

구강암세포주에서의 Tamoxifen의 항암효과

정재화 · 윤필영 · 명 훈 · 신재일 · 이종호 · 김명진

서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2003;29:365-373)

ANTICANCER EFFECT OF TAMOXIFEN IN ORAL CANCER CELL

Jae-Hwa Jung, Pil-Young Yun, Hoon Myoung, Jae-Il Shin, Jong-Ho Lee, Myung-Jin Kim

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Seoul National University

Tamoxifen is a selective estrogen receptor antagonist widely used in the management of patients with breast cancer for more than 30 years. It was thought to act primarily through occupying the estrogen receptor sites in ER positive breast cancer cells and directly on cancer cell proper. These inhibitory effects, which have been shown to be independent of the ER, highlight new mechanism of therapeutic action of tamoxifen. The purposes of this study were to identify ER in oral carcinoma cell lines and to evaluate ER independent cytotoxic effect of tamoxifen. KB(SCC), HSC-3(SCC) and A253(ACC) cell line were used and capacity of cell proliferation, apoptosis, in vitro invasion and gelatin zymography were tested. ER expression of each cell line were detected by RT-PCR and immunocytochemistry. Dose dependent inhibition of cell proliferation and inhibition of gelatinolytic activity were observed in all oral carcinoma cell lines and significant difference of apoptotic index were observed in A253 and KB. Tamoxifen inhibited in vitro invasion in all experimental groups. ER expression was detected in KB and A253. These data suggest that tamoxifen may play a role in management of oral carcinoma by independent cytotoxic effect and more advanced research must be processed confirming ER-dependent cytotoxicity.

Key words : Tamoxifen, Oral carcinoma, Apoptosis, Anti-cancer effect, Estrogen

I. 서 론

타목시펜은 (tamoxifen)은 선택적 에스트로젠 길항물질(selective estrogen antagonist)로서 여성에서 많이 발생하는 유방암에 30여년간 사용되어 왔다. 타목시펜의 항암기전에 대해서는 아직 논란이 있는데, 일반적으로 에스트로젠 의존성 유방암 세포에서 에스트로젠과 유사한 경쟁적 억제(competitive inhibition)에 기인한 길항 작용을 통한 항암 기전이 가장 주된 작용으로서 받아들여지고 있다. 즉, 타목시펜과 타목시펜의 체내 대사물질인 14-hydroxy tamoxifen은 (Fig. 1) 유방암 세포에 존재하는 에스트로젠

수용체 (estrogen receptor, ER)에 에스트로젠과 경쟁적으로 결합하여 에스트로젠과 ER과의 결합을 방해함으로써 에스트로젠 의존성 유방암 세포를 세포사 (apoptosis) 시킨다는 기전이다^{1,2)}. 또한 타목시펜은 체내 다른 부위의 세포에서는 반대로 작용을 나타내는데 여성의 자궁 (endometrium) 세포와 골세포에서는 에스트로젠 유사작용 (estrogen like action)을 나타내어 타목시펜을 오래 투여한 여성의 경우, 골다공증이 예방되는 현상과 자궁암이 새로이 발생하는 현상을 보인다^{3,6)}. 한편 이러한 타목시펜의 항암 효과에 대해서 에스트로젠에 대한 길항기전 이외에 에스트로젠과 관련없이 직접적인 세포살상능이 있는 것으로 보고되어 에스트로젠과 관련 없는 다른 항암기전이 있는 것으로 가정되고 있는데, 이는 세포내에 ER이 없는 ER(-) 유방암 세포에서도 타목시펜의 세포사효과를 관찰할 수 있기 때문이다^{7,9)}.

구강내 발생하는 암종은 가장 호발하는 편평세포암종을 비롯하여 타액선에 발생하는 타액선 암종등, 그 성상이 매우 다양하고 침습 및 전이가 심하여 예후가 좋지 않다. 특히 암종세포에서 분비되는 MMP-2 (Gelatinase A)와 같은 단백질효소에 의해 기저막 (basement membrane)을 녹이고 주위 조직으로 침습하여 원

김 명 진

서울시 중로구 연건동 28번지

서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Myung-Jin Kim

Dept. of OMF, College of dentistry, Seoul National University

28-2, Yun-Gun dong, Chong-No gu, Seoul, South Korea

Tel: 82-2-760-2632 Fax: 82-2-766-4948

E-mail: myungkim@plaza.snu.ac.kr

* 이 논문은 2002년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구 되었음(KRF-2002-041-E00224).

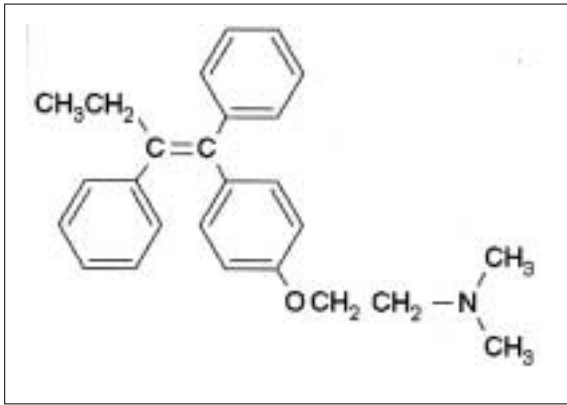


Fig. 1. Chemical structure of Tamoxifen

격 전이하는 성질이 강해 수술 등의 주치료 후에도 미세침습에 의한 재발이 많은 실정이다.

구강내 타액선 종양중에는 유방암의 조직학적 소견과 거의 유사한 경우가 많으며¹⁰ 구강내에 이하선,악하선,설하선과 같은 대타액선외에도 많은 소타액선이 존재하며, 타액선 기원 암종이 아닌 경우에도 조직학적으로 타액선 성상이 혼재되어 보이는 경우가 종종 있어 유사한 선조직 (glandular tissue)이 많은 유방암에 사용되는 타목시펜과 같은 약제를 구강암에 적용할 수 있는 가능성이 있다고 사료된다¹¹. 그러나 타액선 종양을 비롯한 구강암에서의 ER의 존재여부는 검증된 바가 거의 없으며 타목시펜을 이용한 구강암 치료 연구 역시 거의 시도된 바 없다. 본 연구의 목적은 타액선이 풍부한 구강내에 발생하는 타액선 암종 및 구강편평세포암종의 세포주를 이용하여 ER의 존재유무를 확인하고, 타목시펜을 적용하여 우선 타목시펜의 에스트로젠 비의존성 직접 세포살상능(ER independent direct cytotoxicity)을 평가하고, 마찬가지로 에스트로젠에 비의존적으로 침습 및 젤라틴 용해능에 미치는 영향을 평가하여 타목시펜의 구강암에 대한 치료제로서의 가능성을 평가하는데 있다.

II. 연구재료 및 방법

1. 세포주 및 세포배양

사용한 세포주는 구강편평세포암종 세포주인 KB (squamous cell carcinoma)와 HSC-3 (squamous cell carcinoma), 악하선암종 세포주 A253 (submandibular gland adenocarcinoma)이었으며, 유방암세포주인 MCF-7 (ER+ breast carcinoma)과 MDA-MB-231(ER-breast carcinoma) 그리고 섬유육종 세포주인 HT1080 (fibrosarcoma)를 각 실험의 대조군으로 이용하였다. 각 세포주는 세포 배양용 플라스크(80cm², Nunc, Denmark)를 사용하여 10% FBS, 1% 항생제(Gibco, USA)가 포함된 MEM(Minimum Essential Medium) 4ml로 37°C, 5% CO₂, 95% 상대습도 하에서 배양하였다.

2. 세포증식능 검사 (MTT assay)

96 well plate에 5×10⁴ cells/well 세포를 넣은 후 70-80% confluence에 이르렀을 때 타목시펜을 2.5μM~12.5μM/12h로 적용하고 농도에 따른 항암 감수성을 측정하였다. 우선 PBS(pH 7.2)로 2회 세척한 후 잔여액은 피펫으로 제거하고 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dimethyltetrazolium bromide(MTT, Sigma Chemical Co.,US)를 PBS에 2mg/ml이 되도록 녹인 후 각 well에 50μl씩 첨가하고 37°C, 5% CO₂, 95% 상대습도하 배양기에서 4시간동안 배양 후 MTT용액을 버리고 DMSO액을 넣어 용액을 균일하게 혼합하였다. ELISA READER에서 파장 540nm로 흡광도를 측정하였다.

3. 아포프토시스 검사

아포프토시스 세포와 소체는 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)를 사용하여 염색하였다. 세포를 gelatin coated cover glass에서 배양 후 MTT 검사에서 유의하게 세포사를 일으킨 최소 농도인 7.5 μM의 타목시펜을 12시간 적용 후 PBS 용액 (PBS, 50mM sodium phosphate, pH 7.4, 200 mM NaCl)으로 세척하고 4% Paraformaldehyde (pH 7.4)로 고정한 후 다시 PBS 용액으로 세척하였다. dUTP(deoxy-Uracil Triphosphate)-digoxigenin을 포함하는 equilibration buffer를 첨가하고 TdT 효소를 각 절편 위에 점적한 후 섭씨 37도에서 1시간 동안 배양하였다. 다시 슬라이드를 stop/wash buffer에 넣어 반응을 종료시킨 뒤, 다시 세척을 한 후 anti-digoxigenin-peroxidase를 슬라이드 위에 첨가하였다. 슬라이드를 세척하고 NBT-BCIP substrate 용액을 첨가하였고 다시 증류수로 세척한 후, Hematoxylin으로 대조 염색하였다. 아포프토시스 지수는 모든 종양 세포 수에 대한 아포프토시스 염색에 대해 양성으로 나타나는 세포나 소체 수의 비율로 하였다. 최소한 5군데를 골라 광학 현미경 시야 400배에서 3000개의 세포를 세어 그 비율을 측정하였다.

4. in vitro invasion assay

Matrigel[®] matrix가 도포된 9 mm 세포배양 삽입판(cell culture inserts: pore size, 8 μm; Becton Dickinson, USA)을 24-well plate (Costar, USA)에 장착하고, well 당 5x10⁵개의 세포를 삽입판의 상층에 산정하여, 비혈장(serum free) DMEM에서 MTT검사에서 유의하게 세포의 성장을 억제시키지 않은 농도 중 임의로 2.5 μM의 타목시펜 농도로 12시간동안 부란하였다. 대조군은 타목시펜 첨가없이 같은 배지에서 배양하였다. 인간 섬유세포육종 세포주 HT1080의 부란 배지 0.5 ml를 삽입판의 하층에 채워 화학주성제(chemoattractant)로 사용하였다. 24 시간 부란 후, 상층에 남아있는 세포를 면봉으로 제거하고, 하층으로 통과한 세포의 수를 측정하기 위하여 5% glutaraldehyde로 고정하고 hematoxylin으로 염색하여, 삽입판의 Matrigel[®] matrix와 각각의 8 μm 미세 소공을 통과한 세포의 총 수를 광학현미경(×100)으로 관찰하였다.

5. Gelatin zymography 및 젤라틴용해능(gelatinolytic activity)의 평가

10 % polyacrylamide separating gel에 젤라틴을 첨가하여 최종농도가 0.1 mg/ml가 되도록 하였다. 타목시펜 처리군은 2.5 μ M의 농도로 12시간동안 비혈장(serum free) DMEM에서 부란 후, 10 ml의 배지를 택하여 0.22 μ m filter로 여과하였으며 농축하였다. 이와 같이 준비한 배지 12 μ l를 sample buffer(10 % SDS, 50 % glycerol, 25 mM Tris-HCl, pH 6.8 및 0.1 % bromophenol blue)와 혼합하여 겔에 적용하고 전기영동을 시행하였다. 전기영동 후에는 겔은 2.5 % Triton X-100에서 30분간 2 회 세척하여 SDS를 제거하였으며, 37 $^{\circ}$ C의 50 mM Tris-HCl과 10 mM CaCl₂를 포함한 substrate buffer(pH 8.0)에서 하룻밤 동안 부란하여 효소반응을 유도하였다. 이후 겔을 상온에서 50 % methanol과 10 % glacial acetic acid에 담긴 0.15 % Coomassie blue R250으로 20분간 염색하고, 염색약이 없는 동일한 용액으로 탈색하였다. HT1080의 배지를 양성 대조군(positive control)으로 사용하였으며, 같은 양의 타목시펜을 포함한 신선한 비혈장(serum free) DMEM을 내부 음성 대조군(internal negative control)으로 사용하였다. MMP-2의 비활성 상태(72 kDa)와 활성 상태(62 kDa)의 젤라틴용해능은 최초 배양된 정상 구강점막 섬유아세포의 배지 10 μ l(총 단백질 0.5 μ g) 중 MMP-2 비활성 상태의 용해능을 MMP-2의 10 상대단위(arbitrary unit: U)로 정의하였다. 비활성 상태와 활성 상태의 용해능 및 총 효소 용해능은 TINA 2.0 software (Germany)를 이용한 2-dimensional densitometric analysis로 측정하였다.

6. ER의 검출 (RT-PCR 및 immunocytochemistry)

구강암세포주에서의 ER mRNA 발현을 평가하기 위하여, 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction: RT-PCR)을 시행하였다. 5 μ g의 RNA 견본(sample)을 주형으로 42 $^{\circ}$ C 에서 50분간 역전사를 시행하였고, cDNA와 10 pmol의 특정 시발체(specific oligonucleotide primer), 200 μ M dNTP 그리고 0.5 U의 Taq DNA polymerase (Perkin Elmer, USA)를 이용하여 중

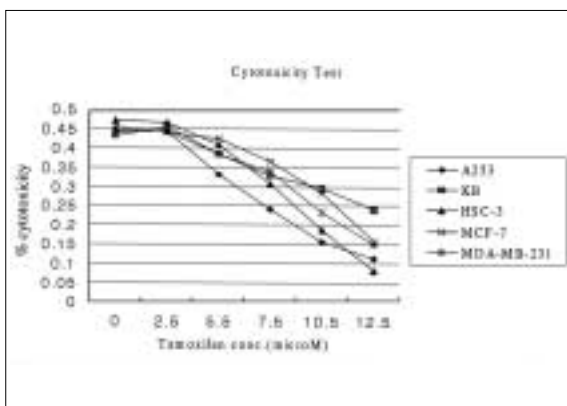


Fig. 2. MTT test. (%cytotoxicity = OD experimental / OD blank)

합효소 연쇄반응을 시행하였다. 중합효소 연쇄반응은 automated thermal cycler (Perkin Elmer, USA)에서 94 $^{\circ}$ C 에서 30초간 변성, 58 $^{\circ}$ C 에서 30초간 가열냉각 그리고 72 $^{\circ}$ C 에서 60초간 연장을 주기로 30회 시행하였다. 인간 ER의 시발체(oligonucleotide primer)의 염기배열은 이전 연구에서 사용된 정보를 이용하였다.¹²⁾ PCR 산물은 PCR product purification kit (Boehringer Mannheim, Germany)을 이용하여 정제하였다. ER의 구강암 세포주 내 분포 및 발현을 정성적 평가하기 위하여 gelatin coating slide에서 배양한 구강암 세포주를 PBS로 2회 세척하고, 4% paraformaldehyde (pH 7.4)를 이용하여 고정 후, 0.2% Triton X-100으로 30분간 permeabilisation시켰다. PBS로 3회 세척 후, blocking 용액을 이용하여 비특이적 반응을 예방 후, ER의 1차항체 (mouse monoclonal IgG-ER)을 1시간동안 적용하였다. 이차항체는 anti mouse IgG-FITC를 이용하여 반응시켰으며 Glycerol로 마운팅하여 형광현미경으로 관찰하였다.

III. 결 과

1. 세포주 증식능에 미치는 영향

흡광도를 %cytotoxicity로 환산하여 약물농도에 대해 그래프로 나타낸 결과 각 세포주는 명확한 농도 대비 증식능의 음의 상관 관계를 보이고 있었다. 각 세포주 간 증식능의 차이는 통계적 유의성을 보이지 않았다(Fig. 2).

2. 세포사지수

아포프토시스 세포는 염색질이 농축되고, 인이 붕괴되어 있고 핵의 변연부에 염색질이 농축되어 초생달 모양을 형성하고 있는 세포로 보였으며, 아포프토시스 소체는 갈색으로 진하게 염색되며, 직경이 4 μ m 이상되는 크고 둥근 핵 잔유물이 소체 내, 외에 관찰되었다(Fig. 3). 현미경적 소견에서, 타목시펜을 투여한 실험군의 세포는 핵이 농축되고, 크로마틴이 핵막주위로 퍼지며, 세포의 크기가 거대해지는 전형적인 세포사 소견을 보였다. 아포프토시스 양성으로 염색된 비율인 세포사 지수는 KB(76.5 \pm 0.21%)와 A253(83.7 \pm 0.28%)이 유의하게 높은 수치를 나타냈으며, 그 외에는 세포주 간 유의한 차이를 보이지 않았다. 다른 편평세포암종 세포주인 HSC-3의 아포프토시스 지수는 49.4 \pm 0.24%이었고, 유방암 세포주인 MCF-7의 지수는 40.4 \pm 0.67%, MDA-MB-231은 43.2 \pm 0.19%이었다(Table 1).

Table 1. Apoptosis index

Cell lines	Apoptosis Index (\pm SD %)	
KB	76.5(\pm 0.21)*	<i>p</i> <0.05
HSC-3	49.4(\pm 0.24)	
A253	83.7(\pm 0.28)*	
MCF-7	40.4(\pm 0.67)	
MDA-MB-231	43.2(\pm 0.19)	

* : significantly lower than the control group (*p*<0.05)

3. in vitro invasion assay

모든 구강암세포주에서 타목시펜을 투여한 실험군은 인공 기저막에 대한 세포수준의 침습이 감소하였다(Fig. 4). HSC-3의 경우, 타목시펜 투여군에서 침습세포가 95.3 ± 8.7 개임에 비하여, 대조군에서는 침습 세포가 343.7 ± 27.4 개로 나타났고, KB와 A253의 경우 각각 실험군이 43.7 ± 7.4 개, 32.9 ± 12.7 인데 반해 대조군은 각각 124.8 ± 32.2 , 96.2 ± 25.1 로 통계적으로 유의하게 차이를 나타냈다(Table 2, $p < 0.05$).

4. Gelatin zymography

Gelatin MMP-2의 비활성 상태 및 활성 상태는 각각 72 kDa과 62 kDa의 위치에서 관찰되었다(Fig. 5). 대조군의 젤라틴용해능은 정상 점막 섬유아세포군의 젤라틴용해능보다 높았으며 HSC-3와

KB에서 대조군과 타목시펜 투여군 사이에 유의한 차이를 보였다. A253의 경우, 대조군과 실험군에서의 젤라틴 용해능이 눈에 두드러지게 나타나지 않아 비교에 실패하였다. HSC-3에서의 타목시펜 투여군의 총 용해능은 68.8 ± 27.2 U였으며, 대조군의 총 용해능은 145.6 ± 16.7 U로 나타났다($p < 0.05$). KB의 경우, 대조군이 84.4 ± 7.2 , 타목시펜 투여군이 16.2 ± 1.8 U로서 유의한 차이를 보였다 (Table 3, $p < 0.05$).

5. ER의 발현

RT-PCR 결과, ER의 mRNA는 KB세포주와 A253세포주에서 발현이 되고 있었으며, HSC-3에서는 발현이 되지 않았다(Fig. 6). Immunocytochemistry결과 ER은 KB세포주와 A253세포주의 세포질과 세포막에 전반적으로 발현되는 것으로 나타났다(Fig. 7).

Table 2. The effect of tamoxifen on the in vitro invasion

	Penetrating cells (number/obs.field)		
	HSC-3	KB	A253
Control group	343.7 ± 27.4	43.7 ± 7.4	32.9 ± 12.7
Tamoxifen treated group	$95.3 \pm 8.7^*$	$124.8 \pm 32.2^*$	$96.2 \pm 25.1^*$

* : significantly lower than the control group ($p < 0.05$)

Table 3. The effect of tamoxifen on the gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase-2(MMP-2)

	Mean gelatinolytic activity (units/ μ g)		
	HSC-3	KB	A253
Control group	145.6 ± 16.7	84.4 ± 7.2	N/d
Tamoxifen treated group	$68.8 \pm 27.2^*$	$16.2 \pm 1.8^*$	N/d

* : significantly lower than the control group ($p < 0.05$), N/d: not detected



Fig. 5. Gelatin zymography

Lane 1 : control
 Lane 2 : KB (non-treated)
 Lane 3 : KB (tamoxifen treated)
 Lane 4 : HSC-3 (non-treated)
 Lane 5 : HSC-3 (tamoxifen treated)



Fig. 6. Expression of ER mRNA in RT-PCR

Lane 7 : HT1080
 Lane 8 : HSC-3
 Lane 9 : A253
 Lane 10 : KB
 Lane 11 : MCF-7 (+ control)
 Lane 12 : MDA-MB-231 (-control)

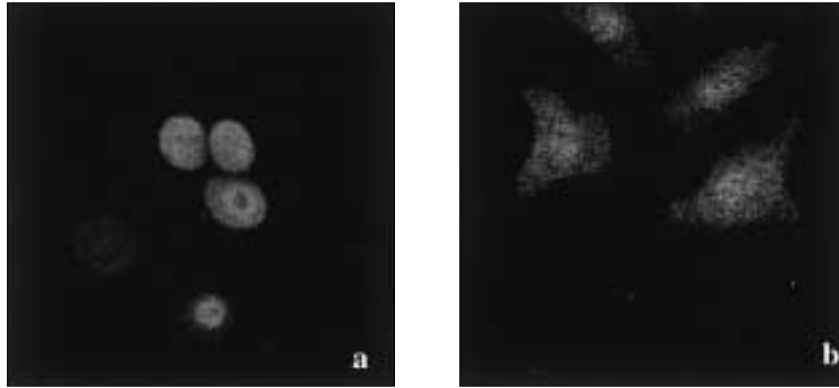


Fig. 7. Confocal microscopic view of ER in oral cancer cell lines, note the diffuse expression of ER immunoreactivity mainly in the cytoplasm and cell membrane
a : ER expression in A253 cell
b : ER expression in KB cell

IV. 고 찰

타목시펜은 1960년대 초에 개발되어 현재까지도 진행성 유방암환자의 초기치료, 전이성 유방암의 치료, 초기유방암의 보조적 치료요법으로 쓰이고 있다. 타목시펜이 신체 각 부위별 세포에서 에스트로젠 수용체에 결합하여 선택적으로 각기 다르게 작용함으로 인하여 타목시펜의 투여환자에서 항암작용 외에도 여러 가지 작용이 나타나는 것으로 알려져 있는데 골다공증 (osteoporosis) 과정을 둔화시키고 혈관경화성 심장질환 (atherosclerotic heart disease)를 저해하며 폐경기시 나타나는 여러 가지 부인과적 증상을 완화시키는 유익한 작용과 더불어 폐전색증 (pulmonary embolism), embolic stroke 등 혈전병 (thrombotic event)의 위험을 증가시키고 자궁암의 위험성을 증가시켰다는 보고가 있다.^{13,15)}

유방암의 에스트로젠 의존성은 oophorectomy, adrenalectomy 등의 수술 후 에스트로젠의 분비가 감소되면 암증이 감소 (regression)되는 현상을 통해 알 수 있다.^{16,17)} 타목시펜은 이러한 에스트로젠과의 경쟁적 길항작용을 통해 유방암에 작용한다고 알려져 있으나 에스트로젠 비의존성 항암효과에 대한 보고도 많아 논란이 되고 있다. 즉 타목시펜의 주된 항암작용이 ER의존적이라는 의견에도 불구하고 ER(-) 유방암환자와 악성흑색종, pancreatic carcinoma, renal cell carcinoma 등 상피기원의 몇몇 암종에서도 항암효과를 보인것으로 나타났다.^{18,21)} ER(-)인 유방암에서 나타나는 타목시펜의 항암작용에 대해서 TGF-beta의 억제와 IGF-1의 증가를 통해 에스트로젠과 상관없이 항암작용을 나타낸다는 보고가 있고²²⁾ 세포주기 (cell cycle)상에서 G0나지 G1 arrest 시키기 때문이라는 보고와 세포내 텔로머라제 (telomerase)의 저해를 통해 세포사를 유도한다는 보고도 있으며 p21등과 같은 세포주기 조절자 (cell cycle regulator)에 작용하여 항암작용을 일으킬 것이라는 등 여러 가지 설이 있으므로 향후 연구를 통한 검증이 필요하다.¹³⁾ ER에 관계없이 작용하는 타목시펜의 항암 기전에는 여러 가지 설이 제시되었는데 여기에는 항신생혈관화, protein kinase-C, phospholipid C/D, Na⁺/K⁺ ATPase 등의 기능 조절효소 (regulat-

ing enzyme)저해 등 여러 가지가 가정되고 있어^{23,25)} 현재까지 계속적인 연구가 이루어지고 있다.

타액선 종양과 유방암의 성상이 유사한 것에 착안하여 타목시펜의 에스트로젠 의존성 항암효과를 기대하고 타목시펜을 직접 타액선 종양 수술 후 재발한 증례의 치료 목적으로 적용한 보고가 있는데²⁶⁾ 투여 후, 방사선학적 평가에서 부분적으로 효과를 보였으며, 병소의 진행을 정지시켰다고 보고하였다. 그러나 ER의 존재유무를 검증하는 것과 같은 기초적 연구의 배경 없이 실험적으로 시도하였기 때문에 타목시펜의 부분적 치료효과가 ER과 상관성을 가지고 있는 것이었는지 알 수 없었고, 이후 진행된 연구가 없어 보다 기초적 연구의 필요성을 제시하는데 그쳤다. 본 연구에서 대상으로 한 구강암세포주중 타액선 기원 세포주인 A253과 구강편평세포암종 세포주인 KB에서 ER이 발현되었고, 구강편평세포암종 중 HSC-3에서는 ER의 발현이 관찰되지 않았는데, 비록 더 많은 수의 구강암 세포를 조사할 필요가 있으나 이는 구강암에서 ER이 발현되는 경우가 분명히 있음을 알려주는 결과이며, 구강암의 에스트로젠 의존성에 대한 연구가 필요함을 시사하였다. 예비연구결과에 의하면 타목시펜과 길항작용을 하는 에스트로젠 (estradiol; E2)을 함께 적용한 예비실험한 결과, ER의 유무에 따라 세포주별로 다양한 증식능 억제 변이를 보여 타목시펜의 직접적 살상능의 반전 (reversal)을 관찰하였는데 이에 대한 추가적인 연구가 진행되고 있다. 그러나 본 연구에서는 우선 에스트로젠 비의존성 항암효과를 측정하는 것을 목표로 하였고 향후 ER과 관련한 연구결과를 보고하고자 했다. 우선 타목시펜은 타액선 종양세포주인 A253과 구강편평세포주암종 세포주인 HSC-3, KB의 증식능, 그리고 대조군으로 설정한 유방암 세포주 MCF-7 (ER+)와 MDA-MB-231 (ER-)의 증식능을 모두 농도의존적 (dose dependent)으로 억제하였으나 각 세포주간 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았으며, 이는 타목시펜의 ER 비의존성 세포살상능을 시사하는 결과라고 사료된다. 더구나 보다 직접적으로 세포사의 효과를 측정하기 위해 시행한 apoptosis assay에서 A253 세포주와 KB 세포주에서 대조군으로 사용한 유방암

세포주보다 많은 세포사 소견을 나타냈다. 상기한 결과를 놓고 볼 때 최소한 타목시펜의 구강암 세포에 대한 *in vitro* 수준에서의 직접적인 살상능은 검증이 될 수 있다고 사료되며 타목시펜을 구강암에 대한 치료제로서 적용할 수 있는 근거가 될 수 있다고 사료된다. 특히 타액선 암종은 성관련 호르몬의 영향을 많이 받을 가능성이 높고 성관련인자 항암요법의 가능성이 제시된 바 있어^{27,28)} 비록 통계적 유의성을 발견할 수는 없었으나 같은 농도에서 타액선 악성종양 세포주인 A253이 타목시펜 처리에 가장 민감하게 반응한 결과를 고려한다면 유방암과 유사성이 많은 타액선 암종에 대한 타목시펜의 적용가능성이 높다고 여겨진다. 본 연구에서 타목시펜이 직접적 세포사를 시키지 않는 농도하에서 ER의 존재여부와 관계없이 구강암 세포주의 젤라틴 용해능과 *in vitro* invasion을 억제한 결과는 타목시펜이 수술 후 침습과 전이를 억제하는 예방요법으로서 적용될 가능성을 시사한다. 이전 연구에 의하면 타목시펜이 다른 항암제와의 상승효과 (synergism)를 보였고 항암제 내성 암세포에 대해서 내성 억제 효과 (reversal effect)를 보였는데^{7,29,30)} 이는 타목시펜과 다른 항암제와의 병용요법이 구강암에 대한 효과적 프로토콜로 제안될 수 있는 근거가 될 수 있다. 구강암의 나쁜 예후가 술 후 미세침습과 전이에 의한 재발에 기인한다는 점에서 이는 향후 연구에 고무적인 결과라고 보여진다. 증식능 및 세포사 실험과정의 과정에서 사용한 타목시펜의 농도는 각 세포주에서 세포사가 일어나지 않는 농도였기 때문에 실험결과에 있어서 타목시펜의 직접 살상효과에 의한 결과요류는 배제할 수 있었다.

본 연구에서 구강암세포주에 작용한 항암작용의 명확한 기전을 알 수 없었기 때문에 향후 이에 대한 심도깊은 연구가 진행되어야 할 것으로 보이며 더불어 에스트로젠 의존성 항암효과에 대한 검증이 필요할 것으로 보이는데, 우선 구강암종에서의 ER의 발현이 검증되어야 하므로 본 연구에서는 그에 대한 예비결과로서 ER의 mRNA 수준과 단백질 수준에서의 발현도를 평가하였다. ER에 대한 RT-PCR 결과, 타액선 세포주인 A253과 구강평평세포암종세포주인 KB에서 ER mRNA가 발현되고 있음을 확인하였고, immunocytochemistry 후 형광현미경을 이용하여 관찰한 결과, ER 단백질이 세포막에 존재함을 확인하였다. 이는 구강암종에서의 타목시펜의 에스트로젠 의존성 항암효과를 기대할 수 있는 실마리가 될 수 있을 것으로 보이며 차후 이에 대한 연구결과를 보고하고자 한다.

참고문헌

1. Klein-Hitpass L, Ryffel GU, Heitlinger E, Cato AC. A 13 bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor. *Nucleic Acids Res.* 1988 Jan 25;16(2):647-63.
2. Hyder SM, Stancel GM. In vitro interaction of uterine estrogen receptor with the estrogen response element present in the 3'-flanking region of the murine c-fos protooncogene. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1994 Jan;48(1):69-79.
3. Hyder SM, Nawaz Z, Chiappetta C, Stancel GM. Identification of functional estrogen response elements in the gene coding for the potent angiogenic factor vascular endothelial growth factor. *Cancer*

- Res. 2000 Jun 15;60(12):3183-90.
4. Cowley SM, Parker MG. A comparison of transcriptional activation by ER alpha and ER beta. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1999 Apr-Jun;69(1-6):165-75.
5. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* 1995 May;146(5):1029-39. Review.
6. Rak J, Filmus J, Kerbel RS. Reciprocal paracrine interactions between tumour cells and endothelial cells: the 'angiogenesis progression' hypothesis. *Eur J Cancer.* 1996 Dec;32A(14):2438-50. Review.
7. Shen F, Xue X, Weber G. Tamoxifen and genistein synergistically down-regulate signal transduction and proliferation in estrogen receptor-negative human breast carcinoma MDA-MB-435 cells. *Anticancer Res.* 1999 May-Jun;19(3A):1657-62.
8. Charlier C, Chariot A, Antoine N, Merville MP, Gielen J, Castronovo V. Tamoxifen and its active metabolite inhibit growth of estrogen receptor-negative MDA-MB-435 cells. *Biochem Pharmacol.* 1995 Jan 31;49(3):351-8.
9. Perry RR, Kang Y, Greaves B. Effects of tamoxifen on growth and apoptosis of estrogen-dependent and -independent human breast cancer cells. *Ann Surg Oncol.* 1995 May;2(3):238-45.
10. Ro JY, Silva EG, Gallager HS. Adenoid cystic carcinoma of the breast. *Hum Pathol.* 1987 Dec;18(12):1276-81. Review.
11. Schmitt FC, Zelandi Filho C, Bacchi MM, Castilho ED, Bacchi CE. Adenoid cystic carcinoma of trachea metastatic to the placenta. *Hum Pathol.* 1989 Feb;20(2):193-5.
12. Aldous WK, Marean AJ, DeHart MJ, Matej LA, Moore KH. Effects of tamoxifen on telomerase activity in breast carcinoma cell lines. *Cancer.* 1999 Apr 1;85(7):1523-9.
13. Anolik JH, Klinge CM, Brolly CL, Bambara RA, Hilf R. Stability of the ligand-estrogen receptor interaction depends on estrogen response element flanking sequences and cellular factors. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1996 Dec;59(5-6):413-29.
14. Hyder SM, Stancel GM, Nawaz Z, McDonnell DP, Loose-Mitchell DS. Identification of an estrogen response element in the 3'-flanking region of the murine c-fos protooncogene. *J Biol Chem.* 1992 Sep 5;267(25):18047-54.
15. Altan N, Chen Y, Schindler M, Simon SM. Tamoxifen inhibits acidification in cells independent of the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Apr 13;96(8):4432-7.
16. Levine AC, Liu XH, Greenberg PD, Eliashvili M, Schiff JD, Aaronson SA, Holland JF, Kirschenbaum A. Androgens induce the expression of vascular endothelial growth factor in human fetal prostatic fibroblasts. *Endocrinology.* 1998 Nov;139(11):4672-8.
17. Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, Cannon MJ, Pecorelli S, Parham GP. Secretion of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer. *Eur J Gynaecol Oncol.* 1999;20(3):177-81.
18. Farinati F, De Maria N, Fornasiero A, Salvagnini M, Faggioli S, Chiamonte M, Naccarato R. Prospective controlled trial with anti-estrogen drug tamoxifen in patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci.* 1992 May;37(5):659-62.
19. Wada T, Nishiyama K, Maeda M, Hara S, Tanaka N, Yasutomi M, Kurita T. Combined chemoendocrine treatment with tegafur and tamoxifen for advanced renal cell carcinoma. *Anticancer Res.* 1995 Jul-Aug;15(4):1581-4.
20. Charlier C, Chariot A, Antoine N, Merville MP, Gielen J, Castronovo V. Tamoxifen and its active metabolite inhibit growth of estrogen receptor-negative MDA-MB-435 cells. *Biochem Pharmacol.* 1995 Jan 31;49(3):351-8.
21. Hoelting T, Siperstein AE, Duh QY, Clark OH. Tamoxifen inhibits growth, migration, and invasion of human follicular and papillary thyroid cancer cells in vitro and in vivo. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995 Jan;80(1):308-13.
22. Mullauer L, Grasl-Kraupp B, Bursch W, Schulte-Hermann R. Transforming growth factor beta 1-induced cell death in preneoplastic foci of rat liver and sensitization by the antiestrogen tamoxifen.

- Hepatology. 1996 Apr;23(4):840-7.
23. Auerbach W, Auerbach R. Angiogenesis inhibition: a review. *Pharmacol Ther.* 1994 Sep;63(3):265-311. Review.
 24. Engstrom PF, Levin B, Moertel CG, Schutt A. A phase II trial of tamoxifen in hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 1990 Jun 15;65(12):2641-3.
 25. Wiseman H. Tamoxifen: new membrane-mediated mechanisms of action and therapeutic advances. *Trends Pharmacol Sci.* 1994 Mar;15(3):83-9. Review.
 26. Shadaba A, Gaze MN, Grant HR. The response of adenoid cystic carcinoma to tamoxifen. *J Laryngol Otol.* 1997 Dec;111(12):1186-9.
 27. Shick PC, Riordan GP, Foss RD. Estrogen and progesterone receptors in salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995 Oct;80(4):440-4.
 28. Fan CY, Wang J, Barnes EL. Expression of androgen receptor and prostatic specific markers in salivary duct carcinoma: an immunohistochemical analysis of 13 cases and review of the literature. *Am J Surg Pathol.* 2000 Apr;24(4):579-86.
 29. Werner A, Bender E, Mahaffey W, McKeating J, Marrangoni A, Katoh A. Inhibition of experimental liver metastasis by combined treatment with tamoxifen and interferon. *Anticancer Drugs.* 1996 May;7(3):307-11.
 30. Tsai LC, Hung MW, Yuan CC, Chao PL, Jiang SY, Chang GG, Chang TC. Effects of tamoxifen and retinoic acid on cell growth and c-myc gene expression in human breast and cervical cancer cells. *Anticancer Res.* 1997 Nov-Dec;17(6D):4557-62.

사진부도 ①

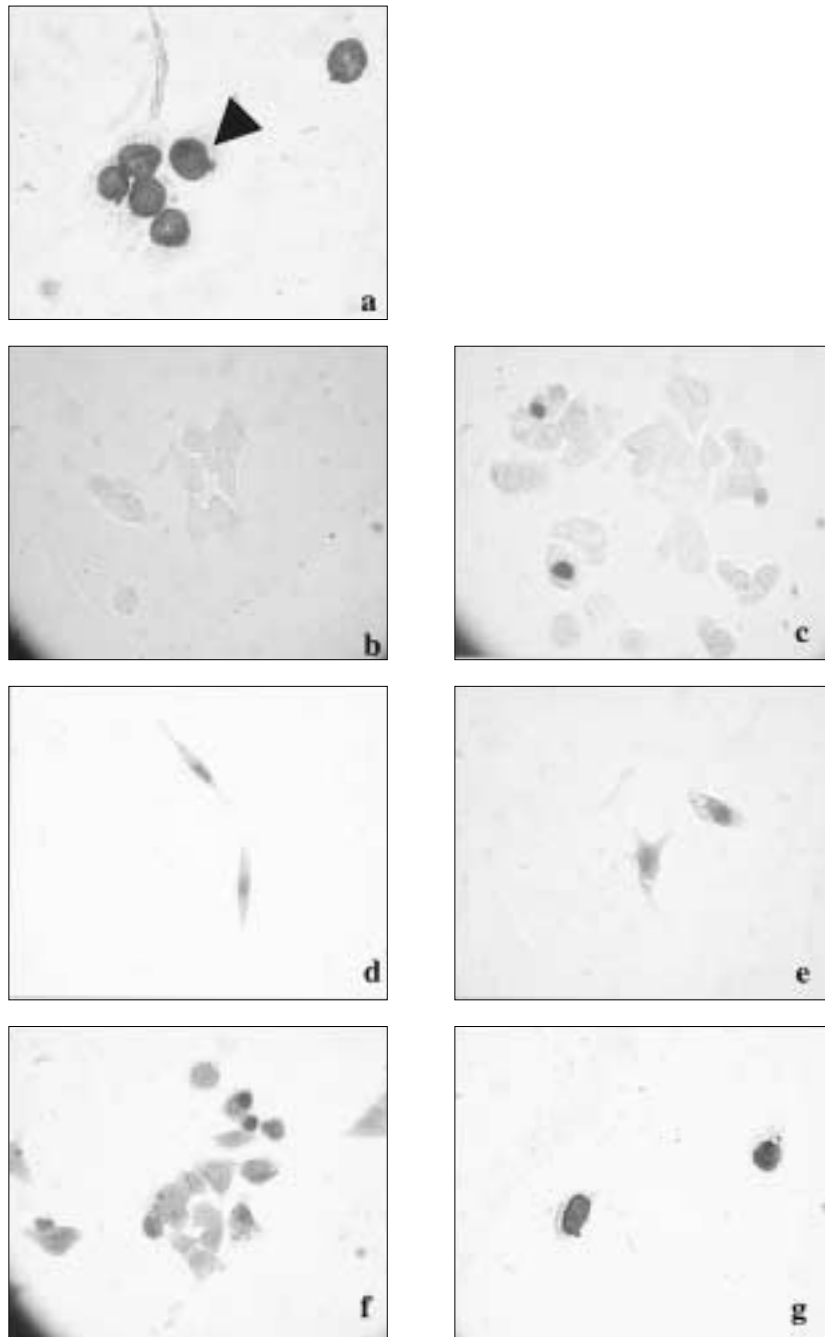


Fig. 3. Apoptosis in Tamoxifen treated cell
a : cellular morphology in apoptotic cell(KB cell)
b : A253-control
c : A253-tamoxifen(5.5 μ M)
d : HSC-3 control
e : HSC-3 tamoxifen(5.5 μ M)
f : KB-tamoxifen(5.5 μ M)
g : KB-tamoxifen(7.5 μ M)
Note enlarged multiple nucleus and chromatin clumping and margination(arrow head)

사진부도 ②

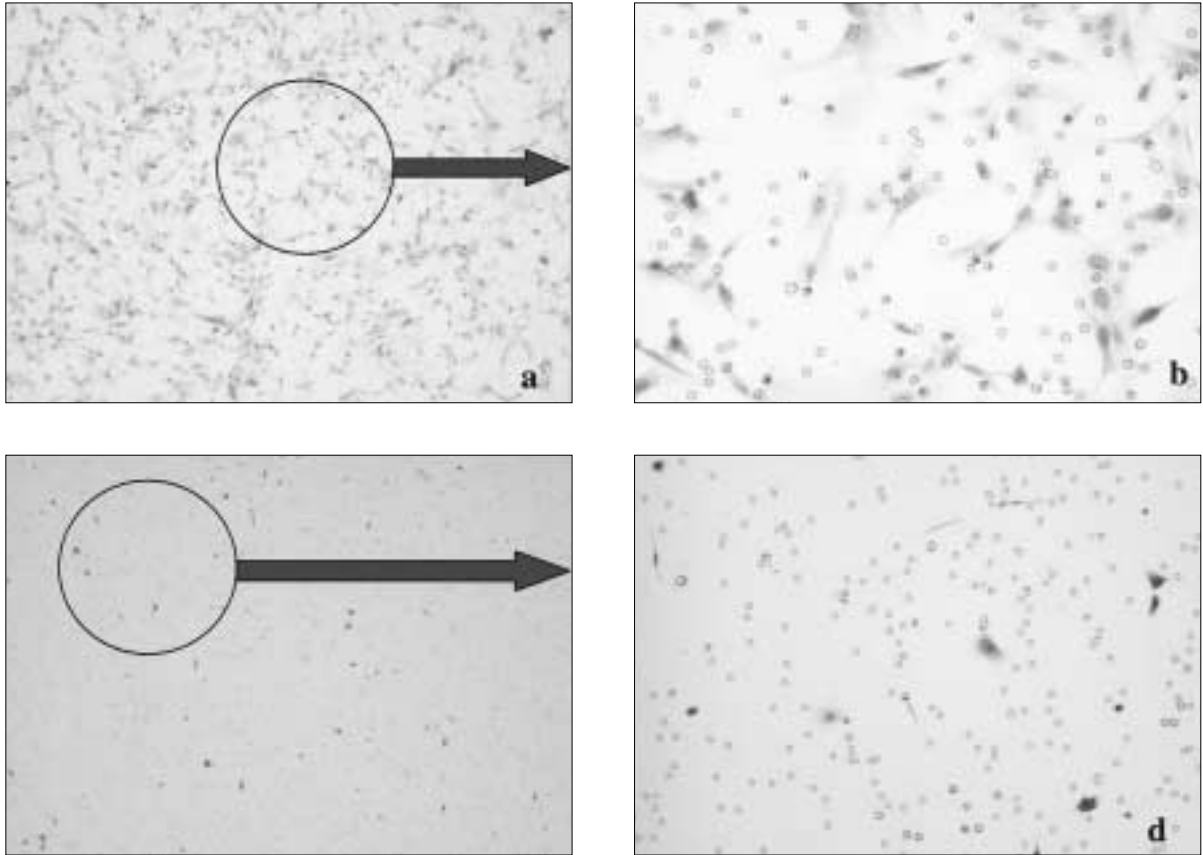


Fig. 4. In vitro invasion assay