

재조합 HCCS-1 아데노바이러스를 이용한 구강암 세포주의 세포사멸 유발

김창현 · 이동주 · 이일규* · 김명진** · 김진우*** · 표성운

가톨릭대학교 의과대학 치과학교실 구강악안면외과, *가톨릭대학교 대학원 통합의학과
서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, *가톨릭대학교 의과대학 산부인과학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2005;31:306-311)

INDUCTION OF APOPTOSIS IN ORAL CANCER CELL LINE THROUGH AN RECOMBINANT HCCS-1 ADENOVIRUS

Chang-Hyen Kim, Dong-Ju Lee, Il-Kyu Lee*, Myung-Jin Kim**, Jin-Woo Kim***, Sung-Woon Pyo

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Medicine, The Catholic University of Korea

**Department of Integrative Medicine, Graduate School, The Catholic University of Korea*

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

****Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, The Catholic University of Korea*

Despite advances in surgery, radiotherapy, and chemotherapy, the survival of patients with oral squamous cell carcinoma has not significantly improved over the past several decades. Gene therapy is currently under investigation and shows us new possibility of cancer curing method. This experiment was undergone to find out the cell growth inhibition effect and evidence of apoptosis by HCCS-1(human cervical cancer suppressor-1), one of the candidates of tumor suppressor gene, transduced to human oral cancer cell line.

To determine the efficiency of the adenovirus as a gene delivery vector cell line was transduced with LacZ gene and analysed with X-gal staining. Northern blot was performed to confirm the transfection with HSCC-1 gene and cell viability was assessed by cell cytotoxicity assay using cell count kit(CCK). To show the evidence of apoptosis, DNA fragmentation assay and flow cytometry(FACS) were performed.

We had successfully construct the recombinant HSCC-1 adenovirus(Ad5CMV-HCCS-1), and importation efficiency was 20% at 2 MOI(multiplicity of infection), 80% at 20 MOI. Northern blot analysis showed that a single 0.6kb mRNA transcript was expressed in Ad5CMV-HCCS-1 transduced cell lines. As a result of CCK, when comparing to control subjects, transduced group showed 50% growth inhibition. In DNA fragmentation assay, according to increasing of MOI, DNA volume was diminished. In FACS analysis, DNA distribution showed fragmentation.

This results imply that HCCS-1 gene has growth inhibition effect in human oral cancer cell lines through apoptosis induction.

Key words: Oral squamous cell carcinoma, Gene therapy, Apoptosis, Human cervical cancer suppressor-1(HCCS-1), Recombinant adenovirus vector

I. 서 론

구강암에 대한 항암요법, 방사선 치료와 외과적 처치를 포함하는 치료는 계속 발전되어 왔으나 치료 효율과 구강암이 진행된 환자의 생존율 향상은 제한적이며, 많은 경우에서 심한 안면부 결손을 초래하고, 항암제의 독성과 방사선 조사로 인한 부작용이 심각하다¹⁾. 더욱이 기존의 치료가 실패한 환자에게는 더 이상 효과적인 생명유지 치료가 불가능하다. 그리하여

여 새로운 치료 전략으로 유전자 치료법이 각광받고 있다²⁾.

유전자 치료란 DNA 재조합방법을 통하여 변형된 유전자를 환자의 질병 세포에 도입하여 특정 유전자의 변화를 유도하고 유전자 이상에 의한 질병을 치료하는 것으로 정의된다³⁾. 암 치료를 위한 유전자 치료는 종양억제 유전자로 잘 알려진 p53을 재조합한 레트로바이러스 벡터를 이용한 종양세포의 성장억제가 보고된 후⁴⁾, 다양한 종양억제 유전자를 보다 높은 효율로 종양세포에 이입하여 치료하는 방법들이 연구되었다^{5,6)}. 종양억제 유전자를 종양세포로 이입하기 위하여 여러 가지 방법 중, 아데노바이러스 벡터에 대한 연구를 통해 암세포주들에 대한 유전자 재조합 아데노바이러스의 높은 이입효율이 보고된 바 있다⁷⁾. 저자들은 구강암 세포주에 재조합아데노바이러스를 제작하여 이입한 결과 20 MOI 이상에서 90% 이상의 이입효율이 관찰한바 있다⁷⁾.

표 성 운

420-717 경기도 부천시 원미구 소사동 2
가톨릭대학교 성가병원 구강악안면외과

Sung-Woon Pyo

Dept. of OMFS, Holy Family Hospital, The Catholic University of Korea
2 Sosa-dong, Wonmi-ku, Puchon, Kyunggi-do, 420-717, Korea
Tel: +82-32-340-2130 Fax: +82-32-340-2255

E-mail: spyo@catholic.ac.kr

세포사멸(apoptosis)은 생명체의 발생과 분화에 기여하며 정상 조직에서 조직의 형태 유지와 개조 등에 관여 한다. 이러한 세포사멸의 기전이 비정상적으로 작용하면 다양한 질환들이 유발된다. 세포사멸을 활성화하여 종양의 성장을 억제하는 유전자치료의 발견은 암의 치료와 인접 부위로의 전이를 억제하는 새로운 방향을 제시하여, 치료의 부작용도 감소시킬 것으로 기대되고 있다⁸⁹⁾. 특히 종양억제 유전자인 p53에 대한 연구를 통하여 p53은 세포의 증식조절에 관여할 뿐만 아니라 세포사멸의 유도에도 관여하는 인자로서 DNA손상에 대한 세포반응의 결정적인 매개인자로서 작용하여 DNA 손상 후에는 상향조절되어 DNA의 수선을 위하여 세포주기의 정체가 일어나거나 DNA의 손상이 광범위한 경우에는 세포사멸을 유발하는 것이 밝혀졌다. 이외에도 다양한 종양억제 유전자들이 이와 유사한 세포사멸 기전에 의하여 종양을 억제하는 것으로 연구되었다.

HCCS-1 (Human Cervical Cancer Suppressor-1) 유전자는 자궁경부를 포함한 다양한 정상 조직에서 발견되는 555Kb 크기의 유전자로 79개의 아미노산으로 구성된 0.9Kd의 HCCS-1 단백질을 생산하며, 자궁경부암 조직과 다른 암세포에서는 발현량이 매우 적거나 발현되지 않는 것으로 밝혀져 이를 통해 HCCS-1 유전자가 종양억제유전자일 가능성을 발견하여, HCCS-1 유전자를 Lipofectamin을 이용하여 HeLa 세포주에 이입하여 세포사멸의 유발과 성장 억제를 보고하였다¹⁰⁾. 하지만 아직까지 HCCS-1 유전자의 기능과 세포사멸 기전에 대한 지식은 미진한 상태이다.

이번 연구에서는 HCCS-1 유전자를 아데노바이러스를 운반체로 사용한 재조합 HCCS-1 아데노바이러스가 자궁암 세포주에서와 같이 구강암세포주에 대한 성장 억제 효과를 나타내는가를 확인하고 이러한 성장 억제 효과가 세포사멸의 유발에 의한 것임을 확인하고자 시행하였다.

II. 연구 재료 및 방법

세포주 및 배양

이번 실험에서는 구강저의 편평세포암에서 기원한 SCC-15 세포주를 미국조직은행 (American Type Culture Collection; Manassas, VA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 배양은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Nutrient Mixture F-12 Ham's (Hyclone, Logan, UT)에 10% Fetal bovine serum(FBS; Hyclone, Logan, UT)과 5% P/S (Penicillin/Streptomycin; Hyclone, Logan, UT)가 포함되어 있는 배지를 사용하였다. 세포주는 37°C, 5% CO₂의 조건으로 항온배양기에서 배양하였다.

재조합 아데노바이러스 벡터의 제작

재조합 아데노바이러스의 제조와 분리는 전술한 바에 따랐으며⁷⁾, 2×10⁷/ml의 농도로 정량하고 virus stock을 -80°C 냉동고

에서 사용 전까지 보관하였다. 재조합 HCCS-1 아데노바이러스 (Ad5CMV-HCCS-1)는 E1 region이 변형된 아데노바이러스 내에 Cytomegalovirus (CMV) promotor, HCCS-1 유전자와 SV40 polyadenylation signal을 삽입하였다. 표지유전자로 사용하기 위하여 크기는 3.2kb이며 CMV promotor와 bovine growth hormone(BGH) poly-A signal이 삽입 되어있는 LacZ를 사용하였다. 구강암 세포주에 감염시킬 때에는 serum을 첨가하지 않은 DMEM/ Ham's F-12 media에 viral stock을 희석하여 정해진 MOI (multiplicity of infection)로 배양액내의 세포 단일 층에 가하여 37°C에 방치하면서 15분 간격으로 흔들어서 2시간동안 배양하였다. 그 후 감염된 세포는 기존의 10% FBS, 5% P/S가 첨가된 DMEM/ Ham's F-12 media로 배양하였다.

Ad5CMV-LacZ transduction과 X-gal staining

24 well plate에 세포주를 well당 2×10⁴개씩 분주하고 Ad5 CMV-LacZ를 0, 2, 10, 20, 50, 100 MOI가 되도록 감염시킨 후 24시간 배양하고 0.5% glutaraldehyde로 상온에서 5분간 고정하였다. PBS(phosphate-buffered saline; Gibco, Grand Island, NY)으로 2차례 세척하고 β-galactosidase activity를 측정하기 위해 X-gal 용액 (1.3 mM MgCl₂, 15 mM NaCl, 44 mM Tris, pH 7.4, 3mM potassium ferricyanide, 3mM potassium ferrocyanide, 2% X-gal in n, n'-dimethylformamide)으로 24시간동안 부란시켰다. 각 well에서 500개의 세포를 3회 계산하여 양성으로 염색된 세포의 백분율을 판단하였다.

HCCS-1 유전자에 대한 Northern blot analysis

이입된 HCCS-1 유전자의 발현 유무를 확인하기 위하여 Northern blotting을 시행하였다. 20μg의 총 denatured RNA를 1% formaldehyde agarose gel에서 전기영동하고 이를 nylon membranes (Boehringer-Mannheim, Germany)에 transfer하였다. Blot은 ³²P-labeled random-primed CG373 partial cDNA probe로 42°C에서 밤새 hybridize시켰다.

Cell Counting Kit-8에 의한 세포활성도 측정

96 well plate에 SCC-15 세포주를 well당 1×10⁴ 개씩 분주하고 Ad5CMV-HCCS-1을 MOI 별로 감염시킨 후 48, 96, 144, 192시간 배양하고, Cell counting kit-8 (CCK-8; Dojindo Molecular Technologies, Inc, Gaithersburg, MD)을 배지 부피의 1/10로 처리한 뒤, 1시간동안 방치하고 분광광도계 (Elisa reader system; Molecular devices)를 이용하여 흡광도 450 nm에서 측정하였다.

DNA 분절화 확인

6 well plate에 세포주를 well당 1×10⁵ 개씩 분주하고 Ad5CMV-HCCS-1을 MOI별로 감염시킨 후 48, 96, 144, 192시간

배양하고 Trypsin/EDTA를 이용하여 수확하였다. Qiagen mini kit (Qiagen; Max-Volmer-strabe, Hilden, Germany)를 이용하여 제작회사의 제안에 따라 DNA를 추출하였으며, 추출된 각각의 DNA 시료 5 μ g을 TE용액에 녹인 후 ethidium bromide가 들어있는 1% agarose gel에 전기영동하고 UV detector 상에서 확인하였다.

핵 응축도 확인

세포주를 6 well plate에 well당 1 \times 10⁵개로 분주하고 Ad5CMV-HCCS-1을 MOI별로 감염시키고 28, 96, 144, 192 시간 동안 배양한 후, 3.7% 포르말린으로 10분간 고정하고, 100% methanol을 10분간 처리하여 세포를 고정시켰다. 슬라이드에 고정된 세포에 methanol을 약 1-2방울 떨어뜨리고 건조시킨 후 DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindone dihydrochloride; Sigma, St. Louis, MO)를 5 μ g/well의 농도로 처리하고 형광현미경으로 관찰하였다.

Flow cytometry에 의한 DNA 함량분석

6 well plate에 well당 1 \times 10⁵개씩 분주하고 24시간 배양한 후, 실험군의 각 well에 Ad5CMV-HCCS-1을 2, 20, 50 MOI로 감염시켰다. 48시간 후 세포를 수거하고 PBS로 두 차례 세척한 후 70% Ethanol로 4 $^{\circ}$ C에서 12시간동안 고정시켰다. Ethanol을 제거하고 0.5 ml PBS로 다시 녹인 뒤 1 mg/ml 농도의 RNase (Sigma, St. Louis, MO) 0.5 ml와 100 mg/ml 농도의 PI (propidium iodide; Sigma, St. Louis, MO) 0.5 ml를 차례로 첨가하여 상온의 암실에서 30분간 반응시켰다. 유세포 분석 전까지는 4 $^{\circ}$ C의 암실에 보관하였으며 유세포 분석기 (FAC Star plus, Becton and Dickinson, Mountain View, CA)를 이용하여 분석하였다.

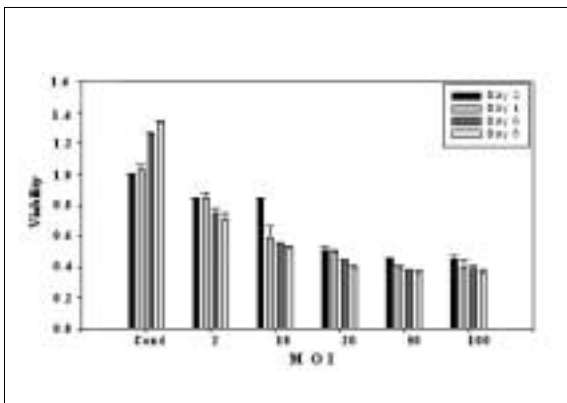


Fig. 1. Effect of HCCS 1 gene on cell viability of SCC-15 cell line. Cell line was cultured in 96 well plate for 48, 96, 144, 192 hours with indicated MOI concentration of HCCS 1 gene. The number in the left column represent relative viability. The standard deviations are shown on top of each bar.

III. 결 과

아데노바이러스 이입효율

재조합 Ad5CMV-LacZ 바이러스로 감염시킨 후 X-gal staining으로 이입효율을 측정된 결과 SCC-15 세포주에 Ad5CMV-LacZ의 이입 효율은 MOI가 2일때 20%이었고, MOI가 20일때 80%로 MOI 20 이상에서는 비슷한 이입효율을 보였다.

HCCS-1 유전자 발현 확인

Northern blot으로 확인할 결과 Ad5CMV-HCCS-1로 transduction된 구강암 세포주에서 단일의 0.6-kb mRNA transcript가 발현되며, Ad5CMV-LacZ transduction된 것과 wild-type에서는 HCCS-1 mRNA transcript가 발현되지 않거나 극미량만 발현되었다.

Ad5CMV-HCCS-1에 의한 세포활성도의 영향

구강암 세포주에 Ad5CMV-HCCS-1을 MOI별로 감염시키고 48, 96, 144, 192시간 후 세포활성도를 확인한 결과 대조군의 경우 구강암 세포주에서 8일 경과 후 약 40%의 세포활성도의 증가를 보인 반면, 실험군의 경우 시간경과에 따라 세포활성도의 감소를 보였는데 20 MOI의 구강암세포주에서 8일 경과 후 약 50%의 감소를 보였다. 또한 MOI가 높아질수록 세포활성도는 떨어지는 양상을 보였다(Fig. 1).

DNA fragmentation analysis

Ad5CMV-HCCS-1을 감염시키고 48, 96, 144, 192시간 후 DNA를 분리하여 각각 같은 농도의 DNA를 전기영동한 결과 48시간부터 바이러스의 농도가 20 MOI 이상에서 뚜렷한 분절이 나타나지는 않았지만 band의 굵기가 가늘어지는 것을 확인하였다(Fig. 2).

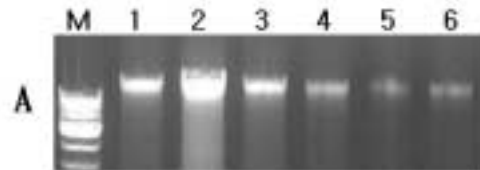


Fig. 2. DNA fragmentation by affect of HCCS 1 gene on SCC-15 cell line. DNA was extracted from cell line and gel electrophoresis was performed. Lane 1 (M) : 1Kb size marker; Lane 2 through 7 : treatment of 0, 2, 10, 20, 50, 100 MOI concentration HCCS 1 gene.

핵 응축도 측정

Ad5CMV-HCCS-1을 감염시키고 DAPI로 핵을 염색한 후 핵의 응축도를 관찰한 결과 48시간 이후부터 핵이 응축되는 것을 관찰할 수 있었으며, 20 MOI에서 세포 응축도가 두드러지게 관찰되었다(Fig. 3).

Flow cytometry에 의한 DNA 함량분석

세포의 DNA 함량을 DNA 삽입색소인 PI로 염색하여 유세포

분석기로 측정한 결과, DNA 함량에 따라 대조군과 실험군은 정규분포를 보이는 DNA histogram을 나타내었으며, 대조군에서는 정상적인 세포주기에 해당하는 G0/G1 기의 peak가 동일한 위치와 크기로 관찰되어 살아있는 정상세포임을 알 수 있었고, 10 MOI에서는 G1기에서 arrest가 일어남을 알 수 있으며, 20 MOI에서부터 G0/G1 peak 앞에 DNA 분절화를 뜻하는 G0/G1 전분기 분획 (pre-G0/G1 fraction)이 형성되어 세포사멸이 유도됨을 알 수 있었다(Fig. 4).

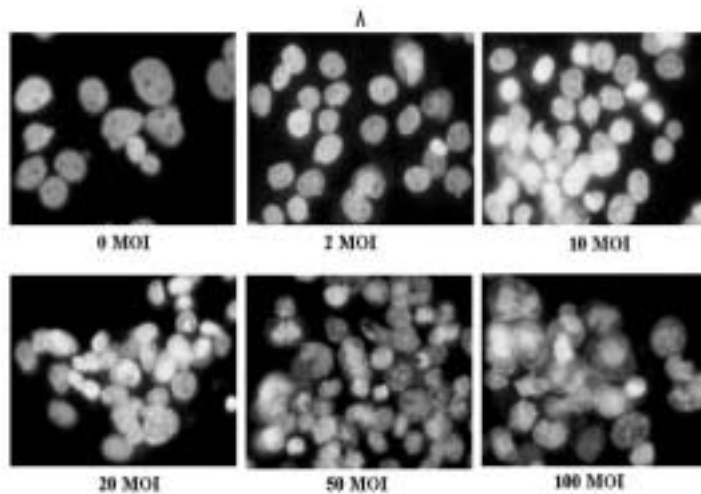


Fig. 3. DAPI staining indicated a higher percentage of SCC-15 cell line transduced by HSCC-1 gene with condensed and fragmented nuclei. (Fluorescence image were captured with fluorescence microscope. DNA was shown blue color)

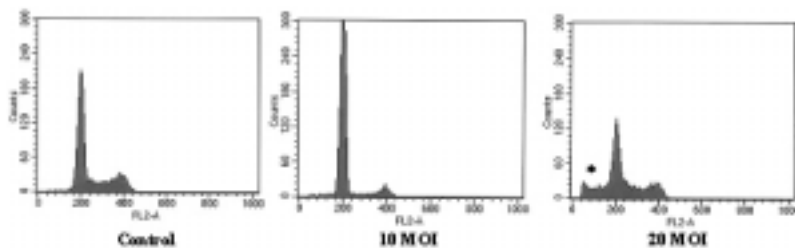


Fig. 4. DNA histograms by flow cytometric measurements. Cells were incubated for 48 hours with indicated MOI. Cells were stained with propidium iodide and analyzed by FACS. In this histogram of a group treated with 20 MOI, apoptosis was corresponded to pre-G0/G1 fraction (*)

IV. 고 찰

이번 연구에서는 구강암에 대한 재조합 HSCC-1 아데노바이러스 유전자 치료의 유용성과 작용 기전을 알아보기 위하여 세포사멸 유도를 통한 억제 효과를 관찰하였다.

본 연구에서 사용된 유전자 전달체인 아데노바이러스는 유전자 치료 등에 다양하게 이용되고 있다. 아데노바이러스의 다양한 이용이 가능한 것은 이 바이러스의 몇 가지 생물학적 특성에 기인하는데, 우선 아데노바이러스는 다양한 종류의 세포에 유전자를 전달할 수 있으며, 유전자의 전달은 세포분열의 활성도와 무관하게 이루어진다. 또한 숙주 세포 염색체에 삽입되어 삽입 돌연변이를 유발하는 레트로바이러스와는 달리 이입된 유전자가 episome로 일정기간 존재하다 사라짐으로서 숙주세포 유전자의 영구적 변형을 유발하지 않는다. 일반적으로 고역가의 바이러스 생산이 가능하며 높은 정도의 유전자 발현 수준을 보인다¹¹⁾. 저자들의 이전의 연구에 따르면 HSCC-1 유전자가 아데노바이러스 벡터를 이용하여 높은 효율로 구강암 세포주내에 성공적으로 전달되었으며 이의 mRNA가 표현되었고 이에 따른 구강암세포의 성장 억제가 관찰되었다⁷⁾. 아데노바이러스 벡터를 이용한 유전자 치료가 조직의 손상을 최소화하고 부작용을 줄이는 장점이 있으나 암세포의 완전한 관해를 유발하지는 못하고 반복 투여시 바이러스에 대한 면역반응이 유발되는 등의 극복해야할 기술적 난제들이 남아 있다¹²⁾.

암은 세포가 정상적인 조절을 벗어나 성장 및 분화의 균형이 깨어져서 발생하는 것으로 생각되고 있으며 그 중에서도 암유전자와 항암유전자가 중요하다는 것이 보고되어 있다¹³⁾. 특히 p53과 Rb 항암 유전자는 세포주기중 S기로 들어가 증식할 것인지, G1기에 머물면서 분화할 것인지, DNA 손상이나 기타의 장애가 너무 심하여 세포사멸로 죽을 것인지 여부를 결정하는 G1 checkpoint의 핵심인자로 알려져 있다¹⁴⁾.

세포사멸은 생명체의 발생과 분화에 기여하며 정상조직에서 조직의 형태 유지와 개조 등에 관여 한다. 이러한 세포사멸의 기전이 비정상적으로 작용하면 다양한 질환들을 유발한다.

세포사멸은 DNA 분절화(fragmentation)를 통하여 세포가 파괴하는 다양한 과정을 내포하며 이과정 가운데 내재적 경로(intrinsic pathway)는 DNA 손상, 저산소증(hypoxia), 성장 인자(growth factor)의 소멸과 같은 intra-cellular stress에 대한 반응으로 활성화된다. 미토콘드리아막의 투과성이 증가함으로써 caspase 연속반응이 시작되며 cytochrome C를 방출한다. 이러한 미토콘드리아의 변화는 procaspase-9, Apaf-1과 cytochrome C로 구성된 apoptosome을 형성한다. apoptosome은 caspase-9을 형성하며 세포사멸을 유발한다.

많은 학자들은 오랫동안 세포사멸의 촉진자와 억제자가 세포사멸의 발현의 아주 긴밀한 조절을 관장하는 것으로 설명해왔다^{15,16)}. 세포사멸을 조절하는 유전자 중 대표적인 것이 bcl-2이며 이와 유사한 염기서열을 가지는 유전자들을 bcl-2 family 유전자라고 부른다. Bcl-2 family에 속하는 단백질들은 크게 세포

사멸을 억제하는 anti-apoptotic protein과 세포사멸을 촉진시키는 pro-apoptotic protein들로 나뉜다. 이들은 상호작용을 통하여 세포사멸을 억제하거나 유발하는 것으로 설명된다. Anti-apoptotic protein의 대표격인 bcl-XL은 미토콘드리아를 통하여 사멸 신호 전달에 관여하는 Apaf-1 단백질이 pro-caspase-9과 결합하지 못하게 방해하여 세포사멸을 억제하는 기능을 수행한다. 이러한 bcl-XL의 anti-apoptotic 기능은 pro-apoptotic 단백질인 blk에 의해 억제된다. Bcl-2와 bcl-XL 단백질같은 anti-apoptotic protein은 결국 미토콘드리아로부터 cytochrome C의 해리를 억제함으로써 세포사멸을 방해하는 것으로 알려져 있으며 이들은 모두 BH1과 BH2 domain을 함유하고 있다. 한편 세포사멸을 촉진하는 pro-apoptotic 단백질인 bcl-2 member들은 크게 bcl-2의 구조와 유사한 bax, bak, bok을 포함한 subfamily와 BH3 domain 만을 갖는 BH3 family로 나뉜다. blk와 같은 BH3 domain을 갖는 pro-apoptotic 단백질들은 bcl-XL 같은 anti-apoptotic 단백질의 길항제로 작용함으로써 세포사멸을 유발하는데 관여하고 있다. 즉 pro-apoptotic 단백질과 anti-apoptotic 단백질의 반응 후에 형성되는 분자의 수준이 세포의 세포사멸을 결정하는 것으로 밝혀지고 있다^{15,16)}.

세포사멸을 통한 종양의 치료를 위해 종양억제 유전자인 p53에 대한 연구가 광범위하게 시행되었다. p53은 세포의 증식 조절에 관여할 뿐만 아니라 세포사멸의 유도에도 관여하는 인자로서 p53에 의해 조절되어지는 경로에 의한 세포사멸의 유도는 bcl-2 유전자(anti-apoptotic protein)의 발현의 감소와 bax(pro-apoptotic protein)발현의 상승과 연관이 있는 것으로 생각되어진다¹⁷⁾. 이외에도 다양한 종양억제 유전자들이 이와 유사한 세포사멸기전에 의하여 종양을 억제하는 것으로 연구되었다¹⁸⁾. 또한 구강암에서도 세포사멸로 구강암 세포주가 억제 등에 의하여 세포사멸되는 과정이 일부 밝혀졌다^{19,21)}.

이 연구에서 사용된 HSCC-1 유전자 발현에 따른 구강암세포주의 세포사멸의 원인을 조사하기 위하여 apoptotic DNA 분절 분석을 실시한 결과, DNA의 양이 감소함을 보일 뿐 분절화의 증거가 명확히 보이지 않았다. 그러나 추가로 시행한 유세포 측정기에 의한 DNA 함량분석을 시행한 결과 20 MOI에서 부터 DNA 분절화를 뜻하는 G0/G1 전분기 분획(pre-G0/G1 fraction)이 형성되었고 핵의 응축도가 20 MOI에서 두드러지게 관찰되므로써 HSCC-1 유전자 도입으로 구강암 세포주의 세포사멸이 유도됨을 유추할 수 있었다. 하지만 아직까지 HSCC-1 유전자가 세포내에서 어떤 경로를 거쳐 세포사멸을 유도하는 지에 대한 지식은 매우 부족하다. 다만 김 등의 연구에 의하면 caspase system의 활성화가 관련되어져 있을 것이라고 추측되고 있다¹⁰⁾. 그리고 세포의 성장과 사멸을 조절하는 인자가 매우 다양하나²²⁾ HSCC-1 유전자와 이들 인자 사이의 상호 작용에 관한 이해가 또한 부족하다. 따라서 향후의 연구를 통하여 HSCC-1 유전자가 세포 사멸과정에서 p16^{INK4a}, p15^{INK4b}이나 p21^{WAF} 등의 세포주기 조절인자와의 관계와 나아가서 세포사멸 촉진 또는 억제 단백질과의 관련성을 밝혀야 할 것으로 사료된다. 이 과정에서 나타나는 caspase system의 변화와 Bcl-2 familial 변화를 western blotting으로 조사하는 것이 필요할 것으로 여겨진다.

이러한 연구를 통하여 가능성인 종양 억제유전자인 HSCC-1 유전자가 세포사멸을 유발하는 기전을 규명한다면, 이에 대한 이해를 바탕으로 구강암 유전자 치료 등의 새로운 치료 방법의 소재로서 중요한 기여를 할 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결 론

이 연구에서는 종양억제 유전자로 알려진 HCCS-1 유전자를 재조합 HCCS-1 아데노바이러스를 이용하여 구강암 세포주에 도입시킨 후 세포 성장과 세포사멸에 미치는 영향을 관찰하였다. HCCS-1 유전자는 20 MOI에서 80%의 효율로 도입되어 구강암 세포주내에서 발현되었으며, 세포활성도 측정시 약 50%의 성장 억제 효과가 관찰되었다. 그리고 DAPI 염색과 Flow cytometry 등의 분석에서 핵의 응축과 DNA의 분절화가 나타나 시험관내에서의 성장 억제가 세포 사멸을 통해 억제됨을 입증할 수 있었다.

참고문헌

- Schwartz GJ, Mehta RH, Wenig BL, et al: Salvage management for recurrent squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck* 2000;22:34.
- Shillitoe EJ: Gene therapy for oral cancer; recent progress in research. *Oral Oncol* 1998;34:157-160.
- Cusack JC, Jr, Tanabe KK: Cancer gene therapy. *Surg Oncol Clin Am* 1998;7:421.
- Cai DW, Mukhopadhyay T, Liu Y, et al: Stable expression of the wild-type p53 gene in human lung cancer cells after retrovirus-mediated gene transfer. *Hum Gene Ther* 1993;4:617-624.
- Zhang WW, Fang X, Mazur W, et al: High-efficiency gene transfer and high-level expression of wild-type p53 in human lung cancer cells mediated by recombinant adenovirus. *Cancer Gene Ther* 1994;1:5-13.
- Wang J, Bucana CD, Roth JA et al: Apoptosis induced in human osteosarcoma cells is one of the mechanisms for the cytotoxic effect of Ad5CMV-p53. *Cancer Gene Ther* 1995;2:9-17.
- 김창현, 김진우, 김명진, 표성운: 구강암 유전자 치료를 위한 재조합 HCCS-1 아데노바이러스의 개발. *대약성외지* 2005;27:103-109.
- Fillis RE, Yuan J, Horvitz HR: Mechanism and function of cell death. *Ann Rev Cell Biol* 1991;7:663-698.
- Krammer PH, Behnann I, Daniel P, et al: Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr Biol* 1994;6:279-289.
- Kim TE, Kim YW, Kim JW: Candidate tumor suppressor, HCCS-1, is downregulated in human cancers and induces apoptosis in cervical cancer. *Int J Cancer* 2002;97:780-786.
- Tong-Chuan He, Shibin Zhou, Luis T, Da Costa, Jian Yu, et al: Simplified system for generating recombinant adenovirus. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:2509.
- Chirmule N, Probert K, Magosin S, Qian Y, Qian R, Wilson J: Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther* 1999;6:1574-1583.
- Levine AJ: the tumor suppressor gene. *Annu Rev Biochem* 1993;62:623-651.
- Steller H: Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995;267:1445-1449.
- Oltvia ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ: Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:225-232.
- Krajewski S, Krajewska M, Shabraik A, et al: Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitors of Bbcl-2. *Am J Pathol* 1994;145:1323-1336.
- Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, et al: Participation of p-53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991; 51:6304-6311.
- Anderson MJ, Stanbridge EJ: Tumor suppressor genes studied by cell hybridization and chromosome transfer. *FASEB J* 1993;7:826-833.
- Jordan RC, Catzavelos GC, Barrett AW, Speight PM: Differential expression of bcl-2 and bax in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Eur J Cancer Oral Oncol* 1996;32B:394-400.
- 김재우, 송재철, 이회경, 이태윤: 구강 편평세포암종 세포주 SCC-15에서 Mycolactone에 의한 apoptosis 효과. *대구외지* 2001; 27:511-518.
- 허균행, 이재훈, 김철환: 구강편평세포암종에서 미슬토 추출물의 apoptosis 유도효과에 대한 실험적 연구. *대구외지* 2005;31:13-23.
- Sherr CJ: Cancer cell cycles. *Science* 1996;274:1672-1677.