

## 두경부 편평상피세포암주에서 방사선 내성 관련 유전인자의 확인\*

중앙대학교 의과대학 이비인후과학교실,<sup>1</sup> 연세대학교 의과대학 이비인후과학교실,<sup>2</sup>  
임상의학연구소,<sup>3</sup> 병리학교실,<sup>4</sup> 암전이연구소,<sup>5</sup> 중앙내과,<sup>6</sup>  
관동대학교 의과대학 명지병원 이비인후과<sup>7</sup>

이세영<sup>1</sup> · 설정훈<sup>2</sup> · 박행란<sup>3</sup> · 조남훈<sup>3,4</sup> · 최윤표<sup>4</sup>  
라선영<sup>5,6</sup> · 백승재<sup>7</sup> · 황준연<sup>1</sup> · 김세현<sup>2</sup>

= Abstract =

### Identifying Genes Related with Radiation Resistance in Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Lines\*

Sei Young Lee, MD<sup>1</sup>, Jeong Hun Seol, MD<sup>2</sup>, Haeng Ran Park, MS<sup>3</sup>,  
Nam Hoon Cho, MD<sup>3,4</sup>, Yoon Pyo Choi, MS<sup>4</sup>, Sun Young Rha, MD<sup>5,6</sup>,  
Seung Jae Baek, MD<sup>7</sup>, Jun Yeon Hwang, MD<sup>1</sup>, Se-Heon Kim, MD<sup>2</sup>

*Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery,<sup>1</sup> Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, Korea  
Department of Otorhinolaryngology<sup>2</sup> and The Yonsei Medical Research Center<sup>3</sup> and Department of Pathology<sup>4</sup> and  
Division of Genomics and Translational Research, Cancer Metastasis Research Center<sup>5</sup> and  
Department of Internal Medicine,<sup>6</sup> Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea  
Department of Otorhinolaryngology,<sup>7</sup> Myongji Hospital, Kwandong University College of Medicine, Seoul, Korea*

**Background and Objective** : Radiation resistance(RR) is one of main determinants of treatment outcome in oral squamous cell carcinoma(OSCC), but accurate prediction of RR is difficult. We aim to establish RR OSCC cell lines and identify genes related with RR by a measurement of altered gene expression after inducing RR. **Material and Methods** : OSCC cell lines, SCC15, SCC25 and QLL1, were treated with 2Gy radiation per session, and parts of them were alive in finally accumulated dosage of 60Gy through 30 times repetition of radiotherapy for inducing RR cell lines. We compared results of cDNA array and proteomics in non-irradiated cell lines and RR cell lines to detect changes of gene expression. Western blot was used for the validation of results. **Results** : cDNA array revealed 265 commonly up-regulated genes and 268 commonly down-regulated genes in 3 RR cell lines comparing their non-irradiated counterpart. Among them, 30 cancer related genes were obtained. Proteomics showed 51 commonly altered protein expressions in 3 RR cell lines and 18 cancer related proteins were obtained. Among the detected genes, we found NM23-H1 and PA2G4 were over-expressed in both cDNA array and proteomics. Western blot showed increased expression of NME1 in RR cell lines but not in PA2G4. **Conclusion**: We concluded that NM23-H1 may be a candidate of RR related gene and over-expression of NM23-H1 could be a biomarker to predict RR in OSCC.

**KEY WORDS** : Squamous cell carcinoma · Radioresistance · cDNA arrays · Proteomics.

Received : July 28, 2011 / Revised : October 11, 2011 / Accepted : October 11, 2011

\*연세대학교 의과대학 2009년도 교수연구비(II)에 의하여 이루어 졌음(과제번호사사 6-2009-0086).

교신저자 : 김세현, 120-752 서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교 의과대학 이비인후과학교실

전화 : (02) 2228-3622 · 전송 : (02) 393-0580 · E-mail : shkimmd@yuhs.ac

구강암은 모든 악성 종양 중 2~3%를 차지한다.<sup>1)</sup> 구강편평 세포암 치료법에는 보통 외과적 수술, 방사선 치료, 화학 약물 적 치료 또는 이들의 병합 치료법이 있다. 지난 2~30년간 새로운 외과적 수술법의 발전, 최신의 방사선 기술, 수많은 믿을 만한 화학 약물 치료법의 소개에도 불구하고 구강암 환자의 생존율은 크게 나아지지 않았다. 그러한 이유에는 TNM 단계에 따라 같은 크기의 종양은 대부분 같은 치료법을 시행하고, 이는 각각의 종양의 생물학적인 특성을 고려하지 않았기 때문이다. 따라서 각각의 치료법에 맞는 새로운 믿을만한 개별적인 예측 표지 인자의 발굴이 필요하다. 그러나 외과적 수술법이 규격화 되어 있지 않고, 화학 약물 요법은 수많은 약제의 복잡한 기전으로 인해 치료 결과를 예측할 수 있는 새로운 예측 지표의 발굴은 어려운 점이 있다.

구강암의 치료법 중 방사선 치료법은 그 사용법이 표준화 되어 있어, 같은 크기의 종양을 가진 환자는 보통 같은 방법으로 방사선 치료를 받지만 환자의 치료 결과는 다양하게 나타난다. 대부분의 환자들은 방사선 치료에 반응을 보이지만, 특정 환자들은 방사선 치료에 전혀 반응하지 않아 추가적인 외과적 수술이 필요하며 수술 후 생존률 또한 좋지 않다. 따라서, 방사선 치료에 대한 예측 방법이 있다면, 방사선 저항을 나타낼 것으로 예측되는 환자의 치료 방법을 변경하여 그 효과를 극대화 할 수 있을 것이다. 그러나 방사선 저항의 구체적인 기전은 잘 알려져 있지 않고, 방사선 저항에 대한 정확한 예측 방법도 없는 실정이다.

지난 10년간 방사선 저항과 종양 내 특이적인 유전자 발현 혹은 유전자 변이와의 관계가 보고되어 왔고, raf-1, bcl-2 그리고 surviving 등의 유전자가 방사선 저항과 관련되어 있을 것이라 알려져 있다.<sup>2-5)</sup> 그러나 대부분의 연구는 몇몇 유전자에 국한되어 연구되어 왔고, 방사선 저항의 기전 전체를 이해하는데 있어서 포괄적인 유전자 발현의 분석이 필요하다. 수천개의 유전자 발현 변화를 동시에 탐지 가능한 마이크로어레이 기법은 복잡한 방사선 저항의 기전을 연구하기에 적합하고, 몇몇 연구는 두경부암 세포주를 이용해 방사선 저항 관련 유전인자를 마이크로어레이 기법으로 탐지함을 보고하였다.<sup>6-9)</sup> 이들 연구는 방사선 저항성을 획득한 암세포주에서 유전적인 발현 변화를 보았지만, 대부분의 연구는 임상적인 치료 환경과는 동떨어진 실험 설정으로 방사선 저항성을 유도하였다.

본 연구에서는 실제 임상 환경과 가까운 실험 조건으로 방사선 저항 구강암세포주를 만들었고, 마이크로어레이 기법과 단백질체학을 이용하여 방사선 저항성을 나타내는 유전자의 변화를 확인하였다.

### 1. 세포주 배양

QLL1(립프절로 전이된 구강암 세포에서 유래) 세포주는 Dr J. Shah(memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY, USA)로부터 공여받았다. SCC15와 SCC25 세포주는 (혀 편평세포암으로부터 유래)는 ATCC (Rockville, MA, USA)에서 구입하였다. 세포주들은 10% FBS와 2mM L-glutamine, penicillin(50ug/mL) 그리고 streptomycin(50ug/mL)가 들어 있는 MEM에서 배양하였다.

### 2. 방사선 저항 세포주의 수립

세포들은 T75 플라스크에 80%정도 자랄때까지 배양한 후 2Gy의 방사선을 실온에서 조사한다. 방사선 조사 후 다시 80% 정도 자라면 2Gy 방사선을 지속적으로 조사하여 총 조사량이 60Gy가 될 때 까지 시행한다.

### 3. Lactate dehydrogenase(LDH) assay

살아남은 세포에서 분비되는 LDH를 측정하여 방사선 저항 세포주를 구별하였다. CytoTox96 nonradioactive assay (Promega, Madison, WI)를 이용하여 측정하였고, 490nm의 흡수 파장으로 정량하였다. 방사선 저항을 나타내는 세포주와 방사선을 주지 않은 세포주 사이의 LDH 활성도를 측정하기 위해 각 세포주에 5Gy의 방사선을 조사하여 세포 독성을 측정하였다. 두 군사이의 세포 독성도 차이를 확인하기 위해 SPSS 11.5 statistical software(SPSS Inc, Chicago, IL, USA)를 사용하여 one-way ANOVA를 수행하였다. p<0.05의 값이 유의하다.

### 4. cDNA array

방사선 저항을 나타내는 구강암세포주와 대조군의 세포주 사이의 유전자 발현 변화를 보기 위해 cDNA array를 시행하였다. mRNA 증폭은 T7 linear 증폭을 변형한 CMRC(Cancer Metastasis Research Center, Seoul, Korea) 방법을 사용하였다.<sup>10)</sup> 증폭된 mRNA는 T7 MEGAscript kit(Ambion, Austin, TX)를 이용하여 cDNA를 시험관 내에서 합성하였다. 세포주에서 추출된 total RNA의 양과 질은 ND-1000 spectrophotometer(NanoDrop Technologies, DE)을 이용하여 측정하였고, 아가로스 젤 전기영동으로 확인하였다. 방사선 저항 세포주의 RNA 증폭은 Cy5-labeled 프라이머로 PCR되었고, 대조군의 RNA는 Cy3-labeled 프라이머로 증폭되어, 17,104개의 알려진 유전자가 섞여진 human microarray(CMRC-GT, Seoul, Korea) 위에서 서로 교잡되었다. 교잡과 세척 과정은 CMRC 방법에 따라 진행되었다.<sup>11)</sup> 마이크로 어레이의 재현성을 확인하기 위해 3회의 실험 과정을 수행하였다.

## 5. 프로테오믹스

### 1) 단백질 시료 준비

3개의 방사선 저항 구강암 세포주와 대조군의 세포 펠릿을 차가운 PBS로 2회 세척한 후 7M urea, 2M Thiourea containing 4%(w/v) 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate(CHAPS), 1%(w/v) dithiothreitol(DTT) 그리고 2%(v/v) pharmalyte, 1mM benzamidine의 용해 용액에서 Sonoplus(Bandelin electronic, Germany)를 이용하여 10초 동안 분쇄한다. 단백질 정량은 Bradford assay로 정량화 하였다.

### 2) 2D PAGE 와 이미지 분석

IPG dry strip은 7M urea, 2M thiourea containing 2% 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate(CHAPS), 1% dithiothreitol(DTT), 1% pharmalyte에서 12~16시간 평형시켰다. SDS-PAGE는 Hoefer DALT 2D system(Amersham Biosciences)을 이용하여 수행하였다. 2D 젤은 1,700Vh에서 수행된 후 silver stain되었고, 염색된 젤은 이미지 파일로 변환되어 PDQuest(version 7.0, BioRad) 프로그램으로 정량화 되었다.

### 3) 젤 상의 단백질의 효소적 분해

젤에 있는 단백질들은 Shevchenko et al<sup>12)</sup> 등에 의해 시행된 방법으로 효소적 분해를 거친후 트립신에 의해 변형되었다.

### 4) MALDI-TOF 분석과 자료 수집

Ettan MALDI-TOF(Amersham Biosciences)와 Rockefeller University([http://129.85.19.192/profound\\_bin/Web-ProFound.exe](http://129.85.19.192/profound_bin/Web-ProFound.exe))에 의해 개발된 ProFound 프로그램으로 펩타이드 질량을 분석하여 단백질의 동정을 수행하였다.

### 5) SPITC 유도 및 질량 분석법

시약 용액은 10mg/mL의 농도로 염용액이나 20mM NaHCO<sub>3</sub>(pH 9.5) 용액에 녹여서 준비되었다. 술폰화반응은 0.5L의 tryptic digest 용액과 8.5L의 시약 용액을 섞어서 반응시켰다. 55°C에서 5~30분간 반응시킨 후 1L의 5% trifluoroacetic acid(TFA)를 첨가하므로써 반응을 중지시켰다. 검체는 micro-

pipette tip(C18 ZipTip ; Millipore, Bedford, MA, USA)에 옮겨진 후 0.1% TFA 로 세척하고, 50% acetonitrile/0.1% TFA 로 세척분리하였다.

모든 MS와 PSD spectra는 Ettan MALDI-TOF(Amersham Biosciences) mass spectrometer의 337-nm의 laser로 측정되었다.

### 6) CAF-MALDI 자료를 이용한 단백질 동정

단백질 동정은 Ettan MALDI-ToF software의 Sonar 혹은 PepFrag로 분석되었다. 아미노산 서열을 입력하면 ProteinInfo([www.proteometrics.com](http://www.proteometrics.com))나 ExPASy Molecular Biology Server([www.expasy.ch](http://www.expasy.ch))를 이용하여 homology search 통해 동정하게 된다.

### 7) Western blot 분석

구강암세포주에서 추출된 단백질은 10ug/20uL의 양이 polyacrylamide 젤 전기영동에서 분리됐다. 분리된 단백질은 nitrocellulose membrane으로 옮겨졌고, 1% skim milk가 들어간 1X PBS-T로 non-specific 단백질을 상온에서 2시간동안 blocking 시킨 후 1X PBS-T로 3회 세척하였다. 1 : 500으로 희석된 1차 항체를 4°C에서 O/N 반응시킨 후 1X PBS-T로 3회 세척하였다. 그 후 1 : 500으로 희석된 2차 항체를 상온에서 1시간 반응시킨 후 1X PBS-T로 3회 세척하였다. chemiluminescent detection 용액으로 발색을 확인하였다. 동등한 단백질량이 젤에 옮겨졌는지 확인하기 위해 GAPDH(goat, polyclonal ; Santa Cruz Biotechnology)를 사용하였다. 각 단백질들의 발현양을 확인하기 위해 TINA 2.0 software(Raytest Isotopenmessgerate, Straubenhardt, Germany)를 사용하였다.

## 결 과

### 1. LDH assay

LDH assay를 통해 3가지 구강편평상피세포암주가 방사선 저항을 획득하였음을 확인하였다. 방사선 저항 세포주와 대조군 세포주에 5Gy의 방사선을 조사한 후 세포독성을 확인한 결과, 대조군에서 확연히 세포 독성이 높게 나타났다(Fig. 1).

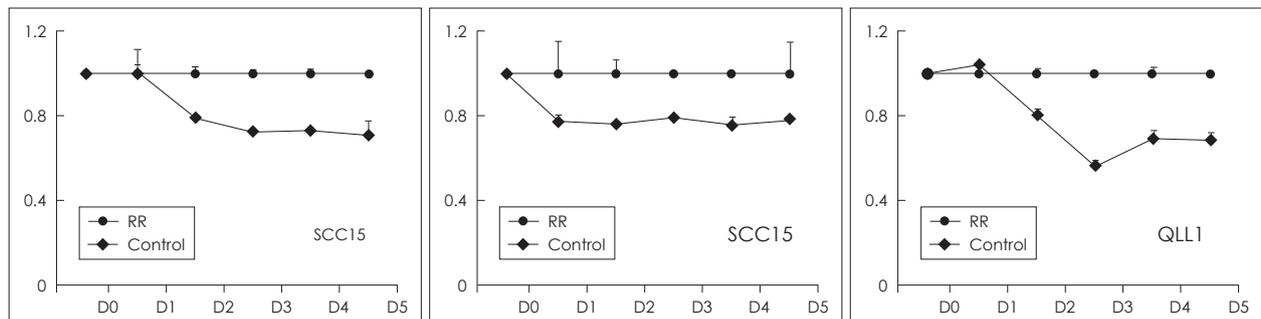


Fig. 1. LDH assay for confirming RR in irradiated cancer cell lines. After delivering 5G radiation to irradiated(RR) and non-irradiated cancer cell lines(control), cytotoxic effect is more severe in control group.

## 2. cDNA 마이크로 어레이

17,101개의 유전자 중에서 14,456개의 유전자 반응을 확인하였다. Hierarchical clustering 분석은 Cluster software를 사용하였고, clustering algorithm은 complete linkage와 Pearson correlation이고 결과물인 dendrogram은 TreeView software (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>)를 통해 시각화되었다(Fig. 2).

통계 프로그램인 Significance Analysis of Microarray(SAM ; <http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/>)을 이용하여 선택된 유전자들의 유효화를 검증하였다. QLL1 세포주는 방사선 저항 세포에서 728개 유전자가 과발현되었고, 745개 유전자가 과감소되었다. SCC15 세포주는 방사선 저항 세포에서 2,185개 유전자가 과발현되었고, 1,855개 유전자가 과감소되었다. SCC25 세포주는 방사선 저항 세포에서 629개 유전자가 과발현되었고, 859개 유전자가 과감소되었다. 3가지 세포주 사이에서 256

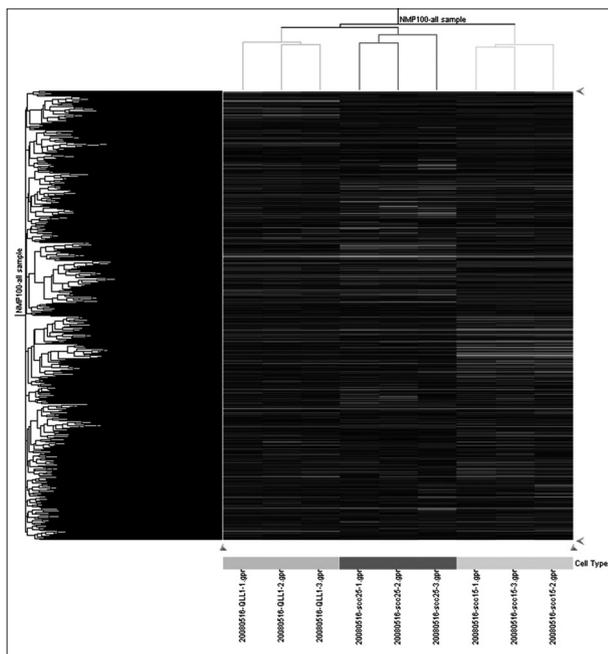


Fig. 2. Hierarchical clustering of cDNA array is shown.

개의 유전자가 공통적으로 과발현되었고, 268개의 유전자가 과감소되었다(Fig. 3).

Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery(DAVID ; <http://apps1.niaid.nih.gov/david>)과 Stanford Online Universal Resource for Clones and Expressed sequence tags(SOURCE ; <http://source.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch>)를 이용하여 선택된 유전자들의 특성을 파악하였다. 방사선 저항 세포주에서 변화된 533개의 유전자 중에서 30개의 암 관련 유전자를 선별하였다(Table 1).

## 3. 프로테오믹스

2-DE와 이미지 분석 결과 1,500개의 spot이 3개의 방사선 저항 세포주에서 획득되었고, 그 중 발현 변화를 보인 449개의 단백질체가 확인되었다. 그 중, 57개의 단백질체는 통계적으로 유의한 발현 변화를 보였다( $p < 0.05$ )(Fig. 4). 단백질체 분석 결과 57개 중 45개의 단백질체가 과발현되었고, 6개의 단백질체가 과감소 되었으며, 18개의 암 관련 단백질체가 확인되었다(Table 2). 프로테오믹스로 얻어진 51개의 단백질체와 cDNA 마이크로 어레이로 얻어진 533개의 유전자 사이에서 공통적으로 과발현되는 유전자(단백체)는 Nm23-H1과 PA2G4로 확인되었다.

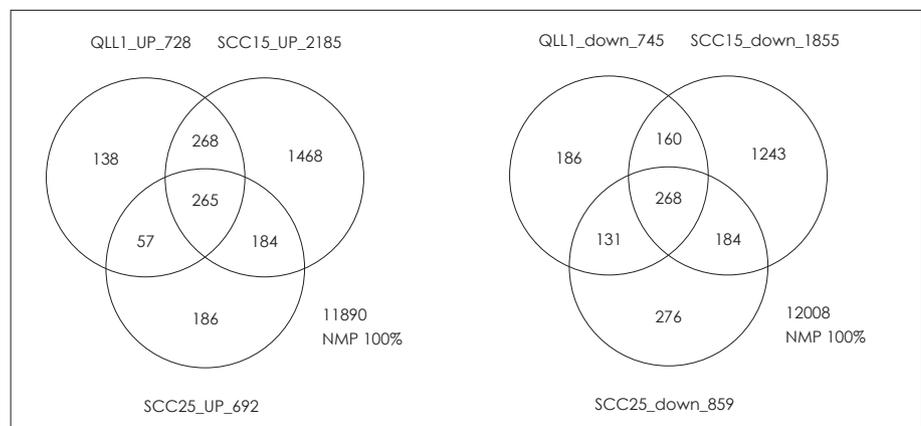
## 4. Western blot

cDNA 마이크로 어레이와 프로테오믹스 결과에서 과발현되었던 Nm23-H1과 PA2G4의 유효성 검증을 위해 웨스턴 블롯팅을 수행 한 결과, SCC15와 SCC25에서 Nm23-H1의 과발현이 확인되었지만 QLL1에서는 별다른 차이점이 없었다(Fig. 5).

## 고 찰

방사선 치료는 구강암의 주요 치료 방법으로 구강암 환자의 대부분이 초치료 혹은 보조 치료법으로 선택하고, 구강암 환자의 치료 결과와 생존율을 가늠하는 방사선 저항은 중요한 요소가 된다. 따라서, 방사선 치료를 하기 전에 방사선 저항을

Fig. 3. Altered gene expression after acquiring RR identified by cDNA array. There were 265 commonly up-regulated genes and 268 commonly down-regulated genes in all 3 cancer cell lines.



**Table 1.** 30 cancer related genes obtained from 533 genes showing altered expression acquiring RR in all 3 cancer cell lines by cDNA array

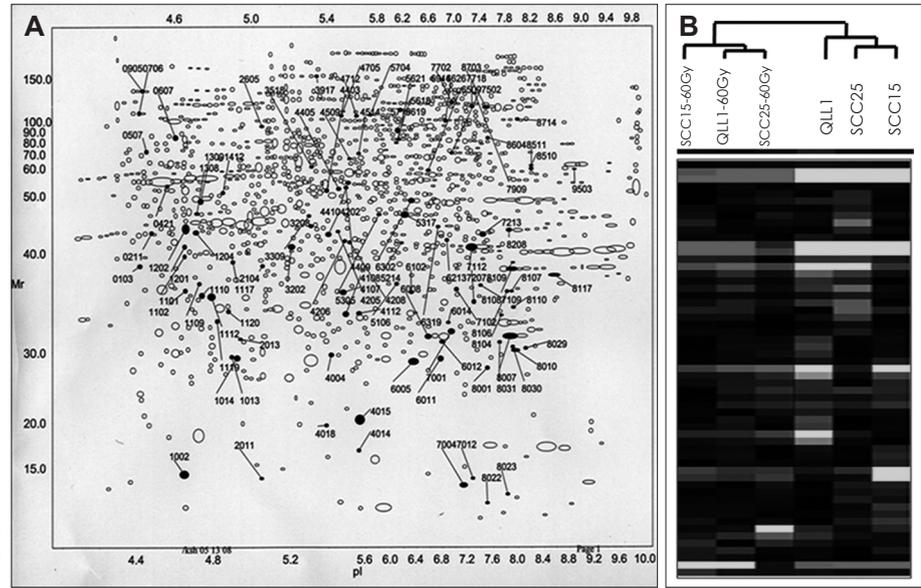
ID	Gene name	Description	Fold change
Proliferation			
AA677403	CGA	Glycoprotein hormones, alpha polypeptide	3.1
W86182	PNN	Pinin, desmosome associated protein	2.54
AW008966	TCEB2	Transcription elongation factor B(SIII), polypeptide 2(18kDa, elongin B)	2.48
AA488332	PA2G4	Proliferation-associated 2G4, 38kDa	2.36
AA446246	NRAS	Neuroblastoma RAS viral(v-ras) oncogene homolog	2.2
H68885	PHLDA2	Pleckstrin homology-like domain, family A, member 2	2.1
AA464856	ID4	Inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein	-2.283
Migration			
AA410383	CXCL13	Chemokine(C-X-C motif) ligand 13(B-cell chemoattractant)	2.67
AA434159	GIPC1	GIPC PDZ domain containing family, member 1	2.41
AI936909	MAPK12	Mitogen-activated protein kinase 12	2.02
R39862	ALCAM	Activated leukocyte cell adhesion molecule	-2.336
DNA repair			
AA620446	RECQL4	RecQ protein-like 4	2.92
AA991871	FOXA1	forkhead box A1	2.87
N93924	RFC4	Replication factor C(activator 1) 4, 37kDa	2.78
AA669314	ATP5D	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit	2.62
AA933835	ENTPD1	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	2.59
H90415	BRCA1	Breast cancer 1, early onset	2.34
AAO85436	NM23-H1	Non-metastatic cells 1, protein(NM23A) expressed in	2.09
Cell cycle			
AA478066	PKMYT1	Protein kinase, membrane associated tyrosine/threonine 1	2.58
AA922727	FGF4	Fibroblast growth factor 4	2.36
N54551	PPP5C	Protein phosphatase 5, catalytic subunit	2.12
AA486280	TIMP2	TIMP metalloproteinase inhibitor 2	2.11
AI361153	SRF	Serum response factor	2.09
AI355949	CALM3	Calmodulin 3(phosphorylase kinase, delta)	2.07
Cell death			
AA931820	BCL2L1	BCL2-like 1	2.87
AA417746	DMTF1	Cyclin D binding myb-like transcription factor 1	-2.352
R68555	PDCD10	Programmed cell death 10	-2.255
AA482119	ID3	Inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein	-2.185
AA134814	TANK	TRAF family member-associated NFKB activator	-2.176
AA411814	PSEN1	Presenilin 1(Alzheimer disease 3)	-2.142

예측할 수 있는 예측 지표가 있다면 구강암 환자의 치료 결과는 상당히 영향을 받을 것이다. 그러나 방사선 저항의 메커니즘은 다른 분자적 메커니즘과 다름없이 극도로 복잡하고, 분자적 수준에서의 메커니즘에 대해 알려진 것이 거의 없는 실정이다.

Ras 관련 신호 전달로써, Riva 등은 RAF-1 유전자의 과발현은 두경부암에서 방사선 저항과 관련 있다고 보고하였고, Gupta 등은 Akt 인산화에 의한 PI3K 활성화는 두경부암에서 방사선 치료에 대한 반응을 예측할 수 있는 지표가 될 수 있을 것이라고 보고하였다.<sup>13-14)</sup> 저산소증은 방사선 저항과 밀접하게 연관되어 있고, Koukourakis 등은 HIF 유전자와 carbonic anhydrase 9 유전자의 발현은 국부적으로 진행된 두경부

암에서 화학 방사선 반응과 관련이 있다고 보고하였다.<sup>15)</sup> 이러한 보고들은 방사선 저항의 기전을 이해하는데 도움을 줄 것이지만, 방사선 저항을 예측하는데 적용가능한 실험 방법이 아니어서 제한적인 정보만을 주었다. 따라서 구강암을 포함하는 두경부평세포암종에서 복잡한 방사선 저항관련 유전자 발현 윤곽을 연구하는데 있어 microarray 기술이 필요하다.

Microarray기술을 이용하여 두경부암에서 방사선 저항 관련 유전자를 규명하는 보고가 몇몇 있다. Fukuda 등은 4개의 방사선 저항 식도암세포주에서 19개의 과발현 유전자 및 28개의 과감소 유전자를 확인하였고, 이러한 유전자들은 세포괴사, 염증 반응, DNA 대사, 세포 성장, 세포 부착 및 세포 주기 기능에 관련되어 있었다.<sup>6)</sup> Higo 등은 두경부암세포주에서 7개



**Fig. 4.** Results of proteomics comparing RR cancer cell lines and non-irradiated cancer cell lines. A : 449 spots showing altered expression after acquiring RR. B : Hierarchical clustering of proteomics.

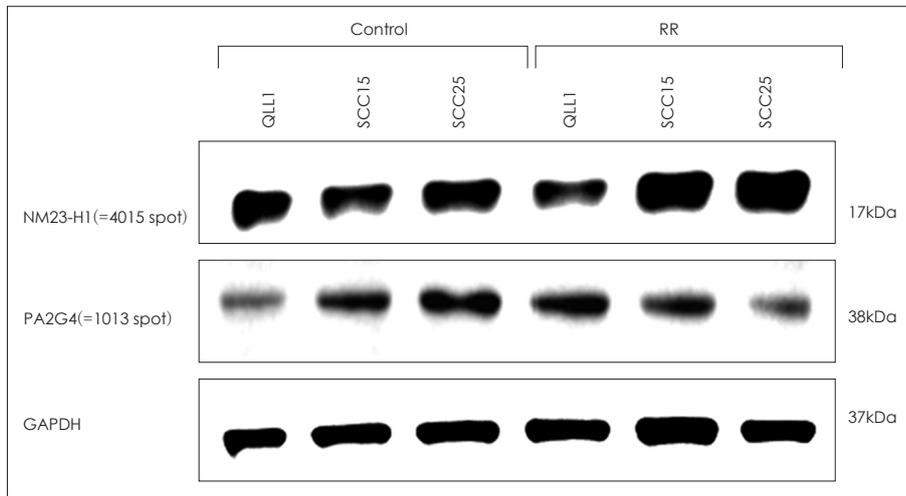
**Table 2.** 18 cancer related proteins obtained from 51 proteins showing altered expression acquiring RR in all 3 cancer cell lines by proteomics

Spot	Protein name	%	pI	kDa	Fold
507	Ubiquitin 1 isoform 1	22	5	62.5	1.48
905	Importin subunit beta-3(Karyopherin beta-3)(Ran-binding protein 5)(RanBP5)	19	4.8	125.1	3.61
1014	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K isoform 1	41	5.3	22.5	1.73
1110	EF-hand domain family, member D2	25	5.2	26.79	1.94
1309	Proteasome 26S ATPase subunit 4 isoform 1	44	5.1	47.46	1.71
1412	PSMC3	35	5.4	45.52	1.76
2013	Glutathione transferase M3	35	5.4	27.13	-3.23
2605	Oxidized protein hydrolase	20	5.3	82.20	-1.43
4015	Non-metastatic cells 1, protein(NM23A) expressed in isoform a	42	5.4	19.86	2.26
4107	Proteasome activator subunit 3 isoform 1	43	5.7	39.6	1.70
4108	Proteasome activator subunit 1 isoform 1	34	5.8	28.88	1.61
4403	Eukaryotic translation initiation factor 2 beta	23	5.6	38.71	10.58
5305	Hepatocyte growth factor receptor precursor(HGF receptor)(Scatter factor receptor) (Met proto-oncogene tyrosine Kinase)(c-Met)	8	7.1	157.85	2.49
6008	Structure of Recombinant Human Triosephosphate Isomerase At 2.8 Angstroms Resolution	48	6.5	26.81	3.42
6302	ErbB3 binding protein EBP1	36	7.2	38.33	2.65
7702	Minichromosome maintenance complex component 4	22	6.3	97.11	2.35
8007	Chain A, Crystal Structure of Recombinant Human Triosephosphate Isomerase At 2.8 Angstroms Resolution. Triosephosphate Isomerase Related Human Genetic Disorders And Comparison With The Trypanosomal Enzyme	63	6.5	26.81	1.76
8109	Casein kinase 1, alpha 1-like	19	9.6	39.28	5.07

의 방사선 저항 관련 유전자를 확인하였고, 2개의 방사선 민감 유전자를 방사선 민감 세포주에서 확인하였다. 그 중 Tcp20 유전자는 방사선량에 따라 발현양의 증가를 보였다.<sup>7)</sup> Ishigami 등은 구강암세포주에 방사선을 조사한 후 과발현된 167개의 유전자를 Ingenuity Pathway Analysis 프로그램을 통해 확인하였다. 또한 167개의 유전자 중 40개의 유전자가 3개의 유의한 유전적인 네트워크를 구성하였다.<sup>8)</sup> Chang 등은 gp96과 GDF15를 포함하는 7개의 유전자가 방사선 저항 코인두암세

포주에서 과발현됨을 보고하였고, gp96과 GDF15에 대한 si-RNA를 transfection 시킨 세포에서 방사선 민감성이 증가함을 확인하였다.<sup>9)</sup>

이러한 보고들은 microarray 방법이 방사선 저항 관련 유전자를 확인하는데 유용하다는 것을 보여주지만, 대부분의 연구는 단점을 가지고 있다. 이상적인 연구를 위해서는, 암세포주에 실제 임상 환경과 최대한 비슷하게 방사선을 조사하여 방사선 저항 암세포주를 만들어야 한다. 대부분의 두경부암



**Fig. 5.** Western blot of NM23-H1 and PA2G4 in RR cell line and non-irradiated cell line.

환자들은 매회 2Gy 씩 총 50~70Gy의 방사선량을 조사 받기 때문에 방사선 저항 암세포주를 유발하기 위해서는 이와 비슷하게 해야된다. 그리고 방사선 저항 암세포주가 방사선 저항성을 획득했음을 실험적으로 반드시 확인해야 한다. 방사선 저항 암세포주의 대조군으로는 방사선을 주지 않은 모세포주를 사용해야 한다. 마지막으로, microarray 결과의 유전자 발현 변화 정도는 반드시 단백질 수준에서 다시 확인을 해야 한다. 따라서, 본 연구실에서는 방사선 저항 세포주의 배양을 위해 지속적인 방사선 조사를 하여 그 성질을 잃어버리지 않게 하였고, LDH assay로 방사선 저항성 획득을 확인하였으며, cDNA array 로 확인된 방사선 저항 관련 유전자들을 프로테오믹스 방법과 웨스턴 블롯팅으로 검증하였다.

본 연구실의 마이크로 어레이 결과, 방사선 내성 세포주에서 265개의 과발현된 유전자와 268개의 과감소된 유전자를 얻었다. 그 중에 30여개의 암 관련 유전자들이 있었고, proliferation, migration, DNA repair, cell cycle의 기능을 나타내는 유전자는 과발현 되었고, cell death 관련 유전자는 과감소되었다. 이는 암세포가 어떻게 방사선 내성을 획득하는지를 보여주고 있는 것이다. 프로테오믹스 결과, 18개의 암 관련 유전자를 얻었고 PA2G4와 Nm23-H1이 마이크로 어레이 결과에 상응하였다. PA2G4는 proliferation과 연관되어 있고 Nm23-H1은 DNA repair 기능과 연관되어 있다. 웨스턴 블롯팅으로 단백질 발현 정도를 확인한 결과, PA2G4는 과발현이 확인되지 않았지만, Nm23-H1은 QLL1 방사선 내성 세포주를 제외한 암세포에서 과발현이 확인되었다. 따라서, Nm23-H1이 마이크로 어레이, 프로테오믹스 및 웨스턴 블롯팅으로 확인된 방사선 예측 지표가 될 수 있을 것이다.

Nm23-H1은 다양한 암 종에서 전이 억제 인자로 알려져 있으나, 두경부암종에서의 역할은 다양하게 나타나고 있다.<sup>16)</sup> Pavelic 등은 두경부암 편평세포암에서의 Nm23-H1의 과발현은 advanced T stage와 안 좋은 예후와 연관되어 있다고 보고하였다.<sup>17)</sup> Wang 등은 식도 편평세포암에서 Nm-H1의 발현은 생

존율과 관계없이 advanced T 및 N stage와 연관되어 있다고 보고하였다.<sup>18)</sup> 반면에, 또다른 Wang 등은 Nm23-H1의 과감소는 자궁 경부 림프절 전이와 연관되어 있고 종양 전이 억제와 연관되어 있을 것이라고 보고하였다.<sup>19)</sup> Liu 등은 Nm23-H1의 과감소는 비인강악성종양에서 두개내로의 전이와 연관되어 있다고 보고하였다.<sup>20)</sup> 따라서, 두경부암에서의 Nm23-H1의 명확한 역할은 분분하다.

방사선 내성에 있어서 Nm23-H1의 역할은 두가지 될 수 있겠다. 첫째는 DNA repair 기능이다. 기본적으로 Nm23-H1은 외부의 자극으로부터 유전적인 안정성 유지의 역할을 하는데, 만약 암세포에서 방사선 조사에 의한 DNA 손상 복구의 역할을 한다면 암세포는 방사선 내성을 획득할 수 있는 것이다. 다른 메커니즘은 AURKA 유전자와 연관되어 있다. AURKA의 과발현은 후두편평세포암의 방사선 내성과 Akt1 수반 활성 cell migration과 관련되어 있다.<sup>21)</sup> cDNA 마이크로 어레이 데이터로부터 얻은 533개의 유전자와 AURKA 유전자를 Ingenuity Pathway Analysis 프로그램에 적용하여 분석하였고, 그 결과 Nm23-H1과 AURKA 사이에 protein-protein binding이 있음을 확인하였다.<sup>22)</sup> 방사선이 조사된 구강암편평세포에서 Nm23-H1이 과발현되므로써 방사선 내성을 야기할 것이라 생각된다.

Nm23-H1의 메커니즘을 규명하기 위한 추가적인 연구가 필요하나, Nm23-H1은 방사선 내성 관련 유전자일 것이고, 구강암편평세포에서 Nm23-H1의 과발현은 방사선 내성을 예측할 수 있는 지표가 될 수 있을 것이다.

**중심 단어 :** 두경부편평세포암 · 방사선 저항성 · cDNA array · 프로테오믹스.

## References

- 1) Silverman S Jr. *Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. The outcomes, the trends, the challenge. J Am*

- Dent Assoc. 132(Suppl):7S, 2001.*
- 2) Sklar MD. *The ras oncogene increases the intrinsic resistance of NIH 3T3 cells to ionizing radiation. Science. 1998;239:645-647.*
  - 3) Kasid U, Pfeifer A, Weichselbaum RR, Dritschilo A, Mark GE. *The raf oncogene is associated with a radiation-resistant human laryngeal cancer. Science. 1987;237:1039-1041.*
  - 4) Lee JU, Hosotani R, Wada M, Doi R, Kosiba T, Fujimoto K, et al. *Role of bcl-2 family proteins(Bax, Bcl-2, Bcl-X) on cellular susceptibility to radiation in pancreatic cancer cell. Eur J Cancer. 1999;35:1374-1380.*
  - 5) Asanuma K, Moriai R, Yajima T, Yagihashi A, Yamada M, Kobayashi D, et al. *Survivin as a radioresistant factor in pancreatic cancer. Jpn J Cancer Res. 2000;91:1204-1209.*
  - 6) Fukuda K, Sakakura C, Miyagawa K, Kuriu Y, Kin S, Nakase Y, et al. *Differential gene expression profiles of radioresistant oesophageal cancer cell lines established by continuous fractionated irradiation. Br J Cancer. 2004;91:1543-1550.*
  - 7) Higo M, Uzawa K, Kouzu Y, Bukawa H, Nimura Y, Seki N, et al. *Identification of candidate genes in human squamous cell carcinoma cells through gene expression analysis using DNA microarray. Oncol Rep. 2005;14:1293-1298.*
  - 8) Ishigami T, Uzawa K, Higo M, Nomura H, Saito K, Kato Y, et al. *Genes and molecular pathways related to radioresistance of oral squamous cell carcinoma cells. Int J Cancer. 2007;120:2262-2270.*
  - 9) Chang JT, Chan SH, Lin CY, Lin TY, Wang HM, Liao CT, et al. *Differentially expressed genes in radioresistant nasopharyngeal cancer cells: gp96 and GDF15. Mol Cancer Ther. 2007;6:2271-2279.*
  - 10) Luo L, Salunga RC, Guo H, Bittner A, Joy KC, Galindo JE, et al. *Gene expression profiles of laser-captured adjacent neuronal subtypes. Nat Med. 1999;5:117-122.*
  - 11) Kim TM, Jeong HJ, Seo MY, Kim SC, Cho G, Park CH, et al. *Determination of genes related to gastrointestinal tract origin cancer cells using a cDNA microarray. Clin Cancer Res. 2005;11:79-86.*
  - 12) Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. *Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. Anal Chem. 1996;68:850-858.*
  - 13) Riva C, Lavieille JP, Rey E, Brambilla E, Lunardi J, Brambilla C. *Differential c-myc, c-jun, c-raf and p53 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck: Implication in drug and radioresistance. Eur J Cancer B Oral Oncol. 1995;31B:384-391.*
  - 14) Gupta AK, McKenna G, Weber CN, Feldman MD, Goldsmith JD, Mick R, et al. *Local recurrence in head and neck cancer: Relationship to radiation resistance and signal transduction. Clin Cancer Res. 2002;8:885-892.*
  - 15) Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Danielidis V, Sivridis E. *Hypoxia inducible factor(HIF1alpha and HIF2alpha) and carbonic anhydrase 9(CA9) expression and response of head-neck cancer to hypofractionated and accelerated radiotherapy. Int J Radiat Biol. 2008;84:47-52.*
  - 16) Ma D, McCorkle JR, Kaetzel DM. *The metastasis suppressor NM23-H1 possesses 3'-5' exonuclease activity. J Biol Chem. 2004;279(17):18073-18084.*
  - 17) Pavelić K, Kapitanović S, Radosević S, Bura M, Seiwerth S, Pavelić LJ, et al. *Increased activity of nm23-H1 gene in squamous cell carcinoma of the head and neck is associated with advanced disease and poor prognosis. J Mol Med. 2000;78(2):111-118.*
  - 18) Wang LS, Chow KC, Lien YC, Kuo KT, Li WY. *Prognostic significance of nm23-H1 expression in esophageal squamous cell carcinoma. Eur J Cardiothorac Surg. 2004;26(2):419-424.*
  - 19) Wang YF, Chen JY, Chang SY, Chiu JH, Li WY, Chu PY, et al. *Nm23-H1 expression of metastatic tumors in the lymph nodes is a prognostic indicator of oral squamous cell carcinoma. Int J Cancer. 2008;122(2):377-386.*
  - 20) Liu SJ, Sun YM, Tian DF, He YC, Zeng L, He Y, et al. *Down-regulated NM23-H1 expression is associated with intracranial invasion of nasopharyngeal carcinoma. Br J Cancer. 2008;98(2):363-369.*
  - 21) Guan Z, Wang XR, Zhu XF, Huang XF, Xu J, Wang LH, et al. *Aurora-A, a negative prognostic marker, increases migration and decreases radiosensitivity in cancer cells. Cancer Res. 2007;67(21):10436-10444.*
  - 22) Du J, Hannon GJ. *The centrosomal kinase Aurora-A/STK15 interacts with a putative tumor suppressor NM23-H1. Nucleic Acids Res. 2002;30(24):5465-5475.*