

구강편평세포암종에서의 Cisplatin 유도 아폽토시스에서의 NF- κ B의 활성화

서종천 · 성일용* · 김종렬

부산대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, *울산대학교 의과대학 울산대학교병원 치과/구강악안면외과

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2006;32:94-100)

ACTIVATION OF NF- κ B IN THE CISPLATIN-INDUCED APOPTOSIS OF ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Jong-Chun Seo, Iel-Yong Sung*, Jong-Roul Kim

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

**Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, Medical College of Ulsan University*

Purpose: This study was done to confirm the role of NF- κ B in cisplatin-induced apoptosis of oral squamous cell carcinoma.

Materials and Methods: Five cell lines originated from different oral cancer patients were tested for the apoptosis by the treatment of cisplatin. These cells showed different degree of cisplatin-resistance and the order is OSCC-2> OSCC-3> OSCC-5> OSCC-1> OSCC-4. OSCC-2 and OSCC-4 cells were assayed for the apoptosis by measuring DNA fragmentation and TUNEL staining after cisplatin treatment. While OSCC-4 cells showed apoptosis, OSCC-2 cells showed no or very slight apoptosis by cisplatin treatment. Next, It was determined whether NF- κ B activation is required in mediating cisplatin-induced apoptosis of OSCC-4 .

Result: The result was that elevated NF- κ B activity mediated cisplatin-induced apoptosis.

Conclusion: In conclusion, these findings suggest that NF- κ B activation is essential to cisplatin-induced apoptosis and it may be involved in cisplatin resistance in OSCC cells.

Key words: Apoptosis, NF- κ B, Cisplatin

I. 서 론

구강암은 국소 부위에 한정적으로 발생하는 암으로 가볍게 생각될 수 있으나, 인체 중에서 어느 부위보다 중요한 부위로서 발생률에 비하여 환자의 사회적 활동에 미치는 영향이 클 뿐만 아니라, 실제로 구강암은 생명을 위협하는 중대한 질환이다.

최근에는 구강암을 두경부암에 포함을 시키며, 두경부암은 그 발생 빈도로 보아 남자에서 4%, 여자에서 2% 정도로 알려져 있다. 두경부암 중에서는 후두암의 빈도가 가장 높고, 구강암, 비인두암의 순으로 호발한다¹⁾.

현재 임상에서 구강암의 항암 치료에 쓰이는 항암 약제중의 하나인 Cisplatin(CDDP)은 같은 DNA 가닥상의 인접한 2개의 guanine과 결합하여 interstrand crosslink를 형성하고 DNA 합성을 억제한다. 즉, 암세포의 핵내에 존재하는 DNA 이중나선 구조

에 부착되어 DNA복제를 방해하여 암세포 성장과 증식을 억제하고 암세포를 죽이는 효과를 나타내며, 세포주기에 비특이적으로 작용한다.

그러나 최근 연구에 의하면, Cisplatin은 구강 암을 포함한 두경부 암에 대하여 유효한 항암제이긴 하지만 그 약제 내성으로 인해 임상적인 문제가 증가하고 있다²⁾. 약제 내성을 가진 암세포에서는 종종 Cisplatin의 세포내 축적이 감소되는데, 이는 Cisplatin 흡수의 감소나 배출의 증가로 인해서 발생된다는 보고가 있다³⁾. 그러나 세포로 유입되는 Cisplatin의 정확한 기전은 완벽하게 밝혀지지 않았으나, Cisplatin의 세포로의 유입은, 단순 확산 혹은 막 단백질에 의해서 매개된다는 보고들이 있다⁴⁾. 또한, 종양 유전자와 종양억제 유전자의 발현 정도의 변화는 Cisplatin에 대한 세포 내성과 관련이 있다는 보고도 있다⁵⁾. 이러한 유전자들의 발현 변화는 세포의 항상성에 영향을 줄 수도 있다. 즉 Cisplatin의 투여로 c-fos protooncogene이 유도되며, c-fos protooncogene은 c-myc, metallothionein, DNA polymerase β 와 같은 AP-1(Fos/Jun complex)에 결합하는 domain을 가지고 있는 유전자들의 발현을 조절한다고 한다⁶⁾. Ras oncogene 또한 Cisplatin에 대한 내성과 관련이 있음이 보고되는데, Cisplatin에 내성이 없는 종양에서는 ras가 낮은 빈도로 돌연변이가 일어나는 반면, Cisplatin에 내성이 있는 종양(tumor)에서는 ras가 높은 빈도로 돌연변이가 발생하는 것으로 보고된 바 있다⁷⁾. 그러나 내성에

김종렬

602-739 부산광역시 서구 아미동1 가10 번지
부산대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Jong-Ryoul Kim

Dept. of OMFS, College of Dentistry, Pusan National University
1-10, Ami-Dong, Seo-Ku, Pusan, 602-739, Korea
Tel: 82-51-240-7429 Fax: 82-51-244-8334
E-mail: jorkim@pusan.ac.kr

따른 기전은 아직 완전히 밝혀지지는 않은 상태이다.

Cisplatin에 대한 내성 및 아폽토시스(apoptosis)와 관련한 많은 유전자들이 보고된 바 있다. 그러나 아직까지 두경부암에서 Cisplatin에 의한 세포의 아폽토시스 기전에 대한 보고는 없었다. 암세포에 Cisplatin을 처리할 때 DNA에 손상이 가고 그 결과 암세포가 아폽토시스라는 과정을 거쳐 죽는 것은 널리 알려진 사실이다⁵⁾. 그러나, DNA가 손상된 결과로 어떤 과정을 거쳐 세포가 아폽토시스를 거쳐 죽는지에 대하여는 잘 알려져 있지 않다.

일반적으로 세포의 아폽토시스 진행에 있어서 NF- κ B의 역할이 매우 중요한 것으로 알려져 있다. NF- κ B는 전사조절인자로서, 활성화 되면 세포가 살아가는 데에 필요한 유전자들을 유도하여 세포가 활성을 유지하며 살아남을 수 있도록 하는 것으로 알려져 있다. 기존의 연구 결과에 따르면 Cisplatin 처리한 세포에서 NF- κ B가 활성화 되면 세포의 아폽토시스가 일어나지 않음이 보고된 바가 있었다^{6,7)}. 따라서 일반적으로 NF- κ B의 활성화가 Cisplatin과 같은 항암제에 대한 내성을 증가시킨다는 보고가 있다^{6,7)}. 그러나, NF- κ B가 세포의 아폽토시스를 촉진시킨다는 보고들도 많다. 즉 NF- κ B가 세포의 아폽토시스를 막는 기전은 IAP family(c-IAP1, c-IAP2, XIAP)⁸⁾와 Bfl-1/A1^{9,10)} 및 Bcl-xL¹¹⁾과 같은 Bcl-2 family 등을 유도 시킴으로써 이루어지는 것으로 알려져 있다. 한편, NF- κ B가 세포의 아폽토시스를 촉진시키는 경우에는 NF- κ B를 활성화시키는 많은 요인들¹²⁻¹⁵⁾을 처리하는 경우 세포의 아폽토시스가 유발된다거나, NF- κ B의 억제제를 처리시 NF- κ B의 활성 억제와 더불어 세포 아폽토시스가 억제되거나¹⁶⁾ NF- κ B가 death receptor 6(DR6)¹⁷⁾, DR4, DR5¹⁸⁾ 그리고 Fas 등¹⁹⁾과 같은 death receptor들을 유도하면 아폽토시스가 나타난다는 보고들이 있다. 따라서 항암제는 기본적으로 다양한 신호 전달 기전을 활성화시키는데, 이 활성화된 다양한 신호전달 체계의 상호 작용 결과 어느 쪽의 신호가 더 강하게 활성화되는 지에 따라 세포의 생사여부가 결정됨을 알려 준다.

본 연구에서는 구강편평상피세포암 세포주들을 대상으로 항암제인 Cisplatin 처리시 아폽토시스가 유도되는 세포들을 확인하고, 이 세포를 대상으로 Cisplatin에 의한 암세포의 아폽토

시스 과정 중 NF- κ B가 암세포의 아폽토시스에 관여하는 지를 확인하며, 항암제에 대한 암세포의 내성을 결정하는데 있어서 가장 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려진 NF- κ B의 역할에 대하여 연구하였다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 세포배양

구강암 환자의 암조직에서 절취하여 배양한 5종류의 구강편평상피세포암주(oral squamous cell carcinoma)²⁰⁾를 사용하였다 (Table 1). 세포는 fetal bovine serum(FBS)이 10% 그리고 streptomycin과 gentamycin(각각 50 mg/l 및 80 mg/l, Gibco BRL, USA)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, GIBCO-BRL, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 아폽토시스 실험을 위하여 세포는 60-mm dish에 배양 후 24시간 지난 다음 Cisplatin을 처리하였다.

2. MTT(5-diphenyl dimethyl tetrazolium bromide) assay

세포를 trypsin/EDTA로 수확한 후 96well microplate에 각 well마다 100 μ l 씩 세포(1.2×10^4 cells/well)를 넣었다. 그리고 37°C, 5% CO₂ 배양기에 세포가 부착할 때까지 4시간 동안 배양하였다. Cisplatin을 적절한 농도로 처리하고 난 후, 전체 부피를 200 μ l 가 되게 DMEM media를 첨가한 후 12시간 동안 배양하였다. 그 후 MTT (1 mg/ml in PBS)를 처리하고 4시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에 배양하였다. 400 g(Clinical centrifuge; Joan GR⁴¹¹⁾에서 10분 동안 원심 분리한 후 syringe needle로 상층액을 제거하였다. 0.04N HCl-isopropanol를 100 μ l 씩 첨가하여 침전물을 녹인 후 pipetting하여 490 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다. 아무것도 처리하지 않은 대조군의 값을 뺀 후 Cisplatin 처리한 세포의 흡광도를 Cisplatin 처리하지 않은 세포의 흡광도로 나누어 살아있는 세포의 비율을 구하였다.

Table 1. Characteristics of the OSCC cell lines used in this study SCC: Squamous cell carcinoma

Cell lines	Primary site	Pathologic type	Cell differentiation
OSCC-1	Tongue	SCC	P/D
OSCC-2	Buccal mucosa	SCC	M/D
OSCC-3	Gingiva	SCC	M/D
OSCC-4	Tongue	SCC	W/D
OSCC-5	Floor of mouth	SCC	W/D

P/D: Poor differentiation, W/D: Well differentiation, M/D: Moderate differentiation

3. DNA fragmentation analysis

세포의 아포토시스를 확인하기 위하여 DNA fragmentation 여부를 조사하였다. 3×10^6 cells 정도의 세포를 모은 후 PBS로 세척한 다음 70% ethanol로 prefix시켰다. 세포를 원심분리하여 모은 후 50 μ l의 phosphate-citrate buffer(186 mM Na_2HPO_4 , 6.7 mM citric acid)에 현탁 시킨 다음 상온에서 30분간 반응시켰다. Phenol-Chloroform (1:1)을 추출한 후 2.5 volumes의 ethanol을 사용하여 침전시켰다. 침전물을 RNase가 100 μ g/ml의 농도로 들어있는 TE buffer에 녹인 후 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음 2% agarose gel에 전기영동을 수행하여 DNA fragmentation을 확인하였다

4. TUNEL(Terminal deoxynucleotide transferase UTP Nick End Labelling) assay

세포의 아포토시스를 측정하기 위하여 TUNEL 염색을 수행하였다. TUNEL 염색은 in situ cell death detection kit, TMR Red를 사용하여 수행하였으며 실험 방법은 제조사(Roche Molecular Biochemicals Mannheim, Germany)의 protocol을 따라 수행하였다. 간단히 설명하면, 세포를 60-mm dish에 2×10^6 cells/ml의 농도로 심어서 24시간 동안 배양한 다음 cisplatin을 처리하였다. Cisplatin을 처리한 세포를 모은 후 2% paraformaldehyde 용액으로 고정시키고 0.1% Triton X-100가 들어있는 0.1% sodium citrate 용액으로 permeabilization 시켰다. 세포를 PBS로 2회 세척 후 terminal deoxynucleotidyl transferase와 tetramethyl-rhodamine-dUTP가 첨가된 TUNEL reaction mixture에 배양하였다. 배양 후 FACS cytometer(Becton Dickinson, Inc. U.S.A.)를 사용하여 형광물질을 분석함으로써 세포의 아포토시스를 측정하였다.

5. TNF α 및 anti-TNF α 항체 처리

구강 편평상피세포암 중 세포주의 아포토시스과정에서 TNF α (Tissue Necrosis Factor α)에 의하여 영향을 받는지를 확인하기 위하여 세포에 10 ng/ml 혹은 50 ng/ml의 TNF α (BD Biosciences PharMingen, San Diego, U.S.A.)를 처리하거나 10 μ g/ml 혹은 50 μ g/ml의 anti-TNF α 항체(BD Biosciences PharMingen, San Diego, U.S.A.)을 처리하고, 37°C에서 24시간 동안 반응시켰다.

6. EMSA(Electrophoretic mobility shift assays)

세포의 NF- κ B 활성을 측정하기 위하여 EMSA를 수행하였다. 구강암 세포에서 Lee 등²⁰의 방법을 사용하여 핵 추출물을 얻었다. C-Rel의 consensus binding site를 지니는 double-stranded oligonucleotides(5' -AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC-3') (Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz U.S.A.)의 5' end를 polynucleotide kinase와 [γ -³²P] dATP를 사용하여 label 하였다. 핵 추출물 2.5-5 μ

g와 동위원소로 label된 oligonucleotide 1 μ l (20,000 c.p.m.)를 20 μ l의 incubation buffer (10 mM Tris-HCl, 40 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM β -mercaptoethanol, 2% glycerol, 1-2 μ g of poly dI-dC)에서 넣고 25°C에서 20분 동안 반응시켰다. NF- κ B oligonucleotide의 결합이 특이한 결합인지를 확인하기 위하여 mutant oligonucleotide와 competition을 수행하였다. 반응 결과 형성된 DNA-protein complexes를 5% nondenaturing polyacrylamide gels에서 분리한 다음 X-ray film에 감광하여 분석하였다.

III. 연구 성적

1. MTT assay를 이용하여 Cisplatin 처리 후 구강 편평상피세포암 (OSCC) 세포주들의 생존률 분석

구강암 세포주 5종류(OSCC-1, OSCC-2, OSCC-3, OSCC-4, OSCC-5)의 세포를 대상으로 하여 Cisplatin을 농도별로 처리한 후(Table 1) MTT assay를 통하여 세포 생존률을 확인하였다. 그 결과 Cisplatin의 농도에 따라 생존률의 정도가 달랐는데, 40 μ M의 농도에서 Cisplatin에 대한 내성은 OSCC-2> OSCC-3> OSCC-5> OSCC-1> OSCC-4 등과 같은 순서를 보였다. 5가지 세포주 중에서 특히, OSCC-4 세포는 Cisplatin에 대해 감수성을, OSCC-2 세포는 내성을 나타내었다(Fig. 1).

2. Cisplatin 처리 후 DNA fragmentation 확인

Cisplatin에 대해 OSCC-4와 OSCC-2 세포 사이에 서로 다른 감수성을 보이는 이유가 Cisplatin에 의한 아포토시스의 유도가 다르기 때문인지를 확인하기 위하여 DNA fragmentation 여부를 조사하였다. OSCC-4와 OSCC-2 세포들에 Cisplatin을 40 μ M 처리 후 각각 12시간 동안 배양시킨 후 시간대별로 genomic DNA를 추출하여 2% agarose gel에서 전기영동 하였다. OSCC-4는 12시간째 DNA fragmentation을 보인 반면 OSCC-2는 DNA fragmentation을 보이지 않았다(Fig. 2).

3. TUNEL assay

OSCC-4 및 OSCC-2 세포의 Cisplatin에 대한 내성의 차이가 Cisplatin에 의한 아포토시스의 차이에 의한 것인지를 재확인하기 위하여 TUNEL 염색을 수행하였다. OSCC-4와 OSCC-2에 Cisplatin을 10, 20, 30, 40, 70 μ M 등의 농도로 처리한 다음 12시간째에 TUNEL 염색을 하여 FACS(Fluorescence activated cell sorter)로 분석 하였다. 그 결과, Fig. 3에서와 같이 Cisplatin에 내성을 보이는 세포주인 OSCC-2는 실험에 사용한 Cisplatin 농도 범위에서 아포토시스가 관찰되지 않았다. 반면에 Cisplatin에 감수성이 있는 OSCC-4는 30 μ M에서부터 아포토시스를 보이기 시작했으며, 40 μ M의 농도에서는 62%의 세포에서 아포토시스가 발생하였다. 이상의 결과들로부터 OSCC-4와 OSCC-2 세포사이에 보이는, Cisplatin에 대한 내성의 차이가 Cisplatin에 의한 아

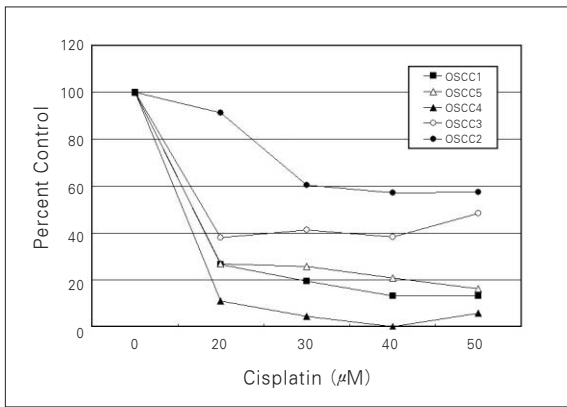


Fig. 1. MTT assay for the viability of 5 oral squamous cell carcinoma cell lines according to cisplatin concentrations.

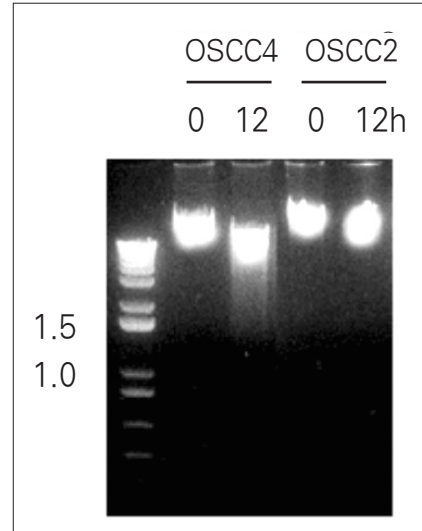


Fig. 2. DNA fragmentation assay for the detection of apoptosis in OSCC-4 cells treated with 40 μ M cisplatin. DNA was extracted from the cells at the indicated times and, then, was analyzed for the presence of fragmentation by agarose gel electrophoresis.

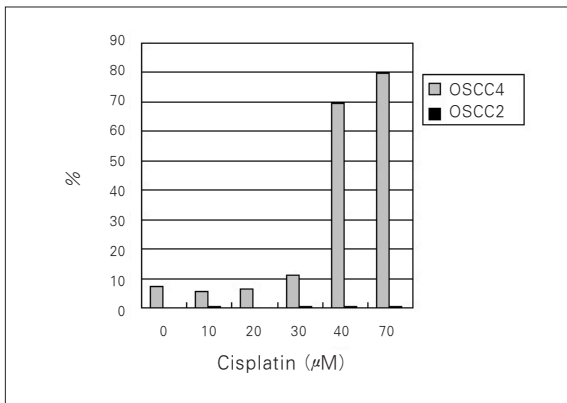


Fig. 3. Cisplatin treatment induces apoptosis in OSCC-4 cells in a dose-dependent manner. In OSCC-4 cells were treated either with different dose of CDDP for 12 hrs. Cells were then fixed with 2% paraformaldehyde, stained with TUNEL, and were analyzed by FACS.

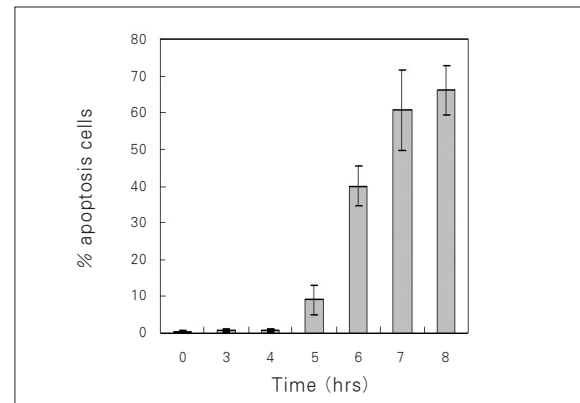


Fig. 4. Cisplatin treatment induces apoptosis in OSCC-4 cells in a time dependent manner. OSCC-4 cells were treated either with 40 μ M cisplatin for the indicated times. Cells were then fixed with 2% paraformaldehyde, stained with TUNEL, and were analyzed by FACS.

아포토시스의 유도 여부와 관련이 있음을 확인할 수 있었다.

다음으로, Cisplatin 처리에 의하여 아포토시스가 일어나는 OSCC-4세포를 대상으로, Cisplatin 처리 후 어느 시간 때부터 아포토시스가 일어나는 지를 확인하기 위하여 40 μ M의 Cisplatin을 처리한 다음 일정 시간대 별로 TUNEL 염색을 한 후 FACS로 분석을 하였다. 그 결과 Fig. 4에서와 같이 OSCC-4세포에서의 아포토시스는 Cisplatin 처리 후 5시간째 부터 나타나기 시

작하여 점점 증가하는 경향을 보였다.

4. TNF α 및 anti-TNF α 항체 처리 결과

TNF α 가 OSCC-4 세포의 아포토시스에 관여하는 지를 확인하기 위하여 OSCC-4 세포의 배양액을 대상으로 TNF α 의 양을 측정하여 보았으나 검출되지 않았다. 그러나 검출되지 않을

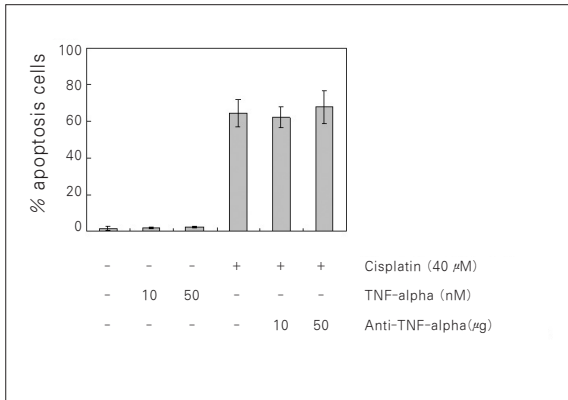


Fig. 5. TNF α is not responsible for the CDDP-induced apoptosis. OSCC-4 cells were treated with the indicated concentration of cisplatin or anti-TNF α for 6 h or TNF α for 24 hrs. Cells were then collected, stained with TUNEL, and were analyzed by flow cytometry.

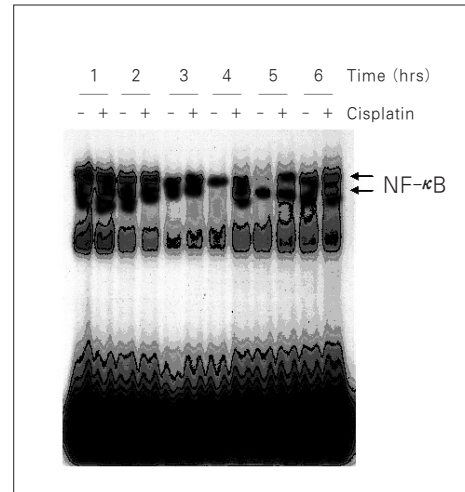


Fig. 6. CDDP treatment causes activation of DNA binding of NF- κ B. CDDP treatment induced NF- κ B activation time-dependent manner, as indicated by EMSA. CDDP treatment induced two complexes in both treated and untreated cells but the faster migrating complex was significantly increased only in treated cells 4 h after CDDP treatment.

정도의 미량으로도 OSCC-4 세포에 아포토시스를 유발할 가능성이 있기 때문에 TNF α 에 대한 중화제 처리를 시행하였다. TNF α 가 OSCC-4 세포의 아포토시스에 중요한 역할을 한다면, 항체를 이용하여 이를 중화시키면 OSCC-4세포에서 아포토시스가 일어나지 않아야 한다. 그러나 Cisplatin을 처리한 OSCC-4 세포에 TNF α 의 중화 항체를 처리하여도 세포의 아포토시스는 일어났다. 그리고 OSCC-4세포에 TNF α 만 처리한 경우에는 아포토시스가 일어나지 않았다(Fig. 5).

5. Cisplatin에 의한 OSCC-4 세포의 아포토시스와 NF- κ B의 활성화

Cisplatin에 의한 OSCC-4 세포의 아포토시스에 있어서도 NF- κ B의 활성화에 변화가 있을 가능성이 매우 높기때문에 이를 확인하여 보았다. 그 결과 예상과는 반대로 40 μ M의 Cisplatin을 처리하여 아포토시스가 일어나고 있는 OSCC-4 세포에서 NF- κ B의 활성화가 증가됨이 확인 되었다(Fig. 6). 활성화된 NF- κ B에 의하여 2개의 DNA-protein 복합체 band가 확인되었는데, Cisplatin 처리 후 1-3시간 사이에서는 Cisplatin 처리한 세포나 처리하지 않은 세포 모두 두개의 복합체가 점점 감소하는 경향을 보였다. 그러나 4시간 이후부터 NF- κ B 활성화가 다시 증가하기 시작하였는데, 큰 복합체의 경우 Cisplatin 처리한 세포와 처리하지 않은 세포 모두에서 증가한 반면 작은 복합체는 Cisplatin 처리한 세포에서만 발현이 증가함이 확인되었다. 이 결과로부터 작은 복합체에 관여하는 NF- κ B subunit의 활성화가 Cisplatin에 의한 OSCC-4 세포의 아포토시스를 유도할 가능성이 높음을 알 수 있었다.

IV. 총괄 및 고찰

Cisplatin은 현재 임상에서 사용되고 있는 30여종의 항암제 중 가장 유용한 약제의 하나로 고환암, 난소암, 폐암, 두경부암, 유방암, 방광암, 위암, 자궁경부암, 골수종 등의 많은 종류의 암에 매우 유효하다. 하지만 최근 연구에 의하면 그 내성으로 인한 임상적인 문제가 증가되고 있는 추세이다³⁰.

본 연구에서는 항암제인 Cisplatin에 의한 두경부암 세포의 아포토시스에 있어서 NF- κ B의 역할을 규명하고자 하였다. 먼저 사람의 구강암 조직에서 유래한 5종류의 세포주들을 대상으로 하여 Cisplatin에 대한 세포 생존율을 분석하였다. 그 결과 Cisplatin에 대한 세포 생존율이 각각 달랐는데, 특히 40 μ M의 농도에서 OSCC-4는 감수성을 OSCC-2는 내성을 보였다. 내성을 보이는 OSCC-2와 감수성을 보이는 OSCC-4만을 대상으로 Cisplatin 처리에 의한 내성의 차이가 아포토시스의 차이에 의한 것인지를 확인하기 위하여 DNA fragmentation 정도를 TUNEL 법으로 분석하였다. 그 결과 Cisplatin에 내성을 보이는 OSCC-2 세포는 아포토시스가 일어나지 않은 반면 감수성을 보이는 OSCC-4 세포는 아포토시스가 활발하게 일어났다. 이로부터 Cisplatin에 대한 내성의 차이는 Cisplatin처리 결과 발생하는 아포토시스의 차이에 의함을 확인할 수 있었다. 이 결과는 Cisplatin이 세포에 아포토시스를 유발한다는 이전의 결과²⁹와 일치하는 것이었다. 이 결과를 바탕으로 Cisplatin에 의하여 아포토시스가 일어나는 OSCC-4 세포를 대상으로 아포토시스에 있어서 NF- κ B의 역할을 분석하였다. 그 결과 NF- κ B가 Cisplatin 의한 아포토시스 유도에 관여함을 확인하였다.

지금까지 NF- κ B가 활성화 되면 세포의 아포토시스가 억제

된다는 많은 보고들²³⁻²⁶이 있었다. 그리고 Cisplatin 처리한 결과 활성화된 NF- κ B가 세포의 아폽토시스를 막는다는 보고들^{6,7}도 있었다. 따라서 NF- κ B가 세포의 아폽토시스를 유도한다는 본 연구 결과는 매우 특이한 것이었다. 그러나, 본 연구 결과와 유사하게 NF- κ B가 세포의 아폽토시스를 유도한다는 보고들도 있었는데, dopamine을 처리한 PC 세포²⁷, 괴사가 진행중인 신경세포²⁸, doxorubicin을 처리한 간암세포²⁹ 및 신경모세포종(neuroblastoma)의 세포¹⁶ 등에서 일어나는 아폽토시스가 그러한 경우들이다.

Cisplatin 처리한 OSCC-4 세포에서 NF- κ B가 어떤 기전을 통하여 아폽토시스를 유도할 만한 한가지 가능성은 NF- κ B가 TNF receptor superfamily의 발현을 유도하여 아폽토시스를 유발시키는 것이다. 지금까지의 연구 결과 NF- κ B는 CD95(Fas)^{19,30}, TRAIL-R1(DR4)¹⁸, 그리고 TRAIL-R2(DR5)^{18,31} 등과 같은 death receptor, 혹은 TNF-related apoptosis-inducing ligand(TRAIL)³¹⁻³³ 등과 같은 death ligand 등의 발현을 유도하여 세포에 아폽토시스를 유발시키는 것으로 보고되었다. 이와 같은 death receptor를 통한 death signal은 caspase-8을 활성화시킨 후 여러 과정을 거쳐 아폽토시스를 유발하는 것으로 알려져 있다³⁴. Cisplatin에 의하여 활성화된 NF- κ B가 어떤 기전을 통하여 표적 유전자들의 발현을 증가시키기도 하고 혹은 억제시키기도 하는 지 현재로서는 설명하기가 어려운 상황이다. 한가지 가능성으로는 NF- κ B의 표적 유전자들이 각각 특정 조합으로 이루어진 NF- κ B에 의하여 활성화 된다고 가정을 하고, NF- κ B의 dimmer 형태 중 Cisplatin은 특정 조합의 NF- κ B만을 활성화시키고 다른 조합의 NF- κ B는 억제함으로써 여러 표적 유전자들의 발현을 다르게 조절한다는 것이다. 그 결과 NF- κ B의 조절에 의하여 발현되는 유전자들에 의하여 세포의 아폽토시스를 유발할 가능성이 있다. 이러한 가능성을 뒷받침하여 주는 것으로 신경모세포종을 사용한 연구 결과가 있다. 신경모세포종 세포들 중 항암제인 doxorubicin에 내성을 보이는 S-type 세포와 아폽토시스가 유발되는 N-type 세포를 대상으로 NF- κ B의 활성을 분석한 결과 doxorubicin에 내성을 보이는 S-type 세포에서는 p50/p50 homodimer와 p65/p50 heterodimer 모두가 활성화 된 반면에, doxorubicin에 의하여 아폽토시스가 일어나는 N-type 세포에서는 p65/p50 heterodimer만이 활성화 됨이 확인 되었다^{16,26}. 본 연구 결과에서도 적어도 두개의 활성화된 NF- κ B 밴드를 관찰할 수 있었으며 이들 중 작은 밴드만이 Cisplatin에 의하여 활성화 되었다. 이후의 계속되는 연구를 통하여 Cisplatin을 처리한 OSCC-4 세포에서 NF- κ B의 어떤 subunit가 활성화 되었으며, 이 subunit의 활성화가 OSCC-4 세포 이외의 다른 암세포의 아폽토시스에서도 필요한지의 여부를 확인할 필요가 있을 것으로 사료된다.

결론적으로, 본 연구에서는 OSCC-4 세포를 대상으로 Cisplatin 처리와 NF- κ B의 활성화, 그리고 아폽토시스 등과의 관계를 분석하였다. Cisplatin에 의하여 활성화되는 NF- κ B의 subunit의 종류를 밝혀내고 또한 이와 같이 활성화 되는 NF- κ B의 정확한 표적 유전자를 밝혀내면 Cisplatin에 의한 OSCC-4 세포의 아폽토시스 기전을 보다 정확하게 이해할 수 있을 것으로

판단된다. 또한, 이러한 결과는 구강암 세포의 Cisplatin에 대한 내성의 기전을 보다 잘 이해할 수 있게 되어, 내성을 막는 치료제의 개발에 필요한 중요한 정보를 제공할 수 있을 것으로 사료되어 진다²⁹.

V. 결 론

항암제인 Cisplatin이 구강 편평상피세포암 세포에 아폽토시스를 유발하는데 있어서 NF- κ B의 역할을 규명하기 위하여 본 연구를 수행하였다. 먼저 사람의 구강암 조직에서 유래한 5종류의 세포주 OSCC1~OSCC5 들을 대상으로 Cisplatin에 대한 아폽토시스 여부를 분석하였다. 그 결과 Cisplatin의 농도에 따라 내성의 정도가 달랐는데, 40 μ M의 농도에서 Cisplatin에 대한 내성은 OSCC-2 > OSCC-3 > OSCC-5 > OSCC-1 > OSCC-4 등과 같은 순서를 보였다. Cisplatin에 내성을 지니는 OSCC-2 세포와 내성을 지니지 않는 OSCC-4 세포를 대상으로 Cisplatin 처리 후 12시간째에 DNA fragmentation 분석 및 TUNEL assay를 수행하여 아폽토시스의 차이를 분석하였다. 그 결과 Cisplatin에 내성을 보이지 않는 OSCC-4 세포의 경우 Cisplatin 처리에 의하여 아폽토시스가 유발되는 반면에 Cisplatin에 내성을 보이는 OSCC-2 세포의 경우에는 아폽토시스가 유발되지 않음이 확인되었다. 또한 Cisplatin에 의하여 아폽토시스를 보이는 OSCC-4 세포의 경우, 아폽토시스의 유발은 NF- κ B의 활성화에 의하여 이루어진 것임을 알 수 있었다.

종합적으로, 본 실험에 사용한 5종류의 구강편평상피세포암의 세포주들 중에서 OSCC-4 등이 항암제인 Cisplatin 처리에 의하여 아폽토시스를 보였으며, OSCC-4 세포의 아폽토시스에 NF- κ B의 활성화가 필요함을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. Andrews PA, Howell SB: Cellular pharmacology of cisplatin: perspectives on mechanisms of acquired resistance. *Cancer Cells* 1990;2(2):35-43. Review.
2. Hromas RA, North JA, Burns CP: Decreased cisplatin uptake by resistant L1210 leukemia cells. *Cancer Lett* 1987;36(2):197-201.
3. Moorehead RA, Singh G: Influence of the proto-oncogene c-fos on cisplatin sensitivity. *Biochem Pharmacol* 2000;15;59(4):337-45.
4. Fokstuen T, Rabo YB, Zhou JN, Karlson J, Platz A, et al: The Ras farnesylation inhibitor BZA-5B increases the resistance to cisplatin in a human melanoma cell line. *Anticancer Res* 1997;17(4A):2347-52.
5. Eastman A: Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system. *Cancer Cells* 1990;2(8-9):275-80. Review.
6. Yeh PY, Chuang SE, Yeh KH, Song YC, Ea CK, et al: Increase of the resistance of human cervical carcinoma cells to cisplatin by inhibition of the MEK to ERK signaling pathway partly via enhancement of anticancer drug-induced NF kappa B activation. *Biochem Pharmacol* 2002;15;63(8):1423-30.
7. Rong R, He Q, Liu Y, Sheikh MS, Huang Y: TC21 mediates transformation and cell survival via activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and NF-kappaB signaling pathway. *Oncogene* 2002;7;21(7):1062-70.
8. Rayet B, Gelinac C: Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* 1999;22;18(49):6938-47. Review.

9. Cheng Q, Lee HH, Li Y, Parks TP, Cheng G: Upregulation of Bcl-x and Bfl-1 as a potential mechanism of chemoresistance which can be overcome by NF-kappaB inhibition. *Oncogene* 2000;5;19(42):4936-40.
10. Wang CY, Guttridge DC, Mayo MW, Baldwin AS Jr: NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 1999;19(9):5923-9.
11. Visconti R, Cerutti J, Battista S, Fedele M, Trapasso F, et al: Expression of the neoplastic phenotype by human thyroid carcinoma cell lines requires NFkappaB p65 protein expression. *Oncogene* 1997;16;15(16):1987-94.
12. Barger SW, Horster D, Furukawa K, Goodman Y, Krieglstein J, et al: Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca2+ accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;26;92(20):9328-32.
13. Hunot S, Brugg B, Ricard D, Michel PP, Muriel MP, et al: Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;8;94(14):7531-6.
14. Tong L, Perez-Polo JR: Transcription factor DNA binding activity in PC12 cells undergoing apoptosis after glucose deprivation. *Neurosci Lett* 1995;26;191(3):137-40.
15. Grimm S, Bauer MK, Baeuerle PA, Schulze-Osthoff K: Bcl-2 down-regulates the activity of transcription factor NF-kappaB induced upon apoptosis. *J Cell Biol* 1996;134(1):13-23.
16. Bian X, McAllister-Lucas LM, Shao F, Schumacher KR, Feng Z, et al: NF-kappa B activation mediates doxorubicin-induced cell death in N-type neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 2001;28;276(52):48921-9. Epub 2001 Oct 25.
17. Kasof GM, Lu JJ, Liu D, Speer B, Mongan KN, et al: Tumor necrosis factor-alpha induces the expression of DR6, a member of the TNF receptor family, through activation of NF-kappaB. *Oncogene* 2001;29;20(55):7965-75.
18. Ravi R, Bedi GC, Engstrom LW, Zeng Q, Mookerjee B, et al: Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB. *Nat Cell Biol* 2001;3(4):409-16.
19. Zheng Y, Ouaz F, Bruzzo P, Singh V, Gerondakis S, et al: NF-kappa B RelA (p65) is essential for TNF-alpha-induced fas expression but dispensable for both TCR-induced expression and activation-induced cell death. *J Immunol* 2001;15;166(8):4949-57.
20. Kim SY, Chu KC, Lee HR, Lee KS, Carey TE: Establishment and characterization of nine new head and neck cancer cell lines. *Acta Otolaryngol* 1997;117(5):775-84.
21. Lee HW, Park SJ, Choi BK, Kim HH, Nam KO, et al: 4-1BB promotes the survival of CD8+ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1. *J Immunol* 2002;1;169(9):4882-8.
22. Timmer-Bosscha H, Mulder NH, de Vries EGL: Modulation of cis-diamminedichloroplatinum(II) resistance: a review. *Br J Cancer* 1992;66(2):227-38. Review.
23. Beg AA, Baltimore D: An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 1996;1;274(5288):782-4.
24. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM: Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science* 1996;1;274(5288):787-9.
25. Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS Jr: TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 1996;1;274(5288):784-7.
26. Bian X, Opipari AW Jr, Ratanaprokksa AB, Boitano AE, Lucas PC, et al: Constitutively active NFkappa B is required for the survival of S-type neuroblastoma. *J Biol Chem* 2002;1;277(44):42144-50. Epub 2002 Aug 26.
27. Panet H, Barzilai A, Daily D, Melamed E, Offen D: Activation of nuclear transcription factor kappa B (NF-kappaB) is essential for dopamine-induced apoptosis in PC12 cells. *J Neurochem* 2001;77(2):391-8.
28. Schneider A, Martin-Villalba A, Weih F, Vogel J, Wirth T, et al: NF-kappaB is activated and promotes cell death in focal cerebral ischemia. *Nat Med* 1999;5(5):554-9.
29. Tietze MK, Wuestefeld T, Paul Y, Zender L, Trautwein C, et al: IkappaBalpha gene therapy in tumor necrosis factor-alpha- and chemotherapy-mediated apoptosis of hepatocellular carcinomas. *Cancer Gene Ther* 2000;7(10):1315-23.
30. Kasibhatla S, Brunner T, Genestier L, Echeverri F, Mahboubi A, et al: DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Mol Cell* 1998;1(4):543-51.
31. Spalding AC, Jotte RM, Scheinman RI, Geraci MW, Clarke P, et al: TRAIL and inhibitors of apoptosis are opposing determinants for NF-kappaB-dependent, genotoxin-induced apoptosis of cancer cells. *Oncogene* 2002;10;21(2):260-71.
32. Baetu TM, Kwon H, Sharma S, Grandvaux N, Hiscott J: Disruption of NF-kappaB signaling reveals a novel role for NF-kappaB in the regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand expression. *J Immunol* 2001;15;167(6):3164-73.
33. Rivera-Walsh I, Waterfield M, Xiao G, Fong A, Sun SC: NF-kappaB signaling pathway governs TRAIL gene expression and human T-cell leukemia virus-I Tax-induced T-cell death. *J Biol Chem* 2001;2;276(44):40385-8. Epub 2001 Sep 11.
34. Nicholson DW, Thornberry NA: Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 1997;22(8):299-306. Review.