

Cyclosporin A가 구강편평상피세포암 세포주에 미치는 항암효과

임한욱 · 김경욱

단국대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2004;30:474-481)

ANTI-CANCER EFFECT OF CYCLOSPORIN A ON ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA CELL LINE

Han-Wook Lim, Kyung-Wook Kim

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

Squamous cell carcinoma is the most prevalent oral cancer, which is characterized by its low survival rate, high malignancy, mortality with facial defects, and poor prognosis. Exact cause and pathogenesis of the squamous cell carcinoma is still unknown. Various routes including smoking, radiation, and viral infections predispose its genesis, and recent studies revealed that genetic defects which fail to prevent cancer proliferation play a role.

Generally, a cancer develops from the decreased rate of apoptosis which is an active and voluntary cell death, and from the altered cell cycles. Anticancer effect can be obtained by recovering the apoptotic process, and by suppressing the cell cycles.

Among the apoptosis related factors, *bcl-2*, *caspase-9*, and VDAC (voltage-dependent anion channel) are produced in mitochondria of the cell. Cyclosporin-A is known to induce apoptosis through its activation with VDAC.

This study was to reveal the anticancer effect of Cyclosporin A to the oral squamous cell carcinoma. The inverted microscope was used to find alterations in the tissue, and sensitivity test to the anticancer cells was performed with MTT (Tetrazolium-based colorimetric) assay. Following cell line culture of primary and metastatic oral squamous cell carcinoma, electrophoresis was performed with extracted total RNA. Finally, semi-quantitative study was carried out through RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction). The results of this study are as follows:

1. The inverted microscopic observation revealed a poorly defined cytoplasm at 2000ng ~ 3000ng/ml, indistinct nucleus, and apoptosis.
2. The Growth of cancer cells was decreased at 1000ng/ml of cyclosporin-A. No cancer cell growth was observed at over 2000ng/ml concentration of cyclosporin-A, and at one week, growth of cancer cells was ceased.
3. The MTT assays were decreased as cyclosporin-A concentration was increased. This means that the activation of succinyl dehydrogenase in mitochondria was decreased following administration of cyclosporin A.
4. A result of RT-PCR showed that amount of mRNA of VDAC-2 was decreased half times at a cyclosporine-A concentration of 2000ng/ml. In *bcl-2*, amount of mRNA was significantly decreased 1/5 times at 2000ng/ml. *caspase-9*, however, showed slight increase compared to the control group.

From the results obtained in this study, administration of cyclosporin-A to the cell lines of oral squamous cell carcinoma induced alterations in morphology and growth of the cells as its concentration increased. Since apoptosis related factors such as VDAS-2, *bcl-2*, and *caspase-9* also showed distinct alterations on their mRNAs, further research on cyclosporin A as an anti-cancer agent will be feasible.

Key words : Squamous cell carcinoma, Anticancer agent, Cyclosporin-A, apoptosis, mRNAs

I. 서 론

김 경 욱

330-716, 충남 천안시 신부동 산 7-1

단국대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Kyung-Wook Kim

Dept. of OMFS, College of Dentistry, Dankook Univ.

san 7-1, Shinbu-dong, Chon-an, Chung-Nam, 330-716, Korea

Tel : 82-41-550-1993 Fax : 82-41-551-8988

E-mail : kkwoms@dku.edu

편평상피세포암종은 구강암 중에서 가장 많이 발생되며, 생존율역시 낮고 안면부 결손을 동반하는 치명적이고, 악성도가 높으며, 예후 또한 불량하다^{1,2)}. 이러한 편평상피세포암종을 치료하기 위한 방법으로 외과적 적출술이나, 방사선 치료방법이 주로 사용되어 왔으며, 항암화학요법과 면역요법에 의한 치료가 단독

혹은 복합적으로 사용된다.

구강편평상피세포암종의 발생원인과 기전은 아직 밝혀지지 않았지만, 흡연, 방사선노출, 바이러스 감염 등 다양한 경로를 통해 발생되며, 최근에는 유전적 결합에 의해서도 암종 세포의 증식을 억제하는데 실패하여 발생된다는 보고가 많다⁸⁾.

일반적인 암은 능동적이고 자발적인 세포의 죽음인 세포사멸(apoptosis)의 속도가 줄어들고 세포주기가 변화하여 발생되는데 이러한 세포사멸을 회복시켜주거나, 세포주기를 억제하여 항암효과를 얻을 수 있다.

이러한 세포사멸에 관여하는 인자 중에는 Bcl-2, caspase-9, VDAC (voltage-dependent anion channel) 등이 있다.

Cyclophilin A는 모든 세포의 세포질 내에 존재하는 단백질이며, cyclosporin A에 대한 수용체(receptor-binding site)로써 중요한 면역억제작용을 한다. 또한 cyclophilin D는 미토콘드리아의 내외막사이에서 VDAC와 접촉하여 세포사멸을 유도한다⁹⁾.

Cyclosporin A는 1976년 토양에서 번식하는 *Tolypocladium inflatum*이라는 곰팡이에서 발견되었으며, cyclophilin의 active site에 결합하여, 구조적 변화를 하는 cyclic-peptide이다. 이러한 변화들은 internal hydrogen bonds에서부터 cyclophilin의 active site에 존재하는 아미노산까지 변화를 일으킨다¹⁰⁾.

면역억제 효과는 cyclophilin-cyclosporin A complex가 Ca^{+} 이온에 의존성이 있는 phosphatase calcineurin을 억제하여 이루어진다. 즉 calcineurin의 alpha sub-unit에 결합하여 이것의 활성을 억제시킨다. Cyclosporin A는 휴지기 T-cell의 활성을 차단하는 역할을 하며, IL-2 (interleukin-2)와 IL-2에 친화력이 강한 receptor의 유전자복제를 방해하여 T-cell의 분화를 억제한다⁹⁾.

Cyclosporin A는 신장, 간, 심장의 이식 시 면역억제제로 널리 사용되며, 신장 이식시 cyclosporin A를 투여할 경우에 1년 생존율이 80%에 이른다고 보고 되지만 부작용으로 신장자체에 독성을 가진다는 중요한 단점 역시 가지고 있다.

많은 면역억제제가 역으로 항암제로 사용되는데 이러한 면역억제제로 cyclophosphamide, 5-FU 등이 있으며, doxorubicin, methotrexate, cisplatin 등과 복합적으로 사용하여 항암치료 효과가 높아졌다고 보고 되어진다. 이러한 면역억제제 중 아직까지 cyclosporin A의 종양세포에 대한 연구가 없어, 시험관 내에서 약제의 효과가 입증되면 항암제로 단독 혹은 복합적으로 사용할 수 있는 길을 열 수 있을 것으로 사료된다. 본 연구는 cyclosporin A 투여 시 구강편평상피세포암종 세포주에서 어떠한 변화가 일어나는지 분자생물학적으로 연구해보고자 시행하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. Cyclosporin A의 농도조절

Cyclosporin A를 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 녹이고 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco, USA) 으로 희석시켜 stock solution 으로 1mg/ml을 만들었다. 본 연구에 사용한 cyclosporin A 농도는 500, 1000, 2000, 3000ng/ml로 각각 조절하였다.

2. 구강편평상피세포암종 세포주 배양

ATCC (Manasas, USA)사에서 구입한 구강편평상피세포암종 세포주로 HN4 세포주를 사용하여, HN4 종양세포 2×10^5 개 세포를 100mm dish에 각 3개씩 분주하여 10% FBS(fetal bovine serum)를 포함하는 DMEM(Hyclone, USA)에 배양하였고 조건은 95% 습기가 있는 CO_2 배양기를 사용하였다. 대조군으로는 Cyclosporin A가 포함되지 않은 구강편평상피세포주를 배양하였고, 실험군으로는 Cyclosporin A 농도(500, 1000, 2000, 3000ng/ml)를 넣고 역상차 현미경으로 관찰하였다.

3. 암종 세포증식의 관찰

1) 성장곡선 (trypsin-blue exclusion test)

HN4 종양세포 2×10^5 세포를 세어 3개의 100mm dish에 분주하고 cyclosporin A 농도 (500, 1000, 2000, 3000ng/ml)에 따라 각각 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7일째 DPBS(dulbecco phosphate buffered saline)로 세포를 세척하고 각 dish에 Trypsin-EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid)을 넣고 5분간 기다린 후 세포를 수거하여 원심분리를 시행하였다. 원심분리 후 상층액을 버리고 DMEM 배양액 4ml씩을 원심분리관에 넣고 혼합한 후, 90 μ l를 튜브에 옮겨 담았다. 튜브에 0.4% Trypsin-blue 용액 10 μ l를 넣고 혼합한 후, 헤모사이토메터를 이용하여 세포 수를 측정하였으며 trypsin blue exclusion 검사 방법을 이용하여 살아있는 세포의 수를 계산하였다. 측정된 세포 수를 이용하여 덧쉬당 총 세포수를 환산하여 성장곡선을 그렸다.

2) MTT (Tetrazolium-based colorimetric) assay

3 well 당 세포수를 2×10^4 이 되도록 분주하고 24시간 배양하였고 Cyclosporin A농도(500, 1000, 2000, 3000 ng/ml)를 포함하는 배양액을 사용하여 48시간 배양하고, MTT(3-(4,5-dimethylthazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; Sigma Co., USA) 50 μ l/ml을 각각의 well에 첨가하고 배양하였다. 배양액을 버린 후 2ml DMSO를 넣고 5분간 실온에 처리하고 ELISA analyser(Spectro Max 250, Molecular Devices Co., USA)로 550nm에서 흡광도를 측정하였다. 통계분석은 측정된 세포수와 백분율로 환산된 MTT분석의 평균과 표준편차를 구하고, 이들의 통계학적 유의성은 일원분산 분석법(ANOVA)을 이용하여 처리하였다.

4. Total RNA 추출

HN4의 구강편평상피암종 세포주를 100mm 배양딴쉬(Gibco BRL, USA)에 70-80%정도 성장시킨 후, 배양액을 제거하고 pH 7.4 PBS (Gibco BRL, USA)로 수세하였다.

Total RNA 추출을 위해 Guanidinium thiocyanate 방법이 사용되었으며, 이러한 RNA추출 버퍼로는 Guanidinium thiocyanate 용액 (4M Guanidinium thiocyanate, 1% β -mercapenthanol, 0.1M Tris-Cl pH 7.5)을 세포주에 떨어 뜨린 후 10% sodium lauryl sarcosinate 용

액과 혼합하여 최종적으로 0.5%의 농도를 만들었다.

원심분리 후 pH 5.5인 2M의 potassium acetate 용액 0.5ml와 1M의 acetic acid 0.8ml를 혼합하여 -20°C의 cold ethanol 7.5ml에 보관하였다.

건조된 침전물을 Guanidine-Hcl 용액 (8M guanidin-Hcl, 0.1M sodium acetate pH 7.0, 1% β-mercaptoethanol, 20mM EDTA)에 용해시켰다. 이때 상층부의 액체를 제거하고 pH 8.0, 20mM EDTA를 첨가하여 침전물을 용해시켰다. Chloroform/n-butanol (4:1v/v)를 1:1로 만들어 첨가하여 혼합하고, 원심분리한 후 4mM sodium acetate solution(pH 7.0)을 3배로 하여 섞은 후 -20°C에 2시간 동안 저장하였다. 다시 원심분리한 후 50 μl diethyl pyrocarbonate (DEPC) 로 용해한 후, RNA의 양을 spectrophotometer(Simatzu, Japan)을 사용하여 260nm까지 측정하였다. 일부의 시료는 -70°C로 냉동 보관하여 다음 실험에 사용하였다.

Total RNA를 확인하기 위해 전기영동을 시행하였다. 10X 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid(MOPS), 50mM sodium acetate, 0.5M EDTA (pH 8.0), 10 N NaOH (pH 7.0) 용액에 1%아가로스 젤을 만들고, 실온에서 젤을 굳히고, 3 μg RNA, 1.25 μl 10X MOPS, 2 μl formaldehyde, 6.25 μl formamide를 혼합하여 65°C에서 5분간 가열하고, 얼음에 식혔다. 1.25 μl 젤 로딩 용액을 섞고, 완충용액으로 1X MOPS를 쓰고 120 V/cm으로 하여 bromophenol blue의 푸른색이 전체 젤의 2/3까지 나오도록 전기 영동을 시행하였다.

5. RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction Amplification

1 μg DNase로 처리된 total RNA를 Random hexamer primers에 70°C에서 10분간 섞은 후 얼음 속에 넣어두었다. 이것을 다시 첫 번째 strand buffer의 5배로 섞고, 100mM dithiothreitol (DTT), 10mM dNTPs, 10U RNAase와 200U/μl superscript II reverse transcriptase

(Gibco BRL, USA)를 섞어 42°C에 60분간 처리하여 cDNA를 만들었다. 이 cDNA를 80 μl 물에 희석한 후 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl, 100mM Tris-HCl, pH 8.3 200 μM dTAD, dTTP, dGTP, biotinylated-dCTP를 0.75 μl 씩 만들고 double 2.5 μl cDNA가 포함된 1 unit Tag-polymerase (Gibco BRL, USA)를 반응물 총량이 50 μl로 만들어 PCR을 사용하여 증폭시켰다. 한 cycle은 변색과정은 1분간 95°C, 증폭을 위해 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분간 처리하고, 마지막 확장을 위해 72°C에서 10분간 시행하였다.

이 실험에서 사용된 PCR polymers는 Table 1과 같다. 정상인의 GAPDH를 대조군으로 위와 같은 방법으로 증폭시켰으며, PCR 반응물은 2% 아가로스 젤을 사용하여 분리하고, 젤 건조기에 말린 다음 enhanced chemiluminescence(ECL, Gibco BRL, USA) 방법을 사용하였다. 필름에 노출한 후 현상을 하고 densitometer를 사용한 semiquantitative 방법으로 각각의 mRNA 수준을 정상인의 GAPDH 수준으로 나누어 평균을 구하여 상호 비교하였다.

III. 연구 결과

1. 역상차 현미경 소견

대조군에서 세포질은 다각형 모양이고 핵이 상대적으로 큰 중앙세포가 뚜렷한 경계를 보이고 있었다(Fig. 1). DMSO 군에서 세포질이 확장되는 변화가 보였으나(Fig. 2) 1000ng/ml에서는 DMSO 군과 큰 차이가 없었다(Fig. 3). 2000ng/ml과 3000ng/ml에서는 세포질의 경계가 뚜렷하지 않으며 핵의 농염도가 희미한 소견이 보였고 세포사멸도 관찰되었다(Fig. 4).

2. 암종세포 성장곡선의 비교

대조군에서 성장양상은 전형적인 "S"자 형을 보이며 세포의 성장이 시간에 따라 더 빠르게 진행되고 있음을 보여주었다. Cyclosporin A 투여 후의 성장곡선은 DMSO 투여군에서 4일 이후

Table 1. PCR Primers used in this study

	Sense	Base pair
	Antisense	
VDAC 2	TGCAGTGGTGTGGAATTTT	549
	ACGAGTGCAGTTGGTACCTGA	
Bcl-2	ACTTGCAGAGATGTCCAGT	217
	GCCAAGTCCATGAGTCAGTA	
Caspase 9	ACAAGGCCTTCGACAGTG	176
	GTACCAGGAACCGCTCTT	
GAPDH	TGCATCCTGCACCAACCAACT	349
	TGCATCCTGCACCAACCAACT	

Abbreviation

IM : Inverted Microscope

RNA : Ribo Nucleic Acid

mRNA : messenger Ribo Nucleic Acid

RT-PCR : Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

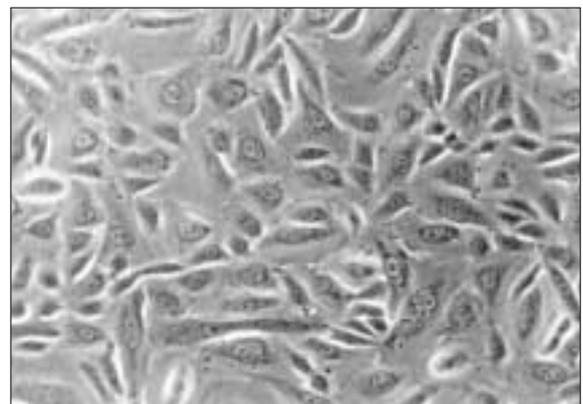


Fig. 1. HN 4 cell line showed the cell membrane with ovoid nucleus(X 200, IM) (control group)

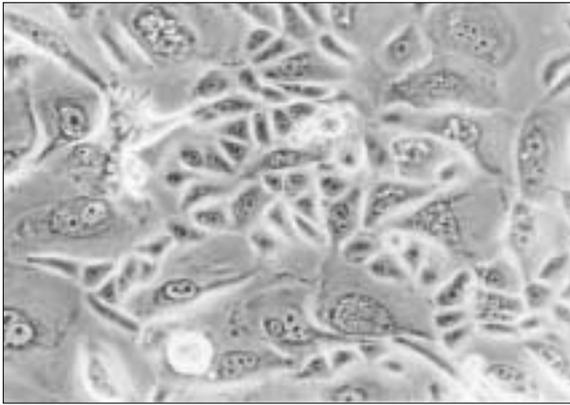


Fig. 2. Cellular degenerated tumor cells with vacuoles (X 200, IM) (DMSO)

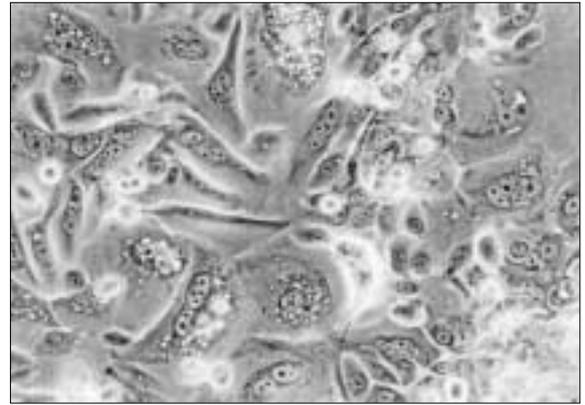


Fig. 3. Increased nuclear vacuolation of tumor cells (X 200, IM) (cyclosporin A 1000ng/ml)



Fig. 4. Decreased anchorage independent tumor cells as apoptosis (X 200, IM) (cyclosporin A 3000ng/ml)

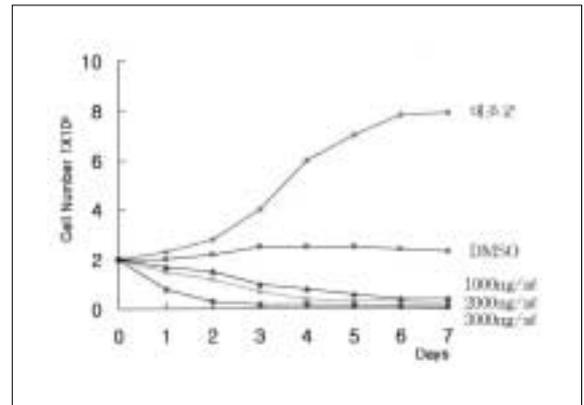


Fig. 5. Growth curve of HN4 cell line according to concentration

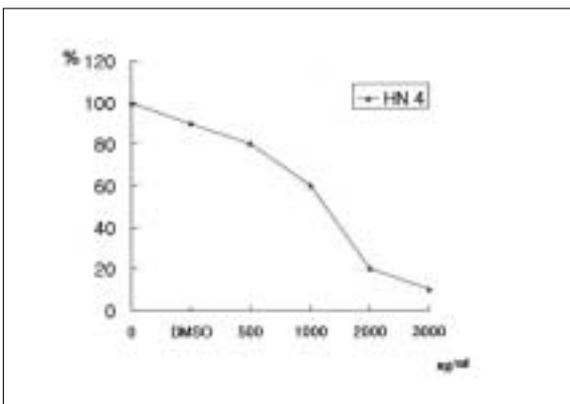


Fig. 6. MTT assay of HN4 cell line according to concentration

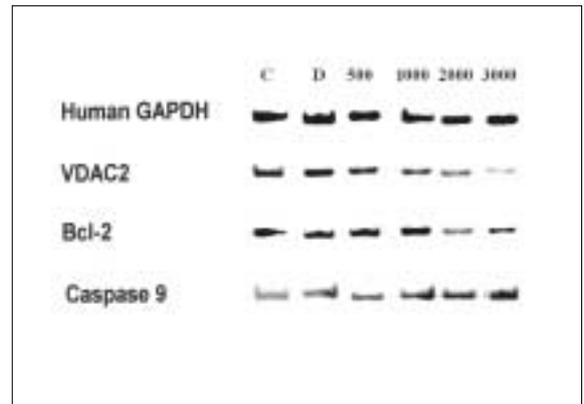


Fig. 7. VDAC 2, Bcl-2, Caspase 9 mRNA expression of HN4 cell line by RT-PCR (ng/ml)

에 약간의 성장 감소를 보였다. 그러나, 약제농도 1000ng/ml 이상에서는 성장이 떨어지고 2000ng/ml 이상에서는 초기에서는 성장이 안되며 일주일째는 거의 세포의 성장이 끝난 것으로 생각되었다(Fig. 5).

3. MTT (Tetrazolium-based colorimetric) assay

DMSO 군에서 MTT 분석은 약 85%로 대조군보다 약간 낮은 수치를 나타냈다. 그러나 500ng/ml 농도에서 실험군은 약 65%,

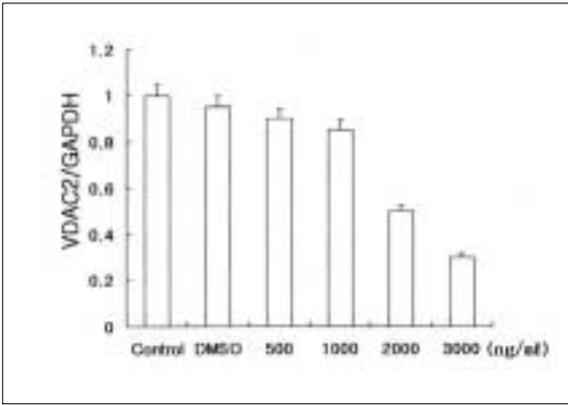


Fig. 8. VDAC 2 mRNA determination of RT-PCR in HN4 cell line (ng/ml)

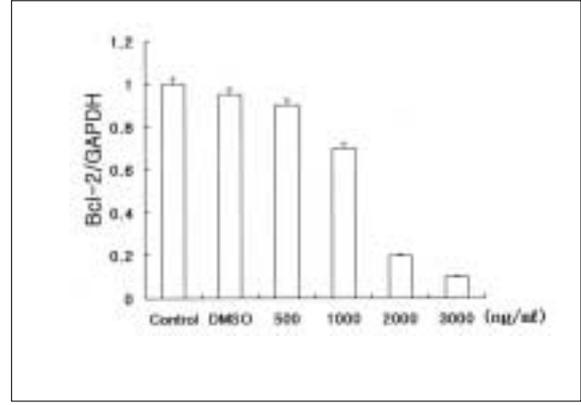


Fig. 9. Bcl-2 mRNA determination of RT-PCR in HN4 cell line (ng/ml)

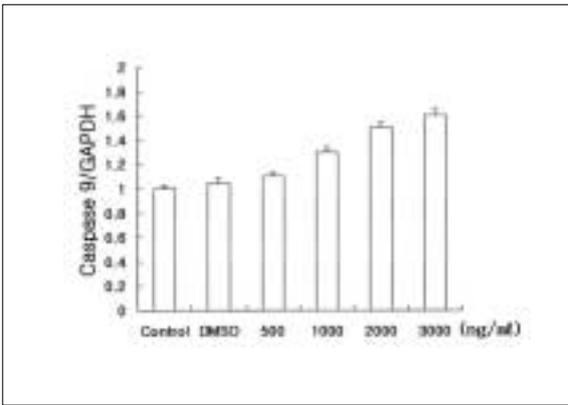


Fig. 10. Caspase 9 mRNA determination of RT-PCR in HN4 cell line

2000ng/ml에서는 약 18%로 cyclosporin A의 농도가 높아질수록 MTT 수치 차이가 뚜렷하였다. 이것은 cyclosporin A투여 후 미토콘드리아 세포에서 succinyl dehydrogenase의 활성이 낮아지는 것을 의미한다.

4. RT-PCR

인간의 GAPDH의 발현은 cyclosporin A의 농도에 따른 각 군에서 전반적으로 고르게 굵은 띠를 형성하고 있어 RT-PCR의 정확성을 증명하고 있다(Fig. 7).

VDAC-2의 경우 mRNA의 양이 대조군에 비해 1000ng/ml까지는 큰 감소를 보이지 않았으나, 2000ng/ml에서는 mRNA 1/2정도 감소를 보였으며(Fig. 8), Bcl-2의 경우 역시 2000ng/ml의 cyclosporin A 농도에서 1/5의 급격한 감소를 보였다(Fig. 9). 그러나, caspase 9의 경우는 오히려 대조군에 비해서 완만하지만 증가의 양상을 보였다(Fig. 10).

IV. 총괄 및 고찰

구강암증에서 편평세포암증은 가장 많이 발생되며⁸⁹, 외과적 수술이나 항암화학요법, 방사선요법, 면역요법 등 다양한 치료법이 있으나, 재발율이 높고 암증의 전이 등으로 인한 생존율 또한 낮아 치명적인 암증으로, 암증의 발생에는 음주, 흡연 및 바이러스에 의한 요인 뿐 아니라 최근에는 유전자적 결함에 의해서도 발생 된다고 한다⁹⁰.

많은 면역억제제가 T-cell의 감작을 감소시킴에도 불구하고, 암세포 자체를 공격하여 항암제로 널리 사용되어진다. 이러한 면역억제제로는 cyclophosphamide, 5-FU 등이 Dexorubicin, methotrexate, cisplatin 등과 복합적으로 사용되어진다. 본 연구는 면역억제제 중 cyclosporin A에 대한 세포 내 종양세포에 관한 연구가 부족한 것으로 사료되어 이것이 시험관 내에서 종양세포에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 시행하였다.

Cyclophilin A는 모든 세포의 cytoplasm에 존재하는 단백질이며 cyclosporin A에 대한 수용체로 면역억제 작용을 한다. cyclosporin A는 구조상 lipophilic하여 그자체로는 용해되지 않으므로 용해될 수 있는 성분을 섞어 제조하며, 이러한 이유로 구강투여는 불가능하다¹¹.

Borel 등¹¹은 cyclosporin A가 T-cell dependent 기능을 방해하여 면역억제를 하고, B-cell의 반응에는 효과가 없으며, Helper T-cell의 분화는 억제하지만 Suppressor T-cell의 분화에는 덜 효과적이라고 하였다^{12,13}. Natural killer cell¹⁴, memory T-lymphocytes¹⁵의 분화를 억제하는데 이것은 면역 반응의 초기에 더욱 효과적으로 나타나지만 성숙한 killer cell에는 효과적이지 않으므로 cyclosporin A는 이식 초기의 면역억제에 탁월한 효과를 나타낸다.

Thiru 등¹⁶은 lymphoma 환자 57명 중 3명에 있어서, 평균 이상의 cyclosporin A를 투여하였을 경우 EBA (Epstein-Bar Virus)의 항원에 대한 항체가 증가함을 발견하였으나, Crawford 등은¹⁷ 체외에서 EBV에 감염된 세포에 cyclosporin A를 주었을 경우 세포독성이 나타나지 않았다고 발표했으며, Thiru 등¹⁶은 역시

cyclosporin A가 T-cell의 기능을 상실시켜 면역억제를 하고, B-cell의 단일클론 복제를 허용하여, EBV의 전이를 돕는다고 하였다. 그러나 cyclosporin A는 염색체의 돌연변이를 일으키거나 세포독성을 나타내지 않으며 초기의 이식 후 발생한 lymphoma의 경우 EBV와 같은 종양원을 공격하는지는 아직 더 연구가 필요하다.

현재까지 개발된 항암제들은 세포독성을 유발시켜 많은 부작용을 나타내므로 최근에는 세포사멸을 유도하여 암 중 자체가 파괴되는 항암제들의 개발에 힘쓰고 있다.

세포사멸이란(Apoptosis ; falling off of tree leaves) 세포의 발생, 분화, 죽음에 이르는 자발적이고 능동적인 생리적 환경뿐 아니라, 세포손상, 미생물감염, 항암제 처리 등 병리적인 환경 하에서도 일어나는 적극적인 세포기전에 의한 세포사멸을 말한다^{18,19}.

본 연구에서는 이러한 세포사멸을 조절하는 유전자 중에서 VDAC 2, Bcl-2, Caspase 9와 같은 대표적인 유전자의 증감을 통해 cyclosporin A가 항암효과를 일으킬 수 있는가를 알아보도록 시행하였다.

세포사멸은 apoptotic factors 들 즉, Mullerian inhibiting substance (a TGF β -like protein), tumor necrotic factor들이 세포사멸 수용체들과 작용하여 이루어진다. 또 다른 요소로는 thyroxin, glucocorticoids, retinoids, lipophylic molecules 등²⁰이 있으며, 이러한 수용체들은 세포사멸을 유도하기 위해 link되어 유전자들을 복제한다^{21,24}. 즉 세포의 영양공급을 중단시켜 정상적인 세포의 소멸과정을 거치게 하며, survival factor인 cytokines, hormone등과 세포표면 및 핵의 수용체와 상호작용을 일으킨다^{25,29}. 또 다른 외적요인으로는 방사선조사, 독성물질, 약제 등이 세포사멸을 일으킬 수 있으며^{30,32} 특히, 세포주기 중 G2/M 기에서의 전사 실패로 세포사멸에 도달한다^{33,34}.

Anti-apoptosis gene (survival gene) 으로 세포질벽에 존재하는 Bcl-2는 골수, 내장벽 피부등의 세포사멸 과정에서 일시적으로 감소됨이 관찰되었다³⁵. 궁극적으로 미토콘드리아로부터, cytochrome-c 해리를 억제함으로 세포사멸을 억제한다.

Bcl-2와 유사한 염기서열을 가지는 유전자들을 Bcl-2 family 유전자라고 부르며³⁶, 크게 두 가지로 나뉘는데 세포사멸을 억제하는 anti-apoptotic protein과 세포사멸을 촉진시키는 pro-apoptotic protein으로 나뉘고, VDAC와 다른 미토콘드리아내의 protein과 상호작용을 통해 세포사멸을 조절한다³⁶.

Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w 등 anti-apoptotic protein들은 synthetic lipid membrane내에서 ion channel을 만들어 조절하며^{37,42}, 미토콘드리아는 cytochrome c와 apoptosis-inducing factor (AIF)를 세포질 내의 intermembrane space로 분비 시켜 apoptosis를 유발한다.

Cytochrome c의 유리는 세 가지 기전에 의해 일어나며, 첫 번째는 미토콘드리아 외벽의 물리적 괴사 (rupture)에 의한 것이며, 두 번째는 Bax와 같은 Bcl-2 family 중 pro-apoptotic protein에 의해 channel을 형성하여 이루어지고, 세 번째는 Bax와 더불어 liposome에 존재하는 VDAC에 의해 형성된 channel을 통해 이루어지며, 이렇게 유리된 cytochrome c는 Apaf-1과 결합하여 Caspase 9를 활성화시켜 apoptosome 이라고 불리는 holoenzyme을 형성하여

apoptosis를 하게 된다^{43,46}.

미토콘드리아의 permeability transition pore (PTpore)를 통해 apoptosis가 일어나는데, 이 pore는 VDAC-ANT (Adenine nucleotide translocase)- cyclophilin-D 가 미토콘드리아의 내 외벽 사이에서 접촉하여 형성되었으며, 이것을 통해 apoptotic protein을 보충하여, cytochrome c, AIF, procaspase 등 세포사멸물질을 방출 하도록 한다. ANT에는 ADP, dADP, ATP가 PTpore 주위에서 관찰되며⁴⁷, ANT단독으로는 PTpore를 형성할 수 없으며, 미토콘드리아의 cyclophilin의 receptor로 cyclosporin A는 enzyme의 activity를 방해하여 pore 형성을 못하도록 한다^{48,49}. 또한 미토콘드리아내의 Ca²⁺은 cyclosporin A가 cyclophilin과 결합하지 못하도록 할 뿐 아니라, PTpore를 활성화 시키는 중요한 역할을 한다^{48,49}. 그러나 ADP의 경우 cyclosporin A의 결합을 촉진시키며⁵⁰, cyclosporin A와 cyclophilin-D를 photolabelling을 시켜보면, ADP에 의해 두 가지 모두 증가하지만, Ca²⁺이 증가하면 감소되는 것이 관찰된다^{51,52}. VDAC 2는 세포사멸을 일으키는 proapoptotic molecule인 Bax, Bak의 활성을 방해하여 세포사멸을 억제한다⁵³.

이상의 문헌고찰을 통해 Bcl-2, VDAC 2, caspase 9 등은 서로에게 밀접한 영향을 주면서 그 양의 증감에 따라 세포사멸을 유도하거나 억제함을 알 수 있다.

본 연구에서는 이러한 세포사멸을 알아보기 위하여 Bcl-2, VDAC 2, caspase 9의 mRNA양을 측정하여, cyclosporin A가 세포사멸을 일으키는가 알아보았다.

VDAC 2의 경우 1000ng/ml의 cyclosporin A를 투여하였을 경우 큰 변화는 보이지 않았지만, 2000ng/ml에서부터 현저한 VDAC 2의 감소를 나타냈으며, Bcl-2 역시 2000ng/ml에서부터 mRNA의 양이 1/5이하로 감소하였음을 나타냈고, caspase 9의 mRNA의 양은 500ng/ml까지는 거의 증가함이 없었으나, 1000ng/ml에서 부터는 mRNA의 양이 점차 증가함을 나타냈다. 특히 caspase 9의 증가는 cytochrom c의 방출이 증가했음을 나타내는 것으로 많은 세포사멸이 일어났음을 의미한다.

역상차 현미경을 통해 관찰된 cyclosporin A 투여군 중 1000ng/ml에서는 대조군과 큰 차이를 보이지 않았으나 2000-3000ng/ml에서는 세포질의 경계가 뚜렷하지 않고 핵의 소실도 보였고 세포사멸도 관찰되었다.

Cyclosporin A의 농도에 따라 종양세포의 수를 세어 세포사멸의 경과를 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7일간 관찰 하였는데 대조군은 계속해서 그 수가 증가하였으나, 1000ng/ml에서는 성장이 거의 보이지 않았고, 2000ng/ml이상에서 성장이 끝난 것으로 나타났다.

MITT 검사법은 항암제의 감수성 검사에 많이 사용되어지며, 성장인자에 대한 세포의 감수성실험에 유용하게 사용되어진다. 이 방법은 정량적 결과를 비교적 객관적 수치로 단기간 내에 얻을 수 있으므로 특정 세포에 대한 선별검사, 병용화합요법에 대한 감수성을 알아볼 수 있다⁵⁴.

본 연구에서는 cyclosporin A의 농도가 높아질수록 MITT 수치의 차이가 뚜렷하였으며, cyclosporin A 투여 후 1000ng/ml에서 50% 정도 감소하였으며, 3000ng/ml에서는 거의 90% 정도 감소하였으

며, 이것은 미토콘드리아에서의 succinyl dehydrogenase의 활성이 낮아짐을 의미한다. 반대로 수치가 올라간다면 약제 저항이 커져서 감수성이 떨어짐을 의미하며, 약제가 세포사멸을 이끌기 어려움을 나타내는 것이다.

최근에는 이러한 세포사멸을 유도하는 항암제들이 많이 개발 되는데 그 이유는 과거의 항암제에 비해 부작용이 적고 정상적인 세포의 발생과 oncogenesis에 관여하는 유전자를 조절하여 종양세포가 스스로 괴사하여 없어지도록 하기 때문이다.

본 연구에서는 이러한 세포사멸을 분자화학적 방법 및 MTT assay, 역상차 현미경을 통한 세포의 관찰을 통해 cyclosporin A가 구강편평상피암종의 세포사멸을 실험관내 방법으로 유도할 수 있음을 밝혀냈으며, cyclosporin A의 자체적 항암효과를 알 수 있었다. 또한 cyclosporin A는 면역억제를 통한 T-cell의 감소로 항암 저해 요인을 함께 가지고 있어 항암제로 임상적 사용을 할 수 있도록 향후 계속적인 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

V. 결 론

구강편평상피세포암종에서 cyclosporin A 가 어떠한 항암 효과를 낼 수 있는지 알아보기 위해 역상차 현미경을 통한 조직의 변화, MTT assay를 통한 암세포에 대한 감수성검사 및 구강편평상피세포암종의 원발성 세포주를 배양 후 total RNA를 추출하여 전기영동을 시행하고, RT-PCR(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)을 거쳐 반정량적으로 분석한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 역상차 현미경 조건에서는 2000ng - 3000ng/ml에서 세포질의 경계가 뚜렷하지 않으며 핵의 농염도가 희미한 소견이 보였고 세포사멸도 관찰되었다.
2. 종양세포의 성장은 cyclosporin A 의 농도가 1000ng/ml 이상에서는 성장이 떨어지고 2000ng/ml 이상에서는 성장이 안 되며 일주일째는 거의 세포의 성장이 끝난 것으로 나타났다.
3. MTT(Tetrazolium-based colorimetric) assay는 cyclosporin A의 농도가 높아질수록 MTT 수치가 감소하며, 이는 cyclosporin A투여 후 미토콘드리아 세포에서 succinyl dehydrogenase의 활성이 낮아지는 것을 의미한다
4. RT-PCR 결과는 VDAC-2의 경우 mRNA의 양이 대조군에 비해 1000ng/ml까지는 큰 감소를 보이지 않았으나, 2000ng/ml에서는 mRNA 1/2정도 감소를 보였으며, Bcl-2의 경우 역시 2000ng/ml의 cyclosporin A 농도에서 1/5의 급격한 감소를 보였다. 그러나, caspase 9의 경우는 대조군에 비해서 완만하지만 증가의 양상을 보였다.

이상의 결과로 cyclosporin A는 구강편평상피암종 세포주에 투여시 농도가 증가 할수록 세포의 형태, 성장에 변화를 유도하였으며, 세포사멸에 관여하는 VDAC 2, Bcl-2 및 caspase 9의 mRNA에서 뚜렷한 변화를 보여 향후 항암제로의 지속적인 연구에 기여할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Meyers EN, Suen JY : Cancer of the Head and Neck. 2nd ed., New York, Churchill Livingstone, 1989.
2. Deleyiannis FWB, Weymuller Jr EA : Quality of life in patients with head and neck cancer. In Myers EN, Suen JY : Cancer of the Head and Neck. 3rd ed, Philadelphia, WB Saunders, 1996;904.
3. Rowley GD : A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and gram staining. Nature 1973;243:290.
4. Crompton M. Bax, Bid and the permeabilization of mitochondrial outer membrane in apoptosis. Curr Opin Cell Biol. 2000;12(4):414-419.
5. Laupacis A, Keown PA, Ulan RA : Cyclosporin A : a powerful immunosuppressant. Can Med Assoc J 1986;126:1041.
6. Seymour RA, Jacobs DJ. Cyclosporin and gingival tissues. J Clin Periodontol 1992;19:1-11.
7. Orita M, Iwahana H, et al : Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:2766.
8. Paz IB : Human papillomative in head and neck cancer 1997;79:595.
9. Smith CJ ; Epidemiology and etiology of malignant tumors of the mouth, jaw and salivary glands Edward Arnolds 1995;1.
10. Weinstein IB. Cancer prevention : recent progress and future opportunities. Cancer Res 1991;51:5080s-5085s.
11. Borel JF, Feurer C, Magnee C, Stahelin H: Effects of the new anti-lymphocytic peptide cyclosporin A in animals. Immunology 1977;32:1017-1025.
12. Tutsch PJ, Beschoner WE, Allison AC, Burns WH, Santos GW: Use of cyclosporin A in allogeneic bone marrow transplantation in the rat. Nature 1979;280:148-151.
13. Leapman SB, Filo RS, Smith EJ, Smith PG: In vitro effects of cyclosporin A on lymphocyte subpopulations. 1. Suppressor cell sparing by cyclosporin A Transplantation 1980;30:404-408.
14. Introna M, Allavena P, Spreafico F, Mantovani A: Inhibition of human natural killer activity by cyclosporin A. Transplantation 1981;31:113-116.
15. Leapman SB, Filo RS, Smith EJ, Smith PG: Differential effects of cyclosporin A on lymphocyte subpopulations. Transplant Proc 1981;13:405-409.
16. Thiru S, Calne RY, Nagington J: Lymphoma in renal allograft patients treated with cyclosporin A as one of the immunosuppressive agents. Transplant Proc 1981;13:359-364.
17. Crawford DH, Sweny P, Edwards JMB, Janosy G, Hoffbrand AV: Long-term T-cell-mediated immunity to Epstein-Barr virus in renal-allograft recipients receiving cyclosporin A. Lancet 1981;1:10-12.
18. Ellis RE, Yuan J, Horvitz HR: Mechanism and function of cell death. Ann Rev Cell Biol 1991;7: 663-698.
19. Krammer PH, Behnmann I, Daniel P, Dhein J, Debatin K: Regulation of apoptosis in the immune system Curr Biol 1994;6:279-289.
20. Evans, R. M.: The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science 1988;240,889-895.
21. Alles, A. J., K. K. Sulik: Retinoic acid-induced spina bifida: Evidence for a pathogenetic mechanism. Development 1990;108,73-81.
22. Wyllie, A.H.: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature 1980;284,555-556.
23. Kerr, J. F. R., B Harmon, J. Searle: An electron-microscope study of cell deletion in the anuran tadpole tail during spontaneous metamorphosis with special reference to apoptosis of striated muscle fibers. J cell Sci. 1974;14,571-585.
24. Umansky, S. R., B. A. Korol, P. Nelipovich: In vivo DNA degradation in thymocytes of γ -irradiated or hydrocortison-treated rats. Bicim. Biophys. Acta 1981;655,9-17.
25. Duke, R. C., J Cohen: IL-2 addiction: withdrawal of growth factors activates a suicide program independent T-cells, Lymphokine Res.

- 1986;5,289-298.
26. Kerr, J. F. R., J. Searle, B. V. Harmon, C. J. Bishop: Apoptosis. n: C. S. Potten (ed): Perspectives on Mammalian Cell Death. pp. 9 3-119. Oxford University Press. Oxford, New York, Tokyo. 1987.
 27. Koury, M. J., M. C. Bondurant: Erythropoetin retards DNA breakdown and prevents programmed cell death in erythroid progenitor cells. *Science* 1990;248,378-381.
 28. Liu, Y. J., D. E. Joshua, G. Y. Williams, C. A. Smith, J. Gordon, I. C. MacLennan: Mechanism of antigen-driven selection in germinal centers. *Nature* 1989;342,929-931.
 29. Mangan, D. F., R. Welch, S. M. Wahl: Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor- α , anti IL-1 prevent programmed cell death (apoptosis) in human peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* 1991;146,1541-1546.
 30. Allan, D. J., B. V. Marmon, J. V. R. Kerr: Cell death in spermatogenesis: In: C. S. Potten (ed): Perspectives on Mammalian Cell Death. pp. 229-258. Oxford University Press Oxford, New York, Tokyo 1987.
 31. Arends, M. J., A. H. Wyllie: Apoptosis. mechanisms and role in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 1991;32,223-254.
 32. Wyllie, A. H., J. F. R. Kerr, A. R. Currie: Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 1980;68,251-306.
 33. Smith, C. A., G. T. Williams, R. Kingston, E. J. Jenkinson, J. J. T. Owen: Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T-cell in thymic cultures. *Nature* 1989;337,181-184.
 34. Hartwell, L. H., T. A. Weinert: Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989;246,629-634.
 35. Hockenbery, D., G. Nunez, C. Milliman, R. D. Schreiber, S. J. Korsmeyer: Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990;348, 334-336.
 36. Adams JM, Cory S: The bcl-2 protein family: arbiters of cell survival, *Science* 1998;281:1322-1326.
 37. Minn, A. J., Velez, P., Schendel, S. L., Liang, H., Muchmore, S. W., Fesik, S. W., Fill, M. and Thompson, C. B. *Nature* 1997;385,353-357.
 38. Schlesinger, P. H., Gross, A., Yin, X. M., Yamamoto, K., Saito, M., Waksman, G. and Korsmeyer, S. J..*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997;94,11357-11362.
 39. Schende, IS. L.,Xie, Z., Montal, M. O., Matsuyama, S., Montal, M. and Reed, J. C.. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997;94,5113-5118.
 40. Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermod, J. J., Mazzei. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 1997;94,4112-4117.
 41. Chou, J. J., Li, H., Salvesen, G. S., Yuan, J. and Wagner. G. *Cell* 1999;96,6156-6164.
 42. McDonne, J. M., Fushman, D., Milliman, C. L., Korsmeyer. S. J. and Cowburn, D. *Cell* 1999;96,625-634.
 43. Jurgensmeier, J. M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D. and Reed, J. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998;95,4997-5002.
 44. Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R. J., Matsuda, H. and Tsujimoto, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998;95,1481-1486.
 45. Zamzami, N., Susin, S. A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez Monterrey, I., Castedo, M. and Kroemer, G. *J. Exp. Med.* 1996;187,1533-1544.
 46. Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Funahashi, Y., Mignon, A., Lacronique, V., Matsuda, H. and Tsujimoto, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998;95,1455-1459.
 47. Vander Heiden, M. G., Chandel, N. S., Williamson, E. K., Schumacker, P. T. and Thompson. C. B. *Cell* 1997;91,627-637.
 48. Halestrap, AP. and Davidson, AM. : Ingibition of Ca²⁺-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin A. *Biochem. J.* 1990;268,153-160.
 49. Crompton M, Andreeva L : On the interactions of Ca²⁺ and cyclosporin A with a mitochondrial inner membrane pore : a study using cobaltamine complex inhibitors of the Ca²⁺ uniporter. *Biochem. J.* 1994;302,181-185.
 50. Andreeva L, Crompton M : On the interactions of Ca²⁺ and cyclosporin A with a mitochondrial inner membrane pore. *Eru. J. Biochem.* 1994;221,261-268.
 51. Andreeva L, Tanveer A, Crompton M : Evidence for the involvement of a membrane-associated cyclosporin A-binding protein in the Ca(2+)-activated inner membrane pore of heart mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 1995;230,1125-1132.
 52. Tanveer A, Virji S, Andreeva L, et al. : Involvement of cyclophilin D in the activation of a mitochondrial pore by Ca²⁺ and oxidant stress, *Eur. J. Biochem.* 1996;238,166-172.
 53. Cheng EH : VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis *Science.* Jul 25;301 (5632): 513-7.2003.
 54. Sobotta SB, Beerger MR : Assessment of antineoplastic agents by MTT assay ; partial underestimation of antiproliferative properties. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1992;30(5):385-393.