

A Neuromedin B Receptor Blockade Inhibits the Growth of Human Oral Cancer Cells

Hyun-Joo Park^{1,2}, Jae-Hoon Jeon¹, Mi-Kyoung Kim¹, Mi Heon Ryu³, Yong-Deok Kim⁴, Soo-Kyung Bae², and Moon-Kyoung Bae^{1*}

¹Department of Oral Physiology, ²Department of Dental Pharmacology, School of Dentistry, ³Department of Oral Pathology, ⁴Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Pusan National University, Yangsan 626-870, South Korea

(received January 02, 2014; revised January 26, 2014; accepted January 26, 2014)

Neuromedin B (NMB) acts as a growth factor or a morphogen and plays a role in cancer progression. Indeed, the NMB receptor (NMB-R) is overexpressed in different types of tumors. In our current study, we investigated the involvement of NMB-R in the proliferation of oral cancer cells. Human oral squamous cell carcinoma (SCC) and human oral cancer cells, SCC-25 cells were found to be NMB-R-positive. The NMB-R antagonist PD168368 inhibited the proliferation of SCC-25 cells and reduced their colony formation capacity. We also found that PD168368 induced the cell cycle arrest and apoptosis of SCC-25 cells in a dose-/time-dependent manner. Overall, this antitumor activity of PD168368 in human oral cancer cells suggests that NMB-R is a potential target for the future prevention and treatment of human cancers.

Key words: human oral cancer cells, neuromedin B receptor, PD168368, apoptosis, cell cycle arrest

*Correspondence to: Moon-Kyoung Bae, Department of Oral Physiology, School of Dentistry, Pusan National University, Yangsan 626-870, South Korea;
Tel: 82-51-510-8239, Fax: 82-51-510-8238,
E-mail: mkbbae@pusan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서 론

Neuromedin B (NMB)는 gastrin-releasing peptide (GRP)와 함께 포유동물의 bombesin-like peptide계로 잘 알려져 있다[1]. Bombesin-like peptide는 외분비, 평활근 수축, 혈관 및 혈당 조절, 체온조절과 같은 생리적 기능 조절에 관여하는 것으로 알려져 왔다[2]. 최근에는 bombesin-like peptide와 그의 수용체가 폐암, 유방암, 위암, 대장암, 전립선암과 같은 여러 가지 고형암에서 과다발현되는 것으로 알려지면서 암에서의 bombesin-like peptide와 그 수용체의 역할에 대해 관심을 가지기 시작하였다[3,4]. 다양한 연구들에서 GRP와 NMB는 다양한 암세포의 증식 및 전이를 촉진시키고, 고형암의 성장에 필수적인 혈관신생을 증가시키는 것으로 보고되고 있다[5,6]. 이와 같은 사실에 기반을 두고 GRP 수용체의 저해를 통하여 인간 악성종양의 치료제로써의 가능성이 제시되고 있다[7]. 여러 가지 연구에서 GRP 수용체의 길항제, 단일클론항체, 안티센스 올리고핵산염을 이용하여 인간 종양 및 실험동물의 암에 대한 억제효능이 증명되고 있다[8,9]. 반면에 NMB 수용체 길항제가 개발되었지만 항암 효능에 대한 연구는 거의 알려져 있지 않았으나 최근 본 연구실에서 NMB 수용체 길항제가 유방암 성장을 억제한다는 사실을 연구하여 보고한 바 있다[10].

두경부 편평세포암종(head and neck squamous cell carcinoma; HNSCC)는 전 세계적으로 6번째로 호발되는 암이며 이중 10%가 구강 편평세포암종(oral squamous cell carcinoma; OSCC)에 해당된다고 알려져 있다[11]. 최

근 OSCC에서 세포생물학적, 분자생물학적 연구에 대한 증가로 OSCC에서의 생물학적 마커의 동정 및 분자생물학적 표적 발굴과 같은 신개념의 암 예방 및 치료제 개발에 많은 관심이 모아지고 있다[12-14].

HNSCC에서 GRP 수용체의 발현양상이 보고되고 있지만 구강암을 포함한 두경부암에서 NMB 수용체의 발현 및 기능에 대한 연구는 전무하다. 본 연구에서는 NMB 길항제가 구강 암세포주의 증식에 미치는 영향을 조사하고 그 기전을 밝힘으로써 NMB 수용체 길항제의 구강암에 대한 항암효능에 대한 가능성을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

PD168368과 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 시약은 각각 Santa Cruz biotechnology (USA)와 Sigma (USA) 제품을 사용하였다. Propidium iodide (PI) 및 RNase A 역시 Sigma사 제품을 사용하였다. TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)은 Promega (USA) 제품을 사용하였다. Cyclin D1, CDK4, p21, p27, cleaved-caspase-3, cleaved-PARP, Bcl-2, XIAP와 같은 항체들은 모두 Santa Cruz biotechnology 제품을 사용하였으며, α -tubulin 항체는 Biogenex (USA)에서 구매하였다. HRP-conjugated anti-rabbit IgG와 anti-mouse IgG, 그리고 Biotin-conjugated anti-rabbit IgG 항체는 Jackson Laboratory (USA)에서 구매하였다.

세포배양

ATCC (American Type Culture Collection, USA)에서 구매한 인간 구강암 세포주 SCC-25는 DMEM/F12 1:1 배지, YD-9 세포는 DMEM/F12 3:1 배지, YD-10B 세포는 RPMI1640를 기본 배지로 사용하였다. 3가지 세포 모두 1% penicillin streptomycin 항생제와 10% fetal bovine serum로 보강하여 세포 배양을 하였고, 모두 GibcoBRL (USA) 제품을 이용하였다. 세포들은 37°C, 5% 이산화탄소 조건에서 배양하며, 3-5일마다 계대 배양하며 유지하였다.

MTT assay

SCC-25 세포를 24 well plates에 각각 5×10^4 cells/well씩 분주하고 500 μ l의 배양액에 PD168368을 각기 다른 농도와 시간으로 배양하였다. 배양액 제거 후 5 mg/ml의 Tetrazolium Salt MTT 용액을 각 well마다 50 μ l 첨가하고 37°C에서 4시간 배양시킨 후 ELISA 기계(Dynex Technologies, USA)를 이용하여 540 nm에서 측정하였다.

Colony formation assay

0.9% soft agar와 10% FBS, 1% PS가 포함된 DMEM/F12 1:1 배양액 500 μ l를 잘 섞어서 4°C에서 30분 정도 굳힌 뒤 base layer가 만들어지면 37°C 배양기에 넣는다. Cell layer에 사용할 0.4% agar와 8×10^3 SCC-25 세포가 포함된 배양액을 잘 섞어서 base layer 위에 뿌려주고 4°C에서 10분 정도 굳힌다. PD168368이 포함되어 있는 배지와 포함되어 있지 않은 배지 250 μ l를 각각의 agar plate에 넣어주고 colony가 형성되는 것을 14일 동안 관찰한다.

유세포 분석(Flow cytometry analysis)

SCC-25 세포를 5×10^5 cells/well로 6-well plate에 키운 뒤, PD168368을 농도 별로 처리하여 48시간에서 72시간 까지 배양한 후 세포를 수거하였다. 수거한 세포는 차가운 PBS로 두 번 세척하고, 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 세포가 서로 엉겨 붙지 않도록 주의하며, 차가운 75 % 에탄올을 첨가하여 4°C에서 1시간 고정시켰다. 고정된 세포를 원심분리하여 에탄올을 제거하고 다시 PBS로 씻어준 후, 2 mg/ml RNase A를 첨가한 PBS 100 μ l를 넣고 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. PI (propidium iodide)를 PBS에 50 μ g/ml로 희석하여 첨가한 후 상온에서 30분간 반응시킨 후 각 처리군을 유세포측정분석기(BD Bioscience, USA)로 측정하였다.

TUNEL assay

세포 핵 내의 DNA 단편화(nuclear DNA fragmentation)를 측정함으로써 세포의 세포사멸 여부를 측정하기 위하여 TUNEL Assay를 실시하였다. 세포를 chamber slide에 배양한 후, 대조군과 각각의 조건에 맞도록 약제 처리하였다. 24시간이 지난 후, 세포를 4% methanol-free formaldehyde solution에 4°C에서 25분간 고정시키고, PBS에 5분간 담가 두었다. 고정이 끝난 후 100 μ l의 equilibration 용액에 담가 실온에서 5분간 반응시켰다. 세포 내부의 DNA fragment를 라벨하기 위해서, fluorescein-12-dUTP가 함유되어있는 50 μ l의 terminal deoxy-nucleotidyltransferase를 첨가하고 플라스틱 coverslip을 덮어 37°C에서 습기가 유지되는 암 환경에서 1시간 동안 반응시켰다. Coverslip을 제거하고 SSC용액에 15분간 담가 반응을 종결시킨 후, PBS로 3회 세척하여 반응하고 남은 fluorescein 12-UTP를 제거하였다. 핵을 염색하기 위해 1 μ g/ml 농도의 PI에 15분간 염색하고, 형광현미경(Nikon, Japan)으로 사진을 촬영하였다.

Western immunoblot analysis

실험군과 대조군의 세포들은 lysis buffer (40 mM Tris-Cl,

10 mM EDTA, 120 mM NaCl, 0.1% NP-40, protease inhibitor cocktail (Sigma)를 이용하여 용해시킨 뒤, 10~15% gel로 SDS-PAGE를 실시하였다. 분리된 단백질을 1시간 동안 전기적 방법으로 nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech, USA)으로 옮긴 후, membrane을 blocking buffer (1×TBS, 0.1% Tween-20, 5% skin milk)에 넣고 상온에서 1시간 반응시킨 후 각각의 1차 항체를 처리하여 4°C에서 16~24시간 반응시킨다. 1차 항체 반응이 끝나면 1X TBS-T buffer로 상온에서 10분 동안 3회 세척한 후 HRP 결합을 가진 2차 항체를 사용해 다시 2시간 동안 상온에서 반응시킨다. 2차 항체 반응이 끝나면 1X TBS-T buffer로 상온에서 10분 동안 3회 세척한 후 ECL (Amersham Pharmacia Biotech) 시스템을 이용하여 발색시키고 필름에 감광시켰다.

면역조직화학염색

정상 대조군으로는 부산대학교 치과병원에 내원한 성인 환자 중 흡연의 기왕력이 없으며 다른 구강 점막 병소가 없는 정상 성인의 구강점막을 채취하였다. 그리고 부산대학교 치과병원에 내원한 환자 중 조직 생검 또는 수술에 의하여 구강 편평세포암종으로 진단받은 환자를 대상으로 하여 조직 채취를 하였다. 충분히 건조된 동결조직절편은 acetone (-20°C)으로 20분간 고정된 뒤 다시 실온에서 건조시켰으며, 파라핀 조직은 탈파라핀 과정을 통해 충분히 파라핀을 제거한 뒤 증류수에 세척하였다. 준비된 조직들은 PBS로 수세한 후 0.3% H₂O₂가 포함된 PBS 용액에서 20분간 반응시킨다. PBS 세척 후 5% normal horse serum으로 실온에서 1시간 적용시킨 뒤, 일차 항체인 polyclonal rabbit anti-NMB-R antibody를 1:200으로 희석하여 4°C에서 16-18시간 동안 반응시켰다. 다음날 PBS로 세척 후, 이차 항체인 biotin conjugated goat anti-rabbit antibody를 1:200으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. Avidin-biotin complex (Vectastain Elite Kit, USA) 용액을 실온에서 1시간 반응시킨 후 PBS로 세척하고 0.05% 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma)와 0.003% H₂O₂ 혼합용액을 이용하여 발색 정도를 확인하였다. 반응이 끝난 조직절편은 Mayer's hematoxylin (DAKO, Germany)으로 대조염색 후 탈수 과정과 투명과정을 거쳐 영구표본을 제작하였으며, 광학현미경 (Nikon, Japan)으로 조직을 관찰하였고 디지털 카메라 (Olympus, Japan)로 촬영 하였다.

통계처리

본 실험에 대한 실험결과는 세 번 실험하여 얻어진 평균치 및 표준편차를 나타내었고 그룹간의 통계적 차이는 Student's t-test를 이용하여 분석하였다. 대조군과 비교하여 P값이 0.01 미만일 때를 통계적으로 유의성이

있다고 판정하였다.

결 과

구강암 및 구강암세포주에서 NMB 수용체의 발현

다양한 종류의 암세포에서 과발현되고 있는 NMB 수용체의 발현을 확인하고자, 구강암 환자로부터 채취한 종양조직에서 면역조직화학 염색을 시행하였다. 그 결과, NMB 수용체가 환자의 구강암 조직에서 발현되고 있음을 DAB 발색과 형광염색을 통해 확인할 수 있었다

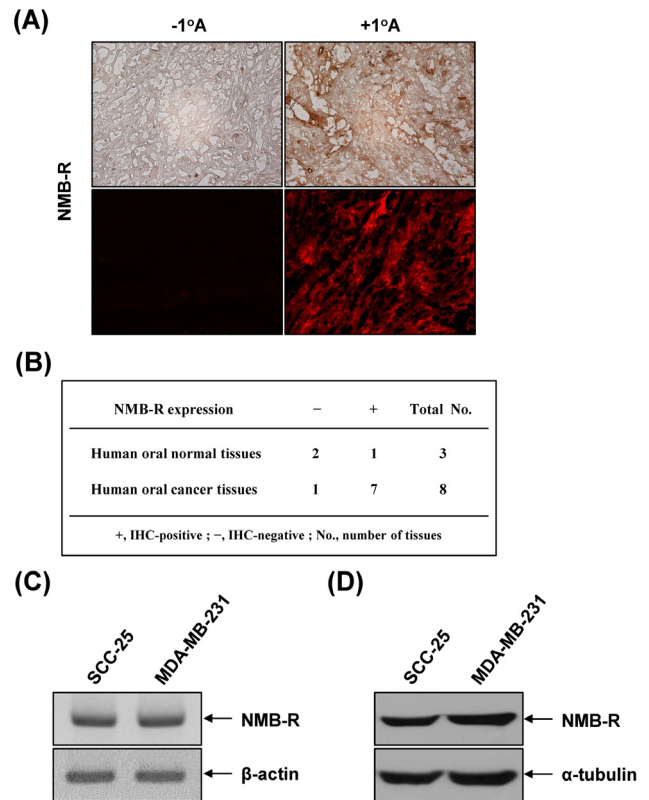


Fig. 1. Expression of NMB-R in human squamous cell carcinoma tissue and SCC-25 human oral cancer cells.

(A) Human normal tissues and oral cancer tissues were obtained from surgical specimens of patients. Slides were immunostained with NMB-R antibodies. Sections were stained without primary anti-NMB-R antibodies as negative controls. Samples were counterstained with hematoxylin to reveal morphology. -1°A: unlabeled primary antibody (negative control), +1°A: labeled primary antibody. (B) The table represents the incidence of NMB-R expressions in normal and oral cancer tissues. (C) The total RNA was isolated and analyzed by RT-PCR using the primers specific to human NMB-R. β -actin was used as the internal control. (D) Protein expression level of NMB-R was confirmed by Western blot using anti-NMB-R antibody. α -tubulin was served as the loading control.

(Fig. 1A). 뿐만 아니라, 정상 구강조직에서 NMB 수용체의 발현이 33.3% 정도임에 비해 구강암 조직에서 NMB 수용체의 발현이 87.5%에 달하는 것은 NMB 수용체가 암조직에서 그 발현 빈도가 높음을 시사해준다(Fig. 1B). 다음으로 인간 구강암세포주인 SCC-25 세포에서 NMB 수용체의 mRNA와 단백질의 발현 정도를 확인하기 위해 RT-PCR과 Western blot을 수행하였다. 그 결과, 여러 가지 보고에서 NMB 수용체가 과발현 된다고 알려진 유방암세포주 MDA-MB-231 세포 못지않게 SCC-25 세포 역시 많은 양의 NMB 수용체의 mRNA와 단백질이 발현되고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 1C & 1D).

NMB 길항제가 세포의 증식 및 집락 형성에 미치는 영향

NMB 길항제가 인간 구강암세포주인 SCC-25 세포의 증식에 어떠한 영향을 미치는 지를 조사하기 위해 농도별(20 μM, 50 μM, 100 μM), 시간별(1일, 2일, 3일)로 NMB 길항제인 PD168363를 처리하여 MTT assay를 실시하였다. Fig. 2A

에서 보는 바와 같이 PD168363의 농도가 증가함에 따라 SCC-25 세포의 증식이 현저히 저해되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 높은 농도의 PD168363 (50 μM, 100 μM)를 처리하였을 경우, 시간이 지남에 따라 큰 폭으로 세포의 증식이 억제되는 것도 확인하였다. 이러한 결과는 또 다른 구강암 세포주인 YD-9과 YD-10B 세포에서도 유사하게 나타났으며, 이는 SCC-25세포를 포함한 다양한 구강암 세포에서 PD168368의 증식억제 효과를 입증해준다(data not shown). 다음으로 암세포의 특징 중 하나인 anchorage-independent growth 능력을 확인하기 위해 colony formation assay를 실시하여 SCC-25 세포의 집락형성에 NMB 길항제가 어떤 영향을 미치는 지 알아보았다. NMB 길항제의 용매로 쓰인 DMSO를 처리한 대조군에서는 부드러운 한천 위에서 SCC-25 세포가 집락을 잘 형성하고 있음을 관찰하였다(Fig. 2B). 하지만 20 μM PD168363와 50 μM PD168363를 처리하였을 경우, SCC-25 세포의 집락형성이 50%와 35%까지 각각 감소되고 있음이 관찰되었다(Fig. 2C).

NMB 길항제가 세포주기 정지(cell cycle arrest)에 미치는 영향

PD168363를 처리한 SCC-25 세포의 세포주기(cell cycle)의 변화를 살펴보기 위해 유세포 분석을 실시하였다. 50 μM의 PD168368을 48시간과 72시간 처리한 뒤, PI 염색을 통해 DNA content를 관찰한 결과, 48시간 처리된 PD168368에 의해 SCC-25 세포의 G1 arrest가 유도되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3A). 이러한 결과를 토대로, G1 arrest가 실질적으로 어떠한 세포주기 관련 유전자들의 조절에 의해 일어나는지 확인하고자 western blot을 시행하였다. 그 결과, G1 단계의 세포주기를 조절하는 cyclin D1과 CDK4 (cyclin-dependent kinase 4)의 발현이 현저히 저해되는 것을 확인할 수 있었으며, CDK4 inhibitor인 p21과 p27의 발현이 높게 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3B & 3C). 이러한 결과로 보아, PD168368은 cyclin D1/CDK4 유전자들의 발현 조절을 통해 G1 arrest를 유도함으로써 세포증식을 억제하는 것으로 사료된다.

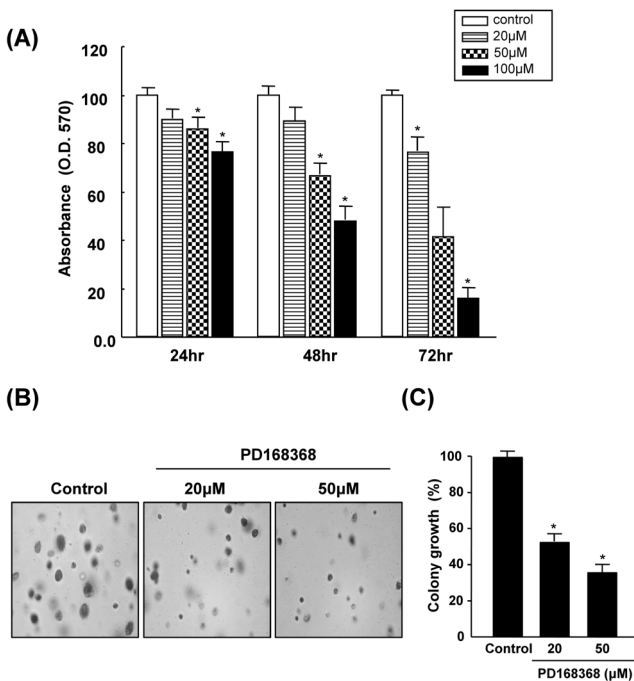


Fig. 2. PD168368 reduces the growth of SCC-25 human oral cancer cells. (A) SCC-25 cells were treated with varying concentrations of PD168368, and the cell viability was determined by MTT assay on days 1, 2, and 3. Data were representative of three independent experiments. * P<0.05 compared to control. (B) SCC-25 cells were treated with PD168368 (20 and 50 μM) and were allowed to form colonies in fresh medium for 14 days. The photomicrographic difference and influence of colonies in colony formation are shown. (C) The graph shown are representative of at least three independent experiments in colony forming assay. * P<0.05 compared to control.

NMB 길항제가 세포 자멸사에 미치는 영향

세포 자멸사가 일어나면 세포주기의 sub-G1 기에 해당하는 세포들의 빈도가 높아진다고 알려져 있다[15]. 그림 3A에서 보는 바와 같이 유세포 분석을 이용한 세포주기 분석 결과를 살펴보면, PD168368은 세포주기 정지를 유도했을 뿐만 아니라, PD168363가 72시간 동안 처리된 구강 암세포주들의 경우는 sub-G1기의 세포빈도가 대조군에 비해 역시 현저히 증가되어 있었다. 따라서 세포사멸

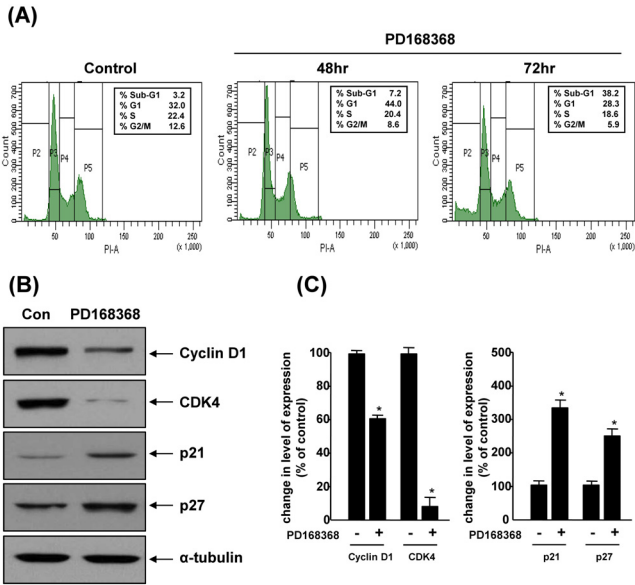


Fig. 3. PD168368 induces cell cycle arrest in SCC-25 human oral cancer cells.

(A) SCC-25 cells were treated with PD168368 (50 μ M) for indicated times. For FACS analysis, nuclei were stained with propidium iodide and the DNA content of the cell nuclei was measured. The percentage of cells in the G1, S, and G2/M phases of the cell cycle are shown. (B) After treatment with PD168368 (50 μ M), cell lysates were prepared and western blot analysis was performed against cyclin D1, CDK4, p21 and p27 antibodies. α -tubulin was served as the loading control. (C) The panel showed quantitative evaluation of the percent change in levels of cyclin D1, CDK4, p21 and p27. The Western blots were quantified using Image-J software. Data were representative of three independent experiments. * $P < 0.05$ compared to control.

이 일어난 세포들만 선택적으로 염색해서 확인할 수 있는 TUNEL assay 방법을 도입하여 PD168368에 의한 구강암 세포 SCC-25의 세포 자멸사를 확인해 보았다. 그 결과, 50 μ M의 PD168368을 72시간 처리한 SCC-25세포에서 많은 수의 세포 자멸사가 일어나고 있음을 형광현미경을 통해 확인할 수 있었으며, DAPI 핵 염색 대비 TUNEL positive 세포들을 개수하여 정량적인 수치를 확보할 수 있었다(Fig. 4A). 뿐만 아니라 세포 자멸사 기전을 조절하는 유전자들의 단백질 발현을 확인하고자 western blot을 시행하였다. 그 결과, PD168368가 처리된 SCC-25 세포에서는 대표적인 세포 자멸사 유전자인 caspase-3의 활성화가 늘어났으며 그 기질에 해당하는 PARP가 분절되고 있음을 확인하였다. 그리고 anti-apoptotic gene으로 알려진 Bcl-2와 XIAP 단백질들의 발현이 감소되는 것이 관찰되었다(Fig. 4B & 4C). 이러한 결과는 NMB 수용체길항제인 PD168368이 직접적으로 구강암세포 SCC-25의 세포 자멸사를 유도할 수 있음을 보여준다.

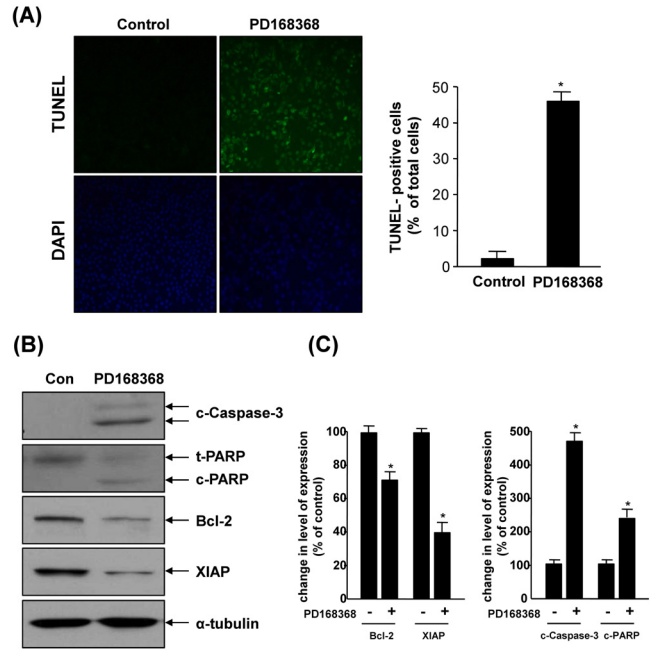


Fig. 4. PD168368 induces apoptosis in SCC-25 human oral cancer cells.

(A) SCC-25 cells were treated with PD168368 (50 μ M) for 72 hr, cellular apoptosis was examined by the TUNEL assay. The stained cells (green) were counted, and the percentage of positive cells was calculated. DAPI (blue) stains nuclear DNA. (B) After treatment with PD168368 (50 μ M), cell lysates were prepared and western blot analysis was performed against caspase-3, PARP, Bcl-2, and XIAP antibodies. α -tubulin was used as a loading control. (C) The panel showed quantitative evaluation of the percent change in levels of caspase-3, PARP, Bcl-2, and XIAP. The Western blots were quantified using Image-J software. Data were representative of three independent experiments. * $P < 0.05$ compared to control.

고찰

펩티드성 호르몬이 자가분비 작용 및 인접분비 작용을 통해 암세포의 증식, 침습, 암혈관신생을 촉진하여 암의 성장 및 진행에 영향을 미친다는 사실이 여러 보고에서 증명이 되어왔다[16]. 또한 이들 펩티드성 호르몬은 그들의 수용체에 결합하여 그 작용을 매개하므로 수용체에 대한 특이적인 길항제 및 차단제를 이용하여 펩티드성 호르몬의 작용을 차단하는 방법이 암치료에 대한 새로운 전략으로 제시되고 있다[17].

Bombesin은 아미드화 tetradecapeptide로써 최초로 양서류의 피부에서 분리되었으며, 이후 포유동물에서도 유사 계열의 펩티드인 GRP와 NMB가 동정되었다[18]. 향후 여러 보고에서 bombesin-like peptide와 그 수용체들이 여러 가지 암조직 및 암세포에서 발현이 증가되어 있음이

증명되었다[3,4]. 특히 본 연구실에서는 NMB 수용체가 유방암조직 및 세포에서 과다발현이 되어 있음을 보고한 바 있다[10,19-21]. 최근 연구에서는 두경부 암조직에서 GRP 수용체의 발현이 높아져 있었으며, 협부 점막에서의 GRP 수용체의 발현이 두경부암의 높아진 위험도와 상관관계가 있음이 보고되었다[22]. 그리고 정상 점막상피세포에 비해 두경부 암세포에서도 GRP 수용체의 높은 발현이 확인되었다[23]. 본 연구에서는 최초로 구강 암조직 및 세포에서 NMB 수용체의 발현을 확인하였다. 향후 여러 병기의 구강암 조직에서 수용체 발현 및 분포양상을 면밀하게 분석하는 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Bombesin-like peptide들은 암세포에 존재하는 G 단백질 결합 수용체의 일종인 각각의 특이 수용체에 결합하여 세포 내 신호전달 경로를 변화시킴으로써 암세포의 증식 및 전이를 촉진시키게 된다[24,25]. 본 연구실에서는 NMB가 혈관내피세포에 존재하는 수용체에 결합하여 extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2), Akt, endothelial nitric oxide synthase (eNOS)를 활성화시킴으로써 혈관내피세포의 이동, 침윤, 관형성능을 높여 혈관 신생을 촉진시킨다는 사실을 보고한 바 있다[5]. 또한 고형암 내 혈관신생을 유도하는 대표적 신호인 저산소 상태가 NMB 수용체의 발현을 증가시키고 있음을 관찰하였다[26]. NMB는 폐암세포에서 epidermal growth factor receptor (EGFR)의 인산화시킴으로써 활성화시켜 폐암세포의 증식을 유도한다고 알려져 있다[27]. EGFR은 두경부암의 종양 유전자로도 잘 알려져 있으므로 구강암세포에서 NMB에 의한 EGFR 활성화유도 및 이에 따른 종양형성에 관한 연구는 더 진행해야 할 과제로 생각된다.

다양한 연구에서 GRP 수용체에 대한 길항제 및 안티센스 올리고핵산염, GRP의 단일클론항체 및 drug-linked /radiolabeled GRP가 항암 효능을 보인다는 사실이 증명되었으며 나아가서는 임상적으로도 적용되어 그 유효성이 입증되고 있다[28]. 두경부암에 적용된 보고에서 GRP가 두경부암 세포의 증식이 농도의존적으로 촉진시켰으며 GRP 단클론 항체를 이용하여 중화시켰을 경우 두경부암 세포의 증식이 저해됨이 *in vitro*와 *in vivo* 모델에서 증명된 바 있다[23]. 이와 같이 GRP 또는 GRP 수용체를 표적으로 한 항암연구가 활발히 진행되고 있는 것에 비해 아직까지 NMB 및 그 수용체를 표적으로 한 연구는 미미한 실정이다. 최근 본 연구실에서 NMB 수용체의 길항제가 NMB가 유도하는 혈관신생을 억제하였으며, 고형암에서의 미세혈관신생을 감소시킴으로써 암의 성장을 저해시킨다는 사실을 밝혀냈다. 또한 NMB

수용체의 길항제가 유방암세포주의 증식을 억제하고 *in vivo* 모델에서 유방암의 성장을 저해한다는 사실을 알아내었다[10]. 그리고 NMB 수용체를 저해시키면 C6 신경교종세포 및 폐암세포의 증식이 억제된다고 보고하고 있다[27,29]. 그리고 본 논문에서는 NMB 수용체의 길항제가 구강암세포주의 증식에 미치는 영향에 대한 연구가 진행되었다. 따라서 NMB의 수용체를 발현하는 여러 가지 다양한 암세포에서 NMB 수용체가 진단 및 치료에 있어 매력적인 표적 유전자로 활용될 가능성이 높을 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음

References

1. Gonzalez N, Moody TW, Igarashi H, Ito T, Jensen RT. Bombesin-related peptides and their receptors: recent advances in their role in physiology and disease states. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2008;15:58-64.
2. Ohki-Hamazaki H, Iwabuchi M, Maekawa F. Development and function of bombesin-like peptides and their receptors. *Int J Dev Biol.* 2005;49:293-300.
3. Patel O, Shulkes A, Baldwin GS. Gastrin-releasing peptide and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1766:23-41.
4. Preston SR, Miller GV, Primrose JN. Bombesin-like peptides and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1996; 23:225-238.
5. Park HJ, Kim SR, Bae SK, Choi YK, Bae YH, Kim EC, Kim WJ, Jang HO, Yun I, Kim YM, Bae MK. Neuromedin B induces angiogenesis via activation of ERK and Akt in endothelial cells. *Exp Cell Res.* 2009;315:3359-3369.
6. Martinez A, Zudaire E, Julian M, Moody TW, Cuttitta F. Gastrin-releasing peptide (GRP) induces angiogenesis and the specific GRP blocker 77427 inhibits tumor growth in vitro and in vivo. *Oncogene* 2005;24:4106-4113.
7. Zhou J, Chen J, Mokotoff M, Ball ED. Targeting gastrin-releasing peptide receptors for cancer treatment. *Anticancer Drugs* 2004;15:921-927.
8. Qiao J, Kang J, Ishola TA, Rychahou PG, Evers BM, Chung DH. Gastrin-releasing peptide receptor silencing suppresses the tumorigenesis and metastatic potential of neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105: 12891-12896.
9. Hohla F, Schally AV, Kanashiro CA, Buchholz S, Baker B, Kannadka C, Moder A, Aigner E, Datz C, Halmos G. Growth inhibition of non-small-cell lung carcinoma by BN/GRP antagonist is linked with suppression of K-Ras,

- COX-2, and pAkt. Proc Natl Acad Sci USA. 2007; 104:18671-18676.
10. Park HJ, Kim SR, Kim MK, Choi KS, Jang HO, Yun I, Bae SK, Bae MK. Neuromedin B receptor antagonist suppresses tumor angiogenesis and tumor growth in vitro and in vivo. Cancer Lett. 2011;312:117-127.
 11. da Silva SD, Ferlito A, Takes RP, Brakenhoff RH, Valentin MD, Woolgar JA, Bradford CR, Rodrigo JP, Rinaldo A, Hier MP, Kowalski LP. Advances and applications of oral cancer basic research. Oral Oncol. 2011;47:783-791.
 12. Brinkman BM, Wong DT. Disease mechanism and biomarkers of oral squamous cell carcinoma. Curr Opin Oncol. 2006;18:228-233.
 13. Shin WC, Kim CS, Kim HJ, Lee MH, Kim HR, Kim DK. Growth inhibition of human head and neck squamous cell carcinomas by *Angelica decursiva* extracts. Int J Oral Biol. 2010;35:153-158.
 14. Jang NM, Oh SH, Kim IR, Park HR, Park BS. The role of HS-1200 induced autophagy in oral cancer cells. Int J Oral Biol. 2013;38:93-100.
 15. Lizard G, Miguet C, Gueldry S, Monier S, Gambert P. Flow cytometry measurement of DNA fragmentation in the course of cell death via apoptosis. New techniques for evaluation of DNA status for the pathologist. Ann Pathol. 1997;17:61-66.
 16. Rozengurt E. Neuropeptides as growth factors for normal and cancerous cells. Trends Endocrinol Metab. 2002; 13:128-134.
 17. Heasley LE. Autocrine and paracrine signaling through neuropeptide receptors in human cancer. Oncogene 2001;20:1563-1569.
 18. Jensen RT, Battey JF, Spindel ER, Benya RV. International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states. Pharmacol Rev. 2008;60:1-42.
 19. Cardona C, Rabbitts PH, Spindel ER, Ghatei MA, Bleehen NM, Bloom SR, Reeve JG. Production of neuromedin B and neuromedin B gene expression in human lung tumor cell lines. Cancer Res. 1991;51:5205-5211.
 20. Jensen JA, Carroll RE, Benya RV. The case for gastrin-releasing peptide acting as a morphogen when it and its receptor are aberrantly expressed in cancer. Peptides 2001;22:689-699.
 21. Matusiak D, Glover S, Nathaniel R, Matkowskyj K, Yang J, Benya RV. Neuromedin B and its receptor are mitogens in both normal and malignant epithelial cells lining the colon. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2005;288:G718-728.
 22. Egloff AM, Liu X, Davis AL, Trevelline BK, Vuga M, Siegfried JM, Grandis JR. Elevated gastrin-releasing peptide receptor mRNA expression in buccal mucosa: association with head and neck squamous cell carcinoma. Head Neck 2013;35:270-279.
 23. Lango MN, Dyer KF, Lui VW, Gooding WE, Gubish C, Siegfried JM, Grandis JR. Gastrin-releasing peptide receptor-mediated autocrine growth in squamous cell carcinoma of the head and neck. J Natl Cancer Inst. 2002;94:375-383.
 24. Majumdar ID, Weber HC. Biology of mammalian bombesin-like peptides and their receptors. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2011;18:68-74.
 25. Ohki-Hamazaki H. Neuromedin B. Prog Neurobiol. 2000;62:297-312.
 26. Park HJ, Kim MK, Kim SR, Bae SK, Bae MK. Hypoxia Regulates the Expression of the Neuromedin B Receptor through a Mechanism Dependent on Hypoxia-Inducible Factor-1 α . PLoS One 2013;8:e82868.
 27. Moody TW, Berna MJ, Mantey S, Sancho V, Ridnour L, Wink DA, Chan D, Giaccone G, Jensen RT. Neuromedin B receptors regulate EGF receptor tyrosine phosphorylation in lung cancer cells. Eur J Pharmacol. 2010;637:38-45.
 28. Cornelio DB, Roesler R, Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy. Ann Oncol. 2007;18:1457-1466.
 29. Moody TW, Jensen RT, Garcia L, Leyton J. Nonpeptide neuromedin B receptor antagonists inhibit the proliferation of C6 cells. Eur J Pharmacol. 2000;409:133-142.