사람 구강암종 세포주에서 Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug-Activated Gene(NAG-1)의 유도 및 세포고사 작용

연세대학교 의과대학 영동세브란스병원 이비인후과학교실,[1] 두뇌한국 21 의과학사업단[2]
이주환[1] · 윤주헌[1,2] · 이정권[1] · 장정현[1] · 이윤재[1] · 김경수[1,2]

Induction of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug-Activated Gene(NAG-1) in Human Oral Cavity Cancer Cells and its Effect on Apoptosis

Joo-Hwan Lee, MD[1], Joo-Heon Yoon, MD[1,2], Jeung Gweon Lee, MD[1], Jung Hyun Chang, MD[1], Yoon Jae Lee, MD[1] and Kyung-Su Kim, MD[1,2]
[1]Department of Otorhinolaryngology, Yong Dong Severance Hospital, Yonsei University College of Medicine, Seoul; and [2]Brain Korea 21 Project for Medical Science, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : Nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-activated gene (NAG-1), which is induced by NSAIDs, has proapoptotic and antitumorigenic effects in colorectal cancer cells. However, NAG-1 induction and its effect on the apoptosis in human oral cavity cancer cells (SCC 1483) have not been determined. **Materials and Method** : NAG-1 expression by various NSAIDs in SCC 1483 cells was investigated by Western blot analysis. The induction of apoptosis by NSAID and the relationship between NAG-1 expression and apoptosis were determined by Western blot assay and flow cytometry. Drosophila cells stably expressing NAG-1 were constructed and NAG-1 conditioned medium (NCM) were made. Apoptosis was examined with flow cytometry on SCC 1483 cells treated with NCM. **Results** : Diclofenac was the most potent inducer of NAG-1. Diclofenac inhibited the proliferation of SCC 1483 cells and this inhibition was proved as apoptosis. Diclofenac induced the expression of NAG-1 and also induced apoptosis in time and dose dependent manner. In the concentrated NCM, the expression of NAG-1 was intense and apoptosis was induced by addition of 5 μl of NCM. **Conclusion** : Based on these data, we could assure that NSAIDs induced NAG-1 in oral cavity cancer cells and NAG-1 induced apoptosis. Therefore, we suggest that it is possible to use NSAIDs as a chemopreventive agent in oral cavity cancer. Further studies on the mechanism of NAG-1 and clinical use will be needed. **(Korean J Otolaryngol 2004;47:1030-7)**

KEY WORDS : Non-steroidal anti-inflammatory agents · Oral cancers · Apoptosis.

서 론

구강암 및 인두암은 전체 악성종양의 약 3%를 차지하며, 대부분은 편평세포암으로 이 중 67%는 구강에서 발생하는 편평세포암이다.[1)] 구강암은 수술요법, 방사선 치료 및 항암요법의 발전에도 불구하고 50% 이하의 장기 생존율과 높은 사망률을 보여 예후가 불량하다.[2)]

두경부암에 대한 성공적 치료 이후 직면하게 되는 어려운 문제가 약 10~40%에서 발생하는 이차 원발암이다. 이러한 이차 원발암이 특히 구강암의 치료와 예후에 중요한 역할을 하며, 성공적으로 구강암을 치료한 이후 사망을 야기하는 원인의 하나이다. 이러한 이차 원발암의 예방에 암예방제(chemopreventive agents)의 투여가 효과가 있는 것으로 밝혀지고 있다.[3)] 현재까지 암예방제로 가능성이 있는 것으로 알려진 것에는 13-cis-retinoic acid,[3)] curcumin[4)] 및 비스테로이드성 소염제(nonsteroidal anti-inflammatory drugs ; NSAIDs) 등[5)]이 있다.

암예방제 중 비스테로이드성 소염제의 항암작용은 주로 cyclooxygenase-2(COX-2)를 억제하여 일어나는 것으로 알려져 있다.[5)] 그러나 최근 연구들에 의하면 COX-2가 없는 세포에서도 비스테로이드성 소염제에 의해 항암작용

논문접수일 : 2004년 5월 6일 / 심사완료일 : 2004년 8월 5일
교신저자 : 김경수, 135-720 서울 강남구 도곡동 146-92
연세대학교 의과대학 영동세브란스병원 이비인후과학교실
전화 : (02) 3497-3463 · 전송 : (02) 3463-4750
E-mail : ydrhinol@yumc.yonsei.ac.kr

이 발생하여 COX-2와 무관한 다른 기전에 의해서 항암작용이 가능하다고 한다.[6)7)]

COX-2 억제와 무관한 항암기전 중 하나가 비스테로이드성 소염제에 의해 유도되는 NSAID-activated gene(NAG-1)에 의한 항암작용이다. NAG-1은 염기서열 분석상 TGF-β superfamily 사이토카인을 특징짓는 seven-cystein domain과 15~29%의 동일성을 보여 TGF-β superfamily에 속하는 사이토카인이다. NAG-1은 기존에 알려진 placenta bone morphogenic protein, placenta TGF-β, prostate derived factor, macrophage inhibitory cytokine-1 또는 novel TGF-β superfamily HP00269 등의 유전자와 염기서열 분석상 동일한 유전자이다.[8)]

NAG-1의 기능은 아직 완전히 밝혀지지 않은 상태로 지금까지 알려진 작용으로 뼈의 형성과 대식세포의 비활성화 등에 관여하는 것으로 알려졌으며,[9)10)] 암의 경우 대장암 세포에 대해 세포고사 및 항암작용을 하는데,[8)11)] 이런 작용은 cyclooxygenase-2와 무관하게 독립적으로 유도되며 비스테로이드성 소염제 외에 p53, genistein, dially disulfide 등에 의해서도 유도된다.[12-15)] 백서에게 구강으로 스테로이드성 소염제를 투여하여 NAG-1이 유도되는 가를 연구한 결과에 의하면 NAG-1은 sulindac을 섭취한 백서의 간과 소장에서 발현이 증가하여 비스테로이드성 소염제에 의해 생체내 유도가 가능한 유전자이다.[11)]

NAG-1은 대장-직장암, 전립선암, 유방암, 폐암 및 백혈병 등에서 활발히 연구되고 있으나,[12)] 구강암에 대해서는 아직 구강암과 NAG-1의 관계에 대해 알려진 바가 없는 실정이다. 이에 저자들은 본 연구를 통해 첫째, NAG-1이 비스테로이드성 소염제에 의해 구강암종 세포주에서 유도가 되는 가를 알고자 하며 둘째, 만약 NAG-1이 유도 된다면, 비스테로이드성 소염제에 의해 세포의 증식이 억제되는 가를 보고 이러한 세포증식 억제가 세포고사에 의한 것인 지를 알고자 하였다. 셋째, 비스테로이드성 소염제에 의한 NAG-1 유도와 구강암종 세포주의 세포고사가 연관이 되는 가를 보고자 하였다. 넷째, NAG-1 유도와 세포고사가 연관이 된다면 NAG-1 단백에 의해 직접적으로 세포고사가 발생하는 지를 알고자 하였다.

재료 및 방법

연구재료

사람 구강암 세포로서 후구삼각에서 기원한 SCC 1483 편평세포암 세포주(Generous gift from Dr. Shah J, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY, USA)를 사용하였다. 세포배양은 37℃, 5% CO_2의 환경에서, 배양액은 10% fetal calf serum이 포함된 minimal essential medium을 이용하였다.

본 연구에서 비스테로이드성 소염제로 indomethacin, acetaminophen, piroxicam, diclofenac, ibuprofen(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)과 sulidac sulfide, NS-398(Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA) 및 aceclofenac(대웅제약, 서울) 등을 사용하였다.

다클론성 항NAG-1 항체는 Dr. Eling T(NIEHS, RTP, USA)에게서 얻었으며, 항actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc.(Santa Cruz, CA)에서 구입하였다.

Western blot 분석

10 cm plate에 SCC 1483 세포가 50~60% 정도 합류를 이루었을 때 무혈장 상태에서 비스테로이드성 소염제를 첨가하여 배양하였다. 대조군으로 비스테로이드성 소염제 대신 0.2% DMSO를 사용하였다. 배양된 세포를 각각 radioimmunoprecipitation assay buffer(1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS)를 이용하여 세포 용해액을 얻었다. 이 세포 용해액을 4℃에서 20분간 10,000×g로 원심분리하여, 침전된 총단백으로 Western blot 분석을 시행하였다. 단백농도는 소혈청 알부민을 이용하는 BCA protein assay로 농도를 결정하였다.

단백(30 μg)을 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)로 분리한 후 니트로셀룰로즈막(Amersham Pharmacia Biotech : Piscataway, NJ, USA)에 전이하였다. 막을 10% 탈지분유가 함유된 TBST(Tris-buffered saline/0.05% Tween-20) 용액에서 4℃로 하룻밤 동안 담가두어 비특이 반응을 억제하였고, 2% 탈지분유가 포함된 TBST를 이용하여 1 : 5000의 농도로 항NAG-1 항체를 사용하여 실온에서 4시간 동안 반응시켰다. 세척을 시행한 후 막은 TBST에 1 : 5000으로 희석한 horse reddish peroxidase 항체(Amersham Pharmacia Biotech)로 한 시간 동안 처리하고 수 차례의 세척 후 enhanced chemiluminescence(Amersham Pharmacia Biotech)와 autoradiography를 이용하여 밴드를 확인하였다. 한편 니트로셀룰로즈막을 deprobing한 다음 같은 방법을 이용하여 1 : 500의 농도로 항actin 항체와 반응시켰다. NAG-1의 유도 정도는 autoradiography에서 얻어진 밴드의 세기를 Scion Image(Scion Co., Frederick, MD, USA)를 이용하여 수치화하였다. 이후 각 비스테로이드성 소염제 밴드의 세기를 actin 밴드의 세기로 나눈 다음, 이 수치중 대조군의 수치를 1로 하여 각 비스테로이드 소염제에 의한 NAG-1 유

도 정도의 상대적 비율을 구하였다. 결과 판정에서 이 수치가 2이상 증가하는 것을 의미있는 것으로 하였다.

세포증식 분석

SCC 1483 세포를 96 - well plate에 well당 2000 세포씩 분주하고 16시간 동안 세포를 배양하였다. 이후 인산완충 생리식염수로 세척한 다음 무혈장 상태에서 비스테로이드성 소염제를 첨가하여 48시간 동안 배양하였다. 세포증식 여부는 Cell Titer 96 AQ_{ueous} One Solution Proliferation Assay kit(Promega Co., Madison, WI, USA)를 사용하여 측정하였는데 방법으로 20 μl의 시약을 각 well에 넣고 37℃에서 1시간 동안 배양한 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

FACS 분석을 이용한 DNA 성분 및 세포고사의 측정

6 - well plate에 SCC 1483 세포를 well당 4×10^5 세포로 분주하여 16시간 동안 배양한 다음 무혈장 상태에서 비스테로이드성 소염제를 첨가하고 각 실험조건에 맞춘 배양시간 동안 배양하였다. DNA 성분 측정을 위하여 부유세포 및 부착세포를 채취한 다음 70% 에탄올 1 ml에 4℃에서 밤새 고정하였다. 고정된 세포는 propidium iodide(PI, 20 μg/ml) 1 ml와 RNase(1 mg/ml)에 20분간 염색한 후 flow cytometry(FACSort, Becton Dickinson, San Diego, CA, USA)를 이용하여 DNA의 양에 따라 세포를 분석하였다. 세포고사는 G0, G1의 subG1 단계의 세포로 정하여 전체 세포에 대한 이 세포수를 백분율로 하여 결정하였다.

세포고사를 측정하는 다른 방법으로 위의 방법으로 세포를 얻어 TACS Annexin V - FITC kit(Trevigen, Inc., Gainthersburg, MD, USA)를 이용하여 핵염색 및 annexin V를 부착하였다. 방법으로 PI로 핵염색을 하고 annexin V - FITC를 세포에 결합시킨 다음 flow cytometry(FACS caliber, Becton Dickinson)를 이용하여 7,500개의 세포를 측정하였다. 측정된 세포 중 Annexin V - positive/PI - positive인 세포와 Annexin V - positive/PI - negative인 세포의 수를 구하여 세포고사된 세포수를 정한 다음 이를 전체 세포수로 나누어 세포고사를 측정하였다. 실험은 3회 이상 시행하였으며 통계 검증은 Mann - Whitney test를 이용하여 유의수준은 $p<0.05$를 유의한 것으로 하였다.

NAG - 1 과발현 초파리세포 제작 및 conditioned medium 제작

pcDNA3.1(+) - NAG - 1 plasmid(generous gift from Dr. Eling T, NIEHS, NIH, R.T.P, NC, USA)를 *EcoR I*와 *Xho I*으로 자르고 pMT/V5 - His A(Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) plasmid도 동일한 제한효소로 자른 후 subclone하였다. Stable cell line을 제작하기 위해 초파리세포인 Schneider 2 세포(Invitrogen Co.)를 이용하였다. Schneider 2 세포 5×10^6개를 T25 flask에 넣고 Schneider 's insect medium(Sigma Chemical Co.)을 이용하여 23℃에서 배양하였다. 이후 초파리세포와 subclone된 NAG - 1 - pMT/V5 - His A plasmid의 전달감염(transfection)은 CaPO4 protocol을 이용하였다.[16] 전달감염 2일 후부터 hygromycin B(300 μg/ml)로 처치하여 전달감염된 세포를 선택한 후 4일 마다 배양액을 갈아주었다.

NAG - 1 단백질을 얻기 위하여 NAG - 1 - pMT/V5 - His A - Schneider 2 세포를 혈청이 없고 $CuSO_4$가 500 μM 농도로 들어 있는 Schneider 's insect medium에 48시간 동안 처치하였다. NAG - 1이 들어 있는 배양 상층액을 인산완충 생리식염수로 24시간 동안 투석하여 남아 있는 $CuSO_4$를 제거한 후 얻어진 액을 NAG - 1 conditioned medium (NCM)으로 하였다. 한편 NAG - 1이 없는 vehicle conditioned medium(VCM)을 만들기 위해 $CuSO_4$를 처치하지 않고 같은 방법으로 액을 얻었다. 이후 생물학적 감염을 막기 위하여 NCM과 VCM을 0.2 μm syringe filter를 이용하여 여과한 후 여과액을 centrifugal filter device(Centriplus YM - 30, Millipore, Billerica, MA, USA)를 이용하여 농축하였다. 이 농축액에 대해 Western blot 분석으로 NAG - 1 발현 여부를 확인하였다.

결 과

비스테로이드성 소염제에 의한 NAG - 1의 유도

사람 구강암종 세포주인 SCC 1483 세포에서 비스테로이드성 소염제에 의한 NAG - 1의 유도여부를 알기 위해 8종의 비스테로이드성 소염제를 100 μM의 농도로 48시간 동안 각각 첨가하여 배양한 다음 Western blot 분석을 하였다.

비스테로이드성 소염제에 의한 NAG - 1의 유도는 diclofenac, aceclofenac, indomethacin, ibuprofen, sulindac sulfide 순으로 유도되었다. 이중 diclofenac, aceclofenac, indomethacin 등이 대조군과 비교하여 2배 이상 의미있게 NAG - 1을 유도하였다. 그러나 acetaminophen, piroxicam, NS - 398 등은 NAG - 1을 유도하지 않았다. 결과상 diclofenac이 가장 강력하게 대조군에 비해 약 5.2배로 NAG - 1을 유도하여 이후의 실험은 diclofenac을 이용하여 실험하였다(Fig. 1).

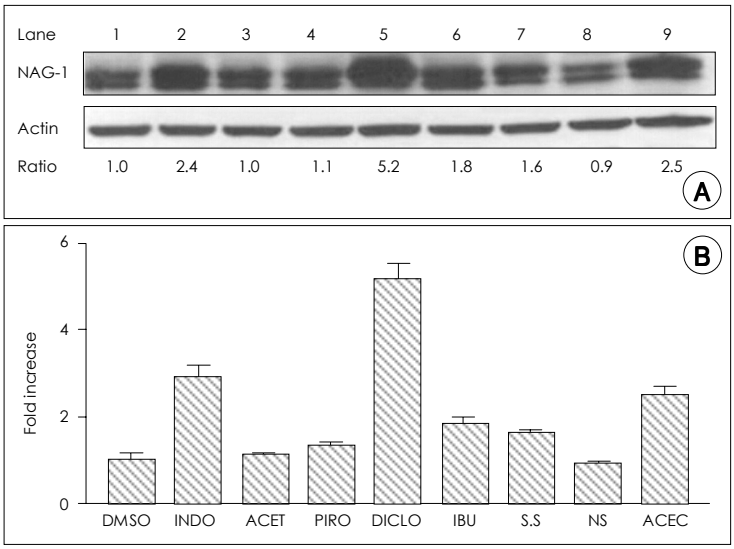

Fig. 1. Expression of NAG-1 by various NSAIDs. A : Western blot analysis. B : Graph showing the fold increase (ratio) of NAG-1 expression. 100 μM NSAIDs were treated to SCC 1483 cells for 48 hours and the expressions of NAG-1 and actin were examined with Western blot analysis. NAG-1 expression was normalized to the level of relevant actin expression and is described relative to that of control (DMSO) as ratio. Diclofenac, aceclofenac, indomethacin, ibuprofen, and sulindac sulfide induce NAG-1 expression, and among them, diclofenac is the most potent NSAIDS as 5.2-folds increase of NAG-1 expression. Lane 1-DMSO, lane 2-indomethacin (INDO), lane 3-acetamionphen (ACET), lane 4-piroxicam (PIRO), lane 5-diclofenac (DICLO), lane 6-ibuprofen (IBU), lane 7-sulindac sulfide (S.S), lane 8-NS 398 (NS), lane 9-aceclofenac (ACEC).

Table 1. Inhibition of cell proliferation by diclofenac

Diclofenac (μM)	Inhibition (%)
1	29.1±8.2
10	53.2±7.5
100	67.8±9.7

Value : mean±standard deviation

Table 2. DNA content of diclofenac-treated cells

Diclofenac (μM)	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
0	44.8±0.4	40.3±0.3	14.9±0.5
1	46.2±0.5	39.6±0.4	14.2±0.6
10	60.7±0.8	25.7±0.6	13.6±0.4
100	65.4±0.7	21.3±0.5	13.3±0.8

Value : mean±standard deviation

Diclofenac에 의한 SCC 1483 세포의 증식 억제 및 세포고사

Diclofenac에 의해 SCC 1483 세포 증식이 억제되는 가를 알기 위해 0, 1, 10, 100 μM의 diclofenac을 48시간 동안 첨가배양한 다음 세포증식 분석을 하였고, 같은 방법으로 diclofenac을 첨가배양한 후 flow cytometry를 이용하여 DNA의 양을 측정하여 세포증식 억제가 세포고사에 의한 것인가를 알아보았다.

Diclofenac에 의한 세포증식 억제는 10 μM부터 50% 이상의 증식 억제를 보였고, 증식 억제는 diclofenac 농도에 따라 증가하였다(Table 1). Diclofenac 농도에 따른 subG1 세포수의 평균치는 대조군 44.8%, diclofenac 1 μM의 경우 46.2%, 10 μM에서 60.7%, 100 μM의 경우 65.4%로 나와 10 μM부터 subG1 세포수가 의미있게 증가하였다 ($p<0.05$)(Table 2). 이상의 결과로 diclofenac 10 μM에서 보이는 세포증식 억제가 세포고사 의한 것임을 알 수 있었다.

NAG-1 유도와 세포고사와의 연관성

상기 실험을 통해 diclofenac이 NAG-1을 유도하며 diclofenac에 의해 세포증식 억제 및 세포고사가 발생함을 알 수 있었다. 이에 diclofenac에 의해 유도된 NAG-1과 세포고사간의 연관성을 알기 위해 diclofenac을 농도별(0, 1, 10, 100 μM)로 48시간 동안 첨가배양하여 NAG-1 유도를 관찰하였고, diclofenac 10 μM을 시간별(0, 6, 12, 24, 36, 48, 72 시간)로 첨가배양하여 NAG-1의 유도를 관찰하였다. 그리고 같은 방법으로 diclofenac을 첨가배양 후 부유세포와 부착세포를 채취하여 annexin V-FITC를 결합시킨 후 flow cytometry를 이용하여 FACS 분석을 하여 세포고사를 측정한 다음 농도별 및 시간별의 NAG-1 유도와 세포고사간의 연관성을 보았다.

결과상 diclofenac 농도별 NAG-1 유도는 10 μM부터 2배 이상 증가하여 100 μM에서 가장 높게 유도되었다(Fig. 2A). 한편 세포고사는 대조군을 1로 보았을 때 세포고사 증가율이 1 μM에서 1.3±0.2, 10 μM의 경우 2.6±0.4, 100 μM에서 4.7±0.7로 나와 10 μM부터 세포고사가 의미있게 증가하였다($p<0.05$)(Fig. 2B).

시간별 NAG-1의 유도는 diclofenac 10 μM 첨가배양 24시간부터 대조군에 비해 2.1배 높게 유도되었고 이러한 NAG-1 유도 증가는 시간에 따라 증가하였다(Fig. 2C). 한편 시간별 세포고사는 대조군을 1로 보았을 때 세포고사 증가율이 6시간에 1.0±0.2, 12시간의 경우 1.2±0.1, 24시간에 1.6±0.1, 36시간의 경우 2.5±0.5, 48시간에 3.1±

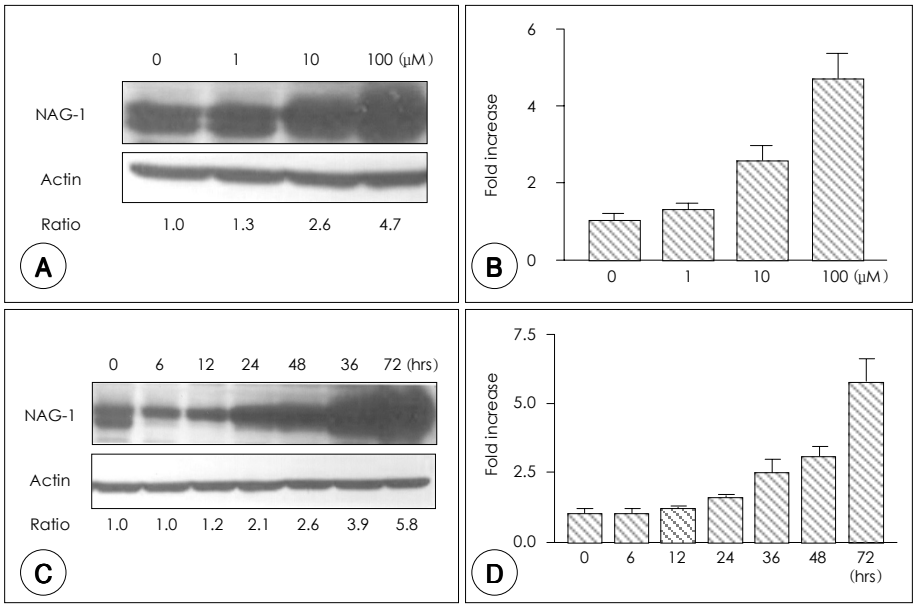

Fig. 2. NAG-1 expression and induction of apoptosis according to the dose and time of diclofenac treatment. Diclofenac was treated to SCC 1483 cells according to various doses and time points. NAG-1 expression and apoptosis were examined with Western blot analysis and flow cytometry. NAG-1 expression was normalized to the level of relevant actin expression and is described relative to that of control as ratio. Apoptosis is represented by the fold inrcease in the percentage of apoptotic population over that of control. A : In Western blot analysis, NAG-1 expression is observed from 10 μM diclofenac and its expression increases in accordance with the increase of dose. B : In flow cytometry, the increase of apoptosis is noted from 10 μM diclofenac and apoptosis increases with the increment of dose. C : In Western blot analysis, NAG-1 expression is observed from 24 hours treatment of diclofenac and the increase continues in accordance with the incease of the treatment duration. D : In flow cytometry, the increase of apoptosis is apparent from 36 hours treatment and the increase is observed with the increment of treatment duration.

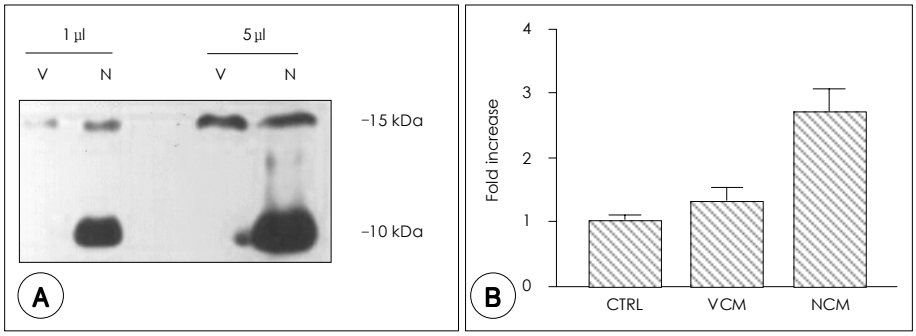

Fig. 3. A : Western blot analysis of VCM and NCM. VCM and NCM were made using inducible NAG-1-tranfected Drosophila cells and the detailed methods were described in Materials and Method section. In 1 μl of concentrated NCM (N), about 10 kDa-sized NAG-1 protein is observed and the NAG-1 expression increases in 5 μl of concentrated NCM. However, in VCM (V), this 10 kDa-sized NAG-1 is not noted. The 15-kDa sized protein is naturally secreted NAG-1 protein in Drosophila cells. B : Flow cytometry of VCM and NCM. SCC 1483 cells were treated with VCM and NCM (1 : 20 to medium), respectively, and apoptosis was examined with flow cytometry. Apoptosis is represented by the fold inrcease in the percentage of apoptotic population over that of control (CTRL). In NCM, apoptosis shows about 2.7-folds increase compared with control and VCM. However, in VCM, the increase of apoptosis is not observed.

0.4, 72시간 때 5.8±0.9의 세포고사 증가를 보여 36시간 동안 첨가배양한 경우부터 세포고사가 의미있게 증가하였으며 세포고사는 시간에 따라 증가하였다($p<0.05$)(Fig. 2D).

이상의 결과로 diclofenac 10 μM에서 NAG-1이 유도되며, 유도된 NAG-1과 세포고사가 연관되어 있음을 알 수 있었다.

NAG-1 단백에 의한 세포고사 유도

NAG-1과 세포고사의 연관성은 알 수 있었으나, 과연 NAG-1 단백에 의해 직접적으로 세포고사가 유도되는 가를 확인하고자 하였다. $CuSO_4$로 NAG-1을 유도한 후 이를 농축한 NCM과 $CuSO_4$ 없이 배양하여 배양액을 얻은 후 농축한 VCM에서 NAG-1 발현여부를 알아보았다. 이후 농축된 NCM과 VCM에 의한 세포증식 억제와 세포고사 여

Table 3. Inhibition of cell proliferation by VCM and NCM

	Inhibition (%)
VCM 1 μl	10.3±5.7
NCM 1 μl	16.4±4.8
VCM 5 μl	11.7±6.3
NCM 5 μl	46.3±12.8

Value : mean±standard deviation

부를 관찰하였다.

*EcoR I*와 *Xho I*으로 제한된 NAG-1 유전자로 계산한 NAG-1 단백의 크기는 약 10 kDa(분비형)으로, Western blot 분석상 초파리세포에서 분비되는 분비형 단백인 15 kDa 크기의 밴드가 약하게 발현되었고 본 실험에서 예상한 약 10 kDa의 NAG-1 단백이 강하게 발현되었다. 또한 NCM 1 μl, 5 μl에서 NAG-1 발현은 1 μl부터 NAG-1이 강하게 발현되어 5 μl에서 발현이 더욱 증가하였고, VCM의 경우 NAG-1은 발현되지 않았다(Fig. 3A). 이런 결과로 본 연구에서 이용한 방법으로 NCM에서 NAG-1 단백이 유도되어지고, VCM에서는 NAG-1 단백이 나오지 않는 것을 알 수 있었다.

NCM과 VCM을 각각 1 μl, 5 μl씩 넣어 무혈장 상태에서 48시간동안 배양 후 시행한 세포증식 분석에서 NCM 1 μl에서는 세포증식이 억제되지 않았으나, NCM 5 μl를 넣어 배양한 경우 VCM에 비해 유의하게 약 4배정도 증식을 억제하였다(Table 3). 이상의 결과로 NCM 5 μl가 세포증식을 억제하므로 다음 실험에서 NCM의 양은 세포증식 분석시 배양액의 양인 100 μl와 비교하여 5 μl : 100 μl (1 : 20)으로 정하였다.

6 well plate에 NCM, VCM 및 대조군으로 인산완충 생리식염수 각각을 무혈장 배양액에 대해 1 : 20의 양으로 넣고 48시간 동안 배양 후 FACS 분석을 시행하였다. 대조군의 세포고사된 세포의 백분율을 1로 보았을 때, NCM을 넣은 경우 2.7±0.7, VCM을 넣은 경우 1.4±0.4의 증가를 보여 NAG-1 단백에 의해 세포고사가 일어남을 확인할 수 있었다(Fig. 3B).

고 찰

대부분의 구강암과 구강 이형성 병변(oral dysplastic lesion)의 경우 COX-2가 과발현 되어 있어 구강암 형성 과정에서 COX-2의 역할을 시사한다.[5] 비스테로이드성 소염제는 COX-2를 억제함으로서 구강암종 세포주에서 세포증식을 억제하고 세포고사를 일으킨다.[5] 그러나 여러 연구에서 비스테로이드성 소염제가 COX-2 억제 작용 이외의 다른 기전으로도 세포고사를 일으킨다는 것이 증명되었다.[6][7] 이러한 COX-2 비의존성 기전 중 하나가 대장-직장암 세포주에서 밝혀진 NAG-1에 의한 세포고사 작용이다.[8][11]

본 연구결과에 의하면 구강암종 세포주에서 NAG-1은 100 μM의 diclofenac, aceclofenac, indomethacin, sulindac sulfide 등에 의해 유도되며 이 중 diclofenac이 가장 강력하게 NAG-1을 유도하였다. 이러한 결과는 대장-직장암 세포에서 여러 비스테로이드성 소염제에 의해 NAG-1이 유도된다는 점에서는 일치하나 소염제의 종류와 NAG-1 유도능력에서는 차이를 보인다.[8] 대장-직장암 세포의 경우 NAG-1을 가장 강력하게 유도하는 소염제는 sulindac sulfide였고, diclofenac은 이보다 약하게 200 μM의 농도에서 대조군 대비 약 3.7배로 NAG-1을 유도하였다. 이처럼 세포에 따라 비스테로이드성 소염제의 NAG-1 유도가 다르게 나타나는 것은 다른 세포에서도 관찰되는데, 동량의 indomethacin을 폐암 세포, 전립선암 세포, 유방암 세포 등에 첨가배양할 경우 NAG-1의 유도 정도는 세포에 따라 상이한 결과를 보였다.[12]

이처럼 NAG-1 유도가 세포 및 비스테로이드성 소염제에 따라 차이를 보이는 이유로 비스테로이드성 소염제가 각 세포에서 세포 특이적으로 반응을 일으키는 것으로 생각된다.[18] 그러나 NAG-1 수용체와 비스테로이드성 소염제와의 반응에 대한 연구는 아직 NAG-1 수용체가 밝혀지지 않은 상태이므로 향후 수용체에 대한 연구가 완성되면 가능하리라 본다. 이러한 차이의 다른 가능한 설명은 p53 단백의 존재 여부이다. p53 단백은 NAG-1 유도의 상위 단계로 알려져 있으므로 이 단백의 존재 유무가 NAG-1 유도에 중요한 역할을 한다.[13] 그러나 최근 연구에 의하면 NAG-1 유도는 p53 단백에 무관하게 유도될 수도 있다고 한다.[12] 이처럼 NAG-1 유도 및 발현에 대해 상이한 연구결과가 존재하므로 향후 NAG-1 유도 기전에 대한 추가연구가 필요하다고 생각한다.

본 연구 결과상 diclofenac 10 μM부터 NAG-1이 유도되었고 이 10 μM의 농도로 24시간 동안 첨가배양시 NAG-1이 유의하게 증가되었다. 한편 세포고사는 이보다 늦은 36시간부터 증가하므로 diclofenac에 의해 유도된 NAG-1과 세포고사가 연관성이 있음을 알 수 있었다. 그러나 NAG-1을 통하지 않고 diclofenac 자체 효과에 의한 세포고사 즉, COX-2 억제에 의한 세포고사에 의해 이런 현상이 발생하였다고 생각할 수 있다. 만일 COX-2 억제에 의한 세포고사라면 diclofenac의 IC_{50}은 1 μM 미만이므로[17] 세포고사가 이 농도부터도 나타나야 하지만 본 연구결과상 10 μM부터 세포고사가 유의하게 증가하므로 이러한 추측을 배제할

수 있다고 본다. 그러나 위의 연구결과는 직접적으로 NAG-1에 의한 세포고사를 관찰한 결과가 아니므로 NAG-1 단백에 의해 직접적으로 세포고사가 야기되는 가를 NCM을 이용하여 관찰하였다.

본 연구에서는 NAG-1을 과발현하는 plasmid를 만들어 초파리 세포에 전달감염시킨 후 $CuSO_4$로 NAG-1을 유도하여 만든 NCM을 이용하였다. 1.3 kb의 full length NAG-1 cDNA(GenBank accession no. AF008393)중 *EcoR I*과 *Xho I*으로 자른 유전자에서 만들어지는 분비형 NAG-1 단백의 예상 크기는 약 10 kDa으로, 결과상 NCM에서 이 크기의 단백이 함유되어 있음을 확인하여 초파리에서 NAG-1 단백이 유도되는 것을 증명하였으며 이 NCM을 이용하여 세포증식 억제와 세포고사를 관찰하였다.

NAG-1에 대한 다른 연구의 경우 NAG-1 유전자를 세포에 과발현시킨 다음 이 과발현된 세포에서 세포고사를 관찰하였다.[8)11)] 이런 연구의 문제점으로 NAG-1 유전자가 세포고사와 연관된 유전자이므로 stable cell line을 만들지 못하고 cell pool을 이용한 점이다. 이런 경우 전달감염된 세포가 균일하지 못하고 이질성을 보인다는 단점이 있다. 본 연구에서도 항생제를 이용하여 stable cell line을 만들려고 selection을 하였으나 NAG-1이 세포고사를 야기하는 단백이므로 실질적인 stable cell line은 아닌 cell pool을 만들었다. 이러한 cell pool을 이용하여 이를 전달감염시켰다는 점에서는 NAG-1이 과발현되지 않는 세포가 포함될 이질성의 가능성이 있으나 이러한 단점을 극복하기 위해 유도계(inducible system)을 이용하여 NAG-1 단백을 유도한 후 이를 농축하여 투여함으로서 NAG-1 단백 자체의 세포고사 작용을 관찰한 것이 기존의 연구와 다른 점이라 하겠다.

연구결과에서 보면 농축된 NCM에서 NAG-1이 과량 발현되었으며, 5 μl의 NCM으로 세포증식이 유의하게 억제되었다. 이 NCM에 의해 세포고사가 유의하게 증가하므로 결과적으로 NAG-1 단백이 직접적으로 세포고사를 야기함을 증명할 수 있었다. 이처럼 구강암종 세포주에서 NAG-1이 세포고사를 유도하는 것은 대장-직장암 세포[8)11)]와 전립선암 세포 등[19)]의 결과와 일치하였다. 그러나 위암 세포(SNU-216)의 경우 NAG-1이 urokinase-type plasminogen activator system을 자극하여 위암 세포의 침습성을 증가시킨다고 하여, 본 연구에서 NAG-1이 세포고사를 야기한다는 결과와는 상이한 결과를 보였다.[20)] 이러한 차이의 이유는 아직 명확히 밝혀지지 않은 상태로 향후 세포에 따른 NAG-1 기능과 발현조절에 대한 추가연구가 필요하리라 생각한다.

결 론

본 연구결과상 여러 비스테로이드성 소염제가 구강암종 세포주에서 NAG-1을 유도하며, 이 NAG-1에 의해 세포고사가 유도되었다. 그러므로 본 연구결과를 토대로 향후 비스테로이드성 소염제가 구강암에 대한 암예방제로 사용될 가능성을 보인다고 생각하며 임상적으로 이를 사용하기 위한 연구 및 그 기전에 대한 연구가 필요하리라 본다.

중심 단어 : 비스테로이드성 소염제 · 구강암 · 세포고사.

본 연구는 2003년도 연세대학교 의과대학 교수연구비(2003-01) 지원에 의해 이루어졌음.

REFERENCES

1) Canto MT, Devesa SS. *Oral cavity and pharynx cancer incidence rates in the United States, 1975-1998. Oral Oncol 2002;38:610-7.*
2) Mork J. *Forty years of monitoring head and neck cancer in Norway-no good news. Anticancer Res 1998;18:3705-8.*
3) Levine PA, Hood RJ. *Neoplasms of the oral cavity. In: Johnson JT, Gluckman JL, Pou AM, editors. Head and neck surgery-Otolaryngology. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins;2001. p.1311-25.*
4) Rinaldi AL, Morse MA, Fields HW, Rothas DA, Pei P, Rodrigo KA, *et al. Curcumin activates the aryl hydrocarbon receptor yet significantly inhibits (−)-benzo(a)pyrene-7R-trans-7,8-dihydrodiol bioactivation in oral squamous cell carcinoma cells and oral mucosa. Cancer Res 2002;62:5451-6.*
5) Sudbo J, Bryne M, Mao L, Lotan R, Reith A, Kildal W, *et al. Molecular based treatment of oral cancer. Oral Oncol 2003;39:749-58.*
6) Hanif R, Pittas A, Feng Y, Koutsos MI, Qiao L, Staiano-Coico L, *et al. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway. Biochem Pharmacol 1996;52:237-45.*
7) Shiff SJ, Koutsos MI, Qiao L, Rigas B. *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit the proliferation of colon adenocarcinoma cells: Effects on cell cycle and apoptosis. Exp Cell Res 1996;222:179-88.*
8) Baek SJ, Kim KS, Nixon JB, Wilson LC, Eling TE. *Cyclooxygenase inhibitors regulate the expression of a TGF-β superfamily member that has proapoptotic and antitumorigenic activities. Mol Pharmacol 2001;59:901-8.*
9) Paralkar VM, Vail AL, Grasser WA, Brown TA, Xu H, Vukicevic S, *et al. Cloning and characterization of a novel member of the transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein family. J Biol Chem 1998;273:13760-67.*
10) Bootocv MR, Bauskin AR, Valenzuela SM, Moore AG, Bansal M, He XY, *et al. MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:11514-19.*
11) Kim KS, Baek SJ, Flake GP, Loftin CD, Calvo BF, Eling TE. *Expression and regulation of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) in human and mouse tissue. Gastroenterology 2002;122:1388-98.*
12) Baek SJ, Wilson LC, Lee CH, Eling TE. *Dual function of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): Inhibition of cyclooxygenae and induction of NSAID-activated gene. J Pharmacol Exp Ther 2002;301:1126-31.*
13) Tan M, Wang Y, Guan K, Sun Y. *PTGF-beta, a type beta transforming growth factor (TGF-beta) superfamily member, is a p53 target gene*

that inhibits tumor cell growth via TGF-beta signaling pathway. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:109-14.

14) Wilson LC, Baek SJ, Call A, Eling TE. *Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) is induced by genistein through the expression of p53 in colorectal cancer cells. Int J Cancer 2003;105:747-53.*

15) Bottone FG, Baek SJ, Nixon JB, Eling TE. *Diallyl disulfide (DADS) induces the antitumorigenic NSAID-activated gene (NAG-1) by a p53-dependent mechanism in human colorectal HCT 116 cells. J Nutr 2002;132:773-8.*

16) Di Nocera PP, Dawid IB. *Transient expression of genes introduced into cultured cells of Drosophila. Proc Natl Acad Sci USA 1983;80:7095-8.*

17) Yamazaki R, Kawai S, Matsumoto T, Matsuzaki T, Hashimoto S, Yokokura T, *et al. Hydrolytic activity is essential for aceclofenac to inhibit cyclooxygenase in rheumatoid synovial cells. J Pharmacol Exp Ther 1999;289:676-81.*

18) Baek SJ, Horowitz JM, Eling TE. *Molecular cloning and characterization of human nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene promoter. J Biol Chem 2001;276:33384-92.*

19) Liu T, Bauskin AR, Zaunders J, Brown DA, Pankhurst S, Russell PJ, *et al. Macrophage inhibitory cytokine 1 reduces cell adhesion and induces apoptosis in prostate cancer cells. Cancer Res 2003;63:5034-40.*

20) Lee DH, Yang Y, Lee SJ, Kim KY, Koo TH, Shin SM, *et al. Macrophage inhibitory cytokine-1 induces the invasiveness of gastric cancer cells by up-regulating the urokinase-type plasminogen activator system. Cancer Res 2003;63:4648-55.*