

위암세포주에서 p53 유전자 형질도입이 위암세포주의 Malignant Phenotype에 미치는 영향

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

라선영^{1,2,3} · 김태수^{1,2} · 정숙정^{1,2} · 안중배^{1,2,3} · 실광용^{1,2,3}
공수정^{1,2,3} · 이화영^{1,2,3} · 유내훈^{1,2,3} · 최진혁⁵ · 임호영⁵
김주향^{1,2,3} · 노재경^{1,2,3} · 민진식^{1,2,4} · 김병수^{1,2} · 정현철^{1,2,3}

Effect on Malignant Phenotypes of Gastric Cancer Cell Line after p53 Gene Transduction

Sun Young Rha, M.D., Ph.D.^{1,2,3}, Tae Soo Kim, M.D.^{1,2}, Sook Jung Jeong, M.D.^{1,2}
Joong Bae Ahn, M.D.^{1,2,3}, Kwang Yong Shim, M.D.^{1,2,3}, Soo Jung Kong, M.D.^{1,2,3}
Hwa Young Lee, M.D.^{1,2,3}, Nae Choo Yoo, M.D.^{1,2,3}, Jin Hyuk Choi, M.D., Ph.D.⁵,
Ho Young Lim, M.D.⁵, Joo Hang Kim, M.D., Ph.D.^{1,2,3}, Jae Kyung Roh, M.D., Ph.D.^{1,2,3}
Jin Sik Min, M.D., Ph.D.^{1,2,4}, Byung Soo Kim, M.D., Ph.D.^{1,2}
and Hyun Cheol Chung, M.D., Ph.D.^{1,2,3}

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

Purpose: To evaluate the effect of wild type p53 gene transduction on the malignant phenotypes for metastasis in gastric cancer, we compared the biological phenotypes of gastric cancer cell lines based on p53 gene status. Then, after retrovirus-mediated wild-type p53 gene transduction, we compared those phenotypes among parent YCC-3 cell line, vector transduced YCC-3v cell line and a clone of YCC-3C₃.

Material and methods: Four human gastric cancer cell lines were used; YCC-1(mutant), YCC-2(wild), YCC-3(mutant) and AGS(wild). DNAs of the cell lines were analyzed to evaluate the mobility shift with PCR-SSCP. Tumorigenicity and proliferation were evaluated by soft agar assay and proliferation assay. Migratory capacity was measured by adhesion assay and Boyden chamber assay. p53 protein expression was measured by Western blot analysis and VEGF, WAF-1 were measured by ELISA assay. Angiogenic activity was measured by cross-feeding assay and cell cycle analysis was performed by flowcytometry. In vivo tumorigenicity was measured by xenograft in nude mice.

Results: YCC-3 cell line with mutant p53 gene expressed all the phenotypes for the me-

tastasis such as tumorigenicity, migration and angiogenesis. In a stable clone of YCC-3C₃, no differences were found in proliferation, cell cycle and WAF-1 expression when compared to those of the control YCC-3v and parent YCC-3 cell line, even if increased p53 protein production was found by Western blot analysis. However, both in vitro and in vivo tumorigenicity were decreased in a stably transduced YCC-3C₃ clone. The adhesive capacity was also decreased in YCC-3C₃ clone whereas the endothelial cell growth stimulatory effect and VEGF production showed no difference compared to those of the YCC-3v cell line.

Conclusion: Wild-type p53 gene transduction in gastric cancer cell line decreased tumorigenicity which resulted from decreased colony forming activity and adhesive capacity but not formed changes of angiogenic activity. This suggested the possible application of anti-metastasis strategy with p53 gene therapy in gastric cancer.

Key Words: Wild-type p53, Malignant phenotypes, Transduction, Gastric cancer

서 론

인체 암조직에서 관찰되는 가장 흔한 유전자 변화는 p53 유전자 돌연변이로 지금까지 폐암, 유방암, 위암등에서 이 유전자의 돌연변이에 의한 단백질의 비활성화가 보고되었다(1~3). 대장암과 유방암에서는 p53 유전자의 돌연변이가 암발생의 초기단계에 관여하는 반면(4), 뇌종양에서는 비교적 악성도가 낮은 성상세포종에서 악성도가 높은 다형성 신경교아종으로 이행시에 p53 유전자의 비활성화가 관여할 가능성이 제시되었다(5). 반면 위암에서는 p53이 암화 과정중 진행, 즉 전이에 관계할 가능성이 제시되었다(6).

암의 전이는 암세포의 증식, 침윤, 혈류를 통한 원격장기로의 이동, 호발장기로의 부착 및 신생혈관생성등의 다단계 과정을 거친후 완료하게 된다(7,8). 이와같은 다단계 전이 과정을 완료하기 위해서는 암세포가 여러가지 생물학적 특성(biological phenotypes)을 발현해야 한다(9~11). 즉 종양성장인자 발현에 의한 종양형성능, 기질분해효소의 생성능, 세포 이동능, 주위 기질조직으로의 부착능 및 혈관생성 유도능이 발현해야 원격전이 발생한다(12). 따라서 p53 유전자의 돌연변이

에 의해 원격전이가 증가한다면, p53 유전자의 돌연변이가 발생한 세포와 발생하지 않은 세포 사이에는 상술한 여러가지 생물학적 활성의 차이가 있을 것으로 생각된다.

p53 단백질은 393개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 암 유발유전자에 의한 세포변형을 억제시키거나 DNA가 손상된 세포의 분열주기를 G1기에 정지시켜 DNA 손상을 회복시키거나 세포사멸(apoptosis)을 유도한다(13,14). 따라서 점 돌연변이, 유전자 소실 혹은 재배치 등이 정상 p53 유전자에 발생할 경우 변형된 단백질이 생성되어 종양세포의 증식을 억제하지 못할 뿐 아니라 정상형 p53 단백질과 복합체를 형성하여 정상형 p53 단백질의 기능을 억제시킨다(15). 종양억제 유전자로서 p53 유전자의 기능은 골육종 세포주에 정상 p53 유전자를 형질도입시에 암세포의 집락형성 및 성장속도가 감소됨으로 일부 증명되었다(16). 암의 전이 과정에서 p53 유전자의 역할은 임상적으로는 비소세포성 폐암 환자의 암 조직에서 p53 유전자 돌연변이 발생시에 주위 임파절로 전이율이 높음이 관찰되었다(17). 실험적으로는 쥐의 방광암세포에 돌연변이 p53 유전자를 형질도입시 전이가 증가함이 확인되었으며(18), 몇 가지 인체 종양에서 정상 p53 유전자 형질도입시

종양세포의 악성형질의 발현을 억제하여 종양세포의 성장을 억제함이 밝혀졌다(19,20).

저자 등은 위암세포주에서 retrovirus를 이용하여 정상 p53 유전자를 형질도입시 위암세포주의 성장억제 효과가 p53 유전자의 돌연변이를 함유하고 있는 위암세포주에서 확인할 수 있었다. 반면, 정상형의 p53 유전자를 함유하는 위암세포주에서는 성장억제 효과를 관찰하지 못하였다. 따라서 본 연구에서는 위암 세포주에서 정상 p53 유전자의 전이억제 기능을 조사하기 위해 p53 유전자의 돌연변이가 발생한 위암세포주와 정상 p53 유전자가 존재하는 세포주에서 생물학적 특성의 차이 여부를 조사하였다. 다음, 돌연변이 p53 유전자를 함유하는 세포주에 정상 p53 유전자를 형질도입 한 후 세포증식에는 영향을 받지 않는 clone을 선정하여 여러가지 생물학적 특성의 변화를 비교함으로써 p53 유전자 요법의 항 전이 치료로서의 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

1) 위암세포주 배양 및 DNA 추출

실험대상 세포주는 연세 암연구소에서 수립한 YCC-1(mutant p53), YCC-2(wild p53), YCC-3(mutant p53) 세포주와 미국의 ATCC(Rockville, MD, USA)에서 구입한 AGS(wild p53) 세포주를 사용하였다. 세포배양은 가열 비활성화된 10% 우태아 혈청(GIBCO, Grand Island, USA)을 함유하는 MEM(GIBCO, Grand Island, USA)을 기본 배양액으로 하여 5% CO₂ 존재하에 37°C 항온배양기에서 배양하였다. 각 세포주에서 DNA는 2×10⁷개의 세포를 각각 GIT buffer(4M guanidine isothiocyanate, 3 M sodium acetate, 0.8% β-mercaptoethanol)에 녹인 후 5.7 M cesium chloride 존재하에 초원심 분리하여 phenol-chloroform으로 추출한 후 ethanol 침전을 시행하여 Davis등(21)의 방법에 따라 분리하였다.

2) Proliferation assay

세포주의 증식능은 노등(22)의 방법으로 시행

하였다. 간략하면, 96-well plate의 각 well에 10,000개의 세포주를 주입한 다음 24시간 후부터 매일 증식을 측정하였다. 각 세포주마다 3개의 well에서 세포증식을 측정하여 평균±표준편차로 도식화 하였다.

3) Soft agar assay

Wellstein등(23)의 방법으로 시행하였다. 간략하면, agar 1.2 g을 50 ml의 증류수에 용해시켜 멸균 소독하였다. 하층 agar는 50 ml의 우태아 혈청이 함유된 배지, 25 ml의 2배 농축배지, 50 ml의 agar를 혼합하여 42°C 항온수조에 보관하면서 agar 용액 1 ml를 35 mm dish에 투여하고 고형화시켰다. 각 dish마다 20,000개의 세포를 투여하고 배양하여 집락형성을 평가하였다. 3개의 dish를 1개의 point로 하여 세포집락수를 센 다음 평균±표준편차로 도식화하였다.

4) Boyden chamber assay

각 세포주들의 이동능을 비교하기 위해 boyden chamber assay를 시행하였다(24). Filter당 60 ug/ml 농도의 matrigel(Collaborative Research, Bedford, MA, USA) 50 ul를 polycarbonate membrane filter(13 mm 반경, 12 micropore 규격, Poretics Corp., Livermore, CA, USA)에서 고형화시켰다. Lower chamber에 세포 배양액을 넣고 filter를 올려놓은 다음, cap을 단단히 고정시켰다. 세포를 수확한 후 chamber의 상부구조에 3×10⁵개의 세포를 주입하고, 0.1% bovine serum albumin (BSA)이 함유된 세포 배양액으로 상부구조를 꼭 채웠다. 37°C에서 7시간 배양한 다음 filter를 꺼내어 crystal violet으로 5분간 염색하였다. Filter를 세척 후 건조시킨 다음, 0.1 M sodium citrate 용액으로 탈색하고 용해된 염색 용액을 96 well plate로 옮기고 automated EIA reader를 이용하여 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 매 실험은 3 chamber씩 시행하여 평균±표준편차로 도식화하였다.

5) 세포부착능 비교

세포의 전이능을 비교하기 위해 Frandsen 등(24)의 방법에 따라 기저막 부착능을 조사하였다. 세포배양용 96 well plate(Costar, MA, USA)에 matrix를 투여하고 고정화시켰다. 비특이 반응을 방지하기 위해 phosphate-buffered saline(PBS)에 용해시킨 3% BSA 용액 100 ul를 분주한 후 30분간 추가 반응시켰다. Scraper를 이용하여 실험에 사용할 세포를 추출한 다음 우태아 혈청이 포함되지 않은 배지에 0.1% BSA를 첨가하여 세척하였다. 준비된 plate를 PBS로 2회 세척후, 세포를 우태아 혈청이 포함되지 않고 0.1% BSA가 첨가된 배지에 부유시키고 이를 100 ul씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ 항온항습기에서 1시간 배양하였다. 부착되지 않은 세포가 함유된 부유액을 제거한 후, 0.5% crystal violet 50 ul로 10분간 염색시킨뒤 염색약을 제거하고 흐르는 수돗물로 3회 세척하였다. 세척한 plate를 24시간 동안 완전히 건조시킨 후 각 well 당 100 ul의 0.1 M sodium citrate용액을 첨가하여 20분간 실온에서 용해시켰다. 용해된 염색용액을 96 well plate로 옮기고 automated EIA reader를 이용하여 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

6) Cross-feeding assay

Fillinger 등(25)의 방법에 따라 위암세포주의 내피세포 증식 유도능을 비교하기 위해 cross-feeding assay를 시행하였다. 6 well plate에 내피세포 50,000개를 분주한 다음, 반투과성막이 있는 세포배양용 insert(Falcon, NJ, USA)를 얹어 놓았다. 위암세포주 500,000개를 우태아혈청이 없는 배지에 부유시켜 cell insert내로 분주하였다. 37°C, 5% CO₂의 항온항습 배양기에서 3일간 배양후 내피세포수를 측정하였다. 각 세포주 마다 3 well의 세포수를 세어 평균±표준편차로 도식화하였다.

7) ELISA assay

Shi 등(26)의 방법으로 각 위암세포주에서 추출

한 세포질을 이용하여 측정하였다. VEGF 측정은 일차항체를 사람 VEGF에 대한 mouse 단클론항체(R&D, MN, USA)를 사용하는 kit를 이용하여 manufacturer's instruction에 따라 시행하였다. WAF1 assay를 위한 세포질 추출은 WAF-1 kit(Oncogene Science, Calbiochem, USA)의 manufacturer's instruction에 따라 시행하였다, 간략하면, 세포를 scraper를 이용하여 채취한 다음 PBS로 세척하고 pellet를 resuspension buffer(50 mM Tris, 5 mM EDTA, 0.2 mM PMSF, 1ug/ml pepstatin, 0.5 ug/ml leupeptin, pH 7.4)에 용해시켰다. 세포부유액 100 ul에 20 ul의 antigen extraction agent를 첨가하고 얼음 위에서 30분간 반응시킨 후 세포추출액을 취한 다음 원심분리 시켰다. 채취한 세포질로 ELISA를 시행하여 평균±표준편차로 도식화하였다.

8) 상대적 생물학적 활성 비교

각 세포주의 생물학적 활성은 그 활성이 관찰되지 않을 경우 negative로, 가장 낮게 발현될 경우를 low expression(+), low expression 보다 2배 이하로 발현할 경우 intermediate expression(++), low expression 보다 2배 이상 발현할 경우 high expression(+++)으로 규정하여 서로 상대적으로 비교하였다.

9) Retrovirus vector를 이용하여 p53 유전자 형질도입후 stable clone 선택

김 등(27)의 방법에 의해 위암세포주를 LNC/p53 retrovirus로 4시간 감염시킨 후 24시간 후부터 G418 800 ug/ml의 농도로 clone(YCC-3C)을 선택하였다. 대조군으로는 p53 유전자가 없고 neomycin resistance 유전자만 주입된 retrovirus를 감염시킨 세포주(YCC-3v)로 하였다.

10) Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism

위암세포주에 p53 유전자의 형질도입 유무를 확인하기 위하여 PCR-SSCP를 시행하였다. Orita 등(28)의 방법에 따라 genomic DNA는 위암 세포

주에서 QIAGEN kit(QIAGEN, Chartworth, CA)를 이용하여 분리하였다. 0.1 ug의 genomic DNA는 oligonucleotide primer의 5' end에 32 P-ATP(Amersham, Arlington Heights, IL, USA)를 부착시킨 후 Taq polymerase의 존재하에 Gene Amp kit(Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA)를 이용하여 10 ul의 완충용액으로 중합효소 연쇄반응을 95°C에서 50초, 55°C에서 50초, 72°C에서 90초를 1 cycle로 하여 40 cycle을 시행하였다. 이때 pair로 사용한 forward primer는 (5'-ACTTGTGCCCTGACTT-3')이었으며, reverse primer는 (5'-AGTGTCTTCTGTC-ATCCAAATACTC-3')이었다. PCR 산물 5 ul를 45 ul의 formamide dye 혼합물(95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% xylene cyanol, 0.05% bromophenol blue)과 함께 95°C에서 4분간 가열한 후 혼합물 2 ul를 취하여 0.5% MDE gel을 이용하여 7 W로 cold room에서 14시간 전기영동한 후, X-ray film에 자가감작 시켜 band의 위치변화를 확인하였다.

11) Flowcytometry

Fan등(29)의 방법에 따라 세포를 추출한 후 70% 에탄올로 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.

12) Western blot analysis

Li등(30)의 방법에 따라 시행하였다. 간략하면, 세포를 채취한 다음, lysis buffer(0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 1% SDS, 10 mM EDTA, 2 mM DTT)로 세포질을 추출하여 단백질을 Lowry법으로 측정하였다. 50 ug의 단백질을 loading buffer(20% glycerol, 5% β -mercaptoethanol, 4% SDS, 125 mM Tris, pH 6.8, 0.1 mg bromophenolblue)에 용해시켜 증탕한 후 10% SDS-PAGE에 100 V로 120분간 전기영동하였다. 단백질을 nitrocellulose membrane으로 transfer시킨 후 5% low-fat milk를 함유하는 PBST(0.1% Tween 20가 함유된 PBS)로 실온에서 60분

간 반응시켰다. 다음 일차항체(Ab-2, Oncogene Science, USA; 1 ug/ml)를 5% low-fat milk를 함유하는 PBST로 희석하여 반응시킨 후 horseradish peroxidase가 부착된 이차항체를 반응시켰다. 반응의 결과는 chemoluminescence reagent(Amersham, USA)를 이용하여 추적하였다.

13) 누누생쥐에서 p53 유전자 형질도입후 종괴성장 비교

BALB/C 누누 생쥐에서 정상 p53 유전자가 형질도입된 clone의 종양형성 및 성장을 조사하기 위하여 누누생쥐 복벽에 모세포주 YCC-3와 형질도입 대조 세포주 YCC-3v, stable clone YCC-3C₃를 4×10^7 개씩을 PBS에 현탁하여 피하주사하고 2일 간격으로 종괴의 크기를 측정하였다. 종괴의 크기는 종괴의 장경과 이에 수직하는 단경을 곱함으로써 종괴의 면적(mm²)을 구하는 방법을 사용하여 비교하였다.

결 과

1) Comparison of biological phenotypes based on p53 status

세포집락 형성능을 비교한 바, YCC-1과 YCC-2 세포주는 집락을 형성하지 못한 반면, YCC-3는 low expression, AGS는 high expression을 나타내었다(Fig. 1A). 모든 세포주는 투여 세포수에 비례하여 부착 세포수가 증가하였다. 이들 세포주에서 세포부착능을 상대적으로 비교한 바, YCC-1과 YCC-2는 low, YCC-3는 intermediate, AGS는 high expression을 나타내었다(Fig. 1B). 세포의 이동능은 YCC-1에서는 관찰되지 않았으며, YCC-2, YCC-3가 low, AGS가 high expression을 나타내었다(Fig. 1C). p53 유전자 상태에 따른 집락형성능, 내피세포 증식 유도능, 세포부착능 및 이동능의 비교는 Table 1과 같다.

Table 1. Relative grouping of biological phenotypes based on p53 state

	p53	Colony formation	Angiogenesis	Adhesion	Migration
YCC-2	wild	-*	-	+ [†]	+
AGS	wild	+++ [‡]	-	+++	+++
YCC-1	mutant	-	-	+	-
YCC-3	mutant	+	+	++ [†]	+

*negative, [†]low(minimum expression), [‡]intermediate(<2 times of the low expression), [§]high(>2 times of the low expression)

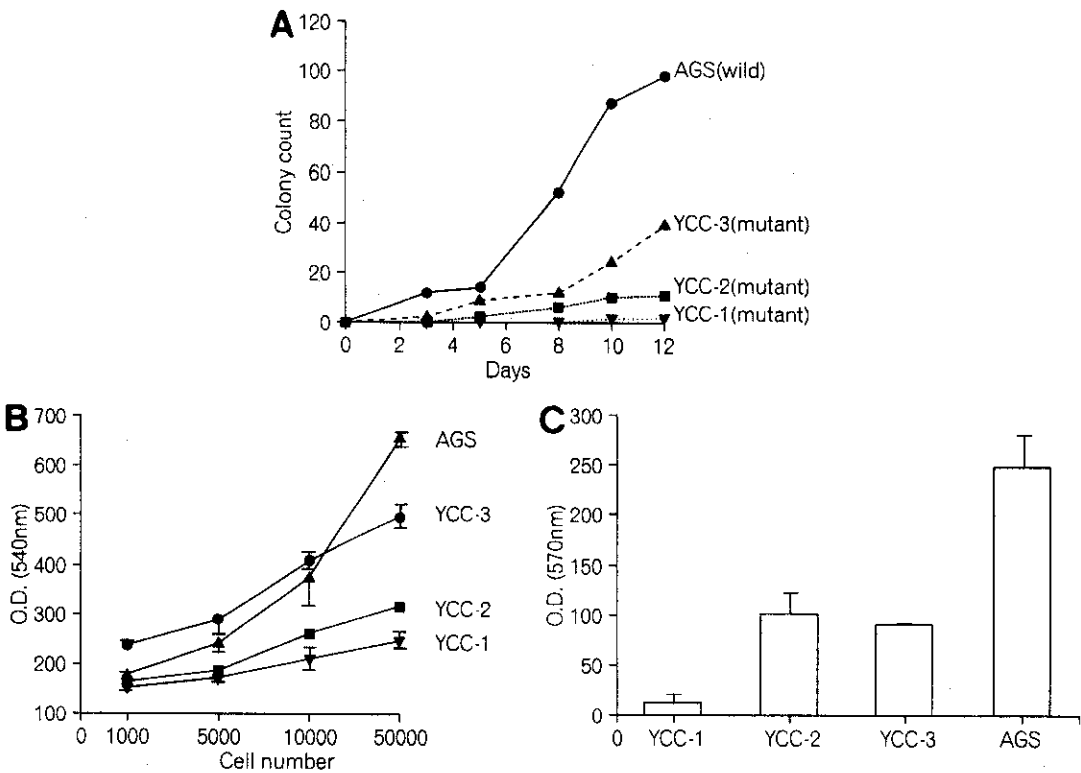


Fig. 1. Comparison of biological phenotypes in gastric cancer cell lines. A) comparison of colony forming activity in soft agar assay B) comparison of cell adhesion capacity C) comparison of cell motility by Boyden chamber assay

2) 정상 p53 유전자가 형질도입된 YCC-3 세포주 clone(YCC-3C3)선정

p53 유전자가 point mutation된 YCC-3 세포주에 정상 p53 유전자를 retrovirus vector LNC/p53을 이용하여 형질도입한 후 G418로 selection 하여 clone

을 선별하였다(Fig. 2A). 형질주입 대조군 clone으로는 neomycin resistance 유전자만 형질도입된 YCC-3v를 선별하였다. Clone을 선별한 후 DNA를 추출한 다음 PCR-SSCP를 이용하여 유전자 형질도입에 의한 mobility shift가 관찰되는 clone인 YCC-3C3를 선별하였다(Fig. 2B).

Fig. 2. A) Selection of the wild-type p53 gene trasduced YCC-3 cell line. (a) parent YCC-3 cell line with G418 treatment (b) YCC-3C₃ clone with G418 treatment. B) PCR-SSCP of the parent(YCC-3), vector(YCC-3v) and clones including YCC-3C₃ showing mobility shift. lane 1: YCC-3, lane 2: YCC-3v, lane 3: YCC-3C₁, lane 4: YCC-3C₃, lane 5: YCC-3C₄, lane 6: YCC-3C₅, lane 7: YCC-3C₆, solid arrow: new band in clones, broken arrow: new band in YCC-3v and clones.

하는 항체(Ab-2, Oncogene Science, USA)를 이용하여 Western blot analysis후 총 p53 단백질생성을 비교한 바, YCC-3 모세포주, YCC-3v 형질도입 대조세포주에 비해 clone 1, 3, 6에서 p53 단백질 생성이 증가하였으며, 특히 YCC-3C₃ clone에서 p53 단백질의 생성이 가장 증가되어 있음을 확인하였다(Fig. 3).

Fig. 3. Western blot analysis of LNC/p53-mediated p53 protein expression in clone YCC-3C₁, YCC-3C₃, YCC-3C₆. For each group, 50ug of cell lysate were separated on a 10% SDS-PAGE, electroblotted onto nitrocellulose membrane and probed with Ab-2. Expression was detected using the enhanced chemoluminescence method.

3) Comparison of p53 protein expression by Western blot analysis

Mutant p53 단백질과 wild p53 단백을 모두 감지

4) Comparison of proliferation potential of clone YCC-3C3

p53 단백질 형성이 가장 많은 YCC-3C₃ clone을 선정하여 세포 증식 곡선을 비교한 바, YCC-3 모세포주와 vector만 주입된 YCC-3v 대조세포주, YCC-3C₃ clone 사이에 성장곡선의 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 4A). Flowcytometry를 이용한 세포주기 비교시에도 YCC-3v와 YCC-3C₃ 세포주 사이에 차이가 없었다(Fig. 4B). S-phase fraction은 YCC-3 세포주가 38.4%, YCC-3v 세포주가 48.8%, YCC-3C₃ 세포주가 48.5%였다. 각 세포주에서 추

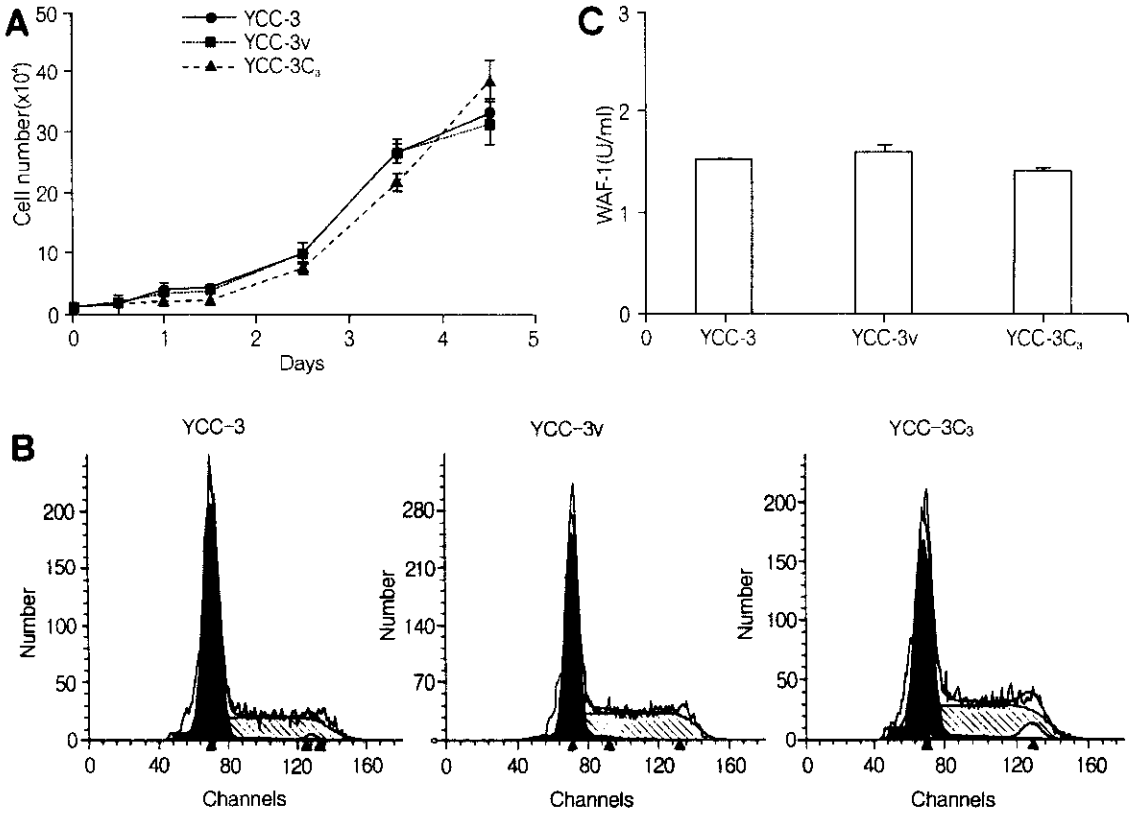


Fig. 4. Comparison of proliferation potential of YCC-3C3 clone to YCC-3v and YCC-3 cell lines. A) Proliferation assay of the 3 cell lines. B) Flowcytometry of the cell cycle of the 3 cell lines. C) ELISA assay of WAF-1 in the cytosolic extracts of the 3 cell lines

출한 세포질에서 WAF-1의 발현도를 ELISA assay로 비교한 바, 각 세포주 사이에 차이가 없었다 (Fig. 4C).

5) 대조 세포주와 YCC-3C3 사이의 biological phenotypes 비교

먼저 soft agar assay에 의한 세포 집락능을 비교한 바, YCC-3v 대조세포주에 비해 YCC-3C₃의 집락형성능이 56% 감소되었다(Fig. 5A). 내피세포 증식능을 비교하기 위해 cross-feeding assay를 시행한 바, 내피세포 증식은 YCC-3v와 YCC-3C₃ 세포주 사이에는 차이가 없었다(Fig. 5B). VEGF 발현도 YCC-3가 638 pg/ml, YCC-3v가 749 pg/ml, YCC-3C₃가 785 pg/ml로 차이가 없었다(Fig. 5C).

세포부착능을 비교한 바, YCC-3v에 비해 YCC-3C₃에서 부착능이 22% 감소됨을 확인하였다(Fig. 5D).

6) 누누생쥐에서 종양 형성능 비교

YCC-3, YCC-3v, YCC-3C₃ 세포주들을 누누 생쥐의 피하에 주입하고 종양성장을 조사한 바, YCC-3C₃ 세포주는 추적관찰 14일까지 종양을 형성하지 않았다. 반면, YCC-3와 YCC-3v 세포주가 주입된 겨우 투여 7일째 부터는 종양을 형성하였다(Fig. 6).

고 안

위암은 서구나 구미에서는 발생빈도가 낮으며,

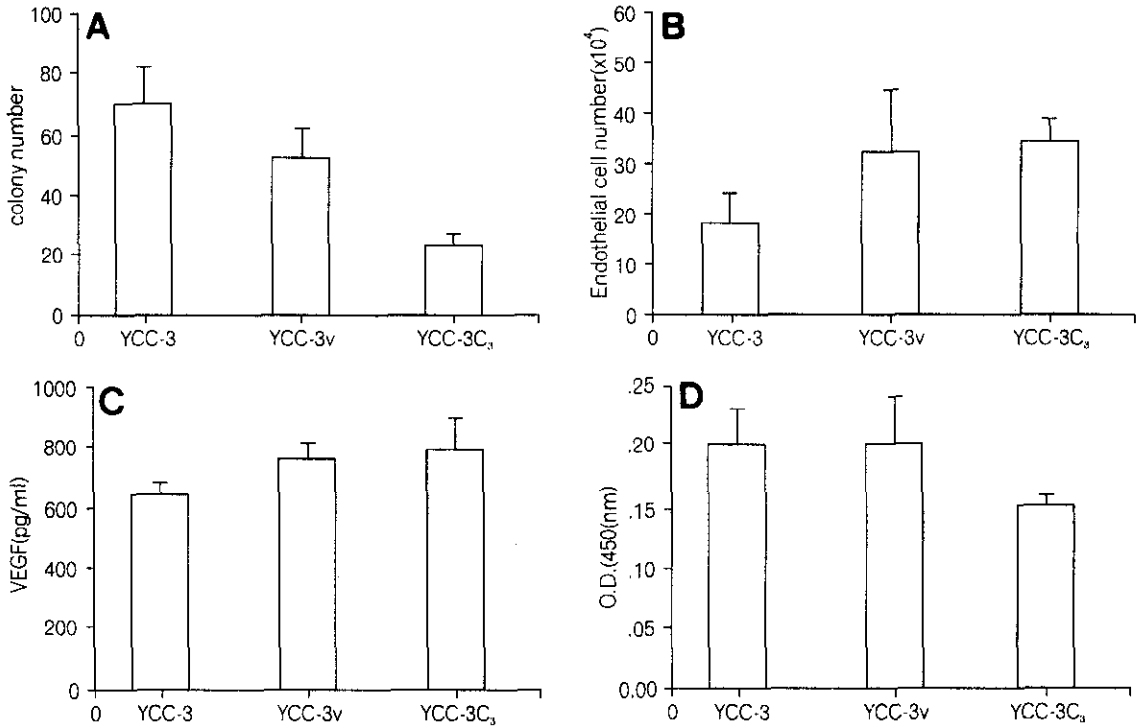


Fig. 5. Comparison of biological phenotypes between YCC-3, YCC-3v and YCC-3C₃ cell lines. A) comparison of colony forming activity by soft agar assay B) comparison of angiogenic effect by cross-feeding assay C) comparison of VEGF content in the cytosolic extracts D) comparison of cell adhesion capacity

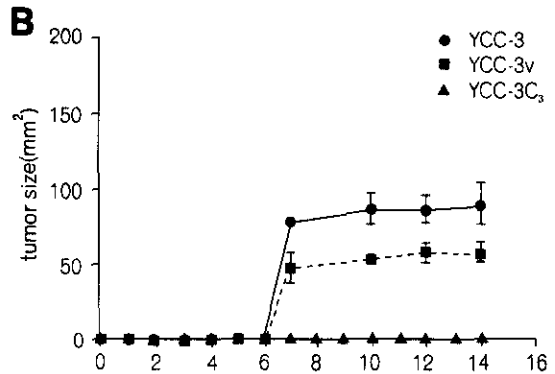


Fig. 6. Comparison of in vivo tumorigenicity of the gastric cancer cell lines in nude mice. A) Tumors are found in YCC-3 and YCC-3v xenografted mice but not in YCC-3C₃ xenografted mouse. 1: YCC-3, 2: YCC-3v, 3: YCC-3C₃

동양에서는 일본이 우리나라와 발생빈도가 유사하나 대부분 조기위암의 상태에서 진단되므로 치료의 개념이 근본적으로 우리나라와 다르다. 따라서 새로운 치료개념의 도입과 치료법 개발에

의한 위암의 완치율 향상에 관한 연구는 우리나라에서 가능하다 하겠다. 정상 p53 유전자의 생물학적 기능은 p53 유전자 돌연변이가 발생한 골육종 세포주에 정상 p53 유전자를 형질도입시에 암

세포의 집락형성 및 성장속도가 감소함을 유도함으로써 세포증식 조절능이 있음이 밝혀졌다(13). p53 유전자의 돌연변이는 폐암, 대장암, 유방암 등 여러종류의 종양에서 관찰되고 있다. 특히 위암에서는 임파절 전이 등의 위암 진행과 p53 유전자 변이가 상관성이 있으므로 제시되고 있다(6). 또한 쥐의 방광암 세포에 돌연변이 p53 유전자를 형질도입시에 전이가 증가됨이 발견되어 p53 유전자 돌연변이가 암세포의 전이와 관계가 있음이 제시되었다(15). 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(27). 따라서 본 연구에서는 암의 전이과정에서 p53 유전자 변이가 관여함을 실험적으로 조사하기 위하여 p53 유전자 돌연변이가 있고 암의 전이에 필요한 여러 가지 생물학적 활성이 있는 세포주를 선택하여 정상 p53 유전자를 형질도입한 다음, 세포주기에는 영향을 받지 않는 clone을 선택하여 이들 clone에서 전이에 필요한 생물학적 활성의 변화 여부를 조사하였다.

암이 전이하기 위해서는 암세포가 증식하여 주위조직으로 침윤하고, 혈행을 통해 원격장기로 전이후 신생혈관 생성 등을 유도하는 여러가지 생물학적 활성이 모두 발현되어야 가능하다. 먼저 본 연구에서는 p53 유전자 돌연변이에 의해 위암의 원격전이가 증가한다면 돌연변이가 발생한 위암 세포주는 돌연변이가 발생하지 않은 위암 세포주에 비해 여러가지 생물학적 활성에서 차이가 있을 것으로 가정하였다. 따라서 본 연구에서는 이러한 전이능력을 비교하기 위해 생물학적 활성을 정하여 각각의 대상 위암 세포주 별로 내재하는 p53 유전자의 돌연변이 유무에 따라 그 활성을 상대적으로 비교하였다. 종양형성능은 soft agar assay에서 집락 형성능으로 비교하였으며, 전이능은 세포이동능과 부착능으로, 신생혈관 형성능은 내피세포 증식 유도능으로 정하여 비교하였다. 대상 세포주로는 저자 등이 보고(6,27)한 결과에

근거하여 p53 유전자의 돌연변이가 발생한 위암 세포주(YCC-1, YCC-3)와 정상 p53 유전자를 함유한 위암 세포주(YCC-2, AGS)들을 선정하여 이들에게서 상술한 생물학적 활성의 차이를 조사하였다.

세포의 종양형성능을 비교하기 위하여 세포집락 형성능을 비교한 바, YCC-3, AGS 세포주만이 집락형성함을 관찰하였다. 세포의 이동능과 부착능의 경우는 AGS 세포주가 가장 높았으며, YCC-2, YCC-3 세포주가 YCC-1 세포주에 비해 비교적 증가되어 있음을 확인하였다. 저자들이 보고한(31) 각 위암 세포주의 내피세포 증식 유도능을 같이 비교한 바, 암의 전이에 필요한 모든 생물학적 활성을 발현하는 세포주는 p53 유전자의 exon 5에 점돌연변이가(codon 175; CGC → CAC) 발생한 YCC-3 세포주였으며, 그의 다른 세포주들에서 p53 유전자 돌연변이에 따른 생물학적 활성의 구별은 어려웠다. 따라서 본 연구의 다음 단계로 YCC-3 위암세포주에 정상 p53 유전자의 coding sequence를 retrovirus를 이용하여 형질도입하고 나서 세포가 사멸하지 않는 stable clone(YCC-3Cs)들을 선택한 다음, YCC-3 모세포주와, neomycin-resistance gene만 형질도입한 YCC-3v 대조 세포주, YCC-3Cs 세포주에서 상술한 생물학적 특성의 차이와 종양형성능의 차이를 비교함으로써 위암에서 p53 유전자 요법의 항전이 치료요법으로서의 가능성을 조사하였다.

위암 세포주에서 p53 유전자의 돌연변이를 정상화 시킬 경우 세포가 사멸함은 이전의 연구에서 보고하였으며(27), 이 경우 p53 유전자의 형질도입에 의한 위암 세포주의 전이능 변화를 세포사멸로 조사할 수가 없었다. 이점을 해결하기 위해 본 연구에서는 p53 유전자를 형질도입할 경우 세포의 성장 및 그 주기에는 영향을 미치지 않으면서도 세포의 전이에 필요한 생물학적 특성에는 영향을 줄수 있는지를 확인하기 위해 먼저 정상 p53 유전자가 형질도입된 후에도 생존하는 stable clone을 선택하였다. 18개의 clone을 선택한 후 PCR-SSCP를 이용하여 p53 유전자가 형질도입됨에 따

라 발생한 것으로 판단되는 mobility shift가 확인된 YCC-3C₃ clone을 선택하여 다음의 실험을 진행하였다. 그리고 형질도입된 유전자가 YCC-3C₃ 세포주내에서 p53 단백을 생성함을 확인하기 위해 정상 및 mutant p53 단백을 추적할 수 있는 단클론 항체를 사용하여 Western blot을 시행하였다. 그 결과 YCC-3 모세포주와, YCC-3v 대조군 세포주보다 YCC-3C₃ 세포주에서 총 p53 단백질의 생성이 증가됨을 확인하여, 형질도입된 p53 유전자가 YCC-3C₃ 세포주에서 작용함을 확인하였다.

p53 유전자가 형질도입된 YCC-3C₃ 세포주는 모세포주 혹은 대조 세포주에 비해 세포 증식능의 변화가 없음을 확인하기 위해 세포 증식 곡선과 flowcytometry에 의한 세포주기를 비교한 바, 대조 세포주와 YCC-3C₃ 세포주 사이에 세포증식능과 세포주기에 차이가 없어 올바른 clone이 선택되었음을 확인하였다. p53 유전자의 형질도입에 의해 정상 p53 단백질의 생성이 증가할 경우 p53 단백질의 transactivation 기전으로 WAF-1 등 세포주기의 변화와 세포 증식을 억제하는 단백질의 생성이 증가하고 그 결과 세포는 사멸하거나 증식억제가 유도된다(30,32,33). 그러나 본 YCC-3C₃ 세포주는 p53 단백질의 생성이 증가함에도 불구하고 세포의 증식에는 차이가 없었으므로 WAF-1의 변화를 대조세포주와 YCC-3C₃ 세포주에서 비교함으로써 p53 단백질의 생성증가에 따른 세포증식 억제 pathway의 활성화 여부를 조사하였다. 그 결과 예상대로 YCC-3C₃ 세포주에서 p53 단백질의 생성이 증가함에도 불구하고 WAF-1의 증가를 관찰할 수 없었다. 이는 본 세포주와 같이 정상 p53 유전자가 형질도입 되었음에도 불구하고 세포증식에 변화가 없는 원인은 p53 단백질에 의한 WAF-1 pathway의 활성화가 유도되지 않아 세포주기에 변화가 없음을 의미한다 하겠다.

YCC-3C₃ 세포주에서 세포주기의 변화가 없음을 확인하였으므로, 다음은 암의 전이에 필요한 여러가지 생물학적 활성의 변화여부를 조사하였다. 먼저 종양형성능의 변화를 조사하기 위하여 soft agar에서 집락형성능의 차이를 조사한 바, YCC-

3v 대조 세포주가 YCC-3 모세포주에 비해 집락형성능이 감소하였으나, YCC-3C₃ 세포주는 YCC-3v 세포주에 비해 집락형성능이 56% 감소하였다. 이는 p53 유전자 형질도입으로 인해 secretory autocrine pathway에 장애가 발생함을 의미하는 것으로 추후 p53 유전자 형질도입에 의한 종양성장 인자의 생성변화에 대한 연구가 필요하다고 생각된다. 다음은 세포 부착능을 비교한바, YCC-3C₃ 세포주에서 부착능이 감소됨을 확인할 수 있었다. 이는 세포주가 부착하기 위해서는 세포 유착물질(cell adhesion molecule)의 발현과 세포막 변형등이 필수적이므로 p53 유전자의 형질도입에 따른 이들 활성의 변화에 대한 연구가 필요하다 하겠다. 마지막으로 내피세포 증식능을 조사한 바, 세포주 사이에서 큰 차이를 발견할 수 없었다. 또한 내피세포의 증식에 가장 활성도가 높은 VEGF의 발현정도를 이들 세포주에서 비교한 바, 이 역시 큰 차이를 관찰할 수 없었다. Grossfeld등(34)은 p53 유전자 돌연변이시 종양신생혈관 생성능이 증가함으로 보고하였으나, 본 연구에서는 p53 유전자의 돌연변이를 정상화 시켰을때 내피세포 증식능의 억제는 관찰하지 못하였다. 이러한 차이는 YCC-3 모세포주가 Midkine이라는 다른 종양혈관생성 유도단백을 생성하기 때문에(31), p53 단백질이 생성되어도 내피세포 증식을 억제시키지 못한 것인지 혹은, 본 연구결과가 in vitro 결과이기 때문에 기인한 차이인지 확인할 수는 없었지만 최소한 p53 형질도입에 따른 VEGF의 발현 차이는 없음을 확인하였다.

마지막으로 p53 유전자 형질도입에 따른 생체내의 종양형성능 차이 발현을 조사하기 위해 누누생쥐에 각 세포주를 피하주입하고 조사한 바, 집락형성능 비교에서와 동일하게 YCC-3 모세포주에 비해 YCC-3v 대조세포주군의 종양형성능이 감소되었으나, YCC-3C₃ 세포주는 종양이 형성되지 않았다. 그 결과 본 연구에서는 p53 유전자 형질도입에 따른 생체내의 신생혈관 생성 차이 유무는 조사할 수는 없었으나, 집락형성능의 감소, 세포 부착능의 감소 등이 YCC-3C₃ 세포주의 종

양형성 억제를 유발한 것으로 판단되었다. 따라서 본 연구결과와 최근 보고된 p53 유전자 돌연변이가 발생한 세포주에서는 암세포가 전이하는 clone이 확산되거나(35), p53 유전자를 주입시에 전이능이 감소한 결과는(36) 이와같은 생물학적 특성의 차이에 기인함으로 판단할 수 있다 하겠다. 이러한 차이를 비교함에 있어 YCC-3v의 세포 집락능과 *in vivo* 종피성장이 YCC-3에 비해 감소되었으나 그 차이가 심하지 않아 일반적인 유전자 조작후에 관찰되는 비특이적 현상으로 판단하였으며 YCC-3v에 비해 YCC-3C₃에서 관찰되는 생물학적 특성의 차이에 유의하였다. 본 연구에서는 선택된 clone들의 유전자 염기서열을 확인하지 않았고 단지 p53 유전자의 형질도입에 따른 생물학적 활성의 변화 유무만을 조사하였으므로 추후 염기서열의 확인과 각 clone별로 p53 유전자의 transcription 및 translation의 정도 차이에 따른 생물학적 활성의 차이 비교에 대한 연구가 필요하다 하겠다.

결 론

p53 유전자 돌연변이가 발생한 위암세포주에서 retrovirus를 이용하여 정상 p53 유전자를 형질도입하고 생물학적 특성의 차이를 조사한 바, 세포주기와 증식도의 변화가 없는 clone에서 집락형성능과 세포 부착능이 감소하나 내피세포 증식 유도능이나 VEGF 발현도에는 차이가 없음을 관찰하였다. 이 clone을 누누생쥐에 피하주입시에 종양형성능이 감소한 바, 위암 세포주에 정상 p53 유전자 형질도입은 이러한 생물학적 활성의 변화를 유도하여 종양형성능을 감소시킴을 확인한 바, p53 유전자 요법이 항 전이치료법으로 응용될 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Takahashi T, Nau MM, Chiba I, Birrer MJ, Rosenberg RK, Vinocour M, Levitt M, Pass H, Gazdar AF, Minna

JD. p53 a frequent target for gastric abnormalities in lung cancer. *Science* 1989; 246: 491-4.
 2. 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.
 3. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hottetter R, Cleary K, Binger SH, Davidson N, Baylin S, Devilee D, Glover T, Collins F, Weston A, Modalk R, Harris C, Vogelstein B. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature* 1989; 342: 705-8.
 4. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JKV, Hamilton S, Vogelstein B. p53 gene mutation occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1990; 50: 7717-22.
 5. Sidransky D, Mikkelsen T, Schwechheimer K, Rosenblum ML, Cavanee W, Vogelstein B. Clonal expansion of p53 mutant cells is associated with brain tumor progression. *Nature* 1992; 355: 846-7.
 6. Kim JH, Choi JJ, Noh SH, Roh JK, Min JS, Youn JK, Yoo NC, 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.
 7. Fidler IJ, Hart IR. Biologic diversity in metastasis neoplasms: origins and implications. *Science* 1982; 217: 998-1001.
 8. Liotta LA, Rao CN, Barsky SH. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest* 1983; 49: 636-45.
 9. Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Metalloproteinase and cancer invasion. *Semi Cancer Biol* 1990; 1: 99-106.
 10. Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989; 339: 58-61.
 11. Wever VM, Tarabozetti G, Sobel ME, Albrechtsen R, Liotta LA. Role of laminin receptor in tumor cell migration. *Cancer Res* 1987; 47: 5691-8.
 12. Nicolson GL. Cancer progression and growth: Relationship of paracrine and autocrine growth mechanism to organ preference metastasis. *Exp Cell Res* 1993; 204: 171-80.
 13. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991; 351: 453-6.
 14. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cel-

- lular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991; 51: 6304-11.
15. Soussi T, Caron de Romental C, May P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* 1990; 5: 945-52.
 16. Chen DL, Chen Y, Bookstein R, Lee WH. Genetic mechanism of tumor suppression by the human p53 gene. *Science* 1991; 250: 1576-9.
 17. Marchetti A, Buttitta F, Merlo G, Diella F, Pellegrin S, Pepe S, Macchiarini P, Chella A, Angeletti CA, Callahan R, Bistocchi M, Squartini F. p53 alterations in non-small cell lung cancers correlate with metastatic involvement of hilar and mediastinal lymph nodes. *Cancer Res* 1993; 53: 2846-51.
 18. Pohl J, Goldfinger N, Radler-Pohl A, Rotter V, Schirmacher V. p53 increases experimental metastatic capacity of murine carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 2078-81.
 19. Baker SJ, Markowitz S, Fearson ER, Villson JKV, Vogelstein B. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 1990; 249: 912-5.
 20. Takahashi T, Carbone D, Takahashi T, Nay MM, Hide T, Linnoila I, Ueda R, Minna JD. Wild type but not mutant p53 suppresses the growth of human lung cancer cells bearing multiple genetic lesions. *Cancer Res* 1992; 52: 2340-43.
 21. Davis L, Kudhl M, Battey J. Basic methods in molecular biology. 2nd ed. Norwalk, Appleton & Lange, 1994.
 22. 노재경, 정현철, 고은희, 이원영, 한지숙, 김병수. 단기배양된 위선암 세포군의 각종 항암제에 대한 제외세포 독성에 관한 연구. *대한암학회지* 1991; 23: 495-517.
 23. Wellstein A, Lupu R, Zugmaier G. Autocrine growth stimulation by secreted Kaposi's fibroblast growth factor but not by endogenous basic fibroblast growth factor. *Growth Diff* 1990; 1: 63-71.
 24. Frandsen TL, Boysen BE, Jirus S, Zwiebel J, Sapang-Thompson M, Thompson EW, Brunner N. Assay for the study of human cancer cell invasion and metastasis. *Fibrinolysis* 1992; 6: 71-6.
 25. Fillinger MF, O'Connor SE, Wagner RJ, Cronenwett JL. The effect of endothelial cell coculture on smooth muscle cell proliferation. *J Vasc Surg* 1993; 17: 1058-68.
 26. Shi YE, Torri J, Tieh L, Wellstein A, Lippman ME, Dickson RB. Identification and characterization of a novel matrix-degrading protease from hormone-dependent human cancer cells. *Cancer Res* 1993; 53: 1409-15.
 27. 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.
 28. Orita M, Suzuki YM, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutation and DNA polymorphism using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; 5: 874-9.
 29. Fan S, Smith ML, Rivet II DJ, Duba D, Zhan Q, Kohn KW, Fornace AJ and O'Connor PM. Disruption of p53 function sensitize breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and pentoxifylline. *Cancer Res* 1995; 55: 1649-54.
 30. Li JH, Li P, Klamut H, Liu FF. Cytotoxic effects of Ad5CMV-p53 expression in two human nasopharyngeal carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 507-14.
 31. 라선영, 정희철, 공수정, 정현철, 김주항, 노재경, 민진식, 김병수. 위암 세포주에 대한 성장인자 억제제와 항전이제의 항 종양효과에 관한 연구. *대한암학회지* 1997; 29: 391-403.
 32. Hamada K, Alemany 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.
 33. Yang B, Stambrook PJ, Markowitz SD. Wild-type p53 demonstrates functional dominance in a human colon carcinoma cell line in which it induces reversible growth arrest. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1639-47.
 34. Grossfeld GD, Ginsberg DA, Stein JP, Bochner BH, Esrig D, Groshen S, Dunn M, Nichols PW, Taylor CR, Skinner DG, Cote RJ. Thrombospondin-1 expression in bladder cancer: association with p53 alterations, tumor angiogenesis and tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 219-27.
 35. Stapleton AMF, Timme TL, Gousse AE, Li QF, Tobon AA, Kattan MW, Slawin KM, Wheeler TM, Scardino PT, Thompson TC. Primary human prostate cancer cells harboring p53 mutations are clonally expanded in metastases. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 1389-97.
 36. Lesnno-Wood LA, Kim WH, Kleinman HK, Weintraub BD, Mixon AJ. Systemic gene therapy with p53 reduces growth and metastases of a malignant human breast cancer in nude mice. *Human Gene Ther* 1995; 6: 395-405.