구강 편평세포암종에서 Taxol과 Cyclosporin A의 세포사멸 상승 작용 효과

서민정 · 한세진 · 이재훈
단국대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract

SYNERGISTIC APOPTOTIC EFFECT OF TAXOL ON ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA BY CYCLOSPORIN A

Min-Jung Suh, Se-Jin Han, Jae-Hoon Lee
Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Dankook University

Oral squamous cell carcinoma is the most prevalent oral cancer, which is characterized by its high metastasis and recurrent rates and poor prognosis.

Taxol is an anticancer agent which is microbial products extracted from jew tree. It combines with the tubulin and induces apoptosis by inhibiting mitosis of cell with microtubule stabilization. Recently, it was reported to be effective in various solid tumors, but only very slight effect has been seen in oral squamous cell carcinomas due to its cell-specific potencies.

Cyclosporin A is used as immune suppressant and is being applied in anticancer therapy as its mechanism of induction of change of apoptotic process in various cells have been known.

In this study, oral squamous cell carcinoma HN22 cell line was used for in vitro experiment and as for the experimental group taxol and cyclosporin A were applied alone and to observe the synergistic effect of apoptosis, Taxol and cyclosporin A were coadministered with different concentration of taxol for comparison.

The results were obtained as follow:

1. There was no difference in Bcl-2, Bax, caspase 3, 8, 9 mRNA expression when cyclosprin A or taxol was applied alone to HN 22 cell line.
2. Caspase 3, 9 mRNA expression was prominently increased when cyclosprin A and taxol were applied together to cancer cell.
3. No significant difference was observed when cyclosporin A and taxol(1㎍/ml and 3㎍/ml) were applied together to cancer cell line.
4. No significant difference was seen in Bcl-2, Bax, and caspase 8 mRNA expression in all the groups of in vitro experiments.
5. When cyclosporin A was applied alone in vivo study on the nude mice, histopathologi cal findings was similar to those of the control group. Oral squamous cell carcinoma induced by inoculation of HN 22 cell line was not reduced after treatment of cyclosporin A.
6. When taxol was applied alone, the islands of squamous cell carcinoma still remained, which meant insignificant healing effect. There was a lesser volume increase compared with the cyclosporin A alone.
7. When taxol and cyclosporin A were applied together, the connective tissue and calcification were seen in the histopathologic findings. Oral squamous cell carcinoma was decreased and cancer cell was disappeared. In observing the tumor mass change with time, there was a gradual decreased size and healing features.

As the results of the in vitro experiment, it could conclud that only when the two agents are applied together, mitochondria-mediated apoptosis occurred by considerable increase of caspase 3, 9 mRNA expression, irrespectable of the concentration of taxol. In vivo experiment, there was a discrete synergistic effect when the two agents were applied together. But single use of cyclosporin A was not effective in this study. Based on the results of this experiment, if further clinical studies are done, taxol and cyclosporin A could be effectively used in treatment of oral squamous cell carcinomas.

Key words: Oral squamous cell carcinoma, Taxol, Cyclosporin A

Ⅰ. 서 론

구강암의 발생 빈도는 전체 암 발생 빈도의 4%를 차지하며 신체 다른 부위의 암보다 악성도가 높다. 구강암 중에서 가장 호발 하는 구강 편평세포암종은 원격 전이 및 재발이 심하여 생존율도 낮게 나타나고 있다. 이러한 구강암의 치료 방법은 수술, 방사선 요법 및 항암제 요법 등이 있다[1]. 항암 요법으로는 Methotrexate, Cisplatin, 5-Fluorouracil, Bleomycin 같은 약제들이 단독 또는 복합적으로 사용되어 왔으며 항암제의 부작용, 내성 및 세포독성을 줄이기 위한 많은 연구가 계속되고 있다[2].

90년대 개발된 Taxol은 주목 나무에서 추출한 미생물 대사산물 약제로 튜블린과 결합하여 미세소관(microtubules)을 안정시키며 G2/M 세포 주기 차단에 의한 세포 분열을 저해하는 항암제로 알려졌으나, Taxol에 의해 유도된 항암기전은 세포특이성이 나타나며, 특히 난소암, 유방암, 폐암, 백혈병 등의 치료에 효과적인 것으로 보고되었다[3-15]. 그러나 구강 편평세포암종의 Taxol 치료 연구 결과는 잘 알려져 있지 않다.

Taxol에 의한 세포사멸(Apoptosis)은 lymphoid cell에서는 Bcl-2 인산화로 인한 비활성이 G2/M 단계에서 발생하여 유도 되었고[16], Ovarian cell에서는 JNK 활성으로 G2/M 세포 주기가 차단되었다[17]. Leukemia HL-60 세포주에서는 caspase 9, 3에 의한 세포사멸이 보고 되었으며[18], CCRF-HSB-2 세포주에서는 caspase 10의 활성에 의한 caspase 3과 6이 활성 되고 Bcl-2가 분해 되어 세포사멸을 유발하였다[19]. 이와 같이 Taxol의 세포사멸 양상은 다양하게 보고 되고 있으나 정확한 기전은 밝혀지지 않은 실정이다.

T세포의 활성과 cytotoxic T 세포의 성숙을 억제하는 강력한 면역억제제로 알려진 Cyclosporin A는 최근 세포 사멸에도 관여하는 것으로 알려져 lymphoma cell, renal cell, tubular cell, glioma cell 등에서 세포사멸 효과가 보고 되었으며[20-26], 또한 구강 편평세포암종 세포주에도 세포사멸 효과가 보고 되었다[27]. Taxol과 Cyclosporin A를 동시 투여한 경우에 Nomura 등[28]은 방광암에서, Ross 등[29]은 백혈병과 호흡기 세포암종에서 세포사멸이 촉진되고 항암 효과가 상승되었다고 보고 하였다. Cyclosporin A는 항암 약제 내성을 반전하였고[30], 평활근 세포에서 protein kinase C 활성으로 항세포증식 증폭효과를 나타냈으며[31], 또한 Cyclosporin A는 Taxol의 약제 내성을 야기하는 P-gp를 억제하는 길항제로 Taxol이 체내 흡수를 증강시켜서 세포사멸 상승 작용을 나타내는 것으로 보고 되고 있다[32-35].

이에 본 연구는 HN22 구강 편평세포암종 세포주의 시험관 내 실험으로 Taxol과 Cyclosporin A를 단독 및 동시 투여 후 RT-PCR 분석을 시행하여 세포사멸 관련 유전자의 발현 양상을 비교 관찰하고 상승 작용과 항암 기전을 평가하고자 하였으며, HN22 세포주로 유도된 누드마우스 암종에서 Cyclosporin A에 의한 세포사멸 효과의 발현 여부 및 Taxol과 Cyclosporin A의 동시 투여에 의한 상승 작용 효과를 종양 부피 변화 측정과 조직병리 연구를 통해서 관찰하여 임상적 적용에 도움이 되고자 시행하였다.

Ⅱ. 연구 재료 및 방법

1. 시험관 내 실험

1) 구강 편평세포암종 세포주 배양

ATCC(Manasas. USA)사에서 구입한 구강 편평세포암종 세포주로 HN22 세포주를 사용하여, HN22 종양세포 2×10^5개를 100mm 배양 딧쉬에 각각 3개씩 분주하여 10% FBS(Fetal bovine serum)를 포함하는 DMEM (Hyclone, USA)에 계대 배양하였고 조건은 95% 습기가 있는 CO_2배양기를 사용하였다.

2) Cyclosporin A의 농도 조절 및 약제 투여

Cyclosporin®(종근당)의 농도는 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹이고 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco, USA)으로 희석시켜 stock solution으로 1mg/ml를 만들었다.

대조군으로는 약제가 포함되지 않은 구강 편평세포암종 세포주를 배양하였고 실험군은 투약된 약제에 따라 4군으로 분류하였다. 실험군은 1㎍/㎖ Cyclosporin A, 3㎍/㎖ Taxol®(BMS,한국), 1㎍/㎖ Cyclosporin A와 1㎍/㎖ Taxol 동시 투여, 1㎍/㎖ Cyclosporin A와 3㎍/㎖ Taxol 동시 투여로 구분하여 배양된 세포주에 약제 투여 후 역상차 현미경으로 관찰하였다.

3) Total RNA extraction

구강 편평세포암종 HN22 세포주를 100mm 배양 딧쉬에서 70-80%정도 성장시킨 후 배양액을 제거하고 pH7.4 PBS(Gibco BRL, USA)로 수세하였다. Guanidinium thiocyanate 방법이 Tatal RNA 추출에 사용되었고, RNA 추출 버퍼로 Guanidinium thiocyanate 용액(4M Guanidinium thiocyanate, 1% β-mercaptoenthanol, 0.1M Tris-Cl pH 7.5)을 세포주에 떨어뜨린 후 10% sodium lauryl sarcosinate 용액과 혼합하여 0.5% 농도로 만들었다.

원심 분리 후 pH 5.5인 2M의 아세트산칼륨 용액 0.5ml와 1M의 아세트산 0.8ml를 혼합하여 -20℃의 에탄올 7.5ml에 보관하였다. 건조된 침전물을 Guanidine-Hcl 용액(8M Guanidine-Hcl, 0.1M sodium acetate pH 7.0, 1% β-mercaptoethanol, 20mM EDTA)에 용해시켰다. 상층부의 액체를 제거하고 pH 8.0, 20mM EDTA를 첨가하여 침전물을 용해시켰다.

Chloroform/n-butanol (4:1v/v)를 1:1로 만들어 혼합하고 incubation 후 원심 분리한 후 4mM 아세트산나트륨 용액(pH 7.0)을 3배로 해서 혼합하고 -20℃에서 2시간 저장하였다. 다시 원심 분리하여 50㎕ diethyl pyrocarbonate(DEPC)로 용해 후 분광광도계를 사용하여 RNA의 양을 260nm에서 측정하였다. 일부의 시료는 -20℃로 냉동 보관하여 다음 실험에 사용하였다. Total RNA를 확인하기 위해 전기영동을 시행하였다.

10X 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS), 50mM sodium acetate, 0.5M EDTA (pH 8.0), 10N NaOH (pH 7.0)용액에 1% 아가로스 젤을 만들고, 실온에서 젤을 굳히고, 3㎍ RNA.1.25㎕ 10X MOPS, 2㎕ formaldehyde, 6.25㎕ formamide를 혼합하고 65℃에서 5분간 가열 후 얼음에 식혔다. 1.25㎕ 젤 로딩 용액을 섞고, 완충 용액으로 1X MOPS를 쓰고 120 V/cm으로 하여 bromophenol blue의 푸른색이 전체 젤의 2/3까지 나오도록 전기영동을 시행하였다.

4) RT-PCR(Reverse Tanscription Polymerase Chain Reaction) 증폭

1㎍ DNase로 처리된 total RNA를 Random hexamer primers에 70℃에서 10분간 섞은 후 얼음 속에 넣어두었다. 이것을 다시 첫 번째 strand buffer의 5배로 섞고, 100mM dithiothreitol(DTT), 10mM dNTPs, 10U RNAase와 200U/㎕ superscript II reverse transcriptase(Gibco BRL, USA)를 섞어 42℃에 60분간 처리 후 cDNA를 만들었다. 이 cDNA를 80㎕ 물에 희석한 후 1.5mM MgCl, 50mM KCl, 100mM Tris-HCl, pH8.3 200㎛ dTAD, dTTP, dGTP, biotinylated-dCTP를 0.75㎕씩 만들고 double 2.5㎕ cDNA가 포함된 1unit Tag-polymerase(Gibco BRL, USA)를 반응물 총량이 50㎕로 만들어 PCR 증폭을 시행하였다. PCR 조건의 한 cycle은 변색 과정은 95℃에서 1분, 증폭을 위해 95℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 1분간 처리하고, 마지막 확장을 위해 72℃에서 10분간 시행하였다.

이 실험은 PCR primer(Table 1)를 이용하여 증폭을 시행하였다. 정상인의 GAPDH를 대조군으로 위의 방법으로 증폭시켰으며, PCR 생성물을 2% 아가로스 젤에서 전기영동하고 젤 건조기에 말린 후 enhanced chemiluminescence(ECL, Gibco BRL, USA)방법을 사용하였다. 필름에 노출 후 현상을 하고 농도계를 사용한 반정량적 방법으로 각각의 mRNA 수준을 GAPDH 수준으로 나누어 평균을 구하여 상호 비교하였다.

대조군 mRNA expression Bcl-2 /mRNA expression GAPDH를 1로 하고 나머지 유전자 발현양은 mRNA expression GAPDH로 환산하여 그래프에 표시하였다.

Table 1. PCR Primers Used in This Study

	Sense Antisense
Bcl-2	AAGATTGATGGGATCGTTGC
	GCGGAACACTTGATTCTGGT
Bax	TTTGCTTCAGGGTTTCATCC
	CAGTTGAAGTTGCCGTCAGA
Caspase 9	GAGGGAGTCAGGCTCTTCC
	TCACCAAATCCTCCAGAAC
Caspase 3	TTTTTCAGAGGGGATCGTTG
	CGGCCTCCACTGGTATTTTA
Caspase 8	TGCAGGGTCTCACTCTGTTG
	CAAAAATCAGCCATGTGTGG
GAPDH	TGCATCCTGCACCAACCAACT
	TGCATCCTGCACCACCAACT

2. 생체 실험

1) 세포 배양 및 종양 유도 (Induction of oral squamous cell carcinoma by HN22 cell line)

구강 편평세포암종 세포주(HN22)의 배양은 10% FBS(Fetal Bovine Serum)와 페니실린과 스트렙토마이신을 포함하는 DMEM을 배양액으로 하여 95% 습기가 있는 CO_2배양기에서 HN22 세포주를 배양하였다.

생후 5주된 약 20g 내외의 수컷 누드마우스 각 군당 7마리를 실험 동물로 사용하였다. 한 마리당 50㎕ 배양액에 포함된 107세포를 1cc 주사기 25G needle로 누드마우스(Charsliver®, Japan) 등에 세포접종체를 피하 주사하여 구강 편평세포암종을 유도하였다.

2) 약제 투여

종양이 유도된 누드마우스의 복강에 대조군은 0.1cc 생리식염수를 주사하였고, Cyclosporin A 단독 투여 실험군은 kg당 8mg, Taxol 단독 투여 군은 kg당 3mg, 두 약제를 동시 투여한 실험군은 Cyclosporin A는 8mg/kg, Taxol은 3mg/kg의 용량으로 각각 7마리씩 복강 내 주 2회 주사하였다.

3) 종양 부피 측정 (Size measurement of induced oral squamous cell carcinoma)

약 2-4주 후 종양의 부피가 60mm^3 이상 되었을 때 실험을 시작하였다. 실험군은 각 군에서 복강 내 주 2회 항암제 투여 후 종양의 부피 변화를 계측하여 그래프로 나타냈다(Fig. 1). 종양 부피 측정 공식은 (가로×세로×높이)× $\frac{2}{3}$를 사용하였다.

4) 조직병리 연구

실험 시작 4주 후에 대조군과 실험군의 종양 조직을 채취하여 10% 중성 포르말린에 고정 후 4-5㎛ 두께의 파라핀 절편을 제작하고 통법에 따라 Hematoxillin-Eosin(H-E) 염색을 시행한 후 광학현미경 하에서 100배 및 200배로 관찰하였다.

Ⅲ. 연구 결과

1. 시험관 내 실험

RT-PCR로 측정한 결과에서 대조군으로 사용된 GAPDH의 발현은 각 군에서 전반적으로 고른 발현을 보여주고 있어 실험에 사용된 RT-PCR의 정확성을 확인할 수 있었다(Fig. 2). Bcl-2와 Caspase 8의 mRNA 발현은 대조군과 전 실험군에서 큰 변화를 보이지 않았고, Bax의 발현은 모든 군에서 다양하게 나타났지만, 종양 세포의 사멸에 Cyclosporin A 및 Toxol의 영향을 받은 것으로는 생각되지 않았다. Caspase 3과 Caspase 9의 mRNA 발현은 대조군보다 Cyclosporin A 또는 Toxol 단독 투여 시 약 2배 정도의 증가가 있었다. Cyclosporin A 및 Toxol 동시 투여 시에는 Toxol의 농도에 관계없이 Caspase 3 mRNA의 발현은 약 9배, Caspase 9의 mRNA 발현은 18~20배 증가하였다. 또한 Cyclosporin A 단독 투여군 보다 Caspase 3 mRNA 발현이 약 18배 증가하였고, Caspase 9은 약 10배 정도의 급격한 발현 증가를 보였다. Cyclosporin A 및 Toxol 동시 투여 시에는 Toxol 단독 투여 시 보다 Caspase 3 mRNA 발현은 약 9배, Caspase 9 mRNA 발현은 약 10배 정도로 발현이 급격하게 증가되는 양상을 보였다. 그

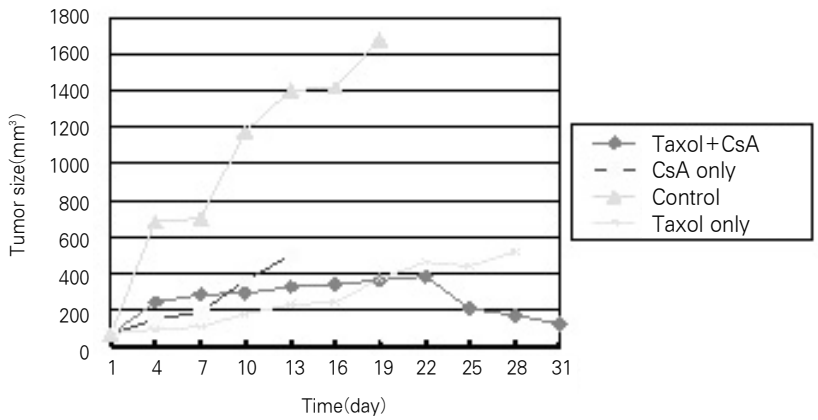

Fig. 1. Measurements of total volume of tumor mass.

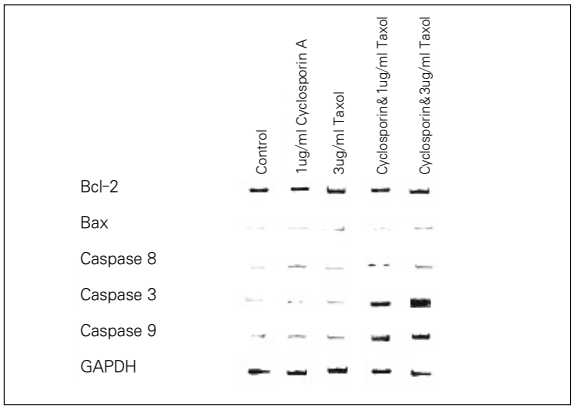

Fig. 2. Effect of Cyclosporin A and Taxol on Bcl-2, Bax, Caspase 8, 3 and 9 mRNA expression in HN 22 cell line by RT-PCR.

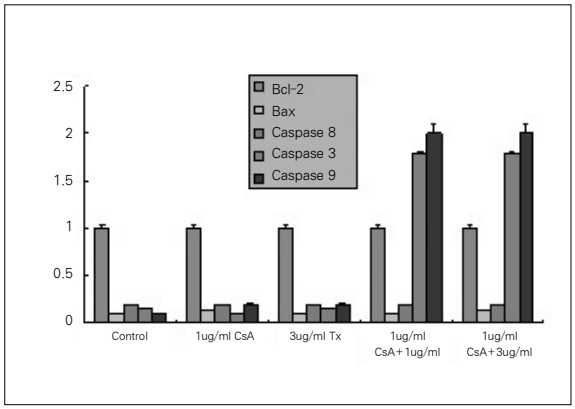

Fig. 3. Effect of Cyclosporin A and Taxol on Bcl-2, Bax, Caspase 8, 3 and 9 mRNA expression measurement in HN 22 cell line by densitometer.

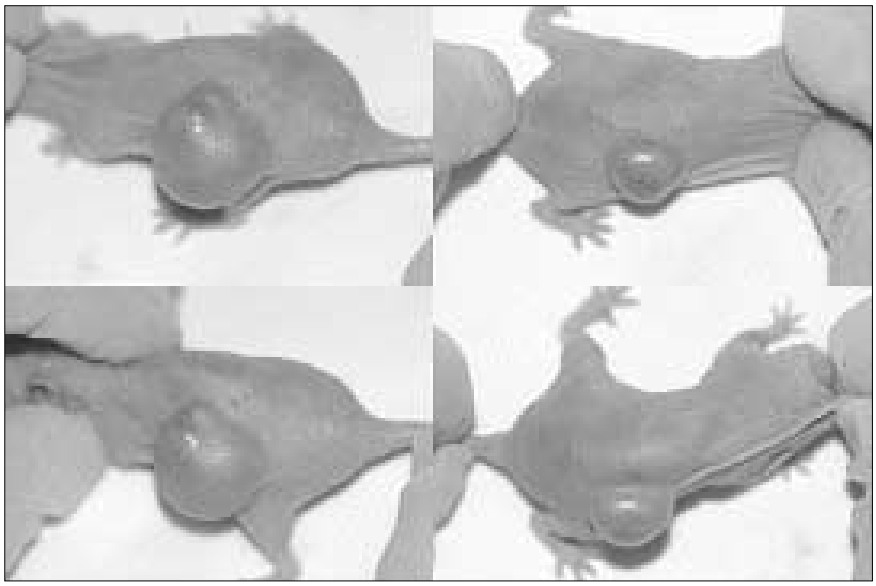

Fig. 4. Visual observation of control group(Intraperitoneal injection of normal saline).

러나, 동시 투여 시 Toxol의 농도에 따른 Caspase 3 및 Caspase 9의 mRNA의 발현 정도의 변화는 거의 없는 것으로 보였다(Fig. 3).

2. 생체 실험

1) 종양 부피 측정

HN22 세포주 접종체를 누드마우스 등에 피하 주사하여 종양을 유도하여 부피가 60mm^3 이상 되었을 때 항암제 투여 후 시간 경과에 따라 종양 부피 변화가 나타났다(Fig. 4). 부피 측정 공식을 사용한 후 그래프로 변화를 나타냈다(Fig. 1). Cyclosporin A를 8mg/kg 투여한 실험군에서는 성장 곡선이 전반적으로 대조군에 비해서는 낮게 나타났으나 시간 경과에 따라 부피가 계속 증가하였다(Fig. 5). Taxol만 3mg/kg 투여한 군에서는 종양 크기는 Cyclosporin A를 단독 투여한 실험군에 비해 낮게 증가하였으며, 점차 크기 증가가 둔화되는 양상을 나타냈다(Fig. 6). Cyclosporin A와 Taxol을 함께 투여한 실험군에서는 부피 측정 초기에는 부피 증가가 있었으나 점차 부피 감소가 나타나기 시작하였다(Fig. 7).

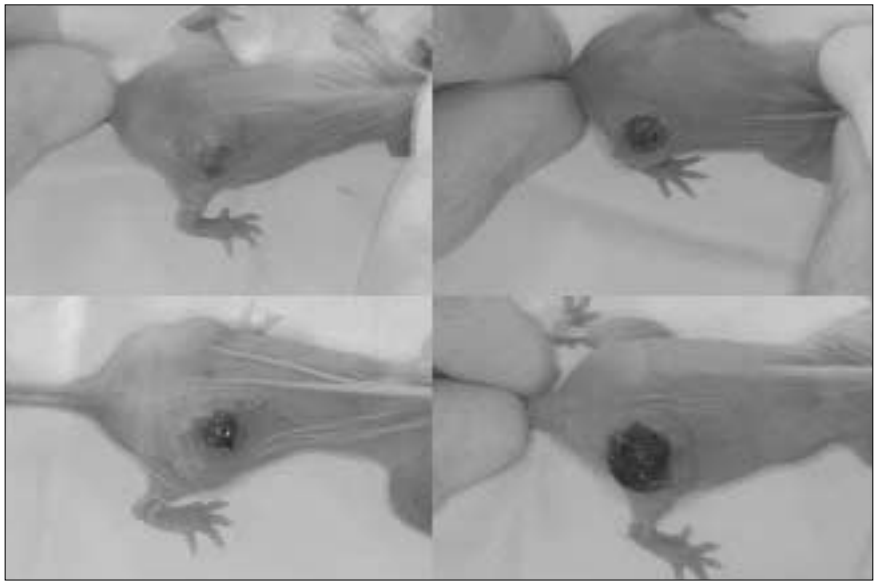

Fig. 5. Visual observation of experimented group(After treatment with Cyclosporin A. 8mg/kg).

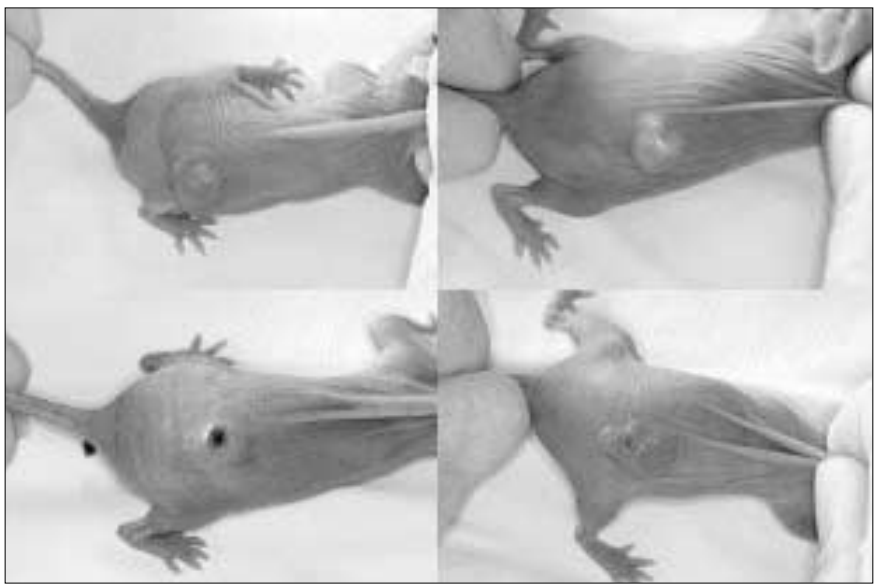

Fig. 6. Visual observation of experimented group(After treatment with Taxol. 3mg/kg).

2) 조직병리 소견

누드마우스에서 HN22 구강 편평세포암종 세포주로 유도된 소견이 나타났다(Fig. 8). 유도된 구강 편평세포암종에 Cyclosporin A를 투여한 실험군의 조직병리 소견은 대조군과 거의 유사하였고 Cyclosporin A의 영향을 받지 않았다(Fig. 9). Taxol 단독 투여 시 조직병리 소견에서는 종양도(島)가 여전히 남아 있었으며 치료 효과는 미미하였다(Fig. 10). Cyclosporin A와 Taxol을 동시 투여한 실험군의 조직병리 소견에서 결체 조직과 석회화를 보였다(Fig. 11).

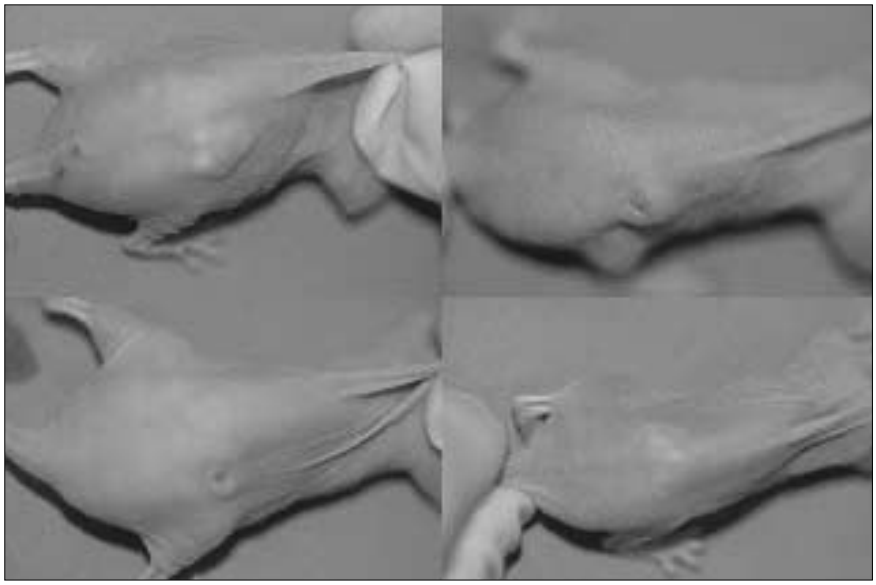

Fig. 7. Visual observation of experimented group(After treatment with Cyclosporin A. 8mg/kg +Taxol. 3mg/kg).

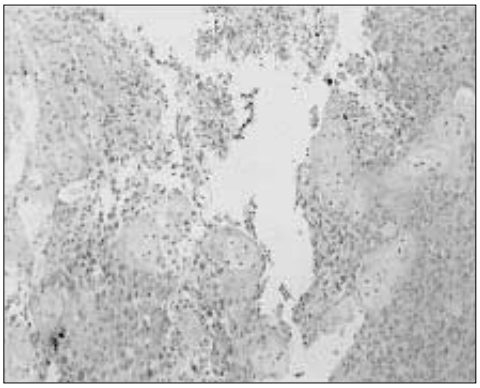

Fig. 8. Microscopic view of control group (H&E, ×100).

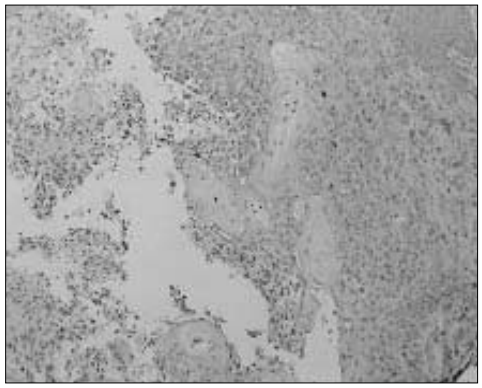

Fig. 9. Microscopic view of experimented group (H&E, × 100 / CsA alone).

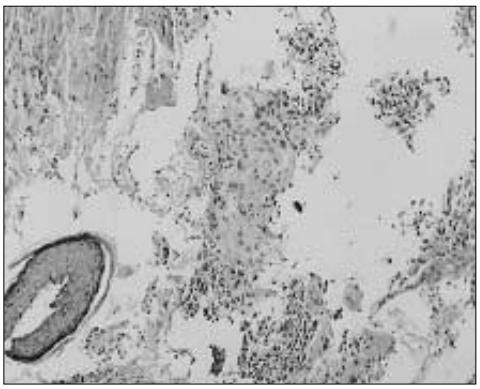

Fig. 10. Microscopic view of experimented group (H&E, × 100 / Taxol alone).

Fig. 11. Microscopic view of experimented group (H&E, × 100 / Taxol +CsA).

Ⅳ. 총괄 및 고찰

세포사멸(Apoptosis)은 능동적 세포 사망으로 유전자 발현의 변화나 과도한 유전자 손상으로 인한 돌연변이나 결함이 있는 유해한 세포를 제거하여 개체의 항상성을 유지하는 기능이며, 세포사멸 결함 시는 암, 자가면역 질환 및 바이러스 감염 등이 야기될 수 있다[36-38]. 암은 신호전달 기전 및 세포 주기의 이상, 유전자의 증폭 등에 의해 세포 성장과 세포사멸의 조절 상실로 발생하며, Bcl-2와 Bcl-XL의 과발현을 통한 억제, p53 유전자의 기능 소실, PI3K/Akt 경로의 활성화 등에 의해 세포사멸을 억제한다[39-42].

세포사멸의 주경로는 death receptor pathway 및 mitochondrial pathway로 구분할 수 있다. 화학요법 약제, DNA의 손상, oxidative stress, 기아상태 세포 등으로 인해 미토콘드리아에서 기시되는 intrinsic apoptosis pathway는 caspase-dependent와 AIF-dependent pathway로 나뉜다.

Caspase-dependent pathway는 미토콘드리아 막의 투과가 유도되어 방출된 cychrome c와 Apaf1의 결합체에 caspase 9가 결합하여 caspase 9, 3의 활성화로 caspase 3이 기질단백질을 분해하여 세포사멸을 유도하게 된다[43-45]. 미토콘드리아 막내 공간에 존재하는 AIF(Apoptosis inducing factor)는 cytochrome C의 방출을 증가시키고 phosphatidylserine의 세포 외부 노출을 증가시켜 핵 내 DNA 분절이 일어난다[46]. 미토콘드리아와 관계없는 extrinsic apoptosis pathway인 receptor-mediated caspase의 활성은 death receptor(Fas. TNFR1, DR5)에 ligand(FasL, TNF-α, TRAIL)의 결합으로 발생하며 활성 caspase 8의 형성으로 caspase 3이 활성 되어 세포사멸을 일으킨다. Caspase 활성의 두 가지 주요 경로는 세포막에서 기시하는 caspase 8 경로와 미토콘드리아에서 시작되는 caspase 9 경로가 있다. 세포막에서 TNF 또는 Fas 신호전달에 의해 활성화된 caspase 8이 Bid를 절단하여 truncated Bid(t-Bid)가 생성되면 미토콘드리아로 이동하여 cytochrome C 방출을 촉진하여 caspase 9 활성을 유도하여 두 경로는 연계 된다[47].

Bcl-2 family 단백질들은 anti-apoptotic 단백질(Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Ced-9, BHRF-1, E1b-19, kDa, A1, ASFV-5HL, Bcl-W, NR[13])과 pro-apoptotic 단백질(Bax, Bcl-XS, Bak, Bad, Bik, Bid)로 나뉜다. Bcl-2는 미토콘드리아 본체를 지키는 역할을 하는데 항암제에 의해 미토콘드리아 손상이 생기면 Bcl-2 인산화가 G2/M 단계에서 발생하여 세포사멸 억제 기능이 차단된다. Bcl-2의 감소는 항암제 감수성을 증가시키고[48], Bcl-2는 P53에 의해 감소될 수 있다[16]. 또한 Ca^{2+}calmodulin dependent phosphatase인 calcineurin이 Bcl-2를 인산화하여 비활성 시킨다[21]. Bcl-XL의 발현은 화학요법 내성 암종 세포주와 연관되어 있으며[49], Intrinsic cell death pathway의 필수 통로 역할을 하는 Bax와 Bak는 미토콘드리아 막에 통로를 만들어 cytochrome C를 유출하여 세포사멸이 시작된다[50]. 두경부 암종의 Bcl-2와 Bax 유전자 발현율에 관한 연구에서 암종의 세포 분화도가 나쁠수록 Bcl-2 유전자 발현율이 높아 세포사멸이 억제되고, Bax는 세포분화도가 좋을수록 발현율이 높아 분화가 좋은 조직에서는 세포사멸이 촉진될 것으로 보고 하였다[51].

본 연구에서는 구강 편평세포암종은 Bcl-2의 발현율이 Bax에 비해 높게 나타났으나, 누드마우스에 유도된 종물의 조직병리 소견상 분화도가 좋은 구강 편평세포암종이었다. 또한 약물을 투여한 실험군에서도 Bax의 발현이 아주 낮아 세포사멸이 억제되는 것으로 생각된다.

Taxol은 미세소관 회합을 촉진하고 미세소관 중합의 분해 및 세포분열을 방해하며 미세소관 역학을 변화시켜 유사분열과 세포증식이 필요한 미세소관 네트워크의 정상 재조직화를 붕괴시키는 것으로 알려졌다[52]. 미세소관 회합을 방해하는 colchicine, podophyllotoxin, vinblastine, maytansine과 같은 다른 antimitotic agent들은 비교적 고농도에서 미세소관의 중량체를 단량체로 분해하는 반면 Taxol은 고농도에서 튜불린 중합을 촉진하고[5], 미세소관 중합체 증가 및 미세소관 다발의 형성을 유도한다[53]. Taxol에 의한 세포사멸 유전자 발현 양상은 각 세포주마다 다르게 나타났다.

Taxol은 lymphoid cell의 시험관 내 실험에서 Bcl-2를 인산화하여 세포사멸을 유도하였고[54], Ovarian SKOV3 및 MCF7 유방 암종 세포주에서는 세포사멸이 caspase 3, 9와 무관한 경로로 나타났으며[13], 폐 종양 A549 세포주에 저농도 Taxol을 투여 시 암 억제 유전자인 P53이 증가하고 세포주기 억제로 항암 효과가 나타나는 것으로 보고 되었다[14]. 또한 ovarian cell 세포주는 Taxol에 의해 JNK 활성화, G2/M 차단 및 Bcl-2 인산화가 나타났고[17], Leukemia HL-60 세포주에서는 caspase 9, 3 활성 경로가 나타났으며 Taxol의 효과는 세포특이성이 있는 것으로 보고 되었다[18]. CCRF-HSB-2 Human T-cell lymphoblastic leukemia cell은 Taxol 투여 시 Fas 유도 세포사멸이 나타났으며 death receptor 및 caspase 9 활성화와 무관하게 caspase 10이 활성 되고 caspase 3, 6 활성으로 이어져 Bcl-2가 분해 되어 세포사멸이 일어났다[19]. Bax는 세포사멸을 증가시키는데 Bax가 높게 나타나는 것만으로 세포사멸이 시작하지 않으며 Taxol과 같은 다른 자극이 있어야 발생한다고 보고 되었다[55]. 이렇듯 다양한 세포주에서 세포사멸 경로가 상이하게 나타났으며 Taxol의 기전은 정확하게 알려지지 않았다.

그러나 본 연구에서는 Taxol을 단독 투여한 구강 편평세

포암종 세포주의 mRNA 발현에서 Bcl-2, caspase 8의 유전자 발현율은 치료 전후에 변화가 거의 없었으며 caspase 3, 9는 미미한 증가를 나타내 Taxol의 항암 효과에 대한 평가를 위해서는 또 다른 세포사멸의 경로 및 저항 기전에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Cyclosporin A는 cytokine 유전자 복제를 억제하여 T-cell 분화를 차단시켜 동종 항원에 대한 세포 독성을 효과적으로 차단하는 강력한 면역억제제로 알려졌으며[20], Calcineurin/NFAT 경로 차단은 Cyclosporin A의 면역억제 기전 중의 하나이다. 염증 또는 세포사멸 같은 스트레스 반응으로 T cell이 활성 될 때 JNK와 p38이 기능을 하는데 Cyclosporin A는 JNK와 p38 signaling pathway를 막는다[21]. 그러나 최근 Cyclosporin A는 세포사멸을 유도하는 것으로도 알려져 lymphoma cell[23], renal cell[24], tubular cell[25], glioma cell[26] 등과 같은 다양한 세포주에서 세포사멸 효과가 보고 되었다. 가토의 lymphoma cell에서 높게 발현된 Bcl-2 및 Bax는 Cyclosporin A 치료 후, Bcl-XL와 더불어 감소되어 세포사멸이 유도되었다[23]. Tubular cell에서는 Cyclosporin A에 의한 미토콘드리아 손상으로 탈분극 및 caspase 2, 3, 9가 활성 되어 세포사멸을 유도한다고 보고 되었다[25]. 구강 편평세포암종 HN4세포주에 Cyclosporin A를 단독 투여한 시험관 내 실험에서 Cyclosporin A의 농도를 증가시키자 VDAC2와 Bcl-2가 감소하였으나 caspase 9는 약간 증가하였고 시험관 내 세포수 측정 및 조직병리 소견에서도 세포의 형태, 성장에 변화를 유도하고 세포사멸을 일으키는 것으로 보고 되었다[27].

그러나 본 연구에서는 구강 편평세포암종 세포주(HN22)의 생체 실험과 시험관 내 실험 모두에서 Cyclosporin A 단독 투여로는 치료 효과가 나타나지 않았다. 이에 Cyclosporin A 단독으로는 HN22 세포주에서는 세포사멸 효과가 없는 것으로 생각된다.

항암제를 단독으로 사용 시 효과가 없는 경우 면역억제제와 동시 투여 후 치료 효과가 나타나 함께 사용되기도 하는데, Bcl-2의 과발현으로 유전자 돌연변이가 생기거나 항암제 자체가 P53 암 억제 단백질의 돌연변이를 일으키면 종양 세포가 내성을 갖게 되며, 이러한 약제 내성에 Cyclosporin A가 효과가 있는 것으로 알려지고 있다[30]. P-gp(Plasma membrane glycoprotein)는 약제 운반 단백질 역할을 하여 세포 내 약 농도를 감소시키는데, P-gp 길항제인 Cyclosporin A를 함께 투여하게 되면 세포사멸 능력을 강화시키고 표적 부위에서 Taxol 약제 내성을 반전시킨다. P-gp가 억제되면 Taxol의 장내 흡수를 증가되고 billiary track을 통한 소실을 막아 주어 항암 효과가 상승된다. Taxol을 구강 복용 시 체내 농도가 낮아 약 효능이 부족했는데 Cyclosporin A에 의해 장내 흡수 및 효능이 증강되어 Taxol의 복용이 가능해졌다[32-34]. 또한 폐암 치료에 Taxol과 Cyclosporin A 흡입제를 저농도로 동시 투여하면 전신 독성을 최소화한다고 보고 되었다[14]. Cyclosporin A는 Paclitaxel 대사에 관련된 Cytochrome P450-mediated metabolism의 억제제로도 알려져 있다[56].

Nomura 등[28]은 면역억제제에 의한 Taxol의 세포사멸 감수성 강화에 관한 실험에서 Taxol에 저항하는 T24 방광암 세포에 Cyclosporin A를 동시 투여 후 극적으로 Taxol에 대한 감수성이 강화되었으며, 이 세포주에서 Taxol은 JNK 경로 활성과 Bcl-2 인산화에 따른 세포사멸을 유도하였으며 Cyclosporin A는 calcineurin의 활성을 억제해서 Bcl-2 인산화를 강화하여 Taxol의 세포사멸 효과가 증가되었다. 또한 Cyclosporin A 단독 투여만으로는 JNK를 활성 시키지 못해 Bcl-2 인산화를 야기하지 않는다고 보고하였다.

신장암이 폐로 전이된 마우스 실험에서 Cyclosporin A 단독 투여와 Paclitaxel와 동시 투여를 비교 실험한 결과 Cyclosporin A 단독 치료는 항암 효과가 없는 것으로 나타났고 Cyclosporin A와 동시 투여 시 확연하게 암종 크기 및 암종의 갯수가 감소되었으나, Cyclosporin A의 용량을 증가시키면 체중 감소 및 신독성을 유발하므로 사용 용량을 제한하여 사용해야 한다고 보고했다[35].

Taxol 저항을 보이는 간암 세포의 시험관 내 실험에서 Cyclosporin A는 AKT 활성과 BAD phosphorylation을 방해해서 Taxol 저항을 효과적으로 반전하였으며 caspase 9, 3 활성을 증가시켰다[42].

본 연구에서는 HN22 구강 편평세포암종 세포주에 Cyclosporin A와 Taxol을 동시 투여 후 유전자 발현의 변화에서 caspase 9, 3은 급격히 증가 하였으며 caspase 8은 변화가 없었다. 이는 미토콘드리아 막 유도에 의한 세포사멸이 발현된 것으로 생각된다. 또한 HN22 세포주로 암종을 유도한 누드마우스에서 Cyclosporin A만 단독 투여한 경우에는 종물이 감소하지 않았으나, 두 약제를 동시 투여한 경우에는 종물의 크기가 현저히 감소되어 치료가 되었다. 구강 편평세포암종의 항암 치료 시 Taxol과 Cyclosporin A를 동시 투여하면 세포사멸 상승효과가 나타나 추후 임상에서 효과적인 치료 방법으로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

Ⅴ. 결 론

구강 편평세포암종의 항암 치료 효과를 평가하기 위해 최신 항암제인 Taxol을 Cyclosporin A와 함께 사용하여 나타나는 상승작용에 대한 실험 과 Taxol과 Cyclosporin A를 각각 단독으로 투여한 후 항암 효과를 평가하였다. 시험관 내 실험으로 total RNA 추출 후 RT-PCR 분석으로 유전자 발현의 변화를 관찰하였고, 생체 실험으로는 누드마우스에 HN22 암종을 유도한 후 조직병리 소견 및 부피 변화 측

정을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 종양 세포주에서 저농도 Cyclosporin A 또는 Taxol를 각각 단독 투여 시 Bcl-2, Bax, caspase 3, 8, 9 mRNA 발현에는 차이가 없었다.
2. Cyclosporin A와 Taxol을 동시 투여 시 caspase 3, 9 mRNA 발현이 뚜렷이 증가하였다.
3. 종양 세포주에 Cyclosporin A와 Taxol을 함께 투여 시 Taxol의 농도 변화에 따른 caspase 3, 9 mRNA 발현에는 차이가 없었다.
4. 실험의 모든 군에서 Bcl-2, Bax, caspase 8 mRNA는 유사한 수준을 유지하고 있었다.
5. 종물이 유도된 누드마우스에 Cyclosporin A를 복강내 단독으로 투여한 경우 조직병리 소견은 대조군과 유사하였다. 대조군에 비해서는 종양 크기 증가는 약간 낮게 나타났으나 치료 효과는 없는 것으로 생각되었다.
6. Taxol 단독 투여 시 조직병리 소견에서 종양도(島)가 발견되었으며 종양 크기는 Cyclosporin A 단독 투여 시에 비해서는 증가율이 시간 증가에 따라 둔화되는 양상을 나타냈다.
7. Taxol과 Cyclosporin A를 동시 투여 시 조직병리 소견에서 결체 조직과 석회화를 보였고 육안적 부피 측정에서는 종물이 감소되어 정상 누드마우스와 유사하게 보였다.

이상의 연구 결과에서 시험관 내 실험 및 동물 실험에서 두 약제를 동시 투여 시 치료 효과가 뚜렷이 나타나는 상승 효과가 관찰되었다. 따라서 이 결과를 토대로 구강 편평세포암종의 항암치료 방법으로 Taxol과 Cyclosporin A를 동시 투여하는 임상 실험 및 검증을 통해 치료에 적용할 수 있을 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. Peterson LJ : Principles of oral and maxillofacial surgery. Philadelphia, J.B. Lippincott, 1992.
3. 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.
4. Yvon A, Wadsworth P, Jordan MA : Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells. Mol Biol Cell 10(4) : 947, 1999.
5. Rowinsky EK : The development and clinical utility of the taxan class of antimicrotubule chemotherapy a gents. Annu Rev Med 48 : 353, 1997.
6. Rowinsky EK, Cazenave LA, Donehower RC : Taxol ; a novel investigational antimicrotuble agent. Nat Cancer Inst 82 : 1247, 1999.
7. Schiff PB, Fant J, Horwitz SB : Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. Nature 277 : 665, 1979.
8. Schiff PB, Horwitz SB : Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. Proc Natl cad Sci USA 77 : 1561, 1980.
9. Manfredi J, Horwitz SB : Taxol ; An antimitotic agents with a new mechanism of action. Pharmcol Ther 25 : 83, 1984.
10. Jordan MA, Wendell KL, Gardiner S et al : Mitotic block induce in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. Cancer Res 56 : 816, 1996.
11. Jordan MA, Wilson L : Microtubules and actin filaments :dynamic targets for cancer chemotherpy. Curr Opin Cell Biol 10(1) : 123, 1998.
12. Ahn HJ, Kim YS, KIm YU et al : Mechanism of taxol induced apotosis in human SKOV2 ovarian carcinoma cells. J cellular Biochem 91 : 1043, 2004.
13. Ofir R, Seiman R, Rabinski T et al : Taxol-induced apoptosis in human SKOV3 ovarian and MCF7 breast carcinoma cells is caspase-3 and caspase-9 independent. Cell Death Differ 9(6) : 636, 2002.
14. Mcmorris TC, Estes Kelner MJ, L, et al : Noneresponsiveness of the metastatic human lung carcinoma MV522 xenograft to conventional anticancer agents. Anticancer Res 15 : 867, 1995.
15. Rowinsky EK, Donehower RC, Jones RJ et al : Microtubule changes and cytotoxicity in leukemic cell lines treated withtaxol. Cancer Res 49 : 4093, 1988.
16. Haldar S, Jena N, Croce CM : Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. Proc Natl Acad Sci USA 9b : 92(10) : 4507, 1995.
17. Wang TH, Popp DM, Wang HS et al : Microtubule dysfunction induced by paclitaxel initiates apoptosis through both c-Jun N-terminal Kinase(JNK)-dependent and independent pathways in ovarian cancer cell. J Biol Chem 274(12) : 8208, 1999.
18. Lu KH, Leu K, Liao HH et al : Induction of caspase -3-dependent apoptosis in human leukemia HL-60 cells by paclitaxel. Clin Chem Acta 357(1) : 65, 2005.
19. Park SJ, Wu CW, John D et al : Taxol Induces Caspase-10-dependent Apoptosis. J Bio Chem 279(49) : 51057, 2004.
20. Laupacis A, Keown PA, Ulan RA : Cyclosporin A : a powerful immunosuppessant. Can med Assoc J 126 : 1041, 1986.
21. Satoshi M, Shigeo K : Mechanisms of action of cyclosporine. Immunopharm 47 : 119, 2000.
22. Braida M, Knop J : Effect of cyclosporin A on the T-effector and T-suppressor cell response in contact sensitivity. Immun 59 : 503, 1986.
23. Mongini C, Waldner C, Lopes EC et al : Induction of apoptosis in murine lymphoma cells by cyclosporin A. Int J Mol Med 7(4) : 431, 2001.
24. Healy E, Dempsey M, Lally C et al : Apoptosis and necrosis : mechanisms of cell death induced by cyclosporine A in a renal proximal tubular cell line. Kidney Int 54(6) : 1955, 1998.
25. Justo P, Lorz C, Sanz A et al : Intracellular mechanisms cyclosporin A-induced tubular cell apoptosis. J Am Soc Nephrol 14(12) : 3072, 2003.
26. Zupanska A, Dziembowska M, Ellert MA et al : Cyclosporine A induces growth arrest or programmed cell death of human glioma cells. Neuro chem Int 47(6) : 430, 2005.

27. Lim HW, Kim KW : Anti-cancer Effect of Cyclosporin A on oral squamous cell carcinoma cell line. J Kor Oral Maxillofac Surg 30(6) : 474, 2004.
28. Nomura T, Yamamoto H, Mimata H et al : Enhancement by cyclosporin A of taxol-indeced apoptosis of human urinary bladder cancer cells. Urol Res 30(2) : 102, 2002.
29. Ross HJ, Canada AL, Slater LM : Cyclosporin A enhances paclitaxel toxicity against leukemia and respiratory epithelial cancers. Clin Cancer Res 3 : 57, 1997.
30. Sood AK, Sorosky JI, Squatrito RC et al : Cyclosporin A reverse chemoresistance in patients with gynecologic malignancies. Neoplasia 1 : 118, 1999.
31. Sindermann JR, Skaletz-Rorowski A, Bartels A et al : Paclitaxel and cyclosporine A show supra-additive antiproliferative effects on smooth muscle cells by activation of protein kinases C. Basic Res Cardiol 97(2) : 125, 2002.
32. Meerum-Terwogt JM, Malingre MM, Beijnen JH et al : Coadministration of oral cyclosporin A enables oral therapy with paclitaxel. Clin Cancer Res 5 : 3379, 1999.
33. Kimura Y, Aoki J, Kohno M et al : P-glycoprotein inhibition by the multidrug resistance-reversing agent MS-209 enhances bioavailability and antitumor efficacy of orally administered paclitaxel. Cancer Chemother Pharmacol 49(4) : 322, 2002.
34. Mirte MM, Dick JR, Jos H et al : Coadministration of Cyclosporine strongly enhances the oral bioavailability of docetaxel. J Clin Oncology 19(4) : 1160, 2001.
35. Koshkina NV, Golunski E, Roberts LE et al : Cyclosporin A aerosol improves the anticancer effect of paclitaxel aerosol in mice. J Aerosol Med 17(1) : 7, 2004.
36. Kaufmann SH, Earnshaw WC : Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. Exp Cell Res 256(1) : 42, 2000.
37. Hengartner MO : The biochemistry of apoptosis. Nature 40(6805) : 770, 2000.
38. Meier P, Finch A, Evan G : Apoptosis in development. Nature 407(6805) : 796, 2000.
39. Haldar S, Basu A, Croce CM : Bcl-2 is the guardian of microtubule integrity. Cancer Res 57(2) : 229, 1997.
40. Ibrado AM, Liu L, Bhalla K : Bcl-xL overexpression inhibits progression of molecular events leading to paclitaxel-induced apoptosis of human acute myeloid leukemia HL-60 cells. Cancer Res 57 : 1109, 1997.
41. Fana V, Sara V, Patrizia B et al : Inactivation of p53 in a human ovarian cancer cell line increases the sensitivity to paclitaxel by inducing G2/M arrest and apoptosis. Exp cell Res 241 : 96, 1998.
42. Lin HL, Lui WY, Liu TY et al : Reversal of Taxol resistance in hepatoma by cyclosporin A : involvement of the PI-3 Kinase-AKT 1 pathway. Brit J Can 88 : 973, 2003.
43. Susin SA, Lorenza HK, Zamzami N et al : Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. Nature 397 : 441, 1999.
44. Martin Crompton : The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. Biochem 341 : 233, 1999.
45. Crompton MB : Bid and the permeabilization of mitochondrial outer membrane in apoptosis. Curr Opin Cell Biol 12(4) : 414, 2000.
46. Li H, Zhu H, Xu C et al : Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. Cell 94(4) : 491, 1998.
47. Wieder T, Essmann F, Prokop A et al : Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor-ligand interaction and occurs downstream of caspase-3. Blood 97(5) : 1378, 2001.
48. Reed JC : Prosmise and problem of Bcl-2 antisene therapy. J Natl Cancer Inst 89 : 988, 1997.
49. Amundson SA : An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. Reserch 60 : 6101, 2000.
50. Hertz C, Vitte PA, Bombrun A et al : Bax channel inhibitors prevent mitochondrial-mediated apoptosis and protect neurons in a model of global brain ischemia. J Biol Chem 280(52) : 42960, 2005.
51. Hwang CS, Choi CO, Kim IS : Detection of Bcl2 & Bax Expression in the Head and Neck Cancers. J Kor Can Asso 27(4) : 570, 1995.
52. Amos LA, Lowe J : How Taxol stabilises microtubule structure. Chem. Biol 6 : 65, 1999.
53. Kumar N : Taxol-induced polymerization of purified tubulin. J Biol Chem 256 : 10435, 1981.
54. Linus TC, Eva L, Kenton RC et al : Alteration of lymphocyte microtuble assembly, cyctotoxicity, and activation by the anticancer drug taxol. Cancer Res 41 : 286, 1994.
55. Thomas S, Linda S, Stanley K et al : BAX enhance paclitaxel-induced apoptosis through a p53-independent pathway Proc Natl Acad Sci USA 93(24) : 14094, 1996.
56. Sonnichsen DS, Liu Q, Scheutz EG et al : Variability in human cytochrome P450 paclitaxel metabolism. J Pharm Exp Ther 275 : 566, 1995.

저자 연락처
우편번호 330-716
충남 천안시 신부동 산 7-1번지
단국대학교 치과대학 구강악안면외과학교실
서 민 정

원고 접수일 2006년 12월 20일
게재 확정일 2007년 7월 20일

Reprint Requests
Min-Jung Suh
Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Dankook University, 7-1 Sinbudong, Cheonan, 330-716, Korea
Tel: 82-41-550-1993 Fax: 82-41-551-8988
E-mail: kkwoms@dku.edu

Paper received 20 December 2006
Paper accepted 20 July 2007