

p53 유전자 변형이 발생한 위암세포주에서 유전자이상 교정에 의한 항암제 감수성 변화

연세대학교 의과대학 ¹연세 암연구소, ²연세 암센터, ³내과학교실, ⁴외과학교실
⁵아주대학교 의과대학 내과학교실

맹호영¹ · 라선영^{1,2,3} · 민병소¹ · 김용배¹ · 곽현주¹
김태수^{1,2} · 박규현^{1,2} · 유내춘^{1,2,3} · 임호영⁵
최진혁⁵ · 김주항^{1,2,3} · 노재경^{1,2,3}
민진식^{1,2,4} · 김병수^{1,2} · 정현철^{1,2,3}

Restoration of Wild-type p53 Induces Chemo-sensitization in the Gastric Cancer Cell Line with Mutant p53

Ho Young Maeng, M.D.¹, Sun Young Rha, M.D.^{1,2,3}, Byung Soh Min, M.D.¹
Yong Bae Kim, M.D.¹, Hyun Joo Kwak, M.D.¹, Tae Soo Kim, M.D.^{1,2}
Kyu Hyun Park, Ph.D.^{1,2}, Nae Choon Yoo, M.D.^{1,2,3}, Ho Young Lim, M.D.⁴
Jin Hyuk Choi, M.D.⁴, Joo Hang Kim, M.D.^{1,2,3}, Jae Kyung Roh, M.D.^{1,2,3}
Jin Sik Min, M.D.^{1,2,4}, Byung Soo Kim, M.D.^{1,2}
and Hyun Cheol Chung, M.D.^{1,2,3}

¹Yonsei Cancer Research Institute, ²Yonsei Cancer Center,
³Department of Internal Medicine, ⁴General Surgery,
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea;
⁵Department of Internal Medicine, Ajou University School of
Medicine, Suwon, Korea

Purpose: It has been theorized that p53 may be involved in the sensitivity to chemotherapeutic agents. We evaluated the chemosensitivity of wild p53 after transduction into gastric cancer cell lines with mutant p53.

Materials and Methods: YCC-3(parent cell line with mutant p53), YCC-3v(parent cell line transduced with vector alone) and YCC-3C₃(clone with wild p53) cell lines were used in this study. p53 protein expression was measured by ELISA assay. Tumorigenicity and drug sensitivity were evaluated by soft agar and proliferation assay, respectively. Cell cycle analysis was performed by flowcytometry. Telomerase activity was measured by TRAP assay and terminal restriction fragment(TRF) length was measured after Southern blot analysis.

Results: Even though p53 production from the YCC-3C₃ cell line was three times higher than those of YCC-3 and YCC-3v cell lines, the cell cycle was the same in these three cell lines. In the YCC-3C₃ cell line, drug sensitivity to etoposide and cisplatin was in-

creased when we compared it to those of the YCC-3v cell line(etoposide, 50% versus 83%; cisplatin, 67% versus 83%). However, there was no chemo-sensitization effect with vincristine, vinblastine and carboplatin. After exposure to cisplatin, a G0/G1 check-point effect was found in the YCC-3C₃ cell line, but not in the YCC-3v cell line. No differences were found in telomerase activity, TRFs length or DNA fragmentation between the YCC-3v and YCC-3C₃ cell lines after cisplatin treatment.

Conclusion: Wild-type p53 gene transduction in the gastric cancer cell line induced sensitization to the cytotoxicity of etoposide and cisplatin. This suggests the possible application of combined chemo-gene therapy with an EP regimen and wild-type p53 in gastric cancer patients with p53 mutation.

Key Words: Wild-type p53, Chemo-sensitization, Etoposide, Cisplatin, Gastric cancer

서 론

p53 유전자 돌연변이는 폐암, 대장암, 유방암 등 여러 종류의 암종에서 관찰되는(1~3) 인체 종양에서 가장 빈번한 분자유전학적 변화로(4,5), 위암세포주 및 위암 조직에서도 보고되었다(6,7).

정상 p53 단백질은 암 유발유전자에 의한 세포변형을 방지하며, DNA 손상이 발생할 경우 세포주기를 G1기에 정지시킴으로써 DNA 손상을 회복시키는데 필요한 시간을 갖도록 하거나 세포사멸을 유도한다(5,8). 그러나 점돌연변이, 소실 혹은 재배치 등에 의해 p53 유전자의 돌연변이가 발생할 경우, 변형된 단백질이 생성되어 종양세포의 증식을 억제하지 못할 뿐 아니라 정상 p53 단백질의 기능을 억제하게 된다(9). Chen등(10)은 대장암 세포주에 정상 p53 유전자를 형질도입 시킨 결과 암세포주의 집락형성 감소, 세포의 형태학적 변화, 그리고 성장속도의 감소 등을 관찰하고 p53 유전자가 종양억제 유전자임을 확인하였다. 또한 Cai등(11)은 retrovirus vector를 이용하여 정상 p53 cDNA를 폐암 세포주에 형질도입할 경우 폐암세포의 성장이 억제됨을 보고하였고, 김등(12)도 retrovirus vector를 이용하여 정상 p53 유전자를 위암세포주에 형질도입시에도 성장이 억제됨을 확인하였다.

DNA 손상을 유발하는 약제들에 노출된 경우, 일반적으로 세포는 정상 p53 단백을 증가시켜 G1 혹은 G2 checkpoint의 조절을 증가시킴으로써 DNA 손상이 증폭되는 것을 방지하여 세포를 보호한다(13,14). 그러나 정상 p53 단백질이 생성되지 않는 경우에는 G1, G2 checkpoint 조절이 이루어 지지 않아, 항암제나 기타 스트레스에 인한 DNA 손상을 받고서도 세포주기는 계속되고 그 결과 DNA 손상은 증폭되어 세포가 사멸하게 된다. 대표적인 예로 다량의 정상 p53 단백을 생성하면서 cisplatin에 내성이 있는 난소암 세포주에 돌연변이 p53 유전자를 형질도입하는 경우 정상 p53 단백질의 기능이 억제되어 cisplatin에 대한 감수성이 증가하였다(15). 반면, 일부세포에서는 항암제에 의해 DNA 손상이 발생할 경우 손상된 세포를 제거하는 세포사멸 기전을 유발하기 위해 정상 p53 단백질의 생성이 증가하였다(16). 이 경우는 비정상 p53 단백을 발현하는 경우 정상 p53 단백질에 의한 세포사멸 기전이 억제되어 DNA 손상으로부터 생존가능성이 높다는 것이다. 즉, 비정상 p53 단백을 함유하는 경우에는 단지 DNA 손상만 증폭되고 세포가 사멸하지는 않거나, 정상적인 세포사멸기전이 활성화되지 않기 때문에 비정상 p53 단백을 발현시 세포가 보다 생존함으로 생각한다. 실제로 DNA 손상을 유발하는 항암제에 대한 종양세포의 생물학적 반응은 p53 유전자 돌연변이

상태와는 완전히 일치하지 않는 것으로 확인되었다(17,18). 따라서, 현재까지 연구된 결과 세포는 DNA 손상후 밝혀진 여러가지 경로를 이용하여 사멸하거나, DNA 손상을 수리하여 생존하게된다(14). 이 경우 세포의 유형에 따라 p53 유전자의 돌연변이는 항암제에 대한 저항성 혹은 감수성 유발 인자로 작용하게 된다.

위암은 우리나라에서 발생빈도가 높을 뿐 아니라 대부분 진행된 상태에서 진단되므로 수술과 항암 약물요법 등의 다방면 요법이 시행되에도 불구하고 아직도 그 완치율이 만족할 만하지 못해, 새로운 개념에 의한 새로운 치료법의 개발이 필요한 시점이다. 최근에 위암에서도 여러가지 유전자 이상이 확인되어 이들을 교정하려는 유전자 치료가 연구되고 있다. 그러나 현재까지 유전자 치료는 유전자의 형질도입 효율성이 낮은 점이 문제점으로 제시되었다.

이러한 문제점을 해결하기 위해 보다 전달 효율성이 높은 vector system을 개발하거나 지금까지 개발된 유전자 요법을 현재 시행하는 항암 약물치료와 병용하는 방법이 연구되고 있다. 돌연변이가 발생한 위암에서 정상 p53 유전자를 형질도입하는 경우 세포 사멸이 유도됨은 확인되었으며(12), 정상 p53 유전자가 형질도입되어도 세포 사멸이 유도되지 않는 clone이 있음도 확인되었다. 이와같이 p53 유전자 형질도입이 세포증식에 영향을 미치지 않는다면 실제 임상치료에 p53 유전자 요법을 응용한다 하더라도 그 효과가 의문시 된다 하겠다. 따라서 본 연구에서는 위암에서 유전자 요법의 치료율을 증가시키기 위해, 정상 p53 유전자가 형질도입 되었으나 세포증식에는 변함이 없는 stable clone에 위암에 가장 많이 사용되는 항암제를 투여하여 항암제에 대한 감수성의 변화를 조사함으로써 유전자 요법의 chemo-sensitization 가능성을 조사하였다.

대상 및 방법

1) 위암세포주 배양

실험대상 세포주는 p53 유전자 돌연변이가 확

인된 YCC-3 세포주(codon 175, CGC → CAC), 이 세포주에 정상 p53 유전자가 형질도입된 clone YCC-3C₃와 neomycin resistant gene만 형질도입된 YCC-3v 세포주를 대상으로 하였다. 대조세포주로 293 세포와 Jurkat 세포를 ATCC에서 구입하였다. 세포배양은 가열 비활성화된 10% 우태아혈청(GIBCO, USA)을 함유하는 MEM(GIBCO, USA)을 기본 배양액으로 하여 5% CO₂ 존재하에 37°C 항온배양기에서 배양하였다. YCC-3v 세포주와 YCC-3C₃ 세포주는 G418을 800 µg/ml의 농도하에서 계속 배양하였다.

2) ELISA assay for p53

p53 단백 측정을 위한 세포질 추출과 ELISA는 p53 kit(Oncogene Science, Calbiochem, USA)의 manufacturer's instruction에 따라 시행하였다. 간략하면, 세포를 scraper를 이용하여 채취한 다음, phosphate-buffered-saline(PBS)으로 세척하고, pellet을 resuspension buffer(50 mM Tris, 5 mM EDTA, 0.2 mM PMSF, 1 µg/ml pepstatin, 0.5 µg/ml leupeptin, pH 7.4)에 용해시켰다. 세포부유액 100 µl에 20 µl의 antigen extraction 용액을 첨가하고 얼음위에서 30분간 반응시킨 후 세포추출액을 취한 다음 원심분리시켰다. 채취한 세포질로 ELISA를 시행하여 평균±표준편차로 도식화하였다.

3) Soft agar assay

종양 형성능은 라등(19)의 방법으로 시행하였다. 간략하면, agar 1.2 g을 50 ml의 증류수에 용해시켜 멸균 소독하였다. 하층 agar는 50 ml의 우태아혈청이 함유된 배지, 25 ml의 2배 농축배지, 50 ml의 agar를 혼합하여 42°C 항온수조에 보관하면서 agar 용액 1 ml를 35 mm dish에 투여하고 고형화 시켰다. Dish의 상층부위에 20,000개의 세포를 투여하고, 배양 15일 후 3개의 dish를 1개의 point로하여 세포집락수를 센 다음 평균±표준편차로 도식화하였다.

4) Colorimetric MTT assay

MTT 검사는 노등(20)의 방법으로 하였다. 간략 하면, 약제가 노출된 위선암 세포주를 96시간 96-well plate에 배양하고 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (tetrazolyl blue))(Sigma, USA) 50 ul(2 mg/ml)를 각 well에 첨가후, 37°C, 5% CO₂ 대기하에서 4시간 더 배양하였다. 96-well plate를 450 xg에서 5분간 원심분리한 후, 바닥에 있는 formazan 결정이 제거되지 않도록 주의하면서 상층액을 제거하였다. 150 ul의 DMSO(dimethyl sulfoxide, Sigma, USA)를 각 well마다 첨가하고 진탕기에서 formazan 결정이 용해될 때까지 진탕한 후, multiwell ELISA spectrophotometer를 이용하여 540 nm의 파장에서 판독한 실험군의 색소흡수율을 대조군의 색소흡수율과 비교하여 생존율을 구하였다.

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

5) Flowcytometry

Fan등(21)의 방법에 따라 세포를 수확한 후, 70% 에타놀로 고정시키고, PBS로 세척한 다음, 37°C에서 30분간 RNase로 처리하였다. 다음 50 ug/ml의 propidium iodide(Sigma, USA)로 염색하고 fluorescence-activated cell analyzer(Becton Dickson)을 사용하여 세포주기를 측정하였다.

6) DNA fragmentation analysis

각 세포주에 cisplatin 투여 48시간 후 세포를 수확하여 PBS로 세척한 다음 200 ul의 lysis solution(5 M guanidium, 0.1 M 2-mercaptoethanol)에 용해시키고 100 ul의 7.5 M ammonium acetate, 600 ul의 100% 에타놀을 첨가하였다. 얼음위에서 2

시간 반응시킨 다음, 4°C에서 14000 rpm으로 30분간 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. 75% 에타놀로 세척한 다음 DNA 추출물을 Tris-EDTA buffer(10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 용해시켜 2% agarose gel에 전기영동한 다음 ethidium bromide로 염색하였다. 양성 대조로는 24시간 무혈청 배지에서 배양한 Jurkat 세포주로 하였다.

7) Telomerase assay (TRAP assay)

세포질 추출후 Bradford(Bio-rad)법에 의해 단백질량을 시행한 다음 박등(22)의 방법에 의해 TRAP assay를 시행하였다. TRAP reaction은 검체 20 ul, TRAP 반응용액, 50 uM deoxynucleoside triphosphate, 0.1 mg/ml BSA, 1 ug T4 Gene 32 protein, 0.1 ug TS oligonucleotide(5'-AATCCGTCGACGAGGTT-3')를 혼합한 50 ul로 시행하였다. 먼저 실온에서 20분간 방치한 후, 반응물질을 94°C에서 3분간 가열함으로써 telomerase를 비활성화시킨 다음, CX primer(5'-CCCTTACCCCTTACCCCTTACCCCTAA-3') 0.1 ug, α-³²P dCTP 10 μCi/μl, dNTPs 50 μM, MgCl₂ 50 mM과 Taq polymerase 2.5 unit를 첨가하였다. 이 산물을 94°C에서 30초, 50°C에서 30초, 72°C에서 90초간 반응하는 cycle을 30회 반복시켰으며, 추출한 PCR 산물을 12%의 non-denaturing polyacrylamide gel에서 분리시킨후 X-ray film에 감광시켰다. -70°C에서 하루밤 exposure후 전형적인 6 bp의 사다리 모양이 관찰되고 그 밴드가 RNase A 처리후 없어지면 양성으로 판정하였다. 양성대조군인 293 세포주의 검체 6 μg을 투여시에 관찰되는 O.D.값을 arbitrary 100 단위로 정하고, 이를 기준으로 각 검체 6 μg으로 측정된 telomerase activity의 band intensity를 computer-assisted image analyzer를 이용하여(Bio-Profil, Vilber Lourmat Biotechnology, France) 수치화한 다음, 그 값을 비교하였다.

8) Telomere length assay using Southern blotting

Genomic DNA를 *HinfI* 제한효소 10 unit으로

37°C에서 12시간 반응시킨 후 65°C에서 20분간 가열하여 불활성화시킨 다음, 5 µg의 DNA를 0.8% agarose gel에서 전기영동시켰다. Gel을 10X SSC에서 Hybond-N⁺ membrane(Amersham, UK)으로 transfer 시킨 후, 자외선조사로 고정시켰다. Hybridization을 위해 ECL kit(Amersham, UK)를 사용하였다. 우선 telomerase specific probe(TTAGGG)₄에 DNA labeling 용액과 glutaraldehyde를 혼합한 후 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 얼음에 보관하며 10분 이내에 사용하였다. ECL hybridization 용액, 0.5M NaCl, 5%(w/v) blocking reagent가 함유된 hybridization-용액으로 42°C에서 1시간 prehybridization시킨 후 준비된 probe를 첨가하고 42°C에서 밤새 반응시켰다. 반응이 끝난 membrane을 세척하고 signal을 Hyperfilm-ECL(Amersham, UK)에 감광한 후 각각의 lane은 densitometer로 scan하여 telomere length를 측정하였다. 2에서 21 kbp까지 1 kbp 단위로 나눈 후 각각에 해당하는 signal을 아래의 공식으로 구하였다(23).

$$L = \frac{\sum(ODi \times Li)}{\sum ODi}$$

(L: TRFs length, ODi:integrated signal in interval i, Li: TRFs length at the midpoint of interval i)

9) Statistical analysis

두 군간의 비교는 paired student t-test로 시행하였으며, p값이 0.05 이하인 경우 유의하게 평가하였다.

결 과

1) p53 단백질 측정

ELISA법으로 각 세포주에서 p53 생성을 비교한 바, YCC-3v 대조군세포주는 YCC-3 모세포주와 차이가 없었다. 반면, YCC-3C₃ 세포주는 대조 및 모세포주에 비해 p53 생성이 3배 증가되어 있었다(Fig. 1).

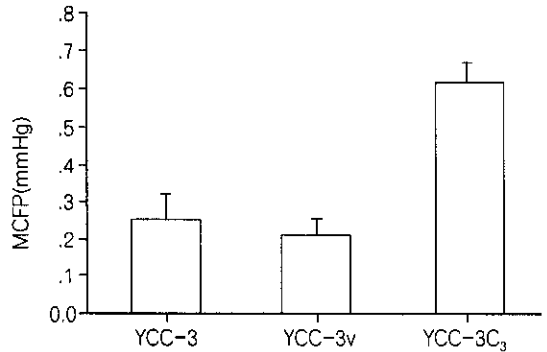


Fig. 1. Comparison of p53 expression by ELISA assay.

2) 항암제 감수성 검사

각 세포주에서 5-fluorouracil, adriamycin, mitomycin의 세가지 약제에는 투여 용량에 비례하는 성장억제가 관찰되었으나, YCC-3v와 YCC-3C₃ 세포주간에 약제 감수성의 차이는 없었다. Vinca alkaloid 계통인 vincristine, vinblastine에는 세가지 세포주 모두 저항성을 나타내었으나, etoposide의 경우 인체에 투여 가능 농도인 1 µg/ml에서 YCC-3C₃ 세포주의 약제 감수성이 YCC-3v 세포주에 비해 증가(83% versus 50%; p=0.001)됨을 확인하였다. 또한 YCC-3C₃ 세포주에서 cisplatin의 인체 투여 가능 농도인 0.5 µg/ml에서 YCC-3v 세포주에 비해 약제 감수성의 증가가 관찰된 반면(67% versus 83%; p=0.01), carboplatin에 대한 감수성의 증가는 관찰할 수 없었다(Fig. 2).

3) 세포집락형성 억제

세포집락 형성능은 YCC-3C₃ 세포주에서 YCC-3v 대조 세포주에 비해 감소하였다. Cisplatin을 0.5 µg/ml의 농도로 투여시에 YCC-3v 세포주는 33%의 집락형성이 감소한 반면, YCC-3C₃ 세포주는 51%가 감소하였다. 반면 YCC-3 모세포주는 cisplatin 투여 후에도 집락형성이 억제되지 않았다(Fig. 3).

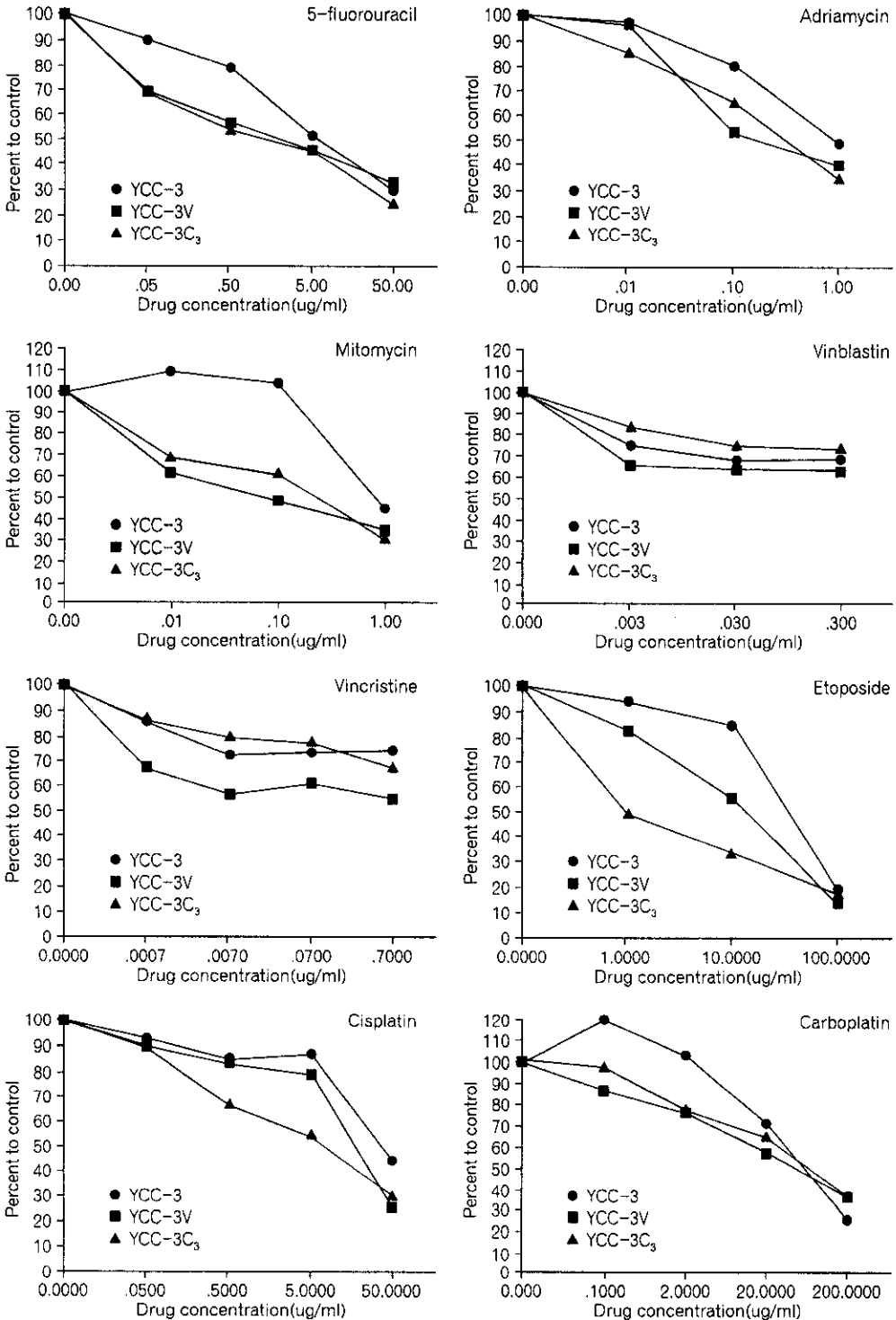


Fig. 2. Comparison of drug sensitivity in three cell lines

Table 1. Comparison of cell cycle between YCC-3v and YCC-3C₃ with cisplatin treatment

Cell cycle	YCC-3	YCC-3v		YCC-3C ₃	
		before DDP	after DDP	before DDP	after DDP
G0/G1	60%	54%	0%	51%	17%
S	40%	46%	100%	46%	83%
G2/M	0%	0%	0%	3%	0%

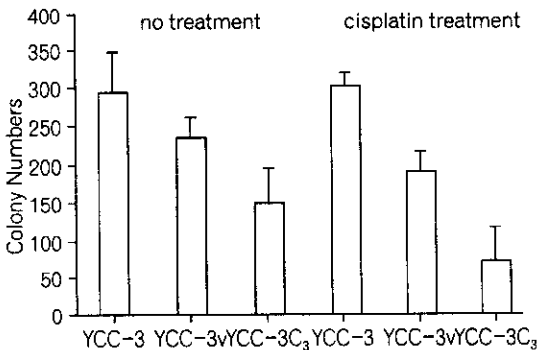


Fig. 3. Comparison of tumorigenicity and cisplatin sensitivity

4) Cisplatin 투여후 세포주기 변화

YCC-3, YCC-3v, YCC-3C₃ 세포주에서 cisplatin 투여전 G0/G1 phase는 각각 60%, 54%, 51%였으며, S-phase는 각각 40%, 46%, 47%로 세포주 사이에 차이가 없었다. 반면 cisplatin 투여후 YCC-3v 세포주는 S-phase가 100%로 증가하고 G0/G1 phase는 소실된 반면, YCC-3C₃ 세포주는 G0/G1 phase가 17%, S-phase 83%가 관찰되었다(Table 1).

5) Cisplatin 투여전, 후의 telomerase activity와 TRFs length의 변화

Cisplatin 투여전 YCC-3, YCC-3v, YCC-3C₃ 세포주의 telomerase activity는 서로 차이가 없었다. Cisplatin 투여후 YCC-3 세포주에서는 투여 전에 비해 telomerase activity가 증가한 반면, YCC-3v 세포주와 YCC-3C₃ 세포주에서는 투여 전 후에

차이가 없었다(Fig. 4). 세 세포주사이에 cisplatin 투여전 TRFs length에는 차이가 없었으며, cisplatin 투여후에는 세 세포주 모두에서 TRFs length가 증가했다(Fig. 4).

고 안

p53 유전자의 돌연변이는 폐암, 대장암, 유방암 등 여러 종류의 종양에서 관찰되며, 특히 위암에서는 임파절 전이 등 위암의 진행과 상관성이 있음이 제시되었다(7). 정상 p53 유전자의 생물학적 기능은 p53 유전자 돌연변이가 발생한 골육종 세포주에 정상 p53 유전자를 형질도입시에 암세포의 집락형성 및 성장속도의 감소가 유도됨이 관찰되어 세포증식 조절능이 있음이 밝혀졌다(5). 또한 쥐의 방광암 세포에 돌연변이 p53 유전자를 형질도입시에 전이가 증가됨이 발견되어 p53 유전자 돌연변이가 암세포의 전이와 관계가 있음이 실험적으로 제시되었다(9). 저자 등은 위암세포주에 retrovirus를 이용하여 정상 p53 유전자를 형질도입시에 p53 유전자 돌연변이가 발생한 세포주에서는 세포주의 성장억제 효과가 유도됨을 in vitro 및 in vivo 연구에서 확인한 바가 있다(12). 또한 p53 유전자 돌연변이가 있고 암의 전이에 필요한 여러가지 생물학적 활성을 나타내는 YCC-3 세포주에 정상 p53 유전자를 형질도입한 다음, 세포주기에는 영향을 받지 않는 clone인 YCC-3C₃ 세포주에서 전이에 필요한 생물학적 활성의 변화가 유도됨을 확인하였다(19).

위암 세포주에서 p53 유전자의 돌연변이를 정

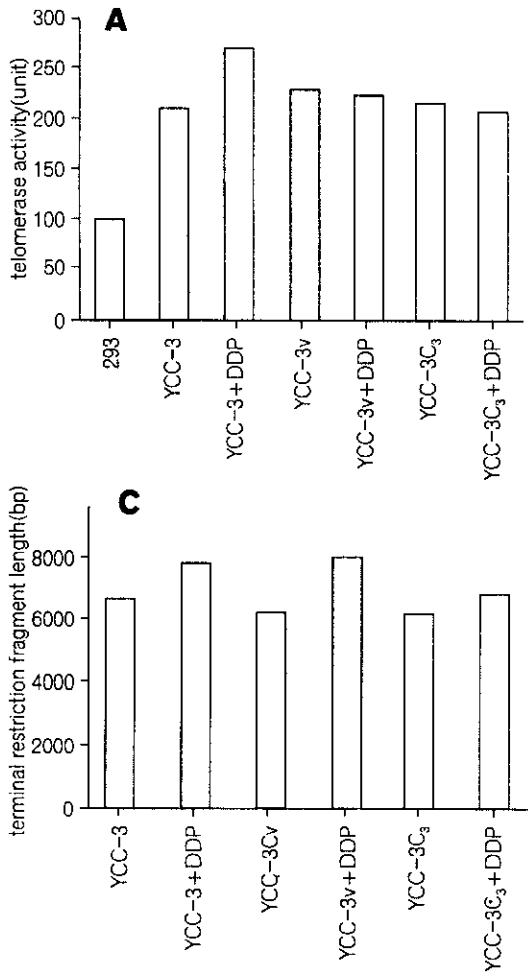


Fig. 4. Comparison of telomerase activity and TRFs length before and after DDP treatment. A) comparison of band density of telomerase, B) gel analysis of telomerase activity, C) comparison of TRFs length

상화 시킬 경우 세포 사멸은 유도되었으나, 이 경우 위암 세포주의 사멸이 모든 세포에서 발생하지는 않았다. 이와같은 현상은 레트로바이러스를 이용한 유전자 형질도입률이 낮아 정상 p53 유전자가 형질도입되지 않은 세포가 사멸하지 않거나, 정상 p53 유전자가 형질도입 되었어도 세포의 사멸기전으로 p53 유전자가 관여하지 않는 세포가 존재하기 때문으로 가정할 수 있다. 특히 후자의 경우는 현재까지 유전자 전달효율이 높지 않은 시점에서 정상 p53 유전자가 형질도입되어도 세포사멸을 유도하지 못한다면 유전자 치료의 제

약점이 된다. 따라서 본 연구에서는 후자의 경우에서 약제 감수성의 변화를 조사함으로써 현재 시행하는 유전자 요법의 단점을 보완할 수 있는지를 조사하였다.

저자 등은 먼저 정상 p53 유전자가 형질도입된 후에도 생존하는 stable clone인 YCC-3C₃ 세포주를 선택하여 이 세포주내에서 p53 단백질이 생성됨을 확인하기 위해 p53 단백질에 대한 단클론 항체를 사용하여 ELISA 검사를 시행하였다. 그 결과 YCC-3 모세포주와, YCC-3v 대조군 세포주보다 YCC-3C₃ 세포주에서 총 p53 단백질의 생성이 3배

증가되어 관찰하여, 형질도입된 정상 p53 유전자가 YCC-3C₃ 세포주에서 발현되고 있음을 확인하였다.

위암에 효과적인 약제는 5-fluorouracil, adriamycin, mitomycin-C, cisplatin, etoposide, methotrexate 등이 있으며, 관해율을 증가시키기 위해 다제 병용 약물요법이 시행되어 5-fluorouracil + adriamycin + mitomycin-C(FAM)(24), 5-fluorouracil + etoposide + cisplatin(FEP)(25), etoposide + adriamycin + cisplatin (EAP)(26)으로 30~60% 관해율이 유도되었다. 그러나 아직도 관해를 나타내는 환자군이 heterogeneous 하여 보다 일관된 관해를 유도할 수 있는 환자군을 선정하거나 관해율을 증가시키는 새로운 약제 혹은 치료방법의 개발이 필요하다 하겠다. 일반적으로 세포가 DNA 손상을 유발하는 약제들에 노출된 경우 세포는 정상 p53 단백을 증가시켜 G1 혹은 G2 checkpoint의 조절을 증가시킴으로써 DNA 손상이 증폭되는 것을 방지하여 세포를 보호한다(13,14). 반면, 정상 p53 단백질이 생성되지 않는 경우 DNA가 손상을 받은 후에도 G1, G2 checkpoint 조절이 이루어 지지 않아 항암제나 기타 스트레스에 인한 DNA 손상을 받고서도 세포주기는 계속되고 그 결과 DNA 손상은 증폭되어 세포가 사멸하기도 한다. 따라서 정상 p53 유전자를 이용하여 직접 세포 사멸을 유도하거나 (27,28) 항암제(29,30) 및 방사선치료(31)의 감수성을 증가시키는 연구가 계속되어 왔다. 본 연구에서는 위암에서 가장 많이 사용되는 약제들을 정상 p53 유전자가 형질도입된 YCC-3C₃ 세포주에 투여하여 YCC-3v 세포주와 비교하여 약제 감수성의 변화를 조사하였다. 그 결과 5-fluorouracil, adriamycin, mitomycin-C에는 투여용량에 비례하여 세포증식이 억제되었으나 YCC-3C₃와 YCC-3v 세포주 사이에 차이가 없었다. 반면 etoposide와 cisplatin을 투여한 경우 YCC-3C₃ 세포주에서 YCC-3v 세포주에 비해 약제 감수성이 증가하였다. 특이한 점은 이들과 동일한 vinca alkaloid 계열인 vincristine, vinblastine과 platinum 계열인 carboplatin 감수성에는 차이가 없는, cross-sensitivity는

발생하지 않음을 확인할 수 있었다. YCC-3C₃ 세포주의 cisplatin에 대한 감수성을 soft agar에서 집락형성 억제 정도로 비교한 바, cisplatin에 의한 집락형성 억제 효과도 YCC-3C₃ 세포주에서 증가함을 확인할 수 있었다. 이같은 결과는 위암을 치료하는데 있어 p53 유전자가 정상인 경우는 FAM 요법보다는 FEP 혹은 EAP 요법이 보다 효과적일 수도 있고, p53 유전자 요법은 FEP 혹은 EAP 요법과 병용시에 보다 효과적일 가능성을 제시하므로 추후 임상적인 증명이 필요하다 하겠다.

p53 유전자에 의한 cisplatin 감수성의 증가 기전을 조사하기 위해 세포독성을 유도하는 농도보다 낮은 농도(0.5 ng/ml)에 YCC-3C₃ 세포주를 48 시간(2 doubling time) 노출시킨 후 세포주기의 변화, telomerase와 TRFs length의 변화 및 DNA fragmentation의 발생 여부를 YCC-3v 세포주와 비교하였다. YCC-3v 세포주의 경우 cisplatin 투여 후 G0/G1 phase는 감소하고 S-phase가 급격히 증가하였다. 이는 YCC-3v 세포주에는 정상 G0/G1 check-point가 없으면서 S-phase transition이 감소하였기 때문으로 판단된다. 반면 YCC-3C₃ 세포주의 경우는 cisplatin 투여 전의 세포주기는 YCC-3v 세포주와 동일하나, cisplatin 투여 후에도 G0/G1 phase가 17% 존재함을 확인하여 형질주입된 정상 p53 유전자의 G0/G1 check-point가 작용함을 관찰할 수 있었다. 그러나 G0/G1 check-point에서 arrest후 apoptosis가 발생함을 의미하는 sub-G1 peak는 관찰할 수 없었으며, G2 check-point의 작동에 의한 G2/M peak도 관찰되지 않아, cisplatin 투여에 따른 apoptosis의 유도를 확인할 수 없었다. 이를 확인하기 위하여 동일하게 약제가 투여된 상태에서 DNA fragmentation 발생 여부를 조사한 바, 대조군인 Jurkat 세포주에서는 DNA ladder가 관찰된 반면 cisplatin 투여 전후의 YCC-3v, YCC-3C₃ 세포주 모두에서 DNA fragmentation을 관찰할 수 없었다(data not shown). 이러한 결과는 정상 p53 유전자 형질도입과 cisplatin 투여에 따른 세포증식 억제효과에서 apoptosis가 주된 기전이 아님을 확인할 수 있었다. 이점은 추후 약제 투여후 시간별

세포주기의 변화 및 nocodazole 투여에 의한 single cycle내의 변화 그리고 BrDU 염색에 의한 dual stain을 시행함으로써 확인할 수 있겠다.

유방 상피세포주에 HPV-16 E6를 발현시킬 경우 p53 유전자의 정상 기능이 소실되면서 immortality를 얻게된다(32). 이 경우 telomerase activation의 가능성이 제시되며 실제 p53 유전자 돌연변이가 있는 non-immortalized 세포와 immortalized 세포를 비교시에 non-immortalized 세포에서는 활성화된 telomerase activity가 관찰되지 않은 반면, immortalized 세포에서는 telomerase가 관찰되었다(33). 본 연구에 사용한 YCC-3 세포주는 telomerase activity가 발현되는 immortalized 세포주이므로, YCC-3v와 YCC-3C₃ 세포주에서 cisplatin 투여 전후의 telomerase activity와 TRFs length의 변화를 조사한 바, telomerase activity는 두세포주 모두에서 약제 투여 전후에 차이가 없었다. 반면, TRFs length는 두 세포주 모두에서 cisplatin 투여후에 증가하였다. 본 연구는 약제 투여후 48시간에 telomerase activity와 TRFs length를 측정하여, 이미 존재하는 telomerase activity가 감소하는 현상은 관찰하지 못하였으나, TRFs length가 변화함은 cisplatin 투여에 의한 세포손상에 의해 기존에 존재하던 telomerase가 작동하여 telomere의 길이에 변화를 유도함으로 판단된다. 따라서 cisplatin에 대한 약제 감수성의 증가는 telomerase activity의 감소에 기인할 가능성은 낮다고 생각되었다.

결 론

p53 유전자의 돌연변이가 발생한 위암세포주에 정상 p53 유전자를 형질주입하여도 세포성장과 세포주기에 변화가 없는 clone에서 etoposide와 cisplatin에 대한 약제 감수성이 증가하였다. 이 증가는 직접적인 세포독성의 증가와 함께 G0/G1 check-point의 작동에 의함을 관찰하였으나 apoptosis 유도나 telomerase inactivation과는 상관성을 확인하지 못하였다. 따라서 p53 유전자 요법시는 etoposide와 cisplatin 병용요법을 시행하거나, 정상

p53 유전자가 발현되는 위암에서는 etoposide와 cisplatin 병용요법을 시행함이 보다 효과적일 가능성이 제시된 바, 추후 임상 연구에 의한 검증이 필요하다고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Takahashi T, Nau MM, Chiba I, Birrer MJ, Rosenberg RK. p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 1989; 246: 491-4.
2. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Binger SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, Glover T, Collins F, Weston A, Modalik R, Harris C, Vogelstein B. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature* 1989; 342: 705-8.
3. Thor AD, Moore II DH, Edgerton SM, Kawasaki ES, Reihnsaus E, Lynch HT, Marcus JN, Schwartz L, Chen LC, Mayhall BH, Smith HS. Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: An independent marker of prognosis in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 845-54.
4. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253: 49-53.
5. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991; 351: 453-6.
6. Kim JH, Takahashi T, Chiba I, Park JG, Birrer MJ, Roh JK, Lee HD, Kim JP, Minna JD, Gazdar AF. Occurrence of p53 gene abnormalities in gastric carcinoma tumors and cell lines. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 938-43.
7. Kim JH, Choi JJ, Noh SH, Roh JK, Min JS, Youn JK, Lim HY, Carbone DP, Gazdar AF, Lee KS, Kim BS. Comparison of p53 mutations in paired primary and metastatic gastric tumor tissues. *J Korean Med Sci* 1993; 8: 187-91.
8. Kástan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991; 51: 6304-11.
9. Soussi T, Caron de Romentel C, May P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* 1990; 5: 945-52.
10. Chen PL, Chen Y, Bookstein R, Lee WH. Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. *Science* 1990; 256: 1576-80.

11. Cai DW, Mukhopadhyay T, Liu Y, Fujiwara T, Roth JA. Stable expression of the wild-type p53 gene in human lung cancer cells after retrovirus-mediated gene transfer. *Hum Gene Ther* 1993; 4: 617-24.
12. 김주항, 문유선, 신동환, 송재진, 공수정, 라선영, 김수경, 정숙정, 정현철, 노재경, 민진식, 김병수. 인체 위암 세포주에 retroviral vector를 이용한 p53 종양억제 유전자의 형질도입에 관한 연구. *대한암학회지* 1997; 29: 754-64.
13. Loganzo F. Jr., Nabeya Y, Maslak P, Albino AP. Stabilization of p53 protein is a critical response to UV radiation in human melanocytes: implication for melanoma development. *Mol Cell Diff* 1994; 2: 23-43.
14. Sturzbecher HW, Deppert W. The tumor suppressor protein p53: relationship of structure to function. *Oncol Rep* 1994; 1: 301-7.
15. Brown R, Clugston C, Burns P, Edlin A, Vasey P, Vojtestek B, Kaye S. Increased accumulation of p53 protein in cisplatin-resistant ovarian cell lines. *Int J Cancer* 1993; 55: 678-84.
16. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53 dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993; 74: 957-67.
17. Tishler RB, Calderwood SK, Coleman CN, Price BD. Increase in sequence specific DNA binding by p53 damaging agents. *Cancer Res* 1993; 53: 2212-16.
18. Slichenmyer WJ, Nelson WG, Slebos RJ, Kastan MB. Loss of a p53-associated G1 checkpoint does not decrease cell survival following DNA damage. *Cancer Res* 1993; 53: 4164-68.
19. 라선영, 김태수, 정숙정, 이화영, 유내춘, 최진혁, 임호영, 김주항, 노재경, 민진식, 김병수, 정현철. 위암세포주에서 p53 유전자 형질도입이 위암세포주의 malignant phenotype에 미치는 영향. *대한암학회지*(in press).
20. 노재경, 정현철, 고은희, 이원영, 한지숙, 김병수. 단기배양된 위선암 세포군의 각종 항암제에 대한 체외 세포독성에 관한 연구. *대한암학회지* 1991; 23: 495-517.
21. Fan S, Smith ML, Rivet II DJ, Duga D, Zhan Q, Kohn KW, Fornace AJ, O'Connor PM. Disruption of p53 function sensitize breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and pentoxifylline. *Cancer Res* 1995; 55: 1649-54.
22. 박규현, 라선영, 김태수, 이병찬, 박세호, 정현철, 이원영, 김주항, 노재경, 이경식, 민진식, 김병수. 유방암 진행에 따른 Telomerase activity 발현 증가. *대한암학회지* 1997; 29: 1032-40
23. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Ichikawa T, Matsuura Y. Length of telomeric repeats in neuroblastoma: correlation with prognosis and other biological characteristics. *Jpn J Cancer Res* 1992; 83: 159-64.
24. MacDonald JS, Schein PS, Woolley PV, Smythe T, Ueno W, Hoth D, Smith F, Boirin M, Gisselbrecht C, Burnet R. 5-fluorouracil, doxorubicin, and mitomycin-C(FAM) combination chemotherapy for advanced gastric cancer. *Ann Intern Med* 1980; 93: 533-9.
25. Ajani JA, Ota DM, Jackson DE. Current strategies in the management of local, regional and metastatic gastric cancer. *Cancer* 1991; 67: 260-5.
26. Wilke H, Preusser P, Fink U, Achterrath W, Meyer HJ, Stahl M, Lenaz L, Meyer J, Siewert JR, Geerling H, Kohne-Wompner CH, Harstrict A, Schmoll HJ. New development in the treatment of gastric cancer. *Semin Oncol* 1990; 17: 61-70.
27. Nabeya Y, Loganzo F, Maslak P, Lai L, DeOliver AR, Schwartz GK, Blundell MI, Altorki NK, Kelsen DP, Albino AP. The mutational status of p53 protein in gastric and esophageal adenocarcinoma cell lines predicts sensitivity to chemotherapeutic agents. *Int J Cancer* 1995; 64: 37-46.
28. Hamada K, Alemnay R, Zhang WW, Hittelman WN, Lotan R, Roth JA, Mitchell MF. Adenovirus-mediated transfer of a wild-type p53 gene and induction of apoptosis in cervical cancer. *Cancer Res* 1996; 56: 3047-54.
29. Gupta M, Fan S, Zhan Q, Kohn KW, O'Connor PM, Pommier Y. Inactivation of p53 increases the cytotoxicity of camptothecin in human colon HCT116 and breast MCF-7 cancer cells. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 1653-60.
30. Skladanowski A and Larsen AK. Expression of wild-type p53 increases etoposide cytotoxicity in M1 myeloid leukemia cells by facilitated G2 to M transition: implications for gene therapy. *Cancer Res* 1997; 57: 818-23.
31. Gallardo D, Drazan KE, McBride WH. Adenovirus-based transfer of wild-type p53 gene increases ovarian tumor radiosensitivity. *Cancer Res* 1996; 56: 4891-3.
32. Dalal S, Gao Q, Androphy EJ, Band V. Mutational analysis of human papillomavirus type 16 E6 demonstrates that p53 degradation is necessary for immortalization of mammary epithelial cells. *J Virol* 1996; 70: 683-8.
33. Cao Y, Gao Q, Wazer DE, Band V. Abrogation of wild-type p53-mediated transactivation is insufficient for mutant p53-induced immortalization of normal human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 1997; 57: 5584-9.