

구강편평세포암 세포주QLL-2에서
Caveolin-1의 발현이
Cisplatin 감수성과 MMP-9 발현
및 활성화에 미치는 효과

연세대학교 대학원
의학과
김 재 원

구강편평세포암 세포주QLL-2에서
Caveolin-1 의 발현이
Cisplatin 감수성과 MMP-9 발현
및 활성화에 미치는 효과

연세대학교 대학원
의학과
김 재 원

구강편평세포암 세포주QLL-2에서
Caveolin-1 의 발현이
Cisplatin 감수성과 MMP-9 발현
및 활성화에 미치는 효과

지도교수 최 은 창

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2011 년 6 월

연세대학교 대학원

의학과

김 재 원

김재원의 박사 학위논문으로
인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2011 년 6 월

감 사 의 글

이 논문이 완성되기까지 세심한 지도와 배려로 이끌어 주신 최은창 선생님께 깊은 감사의 말씀을 드립니다. 또한 각별한 관심과 평상 시 조언을 아끼지 않으신 이원상 선생님과 김영모 선생님, 박창신 선생님, 그리고 논문의 세세한 부분까지 신경 써 주신 박전한 선생님께도 감사 드립니다.

그 동안 모든 선생님들의 애정 어린 관심과 따끔한 일침으로 제가 이 자리에 있음에 다시 한 번 깊은 감사의 말씀을 올리며 그 감사의 마음을 이 논문에 담고 싶었습니다.

그리고 어려운 시기에 많은 도움을 주신 인하대 이비인후과 김규성 선생님과 약리학 강주희 선생님, 그리고 바쁜 와중에도 마지막까지 도움을 준 인하대 이비인후과 오윤석 선생님께도 고마움을 전합니다.

저자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 연구 대상 및 방법	9
1. 세포배양	9
2. 시약 전처리 및 단백질 분리	9
3. Western blotting	9
4. QLL-2 세포에서 cisplatin 농도에 따른 세포사 측정.....	10
5. QLL-2 세포에서 cisplatin 농도에 따른 caveolin-1의 발현 변화	10
6. Caveolin-1 siRNA 처리한 QLL-2 세포에서 caveolin-1의 발현 억제에 의한 cisplatin 농도에 따른 세포사 측정	11
7. Caveolin-1 siRNA 처리한 세포 QLL-2 에서 MMP-9의 발현과 활성화 측정	11
8. 산화질소에 의한 caveolin-1의 발현 변화와 이에 따른 MMP-9의 활성화 측정	12
III. 결과	13
1. Cisplatin에 의한 QLL-2 세포 세포사 유도	13
2. QLL-2 세포에서 cisplatin에 의한 caveolin-1의 발현 변화	14
3. QLL-2 세포에서 caveolin-1 발현 억제가 cisplatin에 의한 세포사에 미치는 영향	16
4. QLL-2 세포에서 caveolin-1 발현 억제가 MMP-9의 발현과	

활성화에 미치는 영향	18
5. QLL-2 세포에서 산화질소 공여체 NONOate 처리에 따른	
caveolin-1의 발현 변화 및 이에 따른 MMP-9의	
활성화에 미치는 영향	19
IV. 고찰	21
V. 결론	27
참고문헌	28
Abstract	32

그림 차례

Fig 1. Growth inhibition of QLL-2 cells by cisplatin	13
Fig 2. Effect of cisplatin treatment on the expression of caveolin-1 in QLL-2 cells	14
Fig 3. Effect of suppression of caveolin-1 expression by siRNA on the growth inhibition induced by cisplatin in QLL-2 cells	16
Fig 4. Effect of suppression of caveolin-1 expression by siRNA on MMP-9 expression and activity in QLL-2 cells	18
Fig 5. Effect of NONOate treatment on the expression of caveolin-1 and MMP-9 activity in QLL-2 cells	19

구강 편평세포암 세포주 QLL-2 에서 Caveolin-1 의 발현이

Cisplatin 감수성과 MMP-9 발현 및 활성화에 미치는 효과

서론: Caveolae는 세포 내로의 세포내 이입과 신호전달 등에 매우 중요한 역할을 하는 구조이다. 그 안에 존재하는 caveolin-1은 종양에서 항성장 작용(anti-proliferative function)에 많은 관여를 하고 있는 것으로 알려져 있다. 종양에서 caveolin-1의 생물학적 기능은 원발 병소 조직과 병변의 병기에 따라 종양 억제자와 종양 촉진자로서 양면성을 취하고 있듯이 다양하다. 그러나 아직까지 편평세포암이 주종을 이루고 있는 두경부암 치료에 caveolin-1이 어떠한 역할을 하는 지에 대해서 알려진 연구가 별로 없는 상태이고, 전이와의 연관성을 보고한 논문은 드문 상태이다. 따라서 본 연구에서는 caveolin-1 양성 구강편평세포암 세포주 QLL-2에서 1) cisplatin 농도에 따른 세포사, 2) cisplatin 농도에 따른 caveolin-1의 발현, 3) caveolin-1 knockdown QLL-2 세포에서 cisplatin 농도에 따른 세포사, 4) caveolin-1 knockdown QLL-2 세포에서 MMP-9의 발현과 활성화, 5) 산화질소를 처리한 QLL-2 세포에서 caveolin-1의 발현과 MMP-9의 활성화를 조사함으로써 구강암 치료에 도움을 주고자 하였다.

결과: Cisplatin 의 농도를 0.02 $\mu\text{g/ml}$ 부터 10 $\mu\text{g/ml}$ 까지 증가할 때, 농도 의존적으로 세포사가 증가함을 확인할 수 있었던 반면에, cisplatin 농도 의존적으로 caveolin-1 발현이 적게 발현하는 것을 관찰하였다. Caveolin-1 의 발현이 cisplatin 에 의한 QLL-2 세포의 세포사 및 MMP-9 의 발현과 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위해, QLL-2 세포에서 siRNA 로

caveolin-1 의 발현을 억제한 결과, cisplatin 에 의한 세포사가 증가한 반면, MMP-9 의 발현 및 활성화가 모두 감소하는 것을 확인하였다. 산화질소에 농도의존적으로 caveolin-1 의 발현이 감소되어 산화질소를 투여한 군에서 산화질소를 투여하지 않은 군보다 MMP-9 의 활성화가 더 많이 감소하였다.

결론: Caveolin-1 발현 구강 편평세포암 세포 QLL-2 에서 caveolin-1 발현 억제가 cisplatin 에 의한 세포사를 증가시키고, MMP-9 발현과 활성화를 억제하여 caveolin-1 이 세포증식과 전이에 관여하는 것으로 나타났으며, 종양증식과 신혈관생성에 관여된다고 알려진 산화질소 존재 시에는 역상관관계를 보였다. 이러한 결과는 caveolin-1 이 종양 성장 측면에서 볼 때 종양촉진자로서의 역할을 하고 있음을 알 수 있었다.

구강암은 환자 별로 특성이 다양하기 때문에 화학요법 약물들의 효과를 높이고 독성을 줄이며 치료 효과를 높이기 위해서는 분자 표지자를 찾는 것이 중요한데, 본 연구를 통하여 caveolin-1의 특성 상 cisplatin에 대한 감수성과 MMP-9 활성도를 예측할 수 있는 구강암 치료의 표적 중 하나로서의 가능성을 제시할 것으로 사료되었지만, 좀 더 정확한 분자 표지자로서의 caveolin-1의 역할을 알기 위해서는 임상적인 자료와 연계한 연구가 필요하리라 사료된다.

핵심 되는 말: caveolin-1, cisplatin, 구강편평세포암, 세포사, MMP-9, siRNA

구강 편평세포암 세포주 QLL-2에서 Caveolin-1의 발현이
Cisplatin 감수성과 MMP-9 발현 및 활성화에 미치는 효과

<지도교수 최 은 창>

연세대학교 대학원 의학과

김 재 원

I. 서론

Caveolae는 전자현미경에 의해 처음 관찰된 세포구조물로서, 그 크기가 50 ~ 100 nm정도인 세포막의 함입된 소포체(membrane invaginated vesicles)로 정의되었다¹⁻⁵. 그러나 계속된 연구로 형질막(plasma membrane)에 연결된 함입 소포체뿐만 아니라, 형질막에서 떨어져 나온 소포체와 그 소포체들의 연합으로 그 정의의 범위가 확대되었다. 소포체의 연합은 로제트(rosette)를 형성하거나, 포도송이 등의 모양을 형성한 것에서부터, 관모양(tubule)에 이르기까지 다양한 형태를 취한다⁶.

최근 여러 연구에 의하면 caveolae는 molecule의 세포내 이입과 신호전달 등에 매우 중요한 역할을 하는 구조이다⁶⁻¹¹. 세포막 함입의 구조물인 caveolae는 caveolin이라는 단백질 표지와 함께 존재하는 특징을 가지고 있다¹. Caveolae의 주요 구성성분으로서 caveolin-1, -2, -3가 있으며, 이들은 호모 올리고머 또는 헤테로 올리고머를 이루어 caveolae 구조를 형성한다. 이러한 구조적 특성을 이용하여 caveolae/caveolin은 vesicular transport에 중요한 역할을 하고 있다. 여기에는 모세혈관에서 간질 구역(interstitial compartment)으로 이동시키는 transcytosis², 이동시키려는 물질을 소포체에 함입하여 세포 내로 이동하는 endocytosis¹², 1 kDa 보다

작은 물질을 소포체의 형성 없이 caveolae 의 안에 담았다가 세포 내로 확산시키는 protocytosis¹² 의 기전이 관여된다. Caveolin-1 과 -2 는 내피세포, I 형 폐세포, 그리고 지방세포 등에서 높은 발현율을 보이는 반면에, caveolin-3 는 근육에서 특이적으로 발현된다^{4,5,7,9,13,14}. Caveolae/caveolin 은 여러 가지 신호 전달 체계의 조절인자로 알려져 있는데, 여기에는 caveolae 가 신호 전달 단백질(signal transduction protein)과 동시 위치하는 현상인 colocalization 기전과 이들 신호 전달 단백질과 caveolin 의 결합에 의한 기전이 있다². 그 중 caveolin-1 은 조절단백질(regulatory protein)로서 G-protein α subunit, H-Ras, Src-family tyrosine kinases, protein kinase C isoforms, EGF receptor 및 eNOS 와 상호작용하여 신호전달체계에서 항조절(negative regulatory) 역할을 수행한다고 알려져 있다^{10,15}. 이러한 caveolae/caveolin 이 가지고 있는 기능적 특성들 때문에 최근에는 동맥경화증, 심장병, 폐질환, 근육이영양증, 지방이영양증, 당뇨, 인슐린 저항증, 노화 등과 같이 많은 질병과의 관련성을 입증하고자 하는 연구가 진행 중이며, 또한 그 연관성들이 입증되고 있다^{1,7,14}.

Caveolin-1의 항성장 작용(anti-proliferative function)은 caveolin-1이 성장세포주기 조절인자인 cyclin D1을 억제함으로써 세포 성장을 조절하는 것으로 알려진 이후, 종양발생에 직접적으로 관여함을 암시하게 되었다⁷. 종양에서 caveolin-1은 CD44와 과립구대식구집락자극인자 (granulocyte/ macrophage-colony stimulation factor)가 종양형성과정에서 이중 작용을 하는 것과 같이, caveolin-1의 발현 수위는 목표 조직과 병변의 병기에 따라 종양 억제자와 종양 촉진자로서 양면성을 취하고 있다^{6,10,11,16~18}. 이전 연구에서 caveolin-1의 발현저하가 구강암, 여포상 갑상선암, 유방암, 폐암, 대장암, 자궁경부암, 육종 등 다양한 암 종류에서 나타나며, 이는 caveolin-1은 종양 억제자로서 역할을 한다는 것을 의미한다^{10,19,20}. 갑상선암인 경우 유두상 갑상선암보다 여포상 갑상선암일 때 하향 조절되어 이 두 종양형성에 다른 작용을 하고, 이 두 암종을 구별하는데 도움을 준다고 하였다²⁰. 종양 억제자로서의 증거로는 섬유세포에서 종양유전자가 과발현될 때 caveolin mRNA, caveolin

단백질, caveolae가 감소되고, 유방암에서 caveolin-1 유전자가 상향 조절되면 표현형 형질전환 (phenotypic transformation)이 감소되지만, caveolin-1이 소실되면 종양형성과정에서 전이가 촉진된다. 또한 caveolin-1, -2가 D7S522 locus에 같이 공존하는데 그 부위가 암세포 중 25%에서 결손을 보인다^{10,18}. 반면에, caveolin-1의 과다발현 역시 유방암, 전립선암, 난소암, 유두상 갑상선암 등 다양한 암종에서 발견되는데^{8,10,16}, 유방암의 경우 caveolin-1은 종양 세포 성장을 억제하고, 육종의 군집 형성을 감소시킨다. 전립선 암종에 caveolin-1의 높은 발현은 종양의 진행과 관련이 있으며, 환자의 생존력을 감소시킨다는 보고가 있다²¹. 또한 caveolin-1의 발현은 폐 편평세포암종 환자의 예후를 예측하는 인자로서 작용할 수 있다^{15,22}.

일반적으로 종양의 악성도, 침습도 및 전이 여부는 종양의 예후를 결정하는 독립적인 인자로 이용되어 왔으며 이들 중에서 종양의 전이와 진행에 세포외 기질 분해효소의 역할과 유전자의 조절기구가 중요하게 작용한다고 알려져 있다. 종양의 침습과 전이 과정 중에 악성 종양세포는 원발 병소 및 전이 병소에서 기저막과 혈관의 내피세포층을 뚫고 침습하므로 종양의 악성화 진행과정에는 장애물이 되는 기저막과 세포외 기질의 파괴가 필수적 요소이다²³. Caveolin-1이 세포 침윤과 전이에 많은 영향을 미치는 것으로 되어 있다. 식도 편평세포암종에서 caveolin-1의 발현 유무에 따라 림프절 전이 양상을 비교한 결과, caveolin-1의 발현이 있었던 종양인 경우 림프절 전이가 많아 림프절 전이의 표식인자로 활용할 수 있다고 하였다¹⁶. 또한 폐암에서 caveolin-1 발현도에 따른 림프절 전이 양상을 살펴 보면, 주변 림프절 전이가 없는 종양에서는 caveolin-1이 거의 나타나지 않은 반면, 림프절 전이가 있는 폐암인 경우 원발병소에서 caveolin-1의 발현도가 증가하였다¹⁷. Caveolin-1 발현이 없는 암세포인 경우 caveolin-1 발현이 상향 조절되면 암세포의 이동 능력 특히 침윤 능력이 증가한다고 하여 caveolin-1 발현이 증가함으로 해서 암세포의 침윤 능력이 좋아져 림프절 전이에 영향을 미친다는 보고도 있다¹⁷. 유방암인 경우 16%에서 codon 132에 있는 caveolin-1 유전자에서 변이가 있다고 하였다. 변이가 있는

암세포인 경우 형질전환을 일으켜 유방암 형성과정에 영향을 미쳐 암세포 침윤능력이 증가한다고 하였다²⁴. 전립선암인 경우 caveolin-1의 발현도가 높은 경우 수술 절제연 종양양성과 림프절 전이가 더 많음을 보였다⁸.

기저막과 세포외 기질의 파괴 기전에 관여하는 효소 중 가장 대표적인 강력한 단백 분해효소로 기질 금속단백분해효소(matrix metalloproteinase: MMP)를 들 수 있다. 이 MMP는 현재까지 8종류가 알려져 있으며, 그 중 분자량 72 kDa, 92 kDa의 type IV collagenase에 해당하는 MMP-2와 MMP-9은 기저막의 주요 성분인 제 4 형 콜라겐과 젤라틴, 라미닌을 분해하는 효소로 위장관, 간, 췌장 및 담도계, 요로계, 신경계, 생식기 종양 등 거의 모든 악성 종양의 침윤과 전이 과정에 관여한다는 보고가 있다. 결장암, 폐암, 뇌종양, 난소암, 췌장암 등에서 발현이 증가되는 경우 종양의 침윤과 전이와 상관관계가 있어서 MMP의 발현 증가는 보다 심한 악성도를 의미하는 예후 인자로 보고되고 있다^{15,23}. 그러나 아직까지 편평세포암이 주종을 이루고 있는 두경부암에서 치료 효과에 대한 caveolin-1의 역할에 대해서는 연구가 미비한 상태이고, 전이와의 연관성을 보고한 논문은 드문 상태이다.

Nitric oxide synthase (NOS)에는 3가지 아형이 알려져 있다. Neuronal NOS (nNOS)는 주로 중추 및 말초신경조직에서 검출되며 새로운 신경전달 물질로서 알려져 있으며, inducible NOS (iNOS)는 대식구, 호흡상피세포 등 다양한 조직에서 발견되는데 다른 세포생물학적 기능과 함께 면역조절과 세포독성 기전에 관여하는 것으로 알려져 있다. Endothelial NOS (eNOS)는 혈관내피에서 발견되며 혈관 평활근의 혈관이완 작용에 관여한다²⁵. eNOS는 종양의 초기 성장 시작 및 유지에 중요한 역할을 하고, 전이 병변의 착상과 안정에도 영향을 미친다. 또한 간암 생성에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹⁸. 또한 간암 생성에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁶. 암종의 증식에서 산화질소(nitric oxide: NO)는 일부 종양에서 신혈관생성을 촉진시켜 종양 형성 초기와 유지에 중요한 역할을 하며, 혈관내피세포로의 종양세포 부착을 매개함으로써,

또는 혈관 투과성을 증진시킴으로써 그 역할을 수행한다^{18,24,27}. 또한 다른 방법으로는 p53돌연변이를 유도하거나²⁸, heat shock protein 70을 유도²⁹하여 원발 암종의 급속한 성장을 유발시킬 뿐 아니라 타부위의 전파에도 역할을 하며 실제로 실험적 연구에서 NOS 활성도가 높은 암종에서 보다 빨리 성장함이 확인되었다²⁶. 하지만, NO가 종양을 억제한다는 보고도 많다. p53 발현을 증가하여 세포사멸을 촉진하여 종양을 억제한다는 보고도 있고³⁰, 종양혈관형성을 억제하여 종양증식을 억제하거나³¹, 전이를 억제하여 종양을 억제한다는 보고³²도 있다. 이와 같이 NO가 종양 성장과 억제에 대해 상반된 결과를 보이는 보고들이 많다. NO가 종양발생 및 성장에 미치는 영향에 대한 연구결과를 종합하면 암종의 성장이란 측면에서 NO는 세포 괴사와 종양세포 증식의 매개체로서 이중적인 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 NO가 종양 성장과 억제에 대해 상반된 결과를 보이는 보고들이 많다. 즉, 한 쪽은 종양발생 및 성장을 촉진한다는 결과이고, 다른 쪽은 반대의 결과를 보여준다²⁶. 이런 상반된 결과가 나오는 이유를 몇 가지 들 수 있다. NO 농도, NO 노출기간, NO 생성장소, NOS의 종류, 실험조직의 NO에 대한 민감성, superoxide 생성여부 등이다²⁶.

NO와 caveolin-1의 상관관계는 혈관생성과정에서 아직 caveolin-1의 역할에 대한 연구가 부족하지만, 제대정맥내피세포를 이용한 혈관생성 실험²²과 자궁 동맥³³이나 뇌혈관³⁴을 이용한 동물 실험에서 NO가 caveolin-1의 활성도를 억제하는 것으로 보고되고 있다^{7,25}. 또한 근육 세포주를 이용한 실험에서도 NO가 caveolin-1을 억제하는 것으로 되어 있다³⁵. 하지만 종양 내에서의 NO가 caveolin-1에 대해 미치는 영향을 비롯한 상관관계에 대해서는 아직 연구가 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 caveolin-1 양성 구강암 세포주 QLL-2 에서 1) cisplatin 처리에 따른 caveolin-1 의 발현변화와 2) 이에 따른 세포사를 측정하고, 3) siRNA 에 의한 caveolin-1 발현 억제가 cisplatin 에 의한 세포사에 미치는 영향을 조사하고, 4) MMP-9 의 발현과 활성화에 미치는 영향을 조사하고, 5) 세포내 NO 가 caveolin-

1 의 발현과 MMP-9 의 활성화에 미치는 영향을 조사하여 caveolin-1 이 구강암 치료의 표적분자가 될 수 있는가에 도움을 주고자 하였다.

II. 연구 대상 및 연구 방법

1. 세포배양

본 연구에 사용된 QLL-2는 인간 구강편평세포암종의 전이 림프절에서 기원한 세포로, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center의 Dr. Shah로부터 기증받은 세포로 caveolin-1 발현 세포주이다. 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Grand island, NY, USA), 1% 항생제 (penicillin/streptomycin, Gibco), 3.7 g의 sodium bicarbonate (Sigma, St. Louis, MO, USA)가 첨가된 DMEM 배양액 (Gibco)을 100 mm 세포배양 dish (TPP, Trasadingen, Switzerland)에 넣고 37℃ CO₂ incubator에서 배양하였다.

2. 시약 전처리 및 단백질 분리

시약의 stock solution을 serum free DMEM에 희석하여 QLL-2 세포에 처리하였다. 처리가 끝난 QLL-2 세포는 차가운 1 x PBS로 2~3회 세척한 후 얼음에 박은 상태에서 긁어서 모았다. 모은 세포는 4℃에서 13,000 rpm으로 10분 간 원심분리하였다. 원심분리로 얻어낸 세포들에 단백질 분해효소 억제제 (1 mM DTT, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml trypsin inhibitor, 2 µg/ml aprotinin, 1 mM PMSF, 1 µg/ml pepstatin)가 포함된 NOS buffer (320 mM sucrose, 200 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7.2)를 넣고 4℃에서 초음파기를 이용하여 세포막을 파쇄하였다. 파쇄한 시료는 BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용해 단백질을 정량하였다.

3. Western blotting

QLL-2세포에서 발현되는 caveolin-1과 인산화된 caveolin-1의 발현 정도를 측정하기 위해 Western blotting 을 실시하였다. 위에서 얻은 시료 단백질을 25 µg을 100℃에서 10분간 가열한 후, 8~16% Tris-glycine gradient gels (Novex, Invitrogen, Breda, Netherlands)에서 125 V로 전기영동에 하여 단백질을 분리하였다. 전기영동된 단백질은 15 V, 4℃에서 하룻밤 동안 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane

(Millipore, Miliford, MA, USA)으로 이동시켰다. 전기영동된 membrane은 blocking buffer (TBS-T 용액에 녹인 5% nonfat milk)로 1시간 동안 처리하여 항체와의 비특이적 결합을 억제시켰다. 다클론 항체인 phosphor-Cav-1 항체 (Cell signaling, Beverly, MA, USA)와 caveolin-1 (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA)를 각각 상온에서 2시간, 1시간 동안 반응시켰다. TBS-T (0.1% Tween 20, 10 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8.0)로 5분씩 5회 세척 후, 1000배로 blocking buffer에 희석된 2차 항체 (anti-rabbit IgG-HRP, Pierce)를 각각 상온에서 1시간, 30분 동안 반응시켰다. TBST로 다시 5분씩 5회 세척한 후 ECL solution(Pierce)에 membrane을 2분간 반응시킨 후, 암실에서 X-ray film (Kodak, Rochester, NY, USA)에 감광하였다. X-ray film은 developing, fixing, washing 과정을 거쳐 caveolin-1의 발현과 인산화 정도를 분석하였다.

4. QLL-2 세포에서 cisplatin 농도에 따른 세포사 측정

QLL-2 세포주에서 cisplatin에 의한 세포사를 측정하기 위해 96 well plate에 세포를 4000/well로 깔고 cisplatin을 0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 부터 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 농도 별로 처리한 후, MTT assay를 통하여 세포증식 정도를 비교하였다. MTT assay는 MTT formazan 생성을 570 nm에서 측정한 흡광도를 비교하여 결정하였다. Cisplatin에 대한 감수성은 약제를 처리하지 않은 well의 흡광도에 대한 약제처리 well에서 흡광도의 백 분율로 비교하였다. 각각의 흡광도는 3회에 걸쳐 실시한 실험의 평균값으로 정하였다.

5. QLL-2 세포에서 cisplatin 농도에 따른 caveolin-1 의 발현 변화

구강암 세포주에서 cisplatin 농도에 따른 caveolin-1 의 발현 변화를 측정하기 위해 cisplatin 을 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 부터 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 농도 별로 처리한 후 western blotting 을 실시하였다. 구강암 세포주에서 caveolin-1 의 발현 정도를 분석하기 위해 세포를 60 mm plate 에 2×10^5 cell/plate 로 깔고 24 시간 후 세포를 radioimmunoprecipitation assay (RIPA) lysis buffer 로 모은 후 초음파파쇄기로 세포를

분쇄하였고, $1000\times g$ ($4^{\circ}C$)에서 10 분간 원심분리하여 단백질을 추출한 후 BCA 법으로 단백질농도를 측정하여 western blot 에 이용하였다.

6. Caveolin-1 siRNA 처리한 QLL-2 세포에서 caveolin-1 의 발현 억제에 의한 cisplatin 농도에 따른 세포사 측정

Caveolin-1 발현 정도에 대한 cisplatin 의 반응 효과를 알아보기 위해 caveolin-1 의 발현을 RNA silencing 방법으로 caveolin-1 을 일시적 knock-down 시킨 QLL-2 세포에서 cisplatin 에 의한 세포사의 변화를 대조군과 비교하여, caveolin-1 의 암세포 증식 및 사멸에서의 기능을 탐구하였다.

siRNA 방법은 QLL-2 세포들을 Santa Cruz® Biotechnology로부터 구입한 caveolin-1 siRNA와 control siRNA를 Lipofectamine 2000 (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 세포 안으로 transient transfection시켰다. Transfection 4-6 시간 후에 transfection 용액을 제거하고 fresh media로 교환한 후 5% CO₂ incubator에서 18-24시간 동안 안정화시켰다. 안정화된 세포를 모은 후 caveolin-1의 발현 정도를 western blotting 으로 확인하였다. Caveolin-1의 발현이 cisplatin에 의한 세포사에 미치는 영향을 알아보기 위해 siRNA로 caveolin-1 발현 억제시킨 QLL-2 세포에 1 $\mu g/ml$ 부터 10 $\mu g/ml$ 까지 농도 별로 cisplatin을 처리한 후 MTT assay를 통해 세포사를 측정하였다.

7. Caveolin-1 siRNA 처리한 세포 QLL-2 에서 MMP-9 의 발현과 활성화 측정

Caveolin-1의 발현이 MMP의 발현 및 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위해 대조군과 siRNA 처리 실험군에서 MMP의 발현 및 활성도를 western blot 및 zymography 법으로 분석하였다.

Zymography를 약술하면, 6 well plate에 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액을 이용하여 세포를 1×10^6 cells/well의 농도로 24 시간 동안 부착시킨 후 FBS가 없는 무혈청 배양액으로 갈아준 다음, 24 시간

후 무혈청 배양액을 효소액으로 하여 deionized water 5 μ l와 novex Tris-Glycine SDS sample buffer (2X)를 같이 10% zymogram gel (30% acrylamide 3.3ml, 1.5M Tris, pH 8.8 2.5ml, 10% SDS 0.1ml, 10% ammonium persulfate 0.1ml, gelatin 0.1ml, TEMED 0.004ml)에 넣어 전기영동하였다. 상온에서 120 V로 2시간 전기영동이 끝난 후에 gel은 SDS를 제거하기 위해 washing buffer (2.5% Triton-X 100, 50 mM Tris-HCl, pH 7.9) 용액으로 30분간 2회 세척한 후 반응액(5 mM CaCl₂, 1 mM ZnCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 7.9)에 18시간 동안 37°C에서 반응시키기질분해를 유도하였다. Gel을 0.25% Coomassie brilliant blue G (Bio-rad, Hercules, CA, USA) 용액으로 1시간 염색하고 5% methanol과 8% acetic acid로 탈색하여 band density를 분석하였다.

8. 산화질소에 의한 caveolin-1 의 발현 변화와 이에 따른 MMP-9 의 활성화 측정

산화질소 공여체 (NONOate)를 QLL-2 세포에 처리하여 산화질소에 의해 caveolin-1 의 발현이 변화하는지를 western blot 으로 분석하였다. 약 12 시간 동안 산화질소 공여체를 0 μ M 부터 500 μ M 까지 처리한 후 세포를 lysis buffer (Hepes buffer, pH 7.2, 250 mM sucrose, 1 mM EDTA)에서 파쇄기로 분쇄한 후 1000 $\times$ g (4°C)에서 10 분간 원심분리하여 단백질을 추출한 후 BCA 법으로 단백질농도를 측정하여 western blot 에 이용하였다.

NONOate 에 의한 caveolin-1 발현 변화가 MMP-9 의 활성화에 미치는 영향은 500 μ M NONOate 를 12 시간 처리한 후 NONOate 전처리에 대한 MMP-9 의 활성화를 zymography 를 통해 관찰하였다.

III. 결과

1. Cisplatin 에 의한 QLL-2 세포 세포사 유도

Cisplatin 에 의해 구강암 편평상피세포암 유래 QLL-2 세포에서 세포사가 유도되는지를 알아보기 위해 QLL-2 세포에 cisplatin 농도를 0 에서 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 증가하여 24 시간 처리한 후 MTT assay 를 통하여 세포 증식 억제를 측정하였다. Cisplatin 을 처리하지 않았을 때와 비교하여 처리했을 경우 농도에 비례하여 세포증식억제가 일어남을 확인할 수 있었다. (Fig.1)

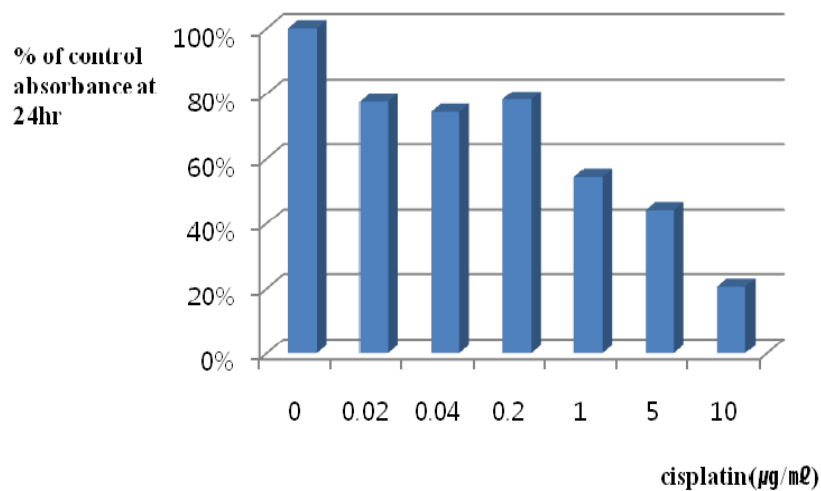


Fig.1. Growth inhibition of QLL-2 cells by cisplatin.

QLL-2 cells growing in 96 well plate (10^4 cells/well) were incubated with different concentrations of cisplatin for 24 h. Cell growth was determined by MTT assay. The data shown are the mean from 3 independent experiments.

2. QLL-2 세포에서 cisplatin에 의한 caveolin-1의 발현 변화

QLL-2 세포에서 cisplatin에 의한 caveolin-1 발현 변화를 조사하기 위해 QLL-2 세포에 cisplatin의 농도를 0에서 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 증가하여 24 시간 처리한 후 caveolin-1의 발현 정도를 western blot을 통해 관찰하였다. Cisplatin 농도를 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 증가하였던 경우에는 caveolin-1의 발현도에 별 차이를 보이지 않았다. Cisplatin의 농도를 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상으로 증가하였던 경우 caveolin-1의 발현이 현저하게 감소된 것을 확인하였으며, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리하였던 경우에는 caveolin-1이 거의 발현되지 않았다. 이는 QLL-2 세포에서 caveolin-1의 발현은 cisplatin 처리 농도 의존적으로 역상관계에 있다는 것을 의미한다. (Fig.2)

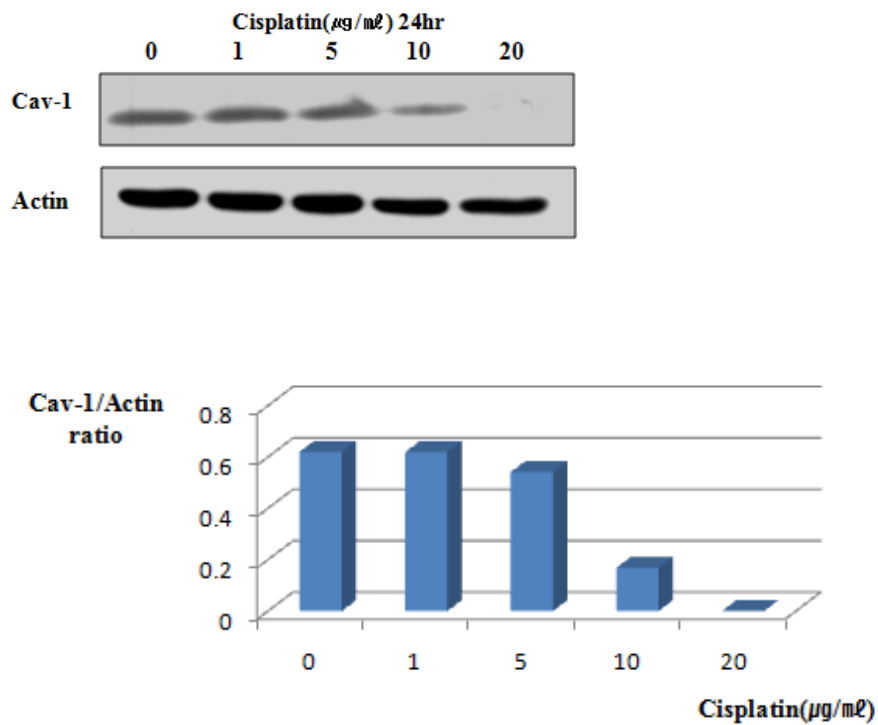


Fig.2. Effect of cisplatin treatment on the expression of caveolin-1 in QLL-2 cells.

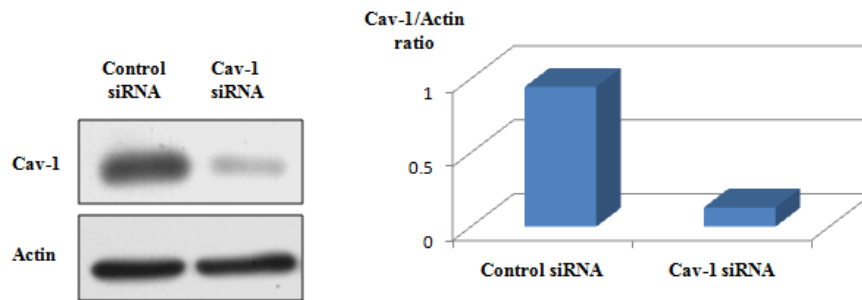
QLL-2 cells (2×10^5 cells/plate) were treated with different concentrations of cisplatin for 24h. Caveolin-1 expression was determined by western blot. Actin was used as loading controls.

3. QLL-2 세포에서 caveolin-1 발현 억제가 cisplatin에 의한 세포사에 미치는 영향

QLL-2 세포에서 caveolin-1 발현억제가 cisplatin에 의한 세포사에 미치는 영향을 조사하기 위해 QLL-2 세포에 caveolin-1 siRNA를 transient transfection 한 후 세포 증식 억제 정도를 MTT assay로 조사하였다. QLL-2에 caveolin-1 siRNA 처리한 경우 caveolin-1이 현저하게 감소되어 거의 발현되지 않는 것을 확인하였다. (Fig.3A)

siRNA를 처리하여 caveolin-1의 발현을 감소시킨 세포에서 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 부터 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 cisplatin을 농도 별로 증가시킴에 따라 비례적으로 세포증식이 억제되었으며, 그 정도는 siRNA 처리하지 않은 군에 비해 더욱 현저하였다. (Fig.3B)

A.



B.

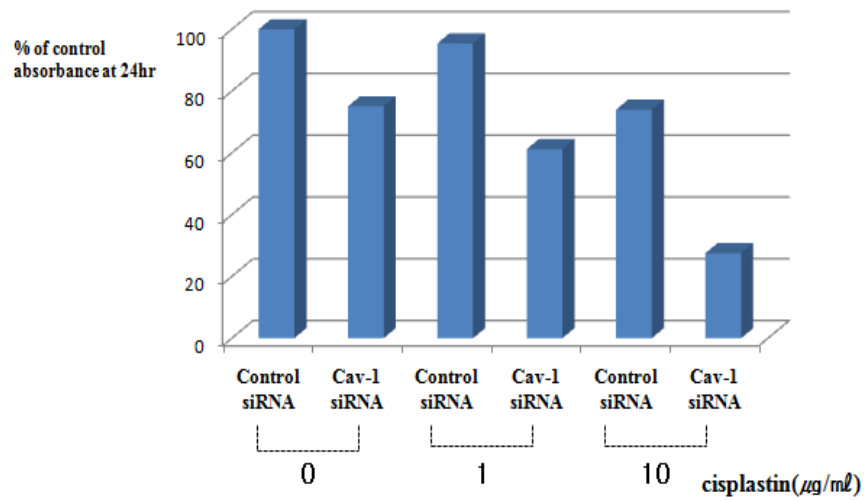


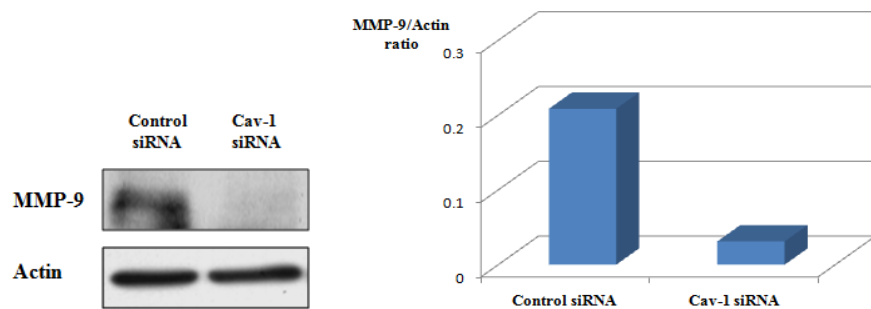
Fig.3. Effect of suppression of caveolin-1 expression by siRNA on the growth inhibition induced by cisplatin in QLL-2 cells

A. QLL-2 cells were transiently transfected with control or caveolin-1 siRNA for 18-24h. Effect of siRNA on the caveolin-1 expression was determined by western blot. Actin was used as loading controls. B. QLL-2 cells were transiently transfected with control or caveolin-1 siRNA for 18-24h, then treated with different concentrations of cisplatin for 24h. Cell growth inhibition was determined by MTT assay. The data shown are mean from 3 independent experiments.

4. QLL-2 세포에서 caveolin-1 발현 억제가 MMP-9 의 발현과 활성화에 미치는 영향

QLL-2 세포에서 caveolin-1 발현 억제가 MMP-9 의 발현 및 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위해 siRNA 처리한 세포에서 western blot 과 zymography 를 이용하여 MMP-9 의 발현 및 활성화를 알아보았다. siRNA 처리한 군에서 대조군보다 MMP-9 의 발현 및 활성화 모두 감소한 것을 확인하였다. (Fig 4A, 4B)

A.



B.

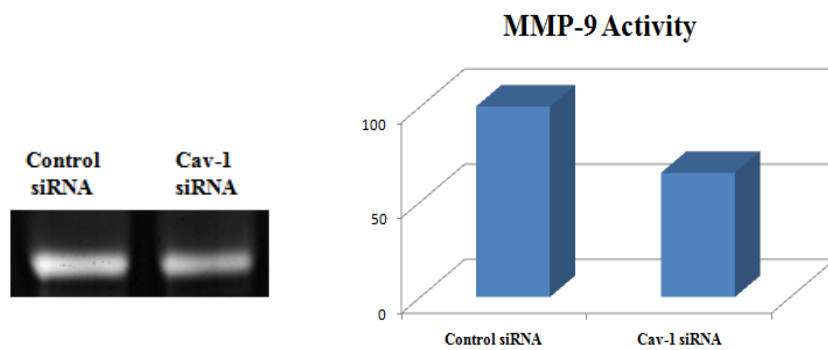


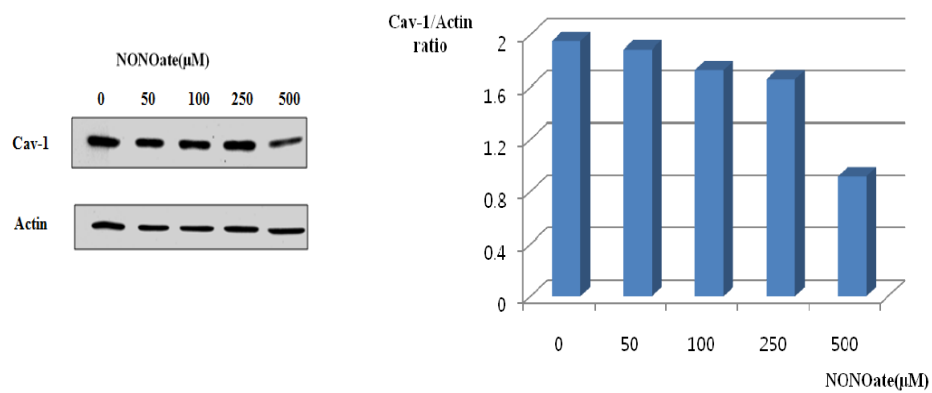
Fig. 4. Effect of suppression of caveolin-1 expression by siRNA on MMP-9 expression and activity in QLL-2 cells

QLL-2 cells were transiently transfected with control or caveolin-1 siRNA for 18-24h, then MMP-9 expression and activity was determined by western blot (A) and zymography (B), respectively.

5. QLL-2 세포에서 산화질소 공여체 NONOate 처리에 따른 caveolin-1의 발현 변화 및 이에 따른 MMP-9의 활성화에 미치는 영향

QLL-2 세포에서 세포내 산화질소에 의해 caveolin-1의 발현이 변화하는지를 알아보기 위해 산화질소 공여체(NONOate)를 처리한 후 caveolin-1의 발현을 western blot으로 분석한 결과, NONOate의 농도가 증가함에 따라 caveolin-1의 발현이 감소하였다. (Fig. 5A) NONOate 500 μ M을 12시간 전처리한 세포에서 NONOate를 투여하지 않은 군보다 MMP-9의 활성화가 더욱 감소하였다. (Fig.5B)

A.



B.

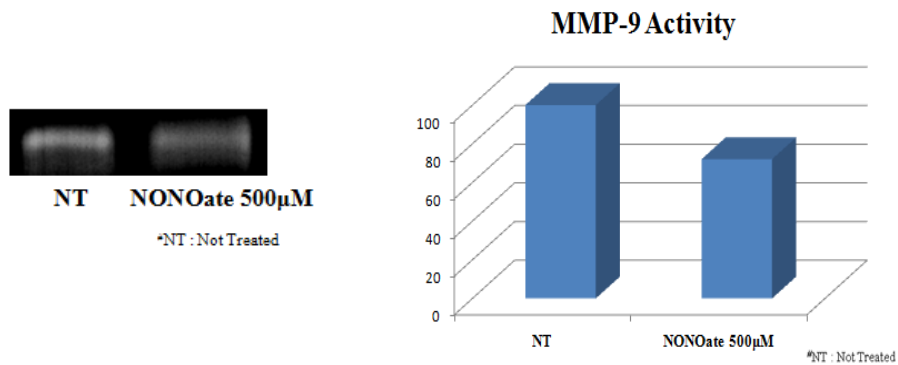


Fig 5. Effect of NONOate treatment on the expression of caveolin-1 and MMP-9 activity in QLL-2 cells.

QLL-2 cells were treated with different concentrations of NONOate for 12h. Caveolin-1 expression was determined by western blot (A). Actin was used as loading controls. QLL-2 cells were treated with NONOate 500 μ M for 12h, then MMP-9 activity was determined by zymography (B).

IV. 고찰

Caveolin-1은 caveolae를 형성하는 하나의 구조 단백질로 알려져 있으며, 이를 지령하는 유전자는 chromosome 7q31.1에 위치한 종양 억제자로 알려져 있으나^{33,34}, 종양에서 caveolin-1 발현은 원발병소 조직과 병변의 병기에 따라 종양 억제자와 종양 촉진자로서 양면성을 취하고 있듯이 다양하다^{6,10,11,16~18}. 이전 연구에서 caveolin-1의 감소된 발현은 구강암, 여포상 갑상선암, 유방암, 폐암, 대장암, 자궁경부암, 육종 등 다양한 암 종류에서 나타나며, caveolin-1은 종양 억제자로서 역할을 한다^{10,19,20}. 반면에 caveolin-1의 과다발현 역시 유방암, 전립선암, 난소암, 유두상 갑상선암 등 다양한 암종에서 발견된다^{8,10,16,24,29}. 구강 편평세포암종에서도 세포 종류에 따라 caveolin-1 발현이 억제되거나 과다하게 나타난다²¹. 구강 편평세포암종에서 caveolin-1의 발현도가 적어 종양억제자로서의 역할을 한다는 보고도 있다^{19,21}. 하지만 정상조직과 전암병변, 편평세포암종에서의 caveolin-1 발현도를 측정한 결과에서 병변이 심해질수록 caveolin-1의 발현도가 증가된다는 보고도 있다. 이로 인해 구강 편평세포암종에서도 암세포 분화와 밀접한 관계가 있음을 알 수 있다³⁶. 또한 caveolin-1 발현도가 종양의 크기, 조직 분화도, 예후와 밀접한 관계가 있다고 보고되어 편평세포암종 종양 형성과 예후에 많은 영향을 미침을 알 수 있다³⁶.

구강암의 치료에 많은 항암요법이 이용되고 있으며, 암세포 치료에 있어서 화학요법은 주된 치료 방법 중 하나이다. 그 중 cisplatin 을 이용한 요법이 가장 많이 이용되고 있다. Cisplatin (*cis*-diamminedichloroplatinum = CDDP)은 백금원자에 2개의 염소와 암모니아가 배위한, 항암작용을 나타내는 화합물로서, 백금착염이 대장균의 분열을 저지하는 것으로부터 알려졌다. 작용기전은 DNA 염기내의 구아닌과 결합하여 알킬화 항암제와 유사한 DNA 사슬의 교차결합(cross linking)을 초래하여 DNA합성을 저해함으로써 세포장해를 유발시키는 것으로 되어 있다³⁷. 많은 암에 유효성을 나타내는 뛰어난 항암제이지만, 신장에 독성을 나타내는 등의 부작용도 있다. 유도체에는 독성이 낮은 카르보플라틴이 있다. 구강

편평세포암종을 비롯한 두경부암과 고환암, 폐암, 난소암, 방광암, 자궁경부암, 위암 치료에 가장 널리 쓰이는 화학요법 약제 중 하나이다³⁷. 화학요법 치료 성공 여부가 환자 예후에 많은 영향을 미친다. 그러기 때문에 암세포에 대한 화학요법의 감수성이 중요한데 caveolin-1이 화학요법 치료 성공여부에 많은 영향을 준다. 따라서 본 연구에서는 caveolin-1의 발현이 구강암에서 cisplatin의 감수성과 어떤 연관이 있는지 살펴 보았다. 본 연구에서 Caveolin-1 발현 QLL-2 세포인 경우 cisplatin 농도를 달리 하여 세포사를 측정할 경우 cisplatin 농도를 증가하였을 때 세포사가 농도에 비례하여 잘 발생하여 cisplatin에 대해 저항성이 없었다.

종양 형성에 caveolin-1이 이원적 영향을 주는 것과 마찬가지로 caveolin-1이 화학요법 감수성에 상반된 결과를 보여준 보고들이 있다^{6,8,9,10,21}. Caveolin-1의 발현도가 좋은 구강암 세포주에서 cisplatin을 처리한 경우 caveolin-1이 있는 경우 cisplatin에 대한 반응이 증가하여 좋은 반응을 보였다²¹. 다약제내성과 연관된 단백질 (MGr1-Ag)이 caveolin-1과 공통 단백질을 만들고, 화학요법 제재인 bleomycin을 투여하면 다약제내성 단백질과 caveolin-1의 화합물과 상호작용을 일으켜 화학요법의 효과를 좋게 해준다고는 보고도 있다⁶. 하지만, 다른 연구에서는 caveolin-1이 없는 경우, 다약제내성 (multidrug resistance)이 감소하여 화학요법의 반응이 증가한다고 하였다^{9,10}. 유방암에서 발견되는 다약제내성 단백질 (BCRP)이 caveolin-1과 상호작용을 하며, caveolin-1이 BCRP 단백질 수송 활성도 조절과 BCRP를 이용하는 화학요법에 대한 내성도에 중요한 역할을 한다. Caveolin-1의 발현도를 감소시키면 BCRP의 활성도가 낮아져 BCRP를 이용하는 화학요법에 대한 내성도가 감소하여 화학요법의 효과가 증가한다. 그러므로 caveolin-1이 발현되는 정도가 다약제내성을 나타내는 좀 더 적절한 지표로 이용되기도 한다⁹. 또한 신장암세포인 경우 caveolin-1이 발현된 경우 doxorubicin에 대해 저항성과 전이도가 증가함을 보이다가 caveolin-1의 발현도가 감소되면 doxorubicin에 대한 반응이 증가하고 전이가 감소되었다. 그러므로 caveolin-1이 doxorubicin 화학요법 동안 암세포

성장과 폐전이에 중요한 역할을 한다고 보고하고 있다¹⁰. Caveolin-1의 발현이 좋은 경우 화학요법의 효과가 감소하는 이유를 세포의 노화 (senescence)측면에서 설명하기도 한다. Caveolae는 노화 세포에서 증가한다. 노화된 섬유아세포들은 세포막에 있는 많은 caveolae로 인해 신호전달체계(signaling pathway)에 영향을 미쳐 표피성장인자 (epidermal growth factor)와 같은 성장 인자에도 반응을 잘 안 한다. 빨리 자라는 세포들이 천천히 자라는 세포들보다 화학요법에 반응을 더 잘하기 때문에 caveolin-1의 발현도가 좋은 세포인 경우 화학요법에 반응이 떨어지게 된다¹⁰.

QLL-2세포에서 caveolin-1의 발현과 cisplatin에 대한 감수성의 상관성을 알아보기 위해 본 연구에서는 cisplatin 농도를 달리 하여 caveolin-1의 발현도를 측정한 경우 cisplatin 농도를 증가하였을 때 caveolin-1의 발현도가 점차 감소하였다. Cisplatin을 투여함으로써 caveolin-1이 감소하였고, 그 결과를 앞선 실험^{9,10}과 연관하여 생각해 보면 caveolin-1이 감소하여 세포사가 증가하였음을 알 수 있었다. 이것을 통해 세포사에 있어서 caveolin-1이 감소하여 세포사가 증가하였다고 볼 수 있다. 이러한 현상은 siRNA technology를 이용하여 확인할 수 있었다. 즉, cisplatin에 의한 세포사가 siRNA 처리하여 caveolin-1의 발현을 억제시킨 세포에서 대조 세포보다 더 많이 발생함을 보여 caveolin-1의 발현이 저하된 경우 cisplatin에 의한 감수성이 증가하였다. Caveolin-1의 세포사에 대한 상반된 결과 중 caveolin-1이 없는 경우, 화학요법의 반응이 증가한다는 연구와 일치하는 결과를 보였다. 이러한 결과의 원인으로는 다른 논문에서처럼 다약제내성의 감소를 생각해 볼 수 있으며^{9,10}, 구강암 세포주에서 다약제내성 발현에 관한 추가적인 연구가 필요하리라 생각된다. 또한 고농도의 cisplatin을 투여하였을 때, caveolin-1 양성 세포와 siRNA를 처리한 세포에서 세포증식억제 차이를 비교하면, siRNA를 처리한 세포주에서 세포증식억제가 훨씬 더 많이 발생함을 알 수 있었다. 세포증식억제에 대해 저항성을 보이는 caveolin-1의 발현이 적을 때 cisplatin에 대한 세포증식억제 효과가 훨씬 커 반응이 좋음을 알 수 있었다.

Caveolin-1과 MMP와의 연관성을 살펴보면 caveolin-1의 발현도가 증가한 암세포인 경우 MMP-2와 MMP-9의 활성도가 감소하여 세포 침윤도가 억제되고, caveolin-1의 발현도가 감소한 경우 MMP-2와 MMP-9의 활성도가 증가하여 세포침윤이 활성화 된다고 하였다¹⁵. Caveolin-1이 MMP에 영향을 미치는 이유로는 심장근육 세포막에서 caveolin-1과 MMP가 같이 존재(colocalization)하므로 caveolin-1이 직접 또는 다른 신호 전달 물질을 통해 MMP를 조절하기 때문이다¹⁵. Caveolae 형성과 기능에 중요한 역할은 하는 Polymerase I and Transcript Release Factor (PTRF) 또는 cavin-1이 있다. 이 단백질 역시 caveolin-1과 마찬가지로 증가하면 MMP의 활성도가 저하돼 세포의 이동이 적어져 암세포 공격성이 변하게 된다¹¹. Caveolae 안에 있는 단백질들은 같은 자리에 위치하고 있는 MMP의 활성도를 저하시켜 세포 침윤도를 감소시켜 임상 양상에 영향을 줄 수 있을 것으로 생각한다고 하였다. 그리하여 caveolin-1을 다시 발현시키거나 PTRF의 발현을 조절하면 암세포 침윤도를 감소시켜 치료에 도움이 된다고 하여 새로운 치료 목표로 세울 가능성을 제시하기도 하였다^{11,15}.

본 연구에서는 caveolin-1 과 MMP-9 과의 관계를 본 실험에서는 상이한 결과가 나왔다. Caveolin-1 발현에 따른 MMP-9 의 발현 및 활성화가 어떻게 변하는 지를 알아보기 위해 caveolin-1 양성 세포인 QLL-2 세포를 siRNA 로 처리하여 MMP-9 의 발현과 활성화를 측정하였는데, siRNA 처리한 군에서 MMP-9 의 발현 및 활성화 모두 감소하였다. 이는 caveolin-1 의 발현이 적은 경우에 국소 침윤의 지표라 할 수 있는 MMP-9 의 발현과 활성도가 감소된다는 것을 의미한다. 즉, caveolin-1 의 발현도가 감소된 경우 MMP 발현과 활성도가 감소하여 국소 침윤 능력이 줄어들어 국소 침범이 감소하거나 주변 림프절로의 전이가 덜 발생하여 임상적으로 좋은 임상경과 및 예후를 예상할 수 있다고 하겠다.

예후 인자로서의 caveolin-1에 대한 연구는 아직 다양한 결과를 나타낸다^{8,16,17,20}. 식도 편평세포암종에서 수술 후 시료를 분석한 결과 caveolin-1의 발현이 나타난 종양인 경우 T병기, N병기가

높았고, 수술 절제연에 종양이 있는 경우가 더 많아 caveolin-1 발현이 없는 종양보다 예후가 더 안 좋다고 하였다¹⁶. 폐암인 경우 caveolin-1의 예후인자를 측정한 결과 caveolin-1 발현이 있는 경우 T병기와 N병기가 의미 있게 증가하여 예후인자로서의 가능성을 제시하였다¹⁷. Caveolin-1 양성 전립선암인 경우 림프절 전이가 많았으며, 림프절 전이가 음성인 경우 caveolin-1 조직화학염색 활성도가 수술 후 병진행이 더 짧게 소요됨을 예견할 수 있다고 하여 예후인자로서 제시하였다⁸. 또한 췌장암에서도 caveolin-1 발현도가 있는 암인 경우 원발병소의 크기가 컸고, 악성도가 심하고, 나쁜 예후 양상을 보여 caveolin-1이 종양 형성에 영향을 준다고 하였다³⁸. 하지만 이와는 반대로 caveolin-1의 발현도가 좋은 경우 eNOS의 발현이 낮게 되어 간종양 형성과정에서 종양억제자로서의 역할을 하여 좋은 예후인자로서 가능성을 제시하였다¹⁸. 본 연구에서도 caveolin-1의 발현도가 억제된 QLL-2 세포인 경우 국소 침윤 인자인 MMP-9의 발현과 활성도가 줄어 들어 caveolin-1이 발현될수록 원발병소의 병기와 국소 림프절 병기가 진행될 가능성이 높아 나쁜 예후인자로서의 가능성이 제시되었지만, 임상적인 자료를 포함한 추가적인 연구가 필요하리라 사료된다.

종양 내에서의 산화질소가 caveolin-1에 대해 미치는 영향을 보면 caveolin-1이 eNOS와 결합하여 eNOS의 활성도를 감소시켜 산화질소의 생성을 막는다고 하였다. 동시에 eNOS의 발현이 높고 caveolin-1의 발현이 낮은 간암인 경우 생존율의 저하를 보였지만, caveolin-1과 eNOS의 비율(caveolin-1/eNOS)이 증가하면 세포의 분화도가 감소하고 생존율도 증가한다고 하였다. 그러므로 caveolin-1이 eNOS를 통해 부분적으로 간암 종양형성에 영향을 미쳐 종양억제자로서 역할을 한다고 하였다¹⁸.

세포내 산화질소가 caveolin-1 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 본 연구에서는 QLL-2 세포에 산화질소 공여체 (NONOate)를 처리하였으며 NONOate의 농도가 증가함에 따라 caveolin-1의 발현이 감소하였다. 위의 고찰에서와 마찬가지로 저농도의 산화질소 공여체를 투여한 경우에는 caveolin-1의 발현도가 별

차이가 없었지만, 고농도의 산화질소를 처리한 경우에는 caveolin-1의 발현이 갑자기 감소되는 것을 확인하였다. 이러한 결과로 caveolin-1의 발현 역시 산화질소 농도에 영향을 많이 받는다는 것을 알 수 있었다. 또한 NONOate 500 μ M을 전처리한 QLL-2 세포에서 대조 세포에 비해 MMP-9 활성도가 더 많이 감소하였다. 이는 siRNA를 이용하여 caveolin-1 발현을 감소시킨 전 실험에서 MMP-9 활성도가 더 많이 발생한 것과 같은 결과가 나와 고농도의 NONOate를 처리함으로써 caveolin-1 발현 저하를 통한 MMP-9 활성도가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이로써 산화질소가 종양의 억제자로서의 역할을 알 수 있었고 이를 이용하여 화학요법의 예후 인자로 활용할 수 있으리라 사료되었다. 하지만 암세포들의 다양성과 산화질소의 특성 상 이를 이용한 치료 시 여러 가지의 조합이 가능하여 추가적인 연구가 필요하리라 생각된다.

V. 결론

구강 편평세포암 세포 QLL-2 에서 caveolin-1 발현 억제제가 cisplatin 에 의한 세포사를 증가시키고, MMP-9 발현과 활성화를 억제하여 caveolin-1 이 세포증식과 전이에 관여하는 것으로 나타났으며, 종양증식과 신혈관생성에 관여된다고 알려진 산화질소 존재 시에는 역상관관계를 보였다. Caveolin-1 이 종양 성장 측면에서 볼 때 종양촉진자로서의 역할을 하고 있음을 알 수 있었다.

구강암은 환자 별로 특성이 다양하기 때문에 화학요법 약물들의 효과를 높이고 독성을 줄이며 치료 효과를 높이기 위해서는 분자 표지자를 찾는 것이 중요한데, 본 연구를 통하여 caveolin-1 의 특성상 cisplatin 에 대한 감수성과 MMP-9 활성도를 예측할 수 있는 구강암 치료의 표적 중 하나로서의 가능성을 제시할 것으로 사료되었지만, 좀 더 정확한 분자 표지자로서의 caveolin-1 의 역할을 알기 위해서는 임상적인 자료와 연계한 연구가 필요하리라 사료되었다.

참고 문헌

1. Frank PG, Lisanti MP. Caveolin-1 and caveolae in atherosclerosis: differential roles in fatty streak formation and neointimal hyperplasia. *Curr Opin Lipidol* 2004;15:523-9.
2. Razani B, Woodman SE, Lisanti MP. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev* 2002;54:431-67.
3. Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG. De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:8655-9.
4. Engelman JA, Wykoff CC, Yasuhara S, Song KS, Okamoto T, Lisanti MP. Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth. *J Biol Chem* 1997;272:16374-81.
5. Li S, Galbiati F, Volonte D, Sargiacomo M, Engelman JA, Das K, et al. Mutational analysis of caveolin-induced vesicle formation. Expression of caveolin-1 recruits caveolin-2 to caveolae membranes. *FEBS Lett* 1998;434:127-34.
6. Linge A, Meleady P, Henry M, Clynes M, Kasper M, Barth K. Bleomycin treatment of A549 human lung cancer cells results in association of MGr1-Ag and caveolin-1 in lipid rafts. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;19.
7. Williams TM, Lisanti MP. The Caveolin genes: from cell biology to medicine. *Ann Med* 2004;36:584-95.
8. Yang G, Truong LD, Wheeler TM, Thompson TC. Caveolin-1 Expression in Clinically Confined Human Prostate Cancer. *Cancer Res* 1999;59:5719-23.
9. Herzog M, Storch CH, Gut P, Kotlyar D, Füllekrug J, Ehehalt R, et al. Knockdown of caveolin-1 decreases activity of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) and increases chemotherapeutic sensitivity. *Arch Pharmacol* 2010;10.
10. Park J, Bae E, Lee C, Yoon SS, Chae YS, Ahn KS, et al. RNA interference-directed caveolin-1 knockdown sensitizes SN12CPM6 cells to

- doxorubicin-induced apoptosis and reduces lung metastasis. *Tumour Biol* 2010;31:643-50.
11. Aung CS, Hill MM, Bastiani M, Parton RG, Parat MO. PTRF-cavin-1 expression decreases the migration of PC3 prostate cancer cells: Role of matrix metalloprotease 9. *Eur J Cell Biol* 2010;21.
 12. Rothberg KG, Ying YS, Kolhouse JF, Kamen BA, Anderson RG. The glycopospholipid-linked folate receptor internalizes folate without entering the clathrin-coated pit endocytic pathway. *J Cell Biol* 1990;110:637-49.
 13. Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, Lisanti MP. Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev* 2004;84:1341-79.
 14. Williams TM, Lisanti MP. Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;288:494-506.
 15. Han F, Zhu HG. Caveolin-1 regulating the invasion and expression of matrix metalloproteinase (MMPs) in pancreatic carcinoma cells. *J Surg Res* 2010;159:443-50.
 16. Kato K, Hida Y, Miyamoto M, Hashida H, Shinohara T, Itoh T, et al. Overexpression of caveolin-1 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis and pathologic stage. *Cancer* 2002;94:929-33.
 17. Ho CC, Huang PH, Huang HY, Chen YH, Yang PC, Hsu SM. Up-Regulated Caveolin-1 Accentuates the Metastasis Capability of Lung Adenocarcinoma by Inducing Filopodia Formation. *Am J Pathol* 2002;161:1647~1656.
 18. Yang SF, Yang JY, Huang CH, Wang SN, Lu CP, Tsai CJ, et al. Increased caveolin-1 expression associated with prolonged overall survival rate in hepatocellular carcinoma. *Pathology* 2010;42:438-45.
 19. Nakamura M, Nakatani K, Uzawa K, Ono K, Uesugi H, Ogawara K, et al. Establishment and characterization of a cisplatin-resistant oral squamous cell carcinoma cell line, H-1R. *Oncol Rep* 2005;14:1281-6.

20. Aldred MA, Ginn-Pease ME, Morrison CD, Popkie AP, Gimm O, Hoang-Vu C, et al. Caveolin-1 and Caveolin-2, Together with Three Bone Morphogenetic Protein-related Genes, May Encode Novel Tumor Suppressors Down-Regulated in Sporadic Follicular Thyroid Carcinogenesis. *Cancer Research* 2003;63:2864-71.
21. Nakatani K, Wada T, Nakamura M, Uzawa K, Tanzawa H, Fujita S. Expression of caveolin-1 and its correlation with cisplatin sensitivity in oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005 ;131:445-52.
22. Pan YM, Yao YZ, Zhu ZH, Sun XT, Qiu YD, Ding YT. Caveolin-1 is important for nitric oxide-mediated angiogenesis in fibrin gels with human umbilical vein endothelial cells. *Acta Pharmacol Sin* 2006;27:1567-74.
23. Kim SB, Rho YS, Ahn HY, Cho SJ, Shin HS. Expression of the Matrix Metalloproteinase-2/9 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 Proteins with Heterozygosity of p53 Gene in Thyroid Tumors. *Korean J Otolaryngol* 2005;48:225-33.
24. Oliveira CJ, Schindler F, Ventura AM, Morais MS, Arai RJ, Debbas V, et al. Nitric oxide and cGMP activate the Ras-MAP kinase pathway-stimulating protein tyrosine phosphorylation in rabbit aortic endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2003;35:381-96.
25. Han CJ, Kim YM, Park CS. Gene Expression of Nitric Oxide Synthases in Thyroid Papillary Carcinoma. *Korea J Otolaryngol* 2002;45:366-73.
26. Yim CY. Nitric oxide and cancer. *Korean J Med* 2010;78:430-6.
27. Kawasaki K, Smith RS Jr, Hsieh CM, Sun J, Chao J, Liao JK. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt pathway mediates nitric oxide-induced endothelial cell migration and angiogenesis. *Mol Cell Biol* 2003;23:5726-37.
28. Chazotte-Aubert L, Hainaut P, Ohshima H. Nitric oxide nitrates tyrosine residues of tumor-suppressor p53 protein in MCF-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;267:609-13.
29. Blaise GA, Gauvin D, Gangal M, Authier S. Nitric oxide, cell signaling and cell death. *Toxicology* 2005;208:177-92.

30. Messmer UK, Brune B. Nitric oxide-induced apoptosis. p53-dependent and p53-independent signalling pathways. *Biochem J* 1996;319:299-305.
31. Heller R, Polack T, Grabner R, Till U. Nitric oxide inhibits proliferation of human endothelial cells via a mechanism independent of cGMP. *Atherosclerosis* 1999;144:49-57.
32. Mortensen K, Christensen IJ, Nielsen HJ, Hansen U, Larsson LI. High expression of endothelial cell nitric oxide synthase in peritumoral microvessels predicts increased diseasefree survival in colorectal cancer. *Cancer Lett* 2004;216:109-14.
33. Chen DB, Jia S, King AG, Barker A, Li SM, Mata-Greenwood E, et al. Global protein expression profiling underlines reciprocal regulation of caveolin 1 and endothelial nitric oxide synthase expression in ovariectomized sheep uterine artery by estrogen/progesterone replacement therapy. *Biol Reprod* 2006;74:832-8.
34. Shen J, Ma S, Chan P, Lee W, Fung PC, Cheung RT, et al. Nitric oxide down-regulates caveolin-1 expression in rat brains during focal cerebral ischemia and reperfusion injury. *J Neurochem* 2006;96:1078-89.
35. Navarro-Lerida I, Portoles MT, Barrientos AA, Gavilanes F, Bosc L, Rodriguez-Crespo I. Induction of nitric oxide synthase-2 proceeds with the concomitant downregulation of the endogenous caveolin levels. *J Cell Sci* 2004;117:1687-97.
36. Hung KF, Lin SC, Liu CJ, Chang CS, Chang KW, Kao SY. The biphasic differential expression of the cellular membrane protein, caveolin-1, in oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med* 2003;32:461-7.
37. Chon KM, Wang SG, Lee BJ, Lee JC, Koo HJ, Kim SH. Establishment of Cisplatin Resistant Head and Neck Cancer Cell Lines and Cross-resistance of Docetaxel. *Korean J Otolaryngol* 2005;48:651-5.
38. Suzuoki M, Miyamoto M, Kato K, Hiraoka K, Oshikiri T, Nakakubo Y, et al. Impact of caveolin-1 expression on prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma *Br J Cancer* 2002;87:1140-4.

Abstract

The effects of caveolin-1 expression on cisplatin sensitivity,
MMP-9 expression and its activity
in an oral squamous cell carcinoma cell line, QLL-2

Jae Won Kim

Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Eun Chang Choi)

Introduction: Caveolae are 50-to 100 nm vesicular invagination of the plasma membrane which resembles “little caves”. The roles of caveolae are signal transduction, process of vesicular tracking and anti-proliferative function. One of the main components in the caveolae is caveolin-1; caveolin-1 has been known to be associated with anti-proliferative function, while playing a tissue-specific and stage-specific modulatory role on cancer. Caveolin-1 is shown to act both as a tumor suppressor and a tumor promoter. With respect to the function of caveolin-1 to cisplatin sensitivity and invasion, we analyzed the effects of cisplatin sensitivity and MMP-9 activity on invasion of the caveolin-1 expression.

Materials and Methods: To evaluate growth inhibition of QLL-2 cells by cisplatin, QLL-2 cells were incubated with different concentrations of cisplatin for 24 hours. Cell growth was determined by MTT assay. To analyze the effect of cisplatin treatment on the expression of caveolin-1 in QLL-2 cells, QLL-2 cells were treated with different concentrations of cisplatin for 24 hours. Caveolin-1 expression was determined by western blot. To investigate the effect of suppression of caveolin-1 expression by siRNA on the growth inhibition induced by

cisplatin in QLL-2 cells, QLL-2 cells were treated with different concentrations of cisplatin for 24 hours after QLL-2 cells were transiently transfected with control or caveolin-1 siRNA. Cell growth inhibition was determined by MTT assay. To evaluate the effect of suppression of caveolin-1 expression by siRNA on MMP-9 expression & activity in QLL-2 cells, QLL-2 cells were transiently transfected with control or caveolin-1 siRNA for 18-24 hours, then MMP-9 expression & activity was determined by western blot and zymography. To analyze the effect of NONOate treatment on the expression of caveolin-1 in QLL-2 cells, QLL-2 cells were treated with different concentrations of NONOate for 12 hours. Caveolin-1 expression was determined by western blot. To know the effect of suppression of caveolin-1 expression on MMP-9 activity induced by NONOate treatment, QLL-2 cells were treated with NONOate, and then MMP-9 activity was determined by zymography.

Results: With cisplatin treatment, growth inhibition induced by cisplatin increased dose-dependently from 0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. With cisplatin treatment, caveolin-1 expression decreased dose-dependently. After down-regulation of caveolin-1 expression by SiRNA, growth inhibition induced by cisplatin increased and MMP-9 expression and activity decreased in SiRNA caveolin-1 treated QLL-2 cell line. With NONOate treatment, caveolin-1 expression declined dose-dependently and MMP-9 activity decreased in QLL-2 cell line.

Conclusion: It was revealed that the suppression of caveolin-1 increased the growth inhibition induced by cisplatin and decreased expression and activity of MMP-9 in oral squamous carcinoma cell line (QLL-2). With the presence of nitric oxide known as tumor promoter and neovascularization initiator, cancer proliferation and nitric oxide are in inverse proportion to each other. Caveolin-1 is shown to act as a tumor promoter in an aspect of tumor proliferation.

Since oral cancer patients have diverse characteristics for improving

curative value and mollifying toxicity of chemotherapy, it is important to identify tumor surface marker predicting cisplatin sensitivity and MMP-9 activity. Therefore we suggest caveolin-1 is potential for the role as surface marker in oral squamous cell carcinoma cell line and estimate that further study based on clinical data is needed to know further role of caveolin-1 as tumor surface marker.

Key Words: caveolin-1, cisplatin, oral squamous cell carcinoma, cell death, MMP-9, siRNA