

사람 정상 코점막 상피세포와
상악동암종 세포주에서
*nonsteroidal anti-inflammatory
drug-activated gene (NAG-1)*의
조절과 세포고사 유도 차이

연세대학교 대학원

의 학 과

이 광 현

사람 정상 코점막 상피세포와
상악동암종 세포주에서
*nonsteroidal anti-inflammatory
drug-activated gene (NAG-1)*의
조절과 세포고사 유도 차이

지도 김 경 수 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2007년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

이 광 현

이광현의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2007년 6월 일

감사의 글

본 논문의 시작부터 완성까지 체계적인 지도와 조언을 해주신 김경수 교수님께 깊은 감사를 드리며, 본 연구에 대해 조언을 아끼지 않으신 윤주현 교수님, 김세현 교수님, 이수곤 교수님, 그리고 김종선 교수님께도 고개 숙여 감사드립니다.

아울러 이번 연구를 여러모로 도와주신 이정권 교수님의 모든 교실원 및 의국원 여러분과 연구실 선생님께 감사의 뜻을 전합니다.

성실과 사랑의 소중함을 가르쳐 주셨고, 언제나 기다려 주시며, 인생의 등불이 되어 주시며, 오늘의 제 모습을 만들어 주신 양가 부모님들, 힘이 되어 주는 가족들, 그리고 늘 곁에서 지켜주고 따뜻한 지지를 아끼지 않으며, 같이 기뻐하고 아파해 주었던 사랑하는 아내 이윤경과 항상 새로운 미래를 만들어 가는 원석, 유정이에게 이 논문을 바칩니다.

2007년 6월

저자 씬

차 례

국문 요약	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	7
1. 연구재료와 세포 배양	7
2. Western blot 분석	8
3. Flow cytometry 분석	9
4. NAG-1 과발현 초파리세포 제작과 conditioned medium 제작	9
5. 세포증식 분석	10
4. Nude mice를 이용한 indomethacin의 항종양 실험	11
III. 결 과	12
1. AMC-HN5 세포에서 비스테로이드성 소염제에 의한 NAG-1의 유도과 세포고사	12
2. AMC-HN5 세포에서 indomethacin의 농도와 투여시간에 따른 NAG-1의 유도과 세포고사	14
3. AMC-HN5 세포에서 NAG-1 단백질에 의한 세포고사	17
4. 사람 정상 코점막 상피세포에서 비스테로이드성소염제에 의한 NAG-1 유도과 세포고사	20
5. 사람 정상 코점막 상피세포에서 NAG-1 단백질에 의한 세포고사	22
6. Nude mice에서 indomethacin에 의한 항종양효과	23

IV. 고찰	25
V. 결론	30
참고문헌	31
영문요약	35

그림 차례

Fig. 1. Induction of NAG-1 and apoptosis by various NSAIDs in AMC-HN5 cells	13
Fig. 2. Dose-dependent NAG-1 expression and induction of apoptosis in AMC-HN5 cells	15
Fig. 3. Time-dependent NAG-1 expression and induction of apoptosis in AMC-HN5 cells	16
Fig. 4. Recombinant NAG-1 induces apoptosis in AMC-HN5 cells	19
Fig. 5. Induction of NAG-1 and apoptosis by various NSAIDs in normal human nasal epithelial cells	21
Fig. 6. Recombinant NAG-1 doesn't induce apoptosis in normal human nasal epithelial cells	22
Fig. 7. Antitumorigenic activity of indomethacin in nude mice	24

표 차례

Table 1. Inhibition of AMC-HN5 cell proliferation by vector medium, VCM, NCM	18
---	----

국문요약

사람 정상 코점막 상피세포와 상악동암종 세포주에서 nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1)의 조절과 세포고사 유도 차이

비스테로이드성 소염제의 항암작용은 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 억제에 의해 일어나는 것이 주작용으로 알려져 있으나, 최근 비스테로이드성 소염제에 의해 유도되어 COX-2와 무관하게 작용하는 nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1)이 밝혀졌다. 이상적인 암억제제로 정상 세포에는 영향을 미치지 않고 가능하면 암종에만 효과적인 약물이 임상적으로 유용하다. 그러나 비스테로이드성 소염제가 상악동암에 효과가 있는지 여부와 사람 정상 코점막에 어떤 영향을 주는가에 대해서는 연구가 미흡한 실정이다. 이에 본 연구의 목적으로 사람 상악동암종 세포주에서 비스테로이드성 소염제에 의해 NAG-1이 유도되는가를 보고 유도된 NAG-1에 의해 세포고사가 일어나는지를 알아보며, 정상 코점막 상피세포에서 비스테로이드성 소염제에 의해 세포고사가 일어나는가를 보고자 하였다. 그리고 비스테로이드성 소염제를 상악동암종 세포주가 이중익식된 백서에 투여하여 상악동암종의 억제 여부를 알아보아, 비스테로이드성 소염제가 상악동암종에 대해 암예방제로 임상적으로 사용 가능한가를 알아보고자 하였다.

상악동암 세포주(AMC-HN5 세포주)에 비스테로이드성 소염제를 투여한 결과 indomethacin, diclofenac, aceclofenac, sulindac sulfide 순으로 NAG-1을 유도하였으며, 이중 indomethacin은 시간과 농도에 의존하여 NAG-1을 유도하였다. Flow cytometry 상 NAG-1에 의해 유의하게 세포고사가 유도되었으며, 세포고사는 indomethacin 투여 시간과 농도 의존성으로 유도되었다. NAG-1 과발현 초파리세포에서 얻은 NAG-1 conditioned medium (NCM)에 의해 세포고사가 유도되어, 세포고사가 NAG-1에 의한 것임을 알 수 있었다. 사람 정상 코점막

상피세포에서는 비스테로이드성 소염제에 의해 NAG-1이 유도되지 않았고 세포고사도 유도되지 않았으며, NCM에 의해서도 세포고사가 유도되지 않았다. 백서에 AMC-HN5 세포주를 이종이식한 다음 indomethacin을 2 mg/kg/day의 용량으로 음용시켜 종양의 크기를 비교한 결과 indomethacin을 투여하지 않은 대조군과 비해 투여 4주째 부터 유의하게 종양의 형성을 억제하였다.

결론적으로, 비스테로이드성 소염제인 indomethacin은 상악동암종 세포주에서 NAG-1을 유도하여 항암효과와 항종양효과를 보이며 정상 코점막세포에 영향을 주지 않아 안전하고 유용한 암억제제로서의 가능성을 보인다 하겠다.

핵심되는 말 : nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene,
상악동암, 세포고사, 암억제제

사람 정상 코점막 상피세포와 상악동암종 세포주에서
nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene
(*NAG-1*)의 조절과 세포고사 유도 차이

<지도교수 김 경 수>

연세대학교 대학원 의학과

이 광 현

I. 서 론

암예방제는 전암성 병변(precancerous lesion)의 재발을 억제하고 암으로 변환되는 암 유발과정(carcinogenic process)을 차단하는 역할을 한다. 현재 암예방제로 많은 연구가 되고 있는 약제가 비스테로이드성 소염제로 sulindac, celecoxib, rofecoxib 등은 대장에 발생하는 familial adenomatous polyposis의 암억제제로 임상적으로 사용되고 있는데, 주로 COX-2를 억제하여 암예방제의 기능을 보인다.^{1,2} 그러나 COX 효소가 없는 세포에서도 비스테로이드성 소염제에 의해 암예방 효과 혹은 항암작용이 일어나는데 이러한 역할을 하는 유전자 중 하나로 밝혀진 것이 nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (*NAG-1*)에 의한 항암작용이다.³

*NAG-1*은 염기서열 분석상 TGF- β superfamily 사이토카인을 특징 짓는 seven-cystein 영역(domain)과 15-29%의 동일성을 보여 TGF- β superfamily에 속하는 사이토카인으로 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. 사람 *NAG-1* 유전자는 19p12.1-13.1 염색체에 존재하며 *NAG-1* 단백질은 두 exon에 의해 코드화(coding)되는데 309 bp의 Exon I은 71 bp 5' 미

유전암호해독 지역(untranslated region: UTR)과 238 bp 코드화 지역(coding region)으로 구성되며, 647 bp의 Exon II는 3' UTR로 구성된다. 사람 NAG-1은 태반에서 가장 많이 표현되고 대장, 신장, 전립선 등에서는 낮은 농도로 표현된다. NAG-1 단백질은 167개의 아미노산으로 구성된 전영역(pro-domain)을 가지는 전단백(pro-protein) 형태로 만들어지는데, 세포내에서 전단백은 이합체(dimer) 형태로 존재한다. 이 전단백은 아미노산 서열 RXXR에서 분할되어 112개의 아미노산으로 구성된 C-말단 성숙단백(C-terminal mature protein)의 이합체 형태로 세포 밖으로 분비된다. 분비된 단백질은 이합체 형태가 일차적 형태이나 단량체(monomer)도 존재한다. 급성 손상, 염증, 암 등에서 분비된 이합체(dimer) 형태의 NAG-1 단백질이 혈청에서 증가하며 이 단백질이 생물학적으로 활성단백(active protein)이다. 아직까지 여러 형태의 NAG-1 단백질의 생물학적 활성은 전부 밝혀지지 않았으나 그 기능이 상이하리라 생각하고 있다.⁴

TGF- β superfamily 사이토카인의 일반적 특징으로 세포의 증식과 고사, 분화, 세포외 기질의 형성 또는 면역 억제와 관련이 있으며, 강력한 성장 억제를 일으켜 세포주기를 G1 후기에 머물게 하거나, 세포고사를 일으키며 세포 부착물질의 발현에도 작용한다.⁵ NAG-1도 이러한 특성을 보이는데 원시 조혈 전구세포의 증식을 억제하며 대장암 세포, 폐암 세포, 전립선암 세포, 구강암종 세포, 난소암종 세포 등에서 세포고사를 유도하여 전세포고사적(proapoptotic), 항종양성(antitumorigenic) 기능을 한다.^{4,6} 이러한 작용은 비스테로이드성 소염제 외에도 resveratrol, genistein, diallyl disulfide, 5F203, retinoid 6-[3-(1-adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphthalene carboxylic acid (AHPN), indole-3-carbinol, PPAR γ ligand, conjugated linoleic acids 등에 의해서 유도되며, cyclooxygenase-2와 p53 유전자의 존재 여부와 무관하게 유도된다.⁴ 이처럼 NAG-1은 비스테로이드성 소염제의 항암작용에 중요한 역할을 담당하여 암예방제(chemopreventive agents)로서의 가능성을 보인다. 한편, 구강으로 sulindac을 섭취한 백서의 간과 소장에서 NAG-1의 발현이 증가하여 비스테로이드성 소염제에 의해 생체 내 유도가 가능한 유전자이다.⁷

이처럼 NAG-1은 대장-직장암, 전립선암, 유방암, 폐암, 백혈병, 구강암 등에서 활발히 연구되고 있으나 아직 상악동암중 세포주와 NAG-1의 관계에 대해 알려진 바가 없는 실정이다. 만일 상악동암 세포주에서 비스테로이드성 소염제에 의해 NAG-1이 유도되고 이에 의해 세포고사가 유도된다면 이러한 비스테로이드성 소염제를 암예방제로 사용할 수 있을 것이다. 그러나 암예방제로 사용하기 위해서는 가능하면 정상 코점막 상피세포에는 손상을 주지 않고 암세포를 선택적으로 고사시키는 조건이 필수적이다. 즉, 정상 코점막 상피세포에서도 비스테로이드성 소염제에 의해 NAG-1이 유도될 가능성이 있으며 이 NAG-1에 의해 정상 코점막 상피세포가 세포고사될 가능성을 배제할 수 없으므로 상악동암중 세포주에서의 NAG-1 유도 및 세포고사 여부와 함께 정상 코점막 상피세포에서의 반응이 암예방제로의 사용에 있어 중요하다 하겠다.

한편 코에 발생하는 양성 질환인 반전성 유두종은 양성에서 악성으로의 암 변환이 가능한 질환으로, 일차 치료인 근치 수술 이후에도 재발과 악성 변화가 가능하므로 지속적인 외래 관찰이 요하는 질환이다. 특히 반전성 유두종 중 human papilloma virus (HPV 6/11, 16/18)에 양성이거나 세포고사 지수가 낮은 경우, Ki 67 index가 증가한 경우, EGFR이 증가한 경우 등에서는 암종으로 변환될 가능성이 높아 고위험성 반전성 유두종이라고 할 수 있다.⁸⁻¹⁰ 그러므로 이러한 반전성 유두종에 대해 근치 수술 후 암예방제를 투여함으로써 전암성 병변의 재발과 암 형성을 억제할 수 있다. 그러나 부비동-비강암에 대해 어떤 암예방제가 효율적이고 안전한가에 대해서는 연구가 미비한 실정이므로 비스테로이드성 소염제가 상악동암중 세포주에 대해 항암작용을 갖는 가를 알아보아 항암작용이 있다면 암예방제로서의 가능성을 보는 것이 임상적으로 의의를 갖는다 하겠다.

이에 본 연구의 목적으로 사람 상악동암중 세포주에서 비스테로이드성 소염제에 의해 NAG-1이 유도되는 가를 보고 유도된 NAG-1에 의해 세포고사가 일어나는 지를 알아보며, 정상 코점막 상피세포에서 비스테로이드성 소염제에 의해 세포고사가 일어나는 가를 보고자 하였다. 그리고 비스테로이드성 소염제를 상악동암중 세포주가 이중이

식된 백서에 투여하여 상악동암종의 억제 여부를 알아보아, 비스테로이드성 소염제가 상악동암종에 대해 암예방제로 임상적으로 사용 가능한가를 알아보려고 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 연구재료와 세포 배양

기존의 방법으로 만들어 저장해 놓은 passage-2 사람 정상 코점막 상피세포를 이용하여 배양하였다.¹¹ 방법을 약술하면 well당 10^5 세포를 반투과성 막(Trans-clear, Costa Co., Cambridge, MA, USA)에 놓고 막의 위-아래에 모두 배양액을 넣어 9일간 배양하였다. 사용되는 배양액은 BEGM과 DMEM을 동량으로 섞고 여기에 첨가물로 hydrocortisone, insulin, transferrin, epinephrine, triiodothyronine, gentamycin, amphotericin, epidermal growth factor, bovine serum albumin, bovine pituitary extract 등을 기존의 농도로 사용하였다. 배양은 처음 9일간은 위-아래 모두 2일에 한번 배양액을 갈아 주었고, 9일째 위의 배양액을 제거하여 air-liquid interface (ALI)를 시행하여 아래로부터 영양분을 받도록 하여 배양하였다. ALI로 배양된 세포에 대해 배양 14일째 실험을 하였다.

상악동암 세포주는 Asan Medical Center-Head and Neck Cancer 5 (AMC-HN5) 세포주를 사용하였다. 세포주는 DMEM을 배양액으로 하여 10% fetal bovine serum (Gibco BRL, Rockville, MD, USA), penicillin, streptomycin 등을 넣어 배양하였다.

사용한 비스테로이드성 소염제로 indomethacin, diclofenac (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), sulindac sulfide (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA), aceclofenac (대웅제약, 서울) 등을 사용하였다.

다클론성 항NAG-1 항체는 Dr. Eling T (NIEHS, RTP, NC, USA) 에서 얻었으며, 항 α -tubulin 항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

2. Western blot 분석

사람 정상 코점막 상피세포와 상악동암 세포주에 대한 각 실험 이후 radioimmunosorbent assay buffer를 이용하여 cell lysate를 얻었다. 단백질의 양은 bicinchonic acid protein assay-bovine serum albumin 법을 이용하여 측정한 후 각 lane당 단백질 30 μ g을 넣어 전기영동하였다.

전기영동은 15% SDS-polyacrylamide gel을 이용하였고 전기영동 후 nitrocellulose membrane에 전이시킨 다음 이 막을 10% 전지분유가 포함된 TBST (Tris-buffered saline with 0.05% Tween 20) 완충액으로 4°C에서 밤새 반응시킨 후 2% 탈지분유가 포함된 TBST 완충액을 이용하여 1:5000의 농도로 항NAG-1 항체를 사용하여 실온에서 4시간 동안 반응시켰다. 세척을 시행한 후 막은 TBST 완충액에 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 니트로셀룰로즈 막을 deprobing한 다음 같은 방법을 이용하여 1:500의 농도로 항 α -tubulin 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 α -tubulin 밴드의 세기로 나눈 다음, 이 수치중 대조군의 수치를 1로 하여 각 비스테로이드 소염제에 의한 NAG-1 유도의 상대적 비율을 구하였다. 실험은 3회 이상 시행하여 평균과 표준편차를 구하였으며 평균값에 대한 차이는 반복 측정자료의 분산분석법 (repeated measures ANOVA test)을 이용하였고 다중비교(multiple comparisons)를 추가하여 유의수준 $p < 0.05$ 를 유의한 것으로 하였다.

3. Flow cytometry 분석

6-well plate에 AMC-HN5 세포를 well당 4×10^5 세포로 분주하여 16시간 동안 배양한 다음 무혈장 상태에서 비스테로이드성 소염제를 첨가하고 각 실험조건에 맞추어 배양시간 동안 배양하였다. 사람 정상 코점막 상피세포인 경우 ALI 14일째 비스테로이드성 소염제를 첨가하여 배양하였다. 배양 후 부유세포 및 부착세포를 채취한 다음 TACS Annexin V-FITC kit (Trevigen, Inc., Gaithersburg, MD, USA)를 이용하여 핵염색 및 annexin V를 부착하였다. 방법으로 propidium iodide (PI, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 핵염색을 하고 annexin V-FITC를 세포에 결합시킨 다음 flow cytometry (FACS caliber, Becton Dickinson, San Diego, USA)를 이용하여 10,000개의 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 시행하여 평균과 표준편차를 구하였으며 평균값에 대한 차이는 반복 측정자료의 분산분석법(repeated measures ANOVA test)을 이용하였고 다중비교(multiple comparisons)를 추가하여 유의수준 $p < 0.05$ 를 유의한 것으로 하였다.

4. NAG-1 과발현 초파리세포 제작과 *conditioned medium* 제작

NAG-1-conditioned medium을 만들기 위해 기존의 방법을 이용하였다.¹² 이를 요약하면, *pcDNA3.1(+)-NAG-1* plasmid (generous gift from Dr. Eling T)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 5×10^6 개를 T25 flask에 넣고 Schneider's insect medium (Sigma Chemical Co.)을 이용하여 23°C에서 배양하였다. 이후 초파리세포와

subclone된 *NAG-1-pMT/V5-His A* plasmid의 전달감염 (transfection)은 CaPO₄ protocol을 이용하였다. 전달감염 2일 후부터 hygromycin B (300 µg/ml)로 처리하여 전달감염된 세포를 선택한 후 4일 마다 배양액을 갈아주었다.

NAG-1 단백질을 얻기 위하여 NAG-1-pMT/V5-His A-Schneider 2 세포를 혈청이 없고 CuSO₄가 500 µM 농도로 들어 있는 Schneider's insect medium에 48시간 동안 처리하였다. NAG-1이 들어 있는 배양 상층액을 인산완충 생리식염수로 24시간 동안 투석하여 남아 있는 CuSO₄를 제거한 후 얻어진 액을 NAG-1 conditioned medium (NCM)으로 하였다. 한편 NAG-1이 없는 vehicle conditioned medium (VCM)을 만들기 위해 CuSO₄를 처리하지 않고 같은 방법으로 액을 얻었다. CuSO₄를 제거한 후에도 CuSO₄가 남아 있을 가능성이 있으므로 이의 영향을 알아보기 위해 *pMT/V5*와 *pCoHYGRO* vector만을 Schneider 2 세포에 전달감염시킨 다음 NAG-1 과발현 세포와 같은 방법으로 이를 처리하여 투석한 액을 vector medium으로 하였다. 이후 생물학적 감염을 막기 위하여 NCM, VCM, vector medium 등을 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.

5. 세포증식 분석

AMC-HN5 세포를 96-well plate에 well당 2000 세포씩 분주하고 16시간 동안 세포를 배양하였다. 이후 인산완충 생리식염수로 세척한 다음 무혈장 상태에서 실험조건에 맞추어 24시간 동안 배양하였다. 세포증식 여부는 Cell Titer 96 Aqueous One Solution Proliferation Assay kit (Promega Co., Madison, WI, USA)를 사용하여 측정하였는데 방법으로 20 µl의 시약을 각 well에 넣고 37°C에서 1시간 동안 배양한 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. *Nude mice*를 이용한 *indomethacin*의 항종양 실험

실험동물로 생후 8주된 수컷 *BALB/c-nu* nude mice의 양측 전완 뒤쪽에 각각 10^7 개/100 μ l의 AMC-HN5 세포를 피하로 주사하여 이종이식(xenograft)을 하였다. Indomethacin 투여군(10마리, 20 이종이식)으로 indomethacin을 2 mg/kg/day의 용량으로 투여하였다. 투여 방법은 1 ml ethanol에 10 mg의 indomethacin을 녹인 다음 이를 증류수 200 ml에 섞어 마시게 하였으며, 물은 1주일마다 마신 양을 측정하고 새것으로 교체하였다. 대조군(10마리, 20 이종이식)의 경우 indomethacin 없이 제조하여 실험군과 같은 방법으로 음용시켰다. 종양의 크기는 2-3일 간격으로 7주간 장경과 단경을 전자자(electric caliper)로 측정하여 기록하였다. 종양의 부피는 [(장경+단경) x 0.5] x 장경 x 단경 x 0.5236의 공식으로 mm^3 의 단위로 정하였다. 실험 전후 생쥐의 몸무게를 측정하여 두 군을 비교하였다. 통계학적 유의성은 두 군의 평균과 표준편차를 구하였으며 평균값에 대한 차이는 반복 측정자료의 분산분석법(repeated measures ANOVA test)을 이용하였고 다중비교(multiple comparisons)를 추가하여 유의수준 $p < 0.05$ 를 유의한 것으로 하였다.

III. 결 과

1. AMC-HN5 세포에서 비스테로이드성 소염제에 의한 NAG-1의 유도와 세포고사

AMC-HN5 세포에 대해 indomethacin, diclofenac, sulindac sulfide, aceclofenac 등의 비스테로이드성 소염제를 100 μ M의 농도로 48시간 동안 첨가배양한 후 NAG-1의 발현과 세포고사를 관찰하였다. 비스테로이드성 소염제에 의한 NAG-1 유도는 대조군과 비교하여 indomethacin (4.0 ± 0.5 배), diclofenac (2.3 ± 0.3 배), aceclofenac (1.6 ± 0.2 배), sulindac sulfide (1.5 ± 0.3 배) 순으로 유도되어, indomethacin에 의해 NAG-1이 약 4배 정도로 가장 강력하게 유도되는 것을 알 수 있었다($p < 0.05$)(Fig. 1A). 비스테로이드성 소염제에 의한 세포고사 증가율은 대조군과 비교하여 indomethacin (4.7 ± 0.6), diclofenac (2.8 ± 0.3), sulindac sulfide (2.3 ± 0.4), aceclofenac (2.2 ± 0.2) 순으로 증가되어, indomethacin에 의해 상악동암 세포주의 세포고사가 약 4.7배 증가하는 것을 알 수 있었다($p < 0.05$)(Fig. 1B, C). 이상의 결과로 이후 실험은 indomethacin을 이용하여 실험하였다.

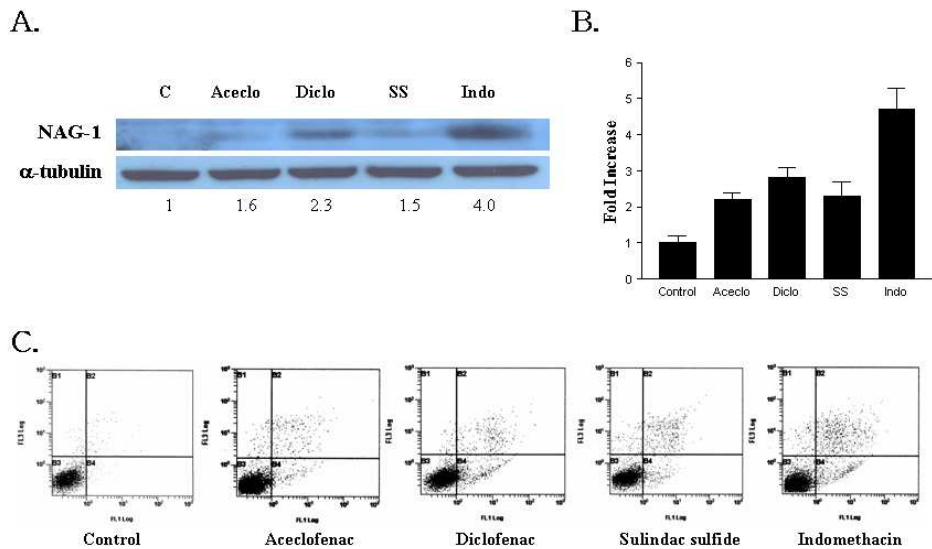


Fig. 1. Induction of NAG-1 and apoptosis by various NSAIDs in AMC-HN5 cells. AMC-HN5 cells were treated separately with 100 μ M of aceclofenac (Aceclo), diclofenac (Diclo), sulindac sulfide (SS), and indomethacin (Indo) for 48 hours. The expression of NAG-1 was examined by Western blot analysis and apoptosis was investigated by flow cytometry using Annexin V-FITC and propidium iodide (PI). NAG-1 expression was normalized to the level to α -tubulin expression and is reported as a ratio of NAG-1 to α -tubulin. Apoptosis is represented by the fold increase in the percentage of apoptotic population compared to the control. A. In Western blot analysis, indomethacin and diclofenac induce NAG-1 expression, and among them, indomethacin is the most potent NSAIDs as 4.0-folds increase of NAG-1 expression ($p < 0.05$). B. In flow cytometry, indomethacin is the most potent NSAIDs as 4.7-folds increase of apoptosis ($p < 0.05$). C. Dot plots of DMSO- and NSAIDs-treated cells. X-axis represents Annexin V-FITC and y-axis represents PI. The figures shown are representative of three independent experiments.

2. AMC-HN5 세포에서 *indomethacin*의 농도와 투여시간에 따른 *NAG-1*의 유도과 세포고사

Indomethacin에 의해 *NAG-1*이 유도되므로 indomethacin을 농도별 (0-1-10-100 μM)과 시간별 (0-6-12-24-48 시간)로 투여하여 *NAG-1*의 유도와 세포고사간의 연관성을 알아보았다. 48시간 동안 indomethacin을 농도별로 첨가배양한 후 측정된 *NAG-1* 유도는 대조군과 비교하여 1 μM (1.4 \pm 0.1배), 10 μM (2.9 \pm 0.2배), 100 μM (3.7 \pm 0.4배)로 나와, 10 μM 부터 약 2.9배의 *NAG-1*이 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$)(Fig. 2A). 한편 농도별 세포고사 증가율은 대조군과 비교하여 1 μM (1.2 \pm 0.1), 10 μM (3.1 \pm 0.4), 100 μM (4.9 \pm 0.4)으로, 10 μM 부터 세포고사가 유의하게 증가하였다($p < 0.05$)(Fig. 2B, C).

100 μM 의 indomethacin을 시간별로 첨가배양한 후 측정된 *NAG-1* 유도는 대조군과 비교하여 6시간(1.3 \pm 0.2배), 12시간(2.1 \pm 0.1배), 24시간(2.9 \pm 0.3), 48시간(3.8 \pm 0.5배)로, 12시간 첨가배양부터 *NAG-1*이 유의하게 발현되었다($p < 0.05$)(Fig. 3A). 한편 시간별 세포고사 증가율은 대조군과 비교하여 6시간(1.3 \pm 0.1), 12시간(1.6 \pm 0.2), 24시간(3.2 \pm 0.4), 48시간(5.0 \pm 0.5)로, 24시간 첨가배양부터 유의하게 세포고사가 증가하였다($p < 0.05$)(Fig. 3B, C). 이러한 결과로 세포고사에 대한 이후 실험은 indomethacin 10 μM , 24시간의 조건으로 시행하였다.

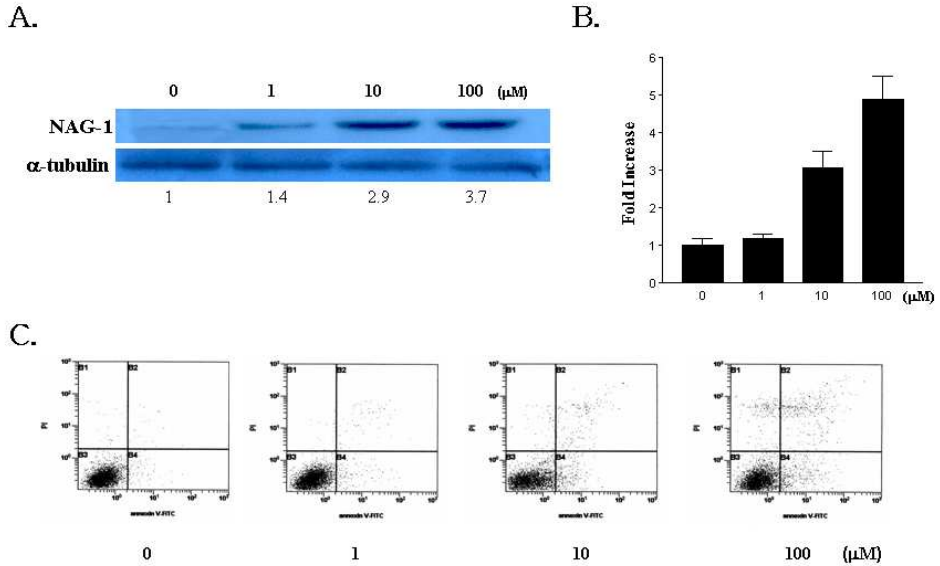


Fig. 2. Dose-dependent NAG-1 expression and induction of apoptosis in AMC-HN5 cells. AMC-HN5 cells were treated with various concentrations of indomethacin for 48 hours. The expression of NAG-1 was examined by Western blot analysis and apoptosis was investigated by flow cytometry using Annexin V-FITC and propidium iodide (PI). NAG-1 expression was normalized to the level to α -tubulin expression and is reported as a ratio of NAG-1 to α -tubulin. Apoptosis is represented by the fold increase in the percentage of apoptotic population compared to control. A. In Western blot analysis, NAG-1 expression is observed from 10 μ M indomethacin and the expression increases in a dose-dependent manner ($p < 0.05$). B. Bar graph showing fold increase of apoptosis. An increase in apoptosis is noted from 10 μ M indomethacin and is in a dose-dependent manner ($p < 0.05$). C. Dot plots of DMSO- and indomethacin-treated cells. X-axis represents Annexin V-FITC and y-axis represents PI. The figures shown are representative of three independent experiments.

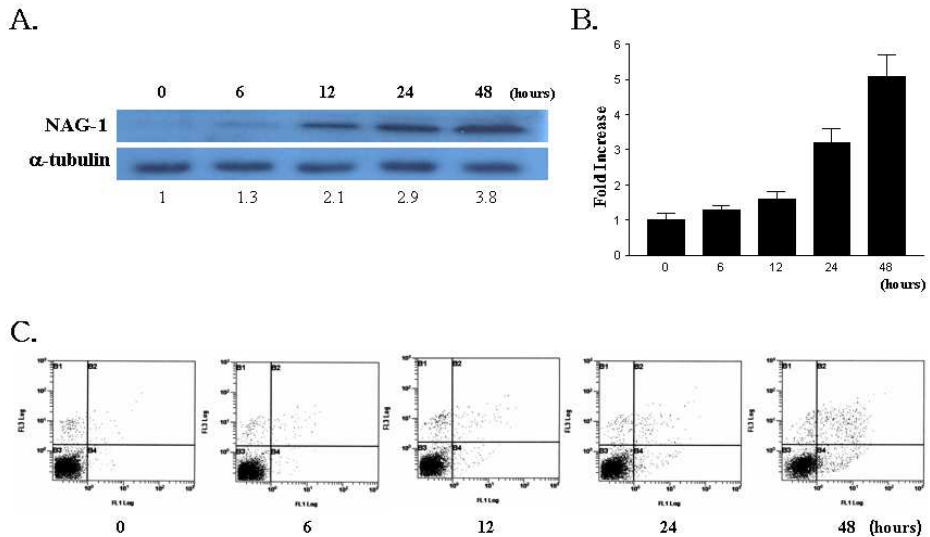


Fig. 3. Time-dependent NAG-1 expression and induction of apoptosis in AMC-HN5 cells. AMC-HN5 cells were treated with 100 μ M indomethacin at the times indicated. The expression of NAG-1 was examined by Western blot analysis and apoptosis was investigated by flow cytometry using Annexin V-FITC and propidium iodide (PI). NAG-1 expression was normalized to the level to α -tubulin expression and is reported as a ratio of NAG-1 to α -tubulin. Apoptosis is represented by the fold increase in the percentage of apoptotic population compared to control. A. In Western blot analysis, NAG-1 expression is observed from 12 hours treatment and its expression increases in a time-dependent manner ($p < 0.05$). B. Bar graph showing fold increase of apoptosis. Apoptosis is detected after 24 hours incubation and the increase of apoptosis is observed with the time of incubation ($p < 0.05$). C. Dot plots of indomethacin-treated cells. X-axis represents Annexin V-FITC and y-axis represents PI. The figures shown are representative of three independent experiments.

3. AMC-HN5 세포에서 NAG-1 단백질에 의한 세포고사

Indomethacin에 의해 유도된 NAG-1에 의해 세포고사가 유도되는 것을 확인하기 위해 농축된 vector medium, VCM, NCM 등을 AMC-HN5 세포에 투여하였다.

Vector medium, VCM, NCM 각 5 μ l를 Western blot 분석한 결과 NCM에서는 약 10 kDa의 NAG-1 재조합 단백질이 검출되었으나, VCM과 vector medium에서는 이 재조합 단백질이 검출되지 않았다 (Fig. 4A).

NCM의 세포증식 억제 농도를 알아보기 위해 NCM과 세포배양액의 농도비가 1:20 (NCM 5 μ l), 1:10 (NCM 10 μ l), 1:5 (NCM 20 μ l) 이 되도록 투여한 다음 24시간 동안 배양한 후 세포증식 분석을 시행하였다. 결과로 대조군과 비교하여 VCM, vector medium에서는 유의한 세포증식 억제가 관찰되지 않았으나 NCM 1:10의 농도부터 세포증식이 50% 이상 억제되었다(Table 1).

이전 실험에서 결정한 1:10의 농도로 NCM, VCM, vector medium을 각각 24시간 동안 첨가배양한 후 FACS 분석을 시행하였다. 대조군과 비교한 세포고사 증가율은 vector medium (1.3 ± 0.1), VCM (1.5 ± 0.3)으로 유의한 차이를 보이지 않았다. NCM 투여 시 세포고사 증가율은 4.6 ± 0.7 로 유의하게 세포고사가 증가하였다($p<0.05$)(Fig. 4B, C).

Table 1. Inhibition of AMC-HN5 cell proliferation by vector medium, VCM, NCM

	Inhibition (%)
Vector medium 5 μ l	1.2 \pm 0.9
VCM 5 μ l	1.5 \pm 1.0
NCM 5 μ l	32.5 \pm 4.8
Vector medium 10 μ l	8.7 \pm 2.8
VCM 10 μ l	10.2 \pm 2.6
NCM 10 μ l	57.4 \pm 6.1
Vector medium 20 μ l	21.2 \pm 4.7
VCM 20 μ l	28.5 \pm 7.2
NCM 20 μ l	73.6 \pm 9.2

Value: mean \pm standard deviation

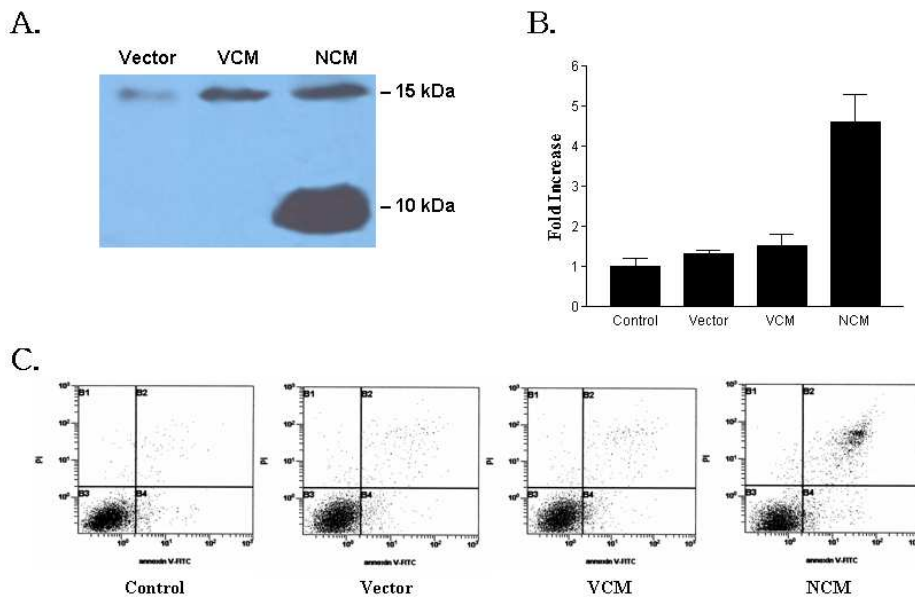


Fig. 4. Recombinant NAG-1 induces apoptosis in AMC-HN5 cells. A. Western blot analysis of vector medium (Vector), VCM and NCM. In 5 μ l of concentrated NCM, approximately 10 kDa-sized recombinant NAG-1 protein is observed. However, in vector medium and VCM, the recombinant NAG-1 is not detected. B. Bar graph showing fold increase of apoptosis. AMC-HN5 cells were treated with DMSO (control), vector medium, VCM, and NCM (1:10, conditioned medium: culture medium), respectively, and apoptosis was examined by flow cytometry. In vector medium- and VCM-treated cells, the increase of apoptosis is not observed compared with DMSO-treated cells. NCM induces 4.6-fold increase of apoptosis as compared with DMSO. C. Dot plots of DMSO-, vector medium-, VCM-, and NCM-treated AMC-HN5 cells. The figures shown are representative of three independent experiments.

4. 사람 정상 코점막 상피세포에서 비스테로이드성 소염제에 의한 *NAG-1* 유도와 세포고사

사람 정상 코점막 상피세포에 대해 indomethacin, diclofenac, sulindac sulfide, aceclofenac 등의 비스테로이드성 소염제를 AMC-HN5 세포주와 동일하게 100 μ M의 농도로 48시간 동안 첨가배양한 후 *NAG-1*의 발현과 세포고사를 관찰하였다. 결과로 여러 비스테로이드성 소염제에 의한 *NAG-1* 유도는 대조군과 비교하여 diclofenac (1.1 ± 0.4 배), indomethacin (0.9 ± 0.3 배), aceclofenac (0.8 ± 0.2 배), sulindac sulfide (0.7 ± 0.2 배) 등의 결과를 보여, 비스테로이드성 소염제에 의해 *NAG-1*이 유도되지 않는 것을 알 수 있었다(Fig. 5A).

비스테로이드성 소염제에 의한 세포고사 증가율은 대조군과 비교하여 diclofenac (1.3 ± 0.3), sulindac sulfide (1.0 ± 0.2), indomethacin (0.9 ± 0.3), aceclofenac (0.8 ± 0.1) 등의 결과로 나와, 사람 정상 코점막 상피세포에서는 비스테로이드성 소염제에 의해 세포고사가 증가하지 않았다(Fig. 5B, C).

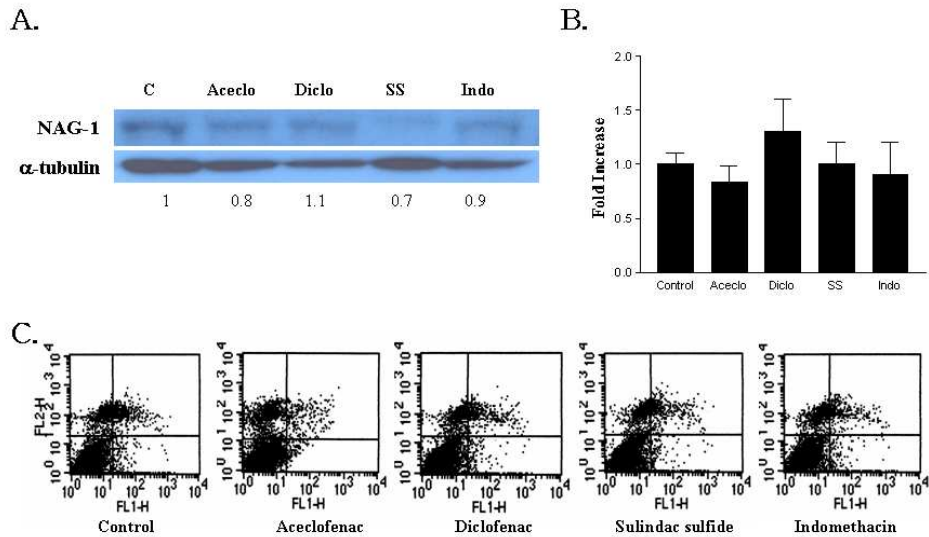


Fig. 5. Induction of NAG-1 and apoptosis by various NSAIDs in normal human nasal epithelial cells. Normal human nasal epithelial cells were treated separately with 100 μ M of aceclofenac (Aceclo), diclofenac (Diclo), sulindac sulfide (SS), and indomethacin (Indo) for 48 hours. The expression of NAG-1 was examined by Western blot analysis and apoptosis was investigated by flow cytometry using Annexin V-FITC and propidium iodide (PI). NAG-1 expression was normalized to the level to α -tubulin expression and is reported as a ratio of NAG-1 to α -tubulin. Apoptosis is represented by the fold increase in the percentage of apoptotic population compared to the control. A. In Western blot analysis, any NSAID doesn't induce NAG-1 expression. B. In flow cytometry, all NSAIDs don't induce apoptosis. C. Dot plots of DMSO- and NSAIDs-treated normal human nasal epithelial cells. X-axis represents Annexin V-FITC and y-axis represents PI. The figures shown are representative of three independent experiments.

5. 사람 정상 코점막 상피세포에서 NAG-1 단백질에 의한 세포고사

사람 정상 코점막 상피세포에서 NAG-1 단백질에 의한 세포고사 여부를 확인하기 위해 농축된 vector medium, VCM, NCM 등을 AMC-HN5 세포주와 동일하게 1:10의 농도로 24시간 동안 첨가배양한 후 flow cytometry 분석을 시행하였다. 대조군과 비교한 세포고사 증가율은 vector medium (0.9 ± 0.3), VCM (0.9 ± 0.2), NCM (1.0 ± 0.4)로 나와, NAG-1 단백질에 의해 세포고사가 증가하지 않는 것을 확인하였다(Fig. 6).

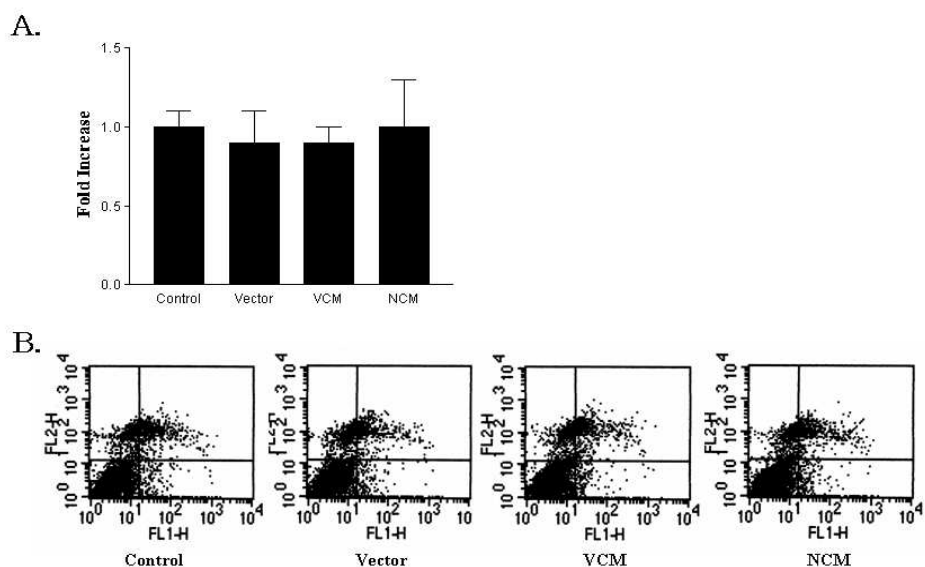


Fig. 6. Recombinant NAG-1 doesn't induce apoptosis in normal human nasal epithelial cells. A. Bar graph showing fold increase of apoptosis. Normal human nasal epithelial cells were treated with DMSO (control), vector medium (Vector), VCM, and NCM (1:10, conditioned medium: culture medium), respectively, and apoptosis was examined by flow cytometry. In vector medium-, VCM-, and NCM-treated cells, the increase of apoptosis is not observed compared with the control. B. Dot plots of DMSO-, vector medium-, VCM-, and NCM-treated normal human nasal epithelial cells. The figures shown are representative of three independent experiments.

6. *Nude mice*에서 *indomethacin*에 의한 항종양효과

*Nude mice*에 AMC-HN5 세포를 이종이식한 후 *indomethacin*을 투여하여 항종양 효과를 알아보았다. 결과로 두 군 모두 실험 기간 중 사망한 생쥐는 없었으며, 실험 전후 생쥐의 몸무게는 대조군의 경우 실험 전 24.7 ± 1.7 g에서 희생 시 27.2 ± 2.2 g였고, *indomethacin* 투여군의 경우 실험 전 24.6 ± 1.5 g에서 희생 시 27.4 ± 1.4 g으로 두 군 간에 유의한 차이는 없었다. 음용수의 양은 대조군에서 마리당 하루 4.2 ± 0.2 ml, 실험군에서 마리당 하루 4.1 ± 0.1 ml으로, 두 군 간에 유의한 차이를 보이지 않았다.

대조군의 종양크기는 1주(11.5 ± 3.3 mm³), 2주(52.0 ± 23.2 mm³), 3주(66.5 ± 35.7 mm³), 4주(205.4 ± 63.1 mm³), 5주(440.3 ± 105.2 mm³), 6주(639.1 ± 280.7 mm³), 7주(831.9 ± 384.5 mm³)였다. *Indomethacin* 투여군의 경우 종양의 크기는 1주(7.7 ± 4.1 mm³), 2주(19.5 ± 8.8 mm³), 3주(26.0 ± 12.1 mm³), 4주(33.6 ± 22.4 mm³), 5주(64.1 ± 32.7 mm³), 6주(108.1 ± 50.6 mm³), 7주(160.7 ± 71.8 mm³)으로, 4주째부터 대조군과 비교하여 유의하게 종양의 크기가 억제되었다($p < 0.05$)(Fig. 7).

A.



B.

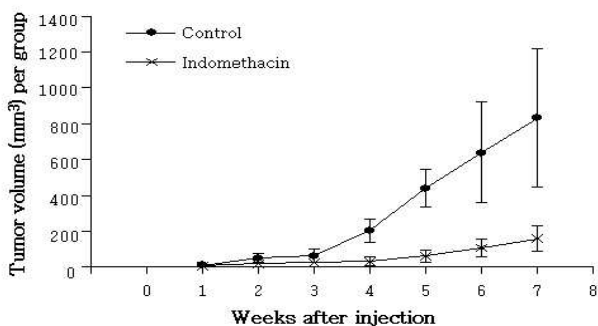


Fig. 7. Antitumorigenic activity of indomethacin in nude mice. AMC-HN5 cells (10^7 cells) were inoculated subcutaneously in *BALB/c-nu* nude mice. Tumors were measured externally on the indicated days in two dimensions using calipers. Values are the mean \pm standard deviation of $n = 20$ xenografts. In control group (Control), mice drank distilled water without indomethacin, but in indomethacin-treated group (Indomethacin), mice drank indomethacin-treated water as a dose of 2 mg/kg/day. A. Photos showing the tumors in control group and indomethacin-treated group. In indomethacin-treated group, the size of tumors are smaller than the control group. B. Graph on the size of tumors. From the 4th week after the treatment with indomethacin, the size of tumors is significantly reduced compared with that of the control ($p < 0.05$). The figures shown are representative of two independent experiments.

IV. 고 찰

사람 상악동암 세포주에서 비스테로이드성 소염제에 의한 세포고사와 NAG-1 유도를 알아보기 위해 indomethacin, diclofenac, aceclofenac, sulindac sulfide 등을 투여한 결과 indomethacin이 가장 강력하게 NAG-1을 유도하며 세포고사를 유도하였다. 이 결과로 indomethacin에 의해 세포고사가 일어나며 NAG-1 유도와 세포고사가 연관성이 있음을 알 수 있었다. 다음 단계로 indomethacin에 의해 유도된 NAG-1이 세포고사를 야기하는 가를 알기 위해 indomethacin 투여 농도와 시간에 따른 NAG-1과 세포고사의 유도를 알아보았다. 결과 상 indomethacin 투여 농도와 시간에 의존하여 NAG-1과 세포고사가 유도되었으며, NAG-1은 indomethacin 투여 12시간째에 유도되었고 세포고사는 indomethacin 투여 24시간째 유도되어 NAG-1의 유도가 세포고사에 선행함을 알 수 있었다. 이와 같은 비스테로이드성 소염제에 의한 세포고사는 대장암 세포, 폐암 세포, 전립선암 세포와 구강암종 세포 등에서도 관찰되나 세포주에 따라 NAG-1을 가장 많이 유도하는 비스테로이드성 소염제는 상이하다.⁴ 즉, 대장암종 세포주의 경우 sulindac sulfide가 가장 강력하게 NAG-1을 유도하지만 구강암종 세포주의 경우 diclofenac이 NAG-1을 가장 많이 유도하며 유방암종 세포주의 경우 5F-203이 NAG-1을 강하게 유도하여 상악동암 세포주와는 상이한 결과를 보인다.^{3,12,13} 이처럼 NAG-1이 세포에 따라 유도에 차이를 보이는 이유로는 각 소염제가 각 세포에서 세포특이 반응(cell-specific reaction)을 일으키는 것으로 생각한다. 이러한 세포특이 반응은 NAG-1의 조절 측면에서 설명할 수 있는데, NAG-1의 조절은 전사 기전(transcriptional mechanism)과 전사 후 기전(post-transcriptional mechanism)을 포함하는 복잡한 기전으로 이루어진다. Promoter sequence에서 *cis-* 와 *trans-acting* promoter elements에 의해 조절되고 여러 전사인자와 다양한 기전으로 조절되며 여러 항종양 물질에 의해서도 조절되는 양상을 보인다. NAG-1은 암억제 경로인 p53, ERG-1, AKT/GSK-3 등의 중요한 하위경로(down stream pathway)이다.^{4,14} 즉, NAG-1의 유도에 대해서는 세포

나 유도물질에 따라 조절 기능이 상이하므로 상악동암 세포주에서 indomethacin에 의한 NAG-1 유도가 어떠한 기전으로 조절되는가에 대해 추가 연구가 필요하다고 본다.

한편 indomethacin은 COX-1, 2를 모두 억제하는 비스테로이드성 소염제로 이러한 세포고사 유도에 NAG-1의 작용 이외에 기존에 알려진 COX-2 억제에 의한 세포고사 가능성도 배제할 수 없다. 그러나 사람 전혈(whole blood) COX-1에 대한 IC₅₀이 0.19 μ M이고 COX-2에서는 0.44 μ M이다.¹⁵ 본 실험에 이용된 AMC-HN5 세포주도 COX-2를 발현하므로(data not shown), 만약 COX-2 억제에 의한 세포고사라면 indomethacin 1 μ M에서도 세포고사가 유도되어야 하지만 결과에서 보듯 이 농도에서는 세포고사가 유도되지 않으므로 indomethacin의 세포고사 유도작용이 COX-2 억제에 의한 가능성을 배제할 수 있다고 생각한다. 또한 사용한 비스테로이드성 소염제의 COX-2에 대한 IC₅₀이 사람 말초 단핵구(human peripheral monocyte)에서 indomethacin 0.31 μ M, diclofenac 0.026 μ M, sulindac sulfide 4 μ M, aceclofenac 0.8 μ M 등으로 diclofenac이 가장 강력하게 COX-2를 억제한다.¹⁶ 만약 COX-2에 의해 세포고사가 일어난다면 diclofenac이 가장 강력하게 세포고사를 유도해야 하지만 본 결과는 이와 다르게 IC₅₀이 높은, 즉 COX-2를 상대적으로 억제하지 못하는 indomethacin이 가장 강력하게 세포고사를 유도하였으므로 COX-2 억제에 의한 세포고사가 아닌 NAG-1 유도에 의한 것이라 하겠다. NAG-1 유도가 COX-1, 2 억제와 무관하게 일어난다는 것은 사람 대장암종 세포주인 HCT-116 세포에 COX-1과 2를 과발현시켜도 NAG-1 발현에는 영향을 미치지 않았다는 연구결과에서도 밝혀진 바 있다.¹⁷ 이러한 이유로 본 연구에서 indomethacin에 의한 세포고사는 COX-2 억제에 의한 세포고사와는 무관하다고 생각한다.

상기 실험으로 NAG-1과 세포고사의 관계가 명확해졌지만 직접적인 증거로는 미흡하므로 NAG-1 conditioned medium을 처치하여 세포고사 여부를 알아보았다. 유전자나 단백질에 의한 세포고사를 확인하는 방법으로 siRNA를 이용할 수도 있으나 siRNA는 전달감염 정도에 따라 결과가 상이할 수 있으며 siRNA는 유전자 선의 실험이므로

생성되는 최종 물질인 단백질 자체의 결과가 더욱 중요하다고 생각되어 conditioned medium으로 실험하였다.¹⁸ 세포에 대한 단백질의 영향을 보기 위해서는 순수 단백질(pure protein)을 만들어 실험하는 것이 가장 좋다고 생각한다. 이러한 목적으로 *pMT/V5-His A-NAG-1* plasmid를 만들어 histidine tag를 이용하여 magnetic bead로 분리하는 방법을 이용해 순수 단백질을 제조하여 예비실험을 하였다. 그러나 이 순수 단백질은 Western blot 상 NAG-1을 잘 표현하나 기존 연구에서 세포고사를 유발하는 것으로 알려진 사람 대장암세포에 대한 실험 상 세포고사능이 결여되었다(data not shown). 추측하는 이유로 제조과정 중 NAG-1 단백질의 3차원적 구성 변화가 일어났으리라 생각하나 확실한 이유는 알 수 없었다. 이런 이유로 순수 단백질을 사용하지 못하고 conditioned medium으로 실험하였다. 결과상 vector medium이나 VCM에 의해서는 세포고사가 일어나지 않았으나 NCM에 의해서는 유의하게 세포고사가 유도되어 NAG-1에 의해 직접적으로 세포고사가 유도되며 NAG-1이 상악동암 세포주에 대해 전세포고사능(proapoptotic activity)이 있음을 알 수 있었다.

암억제제 혹은 항암제의 조건 중 정상세포에 대한 안정성이 중요하다. 즉, 가능하면 암세포나 전암세포에만 작용하고 정상세포에는 영향을 주지 않는 조건이 중요하다 하겠다. 이에 상악동암 세포주에 세포고사를 유도하는 indomethacin이 사람 정상 코점막 상피세포에 어떠한 영향을 주는가를 관찰하였다. 사람 정상 코점막 상피세포에 상악동암 세포주와 같은 조건인 100 μ M로 여러 비스테로이드성 소염제를 첨가배양한 경우에 모두가 NAG-1과 세포고사를 유도하지 않았으며, 암세포에서 세포고사를 유도하는 1:10의 농도로 NCM을 투여한 결과에서도 세포고사는 유도되지 않았다. 이러한 결과로 사용한 10 μ M의 indomethacin이 사람 정상 코점막 상피세포에 세포고사를 야기하지 않는 안전한 약제와 농도임을 알 수 있었다.

다음 단계로 indomethacin에 의한 항종양능(antitumor activity)을 알아보려고 하였다. 결과 상 2 mg/kg/day의 용량으로 indomethacin을 투여한 경우 4주째부터 종양의 부피가 유의하게 대조군보다 감소하여 indomethacin에 의한 항종양능을 확인할 수 있었다. 이러한 비

스테로이드성 소염제에 의한 항종양능은 대장암 세포주인 HCT-116 세포주, 유방암종 세포주인 MDA-435 세포주 등과 일치하는 결과였다.^{3,13} 비스테로이드성 소염제에 의한 NAG-1 유도과 이에 의한 항종양능은 NAG-1을 과발현하는 transgenic mice에서 입증되었는데, NAG-1 transgenic mice에 대장암을 유발하는 azoxymethane을 투여하여 본 결과 소장 폴립 수를 58% 감소시키고, 종양의 양(tumor load)을 60% 감소시켜 NAG-1의 항종양능이 입증되었다.¹⁹ 그러나 이러한 NAG-1의 항종양능에 대해서는 서로 다른 결과가 존재한다. NAG-1이 발현되면 항암작용과 항종양능에 의해 암 자체가 소멸되므로 암이 이미 발생한 암환자의 혈청이나 조직에서는 NAG-1 발현이 정상보다 적어야 한다. 그러나 대장암 환자의 혈청이나 위암이 진행된 점막하조직, 전립선암의 microarray 등의 결과를 보면 암에서 NAG-1의 발현이 오히려 증가되어 세포나 쥐에서의 실험 결과와는 상이한 결과를 보인다.²⁰⁻²² 이에 대한 해석으로 NAG-1은 정상세포나 암의 초기 단계에서는 암을 억제하는 항암작용과 항종양능을 보이지만, 진행된 암이나 암으로의 형질변화가 된 상태에서는 오히려 암의 침습성을 증가하게 하며 생존율을 저하시키는 역할을 하는 것으로 생각하나, 아직 NAG-1의 발현과 기능의 변화에 대해서는 밝혀진 것이 미미하고 각 세포에 따라서 작용도 상이하므로 이에 대한 추가 연구가 필요하다고 본다.

Indomethacin은 강직성 척추염, 어깨 윤회낭염, 통풍, 골관절염, 힘줄염, 류마티스성 관절염 등에 사용하는 비스테로이드성 소염제로 구강이나 좌약으로 사용할 경우 성인 용량이 일일 최대 200 mg이고 소아 용량이 2 mg/kg/day이다.^{23,24} 본 실험에서 2 mg/kg/day를 선택하였는데 이 용량은 소아의 염증 질환이 있는 경우 사용하는 용량으로 비교적 안전한 용량이므로 이 용량을 선택하였다. 이 용량으로 투여할 경우 최대 혈중 농도는 약 1 µg/ml로 이를 Mole로 환산하면 약 2.8 µM로 세포실험에서 보다는 낮은 농도이다. 즉, 세포실험에 사용한 용량보다도 낮은 용량에서 항종양능이 가능하므로 indomethacin 75 mg을 복용 시 최대 혈중농도가 평균 7.6 µM이 된다는 보고를 참조할 때 indomethacin을 고위험도 반전성 유두종에서 사용할 경우 암억제

제로 사용될 가능성이 있다 하겠다.²⁵ Indomethacin의 부작용으로 복통, 설사, 구역과 구토 등의 위장관 장애와 어지러움증, 두통 등의 신경질환과 우울증, 피로 등이 알려져 있다.²⁶ 본 실험에서 indomethacin 투여군이나 대조군 중 사망한 생쥐는 관찰되지 않았고 실험을 종료한 다음 시험적으로 부검하였으나 위장관 출혈이나 특이 사항은 보이지 않아 2 mg/kg/day의 용량이 안전함을 알 수 있었다. 그러나 이를 인체에 사용할 경우는 심혈관질환, 위장관질환, 혈액질환, 간질환, 신경질환, 정신질환 등이 있는 환자에서는 심각한 부작용을 야기할 수 있으므로 환자에 대해 세심한 관찰이 필요하다.²⁶

본 연구의 결과로 상악동암 세포주에서 indomethacin이 NAG-1을 유도하며 이 NAG-1에 의해 세포고사가 일어나 NAG-1이 전세포고사능을 보이는 것을 알 수 있었다. 또한 정상 코점막 상피세포에는 세포고사를 유도하지 않으며 생체실험에서 항종양능이 있음을 알 수 있었다. 그러나 본 연구에서 사용한 비스테로이드성 소염제가 기존 연구에서 NAG-1을 유도하는 것으로 알려진 소염제를 대상으로 하였지만 최근 개발된 소염제가 배제되어 본 실험의 단점으로 생각한다. 임상연구 중인 5F-203의 경우 유방암종 세포주인 MCF-7 세포주에서 0.1 μ M에서 NAG-1을 유도하여 세포고사를 유도하는 약제로 현재까지 개발된 약제 중 가장 낮은 농도에서 NAG-1을 유도한다.¹³ 향후 이러한 신개발 소염제에 대한 상악동암에서의 연구가 필요하리라 생각하며, 고위험도 반전성 유두종 환자에 대한 암예방제로서의 임상실험이 필요하리라 생각한다.

V. 결 론

비스테로이드성 소염제인 indomethacin은 상악동염종에서 NAG-1을 유도하여 항염효과와 항종양효과를 보이며 정상 코점막세포에 영향을 주지 않아 안전하고 유용한 암억제제로서의 가능성을 보인다 하겠다.

참 고 문 헌

1. Half EE, Arber N. Chemoprevention of colorectal cancer: two steps forward, one step back? *Future Oncol* 2006;2(6):697-704.
2. Reddy BS, Hirose Y, Lubet R, Steele V, Kelloff G, Paulson S, et al. Chemoprevention of colon cancer by specific cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, administered during different stages of carcinogenesis. *Cancer Res* 2000;60:293-7.
3. Baek SJ, Kim KS, Nixon JB, Wilson LC, Eling TE. Cyclooxygenase inhibitors regulate the expression of a TGF-beta superfamily member that has proapoptotic and antitumorigenic activities. *Mol Pharmacol* 2001;59:901-8.
4. Eling TE, Baek SJ, Shim M, Lee CH. NSAID activated gene (NAG-1), a modulator of tumorigenesis. *J Biochem Mol Biol* 2006;39(6):649-55.
5. Bootcov 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;94:11514-9.
6. Detmer K, Russell PK, Wu WM, Moore AG, Zhang HP, Brown PK, et al. Epitope mapping of the transforming growth factor-beta superfamily protein, macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1): identification of at least five distinct epitope specificities. *Biochemistry* 2001;40:65-73.
7. 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;305:1388-98.
8. Fan GK, Imanaka M, Yang B, Takenaka H. Characteristics of nasal inverted papilloma and its malignant transformation: a study of cell proliferation and programmed cell death. *Am J Rhinol*

2006;20(3):360-3.

9. Katori H, Nozawa A, Tsukuda M. Increased expression of matrix metalloproteinase-2 and 9 and human papilloma virus infection are associated with malignant transformation of sinonasal inverted papilloma. *J Surg Oncol* 2006;93(1):80-5.

10. Katori H, Nozawa A, Tsukuda M. Markers of malignant transformation of sinonasal inverted papilloma. *Eur J Surg Oncol* 2005;31(8):905-11.

11. Kim KS, Shin JH, Baek SJ, Yoon JH. Expression of non-steroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1 in human nasal mucosa and cultured nasal epithelial cells: a preliminary investigation. *Acta Otolaryngol* 2003;123:857-61.

12. Kim KS, Yoon JH, Kim JK, Baek SJ, Eling TE, Lee WJ, et al. Cyclooxygenase inhibitors induce apoptosis in oral cavity cancer cells by increased expression of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325:1298-303.

13. Martinez JM, Sali T, Okazaki R, Anna C, Hollingshead M, Hose C, et al. Drug-induced expression of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene/macrophage inhibitory cytokine-1/prostate-derived factor, a putative tumor suppressor, inhibits tumor growth. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;318(2):899-906.

14. Baek SJ, Eling TE. Changes in gene expression contribute to cancer prevention by COX inhibitors. *Prog Lipid Res* 2006;45(1):1-16.

15. Chan CC, Boyce S, Brideau C, Charleson S, Cromlish W, Ethier D, et al. Rofecoxib [Vioxx, MK-0966; 4-(4'-methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2-(5H)-furonone]: a potent and orally active cyclooxygenase-2 inhibitor. pharmacological and biochemical profiles. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;290(2):551-60.

16. Kato M, Nishida S, Kitasato H, Sakata N, Kawai S.

Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: investigation using human peripheral monocytes. *J Pharm Pharmacol* 2001;52(12):1679-85.

17. Baek SJ, Wilson LC, Lee CH, Eling TE. Dual function of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): inhibition of cyclooxygenase and induction of NSAID-activated gene. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301(3):1126-31.

18. Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, Haraguchi T, Ohki-Hamazaki H, Juni A, et al. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Res* 2004;32(3):936-48.

19. Baek SJ, Okazaki R, Lee SH, Martinez J, Kim JS, Yamaguchi K, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1 over expression in transgenic mice suppresses intestinal neoplasia. *Gastroenterology* 2006;131(5):1553-60.

20. Brown DA, Ward RL, Buckhaults P, Lie T, Romans KE, Hawkins NJ. MIC-1 serum level and genotype: associations with progress and prognosis of colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:2642-50.

21. 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.

22. Welsh JB, Sapinoso LM, Su AI, Kern SG, Wang-Rodriguez J, Moskaluk CA, et al. Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. *Cancer Res* 2001;61:5974-8.

23. Alvan G, Orme M, Bertilsson L, Ekstrand R, Palmer L. Pharmacokinetics of indomethacin. *Clin Pharmacol Ther* 1975;18(3):364-73.

24. Duggan DE, Hogans AF, Kean KC, McMahon FG. The

metabolism of indomethacin in man. *J Pharmacol Exp Ther* 1972;181(3):563-75.

25. Skinhoj A, Bechgaard H, Chasseaud LF, Brodie RR, Sharman JM, Taylor T, et al. The influence of food and repeated dosing on the bioavailability of indomethacin from a multiple-units controlled-release formulation. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol.* 1984;22(10):557-61.

26. Production information: Indocin(R), indomethacin. Merck & CO., Inc, Westpoint, PA, 1999

Abstract

Difference in the induction of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) and apoptosis between normal human nasal epithelial cells and sinonasal cancer cells

Kwang-Hyeon Rhee

Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Kyung-Su Kim)

A major effort on chemoprevention has been devoted by the medical community to determine the feasibility of using nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) through the inhibition of the cyclooxygenase-2 (COX-2). Recently this anti-cancer effect of COX-2 was noted in COX-2-devoid cells and nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) is found as one of genes which is induced by NSAIDs and has proapoptotic and anti-tumorigenic activities. However, it has not been determined whether NSAIDs has an anti-cancer effect on sinonasal cancer. Therefore, the purpose of this study was to investigate whether NSAIDs induce apoptosis in sinonasal cancer cells and, if so, whether NAG-1 induced by NSAIDs is directly linked to this apoptosis. Also, the effect of NSAIDs on normal human nasal epithelial cells was examined to check their safety. Finally, the *in vivo* anti-tumorigenic activity of NSAID on mice was investigated to use the NSAID as a possible chemopreventive agent. AMC-HN5 human sinonasal carcinoma cell line was used.

NAG-1 expression was increased by indomethacin, diclofenac, aceclofenac and sulindac sulfide, in the order of NAG-1 induction. Indomethacin was the most effective NAG-1 inducer. Incubation with indomethacin induced NAG-1 in a time- and dose-dependent manner. The expression of NAG-1 was observed in advance of the induction of apoptosis. Conditioned medium from NAG-1-overexpressing *Drosophila* cells inhibited the growth of sinonasal cancer cells and induced apoptosis. However, in normal human nasal epithelial cells, NSAIDs and conditioned medium from NAG-1-overexpressing *Drosophila* cells couldn't induce apoptosis and NAG-1. Xenograft tumors of AMC-HN5 cells in indomethacin-treated nude mice showed reduced volume from 4th week after breeding compared with that in the control mice. In conclusion, indomethacin showed the anti-cancer and anti-tumorigenic effect in sinonasal cancer cells by inducing NAG-1 and can be considered as a effective and safe chemopreventive agent against sinonasal cancer.

Key Words : nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene,
sinonasal cancer, apoptosis, chemoprevention