

# Acrylamide가 인체상피세포의 발암화에 미치는 영향

김상규 · 김진욱 · 김진수

경북대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실

**Abstract** (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2008;34:602-610)

## ACRYLAMIDE-INDUCED NEOPLASTIC TRANSFORMATION OF HUMAN EPITHELIAL CELLS IN CULTURE

Sang-Kyu Kim, Jin-Wook Kim, Chin-Soo Kim

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Kyungpook National University*

**Purpose** Acrylamide is present in significant quantities in a wide range of commonly consumed human foods. Carcinogenic risk of acrylamide through the consumption of food is a great public concern and in controversy, but it is not properly addressed due to the lack of evidence in humans. While a plenty of data is available on the carcinogenicity in animal models, the studies in humans are limited. Thus, the present study attempted to examine the carcinogenic potentials of acrylamide on the human epithelial cell, which is the target cell origin of the most cancers.

### Material and method & Result

1. Acrylamide was not cytotoxic up to 100  $\mu$ M as measured by MTT and LDH assays, indicating a relatively low toxicity of this substance in human epithelial cells.
2. 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 acrylamide.
3. The neoplastic transformation was further increased with the co-treatment of TPA
4. Antioxidants blocked the generation of Reactive Oxygen Species(ROS) and the GSH depleting agent dramatically increased the ROS production.
5. mRNA levels of fibronectin following acrylamide exposure was increased in a dose-dependent manner, indicating a possible biomarker of acrylamide-induced cellular transformation.

**Conclusion** The present study will provide a valuable basis to compare the interspecies differences in response to carcinogenic potentials of acrylamide. The data on the interspecies differences are essential element in human risk assessment. Thus, our results obtained from the human epithelial cells will contribute to improving the risk assessment of human neoplasm including oral cancer.

**Key words:** Acrylamide, carcinogenic potential, Neoplastic transformation, Human epithelial cell

## I. 서 론

Acrylamide는 종이, 펄프생산, 하수처리에서부터 치과용 수지 제작에 이르기까지 매우 다양한 용도로 우리 산업에서 널리 사용되고 있다. 산업공정 과정에서 발생하는 acrylamide는 신경독성 및 발암성을 나타내는 것으로 알려져 있으며, 국제암연구기구(IARC)는 acrylamide를 설치류 발암물질로 규정하였고<sup>1)</sup>, 동물실험에서 acrylamide는 구강암을 포함한 매우 다양한 부위에서 암을 발생시키는 것으로 알려져 있다<sup>2,3)</sup>. 특히 최근 들어 acrylamide가 고온을 필요로 하는 식품의 요리과정에서 많

은 양이 생성되는 것이 확인되어 acrylamide의 인체 발암성 가능성에 대한 논란이 매우 뜨겁다<sup>4,5)</sup>.

Marsh 등<sup>6)</sup>에 의하면 식품 중의 acrylamide에 의해 인체에서 식도암, 직장암, 신장암 등이 증가한다고 보고된 바 있다. 그러나 식품의 요리과정에서 생성되는 acrylamide의 발암성은 최근에 와서야 제기되었으며 설치류 등 실험동물에서는 발암화기전이 잘 알려져 있는 반면 인체에서는 발암성 여부 및 발암화 관련기전은 잘 알려져 있지 않다<sup>7,8)</sup>.

설치류 실험에서 이 물질은 발암 유발물질(initiator)로 작용하며 알코올 또는 TPA에 의해 발암이 촉진되는 것으로 알려져 있고<sup>9)</sup>, 또한 Syrian Hamster Embryo cell (SHE)에서는 acrylamide에 의한 세포 발암화가 관찰되기도 하여<sup>10)</sup> 동물 실험모델을 이용한 in vivo 및 in vitro 연구에서 acrylamide의 발암성은 논란의 여지가 없는 것으로 판단된다.<sup>11)</sup> 그러나 인체 발암화 관련성은 역학조사 및 발암화기전에 이르기까지 많은 부분이 명확히 정립되어 있지 않은 실정이다. 따라서 acrylamide의 인체 발암성을 연구할 수 있는 모델로서 인체세포모델이 요구되며 특히

### 김진수

700-421 대구광역시 중구 삼덕동2가  
경북대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과

### Chin-Soo Kim

Dept. of OMFS, 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

상피세포의 활용은 acrylamide의 인체 발암성을 규명하는데 우수한 도구로 평가된다. 산업공정에서 흔히 사용되어 관련 작업장 노동자들의 직업병과 관련성이 있는 것으로 알려졌으며 acrylamide가 식품을 조리하는 과정에서 다량 생산되어 체내로 흡수된다는 사실은 이 물질에 대한 발암성을 재평가하는 계기가 되어야 하며, 특히 이 물질을 함유하고 있는 음식이 최초로 접촉되는 부위가 구강이라는 점에서 구강을 포함한 상부소화기관에 대한 인체 발암성과의 관련성에 대한 적극적인 연구가 필요한 실정이다.

구강암은 90% 이상이 편평세포암(squamous cell carcinoma)으로 거의 대부분이 구강 점막 층을 구성하고 있는 상피세포 기원이므로<sup>12)</sup>, 본 연구에서는 장기적인 노출이 요구되는 화학적 발암물질의 발암 특성을 효율적으로 평가하기 위하여 불멸화된 인체상피세포 모델을 사용하여 발암화기전을 연구하였다.

본 연구는 acrylamide의 발암성을 평가하고 이와 관련된 작용기전 등을 분석함으로써 acrylamide가 인체 발암화에 미치는 영향을 연구하는데 요구되는 기초자료를 제공함으로써 구강암 등을 포함한 인체 발암과의 관련성을 제시하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 사용 시약 및 재료

Acrylamide, TPA(12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate), agarose, 및 기타 시약들은 Sigma사 제품(USA)을 사용하고 DMEM 등 세포 배양관련 시약은 Gibco BRL사(USA), 활성기 산소(Reactive oxygen species, ROS)의 평가와 관련된 시약은 Promega사(USA) 제품을 사용하였다.

### 2. 발암물질 처리

70% confluence를 보이는 인체상피세포에 acrylamide (0.1% DMSO, 5, 10, 20, 50, 100  $\mu$ M)를 함유하는 배양액을 14일간 단독 처리하거나 TPA (100 ng/ml)와 함께 처리하였다. 세포가 100% confluence를 이루는 시점에서 1:3의 비율로 계대배양한 후 passage에 따라 세포 발암성을 분석하였다. 활성기 산소 및 apoptosis(세포사멸)의 측정, 성장 인자 변화 분석에는 acrylamide를 24시간 처리하였다.

### 3. 인체상피세포배양

세포 배양 조건은 37°C의 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하고 배양액을 DMEM에 EGF, FBS, 10% hydrocortisone (5  $\mu$ g/ml), antibiotics 등을 넣어 사용하였다. 세포가 confluence를 이루는 시점에서 1:3으로 계대배양 하였다. 본 연구에는 Ad12-SV40에 의한 인체 불멸화 상피세포(RHEK-1)의 passage-88을 사용하였다<sup>13)</sup>.

### 4. Acrylamide의 인체세포 독성시험

#### 1) MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay

Acrylamide의 세포 독성을 측정하기 위하여 MTT방법을 사용하였다<sup>14)</sup>. Acrylamide 용액을 96 well microplate에 넣고 7일간 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한 후 MTT용액(5 mg/ml) 10  $\mu$ l를 모든 well에 넣고 다시 5-6시간 배양한다. 살아 있는 세포의 미토콘드리아 효소에 의해 생성된 formazan은 0.04 N HCl-isopropanol 용액 100  $\mu$ l로 잘 녹여서 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정한다. 세포 생존율은 acrylamide를 처리한 well의 흡광도 값을 대조군 세포가 들어 있는 흡광도 값으로 나눈 다음 백분율로 나타내었다.

#### 2) Lactate dehydrogenase (LDH) assay

세포에 acrylamide를 7일간 처리하고 원심 분리하여 세포와 세포 배양액을 분리하였다. 분리된 세포는 Triton X-100을 최종 1%의 농도로 가하고 30분간 방치하여 용해시킨다. 세포 배양액과 세포 용해체 각각에 4.6 mM pyruvic acid 100  $\mu$ l와 0.4 mg/ml  $\beta$ -NADPH 100  $\mu$ l를 넣고 혼합하여 340 nm에서 흡광도를 측정한다. LDH 분석은 세포 배양액과 세포 용해체에서 측정된 각각의 LDH 활성도를 용량으로 보정한 후 총 LDH에서 유리된 LDH를 백분율로 나타내었다.

### 5. Cell density 측정

세포의 contact inhibition의 변화를 측정하기 위해  $5 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>를 용기에 넣고 배양하였다. 배양액은 3일마다 새롭게 갈아주고 세포가 confluence 상태에 도달하였을 때 단위 면적당 세포 수를 계산하였다<sup>15)</sup>.

### 6. Soft-agar colony formation

Noble agar 1.2 g에 dH<sub>2</sub>O 35 ml를 넣고 30분간 autoclave한 다음 15 ml의 dH<sub>2</sub>O와 FBS 25 ml, 2X EMEM 50 ml를 넣어 0.9% agar base를 만들었다. 5 ml의 agar base를 petri dish에 넣은 다음 밤새 37°C incubator에 두었다. 0.9 g Noble agar에 dH<sub>2</sub>O 50 ml를 넣어 30분간 autoclave한 다음 dH<sub>2</sub>O 7.2 ml, FBS 7.2 ml 2X EMEM 14.4 ml를 넣어 0.36% top agar를 만든 후, 준비된 base agar에  $1 \times 10^4$  cells/dish를 포함하는 top agar 용액을 2 ml씩 petri dish에 넣었다. 그 후 형성된 colony의 크기가 0.3 mm 이상인 colony 수를 측정하였다<sup>15)</sup>.

### 7. Cell aggregation 측정

Soft agar assay와 같은 방법으로 base agar를 만들어 5 ml씩 petri dish에 넣었다. 밤새 37°C incubator에 둔 다음, 10% FBS를 포함한 배양액에  $10^5$  cells/dish로 세포를 접종한 후 4일이 지난 시점

에서 배양액 상에 성장하는 1mm 이상 크기의 colony 수를 측정하였다<sup>15)</sup>.

#### 8. ROS (Reactive oxygen species) assay

DCFH-DA는 지질 친화성 물질로서 세포 내에 잘 침투되며 침투된 이 화합물은 세포 내에서 ROS 등에 의해 형광물질인 DCF로 변화된다. 따라서 DCF의 측정을 통해 세포 내 ROS의 활성을 측정하는 방법으로 널리 사용되고 있다. 12-well culture plate의 세포에 acrylamide를 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 Fonnum(2000)의 방법을 적용하였다<sup>16)</sup>. 또한 ROS의 생성은 형광현미경을 이용하여 확인하였다. 세포를 CO<sub>2</sub> 배양기에서 50  $\mu$ M acrylamide에 1시간 노출 후 10  $\mu$ M DCFH-DA를 첨가하고 매 30초 단위로 1시간 동안 live image fluorescence microscopy (Leica, 독일)로 ROS의 생성을 촬영하였다.

#### 9. Apoptosis 분석

Cell death detection ELISA Plus kit (Roche, 독일)를 이용하여 세포사멸을 측정하였다. 50  $\mu$ M의 acrylamide를 24시간 노출시킨 후 배양액을 걷어내고 lysis buffer로 30분간 반응시킨 후 1.5ml의 Effendorf tube에 옮기고 200  $\times$  g로 10분간 원심 분리한다. Oligonucleosome을 포함하고 있는 상층액을 취한 후 microplate reader로 405nm에서 DNA fragmentation을 측정하였다.

#### 10. RT-PCR

Fibronectin, TNF- $\alpha$  및 TGF- $\alpha$ 의 mRNA 수준을 평가하기 위해 표5의 조건을 사용하였다(Table 5). Total RNA를 추출한 다음, 1  $\mu$ g의 total RNA에 oligo d(T) primer를 넣고 60°C에서 5분간 두어 poly A<sup>+</sup>를 얻었다. 30  $\mu$ l RT mix(0.1M DTT, RNA guard, RT-buffer, dNTP, dH<sub>2</sub>O, RT)를 각 sample에 넣은 다음 37°C에서 60분, 70°C에서 10분 둔 다음 얼음 위에 놓았다. cDNA과정이 끝나면 2.5  $\mu$ l of cDNA에 47.5  $\mu$ l of PCR mix[PCR-buffer, dH<sub>2</sub>O, Taq.pol, 5'-primer, 3'-primer, dNTP-mix(<sup>32</sup>P - labelled)]를 넣은 다음 primer에 따라 annealing temperature 및 cycle 수를 최적 수준으로 정하였다. 10% PAGE에 전기영동하고 gel dryer로 말린 후, X-ray cassette에 넣어 영하 75°C 보관 후 현상하였다<sup>17)</sup>.

#### 11. 성적 검증

각 실험의 대조군과 실험군 data의 유의성 검증은 Student's t-test로 실시하며 유의도는 p < 0.05로 하였다.

### III. 결 과

#### 1. Acrylamide의 인체세포 독성평가

본 연구에서는 acrylamide에 의한 인체세포 독성을 평가하고 노출 용량의 정량화를 위해 MTT 및 LDH assay를 실시하였다. 두 가지 방법 모두에서 본 연구에 사용된 용량에서 세포 독성은 나타나지 않았다. 다만 100  $\mu$ M인 고용량에서 다소 세포 독성이 있는 것으로 추정되나 유의한 변화를 나타내지 않아 본 연구에 사용된 용량이 세포 독성에 의한 장애를 받을 수준은 아닌 것으로 판단되었다 (Fig. 1,2).

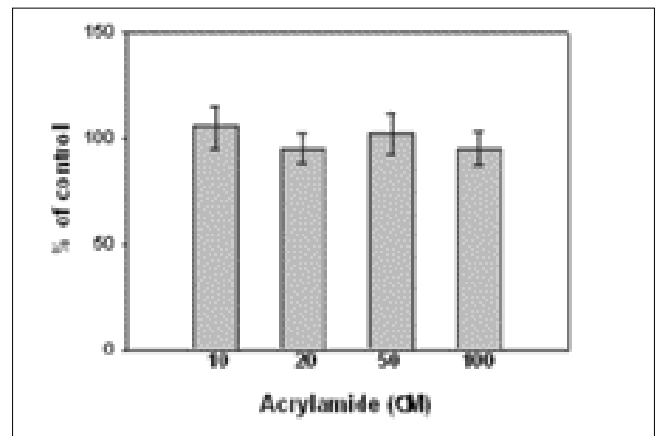


Fig. 1. MTT assay for the cytotoxicity of acrylamide exposed to human epithelial cells in culture.

The cells were incubated with acrylamide for 7 days, after which formed formazan was measured by microplate reader as described in materials and methods.

Values represent the mean  $\pm$  SD of triplicate determinations.

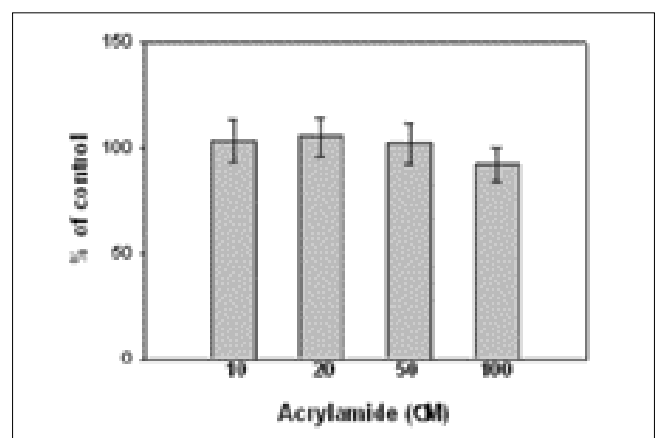


Fig. 2. LDH assay for the cytotoxicity of acrylamide exposed to human epithelial cells in culture.

The cells were incubated with acrylamide for 7 days, 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. Acrylamide의 인체세포 발암력 평가

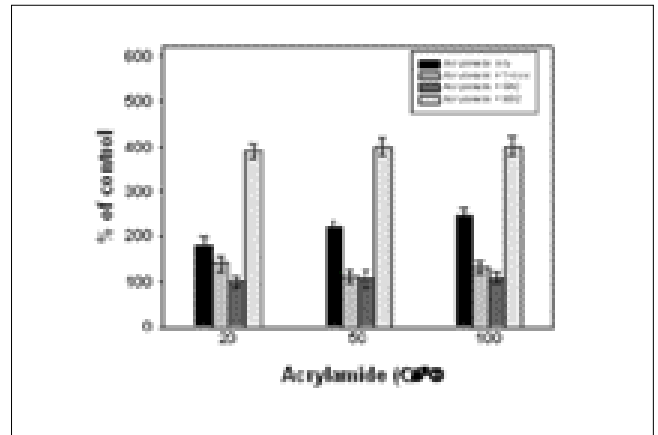
세포 독성이 없는 용량 내에서 나타나는 인체세포의 발암화를 평가하기 위해 세포 발암화의 지표로서 cell saturation density, soft-agar colony formation 및 cell aggregation의 분석을 사용하였다. Saturation density의 경우 50  $\mu\text{M}$  및 100  $\mu\text{M}$ 에서 2.3배와 2.5배의 증가를 각각 나타내었으며, soft-agar colony 경우에는 20  $\mu\text{M}$ 부터 2배 이상의 증가를 나타내었다. 이러한 50  $\mu\text{M}$  이상의 고용량 노출에서의 증가는 cell aggregation에서도 나타나 고용량에서 acrylamide는 세포의 발암화를 촉진시키는 것으로 평가되었다 (Table 1). 세포의 발암화가 나타나는 시기가 빠를수록 발암성이 높으므로 세포의 foci가 나타나는 시기를 관찰한 결과 50  $\mu\text{M}$ 에서는 passage-8에서 100  $\mu\text{M}$ 에서는 passage-7에서 foci가 발현되기 시작하여 세포의 변형 시기도 발암성이 높은 고농도에서 나타나고 있음을 보였다 (Table 2).

## 3. Acrylamide에 대한 TPA의 발암 촉진작용 평가

Acrylamide에 대한 세포 발암화의 촉진 여부를 확인하기 위하여 발암 촉진물질로 널리 알려진 TPA를 병용하여 발암 촉진 현상을 확인하고자 하였다. Saturation density의 경우 acrylamide 단독 투여 및 병용 투여 시 공히 20  $\mu\text{M}$ 부터 유의한 증가를 나타내었으나, 병용 투여 시 acrylamide 단독 투여 군에 비하여 증가를 나타내지는 않았다 (Table 1, 3). Soft-agar colony의 경우는 병용 투여 시 acrylamide 단독 투여 군에 비하여 20  $\mu\text{M}$ 까지는 큰 차이는 없었으나 50  $\mu\text{M}$ 에서부터 다소 증가를 보였으며, 대조군에 비해서는 20  $\mu\text{M}$ 부터 유의한 증가를 나타내어 100  $\mu\text{M}$ 의 경우 acrylamide 단독 투여 시에는 2.9배 증가한 반면 병용 투여 시에는 4.7배가 증가되어 TPA에 의한 촉진작용이 존재함을 확인하였다 (Table 1, 3). 이러한 발암 촉진작용은 cell aggregation에서도 나타나 100  $\mu\text{M}$ 의 경우 acrylamide 단독 투여 시에는 응집된 colony 수가 5개 이상이었다 반면 TPA와 병용 투여 시에는 10개 이상이었다 (Table 1, 3). 이와 같은 TPA에 의한 발암성 촉진은 foci의 발현 시기에서 더욱 뚜렷하게 나타났다. Foci의 발현은 passage-8의 경우 10  $\mu\text{M}$ 에서부터 나타나기 시작하였으며 50  $\mu\text{M}$ 의 경우는 passage-7부터, 100  $\mu\text{M}$ 의 경우는 passage-6부터 foci의 발현이 관찰되어 acrylamide 단독 투여 시보다 발암성이 훨씬 촉진되었음을 보였다 (Table 4).

## 4. 활성기 산소 (ROS)의 생성

Acrylamide의 주요 작용기전에는 free radical의 생성이 관련되어 있다. 따라서 활성기 산소의 생성과 발암화기전을 분석하기 위해 활성기 산소의 생성을 화학적 및 광학적으로 분석하였다. Acrylamide는 20  $\mu\text{M}$ 에서부터 용량 의존적으로 활성기 산소



**Fig. 3.** Effects of ROS generation with exposure to acrylamide for 24hrs. Trolox, N-Acetyl Cysteine (NAC) and BSO were treated 1 hr prior to acrylamide exposure. 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) was measured by luminescence spectrometer as described in materials and methods. Values represent the mean  $\pm$  SD of triplicate determinations.

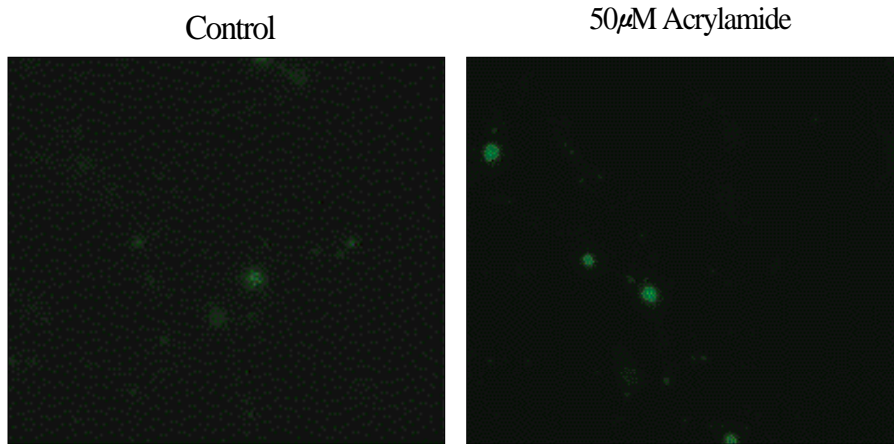
의 생성을 증가시켰으며 100  $\mu\text{M}$ 에서는 대조군에 비해 2.5배 증가를 보였다 (Fig. 3). 활성기 산소의 생성을 확인하기 위하여 항산화제 처리에 따른 활성기 산소의 생성 저하 여부를 분석하였다. Trolox, N-acetyl cysteine (NAC)과 같은 항산화제를 전 처리하였을 경우 활성기 산소의 생성은 감소하였으며 반면 GSH의 고갈 인자인 L-buthionine-sulfoximine (BSO)를 처리 시에는 활성기 산소의 생성이 급격하게 증가하여 acrylamide에 의해 활성기 산소의 생성이 촉진됨을 확인하였다 (Fig. 3). 이러한 활성기 산소의 생성은 광학 형광현미경으로도 확인되었다 (Fig. 4).

## 5. 발암화에 따른 apoptosis 관련 인자의 변화 분석

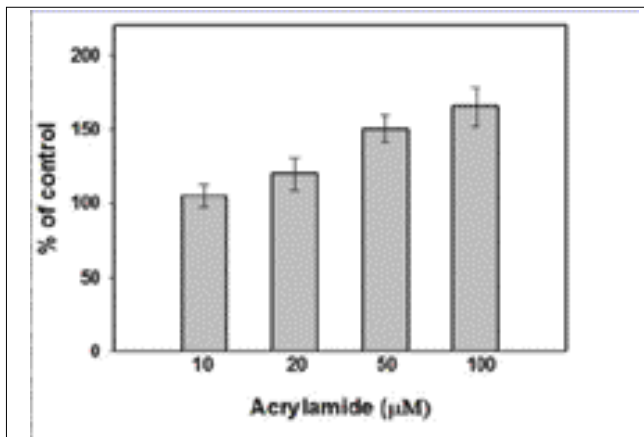
인체상피세포의 발암화기전은 정상적인 세포의 apoptosis 과정을 억제하여 발암 세포에 상대적으로 증식에 유리한 환경을 제공하는 것이 포함되어 있다. 따라서 acrylamide 처리 시 나타나는 apoptosis 관련 인자의 분석을 통하여 발암화에 미치는 영향을 분석하고자 하였다. DNA-histone 항체를 이용한 ELISA 분석 결과 DNA fragmentation은 용량 의존적으로 증가를 나타내었다. 20  $\mu\text{M}$  이상에서 유의한 차이를 나타내기 시작하여 100  $\mu\text{M}$ 에서는 70%의 증가를 보였다 (Fig. 5).

## 6. 성장 인자 및 세포의 기질의 변화

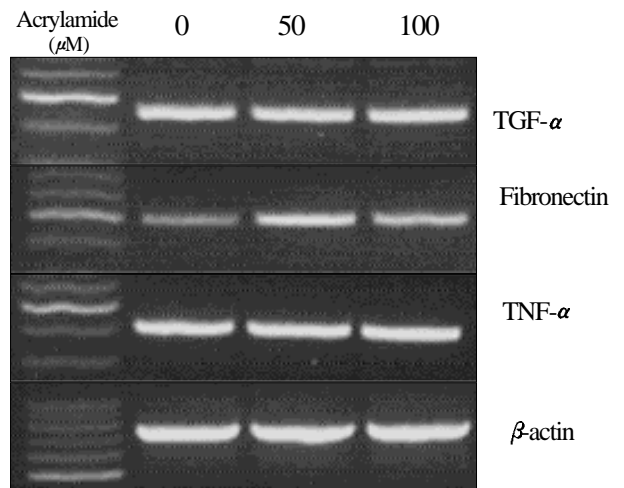
세포의 기질인 fibronectin과 성장 인자인 TGF- $\alpha$  및 TNF- $\alpha$ 의 변화를 RT-PCR로 분석한 결과, TGF- $\alpha$  또는 TNF- $\alpha$ 는 노출량에 따른 변화를 보이지 않았으나 fibronectin의 mRNA는 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 6).



**Fig. 4.** Generation of ROS following 50  $\mu\text{M}$  acrylamide exposure in human epithelial cells. Photos of ROS production were taken at every 30s for 1hr with live image fluorescence microscopy. The representative image at 15 min was presented.



**Fig. 5.** Apoptotic effects of human epithelial cells following acrylamide exposure for 24hrs. Apoptotic cells were measured by the cell death detection ELISA Plus (Roche, Mannheim, Germany). Values represent the mean  $\pm$  SD of triplicate determinations.



**Fig. 6.** RT-PCR analysis of fibronectin, TGF- $\alpha$  and TNF- $\alpha$  following acrylamide exposure. RT-PCR analysis was performed as described in materials and methods. The representative bands of each gene following the triplicate experiments were presented.

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

Dose ( $\mu\text{M}$ )	Saturation density ( $\times 10^5/\text{cm}^2$ )	Soft-agar colony formation(%)	Cell aggregation (> 1 mm) <sup>a</sup>
Control	2.3 $\pm$ 0.05	0.07 $\pm$ 0.01	-
5	2.1 $\pm$ 0.08	0.08 $\pm$ 0.02	-
10	2.9 $\pm$ 0.10	0.08 $\pm$ 0.02	-
20	3.2 $\pm$ 0.04	0.14 $\pm$ 0.05*	-
50	5.4 $\pm$ 0.08*	0.18 $\pm$ 0.04*	+
100	5.8 $\pm$ 0.06*	0.20 $\pm$ 0.06*	+

\* : P < 0.05 as compared to control cells

a: +; > 5 colonies, ++ ; > 10 colonies

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

**Table 2.** Morphological alteration of human epithelial cells treated with Acrylamide by passage levels<sup>a</sup>

Passage	Cumulative no. of days in culture after transfection	Control	Dose ( $\mu$ M)				
			5	10	20	50	100
1	14	.	.	.	.	.	.
4	38	.	.	.	.	.	.
5	45	.	.	.	.	.	.
6	54	.	.	.	.	.	.
7	61	.	.	.	.	.	+
8	66	.	.	.	.	+	++

a: +; moderate, ++; severe

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

Dose ( $\mu$ M)	Saturation density ( $\times 10^5/cm^2$ )	Soft-agar colony formation (%)	Cell aggregation (> 1mm) <sup>a</sup>
Control	2.4 $\pm$ 0.06	0.06 $\pm$ 0.01	-
TPA only	2.7 $\pm$ 0.05	0.08 $\pm$ 0.01	-
5	2.7 $\pm$ 0.06	0.08 $\pm$ 0.02	-
10	2.9 $\pm$ 0.08	0.11 $\pm$ 0.02	-
20	3.8 $\pm$ 0.10*	0.14 $\pm$ 0.01*	-
50	4.8 $\pm$ 0.09*	0.21 $\pm$ 0.02*	+
100	5.1 $\pm$ 0.12*	0.28 $\pm$ 0.02*	++

\*: P < 0.05 as compared to control cells    a: +; > 5 colonies, ++; > 10 colonies    The data are mean  $\pm$  SD with 3 different counts

**Table 4.** Morphological alteration of human epithelial cells co-treated with Acrylamide and TPA(100 ng/ml) by passage levels<sup>a</sup>

Passage	Cumulative no. of days in culture after transfection	Control	TPA only	Dose ( $\mu$ M)				
				5	10	20	50	100
1	14	.	.	.	.	.	.	.
4	38	.	.	.	.	.	.	.
5	45	.	.	.	.	.	.	.
6	54	.	.	.	.	.	.	+
7	61	.	.	.	.	.	+	++
8	66	.	+	.	+	+	+	++

a: +; moderate, ++; severe

**Table 5.** Experimental conditions of RT-PCR analysis

Gene	Primer Sequence 5' $\rightarrow$ 3'	T( $^{\circ}$ C)	Number of cycle
TGF- $\alpha$	F: ATGGTCCCCTCGGCTGGACAG R: GGCCTGCTTCTTCTGGCTGGCA	60	28
Fibronectin	F: CTGTACTGGTTACAGAGTAA R: TAGGTCACCCTGTACCTGGAA	54	26
TNF- $\alpha$	F: ATGAGCACTGAAAGCATGATC R: TCACAGGGCAATGATCCCAAA	58	28
$\beta$ -actin	F: GTGGGGCGCCCCAGGCACCA R: CTCCTTAATGTACGCACGATT	54	25

T: Annealing Temperature

## IV. 고 찰

Acrylamide는 동물실험에서 구강을 비롯한 다양한 부위에서 암을 일으키는 발암물질로 알려져 있으며, 최근 들어 식품의 요리과정에서 많은 양이 생성되는 것이 확인되어 인체 발암 가능성에 대한 논란이 높다. 그러나 지금까지 acrylamide에 대한 발암성은 설치류 등의 실험동물에서는 잘 정립되어 있는 반면 인체에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구는 acrylamide의 인체 발암성을 확인하고 이와 관련된 작용기전을 분석하고자 하였으며, 구강암은 점막 층을 구성하고 있는 상피세포가 기원이므로 본 연구에서는 인체상피세포 모델을 사용하였다.

Acrylamide는 C3H/10T1/2, NIH3T3와 같은 설치류의 섬유모세포(fibroblast) 모델에서 세포 발암성을 나타낸 바 있으며 여러 종류의 동물 모델에서도 발암성이 확인된 바 있다<sup>18)</sup>. 특히 음용수를 매개로 투여한 실험에서는 Fischer 344 쥐의 암컷에서 구강암의 증가를 나타내어 구강은 acrylamide에 표적이 될 수 있는 기관으로 알려져 있다<sup>2)</sup>. 그러나 이러한 동물실험 결과에도 불구하고 역학 조사를 통한 연구들은 acrylamide와 인체 발암과의 관련성을 명확하게 제시하지 못하고 있으므로 인체에 대한 발암성은 여전히 논란의 대상이 되고 있다. Acrylamide는 인간의 식단에 다양한 형태로 광범위하게 존재하며 심지어는 같은 식품 내에서도 그 양의 차이가 매우 클 뿐만 아니라<sup>19)</sup>, 산업 현장에도 존재하고 흡연과 같은 행위에 의해서도 흡수되기 때문에 식품에 의한 acrylamide의 인체 노출을 명확하게 판단하기란 결코 쉽지 않다<sup>20)</sup>. 따라서 acrylamide의 노출을 평가할 수 있는 생체 지표의 개발과 인체에서의 발암성을 판단할 수 있는 모델의 개발이 요구되고 있다.

Acrylamide는 쉽게 흡수되고 또한 몸 전체로도 쉽게 분포되어 헤모글로빈, protamine 등과 같은 중요 표적과 쉽게 adduct를 형성하며, DNA adduct의 형성은 이보다 효율성이 낮다<sup>21)</sup>. 그러나 이러한 생체 지표들 또한 명확한 용량-반응 관계를 유지하지 못하여 실용성에는 한계가 있는 것으로 알려져 있다. 또한 acrylamide는 Ames test와 같은 박테리아를 사용한 실험에서도 돌연변이성을 나타내고 있지 않고 동물을 이용한 실험에서도 실험 대상 종간의 차이가 존재하는 것으로 알려져 있다<sup>8)</sup>. 따라서 인체와 밀접한 관련성이 있는 모델을 대상으로 노출에 따른 생체 지표를 개발하는 일이 필요할 것으로 생각된다.

본 연구는 acrylamide의 인체 발암 관련성을 보다 명확하게 판단하고 이와 관련된 생체 지표를 발굴하는데 초점을 맞추었다. 지금까지 사용된 acrylamide의 세포 발암화 연구에는 설치류의 섬유모세포가 사용되어 왔으며<sup>18)</sup> 인체상피세포를 대상으로 한 연구는 보고된 바 없다. 따라서 본 연구는 인체상피세포에서 acrylamide의 발암성을 확인하고 세포 발암화 과정과 관련된 작용기전을 분석함으로써 생체 지표의 후보 물질 군을 확인하고자 하였다. 본 연구에서는 발암화 과정을 관찰하는데 요구되는 조건인 정상적인 형태를 유지하면서도 장기간의 세포 배양이 가능하고 배양 기간의 연장에 따른 자발적인 세포

발암화 현상을 극소화 할 수 있는 세포 모델인 Ad12-SV40에 의해 불멸화된 'RHEK-1' 을 사용하였다<sup>15)</sup>.

지금까지 보편적으로 수용되고 있는 발암화기전은 다단계 과정을 포함하고 있어서 발암 물질에 의해 손상된 세포 내 유전자가 세포 분화과정에서 지속적으로 유지되어 염색체 내에 고정되는 과정을 거쳐야 발암성을 나타낸다<sup>22)</sup>. 이러한 손상된 유전자 정보의 고착을 확인하기 위해서 다양한 세포 발암화 지표가 사용된다. Cell density, soft-agar colony formation 및 cell aggregation으로 대표되는 이들 지표들은 contact inhibition의 소실, anchorage-independence의 획득, 세포 간의 adhesion을 각각 평가할 수 있으며, 이 모든 지표들에서 양성을 나타내는 세포는 nude mice assay에서도 양성을 나타내는 것으로 알려져 있다<sup>15)</sup>.

본 실험 결과 acrylamide는 용량이 증가할수록 세포 발암화가 증가하는 경향을 나타내었는데, 고용량의 경우에서만 세포 발암화가 나타난 것은 acrylamide가 발암성이 있다 하더라도 그 가능성이 약하며 50  $\mu$ M 이상의 농도는 실질적인 음식섭취를 통한 노출에서는 일어나기 어렵다고 사료된다. 다만 식품 중의 acrylamide와 발암 가능성을 연계하기 위해서는 식품 등을 통해 몸에 축적되는 농도가 정확하게 확인되어야 앞으로의 용량-반응 관계 설정을 통한 위해성 평가에 도움이 될 것이라고 판단된다. Acrylamide는 DNA adduct 또는 protein adduct 형성 등 직접적으로 거대 분자 구조와 반응하는 것으로 알려져 있어서 acrylamide의 역할은 DNA의 손상을 촉발하는 기전을 가지고 있는 것으로 평가되고 있다. 이러한 DNA의 손상이 발암화로 진행되기 위해서는 발암 촉진물질의 이차적인 노출이 요구되는 경우가 많다.

본 연구에서는 발암화 촉진물질로 잘 알려진 TPA를 사용하여 acrylamide의 발암화 변화를 측정하였다. TPA와 병용 투여 시 saturation density에서는 별 변화가 없었으나, soft-agar colony formation 및 cell aggregation의 증가와 세포 발암화의 시간을 단축시켜 acrylamide의 발암성을 촉진하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 acrylamide에 의한 발암성은 추가적인 촉진물질의 노출과 밀접한 관계가 있음을 입증하고 음식 등에 함유된 여러 가지 다양한 발암 촉진제들이 acrylamide의 발암성에 관여할 수 있음을 암시한다. Acrylamide의 발암성 증가가 TPA와 같은 발암 촉진제에 의해 증가하는 현상은 섬유모세포 모델인 BALB/3T3에서도 나타나고 있다. Sakai와 Sato 등<sup>23)</sup>은 acrylamide와 TPA를 72시간 노출 시킨 후 2주간 지속적인 배양을 한 결과 발암성의 증가를 나타낸 것으로 보고한 바 있는데 본 연구는 14일을 노출시켰다. 이는 acrylamide에 의한 세포 발암화는 설치류 세포보다 인체세포가 더욱 저항적임을 의미한다. 따라서 본 연구 결과는 세포 수준에서 중간의 발암화 차이점이 존재한다는 점을 확인함으로써 앞으로의 acrylamide 발암성 평가에 중요한 의미를 부여할 것으로 사료된다. 대부분의 발암성에 관한 위해성 평가는 설치류의 실험 결과에 의존하고 있으므로 설치류와 인체와의 반응 차이의 존재 확인은 인체 위해성 평가의 가장 중요한 고려 사항이다.

활성기 산소 (ROS)는 DNA adduct를 형성하는 등 DNA의 손

상에 직접적으로 관여하여 발암화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 특히 활성기 산소는 신호 전달 체계를 변환시켜 이에 따른 다양한 세포 조절의 변화를 가져오는 것으로 알려져 있다. 활성기 산소는 ERK-1,-2, Jun NH2-terminal kinase, MAPK 등의 신호 전달 체계의 활성화를 통한 세포사멸화에도 관여하고 있다<sup>23)</sup>.

본 연구는 acrylamide가 활성기 산소의 생성에 관여하고 있음을 확인하였다. Trolox, NAC와 같은 항산화물에 의한 활성기 산소의 차단 효과와, GSH를 고갈시키는 물질인 BSO에 따른 활성기 산소의 급격한 증가는 acrylamide가 인체세포에서 활성기 산소를 효율적으로 생성함을 입증하는 결과로서 활성기 산소의 생성이 인체세포 발암화 과정의 시발점이 될 수 있음을 암시하고 있다. 또한 활성기 산소의 생성은 세포사멸화화도 밀접한 관계가 있으므로<sup>24,25)</sup> acrylamide에 의한 세포사멸화의 증가는 활성기 산소와 관련성이 높을 것으로 추정된다. 활성기 산소의 생성은 세포사멸화화와 같은 세포 주기의 후반부 조절에 영향을 줄 수 있으므로 acrylamide에 의한 활성기 산소의 생성이 신호 전달 체계의 변환을 일으키고 이에 따른 세포 조절의 변화가 세포사멸화를 유발시킬 가능성이 높다. Acrylamide에 의한 세포사멸화의 촉진이 선택적인 세포사멸 조건을 유발하여 발암성을 가진 세포의 상대적인 성장 우위를 촉진할 것으로 추정된다. 하지만 이와 같은 추론은 앞으로 보다 정확한 blocker 등의 사용을 통해 입증되어야 할 과제이다.

세포의 발암화에는 성장 인자 및 세포의 기질의 변화가 관련되어 있다. 본 연구에서 나타난 fibronectin의 증가는 acrylamide에 의한 발암 세포의 형태적인 변화에 fibronectin과 같은 세포의 기질이 관여함을 암시하므로 acrylamide에 의한 생체 지표의 가능성을 제시하고 있다.

Acrylamide는 동물실험에서는 구강암의 발생이 입증된 바 있으므로 인체 발암성 여부는 반드시 평가되어야 할 과제이다. 특히 본 연구를 통하여 이 물질에 대한 인체와 동물 간의 발암성의 차이점을 확인하는 것은 인체 위해성 평가에 중요한 판단 기준을 제시할 수 있는 정보로 사료된다. 구강암의 대부분이 상피세포 기원인 점을 고려할 때 비록 본 연구에 사용된 세포가 구강 점막 세포가 아니라는 제한점을 가지고 있음에도 불구하고 이 연구 결과는 acrylamide에 의한 구강암을 비롯한 상피세포 기원의 발암성을 평가하는데 기여할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

Acrylamide의 인체세포 독성을 평가한 결과 100 $\mu$ M까지도 뚜렷한 독성이 나타나지 않아 인체세포에 대해서는 비교적 독성이 낮은 것으로 판명되었다. Acrylamide의 세포 발암성을 평가하기 위해 cell saturation density, soft-agar colony formation 및 cell aggregation과 같은 세포 발암화 지표를 분석한 결과 고용량의 노출에서는 모든 지표에서 발암성의 증가를 나타내어 acrylamide가 인체세포에서 발암성이 있음을 확인하였다. 또한 이

러한 발암성은 발암 촉진물질인 TPA와 병용 투여 시 더욱 증가하여 acrylamide의 발암성은 발암 촉진물에 의해 증가하는 다단계 과정임을 추정케 하였다. Acrylamide는 세포사멸을 고용량에서 촉진하였으며 항산화제와 GSH 고갈 인자 등을 이용한 실험에서는 활성기 산소의 생성에 관여하고 있음을 입증하였다. 따라서 활성기 산소의 생성에 따른 세포사멸의 촉진효과 등이 세포 발암화 과정에 관여하고 있을 것으로 추정된다. 또한 세포외 기질인 fibronectin의 mRNA 수준의 증가는 이 물질이 세포 발암화를 추정할 수 있는 생체 지표 후보 물질일 가능성을 제시하고 있다.

본 연구 결과는 acrylamide에 대한 인체세포의 반응과 선학들이 연구한 동물세포 반응을 상호 비교하여 실험 종간의 반응 차이를 평가할 수 있는 근거를 마련하였으며, 이러한 발암성에 대한 종간의 차이점 확인은 인체 위해성 평가에서 필수적인 요소로서 acrylamide의 인체 위해성 평가에 기여할 것으로 판단된다. 특히 식품 중에 포함된 acrylamide가 최초로 접촉하는 부위가 구강을 비롯한 상부소화기관이며 구강암의 기원 세포가 상피세포인 점을 고려할 때 인체상피세포를 모델로 실험한 본 연구의 결과는 acrylamide에 대한 구강암 등의 발생을 연구하는데 기초 자료로 활용될 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. International Agency for Research on Cancer. Some industrial chemicals. Lyon: IARC. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human. 1994;60:389-433.
2. Johnson KA, Gorzinski SJ, Bodner KM, Campbell RA, Wolf CH, Friedman MA, Mast RW: Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fischer 344 rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1986;85(2):154-168.
3. Friedman M, Dulak L, Stedham A: A lifetime oncogenicity study in rats with acrylamide. Fundam. Appl. Toxicol. 1995;27:95-105.
4. Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Tornqvist M: Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. J. Agric. Food Chem. 2002;50: 4998-5006.
5. Pelucchi C, Franceschi S, Levi F, Trichopoulos D, Borsetti C, Negri E, La Vecchia C: Fried potatoes and human cancer. Int. J. Cancer. 2003;105:558-560.
6. Marsh GM, Lucas LJ, Youk AO, Schall LC: Mortality patterns among workers exposed to acrylamide: 1994 follow up. Occup. Environ. Med. 1999;56:181-190.
7. Sobel W, Bond G, Parsons T, Brenner F: Acrylamide cohort mortality study. Brit. Ind. Med. 1986;43:785-788.
8. Carere A: Genotoxicity and carcinogenicity of acrylamide: a critical review. Ann. Ist. Super. Sanita. 2006;42(2):144-155.
9. Besaratinia A, Pfeifer GP: A review of mechanisms of acrylamide carcinogenicity. Carcinogenesis 2007;28(3):519-528.
10. Park J, Kamendulis LM, Friedman Ma, Klaunig JE: Acrylamide-induced cellular transformation. Toxicol. Sci. 2002;65(2):177-183.
11. Sega GA, valdivia Alcolta RP, Tancongco CP, Brimer PA: Acrylamide binding to the DNA and protamine of spermiogenic stages in the mouse and its relationship to genetic damage. Mutat. Res. 1989;216:221-230.
12. Macfarlane GJ, Sharp L, Porter S, Franceschi S: Trends in survival from cancers of the oral cavity and pharynx in Scotland; a clue as to why the disease is becoming more common? Br. J. Cancer. 1996;73:805-808.



13. Rhim JS, Fujita J, Arnstein P, Aaronson SA: Neoplastic conversion of human epidermal keratinocytes by Ad12-SV40 virus and chemical carcinogens. *Science* 1986;232:385-388.
14. Hirata Y. Manganese-induced apoptosis in PC12 cells. *Neurotoxicol. Teratol.* 2002;24(5):639-653.
15. Fonnum O. Effects of polychlorinated biphenyls on production of ROS in rat synaptosomes. *Arch. Toxicol.* 2000;73:588-593.
16. Rhim JS: Neoplastic transformation of human epithelial cells in vitro. *Anticancer Res.* 1989;9:1345-1366.
17. 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(1):13-18.
18. Banerjee S, Segal A: In vitro transformation of C3H/10T1/2 and NIH/3T3 cells by acrylonitrile and acrylamide. *Cancer Lett.* 1986;32(3):293-304.
19. Friedman M: Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *F. Agr. Food Chem.* 2003;51:4504-4526.
20. Smith CJ, Pergetti TA, Rumble MA, Rodgman A, Doolittle DJ: "IARC Group 2B carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. *Food Chem. Toxicol.* 2001;39:183-205.
21. Farber E: The multiple nature of cancer. *Cancer Res.* 1984;44:4217-4223.
22. Sakai A, Sato M: Improvement of carcinogen identification in BALB/3T3 cell transformation by application of a 2-stage method. *Mutat. Res.* 1989;214(2):285-296.
23. Khun K, Shikhman AR and Lotz M. Role of nitric oxide, reactive oxygen species, and p38 MAP kinase in the regulation of human chondrocyte apoptosis. *J. Cell. Physiol.* 2003;197:379-387.
24. Lukandu OM, Costea DE, Neppelberg E, Johannessen AC, Vintermyr OK: Khat (*Catha edulis*) induces reactive oxygen species and apoptosis in normal human oral keratinocytes and fibroblasts. *Toxicol. Sci.* 2008.
25. 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.* 2006;51(10):913-921.