

원발성 및 전이성 구강편평세포암종 세포주에서 p21 및 p73 mRNA발현에 관한 연구

강정훈 · 김경욱 · 이재훈

단국대학교 치과대학 구강악안면외과학 교실

Abstract

STUDY ON mRNA EXPRESSION OF P21 AND P73 IN THE CELL LINES OF PRIMARY AND METASTATIC SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Jeong-Hoon Kang, Kyung-Wook Kim, Jae-Hoon Lee

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

There were many controversies in the cause and progress of tumorigenesis. Recently, studies on the mutation of genes related to the tumor have extensively been performed due to development of molecular biology. Structural and morphological changes of chromosomes, which are related to the abnormal activation of oncogenes or inactivation of tumor suppressor genes, transform the normal cells into the tumor cells. p53 and Rb are well known tumor suppressor genes, while oncogenes include c-myc, bcl-2 and ras, etc. When exposed to cell damaging agents, p53 inhibits cell growth by inducing transcription of p21. Especially p73, which is homo-logy of p53, frequently deleted in melanoma, neuroblastoma, colon cancer, and breast cancer. when over produced, p73 activates the transcription of p21, bax-1 and inhibits cell growth by inducing apoptosis. For study on mRNA expression of p21 and p73, normal oral keratinocytes, and cell lines of primary and metastatic oral squamous cell carcinomas were cultured and then electrophoresis and RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction) were performed.

1. The mRNA of p21 and p73 in normal oral keratinocyte expressed lower level than that of primary oral squamous cell carcinoma.
2. The mRNA of p21 in metastatic oral squamous carcinoma cell lines was expressed as various patterns compared with that of normal oral keratinocyte.
3. In the metastatic oral squamous cell lines, the mRNA of HN8 expressed higher than that of HN12 or HN19.
4. The mRNA of p73 in primary oral squamous cell lines expressed 4-5 times higher than that of normal oral keratinocyte.
5. In metastatic oral squamous cell lines, there was no significant expression of p73 mRNA compared with that of normal oral keratinocyte.

From the results obtained in this study, mRNA expression of p73 in primary oral squamous cell lines was remarkable, while mRNA expression of p21 and p73 in metastatic oral squamous cell lines were statistically insignificant.

Key words : mRNA expression, p21 & p73, metastatic oral squamous cell carcinoma

I. 서 론

종양 발생의 원인 및 진행과정에 대해서는 많은 논란이 있었으나, 분자생물학의 발달로 암의 발생을 유전자 변이로 이해하기 시작하여¹⁾ 많은 연구가 이루어지고 있다. 암의 발생 및 발전에

관여하는 유전자는 현재 약 100개 이상이 보고되고 있고²⁾, 이는 세포성장과 증식을 조절하는 경로에 관여한다고 알려져 있다. 종양유전자의 비정상적 활성화나, 종양억제 유전자의 비활성화로 인한 염색체의 구조 및 형태의 변화는 정상세포의 암세포로의 변화를 의미한다. 현재 알려진 종양유전자는 c-myc, c-myb, bcl-2, ras 단백질, neu 등 여러 가지가 있으며, 종양 억제유전자로는 p53과 Rb 가 대표적이다. p73은 p53의 유사체로써 1p36.33 염색체 부위에서 발견되는데, 악성 흑색종, 신경모 세포종, 장암, 유방암등에서 결손되어 나타난다³⁾. p53은 핵내에 있는 인산화 단백질로 형질전환된 세포에서 T 항원과 결합상태로 발견되어 종양유전자로 생각되었으나, 모두 돌연변이라는 것이 확인된 후 종양억제 유전자로 인식되고 있다⁴⁾.

p21은 p53이 세포변이 물질에 폭로되면 유도되는 유전자로 사

강 정 훈

330-716, 충남 천안시 신부동 산7-1
단국대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Jeong-Hoon Kang

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

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

Tel: 82-417-550-1991 Fax: 82-417-551-8988

E-mail: kkwoms@anse.dankook.ac.kr

이클린 의존성 인산화 효소와 사이클린이 결합된 복합체의 기능을 억제시켜 G1기의 진행을 방해하고 S 기로의 진입을 억제하여 성장을 정지시키거나 예정사를 유도하게 된다⁷⁻¹²⁾. p53이 특정 DNA 서열과 결합하여, p21같은 표적유전자의 전사를 활성화시켜 세포의 성장을 방해하는 것처럼 p73 역시 특정아미노산 서열에 관여하는 단백질로 알려져 있다¹⁴⁾. 특정 DNA 서열에 결합시 응축되는 p53의 아미노산 잔여물이 p73에서도 보존된다는 사실은 p73이 p53의 유사체라는 것을 간접적으로 증명하고 있다¹⁵⁾. p53은 DNA 상해요인에 의해 단백질의 양 및 활성이 증가하는 상해유도 유전자이나, p73은 상해유도 유전자가 아니며, p73의 과잉생산은 p53에 반응하는 p21이나 bax-1등의 유전자 전사를 증가시켜 세포성장을 억제하고, 세포의 예정사를 유도하기도 한다¹⁶⁾.

p73이 DNA 상해요인에 의해 활성화 되지 못한다는 사실은, 구조적으로는 p53과 같은 단백질 계열임에도 불구하고, 기능적으로는 다른 신호에 의해 유도되고, 다른 역할을 수행하여 세포의 항상성을 유지시킨다는 것을 증명하고 있다^{13,14,17)}.

염색체 1p36에는 둘 또는 그 이상의 Rb유전자가 위치하는데 p73은 작은 위치를 차지하지만 신경모세포종에서 빈번히 결손되어 나타난다. 반면, p73 위치에 반접합체로 남아있는 p73 대립형질에는 돌연변이가 일어나지 않는데, 이는 p73의 반접합성이 잔여대립형질로 하여금 비전사를 유발하여 암 발생에 관여한다는 것을 증명하고 있다. 신경모세포종에서 오히려 p53의 돌연변이체는 적게 나타나는데, 이는 p73이 p53처럼 전구세포에 직접 작용하여 암유발에 관여하고 있다는 보고를 뒷받침 해준다^{18,19)}. 암발생에 관여하는 유전자에 대한 연구대상으로는 암종자체 또는 인위적으로 암을 유발시킨 실험동물을 들 수 있으나^{20,21)}, 여러 종류의 암종을 대상으로 한 세포주를 이용하는 방법 역시 많이 시행되고 있다²²⁾. 구강암의 대부분은 편평세포암종이며, 구강암에 영향을 미치는 종양유전자에 대한 연구는 보고되고 있으나²³⁾. 종양억제유전자, 특히 p73의 구강암에서의 발현에 대한 연구는 미진한 실정이다.

본 연구에서는 정상인 구강상피세포와 두경부 편평상피세포 암종의 원발성 및 전이성 세포주에서 total RNA를 추출 및 전기영동을 시행하고 RT-PCR을 통하여 p73 및 p21의 mRNA 발현을 비교하여 구강암의 임상적 응용에 도움이 되고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 세포배양

대조군으로 사용되는 정상인 구강상피세포(normal human oral keratinocyte, NHOK) 배양은 정상인으로부터 치은을 절제하여 KBM Bullet Kit(Clonetics, USA)배양액을 사용하여 100mm dish 면적의 70~80%가 성장 될 때까지 시행하였다. 구강편평세포암종 세포주는 ATCC (Manassas, USA)社로부터 구입한 구강저에서 얻은 UMSSC 1, 치조에서 얻은 UMSSC 2 및 혀에서 얻은 UMSSC 9을 원발성 세포주로 이용하였고, 전이성 세포주로는 임파절에서 얻은 HN 8, HN 12 및 HN 19를 이용하였다(Table 1).

원발성 세포주는 10% FBS 및 100U/ml 페니실린과 100µg/ml 스트렙토마이신을 포함하는 DMEM(Hyclone, USA)을 배양액으로 사용하였고, 일정한 습도를 유지하며, 37°C, 5% CO₂가 되는 조건으로 배양하였다. 계대배양은 0.01% trypsin-0.5mM ethylenediaminetetra acetic acid(EDTA)를 사용하였고 헤모사이트메타를 사용하여 세포수를 세었다.

2. Total RNA 추출

양 세포 공히 70~80% 정도 성장하면 배양액을 제거하고 PBS로 수세를 하였다. RNA 추출 버퍼(0.14M NaCl, 1.5mM MgCl₂, 10mM Tris-Cl(pH 8.60), 0.5% Nondiet P-40, 1mM dithiothreitol, 1000 unit/ml placental RNase inhibitor) 및 proteinase digestion 버퍼(0.2M Tris-Cl (pH 8.0), 25mM EDTA(pH 8.0), 0.3M NaCl, 2% SDS)를 첨가하였다. policeman을 사용하여 세포를 긁어 21 gauge 바늘을 사용하여 세포를 3~4번 분쇄하고, 200µg/ml proteinase를 섞어 37°C에서 30분간 처리 하였다. 1 : 1 비율의 phenol/chloroform 으로 단백질을 제거하는데 10분간 원심분리기를 사용하여 5000g에서 원심분리 후 aquaous phase와 organic phase를 분리하여 aquaous phase를 새 튜브에 옮기고 2.5배 찬 에탄올을 가하였다. 0°C에서 원심분리하여 상층액을 버리고 0.1% sodium acetate를 포함하는 70%에탄올로 수세하여 에탄올을 제거하고 실온에 말렸다. 이를 50mM Tris-Cl (pH 7.8) 1mM EDTA (pH 8.0)로 녹였다. 여기에 최종농도가 MgCl₂는 10mM, DTT는 0.1mM로 1000units/ml RNase inhibitor를 섞는다. 그리고 최종농도가 2µg/ml 인 DNase I를 넣고 37°C에서 60분간 처리하였다. 또한 최종농도 0.2% SDS 및 10mM EDTA를 넣고 1 : 1 phenol/chloroform에 실온에서 10분간 원심분리하여 aquaous phase를 분리하고 3M sodium acetate를 첨가하여 최종농도가 0.3M이 되게하고 용액의 2.5배에 해당하는 차가운 에탄올을 넣어 얼음에서 2시간 방치하였다. 4°C에서 원심분리하여 RNA를 모으고 에탄올을 제거한 다음 벤취에서 건조시켜 200µg TE(pH 7.6)에 녹였다.

RNA를 확인하기 위하여 전기영동을 시행하였다. 10X 3-[N-morpholinol] 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, 3µg RNA, 1.25µl 10X MOPS, 2µl

Table 1. PCR Primers Used in This Study

Cell line	Original site	Differentiation
UMSSC 1	FOM	Well
UMSSC 2	Alveolus	Well
UMSSC 9	BOT	Moderate
HN 8	LN	Moderate
HN 12	LN	Moderate
HN 19	LN	Poorly

Abbreviation :

FOM : Floor of mouth, BOT : Base of tongue, LN : Lymph node

Table 2. Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Lines Used in This Study

p73	sense	AAC GCT GCC CCA ACC ACG AG
200bp	antisense	CCC GGT TCA TGC CCC CTA CA
p21	sense	GCG CCA TGT CAG AAC CGG C
488bp	antisense	GAG AAT CCT GGT CCC TTA C
β -Actin	sense	ATG GAT GAT GAT ATC GCC GCG CT
822bp	antisense	GCA TCC ATG CCC AGG AGG AAG GA

Abbreviation :

T : Thymine, A : Adenine, C : Cytosine, G : Guanine

formaldehyde, 6.25 μ l formamide를 혼합하여 65°C에서 5분간 가열하고, 얼음에 식혔다. Saik등²⁷⁾과 Orita등²⁸⁾의 방법에 따라 1.25 μ l 젤 로딩 용액을 섞고, 완충용액으로 1X MOPS를 쓰고 120V/cm으로 하여 bromophenol blue의 푸른색이 전체 젤의 2/3까지 나오도록 전기 영동을 시행하였다.

3. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction(RT-PCR) Amplification

Total RNA로부터 역전사를 시켜 cDNA를 다음과 같이 만들었다. cDNA는 1 μ g DNase I으로 처리된 total RNA에 random hexamer primers, 10mM/LDIT, 0.5mM/L dNTPs, 10U RNase 및 200U Maloney murine leukemia virus reverse transcriptase(Gibco BRL社, USA)를 섞어 40 μ l를 만들어 42°C에서 60분간 처리하여 cDNA를 만들었다.

이 cDNA를 80 μ l H₂O에 희석하고 이중 2.5 μ l cDNA를 사용하여 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH 8.3), 200 μ M dATP, dTTP, dGTP, biotinylated-dCTP, 대조군 primer인 human β -Actin과 실험군 primer인 p21과 p73을(Table2) 각각 0.75 μ l, 1unit Taq-polymerase로 반응물 총량 50 μ l로 하고 PCR을 사용하여 증폭시켰는데 denaturation을 위하여 95°C에서 1분, 증폭을 위하여 95°C에서 30초, 64°C에서 30초, 72°C에서 1분(30 cycle), 마지막 확장을 위하여 72°C에서 10분을 시행하였다.

대조군으로 사용된 정상인 β -Actin(822bp)은 95°C에서 1분, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분 (30cycle), 마지막 확장을 위하여 72°C 10분으로 시행하였다. PCR 반응물은 0.5 μ l ethidium bromide를 포함하는 2% 아가로스 젤을 사용하여 분리하고 젤 건조기에 말린 다음 ECL 방법을 사용하였다²⁹⁾. 필름에 노출한 다음 현상을 시행한 후, 덴시토메터를 사용하여 측정하였다. Semi-quantitative 방법으로 각각 mRNA 수준을 β -Actin mRNA 수준으로 나누어 평균을 구하여 상호 비교하였다.

III. 연구결과

1. 세포 배양

실험군 및 대조군을 세포배양 한 후 inverted microscope로 관찰

한 결과 다음과 같은 조직학적 소견을 보였다. 정상인 구강상피 세포는 제일차 배양후 2~3일 후 새로이 성장하는 세포는 방추형을 보이며 군집을 이루었으나 군집이 커지는 경우 세포질은 다각형을 보였으며 핵은 방추형으로 나타나고, 구강상피 암종 세포주에 비해서 예정사가 많이 관찰되었다(Fig. 1). 종양세포는 정상 구강상피세포에 비하여 전체적으로 크기가 약간 컸으며 세포질과 핵이 차지하는 비율이 적었다. 분화도가 좋은 종양세포는 대부분 세포질이 다각형을 보였으나 분화도가 좋지 않은 종양세포들은 다각형 및 심한 방추형을 보였다. 예정사가 나타난 경우 세포질이 3~4배 정상보다 커지고, 핵에 염색체가 농축되어 나타나며 핵질 및 세포질에서는 다수의 공포가 발견되었다(Fig. 2, 3, 4).

2. Total RNA 추출

정상세포 및 각 실험세포주의 Total RNA 추출 후 전기영동 한 결과 공히 28S(Sedimentation)와 18S 부위에서 굵은 띠를 형성하였고, 이는 Total RNA 추출이 정상적으로 시행되었음을 증명하고 있다(Fig. 5).

3. RT-PCR

Human β -Actin (822bp)의 각 군에서의 발현양상이 전반적으로 고르게 굵은 띠를 형성하고 있어 RT-PCR의 정확성을 증명하고 있다(Fig. 6).

4. p21의 mRNA 발현양상

반정량적 분석(Semi-quantitative analysis) 결과 실험군 원발성 세포주에서 p21의 mRNA 발현양상은 대조군에 비하여 다양하게 발현되었으며, 특히, 전이성 세포주에서는 HN12나 HN19에서 보다 HN8에서 과도한 양상으로 발현되었다(Fig. 7).

5. p73의 mRNA 발현양상

실험군 원발성 세포주에서 p73 mRNA는 대조군에 비하여 4~5배 과도한 양상으로 발현되었고, 실험군 전이성 세포주와 대조군에서는 비슷한 수치의 발현양상을 보였다(Fig. 8).

IV. 총괄 및 고찰

편평상피세포암종은 구강영역에서 발생하는 암종의 대부분을 차지하고 있는 악성종양으로^{25,26)} 명확한 원인과 발생기전에 대해서는 알려져 있지 않으나, 근간에는 세포주기를 조절하고, 세포 분열을 자극하여 정상세포를 형질전환된 암세포로 변화시키는 유전자에 대한 연구가 주류를 이루고 있다²⁹⁾. 특히, 유전자 및 분자생물학적 수준에서의 세포에 대한 연구로 암의 원인 및 작용기전을 보다 명확하게 규명할 수 있는 수준에 이르렀다³⁰⁾. 암 발

생에 관여하는 유전자는 그 기능에 따라 종양유전자와 종양억제 유전자로 구분할 수 있는데, 종양유전자가 활성화되거나 종양억제 유전자가 비활성화되면 염색체의 구조 및 수가 비정상적으로 변화하고 정상세포의 기능을 상실하여 종양세포로의 전환이 일어나게 된다⁶¹. 대표적인 종양억제 유전자로는 p53을 들 수 있는데 인간에서 발생하는 암 중에서 가장 많이 변성이 일어나는 유전자로 알려져 있고³¹⁻³⁵, 특정 DNA 서열에 결합하여 세포주기 억제자(cell-cycle inhibitor)인 p21^{waf}의 전사를 활성화시켜 세포의 성장을 억제시킨다고 알려져 있다¹³. p73은 p53처럼 중요한 아미노산 서열을 가진 단백질로 p53의 특정 DNA결합에 관련된 아미노산의 잔재가 p73에도 존재한다는 점으로 미루어 구조적으로 거의 동일한 유사체로 알려져 있다¹⁵. p73은 염색체 1의 짧은 팔에 존재하는데 이 부위는 신경모세포종에서 빈번히 결손되어 나타난다¹⁷. p73의 과잉생산 시 p53에 반응하는 유전자의 전사를 활성화시켜 세포의 예정사(programmed cell death)를 유도하여 세포성장을 억제하는데 이러한 과정은 p53의 작용과 흡사하다⁶⁰. p73은 서로 다른 p73mRNA의 carboxy 말단에의 첨가로 p73 α 와 p73 β 로 구분할 수 있는데 두 동형체 모두 p53구조와 유사한 residue를 가지며 DNA 인식에 관여한다¹⁴. 두 개의 돌연변이 p73 plasmid 중 하나는(Arg292) histidine으로 변할 수 있고, 대응하는 p53 돌연변이(Arg273)는 정상적 p53 DNA와 결합하지 못해, 전사의 활성화를 방해하여 종양억제기능이 없어지게 된다¹². p73과 p53의 구조적, 기능적 동일점과 차이점을 알아보는 실험적 방법으로는 SAOS2 세포의 chloramphenicol acetyltransferase(CAT) activity 정도를 측정하여 정상체와 돌연변이체의 발현여부를 평가하는 것을 들 수 있다⁶⁰. 또, target gene인 p21의 발현여부를 정량적으로 평가하기 위하여 면역형광염색법을 이용하기도 한다⁷¹. CAT 활동도 평가 시 정상 p53이나 정상 p73 동형체 모두 p21을 전사시켜 CAT 활동을 나타내지만 p53 돌연변이의 경우 활동도를 나타내지 못한다는 사실은 p53과 p73이 종양억제유전자라는 사실을 증명하고 있다. 추가적으로 p53 결합 부위가 결손된 p21 promoter mutant는 p53이나 p73에 의해 영향을 받지 않는 것으로 보고하고 있다⁷². 즉, p21은 p53 돌연변이나 p73 돌연변이에 의해서는 유도되지 않으며 오직 정상형태에 의해서만 유도된다는 사실을 알 수 있다. 정상 p53은 예정사를 통해서 세포의 성장을 억제하는데 p73역시 같은 방식으로 세포의 예정사를 유도한다. p73은 과잉 생산 시 종양억제유전자로서의 역할을 수행하는데 생리적 환경에서도 같은 역할을 하는지는 더욱 연구해야 할 문제이다. p73은 p53과는 달리 UV 조사 같은 DNA 상해요소에 의해 유도되지는 않는다. 결국 구조는 p53과 비슷하나 다른 신호에 의해 유도되고 다른 역할을 수행하여 세포의 항상성을 유지한다고 보고되고 있다⁶⁰. 염색체 1p36에는 둘 또는 그 이상의 신경모세포종 억제유전자가 존재하는데 p73은 아주 작은 위치(1p36.33)를 차지하고 있으며, 잘 결손되어 나타난다^{14,17,36}. 특히, 1p36.33부위는 신경모세포종 뿐만 아니라 악성흑색종, 장암, 간세포암, 유방암 등에서도 빈번히 결손되어 나타나는 부위이다^{45,39,41}. p73의 신경모세포종에서의 발현에 관해서는 많은 논란이 있는데 Kaghad 등¹⁶은 신경모세포종 세포주와 정상 말초혈구세포에서 오직

p73만이 유전적 대립형질로부터 단일형질만이 발현된다고 보고하여 p73이 종양억제유전자임을 시사했으나 다른 조직에서는 양성대립형질로 표현되면서 특정부위에서만 단일형질로 표현될 수 있는가에 대한 의문이 제기되었다⁴². 반면 Mai 등⁴³은 정상 폐조직에서도 p73은 단일형질로 발현되어 폐에서는 p73이 종양억제유전자의 기능보다는 종양유전자로 발현됨을 보고하였다. p73위치에 반접합체로 남아있는 p73 대립형질에는 돌연변이가 일어나지 않는데^{44,49} 이와 같은 사실은 p73의 반접합성이 신경모세포종을 일으킨다는 것을 암시하고 있다. 즉 1p36에서 p73은 monoallelically expression을 나타낸다는 보고가 있으며¹⁶ 반면 돌연변이 p53은 신경모세포종에서는 아주 드물게 나타나는데 이와 같은 사실은 p73은 전구세포에서는 p53과 같은 단백질 계열로 작용하지만 결과적으로는 p53보다 비 활성화되는 것으로 간주된다. 그래서 p53 보다는 p73이 neuroectodermal origin 인 세포에서는 종양억제유전자의 역할을 하므로 p73의 비 활성화가 일어나게 되면 p53의 변성은 큰 영향을 미치지 못한다고 하는 보고도 설득력이 있다.⁴⁷ 어떤 세포유형이 정상적으로 p73을 생산하고, p73의 비 활성화는 어떤 역할을 하는지는 앞으로 더욱 연구해야 할 대상이다. 즉 또 다른 p53 family가 존재할 수 있다는 사실을 암시하고 있다. 악성흑색종의 경우 p53 돌연변이는 나타나지만 p73은 상염색체 돌연변이를 나타내지 않으며 p73 locus에서 대립형질 상실도 전이된 암 종에서만 20% 정도로 작게 나타난다는 보고는 p73은 악성흑색종에서 특정한 역할을 하지 않는다는 사실을 증명하고 있다. 또 악성 흑색종의 RT-PCR 결과 p73은 양성종양, 원발성 및 전이성종양에서 낮은 발현양상을 보였고 원발성종양세포주에서는 다양한 양상으로 발현되었는데 이 역시 특정역할이 없었다는 사실을 증명한다⁴⁷.

이와같이 인체에 발생하는 종양에 따라 p73 발현에 관하여 다양한 결과가 보고되었다.

본 실험에서 정상구강상피세포와 원발성 및 전이성 구강편평세포암종 세포주의 배양 후 조직학적 관찰결과 전이성 세포암종 HN19에서 경도의, HN8과 HN12에서는 중등도의 분화도를 보였고, 정상구강상피세포와 원발성 구강편평세포암종 세포주에서는 고도의 분화도를 나타내었다. 예정사는 정상구강세포에서 많이 나타났는데 이는 endonuclease activation, transglutaminase activation, receptor-mediated phagocytosis 등의 정상적 기전에 의한 것이라고 사료된다⁴⁸. 암종세포주에서도 역시 예정사가 관찰되었는데, 이는 유전적인 세포예정사의 경로를 따르는 것으로 이 경로에는 p53, p73, p21, bcl-2, bax-1 등의 많은 유전자가 관여한다는 보고와 일치함을 알 수 있다.^{49,51}

본 실험에서는 p73의 mRNA 발현을 관찰연구 하였는데, 이는 p53의 경우 많은 연구가 선행된 상태지만 유사한 구조를 가진 p73에 관한 연구는 p53에 비하여 드물기 때문이다. 또한 p21은 p53의 변성에 의하여 영향을 받는 유전자로 세포의 예정사를 유도하는데 중요한 역할을 하므로, p73과의 상관관계를 비교 하였다.

본 실험에서의 p21의 mRNA 발현양상은 정상세포에서보다 원발성 종양세포주와 전이세포주에서 다양하게 표현되었는데, 전

이세포주보다는 원발성 종양세포주에서 과도하게 나타났다. p73과 p21의 발현양상을 양적 상관 관계로 비교해 보면 HN8 전이세포주를 제외하고는 비슷한 양으로 발현되어, p73 역시 p53과 같은 방법으로 target gene인 p21의 전사를 활성화시킨다는 다른 보고들과 일치함을 보였다^{13,15,16}. p73의 mRNA 발현양상은 원발성 종양세포주와 전이성세포주에서 뚜렷한 차이를 나타냈는데 다른 보고들과는⁷ 달리 원발성 3군의 종양세포주 모두에서 과도한 양상을 보였다. p73은 p53과는 달리 돌연변이가 발견되지 않는에도 불구하고 본 실험의 종양세포주에서 과도한 양상을 보여 종양억제유전자로서의 역할을 충분히 수행하지 못한 것으로 나타났는데 이는 악성흑색종에서의 p73의 발현양상을 연구한 다른 보고들의 결과와 일치함을 알 수 있었다^{45,46}. 또한 p53에 비해 종양억제유전자로서의 역할이 낮고, 구조는 p53과 비슷하지만 종양억제의 기전이 다른 것으로 보고한 타 연구결과를 간접적으로 증명하고 있다⁶. 본 실험결과에서 가장 특이할 만한 p73의 발현양상은 원발성 세포암종 세포주에서 과도하게 나타났다는 점이다. p73의 과도한 생산은 p53에 반응하는 p21의 전사를 활성화 시켜 종양억제유전자로서의 역할을 수행한다는 타 보고와는 달리^{15,16}, 원발성 세포주에서 과도한 발현을 보임으로써 특정 역할을 수행하지 못한 것으로 생각되었다. 특히, p73의 경우 p53처럼 돌연변이 형태가 존재하지 않으므로, 의문점을 가지게 하는데 구강암의 경우 p73 단독으로는 종양억제유전자로서의 역할을 충분히 수행하지 못할 것이라는 사실을 뒷받침하는 결과로 보여진다. 즉, 다른 유전자와 상호보완적으로 억제유전자로서의 역할을 수행하거나, p53의 subgroup으로서 존재할 수 있다는 가능성을 배제할 수 없다. 이상의 결과로 미루어보아 아직 밝혀지지 않은 p53의 또 다른 family group의 존재가능성을 예측할 수 있으며, 종양억제유전자로서의 역할에 대한 보다 많은 연구가 뒤따라야 할 것이라고 사료된다. 더불어, p73의 단일 대립형질의 발현과 종양억제유전자로서의 역할을 수행하는 기전 및 p53과의 상관관계에 대해서도 보다 많은 연구가 뒤따라야 구강암의 진단 및 치료에 응용될 수 있을 것이라고 사료된다.

V. 결 론

구강편평세포암종에서 p21 및 p73 mRNA 발현을 연구하여 그 결과를 임상에 응용할 목적으로 정상인 구강상피세포, 구강편평세포암종의 원발성 및 전이성 세포주를 배양 후 total RNA를 추출하여 전기영동을 시행하고 RT-PCR(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)을 거쳐 반정량적으로 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 정상 구강상피 세포의 p21 및 p73 mRNA는 실험군 원발성 세포주에 비하여 상대적으로 낮게 발현되었다.
2. 실험군 원발성 세포주에서 p21 mRNA는 대조군에 비하여 비교적 다양하게 발현되었다.
3. 실험군 전이성 세포주에서 p21 mRNA 발현은 HN 12나, HN 19에서 보다 HN 8에서 과도한 양상으로 발현되었다.
4. 실험군 원발성 세포주에서 p73 mRNA는 대조군에 비하여 4~

5배 과도한 양상으로 발현되었다.

5. 실험군 전이성 세포주에서 p73 mRNA 발현은 대조군과 비슷한 양상을 보였다.

이상의 결과를 종합하여 보면, 구강편평세포암종의 원발성 세포주에서 p21과 p73 mRNA가 특히, p73 mRNA가 대조군에 비해 과도하게 발현된 양상을 보였고, 전이성 세포주에서는 p21 및 p73 mRNA 발현은 거의 없는 것으로 나타났다.

참고문헌

1. Nowell PC, Hungerford DA : A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132 : 1497, 1960.
2. Bishop JM : Viral oncogenes. *Cell* 42 : 23, 1985.
3. Caron : Allelic loss of chromosome 1p36 in neuroblastoma is of preferential maternal origin and correlates with N-myc amplification. *Nature(Genet.)* 4 : 187, 1993.
4. Cheng : Preferential amplification of the paternal allele of the N-myc gene in human neuroblastomas. *Nature* 4 : 191, 1993.
5. Schwab : Genomic instability in 1p and human malignancies. *Genes Chromosomes. Cancer* 16 : 211, 1996.
6. Fujii Chang S, Syrjänen K, Kurvinen, et al : The p53 tumor suppressor gene as a common cellular target in human carcinogenesis. *American J. Gastroenterology* 88 : 174, 1993.
7. Farmer GE, Bargonetti J, Zhu H, et al : Wild-type p53 activates transcription in vitro. *Nature* 358 : 83, 1992.
8. EL-Deiry Ws, Kern SE, Pietenpol JA, et al : Definition of a consensus binding site for p53. *Nature Genet* 1 : 44, 1992.
9. Funk WD, Pak DJ, Karas RH, et al : A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Mol Cell biology* 12 : 2866, 1992.
10. Bargonetti J, Friedman PN, Kern SE, et al : Wild-type but not mutant p53 immunopurified proteins bind to sequences adjacent to the SV40 origin of replication. *Cell* 65 : 1083, 1991.
11. Zambetti GP, Bargonetti J, Walker K, et al : Wild-type p53 mediates positive regulation of gene expression through a specific DNA sequence element. *Genes Dev* 6 : 1143, 1992.
12. Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, et al : Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science* 252 : 178, 1991.
13. Haffner R, Oren M : p53-Biochemical properties and biological effects of p53. *Curr Opin Genet Dev* 5 : 84, 1995.
14. Kaghad M : Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 90 : 809, 1997.
15. Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, et al : Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 265 : 346, 1994.
16. Jost : p73 is a human p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature(Lond)*, 389 : 191, 1997.
17. Versteeg R : 1p36: every subband a suppressor? *Eur.J. Cancer* 31A : 538, 1995.
18. Hosoi G : Low frequency of the p53 gene mutations in neuroblastoma. *Cancer* 73 : 3087, 1994.
19. Vogan K : Absence of p53 gene mutations in primary neuroblastomas. *Cancer Res.* 53 : 5269, 1993.
20. Salley JJ : Histologic changes in hamster cheek pouch during early hydrocarbon carcinogenesis. *JD Res* 36 : 48, 1957.
21. Salley JJ : Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the syrian hamster. *JD Res* 33 : 253, 1954.
22. Steidler NE, Reade PC : Initiation and promotion of experimental oral mucosal carcinogenesis in mice. *J Oral Pathology* 15 : 43, 1986.
23. Zambetti GP, Levine AJ : A comparison of the biological activities of wild-type and mutant p53. *FASEB.J.* 855-865, 1993.
24. Myers EN, Suen JY : *Cancer of the head and neck.* WB Saunders : 782, 1996.

25. Paz IB : Human papillomavirus in head and neck cancer. *Cancer* 79 :595, 1997.
26. Smith CJ : Epidemiology and etiology of malignant tumors of the mouth, jaws and salivary glands. *Edward Arnolds* : 1, 1995.
27. Saiki RK, Gelfand OH, Stoffel S, et al.: primer-directed enzymatic amplification on DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 : 487, 1988.
28. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, et al: Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 2766, 1989.
29. Rowley GD : A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. *Nature* 243 : 290, 1973.
30. Jacoby RF, Lior X, Teng BB, et al : mutations in the K-ras oncogene preneoplastic and neoplastic rat colonic mucosa. *J Clin Invest* 87 : 624, 1991.
31. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC : Mutations in p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature* 342 : 705, 1989.
32. Hollstein M, Sidransky D, Volgenstein B : p53 mutations in human cancers. *Science* 253 : 49, 1991.
33. Levine AJ, Momand J, Finlay C.A : The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 351 : 453, 1991.
34. Donehower LA., Harvey M, Slagle BL : Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors. *Nature* 356 : 215, 1992.
35. Jacks T, Remington L, Williams, et al : Tumor spectrum analysis in p53 mutant mice . *Curr. Biol* 4 : 1, 1994.
36. Pietenpol JA : Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 91 : 1998, 1994.
37. Diller L : Topological control of p21^{waf} expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res.* 55 : 2910, 1995.
38. Takeda O : There may be two tumor suppressor genes on chromosome arm 1p closely associated with biologically distinct subtypes of neuroblastoma. *Genes Chrom. Cancer* 10 : 30, 1994.
39. Dracopoli NC, Harnett : Loss of alleles from the distal short arm of chromosome 1 occurs late in melanoma tumor progression. *Proc. nat. Acad. Sci.* 86 : 4614, 1989.
40. Genurdi M, Tsihira H, Anderson, et al : Distal deletion of chromosome 1p in ductal carcinoma of the breast. *Amer. J. Hum. Genet.* 45 : 73, 1989.
41. Yeh SH, Chen PJ : Frequent genetic alterations at the distal region of chromosome 1p in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Res.* 54 : 4188, 1994.
42. Nomoto S, Haruk N, Kondo, et al : Search for mutation and examination of allelic expression imbalance of the p73 gene at 1p36.33 in human lung cancers. *Cancer Res* 58 : 1380, 1998.
43. Mai M, Yokomizo A : Activation of p73 silent allele in lung cancer. *Cancer Res.* 58 : 2347, 1998.
44. Hartmann A, Blaszyk H, Cunningham JS, et al : Overexpression and mutation of p53 in metastatic malignant melanomas. *Int J. Cancer* 67 : 313, 1996.
45. Papp T, JafariM : Lack of p53 mutations and loss of heterozygosity in non cultured human melanocytic lesions. *J. Cancer Res. clin. Oncol.* 122 : 541, 1996.
46. Florenes VA, Oyjord T, Holm R, et al : p53 allele loss, mutatin and expression in malignant melanoma. *Brit J Cancer* 69 : 253, 1994.
47. Brigit Schitteck, Birgit Sauer, Claus G : Lack of p73 mutations and late occurrence of p73 allelic deletions in melanoma tissues and cell lines. *Int. J. Cancer* 82 : 583, 1999.
48. Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR : Mechanisms and functions of cell death, *Ann Rev, Cell Biology* 7 : 663, 1991.
49. Thompson C: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, *Science* 267 : 1456, 1995.
50. Sporn MB : Carcinogenesis and Cancer : different perspectives on the same disease. *Cancer. Res.* 51 : 6215, 1991.
51. Steller H : Mechanisms and genes of cellular suicide, *Science*, 267 : 1445, 1995.

사진부도 설명

- Fig. 1. Polygonal & spindle shaped epithelial cell with ovoid or spindle shaped nucleus formed colony, and apoptosis was observed more than that of oral squamous cell carcinoma cell lines(IM, ×200).
- Fig. 2. Three or four times enlarged, polygonal cell with nuclear hyperchromatism increased Nucleus/Cytoplasm ratio of well differentiated cell lines(IM, ×200).
- Fig. 3. Polygonal spindle shaped cell with numerous vacuolar of moderate differentiated cell lines(IM, ×200).
- Fig. 4. Almost spindle shaped cell with prominent nucleoli of poorly differentiated cell lines were seen(IM, ×200).
- Fig. 5. Total RNA of oral squamous cell carcinoma cell lines.
- Fig. 6. p21 and p73 mRNA expression of oral squamous cell carcinoma cell lines by RT-PCR.
- Fig. 7. p21 mRNA Determination of Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Lines by RT-PCR.
- Fig. 8. p73 mRNA Determination of Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Lines by RT-PCR.

Abbreviation :

- IM : Inverted Microscope
RNA : Ribo Nucleic Acid
mRNA : messenger Ribo Nucleic Acid
RT-PCR : Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
NHOK : Normal Human Oral Keratinocyte
AP : Apoptosis

사진부도 ①

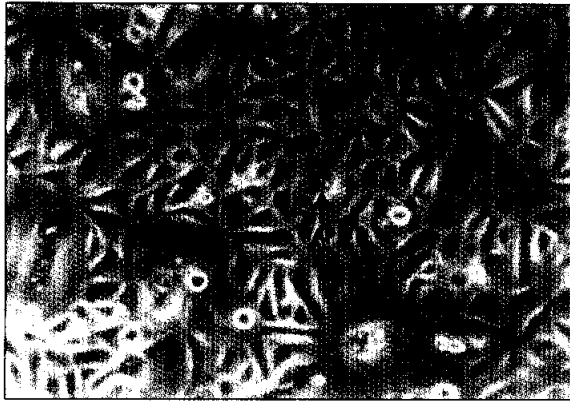


Fig. 1

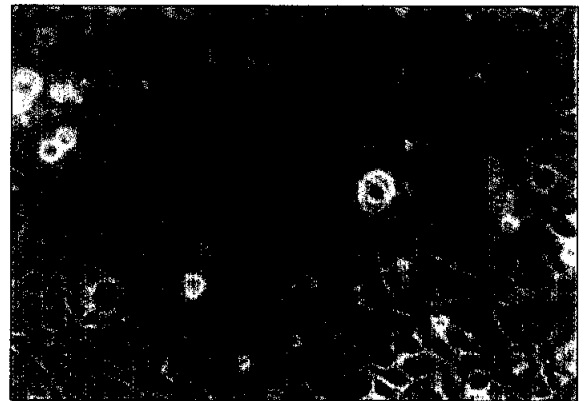


Fig. 2



Fig. 3

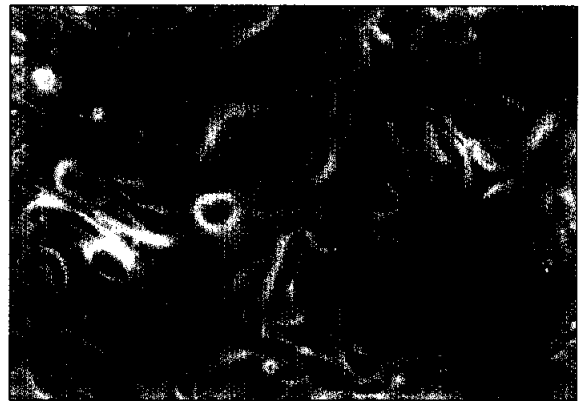


Fig. 4

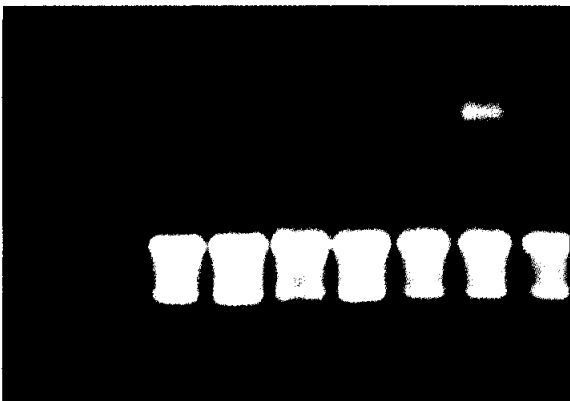


Fig. 5

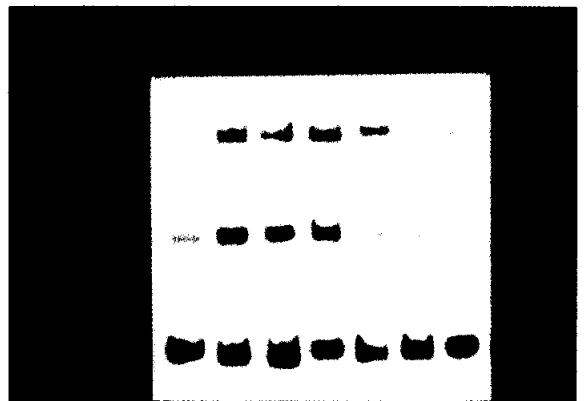


Fig. 6

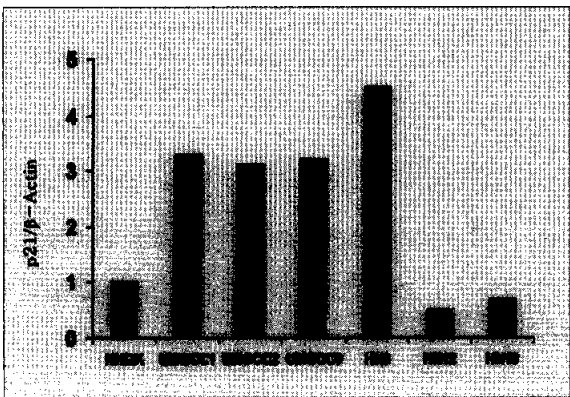


Fig. 7

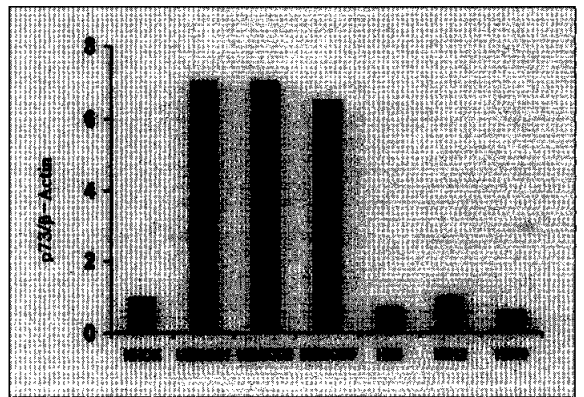


Fig. 8