

## 비소세포폐암 세포주에서 COX-2억제제(Nimesulide)의 세포독성

박찬범\* · 전현우\* · 진 웅\* · 조규도\* · 김치경\* · 왕영필\*

### Cytotoxicity of COX-2 Inhibitor (Nimesulide) in Non-small Cell Lung Cancer Cell Line

Chan Beom Park, M.D.\*, Hyun Woo Jeon, M.D.\*, Ung Jin, M.D.\*  
Kyu Do Cho, M.D.\*, Chi Kyung Kim, M.D.\*, Young-Pil Wang, M.D.\*

**Background:** In recent years, a combination of two demographic phenomena, an increased number of older people in the population and an increase in the incidence of lung cancer with age, has made it mandatory to develop therapeutic modalities with less toxicity for the treatment of inoperable elderly patients with lung cancer. Therefore, we investigated the correlation between COX-2 expression and cytotoxicity of Nimesulide, a specific COX-2 inhibitor.

**Material and Method:** Immunohistochemical staining of COX-2 was performed. After exposure of Nimesulide, XTT analysis, FACS analysis and Hoechst staining were carried out. **Result:** COX-2 protein was expressed in non-treated A549 cells strongly, but not in H1299. Cytotoxicity of Nimesulide against A549 cell and H1299 cell were similar and IC<sub>50</sub> of Nimesulide in both cell lines were 70.9 μM in A549 cell line and 56.5 μM in H1299 cell line respectively. FACS analysis showed G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> arrest in both cell lines and the S phase cell fraction was decreased. Morphologic assessment of apoptosis by Hoechst 33258 staining, many apoptotic cells were detected in both cell lines. **Conclusion:** Selective COX-2 inhibitor, Nimesulide, can inhibit the proliferation of non-small cell lung cancer cell lines in vitro. Inhibitory effect of Nimesulide are induction of apoptosis and G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> arrest. There is no correlation between COX-2 expression and cytotoxicity of Nimesulide, a specific COX-2 inhibitor. Therefore, highly selective COX-2 inhibitors such as Nimesulide can be expected to lead to even greater efficacy of their use as adjuncts to various anticancer agents and radiation therapy for the treatment of high-risk patients.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2005;38:263-270)

**Key words:** 1. Neoplasms  
2. Neoplasm marker  
3. Apoptosis

### 서 론

Cyclooxygenase (COX)는 아라키돈산을 프로스타글란딘과 트롬복산으로 변환시키는 핵심효소로, 이때 생성되는 프로스타글란딘과 트롬복산 등은 세포들의 부착, 성장, 분화에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 최근 COX가 Cyclooxygenase 1 (COX-1)과 Cyclooxygenase 2 (COX-2)의 두

가지의 동종효소로 존재하는 것이 알려졌으며, 이중 COX-1은 거의 모든 세포에 존재하는 구성효소로서 외부의 자극과 관계없이 지속적으로 발현되는 반면, COX-2는 정상적으로는 발현되지 않으나, Ras, Src과 같은 종양유전자나 표피성장인자(Epidermal growth factor; EGF), 변환성장인자(Transfoming growth factor β; TGF β), 종양괴사인자(Tumor necrotic factor α; TNF α), 자외선, 저산소증, Benzo-

\*가톨릭대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

논문접수일 : 2005년 1월 17일, 심사통과일 : 2005년 3월 14일

책임저자 : 왕영필 (137-701) 서울시 서초구 반포동 505번지, 강남성모병원 흉부외과

(Tel) 02-958-2477, (Fax) 02-958-2477, E-mail: drcs5223@daum.net

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

pyrene이나 Interleukin-1 (IL-1)과 같은 다양한 세포외적인 자극에 의해 유도되는 유도성 효소로 알려져 있다.

COX-2는 염증반응에서의 핵심적인 역할뿐 아니라 대장암, 식도암, 유방암, 췌장암 및 폐암과 같은 여러 종류의 종양에서 과발현되며, 특히 대장암 발암의 초기 악성화 변화와 연관이 있는 것이 알려져 있으며, 신생혈관의 형성이나 전이능의 증가와도 관련이 있는 것으로 보고되고 있다. 이러한 암세포에서의 COX-2의 역할은 불분명하지만, COX-2를 발현하는 종양들이 그렇지 않은 종양들과 비교할 때 나쁜 예후를 보인다는 보고도 있어서, COX-2가 암세포의 생존에 있어서 특정한 역할을 하고 있는 것으로 여겨진다[1].

비스테로이드성 소염제(Non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)는 이러한 COX를 비선택적으로 억제하여 프로스타글란딘의 합성을 감소시키는데, NSAIDs를 장기간 복용한 환자군에서 대장암의 발생빈도가 감소되는 것으로 보아, 이러한 COX의 억제가 어느 정도 항암효과가 있는 것으로 생각된다.

선세포폐암은 높은 수준의 COX-2를 보이는 것으로 알려져 있으며, COX-2의 발현유무가 환자의 예후와도 관계가 있는 것으로 보고되고 있다. 또한 이러한 COX-2를 억제하는 약물은 폐암세포의 증식을 억제하는 것으로 알려져 있는데, 기존의 비선택적인 COX 억제제에 비하여 선택적인 COX-2 억제제는 위장 출혈과 같은 부작용을 최소화하면서 사용이 가능하여, 고령이나 고위험군의 환자군에서도 사용이 가능할 것으로 생각된다.

따라서, 저자는 COX-2 발현 양성인 A549와 음성인 H1299 비소세포폐암 세포주에서 선택적인 COX-2 억제제인 Nimesulide를 처리하여 COX-2의 발현 유무에 따른 COX-2 억제제가 비소세포폐암에 미치는 세포독성과의 상관관계를 연구하기 위하여 본 실험을 실시하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 재료: 비소세포폐암 세포주

비소세포폐암 세포주인 A549, H1299는 ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD)에서 구입하였다. A549 비소세포폐암 세포주는 *Ras*와 *P53* 변이를 가지면서 COX-2에 대해서는 과발현되는 특징이 있으며, H1299 비소세포폐암 세포주는 *P53* 변이를 가지고 있으나 *Ras* 변이는 없으며 COX-2에 대해서는 발현되지 않는 특징이 있다. 각각의 세포주들은 10% FBS (Fetal bovine

serum)과 1% Penicillin/Streptomycin이 첨가된 RPMI 1640 (GIBCO BRL, England) 배양액으로 5% 이산화탄소, 37°C 배양기 속에서 배양하였다.

## 2. 방법

1) COX-2 단백질에 대한 면역조직화학염색: A549, H1299 비소세포폐암 세포주를 RPMI 1640과 10% FBS 항생제에 배양한 후 각각  $1 \times 10^4$ 개의 세포를 6개의 용기에 심었으며, 하룻밤 동안 배양 후, 1:200 항 Cox-2항체 (Santa Cruz, Santa Cruz, CA)를 이용한 COX-2의 면역조직학적 염색이 Vecta stain kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA)를 이용하여 시행되었다. 염색방법은 Phosphate buffer solution (PBS)에 2차례 씻은 뒤 실온에서 blocking solution에 30분, 항 Cox-2항체에 30분, link 항체에 30분간 처치하였으며, HRP-fast red에 발색한 후 Mayer hematoxylin으로 대조염색을 시행하였다.

2) XTT 분석: Nimesulide의 세포독성은 colorimetric assay를 이용한 Cell Proliferation Kit II (XTT) (Boehringer Mannheim, Germany)로 측정하였다. 지름 10 cm의 배양접시에 각각 A549, H1299 폐암세포  $1 \times 10^4$ 개를 분주한 후, 하룻밤 동안 세포를 배양하였으며 24시간 동안 Dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해된 0, 10, 100, 200, 300  $\mu$ M 농도의 Nimesulide에 노출하였다. 배양 후 100  $\mu$ L의 신선한 배지로 교체하였으며, 50  $\mu$ L의 XTT labeling mixture (Boehringer Mannheim, Germany)를 첨가하였다. XTT에 2시간 배양한 뒤, 미세측정기(Dynex Technology, Chantilly, Virginia)를 이용하여 분광측광흡수도(Spectrophotometrical absorbance)를 측정하였으며, 각각의 Nimesulide농도에 대하여 생존가능한 세포의 정도(percent)를 계산하였다.

3) FACS (Fluorescent-Activated Cell Sorting) 분석: 지름 10 cm의 배양접시에 각각  $5 \times 10^5$ 개의 A549, H1299 비소세포폐암 세포주를 배양하였으며, 하룻밤 동안 배양 후에 Dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해된 100, 150, 200  $\mu$ M 농도의 Nimesulide에 노출한 군을 처치군으로 하였으며, Nimesulide에 노출하지 않는 군을 대조군으로 하였다. 48 시간 후 세포들을 Trypsin 처리 후 수집하여, 5 mM의 Ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA)를 포함한 PBS 완충용액으로 2번 세척한 후, 70% 냉장 에탄올을 이용하여 4°C에서 고정하였다. 고정된 세포는 Propidium iodide (100  $\mu$ g/mL in PBS) 염색용액을 이용하여 형광염색을 시행하였으며 Coulter fluorocytometer (Coulter Electronics, Hialeah, FL)를 이용하여 자료를 분석하였다.

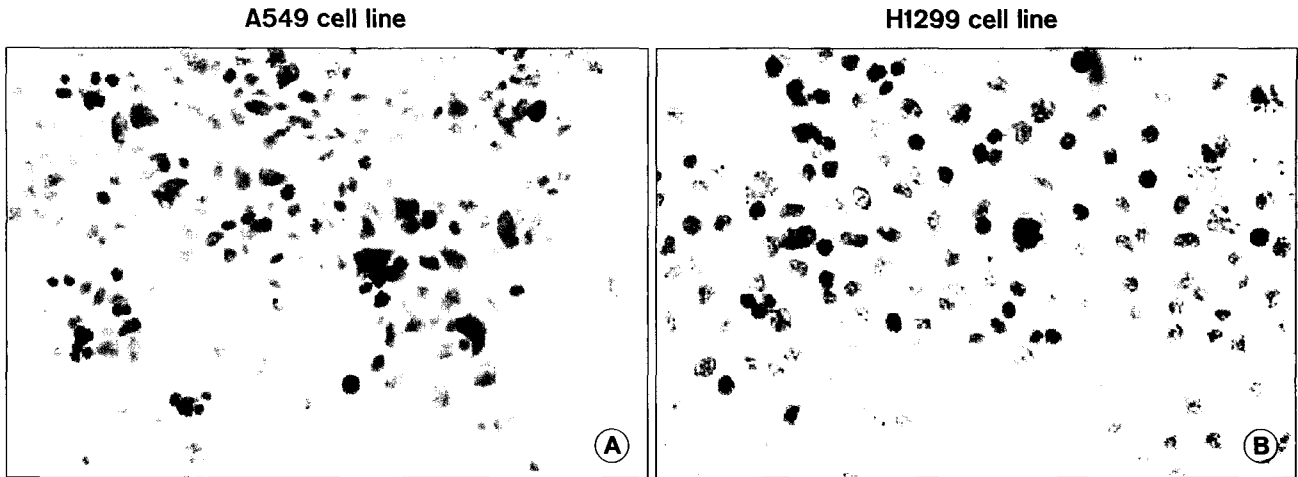


Fig. 1. Immunohistochemical staining with anti-COX2 antibody in non-treated cell lines. (A) COX-2 protein is strongly expressed in the cytoplasm of A549 cell line. (B) No COX-2 protein expression is found in H1299 cell line.

4) **Hoechst 33258 staining:** 6개의 용기에 A549와 H1299 비소세포페암 세포주를  $1 \times 10^4$ 개씩 분주하였으며, 각각의 세포들은  $500 \mu\text{M}$  농도의 Nimesulide에 24시간 처치하였으며, Nimesulide에 노출한 군을 처치군으로 하였으며, 노출하지 않은 군을 대조군으로 하였다. 한차례 PBS에 씻은 뒤, 세포들은 4% Paraformaldehyde에 고정하였고, PBS에 다시 2차례 수세하였다. Hoechst 33258 ( $1 \mu\text{g/mL}$ ) 염색용액에 암실에서 30분간 처치한 후 형광현미경으로 세포자멸세포들을 관찰하였다.

## 결 과

### 1. COX-2 단백질에 대한 면역조직화학염색

Nimesulide를 처리하기 전에 시행한 면역조직화학염색에서 A549 세포는 세포질에서 COX-2 단백질에 대하여 강한 발현을 나타낸 반면, H1299 세포는 발현을 나타내지 않아, 이들 세포주의 COX-2 단백질발현의 특성을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

### 2. XTT 분석

Nimesulide의 세포독성을 알아보기 위하여 시행한 XTT 분석에서 A549 비소세포페암 세포주에서 Nimesulide의 생존력은  $10 \mu\text{M}$ 에서는 80.2%,  $100 \mu\text{M}$ 에서는 40.9%,  $200 \mu\text{M}$ 에서는 13.5% 그리고  $300 \mu\text{M}$ 에서는 10.1%로 용량이 증가할수록 생존력이 감소되는 경향을 보였으며, H1299 비소세포페암 세포주에서 Nimesulide의 생존력은  $10 \mu\text{M}$ 에서는

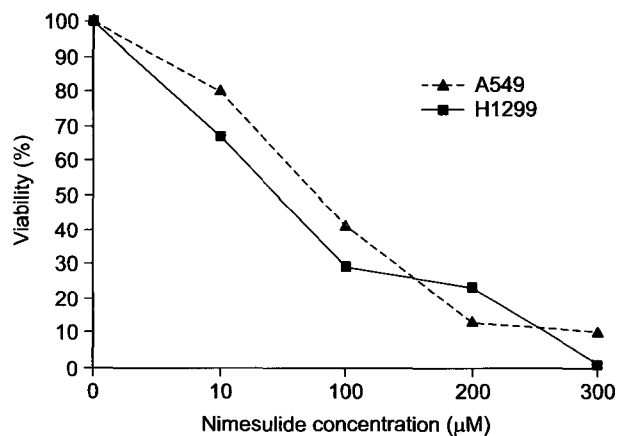
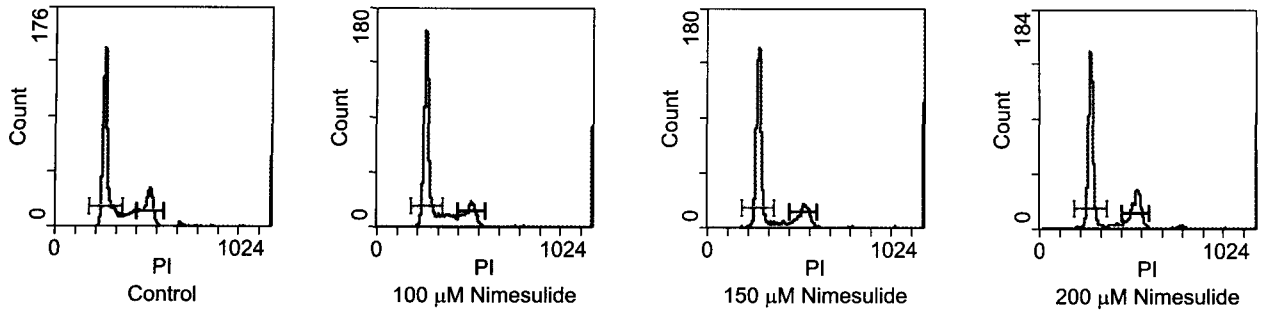


Fig. 2. Viability of A549 and H1299 cells after 24 hours exposure to Nimesulide. Cytotoxicity of Nimesulide against A549 and H1299 cells were not so much different.  $\text{IC}_{50}$  of Nimesulide in both cell lines were  $70.9 \mu\text{M}$  in A549 cell lines and  $56.5 \mu\text{M}$  in H1299 cell lines.

$67.4\%$ ,  $100 \mu\text{M}$ 에서는  $28.7\%$ ,  $200 \mu\text{M}$ 에서는  $23.6\%$  그리고  $300 \mu\text{M}$ 에서는  $1.1\%$ 로 양 군 모두에서 Nimesulide의 농도가 증가할수록 생존가능한 세포 수는 감소하는 양상을 보였다.

Nimesulide의 A549, H1299 비소세포페암 세포주에 대한 세포독성은 Fig 2에서와 같이 거의 유사하였으나, Nimesulide의 세포독성의 지표로서  $\text{IC}_{50}$  (Inhibitory concentration 50%)은 A549 비소세포페암 세포주에서는  $70.9 \mu\text{M}$ 이었으며, H1299 비소세포페암 세포주에서는  $56.5 \mu\text{M}$ 이었다(Fig. 2).

**A: A549 cell line**



**B: H1299 cell line**

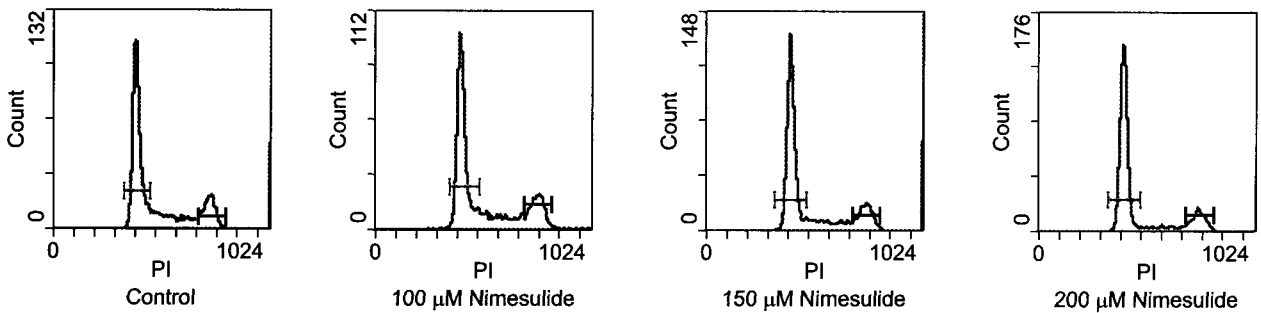


Fig. 3. A (A549), B (H1299): In both cell lines, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> arrest was observed and the content of S phase cells was decreased.

**3. FACS 분석**

Nimesulide의 세포주기에 대한 영향을 조사하기 위하여 FACS 분석을 시행하였다. A549 비소세포페암 세포주에서 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>기의 분획은 대조군에서는 46.9%, 100 μM 처치군에서는 55.5%, 150 μM 처치군에서는 57.6%로 증가되었으며, 200 μM 처치군에서는 53.3%로 100, 150 μM 처치군보다는 감소되었으나, 대조군보다는 증가되는 소견을 보였으며, S기의 분획은 대조군에서는 21.4%, 100 μM 처치군에서는 19.5%, 150 μM 처치군에서는 9.57%, 그리고 200 μM 처치군에서는 6.44%로 감소되어 모든 처치군에서 대조군보다 감소되는 경향을 보였다.

H1299 비소세포페암 세포주에서는 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>기의 분획은 대조군에서는 48.5%, 100 μM 처치군에서는 49.1%, 150 μM 처치군에서는 58.6%, 그리고 200 μM 처치군에서는 67.6%로 Nimesulide 처치 후 증가되는 소견을 보였으며, S기의 분획은 대조군에서는 27.0%, 100 μM 처치군에서는 21.5%, 150 μM 처치군에서는 18.8%, 그리고 200 μM 처치군에서는 11.1%로 감소되어 모든 처치군에서 대조군보다 감소되는 경향을 보였다.

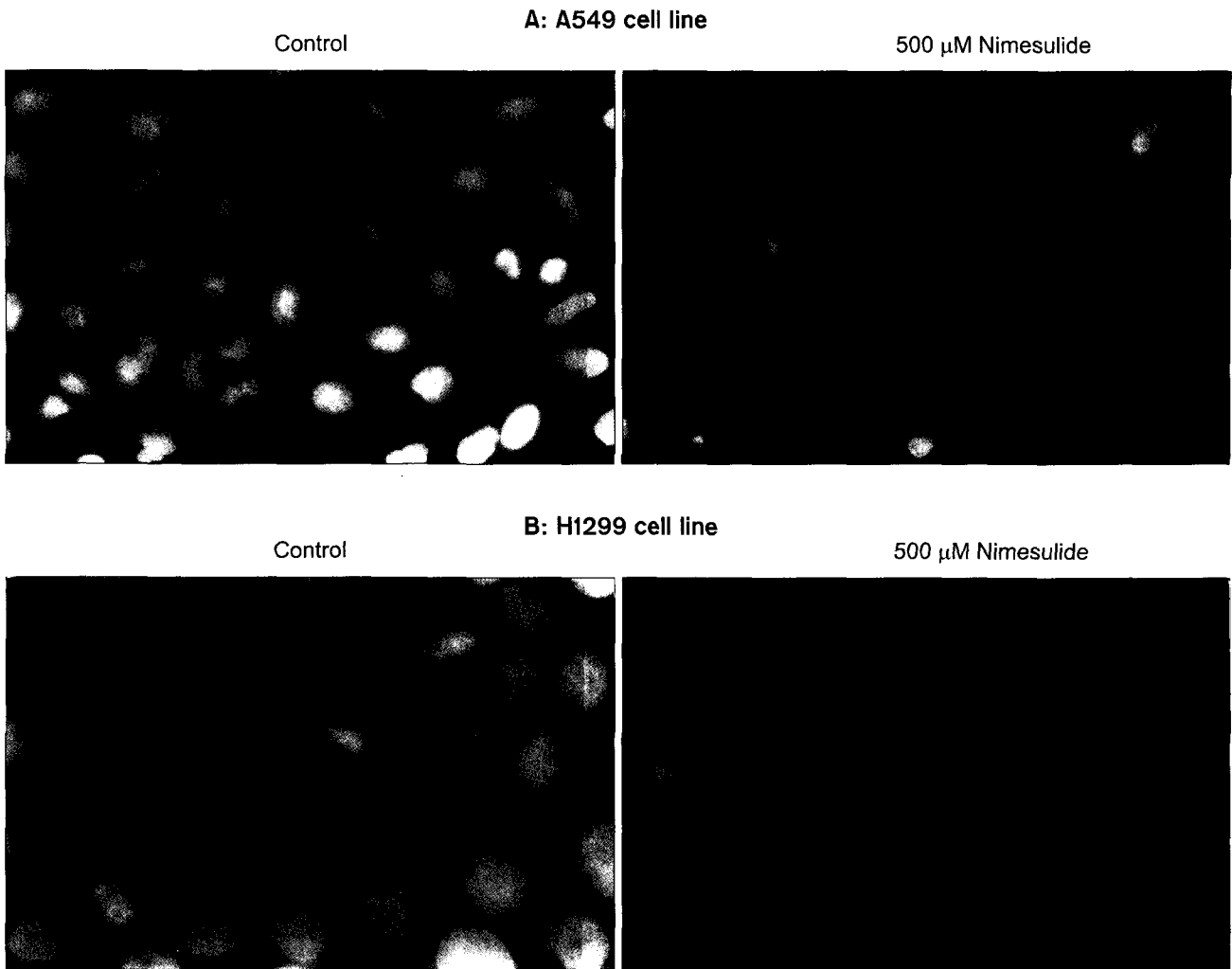
따라서 A549, H1299 비소세포페암 세포주에서 Nimesulide 처치 후 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 기에서 세포주기가 지연되는 것을 알 수 있었으며, S기의 세포는 감소되는 것을 확인하였다 (Fig. 3).

**4. Hoechst 33258 staining**

Nimesulide에 의한 세포사멸이 세포자멸사에 의한 것인지 관찰하기 위하여 Hoechst 33258 염색방법을 사용하여 세포사멸의 형태학적 검사를 시행하였는데, 대조군에서는 A549, H1299 비소세포페암 세포주 양군에서 사멸세포가 관찰되지 않았으나, Nimesulide를 처치한 후에는 양군에서 모두 세포핵의 주변부 농축 현상 및 핵 분절을 가진 많은 사멸세포가 관찰되어 세포자멸사에 의한 기전이 Nimesulide의 비소세포페암 증식 억제에 관여한 것으로 확인하였다(Fig. 4).

**고 찰**

폐암은 조기에 발견하기가 어렵고 치료에 있어서도 비소세포암은 근치적 절제술 외에는 완치의 가능성이 매우



**Fig. 4.** A (A549), B (H1299): In both cell lines, many Hoechst 33258 stained apoptotic cells showing perinuclear condensation and nuclear fragmentation were detected.

희박한 반면 소세포폐암은 복합항암치료에 잘 반응하지  
만 빈번한 재발 등으로 인하여 예후가 매우 불량한 특징  
이 있다. 또한 최근 고령화 사회가 진행되어 가면서 폐암  
환자에 있어서도 수술에 적응이 되지 않는 고령의 환자가  
점차 증가되는 추세를 보이고 있어 독성이 적은 치료방법  
의 개발 필요성이 증가되고 있다. Cisplatin이나 Paclitaxel  
과 같은 항암제의 사용시에는 심한 말초성 신경염이나 골  
수억제와 같은 합병증이 발생할 수 있으며, 다제세포독성  
약제에 대한 내성이 발생할 수 있어, 이러한 단점을 극복  
할 수 있는 여러가지 방법들이 연구 개발되고 있다.

NSAIDs는 아라키돈산을 프로스타글란딘과 트롬복산으  
로 전환시키는 효소인 Cyclooxygenase (COX)를 억제하는  
것으로 알려져 있는데, COX에는 COX-1과 COX-2 두 가

지의 동종효소가 있다. 이중 COX-1은 거의 모든 조직에서  
발현되며, COX-2는 종양촉진인자(Tumor growth factor)나  
성장인자, 염증반응에 관여하는 Cytokine 등에 의해 유도  
되는 특징을 가지고 있다. Hida 등[2]에 의하면 COX-1은  
위장에서의 세포방어, 신장의 혈관확장, 프로스타글란딘  
이나 트롬복산의 합성과 같은 다양한 생리적 기능에 관여  
한다고 하였으며, COX-2는 염증반응에 관여하는 역할 이  
외에도 발암과정에 관여한다고 하였다. 또한 COX-2의 발  
현이 소세포암에서는 거의 발현이 되지 않고 편평상피세  
포암에서는 매우 낮은 발현율을 보이는 반면, 비정형성  
선양증식증(Atypical adenomatous hyperplasia)이나 상피내  
암(Carcinoma in situ)에서는 약 1/3에서 과발현되며, 침습  
적 선암에서는 70%에서 매우 증가되는 특징이 있는 것으

로 보아 COX-2의 발현은 선상피(Glandular epithelium)에서 발생하는 암의 특징인 것으로 보인다고 하였다[3].

Achiwa 등[1]은 2-3기로 병기가 진행된 경우의 췌암종에서는 COX-2가 양성인 경우와 음성인 경우에서 생존율의 차이가 없었으나, 1기의 조기 췌암종에서는 COX-2의 발현이 양성인 환자가 음성인 환자군에 비하여 통계적으로 유의하게 생존율이 낮은 점으로 보아, 수술적으로 절제가 가능한 췌암종 환자중 조기 암인 경우에는 COX-2의 발현 유무가 환자의 예후에 있어서 임상적으로 매우 중요하다고 하였다.

Tsujii 등[4]에 의하면 COX-2의 과발현은 첫째, 세포자멸사(apoptosis)를 억제하며, 둘째, 암세포의 전이력을 증가시키며, 셋째, 혈관생성을 촉진한다고 하였다. 또한, COX-2를 발현하는 대장암은 침습성이 증가하는데 이러한 종양 세포의 침습성은 기저막을 구성하는 단백질의 분해가 주된 기전이며 기저막의 구성성분 중 Type 4 collagen의 분해가 매우 중요하다고 하였다. 이러한 세포외 기질을 분해시키는 성질은 Metalloproteinase-2의 활성화와 Membrane type metalloproteinase를 합성하기 위한 RNA의 증가와 연관성이 있다. 따라서 선택적인 COX-2 억제제는 metalloproteinase-2의 활성화를 억제함으로써 COX-2 발현 암세포의 침습성을 역전시킬수 있다고 하였다.

이 실험에서는 선택적인 COX-2 억제제인 Nimesulide 처치 후 생존가능한 세포의 수가 Nimesulide의 용량과 비례하여 감소하는 것을 관찰할 수 있었으며, Hoechst 33258 염색 결과 많은 수의 자멸세포가 관찰되어 이러한 세포자멸사의 유도가 선택적인 COX-2 억제제의 암세포 증식억제의 기전 중의 하나일 것으로 생각되었는데 Hida 등[5]도 비소세포폐암 세포주에서 COX-2 억제제가 세포자멸사의 유도에 의해서 비소세포폐암의 증식을 억제한다고 발표한 바 있다.

COX-2의 발현은 여러 유전자의 변이와 많은 연관관계가 있는 것으로 알려져 있는데, 이 실험에서도 Ras 유전자의 변이를 가지는 A549 비소세포폐암 세포주와 Ras 유전자의 변이를 가지지 않는 H1299 비소세포폐암 세포주에서 선택적인 COX-2 억제제인 Nimesulide의 세포독성에 관한 연구한 결과 COX-2 단백질의 발현은 Fujita 등[6]이 K-ras 유전자의 변이가 세포내에서 COX-2를 유도할 것이라고 제안한 바와 같이 Ras 유전자 변이를 가지는 A549 비소세포폐암 세포주는 COX-2 단백질에 대해 강한 발현을 나타낸 반면, Ras 유전자 변이를 가지지 않은 H1299 비소세포폐암 세포주는 COX-2 단백질에 대해 발현을 나

타내지 않았다. 그러나 Nimesulide에 대한 세포독성은 Ras 유전자의 변이 유무와는 관계없이 양군에서 유사한 세포독성을 보여 이는 Nimesulide 약제 자체의 직접독성이 영향이 있을 것으로 생각되며 또한 다른 기전에 관해 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

P53 유전자의 변이와 COX-2 발현의 상관관계에 관하여는, Leung 등[7]에 의하면, Wild-type p53 변이를 가진 군이 그렇지 않는 군과 비교하여 매우 강한 COX-2 발현을 보인다고 하였으나, 이 실험에서는 P53 유전자 변이 양성을 가지는 A549, H1299 비소세포폐암 세포주가 COX-2 발현에 있어서는 P53 유전자의 유무와 상관관계를 보이지 않았다. 그러나 COX-2 발현유무와 관계없이 선택적인 COX-2 억제제인 Nimesulide 처치후 양군에서 유사한 정도의 세포독성을 보이는 것으로 보였으며, Piazza 등[8]이 P53 유전자 변이를 가진 군이 COX 억제제 사용 후 세포자멸사를 일으킨다고 보고한 바와 같이 이 실험에서도 선택적인 COX-2 억제제인 Nimesulide 처치 후 시행한 Hoechst 33258 염색에서 세포자멸사를 보여 P53 유전자의 변이가 Nimesulide의 세포독성과 연관관계가 있는 것으로 생각된다.

이 실험에서 선택적인 COX-2 억제제인 Nimesulide 처치 후 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>기의 세포주기가 지연되는 것을 관찰할 수 있었는데, Yao 등[9]이 폐암의 화학예방은 COX-2의 억제와 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>기에서 세포주기의 지연 및 세포자멸사의 유도라고 한 바와 같이 이러한 기전이 COX-2 억제제의 암세포 증식억제의 기전 중의 하나라고 생각된다.

고전적인 비스테로이드성 소염제는 COX-1과 COX-2 모두를 억제하여 종양의 형성을 억제하는 것으로 알려져 있으나[10], COX-1의 억제는 세포방어성 프로스타글란딘의 합성을 억제하여 소화성 궤양이나 출혈을 일으킬 수 있으며, 대부분의 비스테로이드성 소염제는 급성신기능부전을 일으키는 단점이 있다. 이는 비스테로이드성 소염제에 의한 직접적인 세포독성과 COX의 억제에 의한 프로스타글란딘 합성의 감소와 함께 아라키돈산의 혈관을 수축하는 Leukotrienes의 합성 때문인 것으로 보고되고 있다[11]. 그러나, Warrington 등[12]에 의하면 선택적인 COX-2억제제인 Nimesulide는 임상적으로 요구되는 용량보다 많은 양을 복용시에도 신독성을 보이지 않아 고령이나 고위험군의 환자에서도 안정적으로 사용될 수 있을 것이라고 하였으며, Davis 등[13]도 고령이나 중등도의 신기능부전을 가진 환자에서도 비교적 안전하게 사용할 수 있다고 하였다.

이 실험의 XTT 분석결과 Nimesulide의 농도와 세포독성은 일정한 상관관계를 보이는 것을 알 수 있는데, 이는

Hida 등[5]의 COX-2 억제제가 폐암세포의 증식에 있어서 용량 의존성 억제를 유도한다는 결과와도 일치한다. 또한 Hida 등[5]은 임상적으로 적용가능한 낮은 농도에서도 폐암세포의 증식을 억제할 수 있다고 하였으며, 또한 방사선이나 다른 항암제와 병용시 상승효과를 보인다고 하였는데, Soriano 등[14]도 임상적으로 적용가능한 농도에서 폐암세포의 증식을 억제하는 것으로 알려진 아라키돈산 대사의 억제제인 Sulindac sulfide, Exisulind, NDGA (Nordihydroguaiaretic acid)가 Paclitaxel, Cisplatin 같은 항암제와 병용투여시 상승작용을 일으킬 뿐만 아니라 13-cis-retinoic acid같은 화학예방약제와 함께 사용시에도 상승작용을 일으킨다고 하였다.

이 실험은 COX-2 발현 양성인 A549와 음성인 H1299 비소세포폐암 세포주에서 Nimesulide를 처치하여 COX-2의 발현 유무에 따라 COX-2 억제제가 비소세포암에 미치는 세포독성과의 상관관계를 연구하였는데 선택적인 COX-2 억제제인 Nimesulide는 비소세포암 세포주에서 암세포의 증식을 억제함을 알 수 있었으며, 이러한 암세포의 증식의 억제는 세포자멸사의 유도 및 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>기의 세포주기를 지연시키는 것이 Nimesulide에 의한 암세포증식억제의 기전임을 알 수 있었다. COX-2의 발현 유무와 유전자 변이와의 상관관계에 있어서는 Ras 유전자의 변이는 COX-2 발현과 상관관계가 있었으나 P53 유전자의 변이는 상관관계가 없었으며, 유전자의 변이와 선택적인 COX-2 억제제인 Nimesulide의 세포독성과의 상관관계에 있어서는 P53 유전자의 변이는 상관관계가 있었으나 Ras 유전자의 변이와는 상관관계가 없어 선택적인 COX-2 억제제와 유전자 변이와의 상관관계에 대하여 추가연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 결 론

비소세포폐암에서 Nimesulide와 같은 선택적인 COX-2 억제제는 용량의존형 방식으로 세포사멸을 유도함으로써 심각한 부작용 없이 비소세포폐암 증식의 억제가 가능하며, 다양한 항암제나 방사선치료와 병행할 경우 고위험군의 폐암환자에서 매우 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 참 고 문 헌

1. Achiwa H, Yatabe Y, Hida T, et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase 2 expression in primary, resected

lung adenocarcinomas. Clin Cancer Res 1999;5:1001-5.

2. Hida T, Yatabe Y, Achiwa H, et al. Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. Cancer Res 1998;58:3761-4.

3. Bauer AK, Dwyer-Nield LD, Malkinson AM. High cyclooxygenase 1 (COX-1) and cyclooxygenase 2 (COX-2) contents in mouse lung tumors. Carcinogenesis 2000;21:543-50.

4. Tsujii M, Kawano S, Dubois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:3336-40.

5. Hida T, Kozaki KI, Muramatsu H, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis and enhances cytotoxicity of various anticancer agents in non-small cell lung cancer cell lines. Clin Cancer Res 2000;6:2006-11.

6. Fujita M, Fukui H, Kusaka T, et al. Relationship between cyclooxygenase-2 expression and K-ras gene mutation in colorectal adenomas. J Gastroenterol Hepatol 2000;15:1277-81.

7. Leung WK, To K-F, Ng Y-P, et al. Association between cyclo-oxygenase-2 overexpression and missense p53 mutations in gastric cancer. Br J Cancer 2001;84:335-9.

8. Piazza GA, Rahm AK, Finn TS, et al. Apoptosis primarily accounts for the growth-inhibitory properties of sulindac metabolites and involves a mechanism that is independent of cyclooxygenase inhibition, cell cycle arrest, and p53 induction. Cancer Res 1997;57:2452-9.

9. Yao R, Rioux N, Castonguay A, You M. Inhibition of COX-2 and induction of apoptosis: Two determinants of nonsteroidal anti-inflammatory drugs' chemopreventive efficacies in mouse lung tumorigenesis. Exp Lung Res 2000;26:731-42.

10. Kim JH, Kim RH, Yoo K. Induction of apoptosis and inhibition of cellular proliferation in aspirin-treated SNU-668 human gastric adenocarcinoma cell lines. J Korean Cancer Assoc 2001;33:71-6.

11. Rainsford KD. Effects of 5-lipoxygenase inhibitors and leukotriene antagonists pathway on the development of gastric mucosal lesions induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cholinomimetic treated mice. Agents Actions 1987;21:316-9.

12. Warrington SJ, Ravic M, Dawnay A. Renal and general tolerability of repeated doses of nimesulide in normal subjects. Drugs 1993;46(Suppl.1):263-9.

13. Davis R, Brogden RN. An update of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. Drugs 1994;48:431-54.

14. Soriano AF, Helfrich B, Chan DC, Heasley LE, Bunn PA Jr., Chou TC. Synergistic effects of new chemopreventive agents and conventional cytotoxic agents against human lung cancer cell lines. Cancer Res 1999;59:6178-84.

=국문 초록=

**배경:** 최근 고령화 사회가 진행되어 가면서 폐암환자에서도 수술에 적응이 되지 않는 고령의 환자가 점차 증가하는 추세를 보이고 있어 독성이 적은 치료방법의 개발에 대한 필요성이 증가되고 있다. 따라서 기존의 항암제에 비하여 비교적 안정적으로 사용이 가능할 것으로 생각되는 선택적인 COX-2 억제제인 Nimesulide를 처치하여 COX-2 발현 유무와 COX-2 억제제가 비소세포폐암에 미치는 세포독성과의 상관관계를 연구하였다. **대상 및 방법:** A549, H1299 비소세포폐암 세포주에서 COX-2 단백질에 대한 면역조직화학염색을 시행하였으며, Nimesulide 처치후 XTT 분석, FACS 분석, Hoechst 33258 염색을 시행하였다. **결과:** COX-2 단백질의 면역조직화학염색결과 A549 비소세포폐암 세포주는 COX-2 단백질에 강한 발현을 나타낸 반면, H1299 비소세포폐암 세포주는 발현을 나타내지 않았다. XTT 분석결과 Nimesulide의 A549, H1299 비소세포폐암 세포주에 대한 세포독성은 유사하였으며, Nimesulide의 IC<sub>50</sub>은 A549 비소세포폐암 세포주에서는 70.9  $\mu$ M이었으며, H1299 비소세포폐암 세포주에서는 56.5  $\mu$ M이었다. FACS 분석에서는 각각의 세포군에서 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 기에서 세포주기의 지연이 관찰되었으며, S기의 세포는 감소되었다. Hoechst 33258 염색에서는 양군에서 세포핵의 주변부 농축 현상 및 핵 분절을 가진 많은 사멸세포가 관찰되었다. **결론:** 선택적인 COX-2억제제인 Nimesulide는 비소세포폐암 세포주에서 암세포의 증식을 억제함을 알 수 있었으며, 암세포증식 억제의 기전은 세포자멸사의 유도과 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>기에서 세포주기의 지연임을 알 수 있었으며, COX-2의 발현유무와 세포독성은 차이가 없는 것을 알 수 있었다. 따라서 Nimesulide와 같은 선택적인 COX-2 억제제는 다양한 항암제나 방사선치료와 병행하여 고위험군의 폐암환자에서 매우 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

- 중심 단어 : 1. 종양  
2. 종양인자  
3. 세포자멸사