

# COX-2 억제제에 의한 AKT 경로를 통한 구강편평세포암종 세포주의 세포사멸 유도

서영호 · 한세진 · 이재훈

단국대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

## Abstract

### COX-2 INHIBITOR INDUCED APOPTOSIS IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA CELL LINE THROUGH AKT PATHWAY

Young-Ho Seo, Se-Jin Han, Jae-Hoon Lee

*Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Dankook University*

The objectives of this study was to check up the effect of celecoxib, COX-2 inhibitor, on the pathogenesis of oral squamous cell carcinoma. After mefenamic acid, aspirin and celecoxib, COX-2 inhibitor, were inoculated to HN 22 cell line, the following results were obtained through tumor cell viability by wortmannin, growth curve of tumor cell line, apoptotic index, PGE<sub>2</sub> synthesis, total RNA extraction, RT-PCR analysis and TEM features.

1. When wortmannin and celecoxib were given together, the survival rate of tumor cells was lowest about 47 %. So wortmannin had an effect on the decrease of survival rate of tumor cells.
2. In growth curve, the slowest growth was observed in celecoxib inoculated group.
3. The synthesis of PGE<sub>2</sub> was decreased in all group and the obvious suppression and highest apoptotic index was observed in celecoxib inoculated group.
4. Suppression of expression of COX-2 mRNA was evident in celecoxib inoculated group. But that of COX-1,2 mRNA was observed in mefenamic acid inoculated group and aspirin inoculated group.
5. In celecoxib inoculated group, mRNA expression of AKT1 was decreased and that of PTEN & expression of caspase 3 and 9 was evidently increased.

Depending on above results, when celecoxib was inoculated to oral squamous cell carcinoma cell line, an increase of mRNA expression of caspase 3,9 and PTEN is related to a decrease of mRNA expression of AKT1. Wortmannin had an effect on the decrease of survival rate of tumor cells. Celecoxib might induce apoptosis of tumor cell by suppression of AKT1 pathway and COX-2 inhibition. This results suggested that COX-2 inhibitor might be significantly effective in chemoprevention of oral squamous cell carcinoma.

**Key words:** COX-2 growth inhibitor, Apoptosis of oral squamous cell carcinoma

## I. 서 론

구강암은 사람에게 발생하는 모든 암종 2~5%가량을 차지하고 있으며, 두경부 부위에 있어서는 후두암 다음으로 발생률이 높은 암이다. 구강암 중에서도 특히 구강편평세포암종은 가장 빈발하며, 전이 및 재발률이 높아 장기 생존율이 50% 미만일 정도로 예후가 불량하며 파괴적인 양상을 보인다. 구강암의 치료는 수술, 방사선치료 및 항암화학요

법 등이 주로 이용되며, 이 중 항암화학요법은 수술이나 방사선 치료 전후 또는 동시에 사용되며, 원발 병소뿐만 아니라 전이되거나 재발되는 병소에 대한 예방이나 치료에 매우 중요한 방법이다. 이러한 여러 가지 치료방법들에 대한 연구에 상당한 발전이 있었음에도 불구하고 구강편평세포암종은 국소적 재발과 전이로 인하여 그 예후가 크게 개선되지는 않았다<sup>1)</sup>. 항암화학요법은 주로 강한 세포 독성을 유발하여 종양세포뿐만 아니라 주위의 건전한 정상조직에도 심

각한 부작용을 유발하기도 한다. 이러한 정상조직에 대한 부작용을 줄이기 위하여 근래에는 종양세포의 세포사멸(apoptosis)을 유도에 대한 연구가 활발히 진행되어 오고 있다. 세포사멸은 발생 및 분화과정 뿐만 아니라 세포손상 및 감염, 방사선, 약물에 의해서도 나타날 수 있는 일종의 프로그램화 된 세포의 소멸과정으로 주위 조직에 대한 부작용을 최소화 할 수 있다<sup>2)</sup>. 따라서 이러한 세포사멸을 보다 효과적으로 유도하고, 주변 정상조직에 대한 부작용을 줄일 수 있는 여러 가지 약제들에 대한 연구도 진행되어 왔다.

이와 더불어 이미 상당히 진행된 암종에 대한 치료에 앞서 초기단계의 암의 성장을 억제하거나, 암 발생을 예방하기 위한 화학적 암 예방에 대한 연구 또한 진행되어 왔다. 구강암은 전암병소의 관찰이 상대적으로 용이하기 때문에 이러한 화학적인 암 예방의 좋은 후보군이라 할 수 있다. 화학적 암 예방 제제로서 비스테로이드성 소염진통제(Non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)의 장기 복용 시 암 종 발현을 예방할 수 있다는 여러 보고가 있었다. Waddell 등<sup>3)</sup>은 가족성 선천성 용종증(Familial adenomatous polyposis, FAP)과 Gardner씨 증후군 환자에 항류마티스성 항염증 제제인 sulindac을 투여 했을 때 용종의 성장이 감소되고 없어지는 현상을 관찰하였고, 6년간의 추적관찰 결과 sulindac 치료를 중단한 경우에 용종이 재발되는 것으로 보아 sulindac의 세포증식억제 효과로 인한 것이라 하였다. 이후 다른 연구들에서 단발성의 결장 직장암이나 가족성 선천성 용종증 환자에서 NSAIDs를 장기 복용할 경우 결장 직장암이 40~50%까지 감소한다는 것이 보고되었다<sup>4)</sup>.

NSAIDs의 이러한 세포증식억제 작용기전에 대한 연구에서 COX (cyclooxygenase)의 역할이 주목받고 있다. COX는 COX-1과 COX-2의 두 가지의 동질효소가 있으며, 이들은 각기 다른 유전자에 의해 인코딩된다. COX-1은 대부분의 정상조직에서 발현되며 조직 보호 등 일상적인 역할을 하는 반면에<sup>5)</sup>, COX-2는 성장인자, 사이토카인, 종양촉진제 등에 의해 자극되면 즉각적이고 일시적으로 발현되는 유전자에 의해 합성되며, 염증이나 암 조직에서 증가된다<sup>6)</sup>. NSAIDs는 COX-1과 COX-2 모두의 활성을 억제함으로써 프로스타글란딘의 합성을 저해한다<sup>7)</sup>. 선택적 COX-2 억제제로서 celecoxib (Searle/Pharmacia/Pfizer, New London, CT), rofecoxib (Merck, Whitehouse, NJ) 및 valdecoxib (Pharmacia/Pfizer)의 세 종류의 약물이 대표적이다. 이들 선택적 COX-2 억제제는 NSAIDs와 유사한 효능을 보이면서 COX-1 효소를 차단하지 않음으로써 NSAIDs의 장기 복용 시 위장관계와 혈소판에 나타나는 부작용을 크게 감소시켰다. 암 조직에서 COX-2 유전자의 증가와 관련하여 Oshima 등<sup>8)</sup>은 가족성 선천성 용종증 쥐를 이용한 실험에서 COX-2 유전자를 없앤 경우에 장 용종의 수와 크기가 크게 감소한다는 것을 보여주었고, 선택적

COX-2 억제제가 실험동물에서 장 종양의 발생을 방해한다는 연구도 있었다<sup>9)</sup>. 따라서 암 조직에서의 COX-2 유전자의 증가와 COX-2 유전자의 억제를 통하여 암종세포의 성장을 억제할 수 있다는 것이 입증된 것이다.

구강암에서의 COX-2 유전자에 관한 다양한 연구가 진행되었다. Chan 등<sup>10)</sup>은 두경부의 편평세포암종에서 COX-2 mRNA가 정상 구강점막에 비해 150배가량 증가하였으며, COX-2 단백질도 6 증례의 두경부 편평세포암종에서 모두 발견되었는데 반해 정상 구강점막에서는 발견되지 않았다고 하였다. 이처럼 대부분의 구강편평세포암종에서 COX-2가 과발현되고, COX-2의 발현이 증가됨에 따라, 종양세포의 세포사멸이 억제되고 혈관의 신생화가 유도되며 면역계가 파괴되어 종양세포의 성장과 침투가 증가된다고 알려져 있다<sup>11)</sup>. 그러나, COX-2가 종양세포에서 과발현 되는 원인이나 기전은 아직까지는 잘 규명되지 않고 있다.

종양세포는 다양한 경로를 통하여 세포사멸을 제어하게 된다. bcl-2와 bcl-XL의 과발현을 통한 세포사멸의 억제 및 p53유전자의 기능 상실, PI3K/AKT 경로 활성화 등에 의해 세포사멸이 억제되고 있다. 어떤 암세포들은 bcl-2 단백질을 많이 만들어 내어 세포사멸을 억제하기도 한다. 세포사멸의 여러 경로중 대표적인 PI3K/AKT 경로는 여러 연구들에 의하면 세포생존에 관여하는 인자이며 또한 암유발 조절인자로서, 항암화학요법에 저항성을 나타내는 인자로 밝혀져 있다<sup>12-14)</sup>. 세포의 휴지기에 있어서는 이 경로가 정지되어 있지만, 인간의 종양에서는 일반적으로 이 경로의 통제가 해제되어 구조적 활성이 나타나게 되어 세포사멸과정이 억제되게 된다<sup>15)</sup>.

본 연구는 선택적 COX-2 억제제인 celecoxib 투여 시 구강편평세포암종 세포 성장에 미치는 영향과 그 작용 기전을 확인하기 위해, HN 22 세포주에 mefenamic acid, aspirin 및 선택적 COX-2 억제제인 celecoxib를 각각 투여한 후 wortmannin을 이용한 세포생존력 측정, 약제 투여 후 종양세포주의 성장곡선의 관찰, 세포사멸지수 측정, PGE<sub>2</sub>의 합성 측정, total RNA extraction과 RT-PCR 분석 및 투과전자현미경하에서의 관찰을 실시하였다.

## II. 연구 재료 및 방법

### 1. 구강편평세포암종 세포주 배양

ATCC(Manasas, USA)사에서 구입한 구강편평세포암종 세포주로 HN 22 세포주를 사용하여, HN 22 종양세포 2×10<sup>5</sup>개를 100mm 배양 디쉬에 각각 3개씩 분주하여 10% FBS(Fetal bovine serum)를 포함하는 DMEM(Hyclone, USA)에 계대 배양하였고 조건은 95% 습기가 있는 CO<sub>2</sub> 배양기를 사용하였다.

## 2. Mefenamic acid, Aspirin 및 Celecoxib의 농도 조절 및 약제 투여

Mefenamic acid(Pontal<sup>®</sup>, 유한양행), aspirin(Astrix<sup>®</sup>, 보령제약) 및 celecoxib (Celebrex<sup>®</sup>, 한국화이자)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 군과 DMSO가 포함된 배양액에서 구강편평세포암종 세포주를 배양하였고, 실험군은 투약된 약제에 따라 3개의 군으로 분류하였다. 실험군은 50 $\mu$ M 투여한 후 배양된 세포주에 약제 투여 후 역상차 현미경으로 관찰하였다.

## 3. Wortmannin 과 Mefenamic acid, Aspirin 및 Celecoxib를 이용한 구강편평 세포암종 세포주(HN22)의 종양세포 생존력 분석

96 well을 사용하였으며 well 당 2 × 10<sup>5</sup>개의 세포를 3 well에 분주하고 37 $^{\circ}$ C의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양하였다. 100 $\mu$ M의 wortmannin과 50 $\mu$ g/ml의 mefenamic acid, aspirin, celecoxib를 넣고 72시간을 배양 후 MTT(5-diphenyl dimethyl-tetrazolium bromide)용액 50 $\mu$ l를 각각의 well에 첨가하고 다시 34시간 동안 37 $^{\circ}$ C 54% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한 후 상층액을 제거하여 MTT에 의해 형성된 결정만 남겼다. 그 다음 DMSO를 0.2ml씩 각각의 well에 분주하여 잘 혼합하였고 microplate reader로 파장 550nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 4. 약제 투여 후 종양세포주의 성장곡선

종양세포 2×10<sup>5</sup> 개를 100mm 딿쉬 3개에 분주하고 50 $\mu$ M의 mefenamic acid, aspirin 및 celecoxib를 각각 투여 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7일째 DPBS(Dulbecco's phosphate-buffered saline)로 세포를 세척하고 각 well에 Trypsin-EDTA 용액(0.5% Trypsin-0.53mM EDTA 4Na)을 넣고 5분간 기다린 후 세포를 수거하여 원심분리 하였다. DMEM 배양액 4ml씩 원심분리관에 혼합한 후 90 $\mu$ l를 튜브에 옮겨 담고 Trypan-blue 용액 10 $\mu$ l를 혼합하여 헤모사이로메터로 세포 수를 측정하여 성장곡선으로 표시하였다.

## 5. 세포사멸지수(Apoptotic Index) 측정

사멸된 세포의 측정은 ethidium bromide(EB, Sigma)로 염색하여 시행되었다. 72시간동안 다양한 농도의 약제에 노출된 세포들은 trypsinization과 원심분리를 통해 수

집되었다. 2×10<sup>5</sup>개의 세포들이 20 $\mu$ l/ml의 ethidium bromide를 함유하고 있는 50 $\mu$ l PBS용액으로 재현탁 되었다. 세포들은 5분간 실온에서 어두운 곳에서 배양되었고, 슬라이드에 고정 후 FITC(fluorescein isothiocyanate) 필터가 있는 형광현미경하에서 관찰하였다. 사멸된 세포들은 ethidium bromide에 의해 염색되어 붉은 오렌지 형광빛으로 관찰된다.

## 6. 약제 투여 후 종양세포주의 Prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>) 합성 측정

실험에 사용된 각 약제별로 약제에 대한 COX-2 억제에 의한 PGE<sub>2</sub>의 양을 변화를 측정하기 위해서 PGE<sub>2</sub> 검출 키트(Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ, USA)를 이용한 competitive PGE<sub>2</sub> enzyme immunoassay를 시행하였다. HN 22 종양세포를 50 $\mu$ M의 mefenamic acid, aspirin, 및 celecoxib로 각각 72시간 동안 처리하고 종양세포주의 배양액을 채취해서 세포 잔사를 제거하기 위해 2500g에서 2분 동안 원심분리한 후, 부유액을 깨끗한 튜브로 옮겨 담고 검사할 때까지 -70 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 이 샘플을 희석한 후 well로 옮겨놓고 피펫을 이용하여 PGE<sub>2</sub> conjugate를 각 well에 첨가하였다. 이후 PGE<sub>2</sub>에 대한 monoclonal antibody를 각 well에 첨가한 후 4 $^{\circ}$ C에서 18시간 동안 처리하였다. Well plate를 4번 수세하고 tetramethylbenzidine 기질을 첨가하여 염색하였다. 실온에서 30분 동안 반응시킨 후 1M sulfuric acid를 첨가하여 염색 반응을 정지시켰다. ELx800 reader(Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)로 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 아울러 광학현미경으로 세포의 총 개수를 세어 PGE<sub>2</sub>의 양을 10<sup>6</sup>개의 세포당 pg 단위로 표현하였다.

## 7. Total RNA extraction

구강편평세포암종 HN 22 세포주를 100mm 배양 딿쉬에서 70-80%정도 성장시킨 후 배양액을 제거하고 pH7.4 PBS(Gibco BRL, USA)로 수세하였다. Guanidinium thiocyanate 방법이 total RNA 추출에 사용되었고, RNA 추출 버퍼로 Guanidinium thiocyanate 용액(4M Guanidinium thiocyanate, 1%  $\beta$ -mercaptoethanol, 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 $^{\circ}$ C의 에탄올 7.5ml에 보관하였다. 건조된 침전물을 Guanidine-Hcl 용

**Table 1.** Sequences of primers for amplified cDNA of Cox-1, Cox-2, PTEN, AKT1, Bcl-2, Caspase 9, Caspase 3 and GAPDH

Gene	Primer	Sequence
COX-1	sense	5'-GGGACACAGCCGTGAGTAAT-3'
	antisense	5'-TCACTGCTGTTGGGTCTCTG-3'
COX-2	sense	5'-TGAGCATCTACGGTTTGCTG-3'
	antisense	5'-TGCTTGTCTGGAACAACACTGC-3'
PTEN	sense	5'-AACGTGGGAGTAGACGGATG-3'
	antisense	5'-TAGCCCTCAGGAAGAGACCA-3'
AKT1	sense	5'-GCCCTACATCACAGGAGGAA-3'
	antisense	5'-GCGTGAGTGTGGATATGTGG-3'
Bcl-2	sense	5'-GAGGGAGTCAGGCTCTTCC-3'
	antisense	5'-TCACCAAATCCTCCAGAAC-3'
Caspase 9	sense	5'-TTTTTCAGAGGGGATCGTTG-3'
	antisense	5'-CGGCCTCCACTGGTATTTTA-3'
Caspase 3	sense	5'-TGCAGGGTCTCACTCTGTTG-3'
	antisense	5'-CAAAAATCAGCCATGTGTGG-3'
GAPDH	sense	5'-TGCATCCTGCACCAACCAACT-3'
	antisense	5'-TGCATCCTGCACCACCAACT-3'

\* PTEN(putative protein tyrosine phosphatase)

\* GAPDH(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

액(8M Guanidine-HCl, 0.1M sodium acetate pH 7.0, 1%  $\beta$ -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 $\mu$ l 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 전기영동은 다음과 같이 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 $\mu$ g RNA.1.25 $\mu$ l 10X MOPS, 2 $\mu$ l formaldehyde, 6.25 $\mu$ l formamide를 혼합하고 65℃에서 5분간 가열 후 얼음에 식혔다. 1.25 $\mu$ l 젤 로딩 용액을 섞고, 완충 용액으로 1X MOPS를 쓰고 120 V/cm으로 하여 bromophenol blue의 푸른색이 전체 젤의 2/3까지 나오도록 전기영동을 시행하였다.

## 8. RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 증폭

1 $\mu$ g 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/ $\mu$ l superscript II reverse transcriptase(Gibco BRL, USA)를 섞어 42℃에 60분간 처리 후 cDNA를 만들었다. 이 cDNA를 80 $\mu$ l 물에 희석한 후 1.5mM MgCl, 50mM KCl, 100mM Tris-HCl, pH8.3 200 $\mu$ M dTAD, dTTP, dGTP, biotinylated-dCTP를 0.75  $\mu$ l씩 만들고 double 2.5 $\mu$ l cDNA가 포함된 1unit Tag-polymerase(Gibco BRL, USA)를 반응물 총량이 50 $\mu$ l로 만들어 PCR 증폭을 시행하였다. PCR 조건의 한 cycle은 변색 과정을 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 primer를 이용하여 증폭을 시행하였다 (Table 1). 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.

대조군은 mRNA expression/mRNA expression GAPDH를 1로 하고 나머지는 유전자 발현양/mRNA expression GAPDH로 환산하여 그래프에 표시하였다.

### 9. 투과전자현미경 관찰

70~80% 정도의 충만전(preconfluency) 상태에서 배양된 HN 22 세포주에 mefenamic acid, aspirin 및 celecoxib 50 $\mu$ M을 각각 투여한 후 0.1M cacodylate buffer(pH 7.4)하의 2.0% glutaraldehyde에 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 고정 후, 0.1M cacodylate buffer(pH 7.4)하여 1.0% osmium tetroxide에 4 $^{\circ}$ C에서 후고정하였다. Graded ethanol에서 탈수 후 Epon812(TAAB Lab., Berk)에 포매한 후 LKB microtome에서 diamond knife를 이용하여 초박절편을 제작하였다. Uranyl acetate lead citrate로 염색 후 투과전자현미경(H-800 TEM, Hitachi, Tokyo, Japan)에서 관찰하였다.

## III. 연구 결과

### 1. Wortmannin과 Mefenamic acid, Aspirin 및 Celecoxib의 투여 시 HN 22 세포주의 생존력 분석

Wortmannin의 단독 투여 시 보다는 mefenamic acid, aspirin 및 celecoxib와의 동시 투여 시에 세포생존력이 더욱 낮아짐을 보였으며, 동시 투여 시 세포의 생존율은 celecoxib, aspirin, mefenamic acid의 순서대로 낮게 관찰되었다. Wortmannin과 celecoxib의 동시 투여 시에 가장 낮은 47% 정도의 세포 생존율이 관찰되었다(Table 2). PI3K inhibitor인 wortmannin과 병행 사용 시 celecoxib가 가장 낮은 세포 생존율을 보이는 것으로 보아 선택적 COX-2 억제제의 사용이 종양세포의 생존율을 낮추는데 보다 효과적임을 알 수 있었다.

### 2. COX-2 억제제가 구강편평세포암종 세포주의 성장에 미치는 효과

HN 22 세포주에 50 $\mu$ M의 mefenamic acid, aspirin 및 celecoxib를 처리하여 시간에 따른 세포성장 억제 효과를 관찰하였다. 관찰한 결과 약제를 처리하지 않은 대조군에서는 기하급수적인 세포성장이 나타나는 데 비해, 50 $\mu$ M의 mefenamic acid, aspirin 및 celecoxib로 처리한 군에서는

1일 이후부터 7일까지 완전한 세포의 성장 억제가 관찰되었으며, celecoxib를 투여한 군에서 성장의 억제가 더 크게 나타났다(Fig. 1). 이상의 결과에서 선택적 COX-2 억제제의 사용이 일반적인 NSAIDs 보다 종양세포의 성장 억제 효과가 크다는 것을 알 수 있었다.

### 3. COX-2 억제제가 구강편평세포암종 세포주의 PGE<sub>2</sub> 합성에 미치는 효과

Mefenamic acid, aspirin 및 celecoxib(3가지 약제)를 모두 동일한 50 $\mu$ M 농도로 HN 22 세포주를 72시간 동안 처리한 후 배양액을 수거하여 PGE<sub>2</sub> immunoassay를 시행하였다. 약제를 투여하지 않은 대조군과 DMSO만을 투여한 군에서의 PGE<sub>2</sub> 합성량은 큰 변화가 없는데 비해서 mefenamic acid, aspirin 및 celecoxib를 투여한 군에서는 PGE<sub>2</sub>의 합성이 급격히 떨어지는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 3가지 약제가 모두 PGE<sub>2</sub>의 합성을 저해하였으나 celecoxib를 투여한 군에서는 mefenamic acid나 aspirin을 투여한 군보다도 현저하게 낮은 PGE<sub>2</sub> 합성을 보였다. 이상의 결과는 선택적 COX-2 억제제가 일반적인 NSAIDs와 같은 비선택적 COX 억제제보다는 더욱 PGE<sub>2</sub> 합성 억

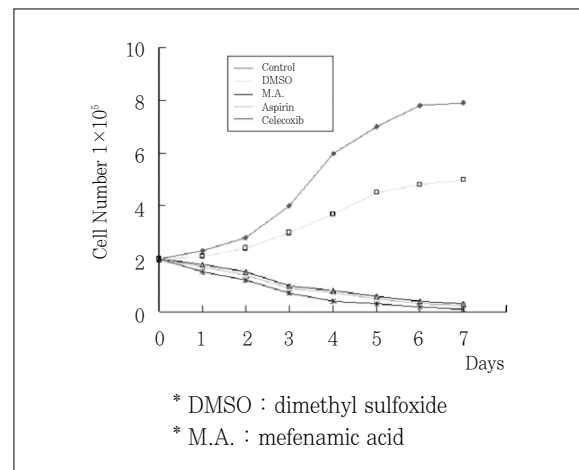
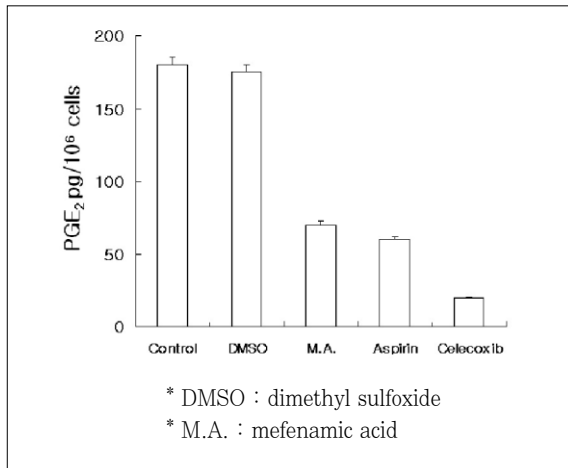


Fig. 1. Growth curve of HN 22 according to 50 $\mu$ M mefenamic acid, aspirin and celecoxib.

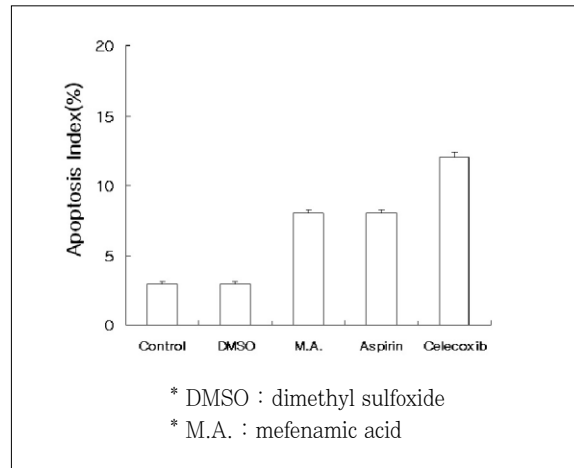
Table 2. HN 22 cell line viability by wortmannin, mefenamic acid, aspirin and Celecoxib

Wortmannin (100 $\mu$ M)	Wortmannin(100 $\mu$ M) + Mefenamic acid(50 $\mu$ g/ml)	Wortmannin(100 $\mu$ M) + Aspirin(50 $\mu$ g/ml)	Wortmannin(100 $\mu$ M) + Celecoxib(50 $\mu$ g/ml)
80 $\pm$ 6.5	79 $\pm$ 6.1	76 $\pm$ 5.1	47 $\pm$ 4.9

Mean $\pm$ SD(%)



**Fig. 2.** Inhibition of PGE<sub>2</sub> synthesis by 50μM mefenamic acid, aspirin and celecoxib in HN 22 cell line.



**Fig. 3.** Apoptosis index by 50μM mefenamic acid, aspirin and celecoxib in HN 22 cell line.

제 효과가 크며, 이에 따른 종양 성장의 억제에 효과적이라는 것을 나타낸다.

#### 4. 세포사멸지수 (Apototic Index)

Mefenamic acid와 aspirin 및 celecoxib를 각각 50μM의 농도로 72시간 동안 HN 22 세포주를 처리한 후 사멸된 세포의 측정은 ethidium bromide(EB,Sigma)로 염색하여 형광현미경하에서 관찰하여 시행되었다. 관찰 결과 아무런 약제를 처리하지 않은 대조군과 DMSO만을 투여한 군에서는 5%미만의 미약한 세포사멸만을 보였으나 mefenamic acid와 aspirin을 투여한 군에서는 10%에 가까운 세포사멸을 보였으며, celecoxib를 투여한 군에서는 가장 높은 15%에 가까운 세포사멸을 보였다(Fig. 3). 이는 자연적인 세포사멸 정도에 비하여 3~4배 이상의 수치를 보이는 것이다. 이러한 결과에서 선택적 COX-2 억제제가 종양세포의 세포사멸에 상당히 효과적으로 작용한다는 것을 의미한다.

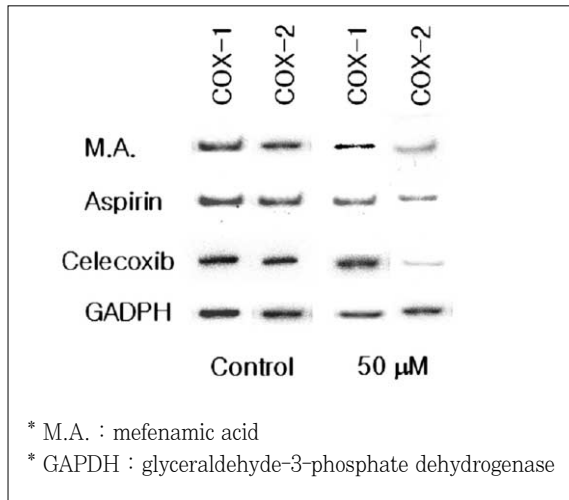
#### 5. COX 억제제가 구강편평세포암종 세포주의 COX mRNA 발현에 미치는 효과

Mefenamic acid, aspirin 및 celecoxib를 50μM을 투여한 후 종양세포에서 COX mRNA의 발현 양상을 관찰하기 위해 total RNA extraction과 RT-PCR 증폭을 이용해 측정하였다. Mefenamic acid로 처리했을 때 mRNA의 발현 양은 COX-1은 대조군에 비해 20% 정도 줄었고, COX-2는 50% 정도 감소되는 것을 확인하였다. Aspirin의 경우에는 mRNA의 발현양은 mefenamic acid와 유사한 수치를 보였다. 이에 반해 celecoxib를 처리한 경우에는 COX-1의

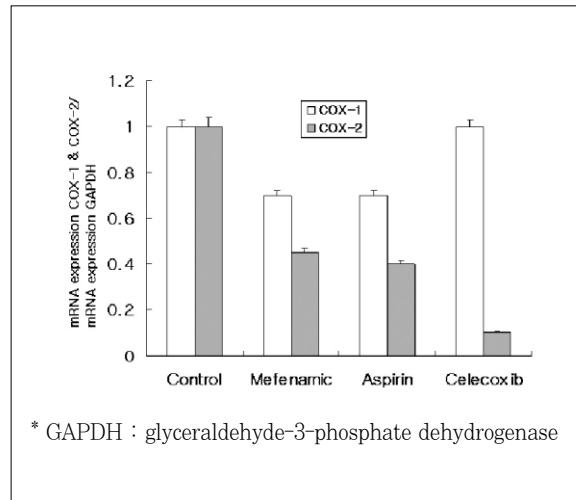
mRNA 발현양은 대조군과 차이가 없었으며, COX-2의 경우에는 약 90% 정도까지 큰 폭으로 감소하였다(Fig. 4, 5). 이상의 결과는 선택적 COX-2 억제제는 COX-1에는 전혀 영향을 미치지 않으며 COX-2에만 특이적으로 작용하여 COX-2에 의해 매개되는 종양세포의 성장을 차단하기 위해 이 약제를 사용할 수 있음을 보여준다.

#### 6. RT-PCR법에 의한 AKT1, PTEN, Bcl-2, Caspase 9, Caspase 3의 발현

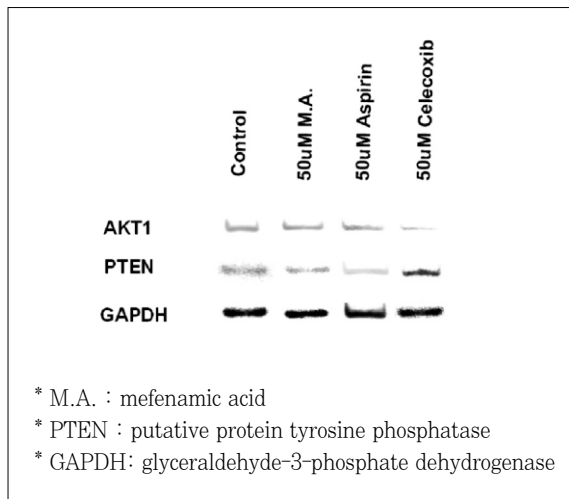
HN 22 세포주에 mefenamic acid, aspirin 및 celecoxib 50μM을 각각 투여한 후 관찰하였을 때 mefenamic acid 투여군과 aspirin 투여군에서는 PTEN mRNA와 AKT1 mRNA의 발현은 변화를 보이지 않거나 아주 미세한 변화만을 보인 반면, celecoxib를 투여한 군에서는 종양억제 유전자로 작용하는 PTEN mRNA 발현의 증가가 대조군에 비해 0.6에서 1로 약 1.5배 정도 높게 발현되었으며, AKT1 mRNA 발현은 대조군과 비교시 0.1에서 0.06으로 40%정도 감소되는 양상을 보였다(Fig. 6, 7). 이는 celecoxib 사용시 AKT pathway가 비활성이 됨으로써 종양세포 성장의 억제 효과가 나타나는 것으로 생각된다. 또한 bcl-2 mRNA 발현은 모든 실험군에서 변화가 전혀 인지되지 않았으며, caspase 9 및 caspase 3 mRNA 발현은 mefenamic acid 투여군과 aspirin 투여군에서는 극히 미미한 변화만을 보였으나, celecoxib 투여군에서는 급격하게 증가하였다(Fig. 8, 9). 이는 미토콘드리아를 통한 caspase-dependent pathway에도 celecoxib가 작용하여 세포사멸을 유도한다는 사실을 나타낸다.



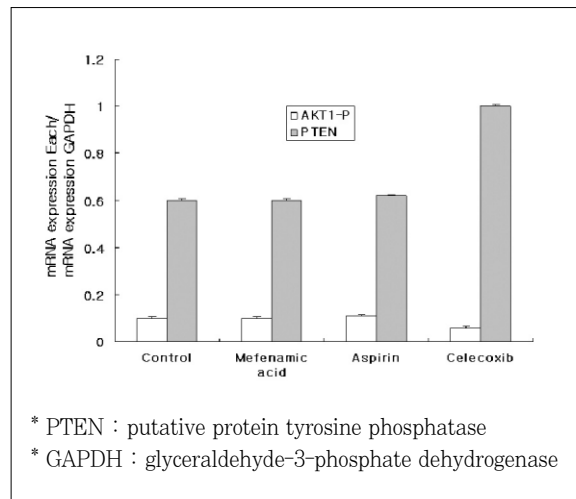
**Fig. 4.** COX-1 and COX-2 mRNA determination of RT-PCR in HN 22 cell line by mefenamic acid, aspirin and celecoxib.



**Fig. 5.** COX-1 and COX-2 mRNA determination of RT-PCR in HN 22 cell line by mefenamic acid, aspirin and celecoxib.



**Fig. 6.** The effect of mefenamic acid, aspirin and celecoxib on AKT1 and PTEN mRNA expression in HN 22 cell line by RT-PCR.

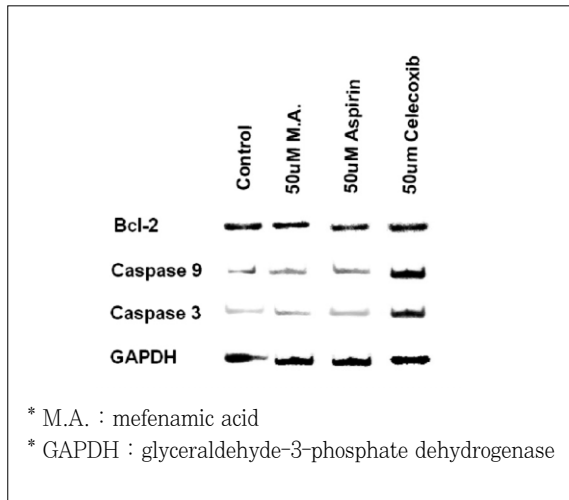


**Fig. 7.** The effect of mefenamic acid, aspirin and celecoxib on AKT1 and PTEN mRNA expression measurement in HN 22 cell line by densitometer.

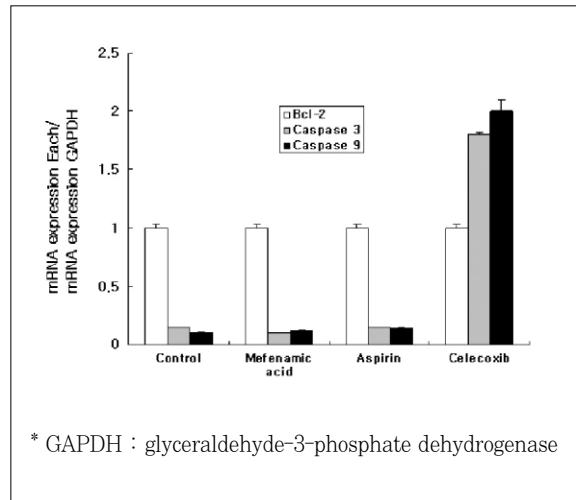
### 7. COX 억제제 투여 후 구강편평세포암종 세포주의 전자현미경 소견

종양세포의 성장이 억제되는 원인을 찾기 위해 HN 22 세포주에 mefenamic acid, aspirin 및 celecoxib를 각각 50 $\mu$ M을 투여한 후 투과전자현미경으로 관찰한 결과, mefenamic acid를 투여한 군에서는 핵막이 분산되고, 많은 세포질내의 공포(vacuole)가 산재한 것이 관찰되었으며(Fig. 10), aspirin을 투여한 군에서는 염색체가 핵 변연으로 이

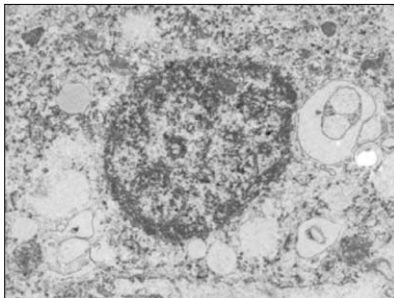
행(chromosome margination)되고 세포질내 공포(vacuole)가 형성되는 등 세포사멸의 초기 현상들이 관찰되었다(Fig. 11). Celecoxib를 투여한 군에서는 뚜렷한 염색체의 변연이동과 많은 세포질 내 공포 및 미토콘드리아 파괴 등 세포사멸이 진행중인 세포에서 특징적으로 관찰되는 소견들이 많이 관찰되고 있어(Fig. 12), 선택적 COX-2 억제제가 세포사멸의 증가를 통해 종양세포주의 성장을 억제시키는 또 다른 경로를 확인할 수 있었다.



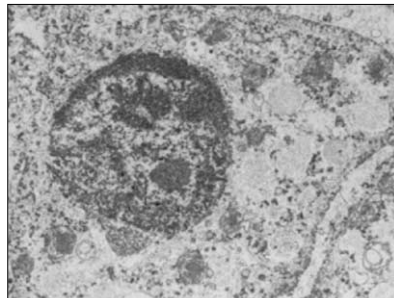
**Fig. 8.** The effect of mefenamic acid, aspirin and celecoxib on bcl-2, caspase 3 and 9 mRNA expression in HN 22 cell line by RT-PCR.



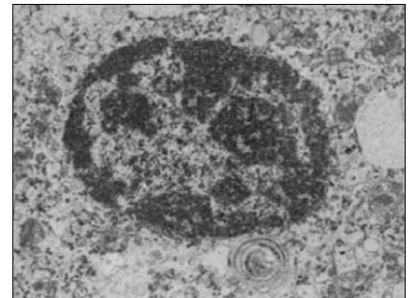
**Fig. 9.** The effect of mefenamic acid, aspirin and celecoxib on bcl-2, caspase 3 and 9 mRNA measurement in HN 22 cell line by densitometer.



**Fig. 10.** TEM view of 50µM mefenamic acid HN 22 cell line group (× 3000).



**Fig. 11.** TEM view of 50µM aspirin HN 22 cell line group (× 3000).



**Fig. 12.** TEM view of 50µM celecoxib HN 22 cell line group (× 3000).

#### IV. 총괄 및 고찰

세포사멸은 개체의 항상성을 유지하기 위하여 정상조직에서 뿐만 아니라, 병적인 상태에서도 일어날 수 있는 프로그램화된 세포의 능동적 사망을 말한다. 악성 종양에서는 anti-apoptotic survival pathway를 통하여 세포사멸을 제어하여 종양의 성장이 일어나게 된다. 세포사멸의 주 경로는 미토콘드리아에서 기시되는 내인성 세포사멸 경로 (intrinsic apoptosis pathway)와 death receptor pathway와 같은 외인성 세포사멸 경로(extrinsic apoptosis pathway)로 구분될 수 있으며, 미토콘드리아에서 기시된 내인성 세포사멸 경로는 caspase-dependent pathway와 AIF-dependent pathway로 나뉜다. 미토콘드리아를 통한 기전은 항암화학요법에 의해 유도될 뿐만 아니라 DNA 손상, oxidative stress, 기아상태(starvation)의 세포내에서 기시되는 death signal의 통합과 전파에 중요한 역할을 한

다<sup>16)</sup>. Caspase-dependent pathway는 미토콘드리아 막의 투과가 유도되어 방출된 cytochrome c와 Apaf1의 결합체에 caspase 9가 결합하여 caspase 9, 3의 활성화로 caspase 3이 기질단백질을 분해하여 세포사멸을 유도하게 된다. 미토콘드리아 막내 공간에 존재하는 AIF(Apoptosis inducing factor)는 cytochrome C의 방출을 증가시키고 phosphatidylserine의 세포 외부 노출을 증가시켜 핵 내 DNA 분절이 일어난다<sup>17,18)</sup>. 미토콘드리아와 관계없는 외인성 세포사멸 경로인 receptor-mediated caspase의 활성화는 death receptor(Fas, TNFR1, DR5)에 ligand(FasL, TNF- $\alpha$ , TRAIL)의 결합으로 발생하며 caspase 8의 활성화로 caspase 3이 활성화 되어 세포사멸을 일으킨다. Caspase 활성화의 두 가지 주요 경로는 세포막에서 기시하는 caspase 8 경로와 미토콘드리아에서 시작되는 caspase 9 경로가 있다. 세포막에서 TNF 또는 Fas 신호 전달에 의해 활성화된 caspase 8이 Bid를 절단하여 truncated Bid(t-



Bid)가 생성되면 미토콘드리아로 이동하여 cytochrome C 방출로 caspase 9 활성을 유도하여 두 경로는 연계된다<sup>19,20</sup>. 이외에도 소포체의 스트레스로부터 활성화되는 caspase-dependent pathway와 세포막으로부터 기인되는 PI3K/AKT pathway 등의 세포사멸 경로 등이 있다.

본 연구에서는 이러한 여러 세포사멸 경로들 중 세포생존에 관여하는 인자이며 또한 암유발 조절인자로서, 항암화학요법에 저항성을 나타내는 것으로 밝혀져 있는 AKT pathway를 주목하였다. 세포막으로부터 기인한 여러 자극에 의하여 PI3K가 활성화 되고 이에 따라 PI3K의 주 target인 AKT가 활성화 되어 세포사멸을 억제하게 되는데, PTEN이라는 종양억제 유전자의 positional cloning과 PTEN 단백질의 산물들은 모든 PI3K 생성물의 비활성화에 관여한다<sup>21</sup>.

진통, 해열 및 항염증효과를 지니는 약물군은 서로 화학적 유사성은 없으나 작용 기전 및 부작용이 aspirin과 비슷하므로 흔히 아스피린계 약물이라고 부른다. 그러나 각 약물의 작용강도에 따라 해열진통제 (antipyretic-analgesics)와 비스테로이드성 항염증약물(non-steroidal anti-inflammatory drug, NSAID)로 구분된다. Aspirin이나 NSAIDs의 장기 복용시 화학적 암 예방의 효과에 대한 연구들이 있었으며<sup>3,4</sup>, 이러한 종양 세포증식억제의 기전에서 COX에 관한 연구가 활발히 진행되어왔다. COX는 COX-1과 COX-2의 두 가지의 동질효소가 있다. COX-1 효소는 대부분의 정상조직에서 발현되며, 염증인자가 퍼지지 않도록 혈액을 응고시키고 피가 잘 통하지 않게 하고 혈관을 수축시키는 물질(thromboxane A<sub>2</sub>)을 만들어내는 효소다. 동시에 위 점막이 파괴되지 않도록 점막 보호 물질을 만드는 등 조직 보호 등의 일상적인 역할을 한다<sup>5</sup>. COX-2 효소는 염증을 유발하는 물질인 PGE<sub>2</sub>가 생성되게 하며, 혈전을 예방하고 혈관을 확장하는 물질인 prostacyclin(Prostaglandin I<sub>2</sub>)의 생성도 촉진하는 효소로서, 염증이나 암조직에서 증가된다. 암 조직에 있어서 COX-2 효소의 증가는 앞선 여러 연구들에서 증명되었으며<sup>10</sup>, 증가된 COX-2 효소를 효율적으로 억제하여 암의 성장억제 및 화학적 암 예방의 효과를 입증하기 위한 연구도 진행되었다<sup>17</sup>. 이러한 COX-2의 효율적 억제를 위한 선택적 COX-2 억제제의 사용은 다른 항암요법과 병행시 상승 효과를 나타내며<sup>22</sup>, 방사선 치료에 대한 감수성을 증가시키기도 한다<sup>23</sup>.

본 연구에서는 aspirin과 NSAIDs의 일종인 mefenamic acid와 같은 비선택적 COX 억제제와 선택적 COX-2 억제제인 celecoxib를 이용하여 실험한 결과, celecoxib 사용시 같은 농도에서 더욱 효율적인 COX-2 효소의 억제가 관찰되었다. 또한 COX-2 효소의 억제가 어떠한 기전을 통하여 종양세포의 세포사멸을 유도하여 종양의 성장을 억제하는가를 알아보기 위하여 구강편평세포암종 HN22 세포주에

각 제제를 투여한 후 관찰하였다. 20 $\mu$ M 미만의 저농도 투여시에는 PGE<sub>2</sub>의 생성억제 효과가 20~30%정도로 미약하기 때문에 50 $\mu$ M의 농도로 약제를 투여하였다<sup>24</sup>.

PI3K의 억제제인 wortmannin과 celecoxib 동시 투여시 HN 22 세포주는 47%가량의 가장 낮은 생존율을 보였다. 이는 PI3K 억제제인 wortmannin의 효과와 더불어 celecoxib의 투여에 의한 직접적인 AKT의 비활성화와 PTEN 유전자의 활성화를 통하여 유도된 PI3K 억제가 유발한 AKT의 비활성화에 의해 세포사멸이 더욱 증가된 것으로 생각되었다. 또한 약제 투여 후 PGE<sub>2</sub>의 합성에 미치는 효과나 COX mRNA 발현에 있어서도 celecoxib는 aspirin이나 mefenamic acid에 비해 현저하게 낮은 PGE<sub>2</sub> 합성과 COX-2 mRNA 발현을 보였다. 이러한 결과로 미루어보아 구강편평세포암종에서 AKT pathway의 비활성화는 COX-2 mRNA 발현억제 및 PGE<sub>2</sub>의 생성억제와 밀접한 관련이 있으며, 또한 세포사멸의 증가를 유도하였다고 할 수 있다. COX-2 mRNA 발현이 AKT pathway를 활성화시키기도 하지만, AKT pathway의 비활성화 또한 COX-2의 down-regulation을 유도하기도 한다<sup>25</sup>. St-Germain 등<sup>25</sup>은 자궁내막암에서 AKT pathway와 COX-2의 억제 및 PGE<sub>2</sub>의 합성과는 밀접한 관련이 있다고 하였으며, Hsu 등<sup>26</sup>은 전립선 암에서 celecoxib가 세포사멸을 유도함에 있어서 AKT 활성의 억제가 핵심적인 부분을 차지한다고 하였다. 본 연구의 실험 결과는 구강편평세포암종에서 COX-2 억제에 의한 AKT pathway의 비활성화와 이로 인한 세포사멸은 다른 암종에서와 마찬가지로의 결과를 보여준다.

선택적 COX-2 억제제에 의한 암의 성장 억제는 지금까지 논의된 세포사멸의 여러 경로들에 영향을 미침으로서 유도될 수 있으며, 또한 암세포의 분열과정에 영향을 미쳐 세포분열을 정지시킴으로서도 가능하다. 또한 종양 조직에서의 angiogenesis와 lymphangiogenesis를 억제하여 종양 성장을 억제한다는 보고도 있었다<sup>27,28</sup>. COX-2 억제제는 일반적으로 세포주기 중 sub-G(1) phase에서의 세포의 축적과 G(1) phase에서의 세포주기의 정지를 유발한다고 알려져 있으나<sup>29,30</sup>, 세포에 따라서는 G(2)/M phase에 영향을 미쳐 세포 성장을 지연 시킨다는 보고도 있다<sup>31,32</sup>. 이러한 효과는 세포 종류에 따라 다르게 나타날 수도 있다. Bock 등<sup>33</sup>은 두경부 편평세포암종세포에 celecoxib를 투여하여 관찰한 결과, G(1) phase에서 세포주기의 정지가 유발되며, 이는 S phase-specific clonogenic toxicity를 유발하여 celecoxib가 두경부 편평세포암종세포에 대한 항증식 작용을 한다고 하였다. 이와 같이 COX-2 억제제의 사용으로 인한 COX-2 발현 감소시 세포주기가 정지되었으나, 반대로 COX-2의 과발현시에도 세포주기가 정지된다는 연구보고가 있다<sup>34</sup>. 또한 Gilroy 등<sup>35</sup>은 사람의 섬유아세포에서 일시적인 COX-2의 발현은 세포주기에 아무런 영향을 미치지

못한다는 연구결과를 발표하였다. 선택적 COX-2 억제제가 세포주기의 정지를 유발하는 것에 대해서는 이견이 없으나, 어떠한 기전으로 세포주기에 영향을 미치는지에 대해서는 앞으로도 추가적인 많은 연구들이 필요할 것으로 보인다.

선택적 COX-2 억제제가 세포사멸을 유도하는 과정에 있어서 본 연구에서는 PI3K/AKT pathway에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위해 PTEN 및 AKT1 mRNA 발현과 더불어 caspase 3, 9 mRNA의 발현 또한 관찰하였다. 그 결과 caspase 3, 9 mRNA의 주목할만한 발현 증가가 나타났으며, 이는 선택적 COX-2 억제제가 미토콘드리아나 소포체 스트레스에서 기인한 caspase-dependent pathway에도 상당한 영향을 미쳤음을 나타낸다. Ding 등<sup>36)</sup>은 미토콘드리아에서 기인한 caspase-dependent pathway는 celecoxib에 의하여 미토콘드리아의 세포막이 분열되면서 caspase 9이 활성화 되고, 이에 따른 caspase 3, 8 또한 활성화 되어 세포사멸이 유도된다고 하였다. 근래에는 소포체 스트레스 기인한 세포사멸 경로에 관한 관심이 증가하면서 이에 관한 연구들도 많이 진행되고 있다.

이상에서 살펴 본 바와 같이 선택적 COX-2 억제제는 다양한 경로를 통하여 암세포의 성장 억제 및 세포사멸을 유도한다. 또한 다른 항암 요법과 병행 투여시 상승효과를 기대할 수 있으며, 방사선 치료에 대한 감수성 증가유발 효과가 있어 향후 화학적 항암 예방 및 치료 제제로서의 가능성은 상당히 높다고 할 수 있다. 그러나, coxib 계열의 선택적 COX-2 억제제는 COX-1 억제시 발생할 수 있는 위 점막과 혈소판에 미치는 부작용을 감소시킬 수 있다는 장점은 있으나, 혈전의 생성과 혈압 상승과 같은 다른 부작용이 발생할 가능성이 증가함에 따라<sup>37,38)</sup>, 근래에는 심혈관 질환자에게서는 임상적 적용시에는 상당한 주의를 요한다<sup>39)</sup>. 이러한 임상적 한계점을 극복하기 위하여 최근에는 non-coxib 계열의 대체제에 관한 연구도 진행되고 있다<sup>40)</sup>. 향후 보다 안전한 임상적 적용을 보장하기 위해서는 다양한 세포사멸의 경로들에 대해 더욱 효율적으로 작용할 수 있는 약제 연구와 더불어 그 작용 기전에 관한 심도 깊은 추가적 연구가 필요할 것으로 생각되며, 암 치료에 있어서 화학적 암 예방제 및 치료 보조제로서의 그 임상적 활용에 관한 연구도 계속 진행 되어야 할 것이다.

## V. 결 론

선택적 COX-2 억제제인 celecoxib 투여 시 구강편평세포암종 세포 성장에 미치는 영향과 그 기전을 확인하기 위해, HN 22 세포주에 mefenamic acid, aspirin 및 선택적 COX-2 억제제인 celecoxib를 각각 투여한 후 wortmannin을 이용한 세포생존력 측정, 종양세포주의 성장곡선, 세포사멸지수 측정, PGE<sub>2</sub>의 합성 측정, total RNA extrac-

tion과 RT-PCR 분석 및 투과전자현미경 하에서의 관찰을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 종양세포 생존율이 wortmannin과 celecoxib 동시 투여 시 약 47%로 가장 낮게 나타나 wortmannin이 종양세포 생존을 감소에 영향을 미쳤다.
2. 성장곡선에서 celecoxib 투여군에서 성장이 가장 느리게 보였다.
3. 모든 군에서 PGE<sub>2</sub> 합성은 감소하였으나 celecoxib 투여 시 가장 뚜렷하게 억제되었다.
4. 세포사멸지수는 celecoxib 투여군에서 가장 높았다.
5. Celecoxib 투여군에서는 COX-2 mRNA 발현억제가 뚜렷하였으나 mefenamic acid 및 aspirin 투여군은 COX-1, 2 mRNA 억제를 보였다.
6. 종양세포주에 mefenamic acid 및 aspirin 투여 시 AKT1과 PTEN mRNA 발현에는 차이가 없었다.
7. 종양세포주에 celecoxib 투여 시 AKT1은 감소하고 PTEN mRNA 발현은 뚜렷하게 증가하였다.
8. 모든 약제 투여군에서 bcl-2 mRNA 변화는 인지되지 않았다.
9. Celecoxib 투여 시 caspase 3과 9 mRNA 발현은 증가하였으나 mefenamic acid 및 aspirin 투여 시에는 변화가 거의 없었다.

위의 결과에서 구강편평세포암종 세포주에 celecoxib 투여 시 caspase 3, 9 및 PTEN mRNA 발현증가는 AKT1 mRNA 감소와 연관이 있었으며, wortmannin이 종양세포 생존을 감소에 영향을 미쳤다. celecoxib 투여 시 AKT1 경로 및 COX-2 억제를 통하여 암세포에서 세포사멸을 유도하였다고 생각되었다.

## 참고문헌

1. Forastiere A, Koch W, Trotti A et al : Head and neck cancer. N Engl J Med 345 : 1890, 2001.
2. Krammer PH, Behnmann I, Daniel P et al : Regulation of apoptosis in the immune system. Curr Biol 6 : 279, 1994.
3. Waddell WR, Ganser GF, Cerise EJ et al : Sulindac for polyposis of the colon. Am J Surg 157 : 175, 1989.
4. Smalley WE, DuBois RN : Colorectal cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Adv Pharmacol 39 : 1, 1997.
5. Williams CW, DuBois RN : Prostaglandin endoperoxide synthase : why two isoforms? Am J Physiol 270 : G393, 1996.
6. Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT et al : Selective inhibition of inducible cyclooxygenase-2 *in vivo* is anti-inflammatory and nonulcerogenic. Proc Natl Acad Sci USA 91(8) : 3228, 1994.
7. Simon LS : Actions and toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Curr Opin Rheum 8 : 169, 1996.
8. Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL et al : Suppression of intestinal polyposis in Apc<sup>4716</sup> knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2(COX-2). Cell 87 : 803, 1996.
9. Kawamori T, Rao CV, Seibert K et al : Chemopreventive activity of Celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. Cancer Res 58 : 409, 1998.

10. Chan G, Boyle JO, Yang EK et al : Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 59 : 991, 1999.
11. Brown JR, DuBois RN : COX-2 : A molecular target for colorectal cancer prevention. *J Clin Oncol* 23 : 2840, 2005.
12. Watanabe H, Saito H, Rychahou PG et al : Aging is associated with decreased pancreatic acinar cell regeneration and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activation. *Gastroenterology* 128(5) : 1391, 2005.
13. Cheng JQ, Jiang X, Fraser M et al : Role of X-linked inhibitor of apoptosis protein in chemoresistance in ovarian cancer : possible involvement of the phosphoinositide-3 kinase/Akt pathway. *Drug Resist Updat* 5(3-4) : 131-46, 2002.
14. Neri LM, Borgatti P, Tazzari PL et al : The phosphoinositide 3-kinase/Akt1 pathway involvement in drug and all-trans-retinoic acid resistance of leukemia cells. *Mol Cancer Res* 1(3) : 234, 2003.
15. Paez J, Sellers WR : The PI3K/PTEN/Akt pathway : A critical mediator of oncogenic signaling. *Cancer Treat Res* 115 : 145, 2003.
16. Kaufmann SH, Earnshaw WC : Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 256(1) : 42, 2000.
17. Susin SA, Lorenza HK, Zamzami N et al : Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397 : 441, 1999.
18. Crompton MB : Bid and the permeabilization of mitochondrial outer membrane in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 12(4) : 414, 2000
19. 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.
20. 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.
21. Vazquez F, Sellers WR : The PTEN tumor suppressor protein: an antagonist of phosphoinositide 3-kinase signalling. *Biochem Biophys Acta* 1470 : M21-M35, 2000.
22. Amir K, Agarwal HK : Role of COX-2 selective inhibitors for prevention and treatment of cancer. *Pharmazie* 60(8) : 563, 2005.
23. Park JS, Jun HJ, et al : Radiosensitivity enhancement by combined treatment of celecoxib and gefitinib on human lung cancer cells. *Clin Cancer Res* 12(16) : 4989, 2006.
24. Lev-Aris S, Kazanov D, Liberman E et al : Down-regulation of PGE<sub>2</sub> by physiologic levels of celecoxib is not sufficient to induce apoptosis or inhibit cell proliferation in human colon carcinoma cell lines. *Dig Dis Sci* 52(4) : 1128, 2007.
25. Germain ME, Gagnon V, Mathieu I et al : Akt regulates COX-2 mRNA and protein expression in mutated-PTEN human endometrial cancer cells. *Int J Oncol* 24(5) : 1311, 2004.
26. Hsu AI, Ching TT, Wang DS et al : The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2. *J Biol Chem* 275(15) : 11397, 2000.
27. Sawaoka H, Tsuji S, Tsujii M et al : Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth *in vivo*. *Lab Invest* 79(12) : 1469, 1999.
28. Barnes NL, Warnberg F, Farnie G et al : Cyclooxygenase-2 inhibition : effects on tumour growth, cell cycling and lymphangiogenesis in a xenograft model of breast cancer. *Br J Cancer* 96(4) : 575, 2007.
29. Toyoshima T, Kamijo R, Ito D et al : Inhibitor of cyclooxygenase-2 induces cell-cycle arrest in the epithelial cancer cell line via up-regulation of cyclin dependent kinase inhibitor p21. *Br. J Cancer* 86(7) : 1150, 2002.
30. Baek JY, Hur W, Wang JS et al : Selective COX-2 inhibitor, NS-398, suppresses cellular proliferation in human hepatocellular carcinoma cell lines via cell cycle arrest. *World J Gastroenterol* 13(8) : 1175, 2007.
31. Dvory SH, Cohen NE, Kazanov D et al : Celecoxib leads to G2/M arrest by induction of p21 and down-regulation of cyclin B1 expression in a p53-independent manner. *Eur J Cancer* 42(3) : 422, 2006.
32. Park C, Kim GY, Kim GD et al : Induction of G2/M arrest and inhibition of cyclooxygenase-2 activity by curcumin in human bladder cancer T24 cells. *Oncol Rep* 15(5) : 1225, 2006.
33. Bock JM, Menon SG, Sinclair LL et al : Celecoxib toxicity is cell cycle phase specific. *Cancer Res* 67(8) : 3801, 2007.
34. Trifan OC, Smith Rm, Thompson BD et al : Overexpression of cyclooxygenase-2 induces cell cycle arrest. Evidence for a prostaglandin-independent mechanism. *J Biol Chem* 274(48) : 34141, 1999.
35. Gilroy DW, Saunders MA, Wu KK : COX-2 expression and cell cycle progression in human fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 281(1) : C188, 2001.
36. Ding H, Han C, Zhu J et al : Celecoxib derivatives induce apoptosis via the disruption of mitochondrial membrane potential and activation of caspase 9. *Int J Cancer* 113(5) : 803, 2005.
37. Mattia C, Coluzzi F : COX-2 inhibitors : pharmacological data and adverse effects. *Minerva Anestesiol* 71(7-8) : 461, 2005.
38. Sooriakumaran P : COX-2 inhibitors and the heart: are all coxibs the same? *Postgrad Med J* 82(966) : 242, 2006.
39. Chen LC, Ashcroft DM : Risk of myocardial infarction associated with selective COX-2 inhibitors : Meta-analysis of randomised controlled trials. *Pharmacoepidermiol Drug Saf* Apr, 2007.
40. Pyrko P, kardosh A, Liu YT et al : Calcium-activated endoplasmic reticulum stress as a major component of tumor cell death induced by 2,5-dimethyl-celecoxib, a non-coxib analogue of celecoxib. *Mol Cancer Ther* 6(4) : 1262, 2007.

#### 저자 연락처

우편번호 330-716  
충남 천안시 안서동 29  
단국대학교 치과대학 부속병원 구강외과  
이재훈

원고 접수일 2007년 10월 15일  
게재 확정일 2008년 1월 8일

#### Reprint Requests

**Jae-Hoon Lee**  
Dept. of OMFS, College of Dentistry, Dankook University,  
29 Anseodong, Choenan, Chungnam, 330-716, Korea  
Tel: 82-41-550-1991  
E-mail: lee201@dku.edu

Paper received 15 October 2007  
Paper accepted 8 January 2008