

구강 편평상피세포암종 세포주에서 Tumor Necrosis Factor- α 와 Interleukin-6의 mRNA 발현에 관한 연구

안진수 · 김경욱 · 이재훈

단국대학교 치과대학 구강악안면외과학 교실

Abstract

STUDY ON THE EXPRESSION OF mRNA OF TUMOR NECROSIS FACTOR - α AND INTERLEUKIN-6 IN THE CELL LINES OF SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Jin-Su Ahn, Kyung-Wook Kim, Jae-Hoon Lee

Department of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Dankook University

The purpose of this study was to examine the mRNA levels of TNF- α and IL-6 in the cell lines of normal oral keratocyte and oral squamous cell carcinoma. Total RNA was extracted from these cell lines, observed under UV light, developed by radiographic films of PCR products via reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification, and measured with densitometer. Each mRNA level of these cell lines divided by β -actin mRNA level was compared to that of normal control group. The results were as follows :

1. Higher mRNA expression of TNF- α than IL-6 in the normal oral epithelial cell line.
2. In general, expression of mRNA of IL-6 appeared 3-4 times more in tumor cell lines than in control group.
3. mRNA expression of TNF- α showed variable expression in tumor cell lines, unlike normal cell line.
4. There are no special connections between differentiation of oral cancer cell lines and mRNA expression of TNF- α and IL-6.

From the above results, expression of mRNA of IL-6 in the cell lines of squamous cell carcinoma used in this study has higher than the normal oral epithelial cell line, but there are no relationship between the differentiation of oral cancer cell lines and the expression of mRNA of TNF- α and IL-6.

I. 서 론

구강암에서 가장 호발하는 편평상피세포암종은 타부위에 발생하는 암에 비해 발생율은 낮으나 예후가 불량하고 치료 후에도 안면부 결손으로 인한 현저한 심미적 및 기능적 손상을 야기시킨다¹⁾.

구강암의 발생원인과 기전에 대해 명확하게 밝혀진 것은 없으나, 흡연, 음주, 자외선 및 방사선조사, 바이러스감염, 화학적 또는 물리적인 발암인자에 대한 지속적인 노출과 같은 외인성 요소들과, 호르몬, 영양결핍, 유전적 요인과 같은 내인성 요소들이 그 원인으로 제시되고 있으며, 발암기전은 다양성과 다단계 과정을 갖는 것으로 알려지고 있다²⁾.

현재 유전자 및 분자수준에서의 발암과정의 규명에 대한 연구가 활발히 진행되어 암은 정상세포의 성장을 촉진하는 원형발암

유전자(proto-oncogene)들이 비정상적인 활성화를 나타내어 종양유전자로 변이가 되거나, 종양억제유전자(tumor suppressor gene)들의 비활성화에 의해 발생됨이 밝혀져 구강암의 조기진단과 효과적인 치료방법의 개발에 대한 연구가 계속되고 있는 실정이다³⁾.

구강암의 치료에는 크게 3가지로 외과적 요법, 방사선 요법, 항암화학요법등이 있으나, 1990년대 이후 유전자 이식술이 개발되면서 암조직에 암세포의 성장을 저해할 수 있는 유전자를 직접 투여하는 방법, 암세포에 대해 환자 자신의 효과적인 면역반응을 유도하기 위해 여러 가지 유전자로 암세포를 변형시킨 백신을 환자에게 재주입하는 방법 및 환자의 골수세포(혈액세포)에 항암제에 대한 내성유전자를 전달시켜 항암제의 독성으로부터 골수 및 혈액세포를 보호하며 암의 화학요법 치료효과를 향상시키는 방법 등이 시도되고 있다. 이중 가장 널리 사용되고 있는 유전자는 인체내 면역기능을 조절하는 일련의 분비 단백질인 사이토카인(cytokine) 유전자들이다⁴⁾.

Tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 interleukin-6(IL-6)는 대표적인 사이토카인의 일종으로 인체내에서 면역기능뿐 아니라 다양한 작용을 지니며 또한 종양발생에도 관여한다. 대식세포⁵⁾, 섬유아세포, 내피세포 및 종양세포 등⁶⁾과 같은 다양한 세포들로부터 생산되는 TNF- α 와 IL-6는 난소암⁷⁾, 악성흑색종⁸⁾, 신장암⁹⁾ 및 구강

안진수

330-716, 충남 천안시 신부동 산7-1
단국대학교 치과대학 구강악안면외과학교실
Jin-Su Ahn

Dept. of OMFS, College of Dentistry, Dankook Univ.
san 7-1, Shinbu-dong, Chon-an, Chung-Nam, 330-716, Korea
Tel.: 82-41-550-1991 Fax.: 82-41-551-8968
E-mail: kkvoms@anseo.dankook.ac.kr

을 포함한 두경부 편평상피세포 암종 환자들의 혈청내 높은 수치를 나타내며^{10,12)}, Yoneda 등¹³⁾은 혈청내 이들의 높은 수치를 보인 구강암은 그 예후가 나쁘다 하였으며, Yasuko 등¹⁴⁾은 술전 항암제 또는 방사선 치료에 민감한 효과를 보인 구강암은 낮은 효과를 나타낸 구강암에 비해 종물내에서 TNF- α 와 IL-6의 발현이 낮았음을 보고 하였다. 종양내에서 TNF- α 와 IL-6는 종양의 진행을 억제 또는 괴사를 유발하여 종양세포들에 대한 세포독성을 나타내는 세포색전(cytostatic) 역할 뿐 아니라¹⁵⁻¹⁷⁾, 맥관형성의 촉진¹⁸⁾, 기질 단백질의 변형¹⁹⁾ 또는 부착단백질의 분비^{20,21)}를 통해 종양세포들의 성장을 촉진하는 종물의 병원기능(prthologenic)을 지니고 있다.

그러나, 종물내에서 TNF- α 와 IL-6의 발생기원은 아직 정확하게 밝혀져 있지 않다. 어떤 학자들은 종양세포들이 이들을 생산한다 하였으나²²⁾, 다른 보고들은 종양세포가 아니라 주근 간질성 대식세포들이 이들을 생산하는 것으로 밝히고 있다^{9,24,26)}. 인터루킨군은 여러종류가 있으나 이들은 인터루킨 망(network)을 통해 그 기능을 상당히 공유하며 이 중 IL-6는 여러 질병에서 가장 흔히 표출된다²⁷⁻³⁰⁾. TNF- α 는 임파구와 다형핵백혈구들의 기능을 조절하고 또한 다른 사이토카인들과 함께 이 세포들의 활성화에 관여하는데^{31,32)}, IL-6의 자극에 의해 B-임파구들로부터 IL-6와 TNF- α 가 동시에 감작되고 분비되므로 TNF- α 와 IL-6를 동시에 관찰하는 것이 바람직한 것으로 여겨진다³³⁾.

본 연구는 구강암에서 가장 호발하는 편평상피세포암종에서 사이토카인의 발현양상이 구강암의 조기진단 및 예후평가의 표식자로의 기능이 가능한지를 확인하고자 발생부위, 임파절 전이 및 조직분화도가 서로 다른 구강편평상피세포암종 세포주를 이용하여 TNF- α 와 IL-6의 발현양상을 비교 관찰하고 다소의 지견을 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 연구 방법

1. 세포배양

정상인 구강 상피세포(Normal human oral keratinocyte, NHOK)를 정상인으로부터 절제하여 KBM Bullet Kit(Clonetics, USA) 배양액을 사용하여 100mm dish 면적의 70~80%가 될 때까지 배양을 하였다. 구강 편평세포암종 세포주는 ATCC(Manasas, USA)로부터 구입한 UMSCC 1, UMSCC 2, H 314, H 400, HN 19 및 SCC 25로 각각의 primary site와 분화도는 Table 1과 같다. 모든 세포주는 10% FBS 및 100U/ml 페니실린과 100 μ g/ml 스트렙토마이신을 포함하는 DMEM (Hyclone, USA)를 배양액으로 사용하였고 일정한 습도를 유지하며 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂가 되는 조건으로 배양하였다. 계대배양은 0.01% trypsin- 0.5mM ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)를 사용하였고 헤모사이토 메타를 사용하여 세포수를 세었다.

2. Total RNA 추출

양 세포 공히 70~80% 정도 성장하면 배양액을 제거하고 PBS

Table 1. PCR Primers Used in This Study

Cell line	Primary site	Differentiation
UMSCC 1	FOM	Well
UMSCC 2	Alvelous	Well
H 314	FOM	Moderate
H 400	Alvelous	Moderate
HN 19	LN	Moderate
SCC 25	BOT	Poorly

Abbreviation :

FOM : Floor of mouth, BOT : Base of tongue, LN : Lymph node

로 수세를 하였다. RNA 추출 버퍼(0.14 M NaCl, 1.5mM MgCl₂, 10mM Tris-Cl(pH 8.6), 0.5% Nondiet P-40, 1mM dithiothreitol, 1000 unit/ml placental RNAase inhibitor) 및 proteinase digestion 버퍼(0.2M Tris-Cl(pH 8.0), 25mM EDTA(pH8.0), 0.3M NaCl, 2% SDS)를 첨가하였다. policeman를 사용하여 세포를 긁어 21 gauge 바늘을 사용하여 세포를 3~4번 분쇄하고, 200 μ g/ml proteinase를 섞어 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 처리하였다. 1 : 1 비율의 phenol/chloroform으로 단백질을 제거하는데 10분간 원심분리기를 사용하여 5000g에서 원심분리 후 aquaous phase와 organic phase를 분리하여 aquaous phase를 새 튜브에 이것의 옮기고 2.5배 용량에 해당하는 차가운 에탄올을 첨가하였다. 0 $^{\circ}$ C에서 원심분리하여 상층액을 버리고 0.1% sodium acetate를 포함하는 70% 에탄올로 수세하여 에탄올을 제거하고 실온에 말렸다. 이를 50mM Tris-Cl(pH7.8) 1mM EDTA (pH8.0)으로 녹였다. 이 용액에 MgCl₂의 최종농도는 10mM, DTT는 0.1mM, RNase inhibitor는 1000units/ml가 되도록 각각 섞는다. 그리고 최종농도가 2 μ g/ml가 되도록 DNase I를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 처리하였다. 또한 최종농도 0.2%가 되도록 SDS와 10mM EDTA 및 1 : 1 phenol/chloroform을 넣고 실온에서 10분간 원심분리하여 aquaous phase를 분리하고 3M sodium acetate를 첨가하여 최종농도가 0.3M이 되게하고 2.5배 차가운 에탄올을 넣어 얼음에서 2시간 방치하였다. 4 $^{\circ}$ C에서 원심분리하여 RNA를 모으고 에탄올을 제거한 다음 벤취에서 건조시켜 200 μ l TE(10mM Tris-Cl, 1mM EDTA pH7.6)에 녹였다.

RNA를 확인하기 위하여 다음과 같이 전기영동을 시행하였다. 10X MOPS, 50mM sodium acetate, 0.5M EDTA(pH8.0), 10N NaOH(pH7.0) 용액에 1% 아가로스 젤을 만든 후 실온에서 젤을 굳히고 3 μ l RNA, 1.25 μ l 10x MOPS, 2 μ l formaldehyde, 6.25 μ l formamide를 혼합하여 65 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열하고 얼음에 식혔다. 여기에 1.25 μ l 젤 로딩 용액을 섞고 완충용액으로 1X MOPS를 쓰고 120V/cm로 하여 bromophenol blue의 푸른색이 전체 젤의 2/3 가 될 때까지 전기 영동하여 UV하에서 밴드를 확인하였다.

3. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Amplification

Total RNA로부터 역전사를 시켜 cDNA를 다음과 같이 만들었다.

Table 2. Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Lines Used in This Study

TNF- α	sense	TAG CCC ATG TTG TAG CAA ACC CTC AAG CT
428bp	antisense	TCA CAG GGC AAT GAT CCC AAA GTA GAC CT
IL6	sense	ATG AAC TCC TTC ACA AGC GCC TTC
488bp	antisense	GAT TCT TTG CCT TTT TCT GCA GGA ACT GG
β -Actin	sense	ATG GAT GAT GAT ATC GCC GCG CT
822bp	antisense	GCA TCC ATG CCC AGG AAG GA

Abbreviation : T : Thymidine, A : Adenine, C : Cytosine, G : Guanine

cDNA는 1 μ g DNase I 으로 처리된 total RNA에 random hexamer primers, 10mM/L DTT, 0.5mM/L dNTPs, 10U RNase 및 200U Maloney murine leukemia virus reverse transcriptase(Gibco BRL)를 섞어 40 μ l를 만들어 42°C에서 60분간 처리하여 cDNA를 만들었다. 이 cDNA를 80 μ l H₂O에 희석하고 이중 2.5 μ l cDNA를 사용하여 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH8.3, 200 μ M dATP, dTTP, dGTP, biotinylated-dCTP, 대조군 primer인 human β -Actin과 실험군 primer TNF- α 와 IL-6를 (Table 2), 각각 0.75 μ l, 1unit Taq-polymerase로 반응물 총량을 50 μ l로 하고 PCR를 사용하여 증폭시켰다. Denaturaton의 조건은 95°C에서 1분, 95°C에서 30초, 64°C에서 30초, 72°C에서 1분(30 cycle)이었고, 마지막 확장을 위하여 72°C에서 10분으로 하였다. 대조군으로 사용된 정상인 β -Actin (822bp)은 95°C에서 1분, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분(30cycle)이었으며 마지막 확장을 위하여는 72°C 10분으로 하였다. PCR 반응물은 0.5 μ l ethidium bromide을 포함하는 2% agarose gel를 사용하여 분리하고 gel 건조기에 말린 다음 ECL(enhanced chemiluminescence) kit를 사용하였다. 필름에 노출시켜 현상을 하고 농도계측기를 사용하여 반정량분석법으로 각각 mRNA 수준을 β -Actin mRNA 수준으로 나누어 측정 비교하였다.

III. 연구결과

1. 세포배양

1) 정상 구강상피세포

대부분의 세포질은 다각형을 보이며 군집을 형성하여 충만(confluence)하였고 핵은 타원형이었으며 세포예정사(apoptosis)가 종양세포에 비해 많이 관찰되었다(Fig. 1).

2) UMSCC 1 종양세포주

분화도가 좋은 종양세포주로 대부분 세포질이 다각형을 보이고 세포질이 정상세포보다 3~4배 커져있다(Fig. 2).

3) H314 종양세포주

중등도 분화도를 보이는 종양세포주로 핵의 염색체 농축이 관찰되었으며 핵질, 세포질에서 공포가 다수 발견되었다(Fig. 3).

4) SCC25 종양세포주

분화도가 좋지 않은 종양세포주로 세포질이 다각형 및 심한 방추형을 보였다(Fig. 4).

2. Total RNA 추출

1% agarose gel에서 정상세포와 종양세포에서 뚜렷한 두가지 밴드(28S, 18S)가 관찰되었으며, 28S가 18S보다 짙게 나타났다(Fig. 5).

3. RT-PCR에 의한 구강편평암종 세포주의 TNF- α 와 IL-6에 대한 mRNA의 발현정도

1) TNF- α 의 mRNA 발현

종양세포주에서 TNF- α 의 mRNA표현은 정상 구강상피세포에 비해 다양한 발현을 보였고, 종양세포의 분화도 사이에는 특이한 연관성이 없었다. UMSCC1 이 타 부위 조양세포주에 비해 현저하게 낮았으며 정상세포에 비해 낮게 나타났다. UMSCC2, H400, HN19, SCC25가 정상세포에 비해 4~5배 많이 관찰되었고 그 중 UMSCC2에서 가장 높았다(Fig. 6, 7).

2) IL-6의 mRNA 발현

정상세포에 비해 구강편평상피세포암종 세포주에서 3~4배 높게 관찰되었으며 조양세포의 분화도와는 특이한 연관성이 없었다. 종양세포주 중 SCC25에서 낮게 관찰되었고 UMSCC2에서 가장 높았다(Fig. 6, 8).

IV. 총괄 및 고찰

숙주의 손상시 방어기전에 중요한 매개체 기능을 담당하는 TNF- α 와 IL-6는 대표적인 사이토카인의 일종으로 또한 종양 발생 시 국소적 및 전신적인 작용을 나타낸다. TNF는 lipopolysaccharide로 처리된 백서에서 종양의 출혈성 괴사를 야기하는 인자로 처음 기술된 이래³⁴, 사람의 TNF- α 분자량은 17kDa이며, 157개의 아미노산으로 이루어진 3중사슬로 구성된 폴리펩타이드로 밝혀졌다.^{35,36}

TNF- α 는 조혈작용, 면역반응, 염증반응, 혈액응고반응과 골, 연골, 근육, 간 및 종양조직과 같은 여러기관 또는 조직내서 다양한 작용을 보이며 또한 같은 조직이나 기관에서도 양면작용을 나타내는 특징을 가지고 있다.³⁷

종양내에서의 TNF- α 의 기전은 정확히 알려져 있지 않다. Komori 등³⁸, Cordingley 등³⁹, 및 Nayler 등⁷은 TNF- α 는 종양세포들의 성장을 촉진시키는 작용이 있다 하였으나, Tomazic 등⁴⁰ 및 Schreiber 등⁴¹은 종양세포들에 대한 독성작용인 항종양효과가 있음을 밝히고 있다. 직접적인 독성작용은 TNF- α 가 종양세포막을 손상시키며 DNA의 분절(fragmentation)을 야기시키는 것으로 추측되고 있으며^{42,43}, TNF- α 의 간접적인 항종양효과는 활성화된 대

식세포가 면역체계를 통해 TNF- α 를 생성한 후 세포주기의 G₂ 시기의 종양세포내 축적되어 세포분열 말기에서 세포용해(cytolysis)를 초래한다⁴³⁾. 또한 TNF- α 는 암종 및 암종 세포주에서 C-fos, C-jun 및 jun-B와 같은 원형유전자들의 발현을 촉진시키는 것으로 보고되고 있다⁴⁴⁾. 그리고 Naylor 등⁷⁾, McIntyre 등⁸⁾, Waase 등⁹⁾은 여러 암종환자의 혈청내에서 TNF- α 의 높은 수치를 관찰하였으며, Yoneda 등¹³⁾은 구강암종의 예후와 혈청내 TNF- α 의 수치는 비례한다 하였으나, Ohno 등²⁵⁾은 혈청내 높은 TNF- α 의 높은 수치를 보인 위암환자의 종양조직내에서 TNF- α 의 발현양상을 관찰할 수 없었다는 상반된 결과를 보고했다.

본 연구는 6종류의 구강편평상피세포암종 세포주(UMSCC1, UMSCC2, H314, H400, HN19, SCC25)와 정상인 구강상피 세포주를 이용하여 TNF- α 와 IL-6의 발현양상을 RT-PCR을 통해 관찰했다. 모든 종양세포주는 정상 구강상피 세포주에 비해 TNF- α 및 IL-6 mRNA 발현이 높게 나타났다. 이는 구강편평상피세포 암종조직과 정상 구강연조직내에서 이들의 발현 양상을 관찰한 Yasuko 등¹⁴⁾의 연구결과와 일치했다.

TNF- α 의 세포독성에 대한 종양세포들의 반응은 매우 다양하다. 유방암²⁶⁾, 직장암²⁴⁾ 및 신장암 등²⁷⁾에서는 TNF- α 의 발현을 관찰할 수 없었으나, 두경부 편평상피세포 암종에서는 TNF- α 의 발현을 관찰할 수 있었다^{10,12,14)}. 또한 종양 세포주내에서의 TNF- α 의 발현은 비교적 민감하게 나타나지만 몇몇 연구에서는 발현되지 않았다한다^{44,47)}. 이와같은 원인은 정확히 알수 없으나 장기간 낮은 농도의 TNF- α 에 노출된 종양세포내에서는 TNF- α 의 내성으로 인해 발현되지 않으며^{48,49)}, TNF- α 의 발현이 되지 않는 종양내에서는 간질성 대식세포를 자극해 효소를 분비하여 종양세포들의 침습을 촉진하는 것으로 제시하고 있다⁴⁹⁾.

구강암을 포함한 두경부편평상피세포 암종에서 TNF- α 의 발현을 보인 여러 문헌보고들의 결과처럼 암종의 세포주를 이용한 본 연구에서도 TNF- α 의 mRNA 발현양상을 관찰할 수 있었다. 그러나 암종의 조직분화도에 따라 TNF- α 의 발현양상이 상관관계가 있다는 보고와는 달리¹⁰⁾, 본 연구에서는 분화도에 따른 발현양상은 특이한 연관성이 없이 종양세포주와 정상 구강상피세포주에서 다양하게 발현된 것을 관찰할 수 있었다.

E-Coli에서 DNA 재조합을 통해 클론된 IL-6는 인체의 염색체 7번체에 위치하며, 분자량은 23.7kDa으로 212개의 아미노산으로 구성된 폴리펩타이드이다^{50,52)}. IL-6의 가장 중요한 기능은 숙주방어기전에서 B-임파구 및 T-임파구의 자극과 살생세포들의 세포독성을 활성화 시키는 것이며^{53,55)}, 그밖에 조혈기능, 염증반응, 정상적 발생 과정 및 암종의 발생등에 관여하는 다양한 작용을 가지고 있다⁵⁷⁾.

종양내에서 IL-6의 역할을 정확히 알려져 있지 않다. 그러나 IL-6는 다양한 종양에서 발현상을 나타내는데, 호르몬과 같은 분비기전으로 생성되어 종양환자의 전신적인 염증증상과 면역기능의 저하를 초래하며⁵⁶⁾, 또한 국소적으로는 종양내 세포분화, 종양세포의 운동성 증가 및 종양세포들간의 부착성 감소의 작용으로 종양발생의 촉진제 역할을 담당한다⁵⁷⁾. 한편으로는, 세포독성 T 임파구의 유도 및 섬유아세포의 성장억제와 같은 작용으로 IL-6

는 항종양효과 및 종양의 전이를 억제하는 양면적인 기능을 지니고 있다^{57,59)}.

Gallo 등¹⁰⁾ 및 여러 문헌보고에서 두경부 편평상피 세포암종 환자의 혈청내 IL-6의 수치는 높게 나타났으며^{11,12,14)}, Yoneda 등¹³⁾은 이러한 수치는 환자의 예후와 연관성이 있다고 밝힌 바 있다. 또한 두경부 편평상피세포암종 및 암종 세포주를 이용한 여러 논문에서 IL-6의 발현이 관찰됨을 볼 수 있다^{60,61)}. 한편 Yasuko 등¹⁴⁾은 IL-6는 암종의 크기에 따라 작은 종양에 비해 큰 암종에서 IL-6 단백질 발현이 높게 나타났으며, 술전 방사선 및 항암제의 치료 효과가 낮은 암종에 비해 좋은 효과를 나타낸 암종내에서 IL-6의 발현이 낮았으나, 임파절 전이부위에서는 사이토카인의 발현이 증가된 양상을 관찰할 수 없었다. 구강암 세포주를 이용한 본 연구에서도 여러 논문과 같은 IL-6의 mRNA 발현 양상을 확인 할 수 있었다. 그러나 암종의 전이부위 뿐아니라 조직분화도에 따라서도 IL-6 유전자의 발현 양상의 차이를 발견할 수 없었다. 이와같은 이유에 대해 사이토카인은 순환대식세포나 임파절 전이와 관련된 면역반응에 의해 조절되기 보다는 종양세포와 기질세포간의 상호작용으로 인해 암종내 사이토카인이 형성되어 증가되는 것으로 제시되고 있다¹⁴⁾.

사이토카인들은 이들의 수용체를 충분히 함유하고 있는 내피세포들과 친화력을 보이며⁶⁾, TNF- α 는 세포부착분자를 생성하여 종양세포들이 혈관으로 모이도록 유도하여 결국 종양의 전이를 촉진시키는 것으로 알려져 있다^{20,22)}. 그러나, 종양의 미세혈관내 내피세포에서의 TNF- α 와 IL-6 단백질의 발현양상과 이들의 유전자인 mRNA 발현양상은 차이가 있다고 한다. 하지만 본 연구에서는 이러한 점에 대해 확인할 수는 없었으나, 이러한 원인은 구강편평상피세포 암종에서의 사이토카인은 조직특이성(tissue-specific)에 의해 생성되며 또한, 이들 사이토카인의 생성, 결합 및 활성의 차이는 사이토카인 단백질과 유전자의 발현위치의 차이를 나타내는 것으로 추측되고 있다¹⁴⁾.

이상의 문헌고찰을 통해 사이토카인은 정상인에서는 적절하게 균형을 이루며 분비되지만 질병상태에서는 균형을 잃고 많은 양이 체내로 분비되어 혈청 또는 병적 조직에서 분포한다^{65,66)}. 이에 사이토카인의 발현양상은 암의 진단 및 예후 평가를 위한 표식자로서의 가능성이 제시되고 있으며 또한 최근에는 암치료의 한 방법으로 사이토카인 유전자들의 재조합을 통한 연구가 시도되고 있는 실정이다⁶⁾. 그러나 사이토카인은 인체내에서 방어기전 뿐 아니라 위해작용을 동시에 지니고 있으며 또한 종양조직내에서 사이토카인 단백질과 유전자 발현은 차이를 보이고, 종양조직의 특이성과 사이토카인 유전자의 농도에 따라 양면작용을 나타낸다⁶⁷⁾. 본 연구는 구강편평상피세포 암종 세포주를 이용하여 TNF- α 와 IL-6의 발현 양상을 비교 관찰한 결과 이제까지의 여러 선학들의 결과와 일치함을 확인할 수 있었다. 그러나, 사이토카인이 임상적으로 구강암의 진단학적 및 예후 평가의 표식자로서의 기능과 새로운 치료방법으로 제시되기 위해서는 구강암에서의 이러한 사이토카인들의 기전 및 역할에 대한 연구가 더욱 필요하리라 생각된다.

V. 결 론

대조군으로 제일차배양을 한 정상인 구강상피세포주(normal human oral keratinocyte, NHOK)와 실험군으로는 구강편평상피세포암종 세포주(UMSCC1, UMSCC2, H314, H400, HN19, SCC25)를 배양하고 Total RNA를 추출하여 UV하에서 28S와 18S의 2종류의 굵은 밴드를 확인하여 실험조건과 방법의 적절성 여부를 판단하였으며, 역전사(reverse transcription)를 통해 cDNA를 합성하고, 중합효소연쇄반응(PCR) 증폭을 통해 얻은 결과를 농도계측기를 사용하여 반정량분석법으로 TNF- α 와 IL-6의 mRNA 수준을 β -Actin mRNA 수준으로 나누고 비교 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 정상인 구강상피세포주에서는 TNF- α 의 mRNA 발현이 IL-6보다 높게 나타났다.
2. IL-6의 mRNA 발현은 종양세포주에서 정상인 구강상피세포주보다 3~4배 높게 나타났다.
3. TNF- α mRNA 발현은 종양세포주와 정상인 구강상피세포주에서 다양하게 나타났다.
4. 종양세포주의 분화도에 따른 TNF- α 및 IL-6의 mRNA 발현 양상은 특이한 연관성이 없었다.

위와 같은 결과로 본 연구에서 사용된 구강편평상피세포암종 세포주에서 IL-6 mRNA 발현은 정상인 구강상피세포주보다 높게 나타났으나, TNF- α mRNA 발현은 다양한 양상을 보였다. 또한 구강편평 구강세포암종 세포주의 분화도에 따른 TNF- α 및 IL-6의 mRNA 발현 양상은 연관이 없는 것으로 생각되었다.

참고문헌

1. Deleyannis FWB, Weymuller Jr EA : Quality of life in patients with head and neck cancer. In Myers EN, Sunen JY : Cancer of the head and neck. 3rd ed, Philadelphia, WB Saunders, 904, 1996.
2. Brachman DG : Molecular biology of head and neck cancer. Seminar in Oncology 21 : 320, 1994.
3. Merritt WD, Weissler MC, Turk BF, et al : Oncogene amplification in squamous cell carcinoma of the head and neck. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 116 : 1394, 1990.
4. 박상대 : 분자세포생물학, 아카데미 서적, 서울 : 724, 1998.
5. May LT, Ghraeyeb J, Santhanam U, et al : Synthesis and secretion of multiple forms of β 2-interferon/B-cell differentiation factor 2/hepatocyte-stimulating factor by human fibroblasts and moocytes. J. Biol. Chem 263 : 7760, 1998.
6. Rak JW, Hegmann EJ, Lu C et al : Progressive loss of sensitivity to endothelium-derived growth inhibitors expressed by human melanoma cells during disease progression. J. Cell. Physiol 159 : 245, 1994.
7. Naylor MS, Stamp GWH, Foulkes WD, et al : Tumor necrosis factor and its receptors in human ovarian cancer. Potential factor and its receptors in human ovarian cancer. Potential role in disease progression. J. Clin. Invest 91 : 2194, 1993.
8. McIntyre CA, Chapman K, Reeder S, et al : Treatment of malignant melanoma and renal cell carcinoma with recombinant human interleukin-2 : analysis of cytokine levels in sera and culture supernatants. Eur. J. Canc 28 : 58, 1992.
9. Waase I, Bergholz M, Iglauer A, et al : Heterogeneity of tumour necrosis factor production in renal cell carcinoma. Eur. J. Cancer 28A : 1660, 1992.

10. Gallo O, Pinto S, Boccuzzi S, et al : MOnocyte tumor necrosis factor production in head and neck squamous cell carcinoma. Laryngoscope 102 : 447, 1992.
11. Gallo O, Gori AM, Attanasio M, et al : Interleukin-1 beta and interleukin-6 release by peripheral blood monocytes in head and neck cancer. Br. J. Cancer 68 : 465, 1993.
12. Yamamoto T, Yoneda K, Ueta E, et al : Serum cytokines, interleukin-2 receptor, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in oral disorders. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol 78 : 727, 1994.
13. Yoneda K, Yamamoto T, Ueta E, et al : Influence of aging and chemoradiotherapy on leukocyte function in oral cancer patients. Eur. J. Cancer B Oral Oncol 31B : 144, 1995.
14. Yasuko N, Wataru K, Satoshi S, et al : Expression of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in oral squamous cell carcinoma. Jpn. J. Cancer. Res 90 : 858, 1999.
15. Kitahara M, Kishimoto S, Hirano T, et al : The in vivo anti-tumor effect of human recombinant interleukin-6. Jpn J Cancer Res 81 : 1032, 1990.
16. Mule JJ, McIntosh JK, Jablones DM, et al : Antitumor activity of recombinant interleukin-6 in mice. J Exp Med 171 : 629, 1990.
17. Puztai L, Lewis CE, McGee JOD : Growth arrest of the breast cancer cell line, T47D by TNF- α : cell cycle specificity and single transduction. Br J Cancer 67 : 290, 1993.
18. Wiseman DM, Ploverin PJ, Kamp DW, et al : Transforming growth factor-beta(TGF β) is chemotactic for human monocytes and induces their expression of angiogenic activity. Biochem Biophys Res Commun 157 : 793, 1998.
19. Mann EA, Hibbs MS, Spiro JD, et al : Cytokine regulation of gelatinase production by head and neck squamous cell carcinoma : the role of tumor necrosis factor-alpha. Ann Otol Rhinol Laryngol 104 : 203, 1995.
20. Cockerill GW, Meyer G, Noack L, et al : Characterization of a spontaneously transformed human endothelial cell line. Lab Invest 71 : 497, 1994.
21. Kossodo S, Moore R, Gschmeissner S, et al : Changes in endogenous cytokines, adhesion molecules and platelets during cytokine-induced tumor necrosis. Br J Cancer 72 : 1165, 1995.
22. Wenzel CT, Scher RL, Richtsmeier WJ : Adhesion of head and neck squamous cell carcinoma to endothelial cells. The missing links. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 121 : 1272, 1995.
23. Watson JM, Sensintaffar JL, Berek JS, et al : Constitutive production of interleukin-6 by ovarian cancer cell lines and by primary ovarian tumor cultures. Cancer Res 50 : 6959, 1990.
24. Beissert S, Bergholz M, Waase I, et al : Regulation of tumor necrosis factor gene expression in colorectal adenocarcinoma : in vivo analysis by in situ hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 5064, 1989.
25. Ohno M, Kato M, Nakamura T, et al : Gene expression for tumor necrosis factor- α and its production in gastric cancer patients. Jpn. J. Cancer Res 85 : 1029, 1994.
26. Puztai L, Clover LM, Cooper K, et al : Expression of tumour necrosis factor- α and its receptors in carcinoma of the breast. Br. J. Cancer 70 : 289, 1994.
27. Hart PH, Whitty GA, Burgess DR, et al : Regulation by interleukin-3 of human monocyte proinflammatory mediators : Similarities with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Immunology 71 : 76, 1990.
28. Frendl G, Fenton MJ, Beller DI : Regulation of macrophage activation by IL-3 : II - IL-3 and lipopolysaccharide act synergistically in the regulation of IL-1 expression. J Immunol 144 : 3400, 1990.
29. Hamilton JA, Whitty GA, Royston AKM, et al : Interleukin-4 suppresses granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor levels in stimulated human monocytes. Immunology 76 : 566, 1992.
30. Hart PH, Jones CA, Finlay-Jones JJ : Interleukin-4 suppression of monocyte tumour necrosis factor- α production : dependence on protein synthesis but not on cyclic AMP production. Immunology 76 : 560, 1992.

31. Nishimura Y, Higashi N, Tsuji T, et al : Activation of human monocytes by interleukin-2 and various cytokines. *J Immunother* 12 : 90, 1992.
32. Brandt E, Petersen F, Flad H-D : Recombinant tumor necrosis factor- α potentiates neutrophil degranulation in response to host defense cytokines neutrophil-activating peptide 2 and IL-8 by modulating intracellular cyclic AMP levels. *J Immunol* 149 : 1356, 1992.
33. Rieckmann P, D' Alessandro F, Nordan RP, et al : IL-2 induces IL-6 production in human monocytes. *J. Immunol* 148 : 795, 1992.
34. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, et al : An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumours. *Proc Natl Acad Sci USA* 25 : 3666, 1975.
35. Walker LN, Bowen-Pope DF, Reidy MA : Production of platelet-derived growth factor-like molecules by cultured arterial smooth muscle cells accompanies proliferation after arterial injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 7311, 1986.
36. Barrett TB, Benditt EP : The sis(platelet-derived growth factor B chain) gene transcript levels are elevated in human atherosclerotic lesions compared to normal artery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 1099, 1987.
37. Enrique P : Handbook of growth factors. Vol III CRC 1994, 241.
38. Komori A, Yatsunami J, Sugamuna M, et al : Tumor necrosis factor acts as a tumor promoter in BALB/3T3 cell transformation. *Cancer Res* 47 : 5382, 1987.
39. Cordingley FT, Bianchi A, Hoffbrand AV, et al : Tumour necrosis factor as an autocrine tumour growth factor for chronic B-cell malignancies. *Lancet* 1 : 969, 1988.
40. Tomzic VJ, Farha, M, Loftus A, et al : Antitumor activity of recombinant tumor necrosis factor on mouse fibrosarcoma in vivo and in vitro. *J. Immunol* 140 : 4056, 1988.
41. Schreiber H, Gressler, VH, Teng MN, et al : Cytokines as effectors in tumor immunity, *Immunol. Allergy Clin. N. Am* 10 : 747, 1990.
42. Yoshimura T, Sone S : Different and synergistic actions of human tumor necrosis factor and interferon- γ in damage of liposome membranes. *J. Biol. Chem* 262 : 4597, 1987.
43. Darzynkiewicz Z, Williamson B, Carswell E, et al : Cell cycle specific effects of tumor necrosis factor. *Cancer Res* 44 : 83, 1984.
44. Cornelius P, Marlowe M, Lee MD, et al : The growth factor-like effects of tumor necrosis factor- α . Stimulation of glucose transport activity and induction of glucose transporter and immediate early gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. *J. Biol. Chem* 265 : 20506, 1990.
45. Koo AS, Chiu R, Soong J, et al : The expression of c-jun and junB mRNA in renal cell cancer and in vitro regulation by transforming growth factor β 1 and tumor necrosis factor α 1. *J. Biol. Chem* 267 : 26134, 1992.
46. Hahn CJ, Ovak GM, Donovan RM, et al : Effect of human recombinant tumor necrosis factor on the growth of different human and mouse long-term hematopoietic cell lines. *J. Leukocyte Biol* 40 : 21, 1986.
47. Beran M, Andersson BS, Kelleher P, et al : Diversity of the effect of recombinant tumor necrosis factors α and β on human myelogenous leukemia cell lines. *Blood* 69 : 721, 1987.
48. Rubin BY, Anderson SL, Sullivan SA, et al : Nonhematopoietic cells selected for resistance to tumor necrosis factor J. *Exp. Med* 164 : 1350, 1986.
49. Spriggs DR, Imamura K, Rodriguez J, et al : Induction of tumor necrosis factor expression and resistance in a human breast tumor cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 6563, 1987.
50. Wong GG, Clark SC : Multiple actions of interleukin-6 within a cytokine network. *Immunol Today* 9 : 137, 1988.
51. Hirano T, Yasukawa K, Hanada H, et al : Complementary DNA for a novel human interleukin(BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature(Lond)* 324 : 73, 1986.
52. Sehgal PB, May LT, Tamm T, et al : Human B2 interferon and B-cell differentiation factor BSF-2 are identical. *Science* 235 : 731, 1987.
53. Tosato G, Seamon KB, Goldman ND, et al : Monocyte-derived human B-cell growth factor identified as interferon-B2(BSF-2, IL-6). *Science* 239 : 502, 1988.
54. Garman RD, Raulat DH : Characterization of a novel murine T cell-activating factor. *J. Immunol* 138 : 1121, 1987.
55. Lotz M, Jirik F, Kabouridis P, et al : B cell stimulating factor 2/interleukin-6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes. *J. Exp. Med* 167 : 1253, 1988.
56. Siegall CB, Schwab G, Nordan RP, et al : Expression of the interleukin 6 receptor and interleukin-6 in prostate carcinoma cells. *Cancer Res* 50 : 7786, 1990.
57. Lu C, Vickers MF, Kerbel RS : Interleukin-6: a fibroblast-derived growth inhibitor of human melanoma cells from early but not advanced stages of tumor progression. *Proc. natn. Acad. Sci. USA* 89 : 9215, 1992.
58. Mullen CA, Coale MM, Levy AT, et al : Fibrosarcoma cells transduced with the IL-6 gene exhibited reduced tumorigenicity, increased immun-ogenicity, and decreased metastatic potential. *Cancer Res* 52 : 6020, 1992.
59. Takai Y, Wong GG, Glark SC, et al : Effects of intradermal administration of streptococcal preparation OK-432 on interferon and natural killer cell activities in patients with oral cancer. *Int. J. oral Surg* 13 : 7, 1984.
60. Chen Z, Colon I, Ortiz N, et al : Effects of interleukin 1 α , interleukin-1 receptor antagonist and neutralizing antibody on proinflammatory cytokine expression by human squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res* 58 : 3668, 1998.
61. Chen Z, Malhotra PS, Thomas GR, et al : Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clin. Cancer Res*, in press, 1999.
62. Woods KV, El-Nagger A, Clayman GL, et al : Variable expression of cytokines in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines and consistent expression in surgical specimens. *Cancer Res* 58 : 3132, 1998.
63. Mann E, Spiro J, Chen L, et al : Cytokine expression by head and neck squamous cell carcinoma. *Am. J. Surg.* 164 : 567, 1992.
64. Cohen R, Contrino J, Spiro J, et al : Interleukin-8 expression by head and neck squamous cell carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg* 121 : 202, 1995.
65. Kern P, Hemmer CJ, Damme JV, et al : Elevated tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 serum levels as markers for complicated plasmodium falciparum malaria. *Am J Med* 87 : 139, 1989.
66. Wagge A, Brandtzaeg P, Halstensen A, et al : The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock : association between interleukin-6, Interleukin-1 and fatal outcome. *J Exp Med* 169 : 333, 1989.
67. Yamamoto T, Yoneda K, Ueta E, et al : Serum cytokine levels in patients with oral mucous membrane disorders. *J Oral Pathol Med* 20 : 275, 1991.
68. Heney D, Lewis JJ, Evans SW, et al : Interleukin-6 and its relationship to C-reactive protein and fever in children with febrile neutropenia. *J Infect Dis* 165 : 886, 1992.

사진부도 설명

- Fig. 1. Polygonal & spindle shaped epithelial cell with ovoid or spindle shaped nucleus formed colony, and apoptosis was observed more than that of oral squamous cell carcinoma cell lines(IM, $\times 200$).
- Fig. 2. Three or four times enlarged, polygonal cell with nuclear hyperchromatism of well-differentiated cell lines(IM, $\times 200$).
- Fig. 3. Polygonal spindle shaped cell with nuclear hyperchromatism showed vacuolar in moderate differentiated cell lines(IM, $\times 200$).
- Fig. 4. Almost spindle shaped poorly differentiated cell lines were seen(IM, $\times 200$).
- Fig. 5. Total RNA of oral squamous cell carcinoma cell lines.
- Fig. 6. Intercellular TNF- α and IL-6 mRNA expression of oral squamous cell carcinoma cell lines by RT-PCR.
- Fig. 7. Intercellular TNF- α mRNA Expression of Oral Squamous Cell Lines by RT-PCR
- Fig. 8. Intercellular Interlekin 6 mRNA Expression of Oral Squamous Cell Lines by RT-PCR

Abbreviation :

- IM : Inverted Microscope
RNA : Ribo Nucleic Acid
mRNA : messenger Ribo Nucleic Acid
TNF- α : Tumor Necrotizing Factor- α
IL-6 : Interleukin-6
RT-PCR : Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
NHOK : Normal Human Oral Keratinocyte
AP : Apoptosis

사진부도 ①

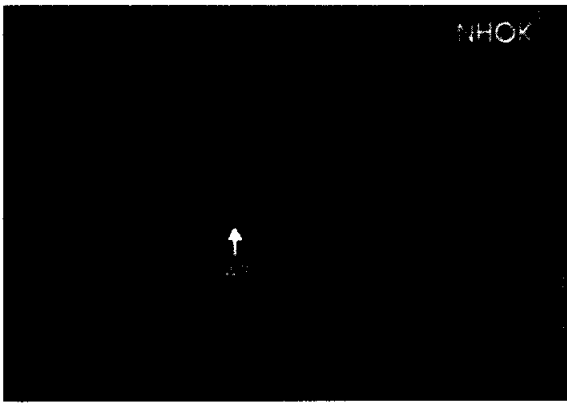


Fig. 1

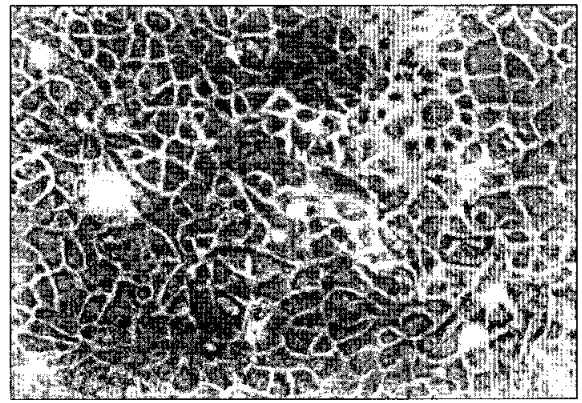


Fig. 2

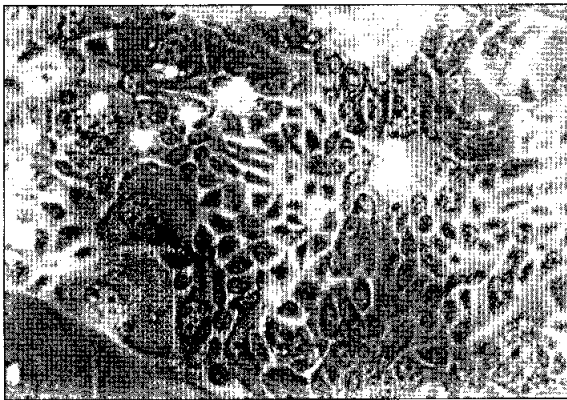


Fig. 3

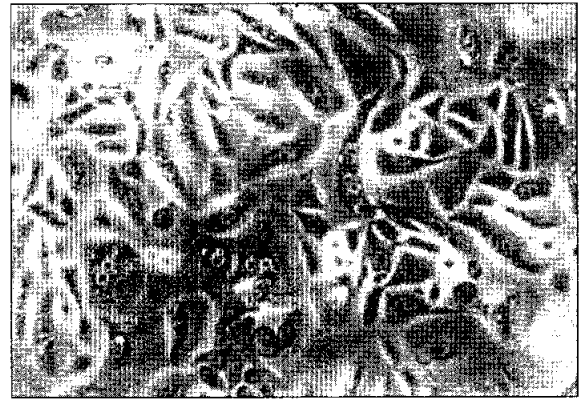


Fig. 4



Fig. 5

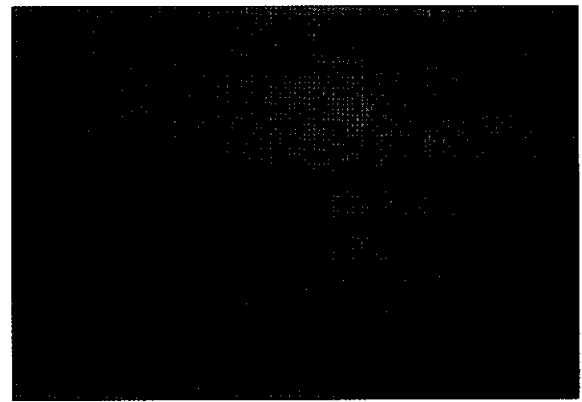


Fig. 6

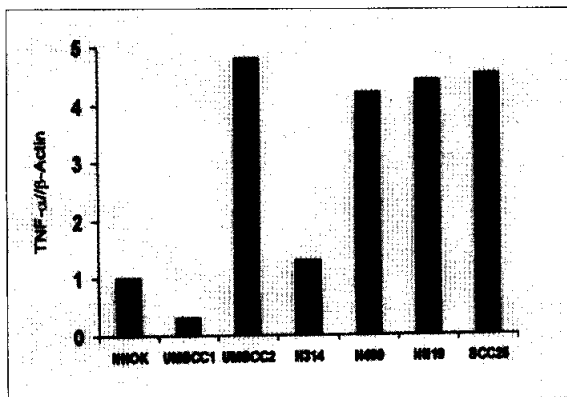


Fig. 7

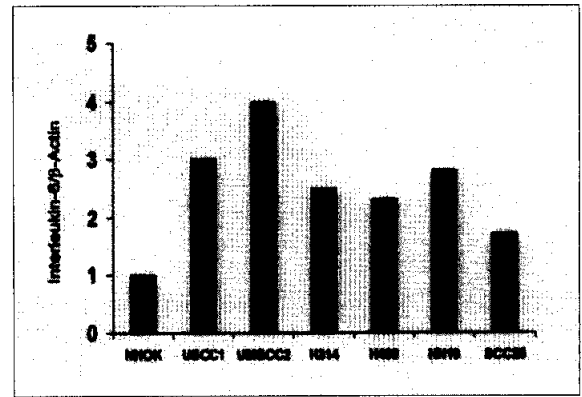


Fig. 8