

## Inducing apoptosis by the inhibition of c-myb in oral squamous carcinoma cell line, KB cell

Jung-Chang Lee, Hyun-Ju Moon, Young-Hee Lee, Ji-Eun Jung, Manju Sharma, Eun-Jung Jhee, and Ho-Keun Yi\*  
*Department of Oral biochemistry, School of Dentistry and Institute of Oral-bio Science, Chonbuk National University*

(Received October 15, 2007; Accepted December 12, 2007)

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common malignancy and is a major cause of worldwide cancer mortality. The proto-oncogene c-myb plays an important role in regulation of cell growth and differentiation, and it is expressed at high levels in hematopoietic cells and many other types of cancers. However, the function of c-myb is not well known in OSCC. The present study aimed to reveal the function of c-myb and to test the alternation of cell growth and signaling by c-myb in OSCC. In this study, c-myb and dominant-negative myb(DN-myb) were expressed in an adenovirus-mediated gene delivery system to KB cells. The over-expressed c-myb brought increased cellular proliferation compared with control cells. However, DN-myb infected KB cells showed significant reduction of cell growth and enhanced induction of apoptosis to activate PARP and caspase 9. c-myb induced increase of IGF-I, -II and IGF-IR expressions while DN-myb down-regulated these expression. Activation of ERK and Akt/PKB pathway was shown only in c-myb transduced cells. These findings suggest that the role of c-myb in cell growth of oral cancer cells is partially mediated through the modulation of IGFs, ERK and Akt/PKB. From this results, DN-myb is strongly recommended as a curable gene for the treatment of c-myb dependent malignancies such as OSCC.

**Key words:** Apoptosis, c-myb, Dominant-negative myb, KB cell, Oral squamous cell carcinoma

\*Corresponding author: Ho-Keun Yi, Ph.D., Department of Biochemistry, School of Dentistry, Chonbuk National University 634-18, Geumam-dong, Deokjin-gu Jeonju, Jeonbuk, 561-712, Korea. Tel.: +82-63-270-4033; Fax.: +82-63-270-4033; E-mail: yihokn@chonbuk.ac.kr

### 서 론

c-myb은 특정 DNA 염기서열에 결합하는 단백질로 분리되었으며, 핵내 전사조절인자로서 주로 혈구세포의 성장과 분화를 담당하는 주요한 인자이다(Luscher and Eisenman, 1990; Introna 등, 1994). c-myb의 DNA 결합 영역과 유사한 단백질의 배열을 갖으며 전사조절인자로서 기능을 수행하는 단백질 군을 myb related protein이라 하며, 이들 인자는 여러 세포의 성장에 관여하는 것으로 알려져 있다(Nishina 등, 1989; Ibanez and Lipsick, 1990). 혈구세포에서 c-myb은 전구세포에서 많은 양이 발현되지만, 세포가 분화하면 발현양이 현저히 감소하는 특징이 있다(Introna 등, 1994). 또한 대부분의 혈액암세포에서는 c-myb이 과잉 발현되거나 증폭 되는 특성을 보인다(Melotti 등, 1994). 그밖에 c-myb은 신경망막, 평활근육, 장관조직 세포에서 발현되고 있으며, 이들 조직에서도 성장과 밀접한 관련성이 있는 것으로 알려져 있다(Torelli 등, 1987; Sitzmann 등, 1995). 암과 관련한 c-myb은 대장암, 유방암, 신경모세포종, 소세포성 폐암 등 여러 암에서의 과잉발현이 보고되었다(Guerin 등, 1990; Thompson and Ramsay, 1995). 따라서 c-myb은 정상조직이나 암세포에서 세포주기의 진행을 촉진시킴으로 apoptosis를 억제시켜 암세포의 생존력을 높이는 것으로 추측된다.

구강암은 조직학적으로 편평상피세포암(squamous cell carcinoma)으로 기저부위에 존재하는 간상피세포의 비정상적인 성장으로 발생한다(Saranath D, 2000). 구강암의 발병은 흡연이 깊은 관련이 있으며, 그밖에 개인의 유전적 요인을 비롯하여 알코올, 음식물, HPV(human papilloma virus)와 EBV(Epstein-Barr virus) 등이 알려져 있다(Daftary 등, 1991). 현재까지 구강암에서 c-myb의 기능에 관하여 알려져 있지 않다. 본 연구는 구강암세포에서 c-myb의

기능을 밝히기 위한 기초적인 연구로 c-myb에 의한 세포 성장의 변화, 세포신호체계의 전환, 성장과 신호체계에 영향을 미치는 성장인자의 변화를 검토하였다.

## 실험재료 및 방법

### 세포배양

사람의 구강암 세포주인 KB 세포를 실험에 사용하였다. 배양액은 RPMI(Life Technologies, Grand Island, NY, USA) 배지에 56°C에서 30분간 가열하여 비활성화시킨 우태아 혈청(FBS, Hyclone, Logan, Utah, USA)을 10%, penicillin(100 unit/ml)과 streptomycin(100 µg/ml) 및 300 µg/ml-glutamine을 첨가하여 조제하였다. 세포주는 위의 배양액을 사용하여 37°C, 95% 습도, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였고, 통상적으로 세포가 서로 융합되기 직전인 3-4일 간격으로 계대 배양을 하였다.

### c-myb, Dominant negative c-myb(DN-myb), 아데노바이러스 제작 및 감염

wild type c-myb 유전자와 c-myb 으로부터 DN-myb의 분리 및 재조합은 Yi 등(Yi 등, 2002)의 보고와 동일하다. DN-myb은 c-myb의 DNA 결합영역만을 재조합시켰다. 아데노바이러스는 AdEasy system(Quantum Biotech., Montreal Canada)의 회사 방법에 준하여 제작하였다. Ad/myb과 Ad/DN-myb 아데노바이러스의 구조는 E1이 대체된 아데노바이러스백터에 c-myb의 cDNA와 DN-myb 영역을 각각 삽입시켰다. 삽입된 백터는 pAdEasy-1 바이러스 백터와 대장균 BJ5183에서 동종 재조합을 시켰다. 재조합이 이루어진 strain으로부터 DNA를 분리하여 대장균 DH5α에 형질전환시켜 다량의 재조합 c-myb과 DN-myb을 정제하였다. 이를 제한효소 PacI으로 절단시키고 QBI-293A packaging cell에 calcium phosphate 방법으로 도입시킨 후 2주일 전후에 형성된 plaque를 확인하였다. Plaque가 형성된 배양용기로부터 바이러스 DNA를 분리한 후 DN-myb 영역을 PCR로 확인하였다. QBI-293A 세포에 재증식시키고, CsCl density purification을 시행하여 투석시킨 후 10% glycerol이 함유된 dialysis buffer(10 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>)와 함께 -80°C로 저장하였다. 대조군으로 LacZ 유전자를 함유한 Ad/LacZ을 사용하였다.

KB 세포주에 바이러스를 10, 과 100 MOI(multiplicity of infection, number of active virus particle/cell number)로 감염시켰으며, 감염은 우태아 혈청이 함유되지 않는 배양액에 5분 간격으로 흔들려주면서 37°C에서 1시간 시켰다.

### 세포성장

세포의 증식은 60 mm의 배양용기에 1×10<sup>5</sup> 개의 세포

를 배양시키고, 세포가 용기에 완전히 정착되는 6시간 후에 Ad/myb과 Ad/DN-myb을 10과 100 MOI 감염시키고, 1일부터 4일까지 tryphan blue 염색을 통하여 성장을 분석하였다. 또한 바이러스를 처리하지 않는 군과 대조바이러스로 Ad/LacZ을 감염시켜 성장정도를 비교하였다. 생존세포의 측정으로 60 mm 배양용기에 1×10<sup>4</sup>개의 세포를 배양시키고, 100 MOI 각각의 바이러스를 감염시킨 후 3일째에 50% 메탄올로 고정시켰다. 부착된 생존 세포는 crystal violet으로 염색하여 현미경으로 관찰하였다.

### RT(reverse transcription)-PCR

KB 세포에 아데노 바이러스를 감염시킨 후 48시간과 72시간에 세포들로부터 Trizol®(Life Technologies, Grand Island, NY, USA)을 사용하여 RNA를 분리하였다. 주어진 시간의 세포에 1 ml trizol®을 첨가 후 실온에서 5분간 세포를 용해시켜 RNA를 노출시킨 후 소형원심튜브로 옮겼다. 200 µl의 클로르포름을 첨가하여 교반시키고, 4°C, 13,000 rpm에서 15분간 원심분리시켜 새로운 튜브에 RNA를 포함한 상층액만 취하였다. 0.5 ml 아이소프로판올을 가하고, 실온에서 10분간 방치시킨 후 4°C, 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 침전된 RNA pellet을 얻었다. RNA pellet은 75% 에탄올로 세척하였으며, 상온에 방치하여 말린 후, DEPC를 처리한 3차 증류수에 녹여서 농도를 측정한 후 -70°C에 보관하였다.

분리한 RNA에 대한 cDNA합성은 Promega(Madison, WI, USA)사의 cDNA합성 kit를 사용하였다. 즉 동일량의 총 RNA(2 µg)을 DEPC-treated water에 넣어 총 8 µl를 만들어 65°C에 5분간 배양 후 얼음에 넣고, 5× reaction mixture(50 mM Tris-HCL, pH 8.3, 75 mM KCL, 3 mM MgCl<sub>2</sub>) 4 µl, 0.1 M DTT 2 µl, 500 uM dNTP 2 µl, 100 uM random primer 2 µl, recombinant RNase inhibitor(50 U/ µl) 0.6 µl, 역전사중합효소(M-MLV reverse transcriptase 200 U/µl) 1 µl를 첨가하여 잘 섞어 42°C에서 60분간 반응시켜 cDNA를 합성하고 95°C에서 10분간 반응시켜 합성을 중지하였다. IGF-I과 IGF-II의 발현 분석에 사용된 시발체는 사람의 각 유전자 cDNA의 염기서열에 근거하여 제작하였다. IGF-I: sense 5'-cac aggtg tgg ctc-3', antisense 5'-caa cta ggt ctt ggg-3', IGF-II: sense 5'-cga tgc tgg tgc ttc tca-3', antisense 5'-ggg gtc ttg ggt ggg tag-3'. 증폭시킬 cDNA 2 µl에 10× reaction buffer 5 µl, 250 uM dNTP mixture 5 µl, MgCl<sub>2</sub> 3 µl, 5'와 3' 시발체 각 10 pmol 및 증류수를 가하여 총 50 µl을 사용하였다. 중합효소 연쇄반응 조건은 95°C에서 5분간 변성시킨 후 94°C에서 1분간 변성반응(denaturation), 주어진 annealing 온도에서 1 분간 결합반응(annealing), 72°C에서 1분간 연장반응(extension)을 30회 반복하였다. 증폭된 DNA 중 10 µl를 취해 1.5% agarose gel상에서 전기영동 하였다.

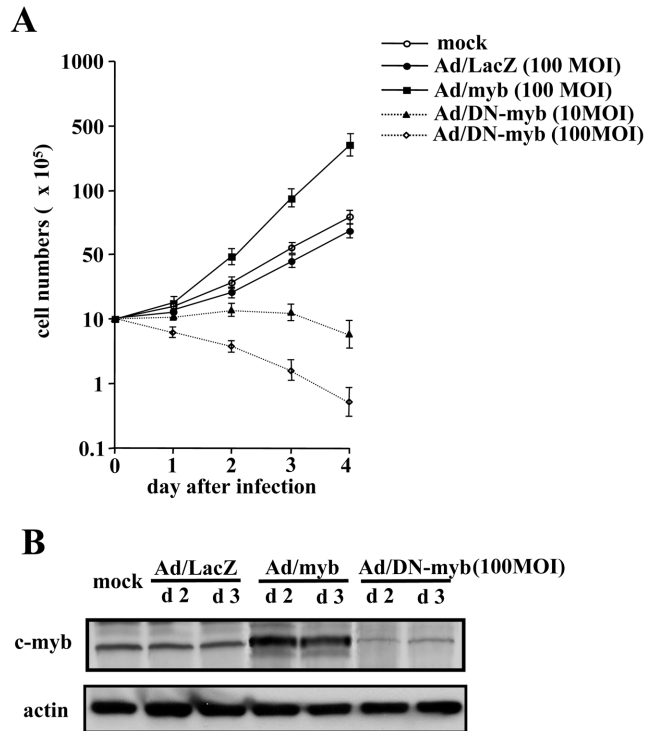
**Western hybridization**

KB 세포에 Ad/myb과 Ad/DN-myb를 감염시키고 48시간과 72시간 후 세포로부터 총 단백질을 분리하였다. 주어진 시간에 도달한 100 mm 배양용기 세포를 2-3회 차가운 PBS로 세척 후 1 ml의 PBS-TDS(PBS, 1% Triton X-100, 0.05% sodium deoxycholate, 0.01% SDS, 0.5 µg/ml leupeptin, 1 mM EDTA, 1 µg/ml pepstatin, 0.2 mM PMSF) 용액을 첨가, 15분간 얼음 위에서 방치 후 12,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였으며, 상층의 총세포단백질을 분리하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin(BSA)을 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 정량 하였다.

위의 방법으로 분리한 20 µg의 총단백질을 7.5% mini gel(Bio-Rad, Hercules, CA, USA) SDS-PAGE(poly acryla mide gel electrophoresis)로 변성 분리하였고, 이를 nitrocellulose membrane(Hybond-C Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)에 60 V로 2시간 동안 전기적으로 이동하였다. Membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TBS-T(TBS, 0.1% Tween 20)용액으로 상온에서 1시간동안 실시하였다. 실험에 사용한 항체로는 anti-c-myc(sc-7874, Santa Cruz, CA, USA), anti-IGF-I receptor(sc-713, Santa Cruz), anti-bcl-2(sc-7382, Santa Cruz), anti-bax(sc-493, Santa Cruz), anti-PARP(sc-1561, Santa Cruz), anti-Phospho-Akt(#9276S, Cell Signaling, Beverly, MA, USA), anti-Phospho-ERK(#4377, Cell Signaling, Beverly, MA, USA)를 사용하였으며, 이들 1차 항체를 1 : 1,000으로 TBS 용액에 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후 TBS로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 horse radish peroxidase(HRP)가 결합된 anti-mouse IgG 혹은 anti-rabbit IgG(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)를 1 : 5,000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응하였다. TBS로 3회 세정 후 ECL 기질(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)에 30-60초간 반응 후 X-Ray 필름에 감광시켰다.

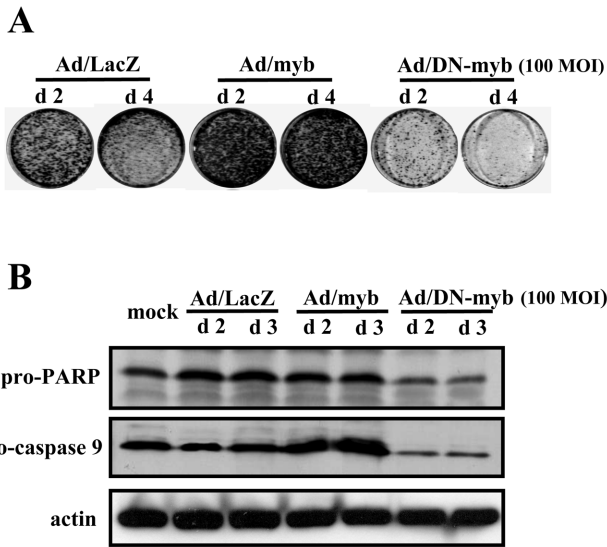
**실험결과**

Ad/myb과 Ad/DN-myb의 감염에 의한 KB 세포의 성장변화를 관찰하였다. Ad/myb 감염 세포는 2일째부터 세포내 c-myc의 높은 발현이 유도되었으며, 감염시키지 않는 정상상태의 세포(mock)와 대조바이러스를 감염시킨 Ad/LacZ은 c-myc의 발현변화가 없었다(Fig. 1A). 반면, Ad/DN-myb 세포에서는 정상세포와 Ad/LacZ 세포에 비교하여 훨씬 낮은 수준으로 c-myc이 발현되었다(Fig. 1A). 이상과 같이 KB 세포에서 c-myc의 과잉발현유도와 정상세포에 비교하여 발현의 감소가 나타나는 조건에서 세



**Fig. 1.** Pattern of cell growth in KB cells infected with Ad/myb and Ad/DN-myb(A). Cells were infected virus with at a does of indicated MOI for 1 hour, and then allowed to grow under standard culture condition for further 4 days. Cell number was determined by direct count after tryphan blue staining. Change of c-myc expression in KB cells infected with Ad/myb and Ad/DN-myb(B). Two and three days after infection, total protein was analyzed by Western hybridization with anti-myc antibody.

포의 성장영향을 관찰하였다. Ad/myb(100 MOI)에 의해서 c-myc의 발현이 유도된 세포는 감염 2일 이후부터 mock 세포와 Ad/LacZ(100 MOI)에 비교하여 2배 이상의 높은 성장이 유도되었다(Fig. 1B). Ad/LacZ은 mock 세포와 비교하여 특별한 성장의 차이가 나타나지 않았으며, 이는 KB 세포가 아데노바이러스 감염에 의하여 특별히 영향을 받지 않는 것을 알 수 있었다(Fig. 1B). 이와는 다르게 Ad/DN-myb 감염세포에서는 c-myc의 발현의 저하가 나타나면서 세포성장이 현저하게 억제되었다(Fig. 1B). 10 MOI의 Ad/DN-myb 감염세포는 성장의 변화가 없었지만, 100 MOI Ad/DN-myb 감염세포는 초기 세포수에 비교하여 오히려 감소하였다(Fig. 1B). c-myc과 DN-myb에 의한 세포성장의 변화를 생존세포만을 선택하여 고정시킨 후 crystal violet으로 염색하여 관찰하였으며, 사진에서처럼 배양 2일과 4일째의 Ad/myb(100 MOI) 세포는 많은 생존세포를 확인할 수 있지만, Ad/DN-myb(100 MOI) 세포는 생존세포가 감소하였음을 보여주었다(Fig. 2A). Ad/DN-myb 세포의 생존세포수의 감소가 apoptosis로 유도되었음을 확인하였다(Fig. 2B). 세포의 apoptosis는 PARP와 caspase-9의 활성을 통하여 확인하였으며, Ad/DN-myb 세포는 pro-PARP와 pro-caspase

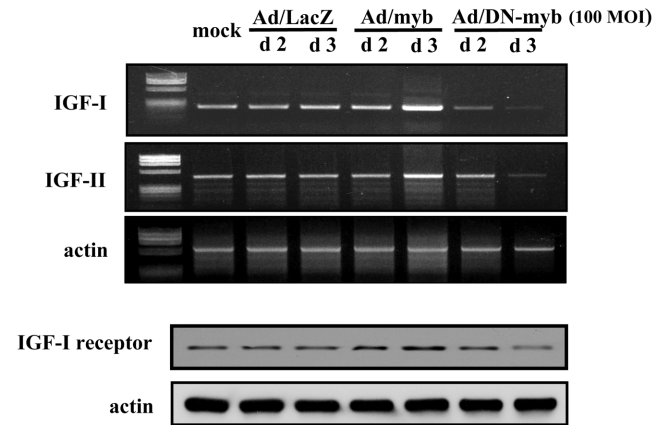


**Fig. 2.** Photograph of cell growth in KB cells infected with Ad/myb and Ad/DN-myb(A). Cells were infected virus with at 100 MOI for 1 hour, and then allowed to grow under standard culture condition for 2 and 4 days. Viable cells were stained by crystal violet. The effect of c-myb and DN-myb expression on PARP and caspase 9 activation. Two and three days after infection, total protein was analyzed by Western hybridization with each of specific antibody.

발현이 감소되어 활성화형의 caspase와 PARP의 증가로 apoptosis가 유도되었다(Fig. 2B).

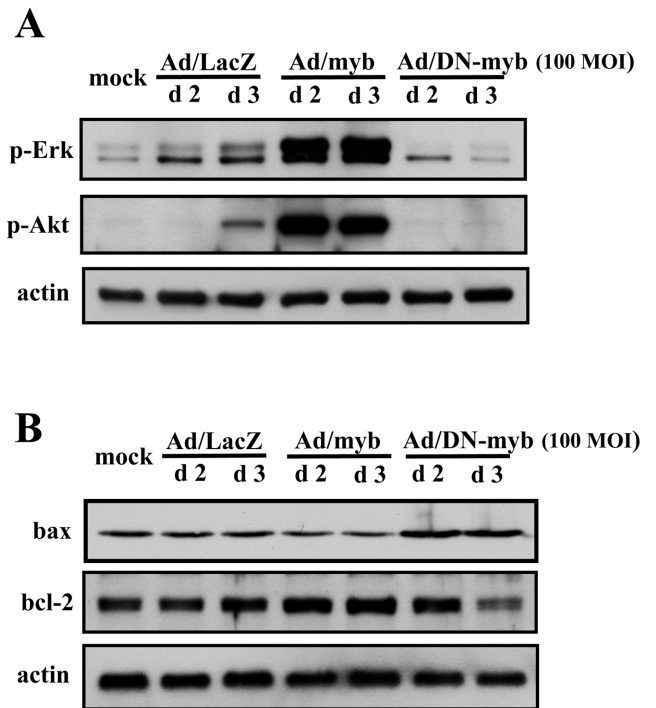
IGFs는 다양한 세포의 성장유도인자로 알려져 있으며, c-myb 발현양이 증가되는 세포에서 IGF-I과 IGF-I 수용체의 발현이 유도되는 것으로 알려져 있다(Reiss 등, 1991). 다음으로 KB세포의 성장과 관련하여 c-myb과 IGFs의 상호 연관성을 검토하였다. Ad/myb(100 MOI)과 Ad/DN-myb(100 MOI)을 감염시키고 2일과 3일째의 세포로부터 IGF-I과 IGF-II mRNA 발현수준을 관찰하였다(Fig. 3). Ad/myb 감염세포에서는 대조세포에 비교하여 배양 3일째에 2배 가까운 수준의 IGF-I과 IGF-II mRNA가 발현되었으며, Ad/DN-myb감염세포에서는 IGF-I과 IGF-II가 2일째에 2배 이상의 감소와 3일째에는 아주 낮은 수준의 mRNA만이 분석되었다(Fig. 3). IGFs의 활성화는 IGF-IR을 통하여 세포에 나타난다. IGFs의 변화로부터 나타난 IGF-IR의 단백질의 발현을 비교하였다. IGF-IR 단백질은 Ad/myb 감염 3일째에 높게 나타났으며, Ad/DN-myb 감염에서는 감염 2일과 3일째에 연속적으로 감소하였다(Fig. 3). 따라서 Ad/myb 감염에 의한 세포내 c-myb 발현의 증가는 IGF-I, IGF-II, IGF-I 수용체의 발현의 증가와 일치를 나타냈으며, 반면 Ad/DN-myb에 의한 세포내 c-myb의 발현의 감소는 이상의 IGFs의 발현의 감소와 동일한 결과를 나타냈다.

IGF-I 수용체의 주요 신호경로는 MAPKs와 Akt/PKB의 활성을 유도하여 세포의 성장과 생존에 관여한다(Datta 등, 1995; Suzuki and Takahashi, 2000). 다음으로 KB



**Fig. 3.** Changes of IGFs expression in KB cells infected with Ad/myb and Ad/DN-myb. Two and three days after infection, total RNA and protein were isolated from transduced KB cells and analyzed IGF-I and IGF-II by RT-PCR and IGF-I receptor by Western hybridization.

세포의 IGFs의 발현유도 혹은 억제에 따른 MAPKs에 속하는 ERK와 Akt/PKB의 활성을 검토하였다. Ad/myb 감염세포는 2일과 3일째에 ERK의 활성화가 높게 유도되었으며, 동시에 Akt/PKB의 활성화가 유도되었다(Fig. 4A). 이와는 다르게 Ad/DN-myb 세포는 ERK와 Akt/PKB의 활성화가 유도되지 않았으며, 대조세포인 Ad/LacZ과 mock 세포에 비교하여 낮은 활성을 보였다(Fig. 4A). 따



**Fig. 4.** The effect of c-myb and DN-myb expression on Erk and Akt/PKB activation(A), and apoptotic molecules, bax and bcl-2(B). Two and three days after infection, total protein was analyzed by Western hybridization with each of specific antibody.

라서 KB 세포에서 ERK와 Akt/PKB의 활성화는 세포내 c-myc의 발현과 연관성이 있었다. 이상의 결과에서 c-myc 발현에 의한 IGFs의 분비증가와 Erk와 Akt/PKB의 활성화는 KB 세포의 성장에 영향을 미치는 것으로 예측되었다. 반면 c-myc의 발현억제는 세포의 apoptosis의 유도로 예측되어지며, 그러므로 이들 세포에서 apoptosis의 제어분자인 bax와 bcl-2의 발현을 검토하였다. KB 세포의 성장이 유도되는 Ad/myb 세포는 약간의 bcl-2의 발현유도와 bax의 발현억제가 나타났지만, apoptosis가 유도되는 Ad/DN-myc 세포는 이와는 반대의 결과가 나타났다(Fig. 4B).

## 고 찰

구강암은 전체적으로 6번째에 해당되는 흔한 암이며, 특히 사망률이 높은 암에 속한다(Saranath D, 2000). 구강암의 발병원인은 흡연이 가장 밀접한 원인이며 여러 단계의 유전적 변이를 거쳐 암이 발생 할 것으로 추측하지만, 아직 단계별 진행에 따른 유전자의 변이는 알려져 있지 않다. 구강암의 치료법으로는 암의 부위와 진행 정도에 따라 다르지만 일반적으로 외과적 수술, 방사선요법, 항암화학 요법이 있다. 이러한 치료에 따른 언어장애나 치아의 상실은 치료법의 선택에 중요한 요인에 해당된다. 구강암을 비롯한 대부분의 암에서 분자생물학적 그리고 면역학적 접근을 중심으로 하는 새로운 치료법은 개발되고 있지만 현재로서는 만족할 수준은 아니다. 그러나 구강암은 치료시 언어와 치아의 보존이 고려되어야 하기 때문에 구강암에 대한 전반적인 분자생물학적인 연구가 요구되는 암이다. 원발암유전자 c-myc은 혈액암을 비롯하여 여러 고형암의 apoptosis를 억제하여 암의 성장과 진행에 영향을 미치는 것으로 파악되고 있다(Sala, 2005). 따라서 구강암에서의 c-myc의 기능을 파악하여 억제시키면 구강암의 치료적 분자로서의 활용 가능성이 충분히 예시된다.

c-myc은 72 kDa의 단백질로 서로 다른 기능을 수행하는 3개의 영역으로 구성되어 있다. 아미노기에는 base specific sequence에 결합하는 DNA 결합 영역이 있고, 다음으로는 기본적인 전사인자와 결합하여 전사를 개시시키는 전사활성 영역(transactivation domain)이 있으며, 카르복실 영역에는 이상의 전사를 조절하는 영역(negative regulation domain)으로 영역으로 존재한다(Sakura 등, 1989). DNA 결합영역은 50여개의 아미노산이 반복적으로 구성되어 있으며, 이를 R1-R2-R3 라고 불린다. 기능에 있어서 R1은 c-myc과 DNA의 상호 결합작용의 안정성에 관여하며, R2-R3는 helix-turn-helix motif를 가지고 있어 c-myc이 여러 유전자 promoter 상에 특이 염기서열을 인지하여 결합에 관여 한다(Howe 등, 1990).

본 연구에서는 c-myc의 기능을 억제시키는 방법으로 dominant negative(DN-myc) 전략을 이용하였으며, 이는 기존의 antisense oligonucleotides와 ribozyme 그리고 최근의 siRNA와는 기본적으로는 다르지만 유전자의 전달에 있어서 바이러스 응용이 가능하며, 전달유전자의 기능 파악에 장점이 있다. DN-myc은 c-myc의 아미노기말단의 DNA 결합영역만을 취했으며(R1-R2-R3), 이를 아데노바이러스에 삽입시켜 유전자의 전달과 발현을 극대화시켰다. 아데노바이러스에 의한 전달유전자인 c-myc의 발현이 KB 세포에서 증가되어 유전자의 발현이 정상적으로 이루어지고 있었으며, 또한 구강암조직에 아데노바이러스를 이용한 유전자전달의 가능성을 확인 할 수 있었다(Fig. 1B). Dominant negative 전략은 DN-myc 단백질이 핵내에서 다량 발현되어 c-myc 단백질이 결합하는 여러 유전자의 promoter와의 결합을 인위적으로 경합시키는 것이다. 즉 DN-myc 단백질은 promoter에 결합되어도 c-myc 단백질이 갖고 있는 전사활성영역이 없기 때문에 전사에 필수적인 RNA polymerase 등과 결합하지 못하므로 전사가 이루어지지 않고 정상 c-myc이 DNA와의 결합을 방해하게 된다. 이러한 예측은 Yi 등(2002)의 결과에서 확인하였으며, c-myc에 의해서 전사되는 bcl-2 단백질의 전사 및 발현을 통하여 확인하였다.

KB 세포에 Ad/myb과 Ad/DN-myc을 감염시켜 세포내 기능을 검토하였다. Ad/myb의 감염으로 c-myc은 배양 2일째부터 높게 발현되었으며(Fig. 1B), c-myc의 과잉발현 유도로 대조세포들의 성장에 비교하여 2배에 달하는 성장이 유도되었다(Fig. 1A). 반면 Ad/DN-myc은 세포내 c-myc의 발현을 억제시켰으며, 또한 세포성장을 억제시켰다(Fig. 1A, B). 특히 DN-myc 세포의 성장억제는 PARP와 caspase 9의 활성을 유도한 전형적인 apoptosis를 알 수 있었다(Fig. 2A, B). 이는 c-myc의 발현 증가와 성장이 일치되며, 반면 c-myc의 발현저하는 성장의 억제와 apoptosis가 유도되어, KB 세포의 성장에 c-myc이 중심적으로 관여하고 있는 것으로 파악되었다. 혈액암 세포에서 c-myc 기능의 억제는 apoptosis가 유도되었으며(Yi 등, 2002; Ratajczak 등, 1992), 고형암이며 구강암세포인 KB 세포에서도 c-myc의 발현 및 기능의 억제가 apoptosis 유도로 나타나는 것을 알 수 있었다.

Reiss 등(1991)은 myb 단백질의 증가에 따라 배양세포에서의 IGF-I과 IGF-IR의 증가를 간접적으로 증명하였지만, 본 연구에서는 KB 세포에 c-myc을 과잉 발현시켜 IGF-I, IGF-II, IGF-IR의 발현의 증가를 확인하였다(Fig. 3). 이는 c-myc이 IGFs의 발현을 직접 조절하는 것으로 생각되며, 특히 DN-myc에 의해서 c-myc의 발현을 억제시키면 이상의 IGFs의 발현이 감소되므로 c-myc의 직접적인 전사기전에 의한 발현으로 해석된다. 지금까지 연구에서는 c-myc에 의한 IGF-I과 IGF-IR의 발현관계만이 언급되었지만, 본 연구의 결과에서는 c-myc이 IGF-II의

발현을 직접 조절하고 있음을 알 수 있었다. 특히 IGF-II는 대부분의 고형암에서 발현이 증가되며, IGF-II가 암세포의 성장을 증가시키는 활성을 갖고 있으므로(Scharf and Braulke, 2003), c-myb에 의한 IGF-II의 발현의 증가는 KB세포에서 c-myb에 의한 암의 진행을 이해하는 새로운 단서로 추측된다. 따라서 KB 세포는 성장과 생존을 지속시키는 방법의 하나로 c-myb의 기능을 통한 IGFs의 발현을 유도하는 것으로 이해되었다.

정상세포를 비롯하여 암세포의 성장과 생존에 관여하는 주요 신호경로는 MAPKs와 Akt/PKB 등이 있다(Rane and Reddy, 2002). 암세포는 성장인자들에 대한 의존도가 낮아도 높은 성장력을 유지하는 특징이 있으며, 이와 관련하여 Akt/PKB의 경로가 주목을 받고 있다(Datta 등, 1995). 특히 IGFs는 Akt/PKB의 활성을 통하여 여러 세포의 성장과 생존을 유도한다(Suzuki and Takahashi, 2000). KB 세포는 Ad/myb 감염으로 c-myb 발현을 유도시킨 결과 전반적으로 IGFs의 발현이 증가하였다(Fig. 3). IGFs의 발현의 증가는 그 활성으로 MAPKs의 하나인 Erk와 Akt/PKB의 활성이 유도되었으며(Fig. 4A), 이는 c-myb에 의한 IGFs의 기능에 의해서 유도되는 것으로 해석된다. 따라서 Ad/myb 세포에서의 성장의 유도과 apoptosis의 억제에 의한 생존력의 증가는 IGFs의 발현의 증가와 이로 인한 ERK와 Akt/PKB의 활성이 작용하고 있음을 확인할 수 있었다. IGFs의 신호체계에 의한 ERK와 Akt/PKB의 활성은 또 다시 c-myb의 발현을 증가시켜 암세포의 지속적인 성장에 영향을 미치는 것으로 이해된다. 이러한 연속적인 반응으로 apoptosis 제어분자인 bax와 bcl-2의 발현에도 영향을 미쳐 c-myb 과발현 세포에서는 bcl-2의 발현이 증가되는 것으로 생각된다(Fig. 4B). 또한 DN-myb의 발현세포에서 apoptosis의 유도와 관련분자인 bax 발현의 증가와 bcl-2 발현의 감소는 DN-myb이 구강암의 치료가능성이 예측되는 유전자로서 생각된다.

지금까지 c-myb이 혈액암의 발생 및 진행에 관여하는 것으로 알려졌지만, 이상의 결과에서 나타나듯 c-myb은 구강암의 발생 및 진행에도 깊숙이 관여하고 있다는 것을 알 수 있었다. 따라서 구강암 치료를 위한 분자적 수준의 구도로서 발암유전자인 c-myb의 전사작용을 억제시키는 것이 효과적으로 예측된다.

## 감사의 글

“이 논문은 2005년 교육인적자원부의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임” (KRF-2005-041-E00381)

## 참 고 문 헌

- Daftary, D. K., Murti, P. R., Bhonsle, R. B., Gupta, P. C., Mehta, F. S. and Pindborg, J. J.: Risk factors and risk markers for oral cancer in high incidence areas of the world. In *Oral Cancer*, vol. 2, edited by Jhonson, N. W., pp 29-63, Cambridge University Press, Cambridge, 1991.
- Datta, K., Franke, T. F., Chan, T. O., Makris, A., Yang, S. I., Kaplan, D. R., Morrison, D. K., Golemis, E. A. and Tsichlis, P. N.: AH/PH domain-mediated interaction between Akt molecules and its potential role in Akt regulation. *Mol. Cell Biol.* **15**:2304-2310, 1995.
- Guerin, M., Sheng, Z. M., Andrieu, N. and Riou, G.: Strong association between c-myb and estrogen-receptor expression in human breast cancer. *Oncogene.* **5**:131-135, 1990.
- Howe, K. M., Reakes, C. F. and Watson, R. J.: Characterization of the sequence-specific interaction of mouse c-myb protein with DNA. *EMBO J.* **9**:161-169, 1990.
- Ibanez, C. E. and Lipsick, J. S.: Trans activation of gene expression by v-myb. *Mol. Cell Biol.* **10**:2285-2293, 1990.
- Introna, M., Luchetti, M., Castellano, M., Arsur, M. and Golay, J.: The myb oncogene family of transcription factors: potent regulators of hematopoietic cell proliferation and differentiation. *Semin. Cancer Biol.* **5**:113-124, 1994.
- Luscher, B. and Eisenman, RN.: New light on Myc and Myb. *Genes Dev.* **4**:2235-2241, 1990.
- Melotti, P., Ku, DH. and Calabretta, B.: Regulation of the expression of the hematopoietic stem cell antigen CD34: role of c-myb. *J. Exp. Med.* **179**:1023-1028, 1994.
- Nishina, Y., Nakagoshi, H., Imamoto, F., Gonda, T. J. and Ishii, S.: Trans-activation by the c-myb proto-oncogene. *Nucleic Acids Res.* **17**:107-117, 1989.
- Rane, S. G. and Reddy E. P.: JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis. *Oncogene.* **21**:3334-3358, 2002.
- Ratajczak, M. Z., Kant, J. A., Luger, S. M., Hijiya, N., Zhang, J., Zon, G. and Gewirtz, A. M.: In vivo treatment of human leukemia in a scid mouse model with c-myb antisense oligodeoxynucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:11823-11827, 1992.
- Reiss, K., Ferber, A., Travali, S., Porcu, P., Phillips, P. D. and Baserga, R.: The protooncogene c-myb increases the expression of insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor 1 receptor messenger RNAs by a transcriptional mechanism. *Cancer Res.* **51**:5997-6000, 1991.
- Sakura, H., Kanei-Ishii, C., Nagase, T., Nakagoshi, H., Gonda, T. J. and Ishii, S.: Delineation of three functional domains of the transcriptional activator encoded by the c-myb protooncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:5758-5762, 1989.
- Sala, A.: B-MYB, a transcription factor implicated in regulating cell cycle, apoptosis and cancer. *Eur. J. Cancer.* **41**:2479-2484, 2005.
- Saranath, D.: Integrated biology and molecular pathology of oral cancer. In *Contemporary issues in oral cancer*, edited by Saranath, D., pp 30-71, Oxford University Press, New Delhi, 2000.

- Scharf, J.G. and Braulke, T.: The role of the IGF axis in hepatocarcinogenesis. *Horm. Metab. Res.* **35**:685-693, 2003.
- Sitzmann, J., Noben-Trauth, K. and Klempnauer, KH.: Expression of mouse c-myb during embryonic development. *Oncogene*. **11**:2273-2279, 1995.
- Suzuki, K. and Takahashi, K.: Anchorage-independent activation of mitogen-activated protein kinase through phosphatidylinositol-3 kinase by insulin-like growth factor I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **272**:111-115, 2000.
- Thompson, MA. and Ramsay, R.G.: Myb: an old oncoprotein with new roles. *Bioessays*. **17**:341-350, 1995.
- Torelli, G., Venturelli, D., Colo, A., Zanni, C., Selleri, L., Moretti, L., Calabretta, B. and Torelli, U.: Expression of c-myb protooncogene and other cell cycle-related genes in normal and neoplastic human colonic mucosa. *Cancer Res.* **47**:5266-5269, 1987.
- Yi, HK., Nam, SY., Kim, JC., Kim, JS., Lee, DY. and Hwang, PH.: Induction of apoptosis in K562 cells by dominant negative c-myb. *Exp. Hematol.* **30**:1139-1146, 2002.