大韓氣管食道科學會誌
VOL 5, No. 2, Dec. 1999

Nude Mouse에 이종이식한 두경부 편평상피세포암의 분화에 대한 Retinoids의 작용

울산대학교 의과대학 서울중앙병원 이비인후과학교실

김상윤 · 유승주 · 유근식 · 주준범 · 최두영 · 남순열

=Abstract=

The Modulation of Squamous Cell Differentiation by Retinoids in Human Squamous Cell Carcinoma Xenografts

Sang Yoon Kim, MD, Seung Joo Yoo, MD, Keun-Sik Yoo, MD,
Joon Bum Joo, MD, Doo-Yung Choi, MD, Soon Yuhl Nam, MD

Department of Otolaryngology,
Asan Medical Center,University of Ulsan College of Medicine

Objectives : To analyze the effect of retinoids on the differentiation in HNSCC xenografts.

Materials and Methods : RA (20 mg/kg) or 13-cis-RA (60mg/kg) was orally administered once in a day for 30 days in the xenograft model we prepared using athymic nude mice with AMC-HN-4 and -6. We carried out H & E staining and immunohistochemical staining with the monoclonal antibody against involucrin and cytokeratin 10.

Results : Both RA and 13-cis-RA RA were found to suppress the differentiation of AMC-HN-4. Interestingly, RA enhanced the differentiation of AMC-HN-6, although 13-cis RA did not exhibit any effect on the differentiation. These results suggest that *in vivo* effect of retinoids on the HNSCC growth and differentiation might be various. Retinoids-induced P450 in AMC-HN-6 might be one of the mechanisms to explain the reason why the retinoids exhibit various functions in the

교신저자 : 김상윤(Sang Yoon Kim, MD)
서울시 송파구 풍납동 388-1. 서울중앙병원 이비인후과학교실
Tel : 2224-3710 Fax : 489-2773

HNSCC.

Key Words : Retinoids, Head and neck squamous cell carcinoma cell line, Athymic nude mouse, Tumor differentiation, Cytochrome P450

Ⅰ. 서 론

Retinoids는 비타민 A와 그 자연 및 합성 유도체로서 면역기능, 조혈기능, 조직의 발생 및 발달, 세포의 증식과 분화 등 많은 생물학적 기능에 중요한 역할을 한다.[1] 특히 Retinoids가 편평상피세포암의 증식과 분화를 억제하는 특성을 이용하여 retinoids를 구강 백판증의 치료와 두경부 편평상피세포암의 예방에 사용하고 있으나[2)3)4)] 임상적인 적용에 한계가 있고 그 원인의 하나로 RA에 의한 RA 분해요소인 cytocrome P450(P450) 생성이 제시되고 있다.[5)] 이러한 P450에 의한 RA의 대사는 간을 포함한 다양한 조직과 세포에서 일어난다는 것이 밝혀진 바 있고, Kim 등[6)]은 일부의 두경부 편평상피세포암의 세포주에서도 P450이 생성된다고 보고하였다.

Retinoids는 *in vitro* 실험에서 편평상피세포암의 세포증식을 억제하며[7)8)9)] 대부분의 다른 세포주에서 분화를 억제하여 involucrin[9)10)11)], type I transglutaminase[7)8)9)12)], CK10 이나 CK[9)11)], cholesterol sulfate[7)] 등의 발현을 감소시키는 것으로 보고되고 있다. 그러나 retinoids에 의해 두경부 편평상피암 세포에서 생성되는 P450은 retinoids의 세포증식억제작용을 감소시킬 뿐 아니라 세포의 분화에도 밀접한 관련이 있을 것이다.

본 연구에서는 *in vivo*에서도 *in vitro*에서와 유사하게 retinoids가 두경부 편평상피세포암의 세포 분화를 억제하고 P450의 생성으로 retinoids의 생물학적 작용이 변화하는지 알아보고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. Chemicals.

All-*trans*-retinoic acid (RA), 13-*cis*-retinoic acid (13-*cis*-RA)는 Sigma사(Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, all-*trans*-[11, 12-^{3}H(N)]-RA ([^{3}H]RA)는 DuPont New England Nuclear사(Boston, MA, USA)에서 구입하였다.

Retinoid의 처리는 암실의 황색 조명하에서 시행하였다.

2. 세포주 배양

본 연구에서 사용한 세포주는 울산대학교 의과대학 이비인후과학교실에서 확립한 두경부 편평상피세포암 세포주로[13)] RA 전처리에 의해 RA의 대사가 뚜렷이 나타나는 AMC-HN-6와 RA의 대사가 일어나지 않는 AMC-HN-4였다.[6)] 세포의 배양은 5% CO_2, 95% 공기, 100% 상대습도, 37℃의 조건하에서 Falcon tissue culture flask(Becton dickinson, Aalst, Belgium)에서 단층배양(monolayer culture)으로 시행하였다. 모든 세포의 배양은 heat inactivated 10 % fetal bovine serum (FBS, GIBCO, Grand Island, NY, USA), 2 mM L-glutamine, 2.2 g/L sodium bicarbonate, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane sulfonic acid (HEPES), 5.9 g/L penicillin-streptomycin, Fungizon이 첨가된 최소필수배지(minimum essential media)에서 시행하였다.

3. Athymic nude mouse에 세포주의

가. 이종이식

실험방법은 아산생명과학 연구소에서 사육되는 24마리의 athymic nude mouse를 8마리씩 3군으로 분류하여 sesame oil 0.1 ml, RA 20 mg/kg, 13-*cis*-RA 60 mg/kg를 경구 투여한 후 같은 날 각 군 8마리중 4마리는 AMC-HN-4를 나머지 4마리는 AMC-HN-6를 한 마리에 두 군데씩 피하 주사하여 8개의 종양을 만들었다. 주사한 각각의 세포수는 5 X 10^6/ml로 1 cc 주사기를 이용하여 nude mouse의 등 양쪽 피하에 주사하였다. 12마리는 AMC-HN-4를 12 마리는 AMC-HN-6를 주사하였다. 약물의 투여는 매일 1회씩 1주일에 6일 투여하였고 약물의 투여기간은 총 30일이였다. 약물투여 30일 째 동물을 희생시켜 일부·종양조직은 10% neutral buffered formalin에 고정 후 paraffin에 포매하였고 일부는 냉동보관하였다.

4. Hematoxylin and Eosin염색과 면역조직화학염색

Paraffin block을 5 μm의 두께로 절편을 만들고, hematoxylin and eosin 염색을 시행한 후 광학현미경하에 종양조직의 층화 정도, 종양과 실질의 비율, solid growth pattern, keratin pearl의 생성 정도를 비교하여 retinoids가 *in vivo*에서 종양의 조직소견에 미치는 영향을 알아보았다.

조직의 분화도를 알아보기 위해 mouse anti-human cytokeratin 10, involucrin (DAKO, Carpinteria, CA, USA)로 streptavidinbiotin peroxidase complex(ABC)법을 이용하여 면역조직화학염색을 시행하였다. 염색을 위하여 파라핀 포매 조직을 2.5 ㎛의 두께로 박절한 후 xylene으로 10분간 3회 처리하여 파라핀을 제거하였다. 100%, 95%, 70% ethanol로 처리하여 재수화(rehydration) 시키고 증류수로 씻은 후 0.1% Trypsin으로 37℃에서 30분 처리하여 항원을 노출시켰다. TBS(Tris buffered solution)로 세척 후 3 % H_2O_2로 10분간 반응시키고 TBS로 세척하였으며, LSAB Kit (DAKO, Dacopatts. Denmark)에 들어있는 blocking agent에 goat anti-mouse immunoglobulins (DAKO, Glostrup. Denmark)를 1 : 100으로 희석하여 상온에서 30분 반응시켰다. Blocking agent를 제거하고 일차항체를 희석액에 희석(CK10 1 : 40, INV 1:200)하여 사용하였고 음성 대조로서 완충용액을 사용하여 상온에서 1시간 반응시켰다. TBS로 세척 후 streptavidin peroxidase를 10분간 반응시키고 substrate-chromogen(DAB) 용액을 슬라이드 조직 위에 떨어뜨려 3분간 반응시킨 후 TBS로 세척하였다.

Ⅲ. 결 과

1. Retinoids가 이종이식된 종양의 조직소견에 미치는 영향 (Fig. 1)

조직소견상 AMC-HN-4 대조군(Fig. 1A)은 층화와 세포내 각질화가 잘 관찰되는 고분화도의 편평상피세포암종이 발생하였으나 RA를 투여한 군(Fig. 1B)에서는 미분화된 세포가 고형성 성장을 하고 있어 RA에 의해 세포의 분화가 억제된 것을 알 수 있었고, 13-*cis*-RA를 투여한 종양조직(Fig. 1C)에서는 부분적으로 중등도 분화도의 편평상피 세포암종이 발생하였으나 대조군과 비교해서 조직소견의 큰 차이는 없었다.

AMC-HN-6 대조군(Fig. 1D)은 세포내의 각질화는 관찰되지 않지만, 세포의 경계가 분명하고 층화가 관찰되는 중등도 분화의 편평상피 세포암종이 발생하였으나, RA(Fig. 1E)와 13-*cis*-RA (Fig. 1F)를 투여한 군에서는 개개의 세포의 핵이 세포질에 비해 약간 커져 있으며 다소의 미분화 양상을 보이고 있으나 분화도의 변화는 없어 보였다. 이와 같은 조직소견의 결과로는 retinoids에 의해 AMC-HN-6의 세포분화에 미치는 영향을 발견할 수 없으며, RA와 13-*cis*-RA 사이에서도 종양의 분화도에 미치는 영향의 차이를 발견할 수

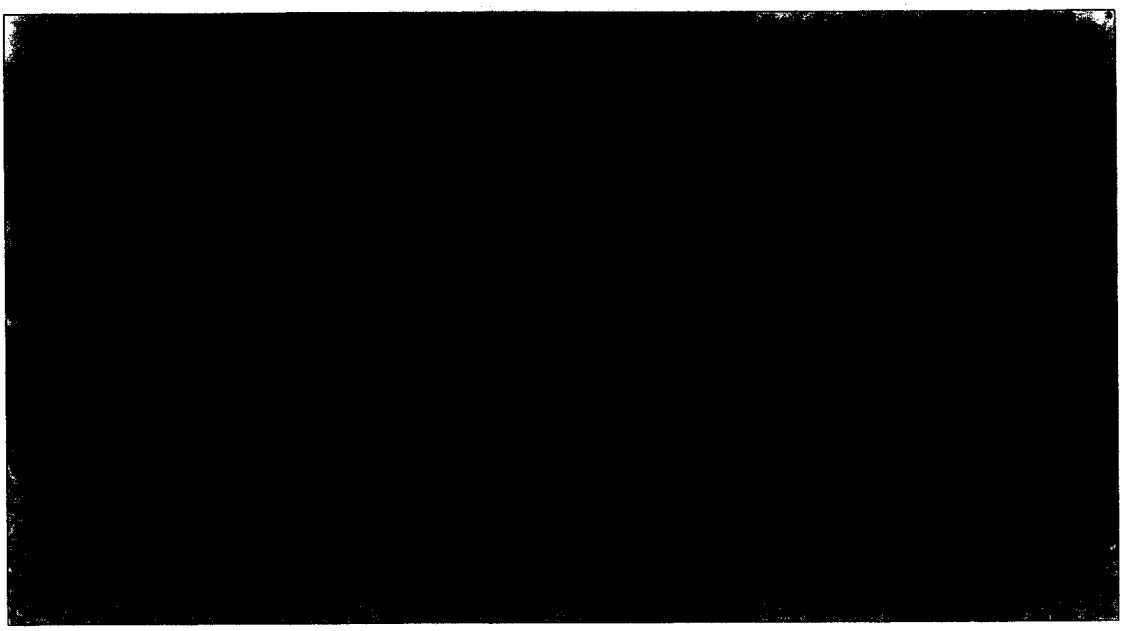

Fig 1. *The photomicrography of tumors shown 30 days after tumor implantation by hematoxylin and eosin staining. A; control(AMC-HN-4), B; RA treated(AMC-HN-4), C; 13-cis-RA treated(AMC-HN-4), Dcontrol (AMC-HN-6), E;RAreated(AMC-HN-6), F; 13-cis-RA treated (AMC-HN-6).*

없었다.

2. Retinoids가 두경부 편평상피세포암 세포의 분화에 미치는 영향 ; 면역조직화학염색법을 통한 분석

AMC-HN-4 세포주를 이식하여 형성된 종양 조직의 대조군에서는 CK10 (Fig.2A)와involucrin (Fig. 2D)이 keratin pearl 주위로 강하게 발현하고 있으나 RA를 투여한 후 형성된 종양조직 소견에서는 CK10(Fig. 2B) 와 involucrin (Fig. 2E)이 아주 약하게 발현되어 RA가 *in vivo*에서도 세포의 분화를 억제하고 있음을 알 수 있었다. 또한 13-*cis*-RA를 투여한 실험군에서도 CK10(Fig. 2C)와 involucrin(Fig. 2F)의 발현이 감소하였으나 RA를 투여한 실험군보다는 감소의 폭이 적었다.

AMC-HN-6 세포주를 이종이식하여 형성된 종양 조직의 대조군에서 CK10(Fig. 3A)와 involucrin (Fig. 3D)의 발현은 약하였으나 RA를 투여한 후 형성된 종양의 조직에서는 CK10(Fig. 3B)와 involucrin(Fig. 3E)이 강하게 발현되었다.

즉 *in vivo*에서는 RA가 오히려 종양세포의 분화를 촉진시켰다. 그러나 13-*cis*-RA는 CK10(Fig. 3C)와 involucrin(Fig. 3F)의 발현에 영향을 주지 않아 13-*cis*-RA가 AMC-HN-6 세포주의 분화에 미치는 작용이 RA와는 다른 것을 알 수 있다.

Ⅳ. 고 찰

*In vitro*에서 RA의 작용에 대한 연구에는 배양된 비생리적인 암세포를 이용한다는 한계가 있다. *In vitro*에서 암세포는 정상적인 stromal support가 없어지고 fetal calf serum의 growth factor로 인하여 상피세포의 분화와 성장이 영향을 받을 수 있다.[14)15)] 이에 본 연구에서는 *in vitro*에서 사용했던 AMC-HN-4와 AMC-HN-6 세포주를 athymic

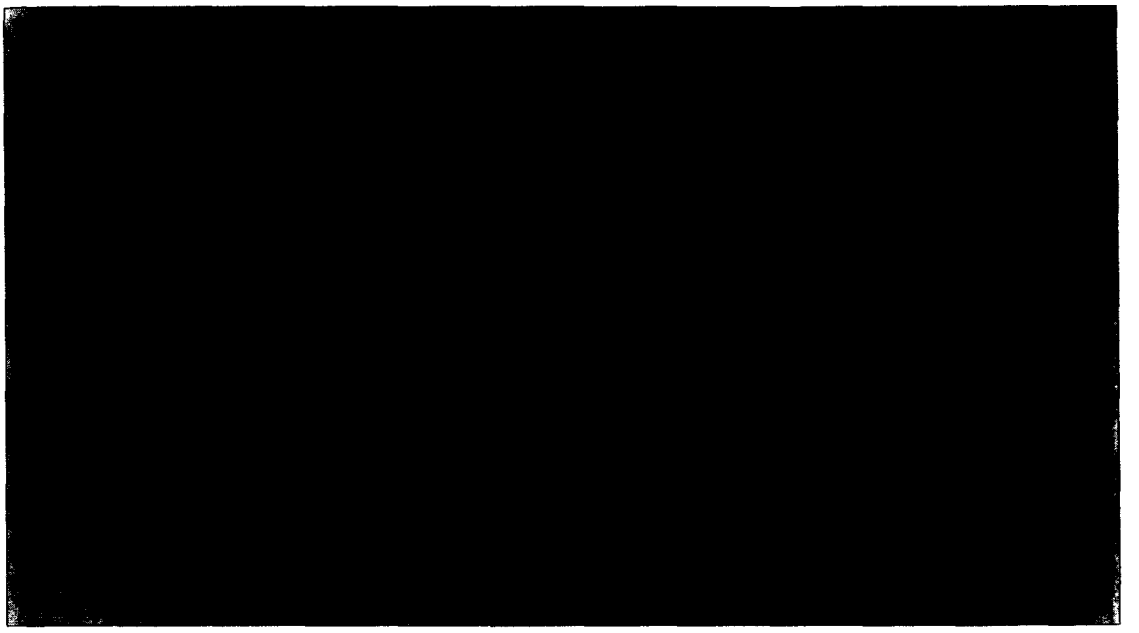

Fig 2. *The effects of retinoids on the expression of CK10 and involucrin in xenograft tumor 30 days after tumor implantation of AMC-HN-4. A; control(CK10), B; RA treated(CK10), C; 13-cis-RA treated(CK10), D; control(Involucrin), E; RA treated(Involucrin) F; 13-cis-RA treated(Involucrin).*

nude mouse에 이식하여 만든 *in vivo* xenograft 모델을 이용하였다. Shalinsky 등[16]은 retinoids를 이용한 동물실험에서 RA와 13-*cis*-RA의 MTD를 측정하여 RA 20mg/kg, 13-*cis*-RA 60 mg/kg를 경구 투여하였을 경우nude mouse에서 retinoids에 의해 발생하는 부작용이 경미하게 나타난다고 보고하였다. 본 연구에서도 Shalinsky 등[16]의 보고를 따라 RA와 13-*cis*-RA를 각각20mg/kg, 60mg/kg 사용하였고 중대한 retinoids 의 부작용을 발견할 수 없었다.

사용된 세포주는 Kim 등[6)13)]의 연구에서 사용된 세포주와 동일한 세포주로서 AMC-HN-6 세포주는 P450에 의해 RA의 대사가 일어나는 세포주이고 AMC-HN-4 세포주는 대사가 일어나지 않는 세포주이다. Kim 등[17]은 AMC-HN-4가 *in vitro*에서 RA와 13-*cis*-RA에 의해 세포증식이 억제된다고 보고하였다. 또한 김 등[17]은 AMC-HN-6가 *in vitro*에서 RA와 13-*cis*-RA에 의해 세포증식이 억제되나 retinoids의 전처리에 의해 RA의 대사가 증가되어 AMC-HN-4보다는 세포증식억제 효과가 적다고 보고하였다.

상피세포분화의 정도는 여러 가지 분화척도의 발현으로 알 수가 있는데 이러한 분화척도에는 cornified envelope의 형성, envelope를 형성하는 단백질 전구물질인 involucrin과 loricrin, 이러한 단백질들의 cross-linking을 촉진시키는 type 1 transglutaminase(TGase-1), 상피세포의intermediate filament를 형성하는 단백질인 cytokeratins (CK), 그밖에 cholesterol sulfate 등이 있다. 저자의 실험에서 사용한 involucrin은 여러 편평상피세포에서 발견되기 때문에 일반적으로 편평상피세포의 분화척도로 사용되고 있고[18] CK10은 CK1과 이합체(dimer)로서 각화편평상피세포의 suprabasal layer에서 볼 수 있다.[19]

RA는 CK10과 involucrin의 발현을 감소시켰고 13-*cis*-RA의 경우 종양조직의 분화억제작용은 약간은 있으나 RA보다는 적었다. 그러나 AMC-HN-6 을 이식한 동물실험에서는 AMC-HN-4와

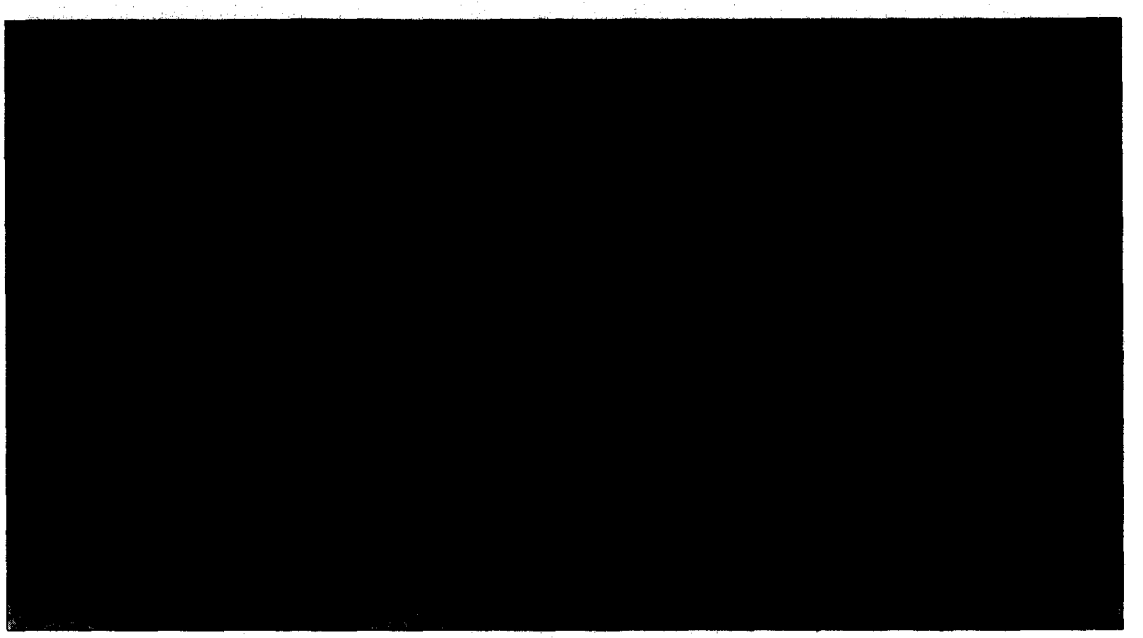

Fig 3. *The effects of retinoids on the expression of CK10 and involucrin in xenograft tumor 30 days after tumor implantation of AMC-HN-6. A; control(CK10), B; RA treated(CK10), C; 13-cis-RA treated(CK10), D; control(Involucrin), E; RA treated(Involucrin) F; 13-cis-RA treated(Involucrin).*

달리 RA에 의해 CK10과 involucrin의 발현이 현저하게 증가하였다. 즉 AMC-HN-6는 동물실험에서 RA에 의해 세포의 분화가 촉진되어 일반적으로 알려진 편평상피세포암과 다른 반응을 보였다는 것이다. 이와 같은 retinoids에 의한 세포증식 억제와 세포분화촉진은 F9 teratocarcinogenic cell[20]등을 포함한 대부분의 세포에서의 retinoids의 작용과 같은 것으로 아마도 AMC-HN-6는 다른 편평상피세포암과 다른 기전으로 retinoids에 반응하리라는 것을 암시하나 *in vivo*에서 retinoids가 분화를 촉진하는 정확한 이유는 아직까지 밝혀지지 않았다.

한편, RA나 13-*cis*-RA가 AMC-HN-6의 *in vivo*에서 종양세포의 분화도를 촉진시키는 이유를 단순히 RA대사의 차이로만 설명할 수는 없으나, 본 연구 결과들을 볼 때 retinoids에 의해 P450을 생성하는 두경부 편평상피세포암 환자에서는 RA보다 13-*cis*-RA가 치료에 효과적이고 P450가 생성되지 않는 환자에서는 13-*cis*-RA보다 RA가 더욱 효과적인 치료제로 작용할 가능성이 있다고 생각된다.

본 연구는 retinoids의 세포증식과 분화에 대한 작용이 *in vivo* xenograft 모델에서 두경부 편평상피암 세포주들간에서도 다를 수 있고, 한편으로는 *in vivo*에서도 *in vitro*에서와 마찬가지로 P450이 retinoids의 작용에 영향을 줄 수 있음을 시사해 주고 있다. 그러므로 향후 retinoids를 암의 예방이나 치료 목적으로 사용하기 위해서는 retinoids가 *in vivo*에서 다르게 반응하는 이유를 밝히는 연구가 필요하다. 또한 편평상피세포암 세포에서 retinoids에 의한 P450의 생성여부가 두경부 편평상피세포암 환자의 retinoids 치료효과를 판정하는 중요한 척도가 될 수 있으리라 생각된다.

V. 결 론

일반적으로 retinoids는 두경부 편평상피세포

암의 세포증식과 분화를 억제한다고 알려져있다. 그러나 retinoids에 의한 두경부 편평상피세포암의 세포증식과 분화에 대한 작용이 세포주들간에 서로 다를 수 있다.

이러한 retinoids의 다양한 작용기전을 정확히 규명할 수는 없으나, 두 세포주간에 retinoids에 의해 발생하는 P450의 생성 여부가 retinoids 효과의 다양성을 결정하는 하나의 인자로 작용할 수 있음을 시사해 주고 있다. 그러므로 향후 retinoids를 암의 예방이나 치료 목적으로 사용하기 위해서는 retinoids가 두경부 편평상피세포암 세포에 미치는 정확한 작용기전을 규명하고, retinoids가 *in vivo*에서 다르게 반응하는 이유를 밝히는 연구가 필요하리라 생각된다.

중심단어 : 레티노이드, 두경부 편평상피세포암 세포주, 암세포 분화, 사이토크롬 P450.

References

1. Underwood BA. Vitamin A in animal and human nutrition. In: *The Retinoids. dited by Sporn MB, Roberts AB, and Goodman* DS. New York: *Academic Press; 1984. p. 211-227.*
2. Shklar G, Schwartz J, *Grau D, Tricker DP, Wallace KD. Inhibition of hamster buccal pouch carcinogenesis by 13-cis retinoic acid. Oral Surg 1980; 50: 45-52.*
3. Hong WK, *Endicott J, Itri LM, Dood W, Batsakis JG, Bell R, et al. 13-cis retinoic acid in the treatment of oral leukoplakia. N Engl J Med 1986; 315: 1501-1505.*
4. Hong WK, *Lippman SM, Itri LM. Prevention of secondary primary tumors with isotretinoin in squamous-cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med 1990; 323: 795-801.*
5. Norum KR. *Acute myeloid leukemia and retinoids. Eur J Clin Nutr 1993; 47: 77-87.*
6. Kim SY, Han IS, Yu HY. *The induction of P450-mediated oxidation of all-trans retinoic acid by retinoids in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. Metabolism (in press).*
7. Jetten AM, Kim JS, *Sacks PG. Inhibition of growth and squamous-cell differentiation markers in cultured human head and neck squamous carcinoma cells by β-all-trans retinoic acid. Int J Cancer 1990; 45: 195-202.*
8. Lotan R. *Suppression of squamous cell carcinoma growth and differentiation by retinoids. Cancer Res 1994; 54: 1897-1990.*
9. Zou CP, Cliffors JL, Xu XC, *Sacks PG, Chambon P, Hong WK, et al. Modulation by retinoic acid (RA) of squamous cell differentiation, cellular RA-binding proteins, and nuclear RA receptors in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines. Cancer Res 1994; 54: 5479-5487.*
10. Gudas LJ, Sporn MB, Roberts AB. Cellular biology and biochemistry of the retinoids. In: *The Retinoids. edited by MB Sporn, AB Robert, DS Goodman. Raven Press, New York; 1994. p. 469-494.*
11. Poddar S, Hong WK, Thacher SM, Lotan R. *Retinoic acid suppression of squamous differentiation in human head-and-neck squmaous carcinoma cells. Int J Cancer 1991; 48: 239-247.*
12. Rubin AL, Rice RH. *Differential regulation*

by retinoic acid and calcium of transglutaminases in cultured neoplastic and normal human keratinocytes. Cancer Res 1986; 46: 2356-2361.

13. Kim SY, Chu K-C, Lee HR, Lee K-S, Carey TE. *Establishment and characterization of nine new head and neck cancer cell lines. Acta Otolaryngol (Stockh) 1997; 117: 775-784.*
14. Carey T. Head and neck tumor cell lines. In : Atlas of Human Tumor Cell Line New York: *Academic Press 1994; 79-120*
15. Rheinwald JG, Beckett MA. *Tumorigenic keratinocyte lines requiring anchorage independent and fibroblast support cultured from human squamous carcinomas. Cancer Res 1981; 41: 1657-1663.*
16. Shalinsky DR, Bichoff ED, Gregory ML, Gottandis MM, Hayes JS, Lamph WW, *et al. Retinoid-induced suppression of sauamous cell differentiation in human oral squamous cell carcinoma xenografts (Line 1483) in athymic nude mouse. Cancer Res 1995; 55 (14): 3183-3191.*
17. Kim SY, Yu HK, Lee HL ,Lee K-S. *All-trans-retinoic acid와 ketoconazole에 의한 두경부편평상피세포암 세포주의 증식과 β integrin 발현의 조절작용. Korean Combined Otolaryngological Congress pp. 97, 1997*
18. Banks-Schlegl S, Green H. *Involucrin synthesis and tissue assembly by keratinocytes in natural and cultured human epithelia. J Cell Biol 1981; 90: 732-737.*
19. Roop DR, Huitfeldt H, Kikenny A, Yuspa SH. *Regulated expression of differentiation-associated keratins in cultured epidermal cells detected by monospecific antibodies derived from different human epithelia. Differentiation 1987; 35: 143-150.*
20. Gudas LJ. *Retinoic acid and teratocarcinoma stem cells. Dev Biol 1991; 2: 171-219.*