세포의 발암성을 과학적으로 평가할 수 있는 기틀을 마련하였고 치과용 합성수지 사용의 적정성에 대한 과학적인 판단을 할 수 있는 근거를 제공하였다. HQ의 발암력 자체는 높지 않으나 발암촉진제 등 주변의 여건에 따라 발암력이 증가할 수 있음을 입증함으로써 구강암 예방을 위한 과학적인 접근 방법 및 기반 자료를 제시하였다. 또한 본 연구 결과는 새로운 치과용 합성수지 개발의 필요성 및 개선방향을 제시 할 수 있는 근거로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 요약

발암물질로 알려진 Hydroquinone (HQ)은 치과용 합성수지를 구성하는 중요한 성분으로서 지금까지 치과용 재료 영역에서 널리 사용되고 있으며 구강 내에서 HQ의 유출이 일어나는 것으로 확인 되었다. 따라서 구강암의 기원이 되는 인체상피세포의 발암화에 HQ가 미치는 영향을 평가하였다. HQ에 의한 인체세포 독성을 평가하기 위해 LDH assay를 실시하고 세포 독성이 높지 않은 용량을 실험 용량으로 설정하였다.

인체 세포의 발암화를 평가하기 위해 세포 발암화 지표로서 cell saturation density, soft-agar colony formation 및 cell aggregation의 분석을 사용한 결과 고용량인 50 μ M을 제외한 모든 용량에서 발암화 지표의 변화를 나타내지 않아 HQ의 발암력은 매우 낮은 것으로 추정된다. 그러나 발암촉진제인 TPA와 함께 투여 시 발암력의 증가를 보여 주변 환경의 여건에 따라 발암력이 증가할 수 있음을 입증하였다.

HQ를 노출 후 세포사멸화를 측정하기 위해 DNA fragmentation변화를 분석한 결과 10 μ M부터 50 μ M까지 노출 시간 의존형의 증가를 나타내었으며 50 μ M과 같은 고용량 농도에서는 노출시간 의존적 세포사멸 효과를 보였다. 따라서 세포 발암화를 일으킨 용량에서 세포사멸도 함께 일어나 HQ에 의한 발암화에 세포사멸이 관여함을 보였다. HQ는 ROS를 생성하였으며 Trolox, NAC와 같은 항산화물에 의한 ROS의 차단 효과와 BSO와 같은 GSH 고갈 유발 물질에 따른 ROS의 급격한 증가는 HQ가 인체세포에서 ROS를 효율적으로 생성함을 입증하는 결과이다.

세포간의 신호전달기작 조절에 중요한 역할을 하는 효소인 protein kinase C (PKC)를 immunoblot으로 분석한 결과 PKC- α 의 활성이 증가 된 반면 PKC- β II의 영향은 나타나지 않았다. 따라서 특정 이성질체에 대한 특이적인 효소반응이 발암화에 관여할 것으로 추정된다.

본 연구결과 치과용 합성수지 구성성분인 HQ 유출에 따른 인체상피세포의 발암성은 매우 낮은 것으로 추정되나 발암촉진제 등과의 상호작용에 의한 발암성 증가는 HQ의 구강암 발생 평가에 고려되어야 할 사항이다. 따라서 본 연구

는 구강암의 예방을 위한 과학적인 접근 방법 및 기반 자료를 제시하였고 치과용 합성수지사용의 적정성에 대한 과학적인 판단을 할 수 있는 근거를 제공 하였다. 또한 본 연구 결과는 새로운 치과용 합성수지 개발의 필요성 및 개선방향을 제시 할 수 있는 근거로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

References

- Geurtsen W : Substances released from dental resin composites and glass ionomer cements. *Eur J Oral Sci.* 106 : 687, 1998.
- Michelsen VB, Lygre H, Skålevik R *et al* : Identification of organic eluates from four polymer-based dental filling materials. *Eur J Oral Sci.* 3 : 263, 2003.
- Rogalewicz R, Batko K, Voelkel A : Identification of organic extractables from commercial resin-modified glass-ionomers using HPLC-MS. *J Environ Monit.* 7 : 750, 2006.
- Rogalewicz R, Voelkel A, Kownacki I : Application of HS-SPME in the determination of potentially toxic organic compounds emitted from resin-based dental materials. *J Environ Monit.* 8 : 377, 2006.
- Michelsen VB, Moe G, Skålevik R *et al* : Quantification of organic eluates from polymerized resin-based dental restorative materials by use of GC/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 850 : 83, 2007.
- McGregor D : Hydroquinone : an evaluation of the human risks its carcinogenic and mutagenic properties. *Crit Rev Toxicol.* 37 : 887, 2007.
- Levay G, Pongracz K, Bodell WJ : Detection of DNA adducts in HL-60 cells treated with hydroquinone and p-benzoquinone by 32 P-postlabeling. *Carcinogenesis.* 12 : 1181, 1991.
- Mattia CJ, Adams JD Jr, Bondy SC : Free radical induction in the brain and liver by products of toluene catabolism. *Biochem Pharmacol.* 46 : 103, 1993.
- Wan J, Winn LM : The effects of benzene and the metabolites phenol and catechol on c-Myb and Pim-1 signaling in HD3 cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 201 : 194, 2004.
- Wan J, Badham HJ, Winn L : The role of c-MYB in benzene-initiated toxicity. *Chem Biol Interact.* 153 : 171, 2005.
- Hirabayashi Y, Yoon BI, Li GX *et al* : Mechanism of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity : current review with implication of microarray analyses. *Toxicol Pathol.* 32 : 12, 2004.
- Rivedal E, Witz G : Benzene metabolites block gap junction intercellular communication. Role in hematotoxicity and leukemia. *Chem Biol Interact.* 153 : 257, 2005.
- Huff J : Benzene-induced cancers : Abridged history and occupational health impact. *Int J Occup Environ Health.* 13 : 213, 2007.
- Polyzois GL : *In vitro* evaluation of dental materials. *Clin Mater.* 16 : 21, 1994.
- Theilig C, Tegtmeier Y, Leyhausen G *et al* : Effects of BisGMA and TEGDMA on proliferation, migration, and tenascin expression of human fibroblasts and keratinocytes. *J Biomed Mater Res.* 53 : 632, 2000.
- Rhim JS, Fujita J, Arnstein P *et al* : Neoplastic conversion of human epidermal keratinocytes by Ad12-SV40 virus and chemical carcinogens. *Science* 232 : 385, 1986.

17. Rhim JS : Neoplastic transformation of human epithelial cells *in vitro*. *Anticancer Res.* 9 : 1345, 1989.
18. Voie OA, Fonnum O : Effects of polychlorinated biphenyls on production of reactive oxygen species(ROS) in rat synaptosomes. *Arch. Toxicol.* 73 : 588, 2000.
19. 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* 21 : 13, 1999
20. Farber E : The multiple nature of cancer. *Cancer Res.* 44 : 4217, 1984.
21. Eastmond DA, Smith MT, Ruzo LO *et al* : Metabolic activation of phenol by human myeloperoxidase and horseradish peroxidase. *Mol Pharmacol.* 6 : 674, 1986.
22. Marrazzini A, Chelotti L, Barrai I *et al* : *In vivo* genotoxic interactions among three phenolic benzene metabolites. *Mutat Res.* 1 : 29, 1994.
23. Butterworth BE, Bogdanffy MS : A comprehensive approach to integration of toxicity and cancer risk assessments. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 29 : 23, 1999.
24. Nishizuka Y : Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular response. *FASEB J.* 9 : 484, 1995.
25. Sun C, Zong Z, Wang Y *et al* : Expressions of five protein kinase C isoforms in salivary adenoid cystic carcinoma. *Hua Xi Kou Qiang yi Xue Za Zhi.* 18 : 237, 2000.
26. Martinez-Gimeno C, Diaz-Meco MT, Dominguez I *et al* : Alterations in levels of different protein kinase C isotypes 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.* 17 : 516, 1995.
27. Khun K, Shikhman AR, Lotz M : Role of nitric oxide, reactive oxygen species, and p38 MAP kinase in the regulation of human chondrocyte apoptosis. *J Cell Physiol.* 197 : 379, 2003
28. Atsumi T, Tonosaki K, Fujisawa S : Induction of early apoptosis and ROS-generation activity in human gingival fibroblasts (HGF) and human submandibular gland carcinoma (HSG) cells treated with curcumin. *Arch Oral Biol* 51 : 913, 2006

저자 연락처

우편번호 700-721
대구광역시 중구 동덕로 200
경북대학교 치과대학 구강악안면외과학교실
김진수

원고 접수일 2010년 03월 30일
게재 확정일 2010년 05월 06일

Reprint Requests

Chin-Soo Kim
Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
College of Dentistry, Kyungpook National University
200 Dongdukro, Junggu, Daegu, 700-721, Korea
Tel: +82-53-420-5916 Fax: +82-53-426-5365
E-mail: kimcs@knu.ac.kr

Paper received 30 March 2010
Paper accepted 6 May 2010