

## 이종 이식된 구강편평세포 암종에서 Paclitaxel (Taxol®)의 항암 효과

김기환 · 김철환 · 한세진 · 이재훈  
단국대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

### Abstract

#### THE ANTICANCER EFFECT OF PACLITAXEL(TAXOL®) IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA XENOGRAFT

Ki-Hwan Kim, Chul-Hwan Kim, Se-Jin Han, Jae-Hoon Lee  
*Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Dankook University*

The treatment for oral and maxillofacial carcinoma with chemotherapeutic agents is evaluated by many effective methods to reduce the tumor mass and cancer cell proliferation. However these chemotherapy have many serious side effects, such as bone marrow suppression, renal toxicity, G-I troubles. Therefore a possible approach to develop a clinically applicable chemotherapeutic agent is to screen anticancer activity of Taxol which is known to have very little side effect and have been used to breast cancer and ovarian carcinoma.

Taxol is a new anti-microtubular anti-cancer agent extracted from the bark of the Pacific yew, *Taxus brevifolia*. Paclitaxel(Taxol) acts by promoting tubulin polymerization and over stabilizing microtubules against depolymerization. Despite the constant improvements of methods of the cancer treatment especially chemotherapy, the rate of cancer metastasis and recurrent are not decreased. Thus the investigation of new drug which have very little side effect and a possible clinically application continues to be a high priority. Considering that the Taxol have shown very effective chemotherapeutic agent with relatively low toxicity in many solid tumors, it deserves to evaluate its efficacy in oral squamous cell carcinoma.

In this study, to investigate the *in-vivo* and *in-vitro* anti-cancer efficacy of Taxol in oral squamous cell carcinoma and lastly, the potency of Paclitaxel in the clinical application for oral cancer was evaluated.

In vivo study, after HN22 cell line were xenografted in nude mice, the growth of tumor mass was observed, 3 mg/Kg taxol was injected intraperitoneally into nude mice containing tumor mass. The methods of these study were measurement of total volume of tumor mass, histopathologic study, immunohistochemical study, drug resistance assay, growth curve, MTT assay, flow cytometry, cDNA microarray *in vivo* and *in vitro*.

The results were obtained as following.

1. The visual inspection of the experimental group showed that the volume of the tumor mass was slightly decreased but no significant difference with control group.
2. Ki-67 index was decreased at weeks 4 in experimental group.
3. Microscopic view of the xenografted tumor mass showed well differentiated squamous cell carcinoma and after Taxol injection, some necrotic tissue was seen weeks 4.
4. The growth curve of the tumor cells were decreased after 1day Taxol treatment.
5. According to the MTT assay, HN22 cell line showed relative drug resistancy above 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  concentrations of Taxol.

6. In drug resistance assay, the decrease of cell counts was seen relatively according to concentration.
7. In Flow cytometry, G2M phase cell arrests were seen in low concentration of the Taxol, while S phase cell arrests were seen in high concentration of the Taxol.
8. Using cDNA microarray technique, variable gene expression of ANGPTL4, TXNRD1, FAS, RRAGA, CTGF, CYCLINEA, P19, DUSP5, CEBPG, BTG1 were detected in the oral squamous cell carcinoma cell after taxol treatment.

In this study paclitaxel is effective against oral squamous cell carcinoma cell lines *in vitro*, but week effect was observed *in vivo*. So we need continuous study about anticancer effect of taxol *in vivo* in oral squamous cell carcinoma.

**Key words :** Squamous cell carcinoma, Paclitaxel(Taxol®)

## I. 서 론

구강암은 매년 발생율이 증가하고 있는 추세로 전체 암 발생의 약 4~5%를 차지하고, 그 중 가장 높은 발현 빈도를 보이는 편평세포암종(squamous cell carcinoma)은 주변 조직으로의 침투 및 전이가 높아 예후가 매우 불량한 암으로 알려져 있다. 구강 편평세포암의 치료법은 일반적으로 수술과 방사선 요법을 병행하여 1차 치료를 시행하고, 항암 요법이 추가로 사용되기도 하지만, 재발률이 40~60%에 이른다<sup>1)</sup>. 만약 재발시 추가적인 외과적 절제가 불가능 하다면 항암요법 이외에는 대안이 없다. 항암요법은 다양한 암종에서 효과가 보고되고 있지만 심각한 전신독성과 유해성으로 인해 사용에 한계가 있는 실정이다<sup>2)</sup>.

구강 편평세포암종의 발생원인은 다른 암종과 유사하게 흡연, 음주, 발암물질의 노출, 유전적 원인, 식습관 등으로 알려져 있다. 정확한 발생 기전은 밝혀지지 않은 실정이나, 임상적으로는 국소적 침윤 및 경부 임파절을 통한 전이가 흔히 발생된다<sup>3,4)</sup>.

구강암 환자의 항암화학요법은 원발병소의 크기를 감소시키거나 재발 또는 전이된 경우에 적용되며, 사용되는 약제로는 5-fluorouracil(5FU), methotrexate(MTX), cisplatin 등이 널리 사용되어 왔다. 이들 항암제는 암세포의 DNA복제, 전사, 번역과정을 차단하거나 증식시 암세포의 세포분열을 억제 함으로써 암세포에 세포독성을 발현하여 항암효과를 나타내는데 종양세포에만 선택적으로 작용하지 않고 신체의 타 부위에도 영향을 미칠뿐만 아니라 골수기능저하, 신독성, 간독성, 탈모 및 면역기능 저하 등의 심각한 부작용을 초래하여 광범위하게 적용하기가 쉽지 않다<sup>5)</sup>. 따라서 기존약물에 비해 합병증은 최소로 줄이면서 효과는 증대된 새로운 항암제의 개발을 위해 많은 연구가 시도되고 있다.

Paclitaxel(Taxol)은 태평양 주목(Taxus brevifolia)의

껍질에서 추출한 항암물질로 1971년 Wani와 Wall 등에 의해서 항백혈병 및 항종양 작용이 있음이 밝혀졌다<sup>6)</sup>.

Taxol은 항 미세소관(antimicrotubule) 항암제로 난소암, 유방암, 폐암, 백혈병, 악성흑색종 등에서 항암작용이 관찰되었고, 세포의 성장에서 DNA합성을 억제하고 질편화를 초래하여 세포사멸(apoptosis)을 유도하는 것으로 밝혀졌다<sup>7)</sup>. 또한 기존의 vinca alkaloids계 같은 항 미세소관 항암제들이 미세소관 형성을 억제하는 것과는 달리, 미세소관의 중합에 필요한 튜불린(tubulin)의 최소 농도를 낮추어 미세소관의 중합을 촉진하고 과안정화 시킴으로써 비기능적인 미세소관을 형성하고 염색체 복제를 억제하며 세포들이 G2M기에 머물도록 함으로써 항암효과를 나타낸다고 알려졌다<sup>8-10)</sup>. 그리고 기존의 항암제들이 심각하고 비가역적인 여러 합병증을 유발하는데 비해서 Taxol의 합병증은 비특정성이며, 가역적인 백혈구 감소증, 무증상의 서맥 및 탈모증 등이 나타나나, 심각한 간독성, 소화기계 독성 등은 흔치 않다<sup>11)</sup>. Taxol은 백혈병에 상당한 세포독성을 나타내는 것으로 알려져 있고, 다양한 암종에서 항암 효과가 관찰 되었으나, 종종 Paclitaxel 저항성 암세포들이 보고되기도 하였는데<sup>12-15)</sup>, Paclitaxel 저항성의 다양한 기전은 mdr-1 gene, p-glycoprotein,  $\beta$ -tubulin에서 아미노산의 돌연변이, Bcl-2, Paclitaxel의 결합 실패와 같은 원인 등이 제시되고 있다<sup>16-27)</sup>.

위와는 달리 현재 구강암 분야에서 Taxol의 연구보고는 미미한 실정이며 임상적 적용 또한 많지 않으므로 대표적인 구강암 중 하나인 구강편평세포 암종에서 항암효과를 알아보기 위해 저자는 시험관 내에서 세포주를 배양하여 drug resistance assay, growth curve 관찰, 세포 독성도 검사를 위한 MTT assay, 세포주기 검사를 위해 유세포 분석 등을 시행하였고, Taxol의 생체내 항암효과를 알아보기 위해 누드마우스를 이용하여 종양유도 및 크기 측정, 조직 병

리 관찰, Ki-67을 이용한 면역조직화학 검사, 유전자 발현 검사를 위해 cDNA microarray를 시행하여 다소의 의미있는 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 연구 재료

#### 1) 누드 마우스 준비

누드 마우스는 BALB/c/nu/nu(Charsliver®, USA)를 기본종으로 생후 5~6주된 약 20 g 내외의 수컷 18마리(대조군 6마리, 실험군 12마리)를 사용하였다. 멸균 소독된 쥐장에서 멸균된 물과 사료를 공급하고, 모든 술식은 층판 기류를 지속적으로 유지한 크린 벤취 속에서 시행하였으며 주야간 생물학적 주기를 위해 실내등을 12시간 조영하고, 12시간은 점멸하였다.

#### 2) 구강편평세포암 세포접종체의 준비

HN22 세포주(Main state university, USA)를 기본 세포주로 하여, 10% FBS(Fetal Bovine Serum) 및 스트렙토 마이신과 페니실린을 포함하는 DMEM(Dulbecco's minimum essential medium, Hyclone®, USA)을 배양액으로 사용하여 배양하였다.

### 2. 연구 방법

#### 1) 종양부피의 측정

준비된 HN22를 누드마우스 한 마리당 50 µl의 배양액에 포함된 10<sup>7</sup>개의 세포를 1 cc 주사기 및 25G needle을 이용하여 누드마우스 등에 피하주사하여 편평세포암종을 유도하고(약 2~4주) 종양 부피가 약 60 mm<sup>3</sup> 이상 되었을 때

실험을 시작하였다. 종양 부피 측정 공식은 (가로 × 세로 × 높이) × ⅓ 를 사용하였다.

항암제 투여는 대조군에서 0.1 cc 생리식염수를 6마리의 누드마우스 복강내 주사하였고, 실험군은 Taxol®(한국 BMS)을 농도별로 3 mg/Kg, 30 mg/Kg를 각각 6마리씩 복강내 주2회 주사하였는데, 30 mg/Kg군은 주사 후 모두 사망하였다.

#### 2) 조직병리학적 연구

실험(Taxol주사)시작 4주후 각 실험군과 대조군의 종양 조직을 절취하여 10% 중성 포르말린에 고정후 4~5 µm 두께에 파라핀 절편을 제작하고 통법에 따라 Hematoxyllin-Eosin(H&E) 염색을 시행하여 광학현미경 하에서 100배 및 200배로 관찰하였다.

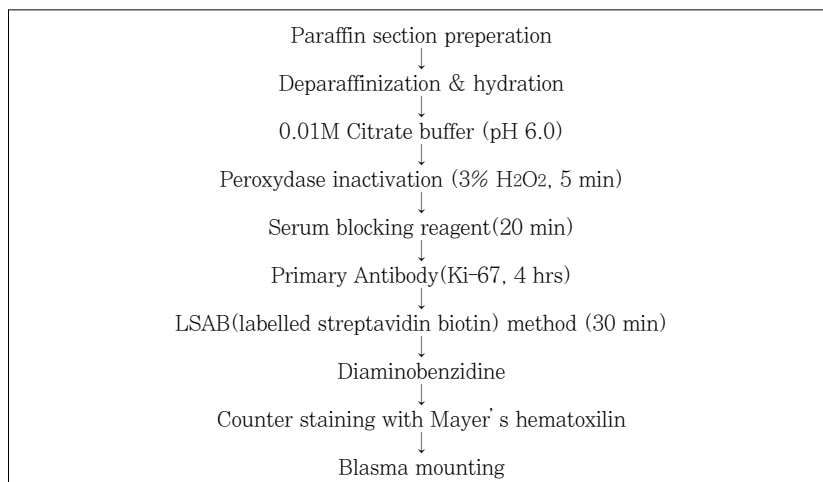
#### 3) 면역조직화학적 연구

절취한 조직을 통법에 따라 고정후 Poly-L-Lysin으로 처리된 슬라이드에 4~5 µm 파라핀 절편을 제작하고 면역조직화학적 염색을 시행하기 위하여 절편을 0.01M citrate buffer(pH 6.0)로 끓인 다음 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 5분간 부란시키고 10mM phosphate buffer solution(PBS)으로 세척한 다음 LSAB(labelled streptavidin biotin)법으로 처리하고 다시 PBS로 세척한 후 발색제는 diaminobenzidine을 사용하였다. 발삼으로 봉입한 다음 메이어 헤마톨실린으로 대조 염색을 실시하여 광학현미경으로 200배하에서 관찰하였다(Table 1). Ki-67지수는 아래와 같이 관찰된 증식기 세포수를 모든 세포수로 나눈 후 100을 곱한 %로 표기하였다.

$$\text{Ki-67 index} = \frac{P}{P + NP} \times 100 (\%)$$

(P : Proliferating cell, NP : Non-proliferating cell)

**Table 1.** Procedure for Immunohistochemical Staining



4) 약제내성 검사

4개의 10 mm well에 HN22세포주를  $2 \times 10^5$ 개를 분주하고 배양한 뒤, 2~3일후 Taxol을 농도(1, 3, 5, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )에 따라 넣고 1주일간 배양 후 세포 생존율을 계산하였다.

5) 성장곡선

HN22세포주  $2 \times 10^5$ 개의 세포를 3개의 100 mm well에 분주하고 항암제 농도(1, 3, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )에 따라 각각 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7일째 DPBS로 세포를 세척하고 각 well에 Trypsin-EDTA용액(0.5% Trypsin-0.53mM EDTA 4Na)을 넣고 5분후 세포를 수거하여 원심분리를 하였다. DMEM 배양액 4 ml씩을 원심분리관에 넣고 혼합한 후 90  $\mu\text{l}$ 를 튜브에 옮겨 담았다.

튜브에 0.4% Trypsin-blue 용액 10  $\mu\text{l}$ 를 넣고 혼합한 뒤 헤모사이토펜터에서 세포수를 측정하였다. 측정된 세포수를 이용하여 덧쉬상 세포수를 환산하고 성장곡선을 그렸다.

6) MTT(5-diphenyl dimethyltetrazolium bromide) assay

Well당  $2 \times 10^4$ 개의 세포를 3well에 분주하고 37°C의 CO<sub>2</sub>배양기에서 24시간 배양하였다. 다양한 농도(1, 3, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )의 항암제를 넣고 48시간을 배양 후 tetrazolium-base compound인 3-(4, 5-dimethylthiazole - 2 - yl - 2, 5- di-phenyltetrazolium bromide (MTT) 용액 50  $\mu\text{l}$ 를 각각의 well에 첨가하고 다시 34시간 동안 37°C, 54% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한 후 상층액을 제거하여 MTT에 의해 형성된 결정만 남긴 다음 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 0.2 ml씩 각각의 well에 분주하여 잘 혼합하였다. microplate reader로 파장 550 nm에서 흡광도를 측정하였다(Table 2).

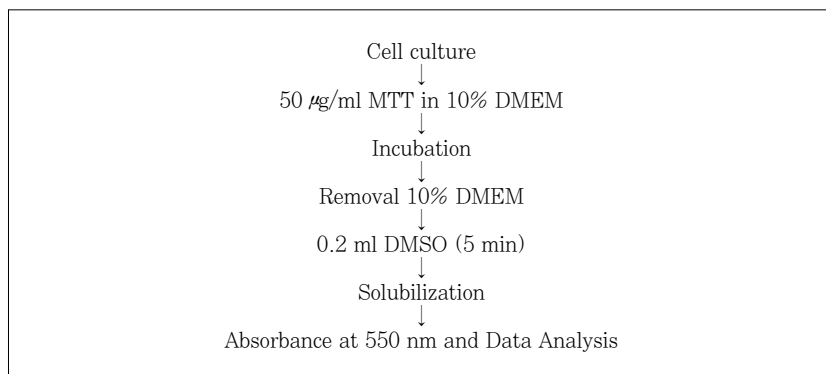
7) 유세포분석

지수 증식기에 있는  $1 \times 10^6$  cells/ml의 세포들에 taxol(1, 3, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 처리한 후, 300  $\times$  G, 5분간 원심분리를 한다. 세포들을 모아서 Cycle TESTTM plus DNA Reagent Kit(BEcton Dickinson immunocytometry system, CA, U.S.A)의 solution A(trypsin buffer) 250  $\mu\text{l}$  씩 첨가한 후 빛을 차단한 냉장실에서 10분 반응시킨다. 반응이 끝난 다음 각 시료를 50 $\mu\text{m}$  nylon mesh에서 filtration한 후에 FAC scan flow cytometer(Becton Dickinson immunocytometry system, CA, U.S.A)를 이용하여 세포주기 분석을 하였다. 결과는 RFIT program으로 분석하여 전체 세포에 대한 비율로 나타내었다.

8) cDNA Microarray

조직 세포에서 RNA 추출을 위해 세포를 1.5 ml E-tube에 담은후 0.1N NaOH 100  $\mu\text{l}$ 를 넣고 끓는 물에서 10분 후 삼차 증류수를 200  $\mu\text{l}$ 를 첨가하고 혼합하여 준 후에 Phenol/Chloroform(1:1) 혼합용액을 400 $\mu\text{l}$  넣어 섞어 준 후 혼합하여 주었다. 혼합된 튜브를 원심분리(13,000 rpm, 10 min, 4°C)한 후에 상층액만을 취하였다. 이어서 전체 부피의 1/10에 해당하는 양만큼 3M Sodium acetate pH 5.2 용액을 넣은 후 잘 섞고, 기존 부피의 2배되는 양의 차가운 99%에탄올을 넣어주었다. 이를 20°C에서 하루 동안 보관한 후 원심분리(15,000 rpm, 5 min, 4°C)를 시행하고, 상층액을 버린후에 pellet만을 취한다음 여기에 70% 에탄올을 500  $\mu\text{l}$ 넣고 5분간 10,000 rpm에서 원심분리를 2번 실행하였다. 튜브를 말리고 얻어진 시편에 삼차증류수를 20  $\mu\text{l}$ 넣고 65°C에서 10분 동안 완전하게 녹인 뒤 20°C에 보관하였다.

**Table 2.** Procedure for MTT Assay



추출한 RNA를 이용하여 target cDNA probes의 합성과 hybridisation과정은 다음과 같이 시행했다.

역전사반응을 위해 반응 혼합물은 400unit의 역전사효소 (superscript II TM, Invitrogen) 2 µg의 Oligo-DT (Amersham Biosciences, UK) 1mM dATP, dCTP and dGTP, 0.6 mM dTTP 그리고 0.1 mM Cy3- 또는 Cy5-dUTP(NEN Life Science Products, Boston, USA)의 혼합물을 42°C에서 2시간 동안 반응시켰다.

역전사 반응동안 total RNA의 각각 50 µg을 Cy-3 또는 Cy5-dUTP로 labelling하였다.

Cy3와 Cy5로 Labelling 된 cDNA를 PCR purification kit(Qiagen, Hilden, Germany)로 정제하였고 정제된 cDNA를 서로 혼합하여 Microcom YM-30(Millipore Corp. Bedford, MA, USA)을 사용하여 농축시켰다. Hybridization 하기위한 혼합물은 39 µl의 labelling된 cDNA target, 25 µl의 20 × SSC, 1 µl의 10% SDS, 30 µl의 formamide(sigma), 1 µl의 muman cot-1 DNA(20 µg/µl, invitrogen), 2 µl의 yeast tRNA(10 µg/µl, invitrogen)과 2 µl의 poly RNA(10 µg/µl, sigma)이며 hybridization 혼합물을 100°C에서 2분간 열을 가한 후 즉시 hybridization시켜 인간 cDNA복제가(invitrogen) 된 cDNA microarray(Gene Track HSV3 307, Genomic Tree, I, Inc, Korea)가 만들어진다. 이 hybridization은 습기가 있는 Hybchamber(Genomic Tree, Inc, Korea)로 42°C에서 12~16시간 동안 이루어졌다. Hybridization이 끝난후 Laser scanner(Axon 4000B, Axon instruments Inc., Foster CA, USA)로 Image scanning을 시행하였다. 형광강도는 Genepix pro4.0 software (Axon instruments Inc, Foster, CA, USA)를 사용하여 각 pixel의 형광강도의 평균을 계산하여 분석한다. Genespring 6.2 (Silicon Genetics, Rodwood CA, USA)를 사용하여 데이터를 분석하였으며, 0.01%의 유의 수준에서 single t test 를 실시하였다(Fig. 1).

### III. 연구결과

#### 1. 종양부피 측정

구강편평세포암 세포주(HN22) 세포 접종체를 누드마우스의 등에 피하 주사한 후 약 2~4주뒤 종양의 부피가 60mm<sup>3</sup>이상의 크기로 자랐으며 육안적으로 관찰 및 계측이 가능하였다(Fig. 2, 3).

항암제 투여 후 시간 경과에 따른 실험군 종양의 부피변화를 그래프로 나타내었다(Graph 1). 항암제 투여 후 3 mg/Kg농도 투여군에서 1마리는 실험 13일째 종양의 소

실이 관찰 되었으나, 나머지에서는 대조군(생리 식염수 투여)과 유사한 성장곡선을 나타내어 실험군과 대조군 사이에 큰 차이가 없음을 관찰 하였다.

#### 2. 조직병리학적 연구

항암제 투여 전까지 누드마우스에서 실험군, 대조군 공히 암진주가 관찰되고 잘 분화된 편평세포암종이 나타났다(Fig. 4). 약제 투여 후 4주가 경과한뒤 조직 표본에서 암세포의 수가 감소하였으며 분화도 또한 미성숙 하였고 일부에서는 괴사가 관찰 되었다(Fig. 5).

#### 3. 면역조직화학적 연구

Ki67 염색도는 약제 투여 전에 비해 투여 후 4주 뒤에는 염색도가 감소 하였고(Fig. 6, 7), Ki67 index는 대조군에서 약 33%로 나타났으며, 실험군에서는 Taxol 투여후 1주째 약 30%로 감소하기 시작하여 약제 투여후 4주째에는 약 25%로 감소하였다(Graph 2).

#### 4. 약제내성 검사

구강편평세포암 세포주(HN22)는 농도(1, 3, 5, 10 µg/ml)가 증가함에 따라 점차 감소하여 1 µg/ml농도에서는 약 70%, 5 µg/ml농도에서는 약 20%, 10 µg/ml 농도에서는 완전히 소멸하였고, 3 µg/ml 농도에서는 약 50%의 생존율을 보였다(Graph 3).

#### 5. 성장곡선

실험군과 대조군에서 Paclitaxel(Taxol)투여 전의 성장양상은 전형적인 S자 곡선을 보였는데, 실험군의 경우 각 농도(1, 3, 5 µg/ml)에서 투여 후 1일부터 세포성장이 급격히 감소하여 1 µg/ml농도에서는 약 7일 이후에 그리고 3 µg/ml 와 5 µg/ml 농도에서는 약 5일 이후에 세포소멸이 관찰되었으며 각 농도간의 차이는 크지 않았다(Graph 4).

#### 6. MTT(5-diphenyl dimethyltetrazolium bromide) assay

실험군에서 Taxol 투여 후 농도가 1 µg/ml에서 80%로 감소하였고 3 µg/ml에서 약 75% 였으며 농도가 증가함에 따라 5 µg/ml에서 약 60%로 감소하여 종양세포의 미토콘드리아에서 succinyl dehydrogenase의 활성도가 낮아졌음을 알 수 있었다(Graph 5).

**Table 3.** Gene Expression of HN22 Cell Line treated with Paclitaxel(Taxol)

Gene Name	Change	Average	Function
ANGPTL4	↑	3.4	Apoptosis
TXNRD1	↑	3.0	
FAS	No change		
RRAGA	↑	2.0	Cell growth
CTGF	↑	2.1	
Cyclin A	↓	0.68	Cell cycle & Proliferation
P19	↓	0.68	
DUSP5	↑	2.5	
CEBPG	↑	2.2	Transcription regulation
BTG1	↑	2.0	Angiogenesis
VEGF	↓	0.56	

7. 유세포분석

유세포분석에서 대조군에서는 G1기에서 58.4%, S기에서 15.5%, G2기는 24.3%의 분포를 나타낸 것에 비해 Taxol 투여시 G2M기에서 77.3%, 82.8%, 69.4%로 세포 주기억제(cell arrest)가 증가하는 것으로 나타났는데 저농도에 비해서 농도가 증가할수록 S기에서의 세포주기 억제가 상대적으로 점차 증가했다(Graph 6).

8. cDNA Microarray

Taxol 투여시 ANGPTL4, TXNRD1, FAS, RRAGA, CTGF, Cyclin A, P19, DUSP5, CEBPG, BTG1 등이 발현 되었으며, ANGPTL4와 TXNRD1은 증가 하였으며, FAS는 변화가 없었으며, RRAGA와 CTGF는 증가, CyclinA, P19은 감소, DUSP5 및 CEBPG, BTG1은 증가하였으며 VEGF는 감소 하였다. 이들은 각각 apoptosis, cell growth, cell cycle and proliferation, transcription 조절, angiogenesis 등에 관여하는 유전자들 이었다(Table 3).

IV. 총괄 및 고찰

구강악안면 영역에서 악성종양의 발현빈도는 인체의 다른 부위에 비해 작지만 점차 그 빈도가 증가하는 추세이며 다양한 치료법에도 불구하고 높은 악성도와 재발율로 인해 치료 후에도 만족스러운 결과를 얻기가 힘들다. 이중 항암화학요법은 재발성, 전이성 종양에 주로 사용된다. 사용되는 항암제는 methotrexate, cisplatin, carboplatin, bleomycin, 5-fluorouracil, dextrorubicin 등이 있으며 각 약제의 치료 효과는 치료방법에 따라 많은 반응도의 차이를

보이고 있고 과거에 비해 환자의 생존율도 별로 개선되지 못하였다<sup>28)</sup>.

대부분의 항암제들은 암세포의 여러 대사경로에 개입하며 작용하는데 유전인자의 본체인 DNA합성을 저해하거나, DNA에 직접 작용하여 그 기능을 손상시키고 암세포의 세포분열을 억제함으로써 효과를 나타낸다. 그러나 이들 항암제는 암세포에만 선택적으로 작용하는 것이 아니라 정상세포 특히 세포분열이 활발한 조직 세포에도 손상을 입혀 골수기능 저하, 오심, 탈모증, 위장장애, 신독성, 간독성, 면역기능저하 등 여러 부작용 및 합병증이 나타나게 된다.

최근 항암제로서 기능성을 널리 인정받고 있는 Taxol은 미 국립 암 연구소에서 약 35,000 여종의 식물에서 항암물질을 연구하던 중 Wani와 Wall에 의해서 백혈병과 종양에 효과가 있음이 발견되었다<sup>6)</sup>. Taxol은 taxane ring system으로 구성되어 있고 C-13 ester side chain에 의해 항암효과를 발휘하며, 세포주기의 G2M기에서 세포주기억제를 일으켜 다음 단계의 세포 주기로 넘어가지 못하도록 한다<sup>8,29)</sup>. 그리고 세포의 미세소관에 작용하여 항암효과를 나타내며 기존의 항 미세소관 항암제와는 달리 튜블린의 중합을 촉진하여 미세소관을 과안정화 시킴으로써 세포분열을 위한 미세소관의 탈분극을 억제 및 비 기능적 미세소관을 형성하는 작용으로 항암효과를 발현한다. 뿐만 아니라 Taxol에 민감한 세포는 Taxol의 작용이 사라진 뒤에도 계속하여 미세소관 다발을 형성하고 세포기관들의 변화를 일으키는 것으로 알려져 있다.

그러나 1 g의 Taxol을 얻기 위해 135 Kg의 주목 껍질이 필요하므로 이러한 희귀성 때문에 대규모의 임상연구가 어려운 실정이다. 이와 같은 제한요소에도 불구하고 Taxol은 백혈병에 상당한 세포독성을 나타내는 것으로 알려져 있고, 폐암, 악성흑색종, 난소암 등에서 항암 작용이 관찰되었고<sup>7)</sup>, 특히 난소암과 유방암에서 좋은 결과를 보여주고 있다<sup>31,32)</sup>.

그 외에 상피세포암과 전립선암 등에서도 치료효과가 관찰된 바 있다.<sup>33,34)</sup>

Taxol투여시 부작용으로는 약제 과민증, 백혈구 감소증, 혈소판 감소증, 탈모증 등이 나타난다<sup>10)</sup>. 그러나 백혈구 감소증은 축적성은 아니며 가역적이고 짧은 기간동안만 발현하고 심각한 소화기계 독성, 점막염, 간독성 등은 드물다고 보고되었고 일반적으로 대부분의 환자에서 좋은 약물 효과를 보여준다<sup>11)</sup>.

Taxol은 이처럼 여러 가지 암종에서 효과가 있으나, 종종 Taxol에 저항성이 있는 암세포들이 보고되기도 하였으며<sup>12-15)</sup>, 그 기전은 *mdr-1 gene*, *p-glycoprotein(p-gp)*,  $\beta$ -tubulin에서 아미노산의 돌연변이, *Bcl-2 family*, Paclitaxel의 결합 실패와 같은 수많은 관여 인자가 제시되고 있다.<sup>16-27)</sup>

종양 연구에 있어서 항암제 개발을 위한 실험실 연구를 위해 인체의 복사모델은 여러 가지 치료방법의 평가를 위해 필수 불가결하다. 사람의 암종에서 직접 추출한 세포주에 대한 세포독성 등 여러 가지 실험을 일반적으로 시행하고, 실험동물에 이종 이식하여 종양을 유발시킨 후 암세포주에 대한 치료효과를 검색하는 이형이식 생체내 검사를 주로 시행한다. 이들 세포주들은 암세포의 분화, 암유전자의 발현, 항암제에 대한 감수성 및 약제 내성, 암세포의 침습 및 전이, 암표지 항원의 발현 및 분비, 단세포군 항체의 개발, 생체 반응 조절 물질의 항암효과, 암세포 성장 및 억제인자와 세포 유전자 연구 등에서 매우 유용하게 상용되고 있다. 본 연구에서 사용된 HN22세포주는 단기간의 세포 증식 배양으로 충분한 양을 얻을 수 있고 누드 마우스 등에 피하 주사하여 종양 유도시 간단한 술식으로 가능하였고, 피하이식된 종양은 매우 높은 종양유도율을 보였으며, 육안으로 쉽게 식별 가능할 정도로 종양이 성장하는 것으로 보아 구강암 연구에 매우 유용한 실험재료라 생각된다.

저자가 연구에서 사용한 누드 마우스는 thymus가 없어 T림파구를 생산할 수 없고, 면역기능이 거의 없어 인체의 종양세포주를 이종이식 하여도 거부반응이 없이 종양이 자랄 수 있는 실험 동물이다.<sup>35,36)</sup>

과거 누드 마우스가 개발되기 전에는 면역거부가 없는 실험동물의 안구 전벽, 두뇌 및 햄스터의 협낭 등이 사용되어 왔다. 그러나 누드 마우스가 개발된 후에는 이를 유용하게 이용하여 왔으며 배양된 세포주를 누드 마우스에 접종하는 방법은 세포 특성을 유지 하면서 많은 양을 동시에 증식시킬 수 있고, 특별한 변이없이 일관되게 종양을 유발시킬 수 있어 현재 암종연구에 많이 이용되고 있다.

누드 마우스를 이용한 실험적 연구에서 Taxol은 여러 암종에서 항암 효과를 보였으나 반응도에 있어서 세포주에 따른 차이가 나타났고 일부 세포주에서는 효과가 없기도 하였

다.<sup>37,38)</sup>. 또한 Cisplatin과의 비교 실험에서 누드 마우스에 이종 이식된 폐암세포주에서 Paclitaxel의 항암 감수성이 cisplatin보다 높고 독성도는 낮게 나타나 Taxol의 우수성에 관한 보고가 있는 반면<sup>39)</sup>, Guo 등<sup>40)</sup>은 유방암에서 doxorubicin에 저항성인 isogenic breast tumor cell이 Paclitaxel과 다른 약제에 교차 저항성을 보인다고 보고한 바 있다. 이는 Taxol이 모든 암종에서 효과를 발현하는 것이 아니고 세포주 종류에 따른 항암반응도의 확인이 필요할 뿐만 아니라 기존 항암제에 반응이 없는 암종에 대한 2차 약제로 사용할 수 있는 가능성을 보여준다.

본 연구에서는 시험관내 실험에서는 Taxol의 항암효과가 뚜렷하였으나 누드 마우스를 이용한 생체 실험에서 대조군과 실험군에서 공히 시간이 경과함에 따라 종양의 부피가 커져 Paclitaxel의 항암 효과가 뚜렷하지 않았다(Graph 1). 이는 Taxol을 단독으로 투여 후 종양세포까지 도달하여 약효가 발현되기까지 여러 인자가 관계할 것으로 생각되며 Paclitaxel에 약제 저항성을 일으키는 기전은 *mdr-1 gene*, *p-gp(p-glycoprotein)*, *Bcl-2* 등 수많은 인자가 관여하는 것으로 제시되고 있다<sup>6-27)</sup>. 따라서 특히 세포주 및 암종에 대한 약제 감수성과 생체 내에서의 약물대사 등 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

육안적 소견에 비해 조직 병리학적 소견에서 HN22 세포주도 유도된 종양은 분화도가 좋은 편평세포암종으로 나타났고 암진주가 관찰 되었으나(Fig. 4), 약제가 투여된 뒤 조직 소견에서 일부 괴사가 관찰 되었다(Fig. 5). 이는 미미하지만 Taxol이 암종에 약제반응이 있음을 의미한다. 그러나 Cisplatin 등 다른 약제와 투여시 또는 방사선 요법등과 함께 사용할 경우<sup>41)</sup>, 그리고 polyanhydride polymer poly(FAD:SA) 같은 polymer를 이용한 polymer chemotherapy시 항암작용의 뚜렷한 상승효과가 보고<sup>42)</sup> 되는 것으로 보아, Taxol의 단독사용보다는 다른 치료법이나 약제를 함께 적용하는 것이 유용할 것으로 생각되었다.

종양 연구에 있어서 세포증식을 표현할 수 있는 생물학적 인자를 찾기 위한 노력이 활발히 진행되어 왔으며 nuclear antigen인 Ki-67이 primary antigen으로 유용하게 사용되었다. Ki-67은 세포주기에서 G0를 제외한 G1, S, G2 및 M기에서 발현되는데<sup>43,44)</sup>, 본 연구에서 Ki-67 index가 대조군에서 약 33%로 나타났고, Taxol투여 직후 약 30%, 투여후 4주째 약 25%로 감소하였다(Graph 2). 이는 미약하나마 약물의 효과가 있었음을 알 수 있었으나 큰 차이는 없었으므로 육안적 소견이나 조직 병리소견과 일치함을 알 수 있었고 염색도 또한 대조군에 비해 실험군에서 감소하는 것으로 관찰 되었다(Fig. 6, 7).

생체 실험에서와는 달리 실험실내 연구에서는 세포 수준에서의 항암효과가 뚜렷하게 나타났다. 약물내성 검사에서

농도가 증가할수록 (1, 3, 5, 10  $\mu\text{g/ml}$ ) 생존 종양 세포수가 감소하였으며, 3  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 약 50%의 종양세포 생존율을 보였다(Graph 3). 성장곡선에서 Taxol 비처리군 종양세포의 성장곡선은 전형적인 S자형을 보이며, Paclitaxel 투여시 투여 1일째부터 세포성장양이 급격히 감소하였으나, 3  $\mu\text{g/ml}$  이상에서는 농도간의 차이가 크지 않았다. 이는 일정농도 이상의 고농도에서는 농도가 증가함에 따른 약효 발현의 개선효과는 없음을 알 수 있다.

세포 독성능 검사에 이용되는 MTT 검사법은 시험관내 정량 실험의 대표적인 방법으로 살아 있는 세포 mitochondria의 탈 수소 효소인 succinyl dehydrogenase를 이용하여 MTT를 환원시켜 청색의 결정체(formazan)를 만듦으로서 이를 spectrophotometer를 이용하여 측정케 하는 시험방법이다<sup>45)</sup>. MTT 분석법은 재현성이 좋고, 시간이 적게 걸리며 인간의 tumor stem cell 시험결과와 양호한 상관관계를 보여 항암제 감수성에 대한 일차 선별 검사의 목적으로 많이 사용되나 성장인자에 대한 세포의 감수성 실험 등에도 유용하게 이용된다<sup>46,47)</sup>. 이는 정량적 결과를 비교적 객관적으로 단시간 내에 얻을 수 있으므로 특정 세포주에 대한 새로운 약제의 선별검사, 병용화학 요법에 대한 증강 효과 검사, 생화학적 조절에 대한 연구에 매우 유용하다<sup>48)</sup>.

이처럼 MTT법이 유용하게 쓰이고 있는 반면, 종양 세포의 초기 배양에서는 정상세포 역시 tetrazolium을 환원시킬 수 있기 때문에 MTT방법은 한계가 있고, 초기 배양 세포는 단일 세포에서 배양된 유전학적으로 동일한 monoclonal 군이 아니므로 세포 반응 특성에 차이가 있을 수 있다<sup>49,50)</sup>. 본 연구에서는 MTT assay에서 Taxol의 농도가 1  $\mu\text{g/ml}$ 에서 80%, 5  $\mu\text{g/ml}$ 에서 약 60%로 농도가 올라갈수록 낮은 수치를 나타냈고 이는 고농도에서 미토콘드리아내 succinyl dehydrogenase의 활성도가 낮아지고 세포의 활성도가 떨어지며 약제 저항이 적은것을 의미한다(Graph 5).

유세포 분석은 유액상태의 입자나 세포를 특정 감지지역을 통과 시키면서 세포의 상태를 개별적인 변화 측정 또는 분리하거나 형광 염색체를 표지시켜 관찰하는데 세포내 또는 표면의 항원 정량, 세포주기 분석, DNA 또는 RNA 분석, 염색체 분석 등에 이용한다. Taxol은 여러 연구에 의해서 세포의 세포사멸을 일으키는 것으로 확인되었는데, programmed cell death라 불리는 세포사멸은 이미 많은 항암제들에 의해 특정 암종에서 나타나는 것으로 보고되어 왔고<sup>51-55)</sup>, 이는 항암치료에 유용하게 이용되지만, 반면에 분화가 빠른 정상세포에서도 세포 사멸을 일으키는 경우도 보고된 바 있다<sup>56)</sup>. 만약 암세포의 세포사멸을 선택적으로 유도할 수 있다면 매우 유용한 것이며 현재 이러한 문제를 해결하기 위해 많은 연구가 이루어지고 있다<sup>57,58)</sup>.

본 연구에서는 Taxol에 의해 발생하는 다양한 영향중 세포주기상에 미치는 영향을 조사하였으며, Taxol에 의해 일어나는 세포주기의 억제는 일반적으로 두가지가 존재한다. 직접적으로 초기에 형성되는 M기의 세포주기 억제와, aberrant mitosis를 통해 세포분열이 진행되어 다핵세포의 형태로 arrest가 일어나는 G1기가 있다<sup>59)</sup>. 유세포 분석기를 이용한 저자의 연구에서 HN22세포의 세포 주기상에 Taxol이 미치는 영향을 조사한 결과 1  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 G2M기에서 억제가 일어났고, 고농도로 갈수록 점차 S기에서의 세포주기 억제가 증가하는 것으로 나타나 5  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 G2M기의 억제된 세포들이 세포사멸에 의해 사라지고 S기의 세포가 점차 늘어나는 것으로 생각된다(Graph 6).

종양치료에 있어서 다양한 치료방법의 시도에도 불구하고 그 예후는 일관성이 없고 불량한 실정이다. 이러한 예후의 차이가 암세포의 분자생물학적 유전자 특성에 기인한다는 가정하에 종양의 발생과 세포의 증식, 사멸에 관여하는 유전자 발현에 관한 연구가 요구되어지고 있다.

최근 수많은 유전자를 한번에 발현시켜 분석할 수 있는 cDNA microarray 기법이 개발되었는데, DNA chip 분석 기법(cDNA microarray)은 분자생물학적 지식을 바탕으로 첨단 전자공학 기법인 반도체 부착기술과 생물정보학이 접목된 방법으로 poly-L-lysine 및 amine과 aldehyde 등으로 coating시켜 만든 슬라이드에 수만개의 target DNA를 부착하여 microarray를 시행한다<sup>60-63)</sup>. 본 연구에서는 구강 편평세포암종 세포주를 누드마우스에 이종이식하여 유도된 구강편평세포암종에 Taxol 투여 후 암세포와 관련된 유전자 중 유의성 있는 11가지의 유전자 발현을 확인할 수 있었다. 세포사멸과 관련된 유전자로는 ANGPTL4, TXNRD1, FAS 등이 발현되었고, cell growth 관련 유전자로는 RRAGA, CTGF가 나타났다. 세포주기와 증식에 관련된 유전자는 Cyclin A, P19, DUSP5가 관찰되었고, transcription 조절인자로는 CEBGP가 나타났으며, angiogenesis와 관련된 유전자로는 BTG1, VEGF 등이 나타났다.

본 연구에서 Paclitaxel(Taxol)이 구강편평세포 암종에 있어서 시험관내 실험에서는 항암효과가 발현되어 암세포의 성장억제가 관찰되었으나, 생체 실험에서는 미약한 효과는 있었지만 유의성 있는 항암효과를 보기는 어려웠으므로 향후 Taxol의 생체내 항암기전에 대한 추가적인 연구가 요구되고 다른 항암제나 방사선요법과 같은 부가적인 치료에 대해서는 고려해야 할 것으로 생각된다.

## V. 결 론

최근 효과적인 항암제로 알려진 Paclitaxel(Taxol)을 이용하여 대표적인 구강암종 하나인 구강편평세포 암종에서



의 항암 효과를 평가하기 위해 HN22세포주를 이용하여 시험관내에서 억제내성 검사, 성장곡선, MTT assay 및 유세포분석 등을 시행하고, 동물실험에서 누드 마우스에 HN22를 이중 이식시켜 종양을 유도하고 Taxol을 투여한뒤 종양 유도 및 크기 측정, 조직 병리관찰, 면역조직화학 검사 및 cDNA microarray를 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 육안적 소견에서 종양부피는 대조군과 실험군 모두에서 큰 차이가 없었다.
2. Ki-67 지수는 대조군의 종양세포에서 4주후 까지 33% 내외를 나타냈고 실험군에서는 약 25%로 감소하였다.
3. Taxol투여 농도가 증가할수록 생존종양세포수가 감소하였으며 3 µg/ml에서 약 50%의 종양세포 생존율을 보였다.
4. Taxol 비처리군 종양세포의 성장은 전형적인 S자형을 보이며, Taxol투여시 각 농도에서 투여 후 1일부터 세포 성장에 급격히 감소하였으나 각 농도간의 큰 차이는 없었다.
5. MTT assay에서 Taxol의 농도가 1 µg/ml에서 80%, 5µg/ml에서 약 60%로 종양세포의 마이토콘드리아에서 succinyl dehydrogenase의 활성도가 낮아졌음을 의미한다.
6. 유세포 분석에서 저농도 Taxol에서는 G2M기에서 세포 주기 억제가 증가했고 농도가 증가할수록 점차 S기에서 세포주기 억제가 증가함을 나타냈다.
7. cDNA microarray에서 Taxol 투여시 ANGPTL4, TXNRD1, FAS, RRAGA, CTGF, Cyclin A, P19, DUSP5, CEBPG, BTG1 등이 발현 되었으며, 이들은 apoptosis, cell growth, cell cycle and proliferation, transcription 조절, angiogenesis 등에 관여하며, 대부분 암세포 증식 억제에 관여한다.

시험관내 연구에서 Taxol은 종양세포의 세포주기 억제를 보이는 항암효과를 관찰할 수 있었으나, 생체 실험에서는 시험관내 연구에서와 달리 Taxol의 효과가 미약한 것으로 나타나 향후 Taxol의 구강편평세포 암종에서 생체내 항암 효과를 위해 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

### 참고문헌

1. Vikran B, Strong E, Shah J et al : Failure at the primary site-following multimodality treatment for advanced head and neck cancer. *Head Neck Surg* 6 : 720, 1984.
2. Jacobs J, Fu K, Lowry L : Five-year results of cisplatin and fluorouracil in head and neck carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 117 : 288, 1991.
3. Mayers EN : Cancer of the head and neck. 2nd ed. New York, Churchill Livingstone, 1989.

4. Jonathan CI, Alan B : Oncogenes in head and neck cancer, *Laryngoscope* 103 : 42, 1993.
5. Peterson LJ : Principles of oral and maxillofacial surgery. Philadelphia, J.B. Lippincott, 1992.
6. Wani MC, Taylor HL, Wall ME : Plant antitumor agents VI. The isolation and structure of Taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* 893 : 2325, 1971.
7. Bahalla K, Ibrado AM, Tourkina E et al : Taxol induces internucleosomal DNA fragmentation associated with programmed cell death in human myeloid leukemia cells. *Leukemia* 7(4) : 563, 1993.
8. Crossin KL, Carney DH : Microtubule stabilization by taxol inhibits initiation of DNA synthesis by thrombin and by epidermal growth factor. *Cell* 27 : 314, 1981.
9. Hamel E, Del Campo AA, Lowe MC : Interactions of taxol, microtubule associated proteins and guanine nucleotide in tubulin polymerization. *J Biol Chem* 256 : 1887, 1981.
10. Rowinsky EK, Cazenave LA, Donehower RC : Taxol : A novel investigational antimicrotubule agent. *J Natl Cancer Inst* 82 : 1247, 1990.
11. Rowinsky EK, Eisenhauer EA, Chaudhry V et al : Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol®). *Semin Oncol* 20(4) : 1, 1993.
12. Luo D, Cheng SC, Xie X et al : Chemosensitivity of human hepatocellular carcinoma cell line QGY-7703 is related to bcl-2 protein levels. *Tumour Biol* 20 : 331, 1999.
13. Huang M, Liu G : The study of innate drug resistance of human hepatocellular carcinoma Bel 7402 cell line. *Cancer Lett* 135 : 97, 1999.
14. Parekh H, Wiesen H, Simpkins H : Acquisition of taxol resistance via P-glycoprotein and non-P-glycoprotein-mediated mechanisms in human ovarian carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 53 : 461, 1997.
15. Bates SE, Zhan Z, Dickstein B et al : Reversal of multidrug resistance. *J Hematother* 3 : 219, 1994.
16. Kavallaris M, Kuo DY, Burkhart CA et al : Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific betatubulin isotypes. *J Clin Invest* 100 : 1282, 1997.
17. Gazitt Y, Rothenberg ML, Hilsenbeck SG et al : Bcl-2 overexpression is associated with resistance to paclitaxel, but not gemcitabine, in multiple myeloma cells. *Int J Oncol* 13 : 839, 1998.
18. Huang Y, Ibrado AM, Reed JC et al : Co-expression of several molecular mechanisms of multidrug resistance and their significance for Paclitaxel cytotoxicity in human AML HL-60 cells. *Leukemia* 11 : 253, 1997.
19. Liu JR, Fletcher B, Page C et al : Bcl-xl is expressed in ovarian carcinoma and modulated chemotherapy-induced apoptosis. *Gynecol Oncol* 70 : 398, 1998.
20. Jang SH, Wientjes MG, Au JL : Kinetics of P-glycoprotein mediated efflux of paclitaxel. *J Pharmacol Exp Ther* 298 : 1236, 2001.
21. Kondratov RV, Komarov PG, Becker Y et al : Small molecules that dramatically alter multidrug resistance phenotype by modulating the substrate specificity of P-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 : 14078, 2001.
22. Siegel DS, Zhang X, Feinman R et al : Hexamethylene bisacetamide induces programmed cell death(apoptosis) and down-regulates BCL-2 expression in human myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 162, 1998.

23. Giannakakou P, Sackett DL, Kang YK et al : Paclitaxel-resistance human ovarian cancer cells have mutant beta-tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerization. *J Biol Chem* 272 : 17118, 1997.
24. Strobel T, Kraeft SK, Chen LB et al : BAX expression is associated with enhanced intracellular accumulation of paclitaxel : a novel role for BAX during chemotherapy-induced cell death. *Cancer Res* 58 : 4776, 1998.
25. Janicke RU, Sprengart ML, Wati MR et al : Caspase3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* 273 : 9357, 1998.
26. Huang Y, Ray S, Reed JC et al : Estrogen increases intracellular p26Bcl-2 to p21Bax ratios and inhibits taxol-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat* 42 : 73, 1997.
27. Panvichian R, Orth K, Day ML et al : Paclitaxel-associated multinucleation is permitted by the inhibition of caspase activation : a potential early step in drug resistance. *Cancer Res* 58 : 4667, 1998.
28. Vokes GE, Haraf DJ, Stenson K et al : The role of paclitaxol in the treatment of head and neck cancer. *Sem Oncol* 22(5) : 8, 1995.
29. Manfredi J, Horwitz SB : Taxol : An antimetabolic agent with a new mechanism of action. *Pharmacol Ther* 25 : 83, 1984.
30. Rowinsky E, Donehower RC, Jones RJ et al : Microtubule changes and cytotoxicity in leukemic cell lines treated with taxol. *Cancer Res* 48 : 4093, 1988.
31. Holmes FA, Walters RS, Theriault RL : Phase II trial of taxol : An active drug in metastatic breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 83 : 1797, 1991.
32. Seidman A, Reichman B, Crown J : Activity of taxol with recombinant granulocyte colony-stimulating factor as first chemotherapy of patients with metastatic breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 11 : 59, 1992.
33. Jensen CG, Davison EA, Bowser SS, et al : Primary cilium cycle in PtK1 cells : Effects of colcemid and taxol on cilium formation and resorption. *Cell Motil Cytoskeleton* 7(3) : 187, 1987.
34. Ranney We, Kramer RE, Mason JI et al : The effects of taxol, a microtubule-stabilizing drug, steroidogenic cells. *J Cell Physiol* 123 : 17, 1985.
35. Cazey TE, Kimmel KA, Schwartz DR et al : Antibodies to human squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 91 : 482, 1983.
36. Giovanella BC, Stehelin JS, Williams Jr LJ : Heterotransplantation of human malignant tumors in "nude" thymusless mice II. Malignant tumors induced by injection of cell cultures derived from human solid tumors. *J National Cancer Inst* 52(3) : 921, 1974.
37. Kelner MJ, McMorris TC, Estes L et al : Nonresponsiveness of the metastatic human lung carcinoma MV522 xenograft to conventional anticancer agents. *Anticancer Res* 15 : 867, 1995.
38. Kubota T, Matsuzaki SW, Hoshiya Y et al : Antitumor activity of paclitaxel against human breast carcinoma xenografts serially transplanted into nude mice. *J surg Oncol* 64 : 115, 1997.
39. Yamori T, Sato S, Chikazawa H et al : Antitumor efficacy of paclitaxel against human lung cancer xenograft. *Jpn J cancer Res* 88 : 1205, 1997.
40. Guo B, Villeneuve DJ, Hembruff SL et al : Cross-resistance studies of isogenic drug-resistant breast tumor cell lines support recent clinical evidence suggesting that sensitivity to paclitaxel may be strongly compromised by prior doxorubicin exposure. *Breast Cancer Research and Treatment* 85 : 31, 2004.
41. Hennequin C, Giocanti N, Favaudon V : Interaction of ionizing radiation with paclitaxel(Taxol®) and docitaxel(Taxolate) in HeLa and SQ20B cells. *Cancer Res* 56 : 1842, 1996.
42. Shikani AH, Domb AJ : Polymer chemotherapy for head and neck cancer. *The Laryngoscope* 110 : 907, 2000.
43. Scholzon T, Gerdes J : The Ki-67 protein : from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182(3) : 311, 2000.
44. Mckormick D : Detection of the Ki-67 antigen in fixed and wax-embedded sections with the monoclonal antibody Ki-67(MIB-1). *Histopathology* 22 : 335, 1993.
45. Alldy MC, Scudiero DA, Monks A : Feasibility of screening with panels of human tumor cell lines using a micro culture tetrazolium assay. *Cancer Res* 48 : 589, 1988.
46. Budach V, Bamberg M, Scheulen E : Preclinical chemosensitivity studies with human soft tissue sarcomas in nude mice. *Contr Oncol* 26 : 168, 1987.
47. Hamburger AW, Salmon SE : Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 197 : 461, 1997.
48. Sobottka SB, Beerger MR : Assessment of antineoplastic agents by MTT assay : partial under estimation of antiproliferative properties. *Cancer Chemother Pharmacol* 30(5) : 385, 1992.
49. Ruben RL, Neubauer RH : Semiautomated colorimetric assay for in vitro screening of anticancer compounds. *Cancer Treat Rep* 71 : 1141, 1987.
50. Chamichel J : Evaluation of atetrazolium-based semiautomated colorimetric assay assesment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47 : 936, 1987.
51. Kaufmann SH : Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary tale. *Cancer Res* 49 : 5870, 1989.
52. Walker PR, Smith C, Youdale T et al : Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes. *Cancer Res* 51 : 1078, 1991.
53. Yoshioka A, Tanaka S, Hiraoka O et al : Deoxyribonucleoside triphosphate imbalance. 5-fluorodeoxyridine-induced DNA double strand breaks in mouse FM3A cells and the mechanism of cell death. *J Biol Chem* 262 : 8235, 1987.
54. Lorico A, Toffoli G, Boiocchi M et al : Accumulation of DNA strand breaks in cells exposed to methotrexate or N-10-propargyl-5,8-dideazafolec acid. *Cancer Res* 48 : 2036, 1988.
55. Searle J, Lawson TA, Abbott PJ et al : An electron microscopy study of the mode of cell death induced by cancer-chemotherapeutic agents in populations of proliferating normal and neoplastic cells. *J Pathol* 116 : 129, 1975.
56. Warrell RP : in "Cancer: Principles and Practice of Oncology" J.V.T. Devita, S. Hellman, and S.A. Rosicberg, Eds. pp.2128.
57. Nagata S, Golstein P : The Fas death factor. *Science* 267 : 1449, 1995.
58. Verheij M, Bose R, Lin X et al : Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* 380.6569 : 75, 1996.

59. Woods CM, Zhu J, McQueney PA et al : Taxol-induced mitotic block triggers rapid onset of a p53-independent apoptotic pathway. *Mol Med* 1(5) : 506, 1995.
60. Brown PO, Botstein D : Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nature Genetics* 21 : 33, 1999.
61. Duggan DJ, Bittner M, Chen Y et al : Expression profiling using cDNA microarrays. *Nature Genetics* 21 : 10, 1999.
62. Lemieux B, Aharoni A, Schena M : Overview of DNA chip technology. *Mol Breed* 4 : 277, 1998.
63. Schena M, Shalon D, Davis RW et al : Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270 : 467, 1995.

**저자 연락처**

우편번호 330-716  
충남 천안시 신부동 산 7-1번지  
단국대학교 치과대학 부속 치과병원 구강악안면외과  
**이 재 훈**

원고 접수일 2005년 12월 1일  
게재 확정일 2006년 2월 24일

**Reprint Requests**

**Jae-Hoon Lee**  
Dept. of OMFS, College of Dentistry, Dankook University  
7-1 Sinbudong, Cheonan, Chungnam, 330-716, Korea  
Tel: 82-41-550-1995 Fax: 82-41-551-8998  
E-mail: lee201@dankook.ac.kr

Paper received 1 December 2005  
Paper accepted 24 February 2006

## 사진부도 설명

Fig. 1. Gene expression related Taxol

Fig. 2. Visual observation of control group(Intraperitoneal injection of normal saline)

Fig. 3. Visual observation of experimented group(After treatment with Taxol 3 mg/Kg)

Fig. 4. Microscopic view of control group (H&E × 100)

Fig. 5. Microscopic view of experimental group (H&E × 200)

Fig. 6. Microscopic view of control group (IHC, Ki-67 × 200)

Fig. 7. Microscopic view of experimental group (IHC, Ki-67 × 200)

Graph 1. Measurement of total volume of tumor mass in both group

Graph 2. Ki-67 index of tumor mass

Graph 3. Drug resistance assay

Graph 4. Growth curve of HN22 according to Taxol concentration

Graph 5. MTT assay of HN22 according to Taxol concentration

Graph 6. Flow cytometric analysis after Taxol treatment

### Abbreviation

TA : Taxol

3TA : 3  $\mu$ g/ml concentration Taxol

5TA : 5  $\mu$ g/ml concentration Taxol

M1 : G0 phase

M2 : G1 phase

M3 : S phase

M4 : G2 phase

사진부도 ①

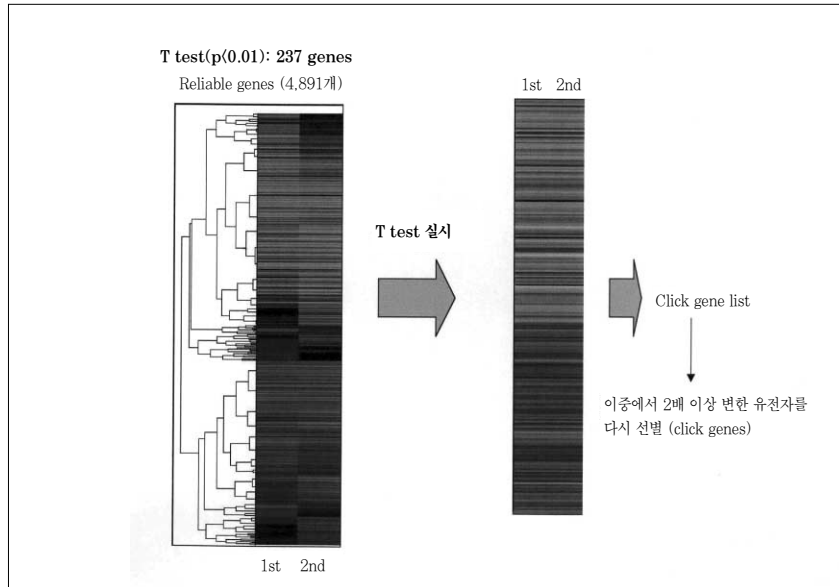


Fig. 1

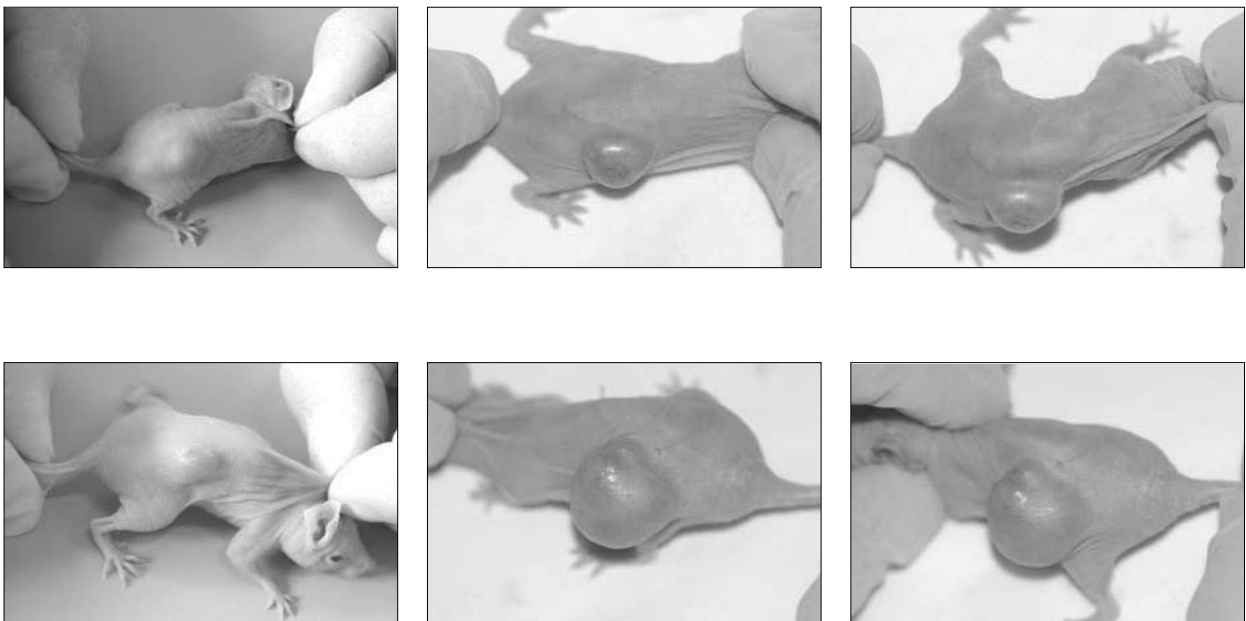


Fig. 2

사진부도 ②

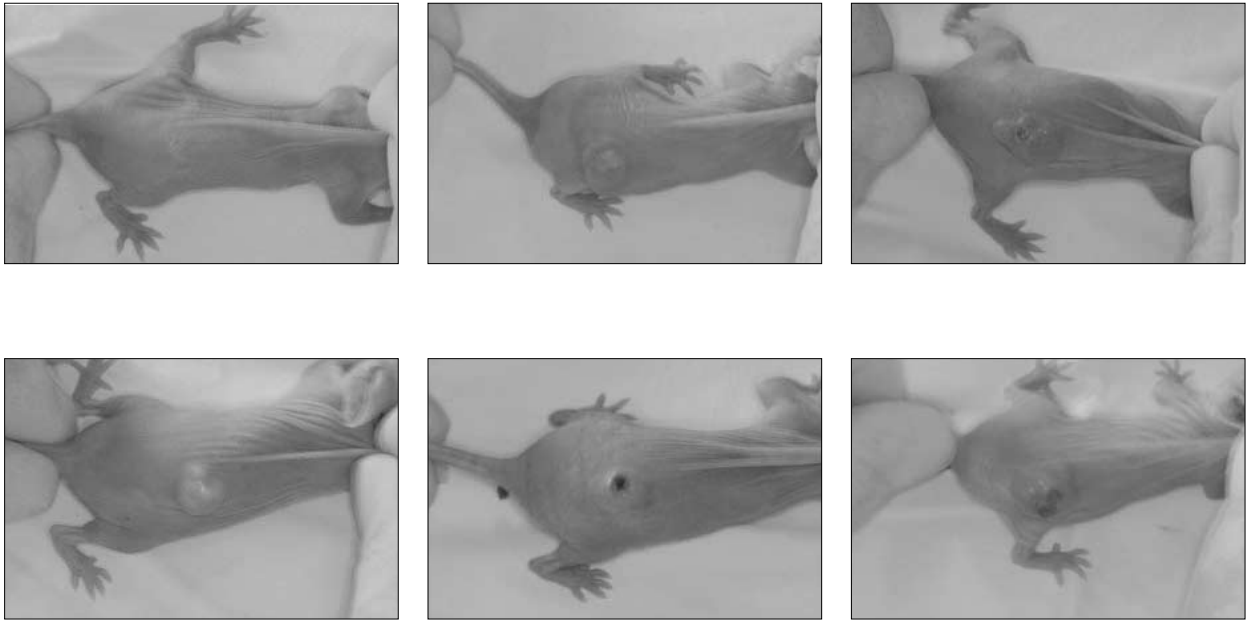


Fig. 3

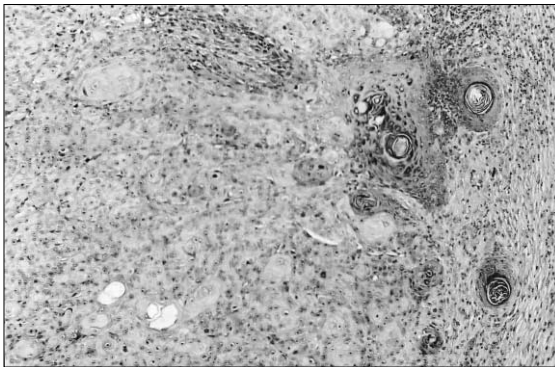


Fig. 4

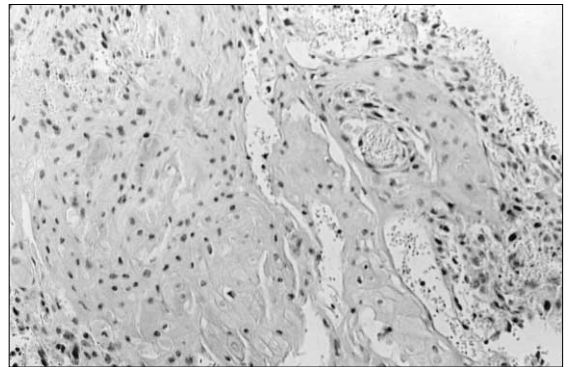


Fig. 5

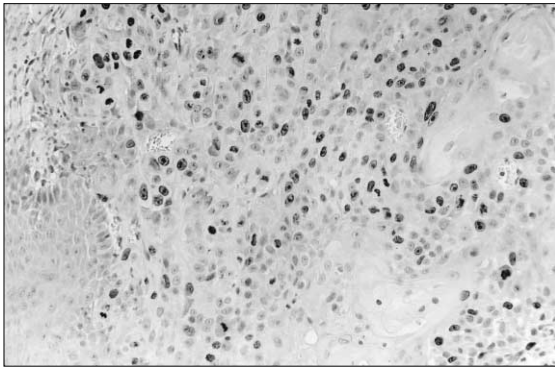


Fig. 6

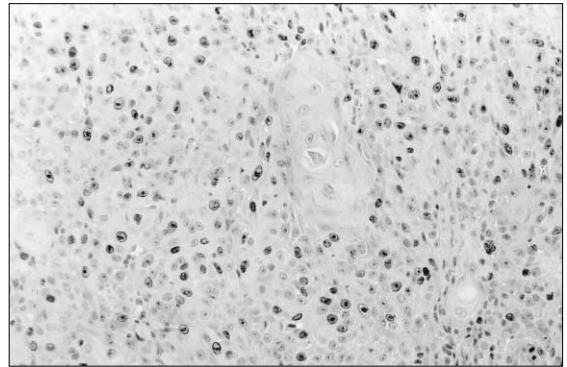
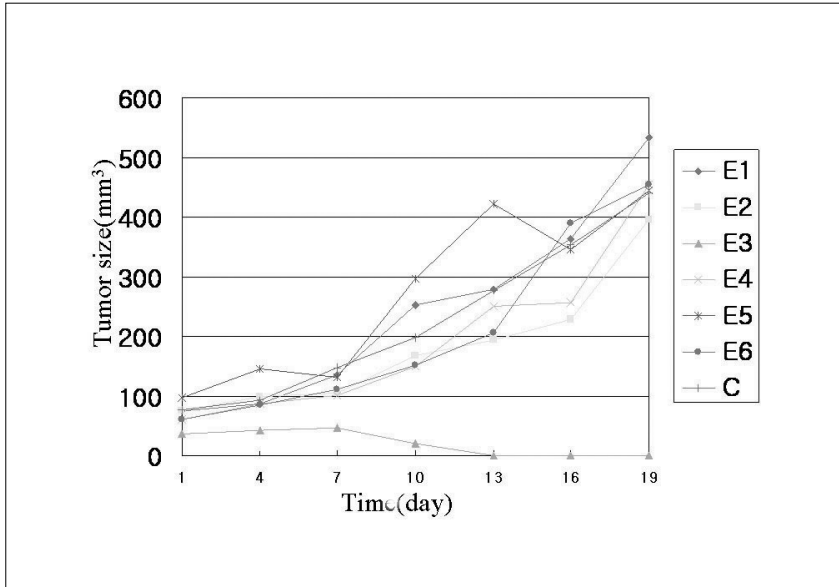
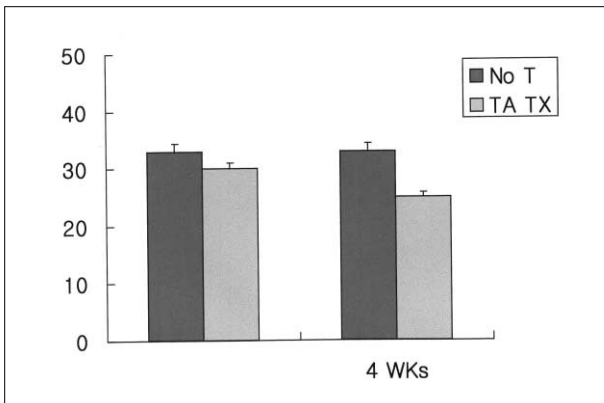


Fig. 7

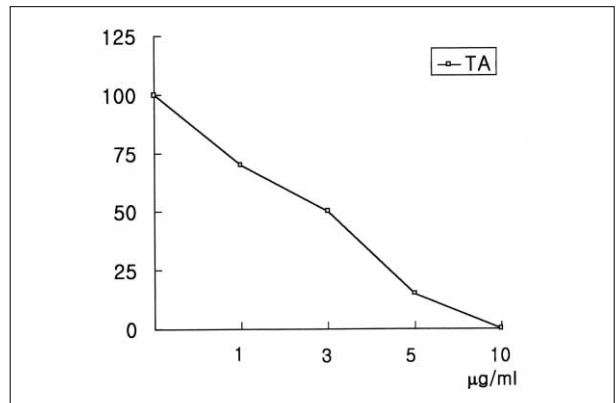
사진부도 ③



Graph 1

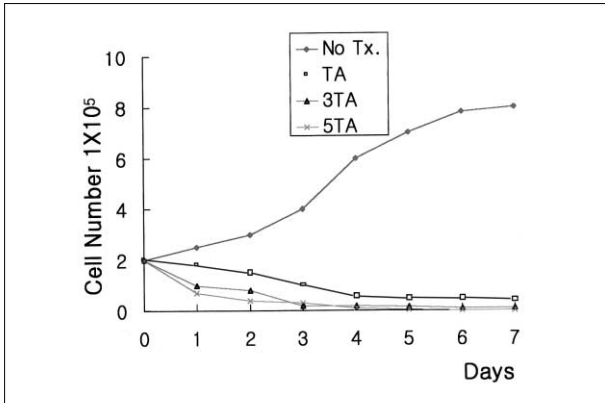


Graph 2

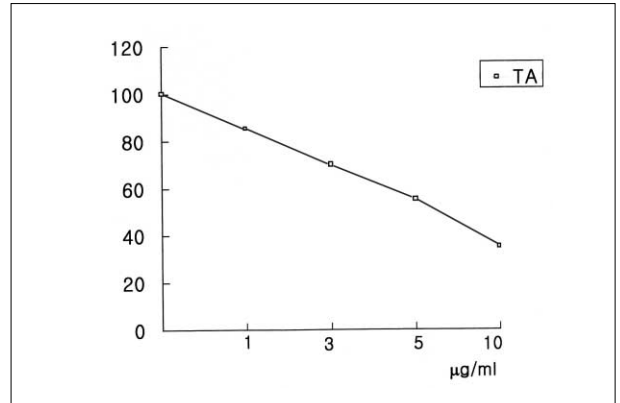


Graph 3

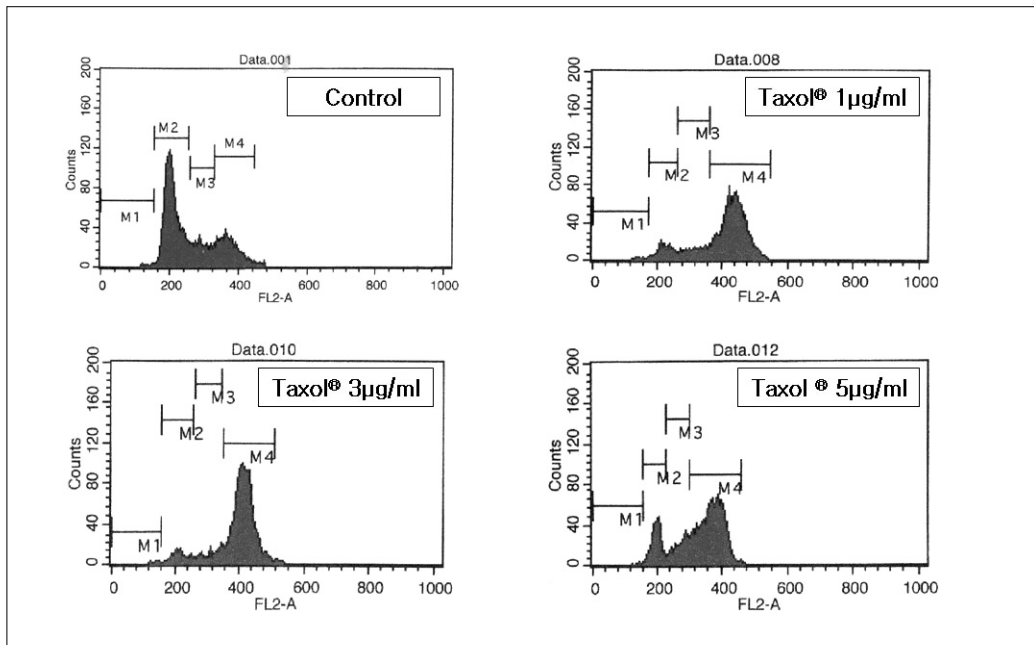
사진부도 ④



Graph 4



Graph 5



Graph 6