

인유두종 바이러스와
사이클로옥시저네이즈-2 발현에 따른
자궁경부암 세포주의 생물학적 특성 비교

연세대학교 대학원

의 학 과

정 은 지

인유두종 바이러스와
사이클로옥시저네이즈-2 발현에 따른
자궁경부암 세포주의 생물학적 특성 비교

지도교수 김 귀 언

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2003년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

정 은 지

정은지의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2003년 12월 일

감사의 글

부족한 저를 사랑으로 인도해 주시는 하나님께 감사를 드립니다. 실험을 계획하고 진행해 나가면서 어려움이 많았습니다만 많은 분들이 사랑으로 도와주셔서 무사히 논문을 완성하게 되었습니다. 논문이 나오기까지 여러 모양으로 도와 주신 분들의 배려와 후원에 진심으로 감사를 드립니다. 전공의 시절부터 지금까지 한결같이 격려해주시고 부족한 논문을 잘 지도해주신 김귀언 교수님께 마음 다해 감사를 드립니다. 논문의 연구 방향과 문제점에 대해 조언해 주신 김주향, 안용호, 양우익, 최은창 교수님께도 진심으로 감사를 드립니다. 그리고 바쁜 시간을 쪼개어 실험 진행을 세심하게 도와주신 라선영, 김태수 선생님께 참으로 고맙다는 인사를 드립니다. 항상 격려해주신 방사선종양학 교실의 서창옥 주임교수님과 모든 교수님들께도 감사를 드리며, 부족한 저를 사랑해 주시고 협조를 아끼지 않으신 일산병원 방사선종양학과 여러분께도 고마움을 표하고 싶습니다.

언제나 저를 위해 기도해 주시고 사랑과 이해로 도와주시는 고마우신 부모님, 늘 저를 믿어주며 사랑의 조언과 따스한 격려를 아끼지 않는 사랑하는 남편 고경백, 그리고 믿음 안에서 씩씩하고 아름답게 잘 자라나는 아들 민성과 현성에게 이 논문을 드립니다.

저 자 씬

차 례

국문요약	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	5
1. 자궁경부암 세포주에서 HPV 감염 및 COX-2 발현도 조사	5
가. 세포 배양	5
나. DNA chip을 이용한 세포주의 HPV 아형 검사	6
다. Western blot 방법으로 COX-2 발현 측정	6
(1) Total cell lysate 추출	6
(2) Western blot	6
2. 세포주의 생물학적 특성 조사	7
가. 세포 성장 곡선	7
나. Soft agar assay를 이용한 생체의 집락 형성능 비교	7
다. Gelatin zymography를 이용한 MMP-2 발현도 측정	7
(1) 양성 대조 세포주와 conditioned media 추출 및 농축	7
(2) Total cell lysate 추출	7
(3) Gelatin zymography	8
라. Boyden chamber assay를 이용한 세포 이동능 측정	8
3. 세포주의 항암제 및 방사선 감수성-세포독성 실험	9
가. 약제	9
나. 방사선	9
다. 세포독성 실험(MTT assay)	9

4. cDNA microarray를 이용한 세포주의 유전자 발현 검사	10
가. RNA 분리	10
나. Probe 준비	10
다. Hybridization of fluorescence-labeled cDNA	11
라. Data 분석	11
III. 결 과	12
1. 자궁경부암 세포주의 HPV 아형 감염 및 COX-2 발현	12
가. DNA chip을 이용한 세포주의 HPV 아형	12
나. Western blot 방법으로 측정된 COX-2 발현	12
2. 세포주의 생물학적 특성	12
가. 세포 성장 곡선 및 배가 시간	12
나. Soft agar assay를 이용한 생체의 집락 형성능	13
다. Gelatin zymography를 이용한 MMP-2 발현	14
라. Boyden chamber assay를 이용한 세포 이동능	15
3. MTT assay를 이용한 항암제 및 방사선 감수성	15
가. 항암제를 이용한 MTT assay	15
나. 방사선을 이용한 MTT assay	16
4. cDNA microarray를 이용한 세포주의 유전자 발현	18
IV. 고 찰	20
V. 결 론	25
참고문헌	26
영문요약	31

그림 차례

그림 1.	DNA chip을 이용한 자궁경부암 세포주의 HPV 아형 검사	12
그림 2.	Western blot법으로 자궁경부암 세포주의 COX-2 발현 측정	13
그림 3.	자궁경부암 세포주의 성장 곡선	13
그림 4.	자궁경부암 세포주에서 soft agar assay를 이용한 생체의 집락 형성능 비교	14
그림 5.	자궁경부암 세포주에서 gelatin zymography를 이용한 MMP-2 발현 측정	14
그림 6.	자궁경부암 세포주에서 Boyden chamber assay를 이용한 세포 이동능 비교	15
그림 7.	자궁경부암 세포주에서 항암제에 대한 MTT assay	16
그림 8.	자궁경부암 세포주에서 방사선에 대한 MTT assay	16
그림 9.	자궁경부암 세포주의 17k cDNA microarray hierarchical clustering	17
그림 10.	C33A 세포주에 특이한 유전자 분포	18
그림 11.	C33A 세포주에 특이한 유전자만을 대상으로 한 hierarchical clustering	19

표 차 례

표 1. 자궁경부암 세포주에서 항암제에 대한 MTT assay 상 IC_{50}	15
표 2. 자궁경부암 세포주에서 방사선에 대한 MTT assay 상 IC_{50}	17
표 3. cDNA microarray 상 C33A 세포주에 유의한 유전자	19

국문요약

인유두종 바이러스와 사이클로옥시제네이스-2 발현에 따른 자궁경부암 세포주의 생물학적 특성 비교

자궁경부암의 원인은 인유두종 바이러스(human papillomavirus: HPV)로 알려져 있고, 여러 연구에서 cyclooxygenase-2 (COX-2)는 대장암 등 여러 암종에서 발암, 혈관 신생, 종양 침윤, 전이나 아포토시스 과정 등에 관여하는 중요한 인자로, 또는 예후인자로 활발히 연구되며, 선택적 COX-2 저해제를 대장암의 예방제로서 사용하려는 시도들도 있는 등 종양과 관련하여 COX-2에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있다. 최근 COX-2 과발현을 보이는 자궁경부암의 임상 결과가 불량한 것으로 보고되므로 자궁경부암에서 COX-2의 발현 기전과 COX-2 과발현이 어떤 생물학적 특성을 가지는지에 대해 관심을 가지게 되었다. 본 연구에서는 몇가지 자궁경부암 세포주에서 HPV 및 COX-2와 관련하여 생물학적 성질 및 항암제와 방사선에 대한 민감도를 조사하고자 하였다. 먼저 HPV 아형 감염 및 COX-2 발현도를 조사하여 이에 따라 세포주를 분류하고 세포주들의 몇가지 생물학적 특성들을 파악하였으며 항암제 및 방사선에 대한 종양 세포의 반응도를 조사하여 생물학적 특성과 비교하였고, Human cDNA microarray를 시행하여 세포주 간에 유전자 발현에 차이가 있는지, COX-2와 관련된 특이 유전자의 발현 양상에 변화가 있는지를 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. DNA chip을 이용하여 4가지 세포주의 인유두종 바이러스 아형을 확인한 결과 HeLa는 HPV 18 양성, SiHa와 CaSki는 HPV 16 양성이었으며 C33A는 HPV 음성이었다.

2. 각 세포주의 COX-2 발현을 조사한 결과 HPV 양성인 HeLa, SiHa, CaSki 세포주에서는 COX-2 발현이 양성이었으나 HPV 음성인 C33A 세포주에서는 COX-2 발현이 전혀 없었다.

3. 이를 토대로 세포주들을 HPV 및 COX-2에 양성, 음성으로 분류하여 종양 세포의 생물학적 특성과 차이를 비교하였다. 종양의 배가 시간과 세포의 이동능에서는 차이가 없이 비슷하였으나, 생체의 집락 형성능(colony forming activity)에서는 차이를 보였다. HeLa, SiHa, CaSki 등 HPV 및 COX-2 양성인 세포주에서는 집락이 형성되었으나 HPV 및 COX-2 음성인 C33A 세포주에서는 집락이 형성되지 않았으며, MMP-2 발현

에서도 HPV 및 COX-2 양성인 3가지 세포주에서는 MMP-2 (matrix metalloproteinase) 발현이 양성이었으나 C33A 세포주는 음성이었다.

4. 각 세포주에 대해 cisplatin과 5-FU 두 가지 항암제 처리와 방사선조사를 시행하여 MTT assay를 시행하였을 때 HPV 및 COX-2 발현 양성인 세포주와 비교하여 음성인 C33A 세포주에서 항암제 투여에 가장 민감하게 세포의 생존이 감소하였고, 방사선조사에 대해서도 가장 민감하게 세포 성장이 지연됨을 확인하였다.

5. cDNA microarray로 각 세포주에서 유의하게 발현하는 유전자군을 분석한 결과 HPV와 COX-2에 음성인 C33A 세포주는 나머지 3개의 세포주와 다른 가지로 분류됨을 관찰하였으며, C33A에 특이하게 발현되는 유전자는 기능이 다양하였으나 COX-2 신호 전달 과정과 관련하여서는 EGF (epidermal growth factor), EGFR (epidermal growth factor receptor) 및 MAPK (mitogen-activated protein kinase), ras oncogene family에 속하는 RAB 유전자 발현이 감소되어 있었고, 종양의 침습성과 관련 있는 MMP-2의 발현도 감소되어 있었으며, 반대로 전이 억제와 관련된 cadherin-18은 과발현되어 있었다.

이상의 결과를 요약하면 HPV와 COX-2 음성인 C33A 자궁 경부암 세포주에 비해 HPV 및 COX-2 양성인 자궁경부암 세포주들은 종양의 세포외 집락 형성능과 침윤성이 더 강하고 항암제나 방사선에 잘 반응하지 않는 공격적인 생물학적 특성을 가진다는 사실을 확인하였으며 이는 향후 자궁경부암의 예방, 진단, 및 치료에서 COX-2와 관련된 다양한 연구를 시행하는데 기초 자료로 유용하게 사용될 수 있으리라 생각한다.

핵심되는 말: 자궁경부암, 인유두종 바이러스, 사이클로옥시제네이스-2 (COX-2)

인유두종 바이러스와 사이클로옥시제네이스-2 발현에 따른
자궁경부암 세포주의 생물학적 특성 비교

<지도교수 김 귀 언>

연세대학교 대학원 의학과

정 은 지

I. 서 론

우리나라에서 자궁경부암의 발생률이 점차 감소하고 있지만 2002년도에 보고된 한국 중앙 암등록 사업 보고서에 의하면¹ 2001년도 한국 여성암 발병은 유방암, 위암, 대장암, 자궁경부암 순위로 침윤성 자궁경부암은 여성암 중 10.1%를 차지하며 네번째 호발암이었고, 자궁경부 상피내 암종을 포함하면 위암보다 많아 한국 여성에서 두번째 호발암이었다. 자궁경부암의 원인은 인유두종 바이러스(human papillomavirus: HPV)로 알려졌으며 침윤성 자궁경부암 환자의 85~98%에서 인유두종 바이러스가 발견되고 있으며 아형 중에는 16과 18이 가장 많이 감염되어 있고 18, 45, 31, 33, 35형 등의 순으로 보고되며 발현율은 인종간, 국가간에 차이가 많다.²⁻⁴ 고위험 인유두종 바이러스에 감염되면 바이러스 DNA 안에 존재하는 암단백인 E6/E7이 각각 암억제 유전자 p53과 Rb와 결합하여 암억제 기능을 파괴함으로써 자궁경부암을 유발하는 것이 주된 기전으로 알려져 있지만 인유두종 바이러스에 이환된 모든 여성에서 자궁경부 상피내 종양이나 자궁경부암이 발생하는 것은 아니므로 다양한 인자들이 복합적으로 관여하여 다단계의 발암 과정을 거치면서 침윤성 암으로 발전하는 것으로 생각된다.³⁻⁵ 인유두종 바이러스 유무와 아형이 예후인자인지에 대한 연구들이 많지만 대상 환자의 병기, 치료 방법들에 따라 다양한 결과들이 보고되므로 임상적인 의의를 명확히 판단하기는 어렵다.⁵⁻¹²

분자생물학의 급속한 발전으로 유전자, 단백질, 효소 등 다양한 분자와 물질들이 밝혀지고 있고 이들은 발암의 이해 뿐 아니라 진단 및 치료에도 이용되고 있다. COX-2는 대장암 등 여러 암종에서 발암, 혈관 신생, 전이나 아포토시스 과정 등에 관여하는 중요한 인자로, 또는 예후인자로 연구되며, 선택적 COX-2 저해제를 가족성 선종성 폴립증에서 사용하여

폴립의 수를 감소시킴으로 대장암의 발병을 감소시킬 수 있다는 보고도 있어 암예방 측면에서도 활발히 연구되면서 종양과 관련하여 COX-2에 관련된 연구들이 다양하게 진행되고 있다.¹²⁻²⁰ 자궁경부암에서도 COX-2가 유의한 예후인자로 여러 논문에서 보고되고 있는데²¹⁻²⁵ 다양한 치료 방법에 따라 임상 결과에 차이가 있지만, 종양의 면역조직화학 염색상 COX-2 과발현인 환자군에서 자궁외 조직 침윤, 혈관 및 림프관 침범이나 골반 림프절 전이가 많은 등 종양의 침습성이나 전이성이 높았으며, 추적시 국소 재발률이나 원격 전이율이 높아서 무병 생존율과 전체 생존율이 낮은 불량한 예후를 보였다. 종양의 생존 및 성장에는 종양 세포 스스로의 종양형성능(tumorigenesis)과 침윤성, 전이성 등의 침습성이 필요하여 아무리 종양 세포가 성장한다고 해도 침윤성이나 전이능이 없으면 악성 종양으로서의 특성을 가질 수 없다. 암의 침윤이나 전이, 신생혈관 형성 등에서 공통적으로 가장 중요한 과정이 세포외 기질(extracellular matrix)과 기저막(basement membrane)의 분해과정이며 높은 침윤력, 전이능을 보이는 암세포들에서는 특정 단백질 분해효소의 생산과 분비가 항진되어 있다는 사실이 확인되고 있다. COX-2는 종양의 침윤성, 신생혈관 형성이나 전이성과 연관된 기질 금속단백분해효소(matrix metalloproteinase; MMP)와도 밀접한 관련이 있다.^{12,14-18,26,27} 종양 세포나 주변 기질섬유 내에서 발견되는 기질 금속단백분해효소들은 현재까지 약 20여 가지 종류가 발견되고 있으며²⁶⁻³⁰ 특히 이동성을 가지는 암세포에 의한 기저막 성분 분해 능력 여부가 암 전이능과 관련이 깊다고 알려져 있다.^{29,30} COX-2는 기질 금속단백분해효소의 활성도를 증가시키며, 활성도가 증가된 MMP는 세포외 기질을 용해시키고 아포토시스를 억제하는 등 COX-2는 복잡한 종양의 생성 및 침윤, 전이 과정 중 여러 단계에서 MMP 등과 다양하게 작용한다.^{17,18} COX-2를 과발현하는 암종이 더 침습적이고, 전이를 잘 하는 공격적인 성향을 보이는데 아마도 종양 세포에 VEGF (vascular endothelial growth factor) 등의 혈관신생 인자(angiogenic factor)들이 다량 존재하거나, COX-2가 단백분해효소의 활성도를 증가시킴으로 종양의 침윤성이 높아져 예후가 불량해질 수도 있다고^{12,14-18} 생각되지만 향후 지속적인 연구로 COX-2가 과발현된 종양의 생물학적 특성들과 그 기전이 점차 밝혀질 전망이다. 자궁경부암에서도 COX-2가 과발현되는 종양에서 불량한 결과를 보이는 이유를 설명할 수 있는 인자들과 그 기전을 밝혀내는 연구들이 필요하다.

자궁경부암의 국소치료법의 하나인 방사선치료법이 발전하고 있지만 국소 진행된 자궁경부암에서 방사선치료 단독만으로는 국소제어율이나 생존율이 불량한 편이었는데 1990년대 후반 cisplatin을 기본으로 하는 항암화학요법을 방사선치료와 동시에 시행하여 방사선치료 단독에 비해 우수한 성적들이 발표된 후 현재는 국소 진행된 자궁경부암에서 동시 항암화학 방사선치료법이 표준치료로서 세계적으로 널리 시행되고 있다.³²⁻³⁴ 그러나 이런

결과에도 불구하고 자궁경부암에서 원인으로 알려진 HPV 감염이나 다른 여러 가지 인자들과 항암제와의 연관성이나 감수성 등에 대한 연구는 부족한 편이다.

최근 한 장의 슬라이드에 수천, 수만개의 cDNA를 점적(spotting)하여 동시에 대량으로 유전자의 발현 양상을 검사할 수 있는 cDNA microarray 기법이 발전하여 다양한 질환이나 암종에서 특이 유전자나 단백질을 분리, 규명하는 기능적 연구가 가능해지면서 유전자 진단 및 치료 등 의학적 분야에서 활발한 연구들이 진행되고 있다. cDNA microarray를 이용한 방법으로 종양의 형태학적 분류 뿐 아니라 분자생물학적인 분류 및 관련 인자나 유전자에 대해 심도있게 연구하여 임상적으로 이용할 수 있어서 본 연구에서도 자궁경부암 세포주들에서 특이 유전자를 찾기 위해 cDNA microarray를 시행하였다.

자궁경부암 세포주들의 생물학적 특성을 연구하기 위해 먼저 HPV 아형 감염 및 COX-2 발현도를 조사하였고, 이를 기준으로 세포주를 HPV와 COX-2 발현도에 따라 분류하고 세포 성장능 및 생체의 집락 형성능을 측정하고 자궁경부암의 침윤성, 전이능과 깊은 관련이 있다고 알려진 MMP-2 발현도와 세포 이동능을 실험하여 HPV 및 COX-2 양성과 음성인 세포주의 생물학적 성질을 알아보고자 하였다. 또한 각 세포주의 항암제 및 방사선에 대한 반응도를 비교 분석하여 HPV 감염 여부나 COX-2, MMP-2 발현도 등 세포주의 생물학적 특성과의 관련성을 확인하려고 하였으며, cDNA microarray를 시행하여 세포주에 따른 유전자의 발현에 유의한 차이가 있는지, COX-2와 관련된 특이 유전자 발현의 증가나 감소가 있는지 연구하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 자궁경부암 세포 주에서 HPV 감염 및 COX-2 발현도 조사

가. 세포 배양

본 실험에서는 ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, U.S.A)에서 구입한 4가지 인간 자궁경부암 세포주인 HeLa (ATCC CCL 2, adenocarcinoma), SiHa (ATCC HTB 35, squamous cell carcinoma), CaSki (ATCC CRL 1550, squamous cell carcinoma), C33A (ATCC HTB 31, squamous cell carcinoma)를 이용하였다. 기본배지로 CaSki 세포주는 RPMI 1640 배지 (GIBCO, Grand Island, U.S.A)를 사용하였고 나머지 세포주는 MEM 배지 (GIBCO)를 사용하였다. 기본배지에 56°C에서 30분간 비활성화된 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum; Omega Scientific Inc, Tarzana, CA, U.S.A), penicillin (100 U/ml; GIBCO)과 streptomycin (100µg/ml ;GIBCO)을 첨가하여 사용하였다. 5% CO₂의 존재 하에 37°C 항온 배양기에서 배양하며 주 2~3회 배지를 교환하였다. 세포의 형태

적 특징을 알아보기 위하여 광학현미경을 이용하여 세포 형태를 150배로 관찰 비교하였다.

나. DNA chip을 이용한 세포주의 HPV 아형 검사

각 세포주의 HPV 아형 검사는 (주)비아코어의 HPV DNA칩과 제시하는 방법에 따라 시행하였다. 약술하면, 각 세포주에서 DNA를 추출한 후 각각의 DNA를 general primer를 이용하여 PCR을 시행하고 5 μ l의 PCR 산물에 Cy-3 dCTP (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)를 random labeling하여 칩에 얹은 후 60°C에서 16시간 동안 보합작용을 시행하였다. 보합작용이 끝난 칩을 제시하는 방법에 따라 수세한 후 GenePix scanner (Axon Ins, Union City, CA, U.S.A)를 이용하여 스캔하고 결과를 얻었다.

다. Western blot 방법으로 COX-2 발현 측정

(1) Total cell lysate 추출: 75 cm² flask에 세포가 90~95% 정도 자라면 Trypsin-EDTA (GIBCO)를 처리하여 세포를 수확하고 PBS로 3차례 세척 후 lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0.5% NP-40, 2 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin, 1 mM PMSF (phenylmethyl sulfonyl fluoride)]를 넣었다. 이를 얼음 위에서 20분간 방치한 후 4°C 13,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 취하여 단백질을 정량하고 분주하여 -80°C에 보관하여 사용하였다.

(2) Western blot: 동량의 시료를 5X buffer [1 M Tris-HCl (pH 6.8), 10% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), 2-mercaptoethanol, 1% bromophenol blue, 50% glycerol, 증류수]와 섞어 10% SDS-PAGE acrylamide gel에 전압이 100 V로 4시간 동안 전기영동을 시행한 후 nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany)에 4°C, 140 V에서 1시간 동안 transfer하였다. Transfer된 membrane은 TBS-T (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.5% Tween20)에 5% skim milk (Becton Dickinson, Detroit, MI, U.S.A)가 포함된 용액을 이용하여 4°C에서 하루 동안 blocking한 후, TBS-T로 5분씩 두 번 세척하고 일차 항체 mouse anti-human monoclonal COX-2 (Cayman Chemical Co, Ann Arbor, MI, U.S.A)를 5% skim milk가 첨가된 TBS-T로 1 : 250으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. TBS-T로 10분씩 세 번 세척한 후 이차 항체 horseradish peroxidase conjugated anti-mouse immunoglobulin을 5% skim milk가 첨가된 TBS-T로 3,000배로 희석하여 실온에서 2시간 반응시켰다. 반응이 끝난면 TBS-T로 10분씩 세 번 세척하고 ECL Western detection kit (Amersham, Little Chalfont, UK)로 반응시켜 X-ray film에 감광 후 현상을 비교 분석하였다.

2. 세포주의 생물학적 특성 조사

가. 세포 성장 곡선

세포의 성장 경향을 알아보기 위하여 세포주들을 Trypsin-EDTA (GIBCO)로 처리하여 단일 부유 세포로 만든 뒤 10% FBS가 포함된 MEM 배지로 3회 세척 후 세포수를 측정하였다. 24 well culture plate에 10%의 FBS가 포함된 MEM 배지를 사용하여, 각각 10^6 /ml개의 세포를 분주하여 5% CO₂의 존재하에 37°C 항온 배양기에서 하루 동안 배양하였다. 분주 후 매 24 시간마다 400 μ l/well의 Trypsin-EDTA (GIBCO)를 첨가하여 단일 부유 세포로 만든 다음 영양배지로 세척 후 혈구 세포 측정기를 이용하여 세포수를 측정하여 세포 성장 곡선을 그렸다.

나. Soft agar assay를 이용한 생체의 집락 형성능(in-vitro colony forming activity) 비교

생체의 세포의 집락 형성능 측정을 위해서 soft agar assay를 시행하였다.³⁶ 먼저 agar (Bacto-agar; DIFCO, Detroit, MI, U.S.A) 1.2 g을 50 ml의 증류수에 용해시켜 멸균 소독하였다. 하층은 agar용액 25 ml에 56°C에서 30분간 비활성화된 20% 우태아 혈청(Omega)이 함유된 2배의 MEM 배지 (GIBCO) 25 ml 과 혼합하여 40°C 항온 수조에 보관하면서 용액을 1 ml씩 35 mm dish에 분주하여 고형화시켜 준비하였다. 각 세포주를 Trypsin-EDTA (GIBCO)로 처리하여 단일 부유 세포로 만든 뒤 영양 배지로 3회 세척 후 세포수를 측정하고, 10^3 개의 단일 부유 세포와 agar 용액과 혼합하여 2.5 ml의 용량으로 만든 다음 0.8 ml씩 각 dish (35 mm×35 mm)에 넣고 고형화시켰다. 집락수/투여 세포수의 백분비 (%)로 정하여 집락 형성능을 평가하였다. 3개의 dish를 1개군으로 하여 2일 간격으로 세포 집락수를 세었고, 세포 집락은 평균 백분비 \pm 표준 편차로 도식화하였다.

다. Gelatin zymography를 이용한 기질 금속단백분해효소-2 (matrix metalloproteinase-2: MMP-2) 발현도 측정

(1) 양성 대조 세포주와 conditioned media 추출 및 농축: 본 실험에서는 사람 섬유육종 세포주인 HT-1080 (ATCC CCL 121)를 MMP-2의 대조 세포주로 사용하였다. 75 cm² flask에 세포가 90% 정도 자라면 배양액을 제거하고 PBS로 2회 세척 후 무혈청 Opti-Media (GIBCO) 20 ml을 넣어 48시간 동안 배양하였다. 배양액을 모아 400 g에서 10분간 원심분리한 후 Centriprep centrifugal filter device (Millipore, Billerica, MA, U.S.A)를 이용하여 60배까지 농축하였다. Bradford (Bio-rad, Hercules, CA, U.S.A)법으로 단백질 정량 후 분주하여 -80°C에 보관하고 실험 시 사용하였다.

(2) Total cell lysate 추출: 75 cm² flask에 세포가 90% 정도 자라면 Trypsin-EDTA (GIBCO)를 처리하여 세포를 수확하고 PBS로 3차례 세척 후 Lysis buffer (0.2 M

Tris-HCl (pH 8.5), 0.14 M NaCl, 0.002 M MgCl₂, 0.5% Nonidet P-40)를 넣었다. 이를 얼음 위에서 5분간 방치한 다음 4°C 14,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 취하여 단백질 정량 후 분주하여 -80°C에 보관하였다.

(3) Gelatin zymography: 세포주와 조직에서 gelatin 활성을 관찰하기 위하여 gelatin zymography를 Lee 등³⁷의 방법으로 시행하였다. 단백질 정량 후 동량의 단백질을 가진 시료를 4배의 non-reducing sample buffer (0.5 M Tris-HCl, 10% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) 4 ml, 0.1% bromophenol blue, 0.5 ml glycerol, 2.0 ml 증류수)를 넣고 실온에서 10분간 반응시킨 뒤 0.1%의 gelatin이 포함된 precast 10% acrylamide gel (Novex, San Diego, CA, U.S.A)에서 얼음이나 냉장실에서 2시간 정도 전기영동을 시행하였다. 전기영동 후 gel를 2.5%의 Triton X-100에서 30분간 반응시켜 SDS를 제거한 다음 developing buffer (50 mM Tris-base, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.02% Brij, pH 7.6)에 넣어 37°C에서 18시간 동안 반응시켰고, 이때 반응 시간은 매 실험마다 일정하게 유지하였다. 반응이 끝난 gel를 Coomassie brilliant blue로 염색 후 methanol, acetic acid, 증류수를 각각 50 : 10 : 40로 혼합한 용액에서 탈색하여 gelatin이 녹아 밝게 나타나는 띠를 관찰하였다. Computer-assisted image analyzer (Bioprofile, Vilber-Lourmat, Marne La Vallee, Cedex, France)를 이용하여 띠의 면적과 밀도를 측정 활성을 비교 분석하였다.

라. Boyden chamber assay를 이용한 세포 이동능(cell motility) 측정

각 세포주들의 이동 및 침윤 능력을 비교하기 위하여 Boyden chamber assay를 시행하였다.^{36,38} 60µg/ml 농도의 matrigel (Collaborative Research, Bedford, MA, U.S.A) 50µl를 polycarbonate membrane filter (13 mm diameter, 12 micropore, Poretics Co, Livermore, CA, U.S.A)에 떨어뜨리고 hood에서 15시간 동안 filter를 건조시킨 후, 0.1% BSA가 포함된 세포 배양액으로 filter를 용해시켜 사용하였다. 하부 chamber에 세포 배양액을 넣고 filter를 올려놓은 다음 cap을 단단히 고정시켰다. Trypsin-EDTA (GIBCO)를 처리하여 세포들을 수확한 후 단일 세포 부유액으로 만들어 세포수를 세고 상부 chamber에 1×10⁴의 세포를 주입하고 0.1% BSA가 포함된 세포 배양액으로 상부 구조를 꽉 채웠다. 37°C에서 6시간 배양한 다음, cap을 제거하고 filter를 조심스럽게 꺼내어 wax판 위에 뒤집어 고정시키고 0.5% crystal violet (crystal violet 2.5 g, 500 ml methanol)으로 5분간 염색하였다. 흐르는 물에 세척 후 filter의 반대편을 면봉으로 3회 세척하였다. Filter를 24-well plate에 넣고 밤새워 건조시킨 뒤, filter에 염색되어진 세포수를 세고, 각 well에 200µl의 0.1 M sodium citrate용액을 첨가하였다. 10분간 실온에서 방치하여 용해된 염색 용액을 96 well plate로 옮기고 automated ELISA reader (Tecan Austria GmbH, Salzburg, Austria)를 이용하여 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 또한 하부 chamber의 배지를 수확하여

세포수를 확인하고, 매 실험은 2 chamber 씩 시행하여 평균±표준 편차로 도식화하였다.

3. 세포주의 항암제 및 방사선 감수성-세포독성 실험(MTT assay)

가. 약제

임상에서 흔히 사용되는 항암제로 자궁경부암에서도 방사선치료와 함께 사용되어 우수한 치료 효과를 보이고 있는 약제인 cisplatin과 5-FU를 이용하였다. 약제 종류는 cisplatin (DDP, diamminodichloroplatinum: Pharmachemie B.V, Haarlem, Holland)과 5-FU (5-fluorouracil, Choogwae Pharma Co, Hwaseong, Korea)이며 이들에 의한 세포 살상능의 검사는 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-1-butene; Sigma, St. Louis, MO, U.S.A] 방법을 사용하였으며, 약제의 농도는 cisplatin은 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 μ g/ml의 농도로, 5-FU는 50, 5, 0.5, 0.05, 0.005 μ g/ml 농도로 단계적으로 희석하여 사용하였다.

나. 방사선

96 well plate에 각 세포를 분주한 후 24시간 동안 배양하고 방사선을 조사하였다. 방사선은 라이낙 4Mv X-선을 이용하여 SSD 80 cm에서 2, 4, 6, 8 Gy를 조사하였고 24, 48, 72, 96 시간 배양한 후에 각각 MTT assay를 시행하여 세포 성장의 지연 정도를 확인하였다.

다. 세포독성 실험(MTT assay)

MTT 검사는 살아있는 세포의 경우 cytochrome b 및 cytochrome c 부위에 있는 미토콘드리아의 효소인 succinate dehydrogenase가 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)의 tetrazolium 환을 분절시켜 황색조의 MTT salt를 자주색의 formazan으로 환원시키는데 그 원리를 두고 있으며, 죽은 세포나 조직 배양액에서는 이러한 변화가 일어나지 않고, 살아있는 세포에서만 선택적으로 일어나는 이 색조 반응을 분광흡도계로 측정하여 살아있는 세포의 수를 알 수 있는 검사법으로 본 연구에서는 Carmichael 등³⁹의 방법에 따라 MTT 검사를 시행하였다. 각각의 배양된 종양 세포주에서 성장 곡선을 그려, 지수 성장을 보이는 세포수를 결정한 후 세포 성장 곡선상 지수 성장기에 해당하는 세포수를 0.25% Trypsin-EDTA (GIBCO)를 처리하여 단일 부유 세포로 만든 후, 10% FCS가 함유된 MEM 배지로 3회 세척하고, trypan blue (GIBCO) 염색으로 세포수를 세어 180 μ l의 배양액에 지수 성장기에 해당하는 세포수를 부유하여 96 well plate에 분주하였다. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 후 여러 농도의 약제를 단독 또는 조합하여 20 μ l의 10% FBS가 포함된 MEM 배지에 용해시켜 96 well plate에 투여하였다. 이때 대조군의 well에는 약제 대신 동량의 10% FBS가 포함된 MEM 배지를 사용하고, 배지 자체의 색소흡수율을 측정하기 위해서 10% FBS가 포함된 MEM 배지만 동량으로

분주하였다. 이후 microplate를 96시간 추가 배양한 후 MTT 50 μ l (2 mg/ml)를 각 well에 첨가하고 이를 4시간 더 추가 배양하였다. 배양이 끝난 microplate는 450 g에서 10분간 원심분리한 후, 바닥에 있는 formazan 결정이 제거되지 않도록 주의하면서, 30 μ l 정도의 배양액이 남도록 digital multichannel pipette (Flow Titerck, Finland)을 사용하여 상층액을 제거하였다. 여기에 다시 150 μ l의 dimethyl sulfoxide (Sigma)를 각 well에 첨가하고 진탕기에서 formazan결정이 용해될 때까지 37°C에서 10분간 진탕한 후 multi-well ELISA automatic spectrometer recorder (Tecan Austria GmbH)를 이용하여 540 nm의 파장에서 판독한 실험군의 색소흡수율(absorbance, optical density)을 대조군의 색소흡수율과 비교하고 아래의 공식으로 생존율을 구하였다.

$$\% \text{ 생존율} = \frac{\text{실험군의 평균 색소흡수율} - \text{기준 색소흡수율}}{\text{대조군의 평균 색소흡수율} - \text{기준 색소흡수율}} \times 100$$

각 항암제와 방사선에 대한 IC₅₀는 CalcuSyn (Biosoft Inc, Cambridge, UK)의 software를 사용하여 계산하였다.

4. cDNA microarray를 이용한 세포주의 유전자 발현 검사

가. RNA 분리

세포주의 total RNA는 Tizol (Invitrogen, Calsbad, U.S.A) reagent의 방법에 의해서 분리하였고, RNA의 정량, 정성 분석은 Gene Spec III (Hitachi, Yokohama, Japan)와 Gel Documentation-Photo system (Vilber-Lourmat)을 이용하였다.

나. Probe 준비

대조 시료와 실험대상 자궁경부암 세포주에서 추출한 50 μ g의 RNA를 RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) 방법을 통하여 역전사시키는 과정에서 두가지 형광색소를 사용하여 각각 다른 labeling을 시행하였다. 대조 RNA 시료는 연세의대 암전이연구센터에서 10개 장기를 대표하는 암세포주를 이용하여 제작한 Yonsei common reference RNA를 사용하였다. 대조 RNA는 Cy3-dUTP (NEN Co, Boston, MA, U.S.A)로, 실험대상 시료는 Cy5-dUTP (NEN)로 각각 표지하여 labelled cDNA를 합성하였다. 형광색소 표지는 SuperScript II 400 unit (GIBCO); 3ml Cy5-dUTP (or Cy-3 dUTP), dATP, dCTP, dGTP 각각 1.5 ml, 0.6 ml dTTP, 300 mM, 5X first-strand buffer 6 μ l, 4 μ g의 oligo-dT primer를 총 부피가 30 μ l가 되게 준비하여 42°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 결합되지 않은 nucleotide는 PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany)에

의해 제거한 후 probe를 제작하기 위하여 1 μ g/ μ l Human Cotrol DNA 20 μ l (GIBCO), 10 μ g/ μ l polyA RNA 2 μ l (Sigma), 1 M TE buffer를 첨가하였다. 제작된 probe는 Microcon-30 tube (Millipore)에서 원심분리한 다음, 적정량의 hybridization buffer (20 X SSC, 10% SDS)와 혼합하여 48 μ l가 되게 하였다.

다. Hybridization of fluorescence-labeled cDNA

본 실험에서는 17 K human cDNA microarray (Yonsei CMRC-GenomicTree Co, Seoul, Korea)를 사용하였다. Hybridization하기 전에 nonspecific hybridization을 예방하기 위해 10 mg/ml BSA, 3.5 X SSC, 0.1% SDS solution에서 슬라이드를 pre-block하고, probe mixtures를 95°C에서 2분간 가열한 후 13,000 r.p.m.에서 2분간 원심분리 한다. 준비된 probe를 슬라이드에 점적하고 슬라이드를 hybridization chamber (GenomicTree)에 넣고 65°C에서 16시간 동안 hybridize 시킨다. 보합작용이 끝난 후, 슬라이드를 10% SSC에서 10분간 2회 수세하고 0.1% SDS에서 10분간 transfer한다. 그 후 10% SSC에서 10분간 2회 수세한다. 수세 후 슬라이드는 600 r.p.m.에서 5분간 원심분리 한다. Hybridization된 슬라이드는 GenePix 4000B (Axon)로 스캔하고 이미지는 GenePix Pro 3.0 (Axon)를 이용하여 분석한다.

라. Data 분석

먼저 signal이 인식될 수 없는 spot과 1개 세포주에서 발현이 되지 않는 spot을 제거하는 filtering 과정을 시행하고, missing spot은 KNN (K nearest neighborhood)법을 이용하여 보정하였다. 각 유전자들에서의 logR/G ratio를 기준으로, Loess normalization을 시행한 후 분석을 시행하였다. 각 세포주의 유의한 유전자를 선정하는 것은 Newton등⁴⁰에 의한 posterior odds model을 적용하였다. 먼저 각 세포주의 유의한 유전자들을 선정하고 HPV 및 COX-2 발현 양상과 비교하여 C33A 세포주에 특이하게 발현하는 유전자들을 선정하였다. 각 유전자들의 발현 변화의 posterior odd는 posterior probability of true differential expression/ posterior probability of unchanged expression 비로 결정하고, 각 유전자들의 실제 발현이 유의할 사후 확률은 E (expectation)-step과 M (maximization)-step을 병합한 EM algorithm을 사용하여 계산하였다. 계산한 확률에 따라 발현이 1 : 10 또는 1 : 100 이 이상 차이가 날 경우 유의하다고 결정하였다. Filtering이 끝난 유전자군과 유의하다고 선정된 유전자들을 이용하여 Eisen의 tree view를 이용하여 hierarchical clustering을 시행하였다. 선정된 유전자들의 기능은 문서검색과 Stanford Source등 public database의 자료 검색을 통하여 검색하였다.

III. 결 과

1. 자궁경부암 세포주의 HPV 아형 감염 및 COX-2 발현

가. DNA chip을 이용한 세포주의 HPV 아형

여러 가지 HPV 아형을 검사할 수 있는 DNA chip을 이용하여 4가지 세포주의 HPV 아형 양성 여부를 검사하였다. HeLa는 HPV 18 양성, SiHa와 CaSki는 HPV 16에 각각 양성이었으며 C33A는 HPV 음성이었다(그림 1).

나. Western blot 방법으로 측정된 COX-2 발현

각 세포주에서의 COX-2 단백질의 발현을 확인하기 위하여 COX-2 항체를 이용한 Western blot을 시행한 결과, HPV가 양성인 세포주는 COX-2도 모두 양성 반응을 보였다. 즉 HeLa와 SiHa는 (+++) 정도의 강한 발현을 보였으며 CaSki는 (+)이었으며 HPV 음성이었던 C33A 세포주는 COX-2의 발현이 음성이었다(그림 2).

2. 세포주의 생물학적 특성

가. 세포 성장 곡선 및 배양 시간

4가지 인간 자궁경부암 세포주인 HeLa, SiHa, CaSki, C33A를 항온 배양기에서 배양하

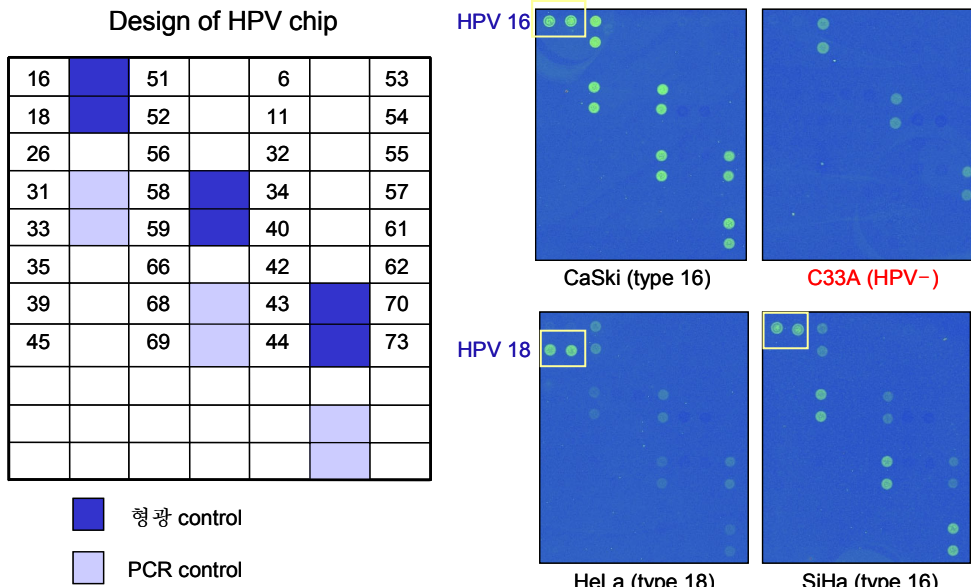


그림 1. DNA chip을 이용한 자궁경부암 세포주의 HPV 아형 검사. HeLa는 HPV 18 양성, CaSki와 SiHa는 HPV 16 양성이고 C33A는 음성이었다.

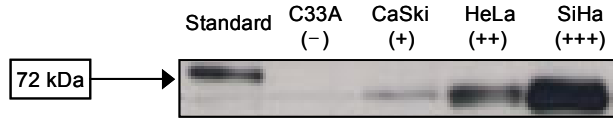


그림 2. Western blot법으로 자궁경부암 세포주의 COX-2 발현 측정. 72 kDa의 COX-2가 C33A에서는 발현되지 않았고 나머지 3가지 세포주에서는 발현되었다.

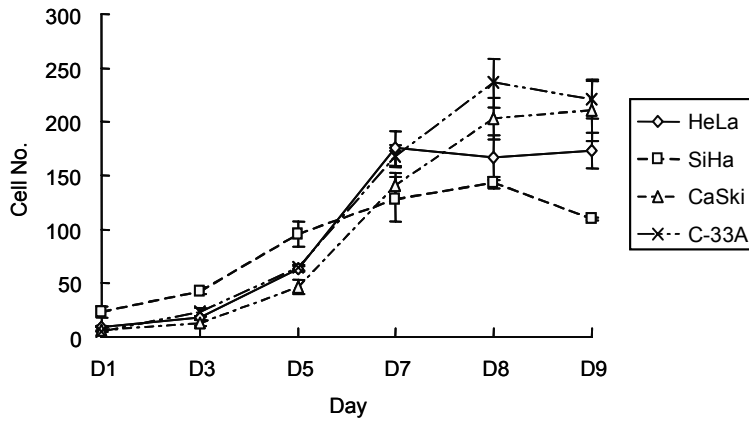


그림 3. 자궁경부암 세포주의 성장 곡선. 9일째까지 세포 성장 곡선에 현저한 차이를 보이지 않았다.

면서 세포의 형태적 특징을 알기 위하여 광학현미경을 이용하여 세포 형태를 150배로 관찰하였다. 각 세포주의 성장 속도를 비교하기 위하여 24 well culture plate에서 배양하며 9일째까지 매일 세포수를 측정하여 성장 곡선을 그리고, 배가 시간(doubling time)을 측정하였다. 각 세포주의 배가 시간은 HeLa 35시간, SiHa 44시간, CaSki 32시간, C33A가 36시간으로 세포주 간의 배가 시간에는 거의 차이가 없었으며 성장 곡선에도 별로 차이를 보이지 않았다(그림 3).

나. Soft agar assay를 이용한 생체외 집락 형성능(in-vitro colony forming activity)

각 세포주들의 생체외 세포집락 형성능 측정을 위해서 soft agar assay를 시행하여, 각 dish마다 1,000개의 세포를 넣고 배양하였다. 각 dish내의 300,000개 이상의 세포가 집락을 형성한 것을 하나의 집락으로 측정하였고, 3개 dish의 집락형성 숫자를 평균하였다. 각 세포주에서 300,000개 이상의 세포로 이루어진 집락수는 HeLa, SiHa, CaSki에서 각각 32, 27, 18개인 반면 C33A 세포주에서는 전혀 집락이 생기지 않았다(그림 4).

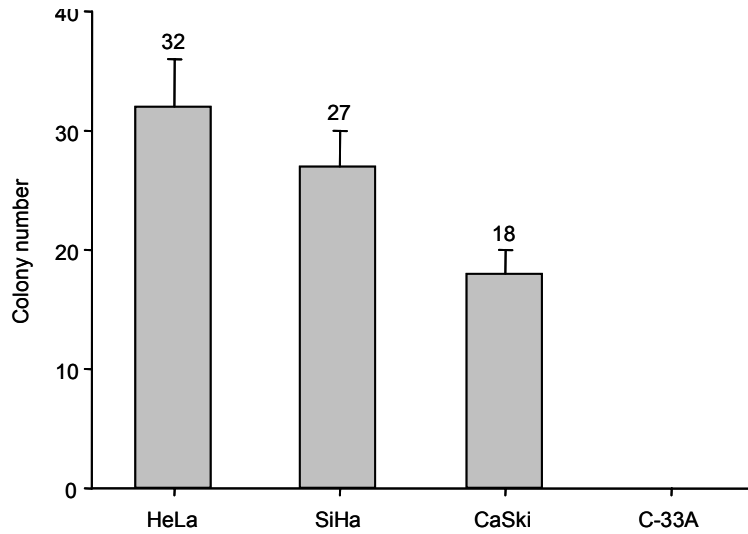


그림 4. 자궁경부암 세포주에서 soft agar assay를 이용한 생체의 집락 형성능 비교. HeLa, SiHa, CaSki에서는 집락이 형성되었으나 C33A에서는 집락 형성이 없었다

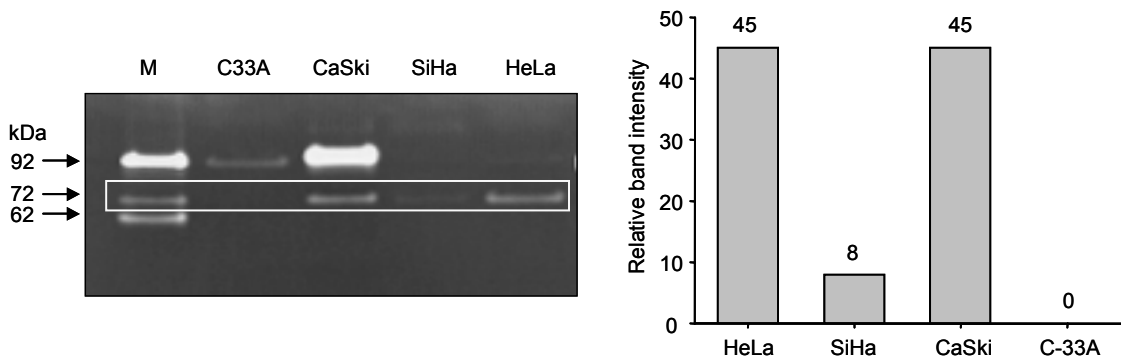


그림 5. 자궁경부암 세포주에서 gelatin zymography를 이용한 MMP-2 발현 측정. 72 kDa MMP-2 전구형의 발현이 HeLa, SiHa, CaSki에서는 있었으나 C33A에서는 전혀 없었다.

다. Gelatin zymography를 이용한 matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) 발현

각 세포주의 세포질에서 MMP의 활성도를 관찰하기 위하여 gelatin zymography를 시행하고, computer-assisted image analyzer (Bioprofile, Vilber-Lourmat)를 이용하여 비교량을 측정하였다. 4개 세포주에서 MMP-2의 활성형인 62 kDa level에서는 관찰되지 않았지만 MMP-2 전구형인 72 kDa level의 발현이 HPV 양성인 HeLa, SiHa, CaSki 세포주에서 확인되어 HeLa는 45, SiHa는 8, CaSki는 45 정도로 발현되었으나, HPV 음성인 C33A세포에서는 72 kDa level에서 발현이 전혀 없었다(그림 5).

라. Boyden chamber assay를 이용한 세포 이동능(cell motility)

세포주들의 이동 및 침윤 능력을 비교하기 위하여 Boyden chamber assay를 시행하였고 매 실험은 2 chamber씩 시행하여 평균±표준 편차로 도식화하였다. 그 결과 4가지 세포주에서 그림 6.에서 보이는 바와 같이 세포 이동 능력의 차이는 없었다.

3. MTT assay를 이용한 항암제 및 방사선 감수성

가. 항암제를 이용한 MTT assay

임상에서 자궁경부암 치료에 흔히 사용되고 있는 항암제인 cisplatin과 5-FU에 대한 각

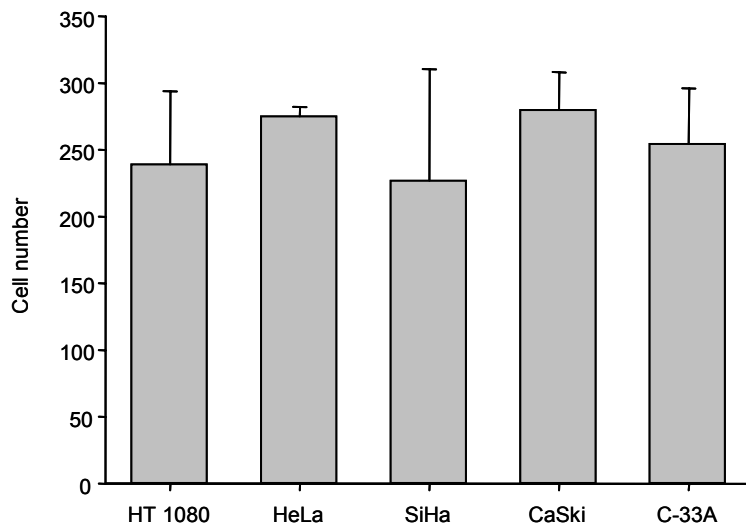


그림 6. 자궁경부암 세포주에서 Boyden chamber assay를 이용한 세포 이동능 비교. 대상 자궁경부암 세포주들 간에 세포 이동능의 차이가 없었다.

표 1. 자궁경부암 세포주에서 항암제에 대한 MTT assay상 IC₅₀

세포주	*IC ₅₀ (µg/ml)	
	Cisplatin	5-FU
HeLa	1.6	>10.0
SiHa	>10.0	>10.0
CaSki	8.4	8.0
C33A	0.8	1.9

IC (inhibition concentration)

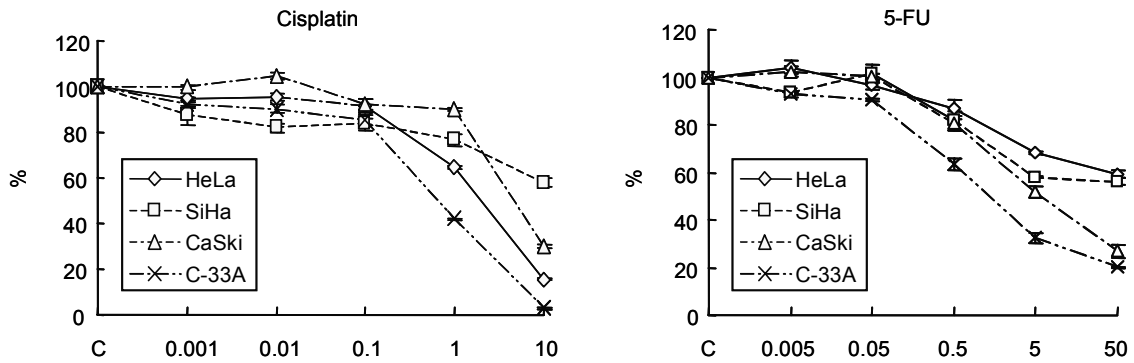


그림 7. 자궁경부암 세포주에서 항암제에 대한 MTT assay. HeLa, SiHa, CaSki 세포주에 비해 C33A는 세포 생존율이 급격히 감소하였다.

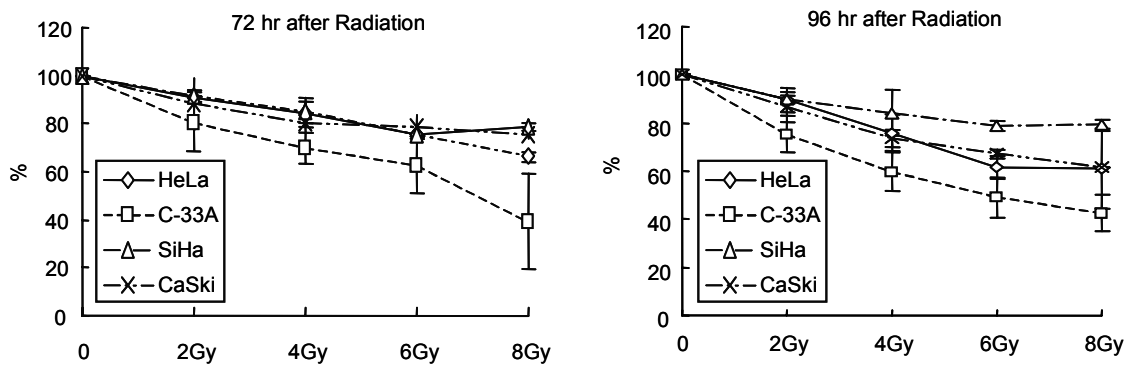


그림 8. 자궁경부암 세포주에서 방사선에 대한 MTT assay. 방사선조사 후 72시간과 96시간에 시행한 MTT 결과 C33A에서 세포 성장이 현저히 지연되었다.

세포주의 세포 살상능의 검사를 MTT 방법으로 시행하였고, CalcuSyn software (Biosoft)를 사용하여 각 약제의 IC_{50} 을 구하였다(표 1). 그림 7.에서 보는 바와 같이 cisplatin과 5-FU 두 약제를 처리하였을 때 HPV 양성인 3가지 세포주에 비해 HPV 음성인 C33A 세포주의 생존율이 가장 많이 감소하였고 IC_{50} 도 C33A 세포주에서 유의하게 적게 나와서 2가지 항암제의 항암작용이 C33A 세포주에서 가장 민감한 것을 확인할 수 있었다.

나. 방사선을 이용한 MTT assay

각 세포주별로 2, 4, 6, 8 Gy 방사선을 조사한 후에 MTT assay를 시행한 결과 방사선조사 후 72시간이나 96시간에서 HPV 양성인 3가지 세포주에 비해 HPV 음성인 C33A 세포에서 세포 성장이 가장 현저히 지연되는 것을 확인하였으며(그림 8.) IC_{50} 도 유의하게 C33A 세포에서 낮게 나타나서(표 2) HPV 음성인 C33A 세포주가 방사선에 가장 민감한 것을 확인하였다.

표 2. 자궁경부암 세포주에서 방사선에 대한 MTT assay 상 IC₅₀

세포주	*IC ₅₀ (Gy)	
	방사선조사 후 시간	
	72시간	96시간
HeLa	15.674	12.811
SiHa	25.244	25.127
CaSki	20.960	12.444
C33A	7.789	5.851

IC (inhibition concentration)

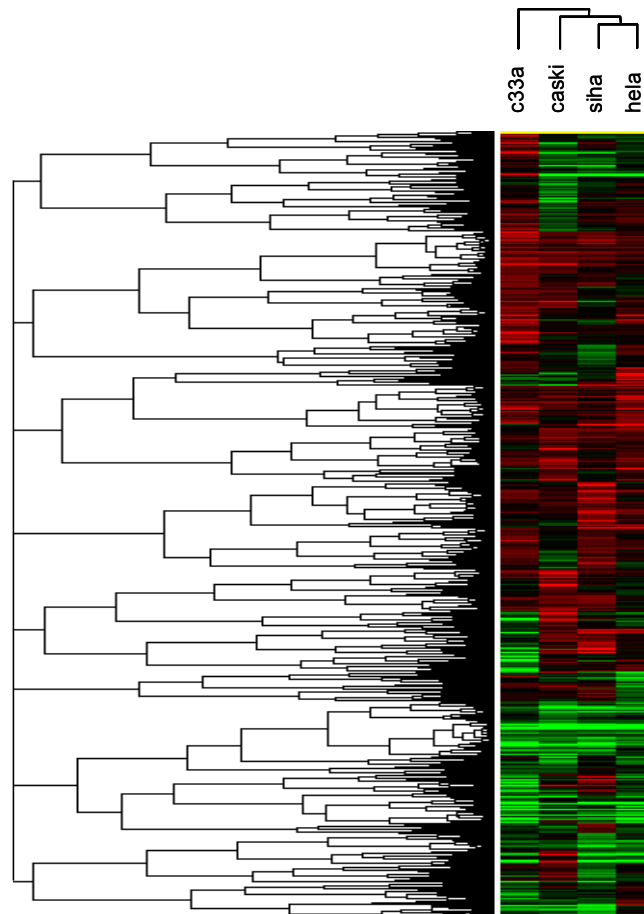


그림 9. 자궁경부암 세포주의 17 k cDNA microarray hierarchical clustering. 25% 누락된 전체 유전자에 대한 clustering 소견임

4. cDNA microarray를 이용한 세포주의 유전자 발현

17,000개의 인간유전자가 접적된 cDNA microarray 실험 결과 각 세포주에서 유의하게 발현하는 유전자군을 선정할 수 있었다. 방법에서 설명한대로 filtering과 표준화가 끝난 13,923개의 유전자를 이용하여 추가 분석을 시행하였다. 먼저 13,923개의 모든 유전자를 이용하여 각 세포주의 RNA 발현 양상을 hierarchical clustering을 시행한 결과 C33A는 나머지 세포주들과 다른 가지로 분류됨을 관찰할 수 있었다(그림 9). 각 세포주의 Newton graph에 근거하여 1 : 100의 기준으로 유의한 유전자를 선정하였을 때, 다른 세포주와 달리 C33A에 특이하게 발현되는 213개의 유전자가 선정되었다. 이 중 30개의 유전자는 과발현되었으며 183개는 발현이 감소됨을 관찰하였다. 이들 213개의 유전자들을 Stanford database를 이용하여 알려진 기능에 따라 분류하였을 때 암유전자, 종양 억제 유전자, 아포토시스, 세포주기 관련 인자 등의 기능을 하는 다양한 유전자들로 이루어졌음을 확인하였다(그림 10). 특히 전이 억제와 관련된 cadherin-18은 4.5배 과발현하였으며, MMP-2는 발현이 4.96배 감소함을 관찰하였다. C33A에 유의하게 발현하는 213개의 유전자를 이용하여 hierarchical clustering을 시행한 결과 역시 C33A가 나머지 세포주들과 발현 양상이 상이하다는 것을 확인하였고(그림 11.) 그 중 COX-2 신호 전달과 관련한 유전자들의 발현에 대해 조사한 결과 EGF, EGFR, MAPK 등과 RAS family인 RAB 13, 32 유전자의 발현이 감소되어 있었다(표 3).

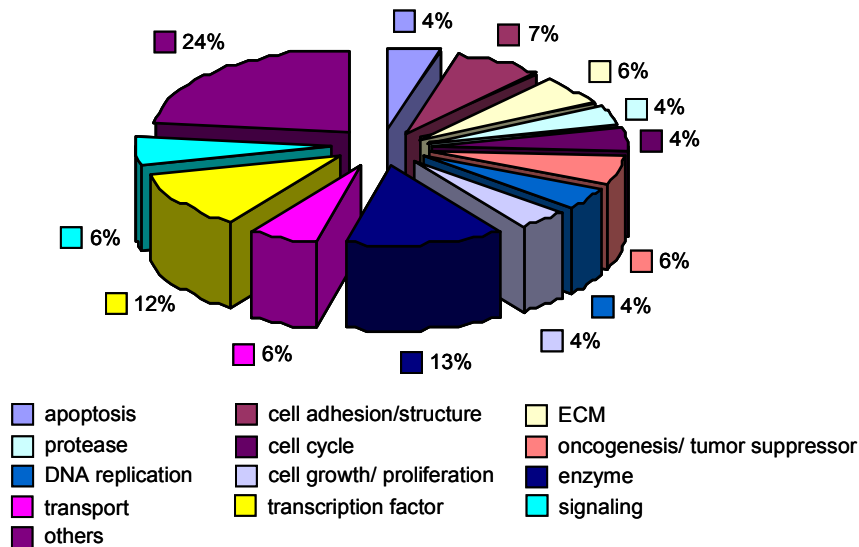


그림 10. C33A 세포주에 특이한 유전자 분포.

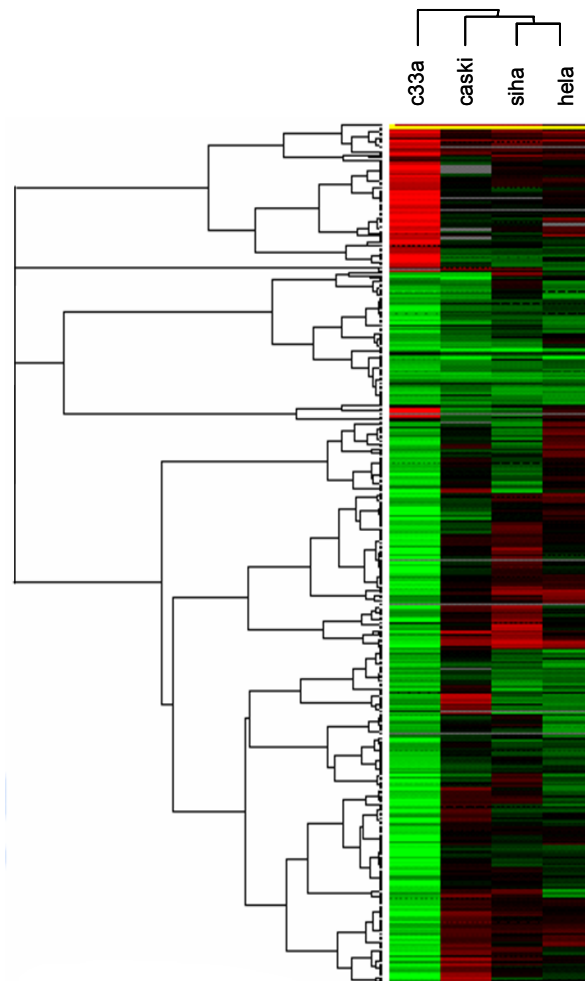


그림 11. C33A 세포주에 특이한 유전자만을 대상으로 한 hierarchical clustering. 총 유전자 213개를 대상으로 clustering 한 소견임

표 3. cDNA microarray 상 C33A 세포주에 특이한 유전자 중 COX-2와 관련있는 유전자

Up-regulated genes	Cadherin 18 Catenin α -2
Down-regulated genes	MMP-2 EGF EGFR RAB 13, 32 MAPK

IV. 고 찰

자궁경부암은 유방암과 더불어 전세계 여성암 중 가장 중요한 암으로 초기 병기에는 수술이 주된 치료법이고 III기 이상이거나 I~II 병기라도 종양이 진행된 경우에는 방사선치료를 항암화학요법과 병합 치료하는 방법이 많이 사용되고 있으며 주요 예후인자들은 병기, 종양 크기, 림프절 전이, 종양의 침범 깊이, 혈관이나 림프관 침범 여부 등이다. 전구 병변인 상피 이형증과 상피내암으로부터 침윤성 자궁경부암으로 수년에 걸쳐 서서히 진행되고 상피내암의 자연 경과에서 침윤성 암종으로 진행될 가능성은 비정형성이 심한 정도에 따라 다르지만 항상 침윤성 병변으로 진행되는 것은 아니며, 중증의 이형증에서도 자연 회복이 가능하다. 자궁경부암이나 전구 병변의 주 원인은 인유두종 바이러스(HPV) 중 특정 고위험 아형의 감염이고 그 중 16, 18형이 흔하고 중요하다.²⁻⁵ HPV 양성률은 자궁경부 정상 세포에서 11~15%, 이형성에서 50~60%, 상피내암에서 60~80%, 침윤성 자궁경부암에서 88~98% 정도로 보고되고 있으며, HPV 아형 한 종류가 양성인 경우가 90% 정도이고 다수의 HPV 아형이 양성인 경우는 10% 미만이다.^{3,4} 자궁경부암에서 HPV 양성 및 아형이 예후와 관련성을 가지는지에 대해서는 결과가 다양하다. HPV가 양성이면 예후가 불량하고 특히 18형이 양성인 경우에 종양이 빨리 성장하고 재발이 많다는 보고도 있으나⁶⁻⁹ 예후와 무관하다는 상반된 연구도 있으며¹⁰ 수술 후 절제된 골반 림프절 내의 종양 세포가 HPV에 감염되었는지와 치료 결과를 비교하여, 골반 림프절에 종양 세포의 침윤이 없어도 HPV가 양성인 경우에는 높은 국소 재발률과 전이가 있었다는 보고도 있으나 골반 림프절에서 양성인 HPV가 예후인자인지에 대한 이견은 많은 편이다.⁹⁻¹¹

자궁경부에 고위험 인유두종 바이러스가 감염되면 바이러스 DNA가 숙주 지놈 내로 조립(integration)되어 E2 ORF (open reading frames)를 파괴하고 그 결과로 E6, E7 암단백이 과발현되면서 유전적 불안정을 유발하게 되며, 이들은 암억제 유전자인 p53과 Rb를 포함하여 세포주기내 여러 가지 조절 단백질들과 작용하게 되어 세포주기 진행이 적절히 조절되지 않아 자궁경부 암화가 진행되는 것으로 알려져 있다.^{3,4} 그러나 HPV 감염 후 암종에 이르기까지 상당한 시간이 필요하고 감염 후 모두 암으로 진행되는 것은 아니므로 HPV 감염만이 발암에 충분한 조건은 아니며 다양한 분자생물학적 보조 요인들이 중요한 역할을 한다. 즉 자궁경부암의 암화 과정에서 다양한 암유전자(oncogene), 종양억제 유전자(tumor suppressor genes), 염색체 변이, 호르몬, 사이토카인, 성장인자, 세포주기 조절인자 등 다양한 인자들이 서로 연관되어 영향을 미치며, 그 외 자궁경부 상피세포의 화생(metaplasia), 임신시 자궁경부의 외변, 면역학적으로 억제된 상태, 흡연, 경우 피임약의 장

기 복용 등 다양한 요인들이 암화와 관련이 있다.³⁻⁵

대장암 등 여러 종양에서 발암 및 혈관신생 관련 인자, 예후인자, 혹은 치료 및 예방에 이용될 수 있다고 생각되어 주요 연구 표적¹²⁻²⁰으로서 각광받는 COX-2는 최근 자궁경부암에서도 활발한 연구 대상이 되고 있다. 종양의 면역조직화학 염색과 치료 결과를 비교 분석한 논문들이 다수 보고되고 있으며²¹⁻²⁵ 연세의대에서도 동시 항암화학방사선치료를 받은 자궁경부암 환자를 대상으로 COX-2 발현이 매우 중요한 예후인자임을 보고한 바 있다.²³ 지금까지 자궁경부암의 발암에 HPV나 그와 연관된 E6/E7 암단백의 기전에 대한 연구는 많지만 침윤 및 전이 등에 HPV가 작용하는 기전에 대한 연구는 별로 없으며, 자궁경부암에서 COX-2가 과발현되는 기전이나 COX-2 발현의 증가가 불량한 임상 결과를 가져오는 이유 등에 관한 연구는 부족하다. 일반적으로 COX-2는 아포토시스와 면역 기능을 억제하며, 혈관신생을 증진시키고 악성세포의 침윤성을 증가시키는 다양한 과정에 관여함으로써 자궁경부암의 발암, 종양의 성장과 침윤, 전이 등에 영향을 주는 것으로 생각하고 있으며¹²⁻¹⁸ 본 연구에서는 자궁경부암의 원인인 HPV와 COX-2에 관심을 가지고 몇가지 자궁경부암 세포주의 생물학적 특성을 조사하여 이를 향후 자궁경부암 연구에서 사용될 수 있는 기초자료로 삼고자 하였다. COX-2를 과발현하는 자궁경부암이 주변조직으로의 침습과 림프절 전이가 많으며 추적시 국소 재발이나 원격 전이가 많은 등 예후가 매우 불량하다는 결과들이 여러 기관에서 공통적으로 보고되고 있는데²¹⁻²⁵ 과거에 제시되었던 다른 예후인자들은 자궁경부암의 병기나 치료법 등에 따라 이견이 많은 반면, COX-2 과발현에 대해서는 현재까지 발표된 연구들이 일관되게 불량한 임상 결과를 보고하는 것은 매우 흥미로운 사실로 COX-2가 자궁경부암에서 매우 중요한 인자라는 점을 시사한다.

Gallo 등⁴¹은 두경부암에서 COX-2 발현과 VEGF 발현이 서로 연관되어 있다는 연구를 통해 COX-2와 혈관신생이 밀접한 관계가 있다고 보고하였고, 자궁경부암에서도 방사선치료를 한 경우 신생혈관이 많을수록 불량한 예후를 보이며⁴² COX-2가 과발현되는 자궁경부암에서 미세혈관 밀도가 높아 COX-2가 과발현 될수록 혈관신생이 증가됨을 보고한 연구⁴³도 있으므로 자궁경부암에서 COX-2가 혈관신생과 관련하여 종양의 성장과 침윤, 전이를 일으키는데 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. Gaffney 등²⁵의 최근 보고에서도 방사선치료를 시행한 자궁경부암 환자에서 임상 병기가 가장 중요한 예후인자였고, COX-2와 VEGF (vascular endothelial growth factor), EGFR (epidermal growth factor receptor) 등에 대해서 면역조직화학 염색을 시행한 결과 EGFR, VEGF, COX-2가 과발현되는 자궁경부암은 예후가 불량하였다. 이렇게 COX-2를 과발현하는 자궁경부암이 더 침습적이고 재발과 전이가 호발하는 특성을 보이는 이유로 종양과 관련된 COX-2의 기능이나 기전 몇가지를 생각해 볼 수 있다.^{4,12-21,24,25} 첫번째는 혈관신생 과정에 COX-2가 관여하는 것이다.

즉 COX-2는 1) VEGF의 생산을 매개하는 유발 요소로, 2) thromboxane A2, 프로스타글란딘 E2, I2 등 대사물 생성을 촉진하여 이들이 직접 혈관 내피세포의 이동과 증식을 자극하게 하고, 3) Bcl-2나 PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase)-Akt 유전자를 활성화시켜 혈관 내피세포의 아포토시스를 억제할 수 있다는 기전들이 제시되고 있다.¹⁴ 두번째로는 COX-2가 MMP 등 단백분해효소의 활성도를 증가시킴으로 종양의 침윤성을 높이기 때문이라 생각하며,^{26,27} 세번째로 Ryu 등²¹의 연구에서 COX-2 발현은 종양의 침윤이 활발히 일어나는 종양 경계부에서 강하게 나타난 반면 아포토시스는 반대로 적게 나타나는 현상을 관찰하였는데, 이런 결과를 통해 자궁경부암에서 COX-2가 과발현됨으로 프로스타글란딘의 합성이 증가되어 아포토시스를 억제함으로 종양의 침습성을 증가시킬 수 있다고 생각한다. 본 연구에서 아포토시스나 신생혈관과 관련된 인자에 대한 실험을 따로 진행하지 못한 점이 아쉽고 HPV와 COX-2 사이의 명확한 관련성을 규명하지는 못하였지만 HPV 16이나 18형이 양성인 자궁경부암 세포주는 모두 COX-2 발현이 양성이고 HPV가 음성인 세포주는 COX-2도 음성인 흥미로운 결과를 얻어, 비록 세포 수준에서 확인된 결과이기는 하지만 HPV와 COX-2 사이에 어떤 연관성이 있을 가능성을 보여준다고 생각한다. 또한 HPV와 COX-2가 모두 양성이거나 음성인 세포주들은 세포 성장이나 배가 시간, 세포 이동능에는 차이가 없었다. 그러나 비록 생체내 종양형성능을 보는 것은 아니고 생체의 집락형성능을 측정한 결과이기는 하지만 HPV와 COX-2가 음성인 C33A 세포주에서는 세포 집락이 형성되지 않아서 다른 3가지 세포주에 비해 생체의 집락형성능이 현저히 감소됨을 확인하여 종양 세포들의 일부 생물학적 특성에 상이점이 있다고 판단하였고, 향후 생체내 종양형성능에 대한 추가 연구가 필요하리라 생각한다.

대개 침윤성과 전이능이 높은 암세포는 특정 단백질 분해효소의 생산과 분비가 향진되어 있다. 이들 중 plasminogen activator (PA)는 plasminogen을 plasmin으로 만들어 암세포 주변의 세포외 기질을 분해하고 비활성 MMP를 활성화시키며, 활성화된 MMP는 세포외 기질의 주요 성분인 콜라겐을 분해하여 암세포의 국소 침윤을 가능하게 한다. 특히 MMP-2와 MMP-9은 기저막의 주요 성분인 IV형 콜라겐을 분해하는 중요한 효소이다. COX-2는 종양 세포에서 MMP의 활성도를 증가시키며, 활성도가 증가된 MMP는 세포외 기질을 용해시키고 아포토시스를 억제하게 되므로, COX-2는 종양의 생성, 침윤 및 전이 중 여러 단계에서 작용한다.^{17,18} 종양의 침윤성에 대한 연구들로 COX-2를 감염시킨 대장암 세포주 Caco-2는 COX-2 감염 전에 비해 MMP-2 및 MT-MMP (membrane type matrix metalloproteinase) 활성도가 증가되어 COX-2 감염 후 종양 세포의 침윤성이 증가됨을 보였고,²⁷ 자궁경부암 세포주에서도 MMP 억제물질을 처리한 결과, 처리 전 MMP-2 발현이 증가하였던 세포주에서는 MMP 억제물질을 처리한 후 종양의 침윤 속도가 현저히

감소해 MMP-2 과발현이 종양 세포의 침윤능을 조절한다고 주장된 바 있으며^{44,45} 쥐의 장 상피세포에서 COX-2가 과발현 되었을 때 세포의 단백질인 라미닌의 세포 유착이 증가하였고 MMP-2가 활성화되었으며 E-cadherin 발현이 감소되었다는 보고도 있다.^{17,18} 본 연구 결과에서도 zymography 실험에서 COX-2 과발현이 있는 세포주에서는 침윤성과 관련 있는 MMP-2가 증가된 반면, COX-2 발현이 없는 C33A 세포주에서는 MMP-2 발현이 전혀 없었으며, cDNA microarray 분석에서도 마찬가지로 COX-2가 발현되지 않는 C33A 세포주에서는 MMP 발현이 현저히 감소되어 있으며 세포 유착 및 전이 억제와 관련 깊은 cadherin-18과 catenin은 반대로 증가되어 있어서 C33A는 침윤성과 전이성이 비교적 낮은 세포주임을 확인할 수 있었다. COX-2가 양성인 자궁경부암 세포주들은 MMP-2도 양성이었으므로 MMP-2가 자궁경부 종양의 침습성이나 전이성을 증가시키거나 조절하는데 관여할 가능성이 높다고 생각되며 이는 최근 보고된 자궁경부암의 COX-2 관련 논문들²¹⁻²⁵에서 MMP와 관련된 실험을 하지는 않았지만 COX-2 과발현 환자군에서 수술 조직상 국소 침습이 많았고 추적시에도 국소 재발 및 전이가 호발하였던 점을 일부분 설명할 수 있다고 생각한다. 향후 자궁경부암에서 COX-2와 연관된 연구 혹은 COX-2 저해제를 이용한 연구를 진행할 때 MMP-2나 MMP-2 저해물질과 관련지어 연구해 본다면 매우 흥미로운 결과들을 기대할 수 있으리라 생각된다.

COX-2가 과발현되는 기전이 HPV 감염에 의한 발암과 관계가 있는지, 혹은 종양의 성장, 침윤 과정에 관여하는지에 대한 연구는 부족하지만 자궁경부 상피내암이나 침윤성 암에서 EGFR이 증가된 경우가 많으므로 EGFR 경로의 활성화로 COX-2 발현이 증가된다고 추정할 수 있다. Kulkarni 등²⁰은 자궁경부암 세포주에 EGF (epidermal growth factor)를 처리하였을 때 COX-2 단백질이 급격히 증가하였고, 이는 EGFR 신호표시를 활성화시킴으로 COX-2 전사를 증가시키고 나아가 EGFR/PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) 신호를 활성화시킴으로 MAPKs (mitogen-activated protein kinases)를 자극하여 이로 인해 EGF를 매개로 하는 COX-2 과발현을 유도한 것이라고 보고하여, COX-2 과발현 기전 중 일부는 EGFR을 통한 신호조절과 밀접하게 연관되어 있다는 사실을 시사하였다. 대장암 세포주에서도 PI3K/Akt kinase/PKB (protein kinase B) 경로가 프로스타글란딘 E2를 매개로 하는 세포 이동능을 조절한다는 것이 밝혀졌으며⁴⁶ 이런 사실들을 통해 COX-2가 조절하는 다양한 매개 경로들을 통해 세포 침습 과정이 발생할 수 있을 것으로 예상된다. 세포 이동성과 유착성에 대한 다단계에 걸친 COX-2의 활성화는 종양의 침윤성과 혈관신생 과정에서 COX-2의 역할을 설명할 수 있다. EGF는 ras와 PI3K 신호를 자극하고 이는 MAPKs 및 AP-1 (activating protein-1)을 증가시키는 유전자로 연구되어져 있으므로 HPV와 COX-2 사이의 직접적인 연관성을 규명하지는 못하지만 상당히 연관 가능성이 높

다는 것을 보여준다. 즉 HPV 16과 18형은 자궁경부암에서 가장 흔히 감염되어 있고 HPV 16 암단백인 E6은 MAPKs와 AP-1 family를 활성화시키며 E6 암단백은 종양 억제 유전자인 p53의 분해를 표적으로 하므로 그 영향으로 COX-2 발현이 증가하게 된다는 것이다.⁴⁷ 본 연구에서 HPV와 COX-2의 관련성을 직접 연구하지는 못하였으나 HPV와 COX-2가 양성인 세포주들과 음성인 세포주들간에 cDNA microarray 분석 결과 상이한 유전자 발현 양상을 보이며, COX-2가 발현되지 않은 C33A 세포주에서는 COX-2 경로를 매개하는 것으로 알려진 EGF, EGFR, MAPK 등의 발현이 감소되어 있어서 COX-2 발현이 EFG를 매개로 발생할 가능성을 간접적으로 확인할 수 있었다.

Ferrandina 등²⁵의 연구에서는 자궁경부암의 병기가 증가할수록 COX-2 발현도도 증가하였고, Sohn 등⁴⁸도 정상 자궁세포에서부터 침윤성 자궁경부암까지 여러 암화의 단계별로 COX-2 발현도를 비교하여 정상세포와 저등급, 중등급 자궁경부 상피내암보다 고등급 자궁경부 상피내암과 침윤성암에서 COX-2 발현이 많고 강도도 강하게 나타난다고 보고하였으므로 COX-2가 자궁경부 상피내 종양의 침윤성 암화로 진행에 중요한 역할을 할 것으로 추측된다. 이런 결과들을 기초로 COX-2 단백을 자궁경부 상피내 종양에서 약물예방 (chemoprevention)을 목표로 혹은 침윤성 자궁경부암 치료의 표적으로 삼아 연구할 수 있으며, 향후 COX-2가 자궁경부암의 암화나 침윤성에 어떻게 작용하는지에 대한 세밀한 연구들이 진행된다면 자궁경부암에서도 최근 각광받는 COX-2 선택적 억제제를 HPV 백신과 더불어 약물예방(chemoprevention) 제제로 혹은 보조치료제로 사용할 수도 있으리라 생각한다. 기존의 암 연구가 암세포 자체에 치중하였으나, 최근에는 암 주위 미세 환경에 대한 연구로 진행방향이 전환되고 있다. MMP나 integrin 등의 분자들을 표적으로 암의 침윤과 신생혈관 생성을 억제하려는 연구들이 진행 중이고 이들을 효과적으로 억제하는 물질이 개발된다면 암치료에 매우 중요한 부분을 차지하리라 기대된다. 특히 원인이 되는 바이러스가 알려져 있는 자궁경부암과 같은 암종에서 관련되는 보조 인자들에 대한 연구가 활발히 진행된다면 암예방이나 암의 진행을 억제할 가능성이 가장 높다고 생각된다.

최근 인간 유전자 지도가 확립되어 유전학적 접근이 용이해지게 되었으며 한 장의 슬라이드에 수천, 수만개의 cDNA를 점적(spotting)하여 동시에 대량으로 유전자의 발현 양상을 검사할 수 있는 cDNA microarray 기법이 발전하여 여러 가지 질환이나 암종에서 특이한 유전자를 분리, 규명함으로써 표현형이 다른 종양이나 개개인 종양의 유전적 차이가 규명되고 있다. Human cDNA microarray를 이용한 방법으로 여러 종양의 분자생물학적인 특성 및 특이 유전자에 대해 연구하여 임상적 예측 및 예후인자로서의 가능성도 제시되고 있다.^{35,49} 본 연구에서도 이를 이용하여 자궁경부암 세포주에서 COX-2 발현과 관련된 유전자들에 관심을 가지고 특이 유전자 발현을 조사한 결과 HPV와 COX-2가 발현되지 않

고 생물학적인 특성이 상이하었던 C33A 세포주에서는 EGF, EGFR, MMP-2, MAPK, RAB 13, 32 (ras oncogene family) 등의 발현이 HPV와 COX-2를 발현하는 다른 세포주들에 비해 현저히 감소되어 있었던 반면 세포 유착과 관련되어 있으며 전이 억제와 유관한 유전자로 알려진 cadherin-18, catenin α -2의 발현은 증가되어 있었다(표 3).

국소 진행된 자궁경부암에서 동시 항암화학방사선 치료법이 표준치료로서 시행되고 있으므로³²⁻³⁴ 본 연구에서도 원인인 HPV 감염 여부와 COX-2 발현과 관련하여 항암제와 방사선에 대한 자궁경부암 세포주의 반응도를 조사해 보았으며 흥미롭게도 HPV나 COX-2가 양성인 세포주들은 모두 항암제나 방사선에 대해 잘 반응하지 않는 반면 HPV와 COX-2가 모두 음성인 C33A 세포주는 항암제나 방사선에 모두 매우 민감하게 반응하여 소량의 항암제나 방사선조사량에서 세포들이 죽거나 성장이 지연되는 결과를 보였다. 이는 방사선치료 단독이나 항암화학요법과 방사선을 병합하여 치료한 자궁경부암의 치료성적에서 COX-2 발현이 양성이었던 종양에서 불량한 예후를 보였던 결과를²²⁻²⁵ 일부 설명할 수 있으나 본 실험 결과는 세포주에 국한된 결과이므로 향후 동물실험 등을 통해 재확인되어야 하리라 생각한다. 자궁경부암 세포주들 중 HPV와 COX-2가 모두 양성이거나 음성인 세포주들은 몇가지 생물학적 특성 및 항암제와 방사선에 대한 반응도가 상이하었고 cDNA microarray로 분석한 결과에서도 HPV(-)/COX-2(-)인 C33A 세포주는 매우 상이한 유전자의 발현 양상을 보였으며, COX-2의 신호전달을 매개할 가능성이 크다고 알려진 유전자들의 발현이 감소되어 있었다. 이런 결과들은 향후 자궁경부암의 예방, 진단, 및 치료에서 COX-2와 관련된 연구를 시행하는데 기초 자료로 유용하게 사용될 수 있으리라 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서는 4가지의 자궁경부암 세포주를 인유두종 바이러스(Human Papilloma-virus; HPV) 감염 여부와 COX-2 발현에 따라 분류하여 보았으며 이를 바탕으로 이들에 양성인 자궁경부암 세포주들과 음성인 세포주에서 세포 성장능, 생체의 집락 형성능, MMP-2 발현도, 세포 이동능 등 종양 세포의 생물학적 특성들을 비교하고, 항암제와 방사선에 대한 민감도가 HPV 및 COX-2의 양성여부와 상관관계가 있는지 조사하였다. 자궁경부암 세포주에서 Human cDNA microarray를 시행하여 유전자의 발현 양상에서 차이와 특성이 존재하는지, 특히 COX-2와 관련된 유전자의 발현에 대해 조사하고자 하였으며 이상의 실험을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. DNA chip을 이용하여 4가지 세포주의 HPV 아형을 확인한 결과 HeLa는 HPV 18 양

성, SiHa는 HPV 16 양성, CaSki는 HPV 16 양성이었으며 C33A는 HPV 음성이었다.

2. COX-2의 발현을 각 세포주에서 HPV 양성과 비교한 결과 HPV 양성인 HeLa, SiHa, CaSki 세포주에서는 COX-2 발현이 양성이었으나 HPV 음성인 C33A 세포주에서는 COX-2의 발현이 전혀 없었다. 이를 통해 대상 자궁경부암 세포주를 HPV 및 COX-2에 양성, 음성인 세포주로 분류하여 생물학적 특성과 차이를 비교 분석하였다.

3. HPV 및 COX-2에 양성인 세포주는 종양의 배가 시간과 세포의 이동능은 비슷하였으나, 세포의 집락 형성능에서는 현저한 차이를 보여 HPV 및 COX-2 양성인 세포주에서는 집락이 형성되었으나 HPV 및 COX-2 음성인 C33A 세포주에서는 집락이 형성되지 않았으며 MMP-2 발현도 비슷한 양상으로 HPV 및 COX-2 양성인 세 가지 세포주에서는 MMP-2 발현이 양성이었으나 C33A 세포주는 음성이었다.

4. 세포주들에서 cisplatin과 5-FU 두 가지 항암제 처리와 방사선조사를 시행하여 MTT assay를 시행하였을 때 HPV 및 COX-2 발현 양성인 세포주와 비교하여 음성인 C33A에서 항암제 처리 후 가장 민감하게 세포의 생존이 감소하였고 방사선조사에 대해서도 가장 민감하게 세포 성장이 지연됨을 확인하였다.

5. cDNA microarray로 각 세포주에서 유의하게 발현하는 유전자군을 선정하고 비교 분석한 결과 HPV와 COX-2에 음성인 C33A 세포주는 나머지 3개의 세포주와 유전자 발현 양상이 전혀 다른 가지로 분류되었으며, C33A 세포주에서 특이하게 발현되는 유전자는 다양하였으나 COX-2 신호 전달과 관련하여서는 EGF, EGFR, MAPK, RAB의 발현이 감소되어 있고, 종양의 침습성과 관련 있는 기질 MMP-2의 발현도 감소되어 있었으며, 세포 유착 및 전이 억제와 관련된 cadherin-18은 과발현되어 있었다.

이상의 결과로 HPV 및 COX-2 음성인 C33A 세포주에 비해 HPV 및 COX-2 양성인 자궁경부암 세포주들은 종양의 집락 형성능이나 침윤성이 강하고 항암제나 방사선에 잘 반응하지 않는 공격적인 생물학적 특성을 가진다고 확인되었으며 향후 자궁경부암의 예방, 진단, 및 치료에서 HPV 및 COX-2와 관련된 다양한 연구를 시행하는데 기초 자료로 유용하게 사용될 수 있으리라 생각된다.

참 고 문 헌

1. Ministry of Health and Welfare, Korea: The 22th annual report of Korean central cancer registry (2001.1.1-2001.12.31), 2002.
2. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A world wide perspective. International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. J Natl Cancer Inst 1995;

87:796-802.

3. Herrington CS. Human papillomaviruses and cervical neoplasia. II. Interaction of HPV with other factors. *J Clin Pathol* 1995;48:1-6.
4. Stanley MA. Human papillomavirus and cervical carcinogenesis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynecol* 2001;15:663-676.
5. Stanley MA. Prognostic factors and new therapeutic approaches to cervical cancer. *Virus Res* 2002;89:241-248.
6. Chen TM, Chen CA, Wu CC, Huang SC, Chang CF, Hsieh CY. The genotypes and prognostic significance of human papillomaviruses in cervical cancer. *Int J Cancer* 1994;57:181-184.
7. Burger RA, Monk BJ, Kurosaki T, Anton-Culver H, Vasilev SA, Berman ML, et al. Human papillomavirus type 18: association with poor prognosis in early stage cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1361-1368.
8. Vernon SD, Unger ER, Miller DL, Lee DR, Reeves WC. Association of human papillomavirus type 16 integration in the E2 gene with poor disease-free survival from cervical cancer. *Int J Cancer* 1997;74:50-56.
9. Sapy T, Hernadi Z, Konya J, Lukacsko L. Poor clinical outcome in early stage cervical cancer with human papillomavirus-18 positive lymph nodes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000;90:93-95.
10. Kristensen G, Karlsen F, Jenkins A, Karen J, Abeler V, Trope C. Human papillomavirus has no prognostic significance in cervical carcinoma. *Eur J Cancer* 1996;32:1349-1353.
11. Kobayashi Y, Yosinouchi M, Tianqi G, Nakamura K, Hongo A, Kaminura S, et al. Presence of human papillomavirus DNA in pelvic lymph nodes can predict unexpected recurrence of cervical cancer in patients with histologically negative lymph nodes. *Clin Cancer Res* 1998;4:979-983.
12. Williams CS, Tsujii M, Reese J, Dey SK, DuBois RN. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Invest* 2000;105:1589-1594.
13. Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, et al. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 2000;342:1946-1952.
14. Gately S. The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 2000;19:19-27.
15. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998;29:705-716.
16. DuBois RN, Radhika A, Reddy BS, Entingh AJ. Increased cyclooxygenase-2 levels in carcinogen-induced rat colonic tumors. *Gastroenterology* 1996;110:1259-1262.

17. Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin-endoperoxide synthase-2. *Cell* 1995;83:495-501.
18. Tsujii M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increase metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:3336-3340.
19. Liu XH, Yao S, Kirschenbaum A, Levine AC. NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells. *Cancer Res* 1998;58:4245-4249.
20. Kulkarni S, Rader JS, Zhang F, Liapis H, Koki AT, Masferrer JL, et al. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:429-434.
21. Ryu HS, Chang KH, Yang HW, Kim MS, Kwon HC, Oh KS. High cyclooxygenase-2 expression in stage IB cervical cancer with lymph node metastasis or parametrial invasion. *Gynecol Oncol* 2000;76:320-325.
22. Kim HJ, Wu HG, Park IA, Ha SW. High cyclooxygenase-2 expression is related with distant metastasis in cervical cancer treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;55:16-20.
23. Kim YB, Kim GE, Cho NH, Pyo HR, Shim SJ, Chang SK, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with a poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated with radiation and concurrent chemotherapy. *Cancer* 2002;95:531-539.
24. Ferrandina G, Ranelletti FO, Legge F, Lauriola L, Poerio A, Zannoni GF, et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in locally advanced cervical cancer patients undergoing chemotherapy plus surgery. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;55:21-27.
25. Gaffney DK, Haslam D, Tsodikov A, Hammond E, Seaman J, Holden J, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and vascular endothelial growth factor (VEGF) negatively affect overall survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;56:922-928.
26. Jiang MC, Liao CF, Lee PH. Aspirin inhibits matrix metalloproteinase-2 activity, increased E-cadherin production, and inhibits in vitro invasion of tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;282:671-677.
27. Attiga FA, Fernandez PM, Weeraratna AT, Manyak MJ, Patierno SR. Inhibitors of prostaglandin synthesis inhibit human prostate tumor cell invasiveness and reduce the release of matrix metalloproteinases. *Cancer Res* 2000;60:4629-4637.
28. De Clerck YA, Perez N, Shimada H, Boone TC, Langley KE, Taylor SM. Inhibition of invasion and metastasis in cell transfected with an inhibitor of metalloproteinases. *Cancer Res* 1992;52:701-708.
29. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an

- imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991;64:327-336.
30. Alexander CM, Werb Z. Proteinases and extracellular matrix remodeling. *Curr Opin Cell Biol* 1989;1:974-982.
 31. Stelzer-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* 1993;9:541-573.
 32. Keys HM, Bundy BN, Stehman FB, Muderspach LI, Chafe WE, Suggs CL, et al. Cisplatin, radiation, and adjuvant hysterectomy compared with radiation and adjuvant hysterectomy for bulky stage IB cervical carcinoma. *N Engl J Med* 1999;340:1154-1161.
 33. Rose PG. Chemoradiotherapy for cervical cancer. *Eur J Cancer* 2002;38:270-278.
 34. Green JA, Kirwan JM, Tierney JF, Symonds P, Fresco L, Collingwood M, et al. Survival and recurrence after concomitant chemotherapy and radiotherapy for cancer of the uterine cervix: a systemic review and meta-analysis. *Lancet* 2001;358:781-786.
 35. Bertucci F, Viens P, Tagett R, Nguyen C, Houlgatte R, Birnbaum D. DNA arrays in clinical oncology: promises and challenges. *Lab Invest* 2003;83:305-316.
 36. Rha SY, Noh SH, Kwak HJ, Wellstein A, Kim JH, Roh JK, et al. Comparison of biological phenotypes according to midkine expression in gastric cancer cells and their autocrine activities could be modulated by pentosan polysulfate. *Cancer Lett* 1997;16:37-46.
 37. Lee KS, Rha SY, Kim SJ, Kim JH, Rho JK, Kim BS, et al. Sequential activation and production of matrix metalloproteinase-2 during breast cancer progression. *Clin Exp Metastasis* 1996;14:512-519.
 38. Frandsen TL, Boyden BE, Jirus S, Zwiebel J, Sapang-Thomson M, Thomson EW, et al. Assay for the study of human cancer cell invasion and metastasis. *Fibrinolysis* 1992;6:71-76.
 39. Carmichael J, De Graff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 1987;47:936-942.
 40. Newton MA, Kendzioriski CM, Richmond CS, Blattner FR, Tsui KW. On differential variability of expression ratios: improving statistical inference about gene expression changes from microarray data. *J Comput Biol* 2001;8:37-52.
 41. Gallo O, Franchi A, Magnelli L, Sardi I, Vannacci A, Boddi V, et al. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with VEGF expression in head and neck cancer. Implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Neoplasia* 2001;3:53-61.
 42. Cooper RA, Wilks DP, Logue JP, Davidson SE, Hunter RD, Roberts SA, et al. High tumor angiogenesis is associated with poorer survival in carcinoma of the cervix

- treated with radiotherapy. *Clin Cancer Res* 1998;4:2795-2800.
43. Min BS, Sohn WS, Jang KT, Lee SW, Kim HB, Lee YW, et al. Cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in invasive cervical cancer. *Korean J Obstet Gynecol* 2002;45:399-403.
 44. Kato Y, Yamashita T, Ishikawa M. Relationship between expression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 and invasion ability of cervical cancer cells. *Oncol Rep* 2002;9:565-569.
 45. Iwasaki M, Nishikawa A, Fujimoto T, Akutagawa N, Manase K, Toshiaki E, et al. Anti-invasive effect of MMI-166, a new selective matrix metalloproteinase inhibitor, in cervical carcinoma cell lines. *Gynecol Oncol* 2002;85:103-107.
 46. Sheng H, Shao J, Washington MK, DuBois RN. Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. *J Biol Chem* 2001;276:18075-18081.
 47. Subbaramaiah K, Altorki N, Chung WJ, Mestre JR, Sampat A, Dannenberg AJ. Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by p53. *J Biol Chem* 1999 16;274:10911-10915.
 48. Sohn WS, Kim SJ, Liu LH, Kim B, Park JY, Kang JB, et al. Cyclooxygenase-2 expression in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Korean J Obstet Gynecol* 2000;43:611-615.
 49. Bertucci F, Houlgatte R, Granjeaud S, Nasser V, Loriod B, Beaudoin E, et al. Prognosis of breast cancer and gene expression profiling using DNA arrays. *Ann N Y Acad Sci* 2002;975:217-231.

Abstract

Biological characteristics of cervical carcinoma cell lines according to human papillomavirus infection and cyclooxygenase-2 expression

Eun Ji Chung

*Department of Medicine or Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Gwi Eon Kim)

It is well known that specific types of human papillomaviruses (HPV) are the principal etiologic agents for cervical cancer. Several articles have reported that cyclooxygenase-2 (COX-2) expression is a significant factor that is closely related to tumorigenesis, angiogenesis, tumor invasion, metastases and apoptosis and is an important prognostic factor in many cancers including colorectal carcinomas. Also there are several reports that the risk of colorectal carcinoma was reduced with the use of the COX-2 inhibitor in familial adenomatous polyposis. Recent several studies reported the significant relationship between the COX-2 overexpression and poor prognosis in cervical carcinomas. So we got interests in the mechanism of COX-2 expression, its biological characteristics and the relation between COX-2 and unfavorable treatment results in the cervical carcinomas. In this study, we analyzed the several biologic features of four cervical carcinoma cell lines according to HPV infection and COX-2 positivity. We also analysed the expression of gene profiles of four cell lines using cDNA microarray, especially genes related to COX-2 signaling pathway. The following results were obtained.

1. The results of HPV typing by DNA chip in the cervical carcinoma cell lines are followings: HeLa: HPV 18(+), SiHa: HPV 16(+), CaSki: HPV 16(+), C33A: HPV(-)

2. The expression of COX-2 protein in three HPV positive cell lines were up-regulated but was down-regulated in HPV negative C33A cell line. Based on these results, we classified four cervical carcinoma cell lines into HPV(+)/COX-2 (+) versus HPV(-)/COX-2(-) cell lines.

3. We evaluated the biological characteristics of four cervical carcinoma cell lines including cell growth, cell motility, in-vitro colony forming activity, and expression

of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2). There were no differences between the cell growth rate and motility but there were significant differences in in-vitro colony forming activity and overexpression of MMP-2 among HPV(+)/COX-2(+) cell lines and HPV(-)/COX-2(-) cell line.

4. Also we evaluated the sensitivities of cell lines to chemotherapeutic agents (cisplatin and 5-FU) and radiation by MTT assay. HPV(-)/COX-2(-) C33A cell line was significantly sensitive to both chemotherapeutic agents and radiation than the other 3 cell lines.

5. We analysed the gene expression profiles of four cell lines using cDNA microarray. The data revealed that HPV(-)/COX-2(-) C33A cell line showed significantly different expression of gene profiles in comparison to other three HPV (+)/COX-2(+) cell lines. COX-2 protein related genes among the significant genes were specified as followings. Expression of EGF, EGFR, MAPK, RAB, MMP-2 were down-regulated, and cadherin-18 was up-regulated in C33A cell line.

By these results, three HPV(+)/COX-2(+) cervical carcinoma cell lines have invasive and aggressive biologic features and they are not sensitive to chemotherapeutic agents and radiation. And HPV(-)/COX-2(-) C33A cell line had less aggressive, relatively chemosensitive and radiosensitive nature than HPV (+)/COX-2(+) cell lines. We suggest that these findings can be used usefully as basic information in further studies of COX-2 in chemoprevention, diagnosis and treatment in cervical carcinoma.

Key Words: cervical cancer, human papillomavirus (HPV), cyclooxygenase-2 (COX-2)