

혈관내피세포성장인자 억제제에 의한 구강편평상피세포암종 세포주의 성장 억제 효과

한세진 · 이재훈

단국대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2009;35:66-73)

ANTI-TUMOR EFFECTS OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR INHIBITOR ON ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA CELL LINES

Se-Jin Han, Jae-Hoon Lee

Dept. of OMFS, College of Dentistry, Dankook University

Tumor angiogenesis is a process leading to formation of blood vessels within tumors and is crucial for maintaining a supply of oxygen and nutrients to support tumor growth and metastasis. Vascular endothelial growth factor(VEGF) plays a key role in tumor angiogenesis including induction of endothelial cell proliferation, migration, survival and capillary tube formation.

VEGF binds to two distinct receptors on endothelial cells. VEGFR-2 is considered to be the dominant signaling receptor for endothelial cell permeability, proliferation, and differentiation.

Bevacizumab(Avastin, Genetech, USA) is a monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor. It is used in the treatment of cancer, where it inhibits tumor growth by blocking the formation of new blood vessels.

The goal of this study is to identify the anti-tumor effect of Bevacizumab(Avastin) for oral squamous cell carcinoma cell lines. Human squamous cell carcinoma cell line(HN4) was used in this study. We examined the sensitivity of HN4 cell line to Bevacizumab(Avastin) by using in vitro proliferation assays.

The results were as follows.

1. In the result of MTT assay according to concentration of Bevacizumab(Avastin), antiproliferative effect for oral squamous cell carcinoma cell lines was observed.
2. The growth curve of cell line showed the gradual growth inhibition of oral squamous cell carcinoma cell lines after exposure of Bevacizumab(Avastin).
3. In the apoptotic index, groups inoculated Bevacizumab(Avastin) were higher than control groups.
4. In condition of serum starvation, VEGFR-2 did not show any detectable autophosphorylation, whereas the addition of VEGF activated the receptor. Suppression of phosphorylated VEGFR-2 and phosphorylated MAPK was observed following treatment with Bevacizumab(Avastin) in a dose-dependent manner.
5. In TEM view, dispersed nuclear membrane, scattered many cytoplasmic vacuoles and localized chromosomal margination after Bevacizumab(Avastin) treatment were observed.

These findings suggest that Bevacizumab(Avastin) has the potential to inhibit MAPK pathway in proliferation of oral squamous cell carcinoma cell lines via inhibition of VEGF-dependent tumor growth.

Key Words: Tumor angiogenesis, Vascular endothelial growth factor, Bevacizumab(Avastin)

I. 서 론

혈관형성(angiogenesis)은 혈관내피세포로부터 혈관계가 발달되는 것을 말하며 정상 조직에서 뿐만 아니라 여러 병

적 상태에서도 중요한 역할을 한다. 특히 종양 내 혈관형성은 산소와 영양분을 공급, 유지하여 종양의 성장 또는 전이 과정을 지지해 준다. 새로운 혈관형성이 없이는 종양이 2-3mm 이상의 크기로 성장할 수 없으며 또한 혈관형성은 종양 세포의 순환계로의 침투를 용이하게 하여 원격 전이를 일으키는 통로를 제공 한다¹⁾.

많은 요인들이 혈관형성에 작용하여 그 과정을 촉진하는데 기여한다. 그 중에서도 가장 중요한 영향 인자는 혈관내피세포성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)이다. 혈관내피세포성장인자는 Ferrara와 Henzel에 의해 처

한 세 진

330-714 충남 천안시 안서동29

단국대학교 치과대학 부속병원 구강악안면외과

Se-Jin Han

Dept. of OMFS, College of Dentistry, Dankook University

29 Anseodong, Choenan, Chungnam, 330-714, Korea

Tel: 82-41-550-1991~3 Fax: 82-41-551-8988

E-mail: hanimplant@hanmail.net

음으로 소의 뇌하수체 여포세포의 배양액에서 혈관내피세포에 특이적으로 작용하여 성장을 촉진시키는 인자로 발견되었다²⁾.

혈관내피세포성장인자는 일반적으로 VEGF로 알려진 VEGF-A 외에 태반성장인자(placenta growth factor, PlGF)인 VEGF-B, VEGF-C 및 VEGF-D 등이 현재까지 발견되었다³⁻⁸⁾. 혈관내피세포성장인자는 46kDa의 heparin 결합성 다기능 이합체 단백질(heparin-binding homodimeric glycoprotein)으로 혈관내피세포에 특이적인 유사분열촉진제로 작용하여 새로운 혈관의 성장을 직접적으로 촉진하고 모세혈관의 투과성을 증가시킨다^{9,10)}.

혈관형성에 있어서 혈관내피세포성장인자의 기전은 혈장섬유소원을 혈관외로 유출시켜 섬유소의 침착을 통해 종양의 세포외 기질의 변화를 일으키며, 이러한 기질은 대식세포, 섬유원세포, 내피세포의 종양내로의 성장을 촉진하고 특히, 혈관내피세포의 증식을 촉진하여 종양의 혈관형성에 관여하는 것으로 알려져 있다¹¹⁻¹⁵⁾.

혈관내피세포성장인자는 내피세포 표면에 있는 tyrosine kinase 수용체들과 결합하는데 이들을 혈관내피세포성장인자 수용체(vascular endothelial growth factor receptors, VEGFRs)라고 하며 혈관내피세포성장인자에 의해 인산화를 통해 활성화되어 세포 내 반응을 매개하여 내피세포의 분화 및 증식을 촉진하게 된다. 현재까지 알려진 혈관형성에 관여하는 혈관내피세포성장인자 수용체는 혈관내피세포성장인자 수용체-1 (VEGF-1 or Flt-1)과 혈관내피세포성장인자 수용체-2 (VEGF-2 or KDR/Flk-1)이다. 이 중 혈관내피세포성장인자 수용체-2와 혈관내피세포성장인자의 결합이 모든 혈관내피세포의 이주 및 증식, 분화와 관련되어 있다고 알려져 있으며 혈관내피세포성장인자 수용체-1은 단지 혈관내피세포성장인자 수용체-2의 세포 내 매개 과정의 일부를 조정하는 역할만을 한다¹⁶⁻²³⁾.

혈관내피세포성장인자와 혈관내피세포성장인자 수용체 모두 여러 종양의 성장 기간 동안 그 발현의 증가가 관찰되었으며 이런 관계를 이용하여 혈관내피세포성장인자에 대한 표적 항암제 개발 연구가 시행되었다^{24,25)}.

Bevacizumab(Avastin, Genetech, USA)은 혈관형성 억제제인 anti-VEGF recombinant humanized monoclonal antibody (rhUMAb VEGF)로 인간의 면역글로블린 G1(human immunoglobulin G1) 기본체와 혈관내피세포성장인자 결합 보체부(murin VEGF-binding complementary-determining regions)로 구성되어있다. Bevacizumab(Avastin)은 모든 인간의 혈관내피세포성장인자 또는 그 유사형태(VEGF isoform)와 결합하여 그 활성을 저해하고 혈관내피세포성장인자와 혈관내피세포성장인자 수용체의 결합을 방해하여 결과적으로 종양의 혈관형성을 막는다²⁶⁻²⁸⁾.

Bevacizumab(Avastin)은 2004년 미국 FDA(Food and Drug Administration)의 허가 후, 현재 임상적으로 전이성의 colorectal carcinoma의 항암제로 사용되고 있으며 양호한 치

료 결과를 보여주고 있으며, 유방암 및 non-small cell lung cancer(NSCLC), 전이성 신장암, 전이성 난소암, 전이성 prostatic cancer, 전이성 또는 국소적으로 진행된 췌장암에 대한 임상 전 실험에서도 좋은 결과들을 보여주고 있다²⁹⁻³²⁾.

구강편평상피세포 암종에서 또한 혈관내피세포성장인자와 혈관내피세포성장인자 수용체의 발현 증가를 관찰할 수 있으며 다른 종양에서와 마찬가지로 이는 종양의 성장과 밀접한 관련이 있고 이들에 대한 표적 항암제인 Bevacizumab(Avastin)이 구강편평상피세포 암종의 성장 등에 영향을 미치리라 생각된다^{33,34)}.

이에 본 연구는 구강편평상피세포암종 세포주에 대한 Bevacizumab(Avastin)의 세포 증식 및 성장 억제 능력을 알아보고 그 기전을 확인하기 위해 시행되었다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 연구 재료

1) 구강편평상피세포암종 세포주 배양
HN4(ATCC, USA) 세포주를 사용하였으며, 10% FBS(fetal bovine serum)가 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco, USA) 배양액을 넣고 5% CO₂가 포함된 대기 조건하의 37°C 배양기에서 배양하였다.

2) 약제

한국로슈(Roche, Korea)에서 구입한 혈관내피세포성장인자 억제제인 Avastin을 사용하였다.

2. 연구 방법

1) 구강편평상피세포암종 세포주의 항증식성 검사(MTT assay)

HN4 종양세포를 96-well plate(Falcon, NJ, USA)에 배양액 200 μ l에서 well당 세포수가 2 \times 10⁵개가 되도록 분주하고 24 시간 동안 배양하였다. 그 후 Bevacizumab(Avastin)을 10, 20, 40 μ g/ml 농도로 투여한 배양액을 넣고 37°C에서 48시간 동안 반응시켰다. 약제 처리한 세포를 phosphate-buffered saline(PBS)로 두 번 세척하고 MTT 50 μ g/ml가 포함된 배양액에 추가로 3시간을 배양하였다. 배양액을 버리고 2ml의 DMSO를 넣고 실온에서 5분간 처리한 후 분광 광도계로 550nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) 구강편평상피세포암종 세포주의 성장곡선

HN4 종양세포 2 \times 10⁵개를 100mm 세포배양접시 3개에 분주하고, Bevacizumab(Avastin)을 각각 20, 40 μ g/ml로 투여한 군으로 나누어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7일째 각각 DPBS로 세포를 세척하고 각 well에 Trypsin-EDTA 용액(0.5% Trypsin-0.53mM EDTA 4Na)을 넣고 5분간 기다린 후 세포를 수거

하여 원심분리 하였다. DMEM 배양액 4ml 씩을 원심 분리관에 혼합한 후 90 μ l를 튜브에 옮겨 담고 0.4% Trypsin-blue 용액 10 μ l를 혼합하여 헤모사이토미터로 세포수를 측정하였다. 세포배양접시당 총세포수를 투여한 약제의 농도에 따라 환산하여 성장곡선을 표시하였다.

3) 구강편평상피세포암종 세포주의 세포사멸지수 (Apoptotic Index) 검사

Bevacizumab(Avastin)을 각각 20 μ g/ml, 40 μ g/ml 농도로 종양 세포에 72시간 동안 노출시키고 2×10^5 개의 세포들을 20 μ l/ml의 ethidium bromide(오렌지 빛으로 염색)를 함유하고 있는 50 μ l PBS용액으로 재현탁 후, 세포들을 5분간 실온의 어두운 곳에서 배양하였다. 그 후 슬라이드 고정하였고 형광현미경하에서 관찰하여 전체 세포수에 대한 apoptotic cell의 비율을 계산하여 약제를 처리하지 않은 대조군과 DMSO만을 첨가한 배양액에 있는 세포군과 비교하여 도표로 표시하였다.

4) 구강편평상피세포암종 세포주의 Kinase assay

HN4 종양 세포들을 24시간 동안 serum과 격리 배양 후 50ng/ml VEGF(Sigma, USA)를 투여하고 10분 동안 배양한 후, Bevacizumab(Avastin)을 각각 20 μ g/ml, 40 μ g/ml를 투여한 군으로 나누어 4시간 동안 배양하였다. 그 후 PBS 세척, lysis buffer 용액(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM MgCl₂, 1mM EGTA, 0.5% CHAPS, 10% glycerol, 5mM mercaptoethanol, and 0.1mM phenylmethylsulphonyl fluoride) 처리 후 원심 분리하여 SDS gel 전기영동 시행한 후 phospho-VEGFR-2, phospho-MAPK에 대한 primary antibody(1:1000 dilution, Cell Signaling, USA)로 재반응 시킨 후 ECL detection kit(Amersham Biosciences, USA)으로 필름에 노출, 현상하였다.

5) 투과전자현미경 관찰

70-80% 정도의 증만전(preconfluency) 상태에서 배양된 HN4 세포주에 Bevacizumab(Avastin) 20 μ g/ml를 투여한 후 0.1M cacodylate buffer(pH 7.4)하의 2.0% glutaraldehyde에 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 고정 후, 0.1M cacodylate buffer(pH 7.4)하의 1.0% osmium tetroxide에 4 $^{\circ}$ C에서 후 고정하였다. Graded ethanol에서 탈수 후 Epon812(TAAB Lab., Berk)에 포매한 후 LKB microtome에서 diamond knife를 이용하여 초박절편을 제작하였다. Uranyl acetate lead citrate로 염색 후 투과전자현미경(H-800 TEM, Hitachi, Tokyo, Japan)에서 관찰하였다.

III. 연구 결과

1. 구강편평상피세포암종 세포주에 대한 Bevacizumab (Avastin)의 항증식성 효과

DMSO만을 첨가한 배양액에 있는 세포와 비교했을 때, Bevacizumab (Avastin) 투여군의 세포 증식 억제 능력을 관찰할 수 있었으며, 이런 세포 증식 억제력은 약제의 농도 증가와 비례하였다. 세포의 증식률이 50% 감소되는 농도인 IC50(50% inhibition of cell proliferation)은 20 μ g/ml 이었다(Fig. 1).

2. Avastin이 구강편평상피세포암종 세포주의 성장에 미치는 영향

약제를 투여한 기간에 따른 세포의 성장곡선을 관찰한 결과 약제를 처리하지 않은 대조군에서는 기하급수적인 세포성장이 나타나는 데 비해, Bevacizumab (Avastin)을 투여한 실험군에서는 1일 이후부터 7일 까지 완만한 세포의 성장 억제를 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

3. 세포사멸지수(Apoptotic Index)

약제를 처리하지 않은 대조군과 DMSO만을 첨가한 배양액에 있는 세포군에서는 5%미만의 미약한 세포사멸만을 보였으나 Bevacizumab(Avastin) 20 μ g/ml를 투여한 군에서는 12%의 세포사멸을 보였으며, Bevacizumab(Avastin) 40 μ g/ml를 투여한 군에서는 15%에 가까운 세포사멸을 보였다(Fig. 3).

4. Avastin이 구강편평상피세포암종 세포주의 세포내 신호전달체계에 미치는 영향

종양 세포들을 혈장 격리 배양(serum starvation) 시행한 결과, 혈장 격리 배양 상태의 대조군에서는 혈관내피세포 성장인자 수용체와 세포내 신호전달체계인 MAPK(mitogen-activated protein kinase)의 활성화(autophosphorylation)를 관찰할 수 없었으나 혈관내피세포성장인자를 추가한 경우, VEGF에 의한 VEGFR-2와 MAPK의 인산화를 관찰할 수 있었다.

혈관내피성장인자가 추가된 종양 세포군에 Bevacizumab (Avastin)을 투여한 경우, 인산화된 VEGFR-2와 MAPK 발현 감소가 관찰되었으며 이는 약제의 농도와 반비례하였다(Fig. 4).

5. 투과전자현미경 소견

약제를 투여하지 않은 대조군에서는 세포골격(cytoskeleton)

이 고르게 분포되어 있는 세포질과 비교적 큰 핵, 그리고 핵인이 두드러져 보이는 소견으로 보아 단백질 합성이 활발하게 진행되고 있는 상태임을 알 수 있었다(Fig. 5).

반면, Bevacizumab(Avastin)을 투여한 종양세포에서는 뚜렷한 염색체의 변연이동과 많은 세포질 내 공포 및 미토콘드리아 파괴를 관찰할 수 있었으며 이는 세포사멸의 특징적인 소견과 동일하였다(Fig. 6).

IV. 총괄 및 고찰

종양의 성장, 침윤, 전이에 있어서 혈관형성(angiogenesis)은 필수요건이다. 이러한 혈관형성에 관여하는 인자(angiogenic factor)로는 형질전환성장인자- α (transforming growth factor- α , TGF- α), 형질전환성장인자- β (transforming growth factor- β , TGF- β), 염기성 섬유아세포성장인자(basic fibroblast growth factor, b-FGF), 산성 섬유아세포성장인자(acidic fibroblast growth factor, a-FGF), 혈관내피세포성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF), 혈소판유래 내피세포성장인자(platelet derived endothelial cell growth factor, PD-ECGF), 종양괴사인자- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 및 angiogenin 등이 있다³⁵⁻⁴⁵.

혈관내피세포성장인자는 혈관형성에 작용하는 여러 인자 중 가장 그 역할이 중요하다고 보고되어 왔으며 종양세포를 포함한 다양한 세포에서 분비되며 혈관내피세포에 특이성이 있어 혈관내피세포의 세포핵 분열을 촉진하고 세포 외 기질의 용해와 내피세포의 이동을 통해 혈관형성에 기여한다고 알려져 있다⁹⁻¹⁵.

인간의 혈관내피세포성장인자의 유전자는 7개의 intron으로 분리된 8개의 exon으로 구성되며 염색체 6p21.3에 위치하고 있다. 다양한 exon의 분리로 4개의 다른 isoform이 존재하며 VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆이 있으며 이중 VEGF₁₆₅가 기능상 가장 중요한 형태의 isoform으로 보고되고 있다^{46,47}. Ferrara 등²⁵은 혈관내피세포성장인자 유전자의 발현을 조절하는 인자로는 조직내 산소 분압도(oxygen tension), 성장인자들, 호르몬 그리고 종양유발유전자(oncogene) 등이 있으며 조직 내 pO₂가 낮고 TGF- α , TGF- β , FGF 같은 성장조절인자들 또는 부신피질 호르몬 등의 영향으로 그리고 종양 세포에서처럼 어떤 변이에 의해 그 발현이 증가한다고 하였다.

한편, 혈관내피세포성장인자는 혈관내피세포와 특이성을 갖고 있는데 이러한 역할을 하는 것이 혈관내피세포성장인자 수용체로 혈관내피세포성장인자 수용체-1 (VEGF-1)과 혈관내피세포성장인자 수용체-2 (VEGF-2) 등이 알려져 있다. 이들은 내피세포의 세포막에 위치하여 세포의 기질에 존재하는 혈관내피세포성장인자와 결합 후 활성화된다. 아직 명확히 밝혀지지 않았지만 혈관내피세포성장인자 수용체-1은 세포내 신호전달 매개체로 직접 작용하지는 않고 다만, 유인 수용체(decoy effect receptor)로 혈관내피세포성

장인자에 의한 세포의 분열 및 증식 조절에 관여한다고 알려져 있다. 그에 반해 혈관내피세포성장인자 수용체-2는 혈관내피세포성장인자와의 결합 후 인산화(phosphorylation)되어 세포내의 신호전달체계로 신호를 전달, 세포의 분화 및 증식을 촉진하게 된다¹⁶⁻²³.

이런 과정에서 세포내 신호전달 체계는 주로 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 인산화 효소 신호전달 체계가 관여한다고 알려져 있으며 이들은 세포가 외부의 환경변화에 따른 자극들을 인지하여 그 정보를 세포 내부로 전달하는 역할을 담당하는 대표적인 신호전달체계의 하나로서 세포의 성장, 발생, 분화, 사멸 등의 조절기전에 관여한다. 인산화 효소 신호전달계의 기전은 하등생물인 효모에서 척추 동물에 이르기까지 비슷한 양상으로 이루어진다. 즉 MAPKKK가 MAPKK를 인산화시켜 활성화하고, MAPKK는 MAPK를 활성화시키며, 활성화된 MAPK는 기질들을 인산화 및 활성화 시켜 각각의 기능을 발휘토록 한다. 척추동물 세포에 존재하는 MAPK에는 extracellular signal-regulated kinase(ERK), c-Jun N-terminal kinase/ stress-activated protein kinase(JNK/SAPK), p38 MAPK 등이 있다⁴⁸.

여러 연구들에서 혈관내피세포성장인자는 결장암, 난소암, 간세포암, 위장관암, 신장암, 유방암, 두경부암 등 다양한 종양에서 미세혈관 밀도와 함께 그 발현이 증가한다고 하였으며 많은 종양 세포가 혈관 내피 성장인자 mRNA를 발현하고 혈관내피세포성장인자양 단백을 분비한다고 하였다. 또한 수술 후 추적 관찰하여 혈관내피세포성장인자가 풍부한 종양이 혈관내피세포성장인자가 적은 종양보다 수술 후 재발이 되기까지의 기간이 훨씬 짧다는 연구 결과는 혈관내피세포성장인자가 종양 발생과 혈관형성에 중요한 기여를 하며 예후에도 영향을 미친다는 사실을 뒷받침해준다. 같은 이유로 많은 종양에서 혈관내피세포성장인자의 발현 증가와 비례하여 혈관내피세포성장인자 수용체의 발현 증가가 나타난다고 하였다⁴⁹⁻⁵⁷.

몇몇의 연구자들은 앞에서 기술한 종양의 성장과 혈관내피세포성장인자의 발현 증가와의 관계에 착안하여 크게 3가지 기전의 표적 항암제에 대한 연구를 시행하였다. 첫 번째는 항 혈관내피세포성장인자 monoclonal antibody에 의해 혈관내피세포성장인자를 비활성화시키는 것이며 두 번째는 혈관내피세포성장인자 수용체에 대한 monoclonal antibody를 이용한 비활성화이고 마지막으로 혈관내피세포성장인자 수용체-2 tyrosine kinase를 선택적으로 억제하는 기전이다⁵⁸⁻⁶¹.

Kim 등⁵⁸은 처음으로 혈관내피세포성장인자에 대한 murine monoclonal antibody를 합성하는데 성공하였으며, Presta 등⁵⁹은 이를 인간에게 치료제로 사용할 수 있게 면역 반응을 제거한 humanized murine monoclonal antibody를 만들었고 동물, 임상 실험을 통해 혈관내피세포성장인자 억제제인, Bevacizumab (Avastin, Genetech, USA)이 생산되게 되었다. Bevacizumab (Avastin)은 모든 인간의 혈관내피세

포성장인자와 결합하여 그 활성을 저해하고 혈관내피세포 성장인자와 혈관내피세포성장인자 수용체의 결합을 방해하여 결과적으로 종양의 혈관형성을 저지하고 종양세포의 분화 및 증식을 억제한다²⁶⁻²⁸⁾.

2004년 미국 식약청(FDA) 허가 후, 현재 Bevacizumab (Avastin)의 임상적 사용은 전이성 colorectal cancer에만 국한되어 있으며 이는 고혈압, 출혈성향의 증가, 신장의 혈전성 미세혈관병변 같은 부작용에 따른 약물의 안전성 문제 때문이다. 두경부 암종에 대한 Bevacizumab(Avastin)의 영향에 대한 연구는 거의 보고된 바가 없으며 따라서 임상적 사용은 아직 허용되지 않았다²⁹⁻³²⁾.

본 연구에서 Bevacizumab(Avastin) 투여 후 구강편평상피 세포암종 세포주의 증식억제능력을 관찰할 수 있었고 종양세포의 성장곡선과 세포 사멸지수에서 다시 확인할 수 있었다. 또한 이런 종양세포의 증식 및 성장 억제 능력은 약제의 농도와 시간에 비례한다는 것을 알 수 있었다. 하지만, 그 억제력이 현재 임상적으로 사용되고 있는 다른 항암제에 비해 떨어지는데 이는 Bevacizumab (Avastin)이 종양세포에 직접 작용하는 기전 보다는 혈관내피세포의 억제를 통한 혈관형성 방해를 주된 작용 기전으로 하기 때문인 것으로 사료되었다.

Rajesh 등⁴⁹⁾은 혈관내피세포성장인자 수용체는 혈관내피세포에 주로 존재하지만 종양세포에서도 그 발현을 관찰할 수 있는데 이는 혈관내피세포의 분화, 증식에 따른 혈관형성에 맞추어 종양세포의 분화 및 증식을 촉진하기 위한 자가 분비 조절 시스템(autocrine system)으로 이해될 수 있다고 하였다. 이러한 사실은 혈관내피세포성장인자에 의한 종양세포의 분화 및 증식 조절이 가능하며 또한 혈관내피세포에서의 경우와 마찬가지로 종양세포막에 위치한 혈관내피세포성장인자 수용체의 활성화 후 종양세포내 MAPK 인산화 효소 신호 전달체계가 활성화 되어 종양세포의 분화 및 증식을 촉진하리라고 추론하게 되었다^{49,62)}.

이에 대한 Bevacizumab(Avastin)의 영향을 확인하기 위해 본 실험에서는 종양세포를 혈장이 없는 배양액에 배양하는 실험 모델을 사용하여 혈관내피세포성장인자와 혈관내피세포성장인자 수용체 및 MAPK 인산화 효소의 상관관계를 알아보고자 하였다. 혈장이 없는 배양액에서 배양한 대조 종양세포군에서 혈관내피세포성장인자 수용체-2의 인산화와 MAPK 인산화 효소의 활성화가 관찰되지 않았는데 이는 세포의 기질에서 혈관내피세포성장인자가 공급되지 않았기 때문이다. 반면, 혈관내피세포성장인자를 공급 시키면 혈관내피세포성장인자 수용체-2의 인산화와 MAPK 인산화 발현이 관찰 되었는데 이는 혈관내피세포 성장인자가 수용체와 결합하여 활성화 시키고 연쇄작용으로 세포내 MAPK 인산화 효소 신호전달체계를 활성화 시켰기 때문이다. Bevacizumab (Avastin)이 투여된 종양세포에서는 인산화된 혈관내피세포성장인자 수용체-2의 발현 감소와 동시에 인산화 MAPK의 발현도 감소하였는데 이

는 약제가 혈관내피세포성장인자와 수용체와의 결합을 방해하여 혈관내피세포성장인자 수용체-2를 비활성화 시킨 결과로 해석되었다.

결론적으로 Bevacizumab(Avastin)에 의한 구강편평상피 세포암종 세포주의 증식 억제 및 성장제한은 혈관내피세포 성장인자와 혈관내피세포 수용체-2와의 결합을 방해함으로써 종양세포내 신호전달체계인 MAPK signaling pathway를 방해하였기 때문인 것으로 추측해볼 수 있었다.

차후에는 Bevacizumab(Avastin)의 생체 내 구강편평상피 세포암종에 대한 증식 억제 및 다른 항암제와의 병용 시 종양세포의 성장에 미치는 효과 등과 같은 추가적인 실험이 필요하다고 생각되며 이와 같은 실험적 데이터의 축적과 적정 투여 용량 및 약물의 부작용에 대한 평가 등 임상 실험이 시행된다면 앞으로 Bevacizumab (Avastin)이 구강편평상피암종의 항암 치료제로도 사용이 가능하리라 사료된다.

V. 결 론

종양 내 신생혈관형성(angiogenesis)은 종양의 성장뿐만 아니라 침윤, 원격전이에 있어서 필수 요건이다. 정상 또는 병적 상태 모두에서 혈관형성을 직접적으로 촉진하는 가장 강력한 인자는 혈관내피세포성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)이다.

Bevacizumab(Avastin, Genetech, USA)은 모든 인간의 혈관내피세포성장인자(VEGF)와 결합하여 그 biologic activity를 저해하고 혈관내피세포성장인자와 혈관내피세포성장인자 수용체(VEGF receptor)의 결합을 방해하여 결과적으로 종양의 혈관형성을 막는다. 본 연구는 구강편평상피세포암종 세포주에 대한 Bevacizumab(Avastin)의 세포 증식 및 성장 억제 능력을 알아보고 그 기전을 확인하기 위해 시행되었으며 본 연구의 결과들을 종합해 보았을 때, 구강편평상피세포암종 세포주에 Avastin 투여 시, 세포증식억제 및 세포성장억제 효과가 있음을 확인할 수 있었으며 이는 혈관내피세포성장인자를 비활성화 시킴으로써 혈관내피세포성장인자 수용체-2와 MAPK의 signaling pathway를 방해하였기 때문인 것으로 추정할 수 있었다. 하지만, 이번 실험은 단 1종류의 구강암 세포주만을 대상으로 하였다는 한계가 있고 따라서 생체 내 실험과 더불어 더 많은 임상연구가 필요하리라 사료된다.

참고문헌

1. Kerbel RS : Tumor angiogenesis: past, present and the near-future. *Carcinogenesis* 21: 505-515, 2000
2. Ferrara N, Henzel WJ : Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161:851-858, 1989
3. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G : Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular perme-

- ability factor. Proc Natl Acad Sci USA 88:9267-9271, 1991
4. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G : Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14. *Oncogene* 8:925-931, 1993
 5. Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A : Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:2576-2581, 1996
 6. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A : A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4(VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 15:1751-1758, 1996
 7. Lee J, Gray A, Yuan J, Luoh SM : Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt4. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:1988-1992, 1996
 8. Orlandini M, Marconcini L, Ferruzzi R : Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:11675-11680, 1996
 9. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM : Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219:983-985, 1983
 10. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M : Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 146:1029-1039, 1995
 11. Benjamin LE, Golijanin D, Itin A : Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 103: 159-165, 1999
 12. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW : Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407: 242-248, 2000
 13. Jain RK : Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9: 685-693, 2003
 14. Ferrara N : Vascular endothelial growth factor as a target for anti-cancer therapy. *Oncologist* 9 (Suppl 1): 2-10, 2004
 15. Fontanini G, Vignati S, Boldrini L : Vascular endothelial growth factor is associated with neovascularization and influences progression of non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 3: 861-865, 1997
 16. Plouet J, Moukadir HJ : Characterization of the receptors for vasculotropin on bovine adrenal cortex-derived capillary endothelial cells. *J Biol Chem* 265:22071-22075, 1990
 17. Vaisman N, Gospodarowicz D, Neufeld G : Characterization of the receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 265:19461-19466, 1990
 18. Jakeman LB, Winer J, Bennett GL, Altar CA : Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J Clin Invest* 89:244-253, 1992
 19. Jakeman LB, Armanini M, Philips HS : Developmental expression of binding sites and mRNA for vascular endothelial growth factor suggests a role for this protein in vasculogenesis and angiogenesis. *Endocrinology* 133:848-859, 1993
 20. Shen H, Clauss M, Ryan J : Characterization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor receptors on mononuclear phagocytes. *Blood* 81:2767-2773, 1993
 21. Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A : Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* 8:519-527, 1990
 22. Matthews W, Jordan CT, Gavin M : A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9026-9030, 1991
 23. Terman BI, Carrion ME, Kovacs E : Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 6:1677-1683, 1991
 24. Ruzinova MB, Schoer RA, Gerald W : Effect of angiogenesis inhibition by Id loss and the contribution of bone-marrow-derived endothelial cells in spontaneous murine tumors. *Cancer Cell* 4:277-289, 2003
 25. Ferrara N and Davis-Smyth T : The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18: 4-25, 1997
 26. Presta LG, Chen H, O' Connor S1 : Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 57: 4593-4599, 1997
 27. Kim KJ, Li B, Houck K, Winer J : The vascular endothelial growth factor proteins: identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies. *Growth Factors* 7: 53-64, 1992
 28. Gridelli C, Rossi A and Maione P : New antiangiogenic agents and non-small cell lung cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 60: 76-86, 2006
 29. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W : Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350: 2335-2342, 2004
 30. Kabbinavar F, Hambleton I, Mass RD : Combined analysis of efficacy; the addition of bevacizumab to fluorouracil/leucovorin improves survival for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 23: 3706-3712, 2005
 31. Johnson DH, Fehrenbacher L, Novotny WF : Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 22: 2184-2191, 2004
 32. Cobleigh MA, Langmuir VK, Sledge GW : A phase I/II dose-escalation trial of bevacizumab in previously treated metastatic breast cancer. *Semin Oncol* 30: 117-124, 2003
 33. Borgstrom P, Bourdon MA and Ferrara N : Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor, antibody completely inhibits angiogenesis and growth of human prostate carcinoma micro tumors in vivo. *Prostate* 35: 1-10 1998.
 34. Berse B, Brown LF, and Senger DR : Vascular permeability factor(vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell* 3: 211-220, 1992
 35. Folkman J, Merler E, Abernathy C : Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 133:275-288, 1971
 36. Folkman J and Klagsbrun M : Angiogenic factors. *Science* 235:442-447, 1987
 37. Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L : Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr Rev* 8:95-114, 1987
 38. Thomas KA, Rios-Candelore M, Gimenez-Gallego G : Pure brain-derived acidic fibroblast growth factor is a potent angiogenic vascular endothelial cell mitogen with sequence homology to interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:6409-6413, 1985
 39. Esch F, Baird A, Ling N : Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:6507-6511, 1985
 40. Jaye M, Howk R, Burgess W : Human endothelial cell growth factor: cloning, nucleotide sequence, and chromosome localization. *Science* 233:541-545, 1986
 41. Abraham JA, Mergia A, Whang JL : Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. *Science* 233:545-548, 1986
 42. Gospodarowicz D and Thakral KK : Production of a corpus luteum angiogenic factor responsible for proliferation of capillaries and neovascularization of the corpus luteum. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:847-851, 1978
 43. Vlodavsky I, Folkman J, Sullivan R : Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor: synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:2292-2296, 1987
 44. Matsuzaki K, Yoshitake Y, Matuo Y : Monoclonal antibodies

- against heparin-binding growth factor II/basic fibroblast growth factor that block its biological activity: invalidity of the antibodies for tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9911-9915, 1989
45. Dennis PA and Rifkin DB : Studies on the role of basic fibroblast growth factor in vivo: inability of neutralizing antibodies to block tumor growth. *J Cell Physiol* 144:84-98, 1990
 46. Houck KA, Ferrara N, Winer J : The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 5:1806-1814, 1991
 47. Tischer E, Mitchell R, Hartman T : The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 266:11947-11954, 1991
 48. Tournier C, Hess P, Yang DD : Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science*. 288: 870-874, 2000
 49. Rajesh V, David S, Jeffery D : Expression of vascular endothelial growth factor receptors on tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma *Arch Otolaryn Head Neck Surg* 129; 882-888, 2003
 50. Volm M, Koomagi R, Mattern J : Angiogenic growth factors and their receptors in non-small cell lung carcinomas and their relationships to drug response in vitro. *Anticancer Res* 17:99-103, 1997
 51. Volm M, Koomagi R and Mattern J : Prognostic value of vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in squamous cell lung cancer. *Int J Cancer* 74:64-68, 1997
 52. Brown LF, Berse B, Jackman RW : Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum Pathol* 26:86-91, 1995
 53. Brown LF, Berse B, Jackman RW : Expression of vascular permeability factor(vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res* 53:4727-4735, 1993
 54. Suzuki K, Hayashi N, Miyamoto Y : Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 56:3004-3009, 1996
 55. Uchida S, Shimada Y, Watanabe G : In oesophageal squamous cell carcinoma vascular endothelial growth factor is associated with p53 mutation, advanced stage and poor prognosis. *Br J Cancer* 77:1704-1709, 1998
 56. Brown LF, Berse B, Jackman RW : Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J Pathol* 143:1255-1262, 1993
 57. Sowter HM, Corps AN, Evans AL : Expression and localization of the vascular endothelial growth factor family in ovarian epithelial tumors. *Lab Invest* 77:607-614, 1997
 58. Kim KJ, Li B, Winer J : Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 362: 841-844, 1993.
 59. Presta LG, Chen H, O' Connor SJ : Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 57:4593-4599, 1997
 60. Fong TA, Shawver LK, Sun L : SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res* 59: 99-106, 1999
 61. Wedge SR, Ogilvie DJ, Dukes M : ZD4190: an orally active inhibitor of vascular endothelial growth factor signaling with broad-spectrum antitumor efficacy. *Cancer Res* 60: 970-975, 2000
 62. D. Sano, M Kawakami, K Fujita : Antitumor effect of ZD6474 on head and neck squamous cell carcinoma. *Oncology Reports* 17; 289-295, 2007

사진부도 설명

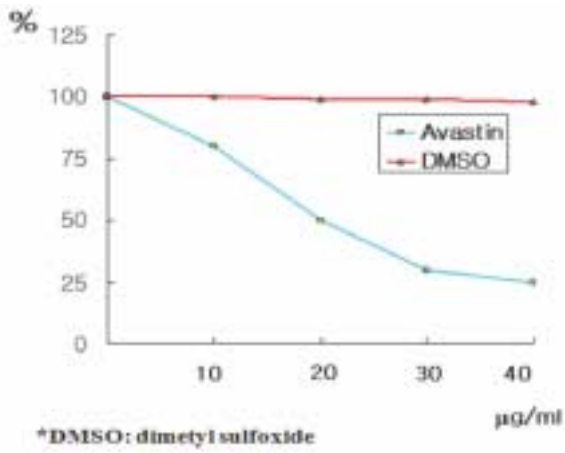


Fig. 1. MTT assay of HN4 cell lines according to concentration of Avastin

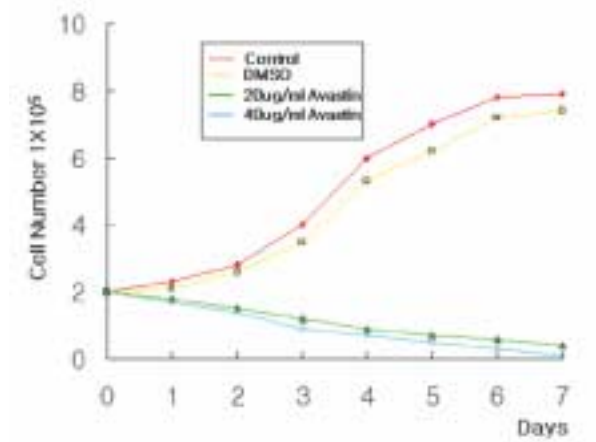


Fig. 2. Growth curve of HN4 cell lines according to Avastin 20µg/ml and 40µg/ml

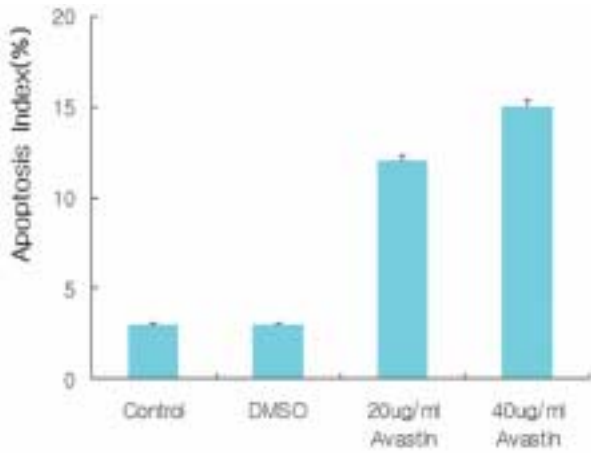


Fig. 3. Apoptosis index of HN4 cell lines according to Avastin 20µg/ml and 40µg/ml

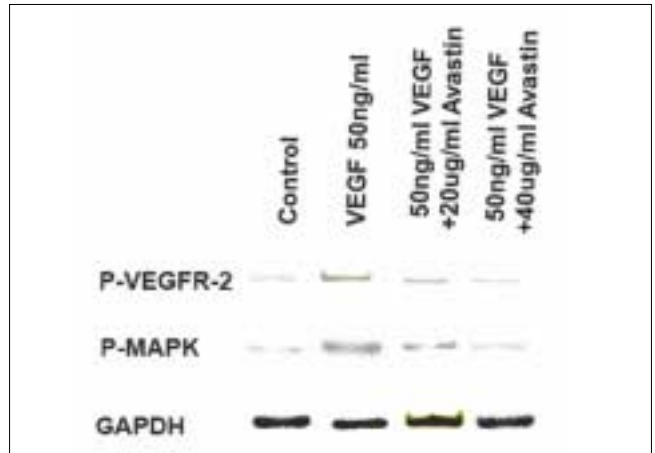


Fig. 4. Phosphorylated VEGFR-2 and Phosphorylated MAPK expression in HN4 cell line by immunoblotting after exposure of Avastin

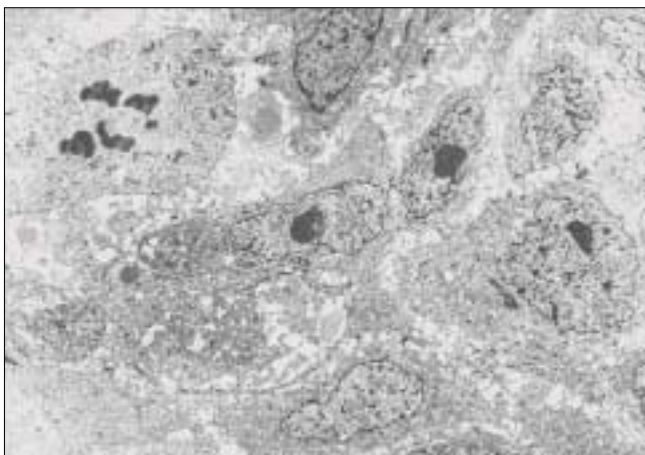


Fig. 5. TEM view of control HN4 cell

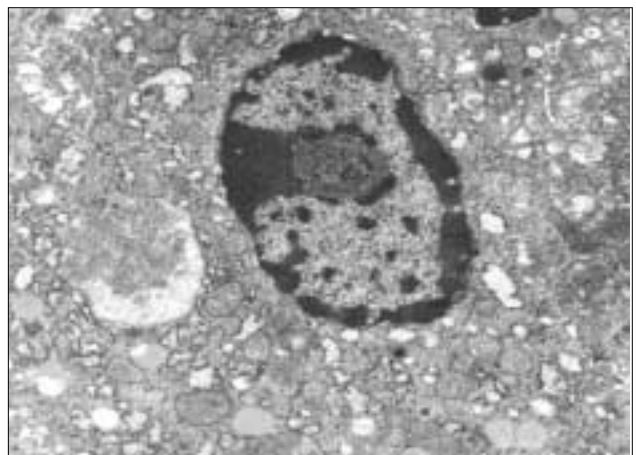


Fig. 6. TEM view of HN4 cell after exposure of Avastin