

Effect of ω 3-Fatty Acid Desaturase Gene Expression on Invasion and Tumorigenicity in Human Tongue Squamous Cell Carcinoma Cells

Tae-Hwa Hong^{1†}, Soyeon Shin^{1†}, Seung-Hyeon Han¹, Byung-Doo Hwang¹ and Kyu Lim^{1,2*}

¹Department of Biochemistry, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon 35015, Korea

²Cancer Research Institute, Chungnam National University, Daejeon 35015, Korea

Received April 6, 2018 / Revised May 8, 2018 / Accepted May 8, 2018

Omega-3 polyunsaturated fatty acids (ω 3-fatty acid) have been found to possess anticancer properties in a variety of cancer cell lines and animal models, but their effects in human tongue squamous cell carcinomas (SCCs) remain unclear. This study was designed to examine the effect of ω 3-fatty acid desaturase (fat-1) gene expression on invasion and tumorigenicity in human tongue SCC cells and the molecular mechanism of its action. Docosahexaenoic acid (DHA) treatment inhibited in vitro invasion in a dose-dependent manner. In zymography, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activities were reduced, and MMP-9 and MMP-2 promoter activities were inhibited by the DHA treatment. In addition, cyclooxygenase-2 (COX-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) promoter reporter activities were inhibited in SCC-4 and SCC-9 cells after the DHA treatment. To investigate the effect of a high level of endogenous ω 3 fatty acids, a stable SCC-9 cell line expressing the ω 3-desaturase gene (fSCC-9sc) was generated. The growth rate and colony-forming capacity of fSCC-9sc were remarkably decreased as compared with those of fSCC-9cc. Likewise, the tumor size and volume of fSCC-9sc implanted into nude mice were significantly inhibited, with increases in the cell death index. Furthermore, a transwell chamber invasion assay showed a reduction in cell invasion of the fSCC-9sc lines when compared with that of the fSCC-9cc line. These findings suggested that fat-1 gene expression inhibited tumorigenicity, as well as invasion in human tongue SCC cells. Thus, utilization of ω 3 fatty acids may represent a promising therapeutic approach for chemoprevention and the treatment of human tongue SCCs.

Key words : DHA, invasion, MMP, SCC, ω 3-desaturase

서 론

혀의 편평세포암(squamous cell carcinoma, SCC)은 구강의 일반적인 악성종양[6]으로 미국에서는 2018년에 혀의 암이 17,110명의 새로운 환자가 발생하고 2,510명이 사망할 것이라 추정되었으며[32], 국내에서는 구강 및 인두암이 2015년에 3309명이 발생하고, 1170명이 사망하였다고 보고 되었다[17]. 또한 이들 암은 임파선 전이에 따라 5년 생존율이 25-50%로, 전이가 환자의 생존율에 매우 중요하다고 알려져 있다[42].

식이 지방이 암 발생과 밀접한 관련성이 있다는 연구 결과가 많이 보고 되어왔다[3, 19, 31]. 특히 ω 6-polyunsaturated fatty acids (ω 6-fatty acid, 오메가-6)/ ω 3-polyunsaturated fatty acids (ω 3-fatty acid, 오메가-3)의 비율이 중요한데 이 비율

이 높으면 암의 발생, 침윤 및 전이와 밀접히 관련되어 있음으로, 오메가-6은 종양성장 및 전이를 증가하는 반면에 오메가-3는 이를 억제하는 작용이 있다고 한다[8, 12, 37]. 따라서 오메가-6/오메가-3 비율의 감소가 암의 예방 뿐만 아니라 치료에 유용하다고[8, 11, 25, 37] 생각 되고 있다. 오메가-3의 항암 작용에 대해서는 Liu 등은 NF- κ B 등 전사인자의 조절[23, 28], Lim 등은 Cox-2 억제 및 Wnt/ β -catenin 신호전달 차단[21, 22, 33], Yao 등은 mirRNA26a/b에 의한 15-PGDH의 증가[38], Yun 등은 혈관 신생 억제[5, 26, 41] 및 전이억제[41], Jing 등은 자가포식 유도[16] 및 ubiquitin/proteosomal 활성 유도 등 다양한 작용으로 암세포를 사멸 시킨다고 알려져 있다[15].

오메가-6를 오메가-3로 전환 시키는 효소는 ω 3-fatty acid desaturase (ω 3-desaturase)인데 이는 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) 이외의 동물에서는 존재하지 않음으로 오메가-3는 음식으로 반드시 섭취해야 하는 필수지방산이다. *C. elegans*에서 ω 3-desaturase를 발현하는 유전자는 *fat-1*으로 알려져 있는데, Xia 등[37]은 *fat-1* 유전자를 adenovirus를 이용하여 발현 시킴으로 오메가-6/오메가-3 비율을 낮아짐을 확인하고, 이때 인체 폐암의 침윤이 억제 된다고 하였으며, Lu 등[24]은 전립선암 세포에서 *fat-1* 유전자의 stable cell을 확립하여 nude mice에서 종양형성능이 억제됨을 보고하였다. 그러나 인체 혀

† Authors contributed equally.

*Corresponding author

Tel : +82-42-580-8223, Fax : +82-42-580-8121

E-mail : kyulim@cnu.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.

의 편평세포암 세포주에서는 흥등[13]이 오메가-3 지방산의 세포독성에 대해서 보고한 것 외에 없으며 *fat-1* 유전자 발현이 혀의 편평세포암 세포의 침윤 및 종양형성에 미치는 영향에 억제에 전혀 알려져 있지 않다.

이에 본 연구에서는 먼저 인체 혀의 편평세포암 세포주에서 먼저 오메가-3인 docosahexaenoic acid (DHA)에 의해 침윤능이 억제됨을 확인하고, 이들 중 SCC-9 세포에서 *fat-1* 유전자의 stable cell을 확립하였을 뿐만 아니라 *fat-1* stable cell의 침윤능 및 nude mice에서 종양형성능 억제를 확인하여 약간의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Nutrient Mixture F-12 (Ham's) (1:1) (DMEM/F12), fetal bovine serum 등 세포배양에 필요한 시약들은 GIBCO-BRL사(Gaithersburg, MD)에서, DHA 및 arachidonic acid [30]는 Cayman Chemical 사(Ann Arbor, MI)에서, sodium dodecyl sulfate (SDS) 등은 시약은 Sigma사(St. Louis, MO)에서 구입하였으며 그 외 다른 시약은 특급의 것을 사용하였다.

혀의 squamous cell carcinoma 세포주의 배양

혀의 squamous cell carcinoma (SCC) 세포주인 SCC-4 및 SCC-9의 배양은 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 µg/ml)을 첨가한 DMEM을 배양액으로 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양하고, 세포의 밀도가 높아지면 수분간의 trypsin-EDTA (0.05% trypsin, 0.02% EDTA in Hank's balanced salt solution without calcium and magnesium)로 처리한 후 실험할 때 지수기에 있도록 계대 배양하였고, 모든 실험은 FBS가 포함되지 않은 배지로 교환한 다음 24시간 후 시행하였다.

세포 증식능 검색

fSCC-9sc 세포등의 증식능은 colorimetric MTT assay를 이용해 측정하였다. 즉 96 well microtiter tissue culture plate에 이들 세포를 5-10×10³ cells/well로 plating하고 일정시간 배양한 다음 세포의 배양액을 제거하고 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (0.5 mg/ml) 용액으로 37°C에서 2시간 반응시키고 상청액을 제거한 후 dimethyl sulfoxide에 녹여 570 nm에서 automatic ELISA plate reader로 흡광도를 측정하였다.

Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay

fSCC-9sc로 부터 유래된 종양조직으로부터 얻은 paraf-

fin-embedded tissue section을 deparaffinized와 rehydrated 후 0.2% TritonX-100으로 처리한 후 DeadEND Fluorometric TUNEL System (Promega, Madison, WI) kit를 사용하여 분해된 DNA에 anti-digoxigenin-phosphatase를 37°C에서 4시간 동안 반응시켜 붙였다. 이를 PBS로 3회 세척한 후 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI)로 핵을 염색한 것을 mounting medium을 넣고 coverslip으로 밀봉시켜 confocal microscopy (OlympusTM)로 검경, 촬영하였다.

Transfection 및 luciferase reporter 활성 측정

SCC-4 및 SCC-9 세포를 6-well culture plate에 80% confluent하게 plating한 후 0.5 µg/well로 MMP-9-Luc reporter plasmid 등을 lipofectamine을 이용하여 transfection 하였다. Transfection된 세포에 DHA 등의 약물을 처리하여 일정시간 배양한 후 세포를 1X reporter lysis buffer로 lysis 시키고 luciferase assay system (Promega사)을 이용하여 반응시킨 후 Luminometer (Thermo사)로 luciferase 활성을 측정하였다. Luciferase 활성의 측정은 효소액의 단백질 양을 측정한 후 동일한 단백질 양으로 조절한 다음 시행하였다.

SCC-9 세포에서 *fat-1* 유전자의 stable cell의 확립

Fat-1 (ω 3-desaturase) 유전자가 포함된 plasmid (pST180, 중국 Nanjing University의 Dr. Yifan Dai로부터 기증 받음)를 SCC-9에 lipofectamin을 이용하여 transfection 하여 150 mm dish에 plating 한 후 G418을 농도별로 처리하여 transfection된 세포를 확인하고, 이들 세포를 colony별로 분리 한 후 G418 (600 µg/ml)이 포함된 배지로 지속적으로 계대 배양하였으며, 이들 세포를 RT-PCR로 *fat-1* 유전자의 발현여부를 확인하여 *fat-1* stable SCC cell (fSCC-9sc)을 확립하였다. 이 때 control cell로는 pST128 (SV40-neo expression vector, 중국 Nanjing University의 Dr. Yifan Dai로부터 기증 받음)의 stable cell (fSCC-9cc)을 확립하여 사용 하였다(제LMO08-1031호).

Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

fSCC-9sc 세포등으로 부터 각각 조제한 total RNA 1 µg, 8 µl의 5x RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 250 mM KCl, 50 mM MgCl₂, 2.5 mM spermidine, 50 mM DTT), 2.5 mM dNTP 4µl, oligo-dT (100 pmol/µl) 1 µl, RNase inhibitor (4 unit/µl) 2 µl, AMV reverse transcriptase (5 unit/µl) 2 µl를 42°C에서 1시간 동안 반응하여 single-strand cDNA를 합성하였다. 이를 *fat-1* 유전자의 primer (Forward: 5'- GGA CCT TGG TGA AGA GCA TCC G-3', Reverse: 5'- GCG TCG CAG AAG CCA AAC -3') 와 dNTP, Taq polymerase, Taq buffer등과 섞어 94°C 1분, 60°C 1분, 72°C 1분씩 30 cycle을 반응시킨 후 1.5% agarose gel에 전기영동하여 확인하였다.

In vitro 침윤능

Transwell chamber를 통한 침윤능의 측정은 Yoon 등[40]의 방법에 따라 시행하였다. 즉, 6.5 mm 직경의 8 µm pores를 가진 polycarbonate filter를 내장한 transwell culture chamber (Costa, Cambridge, MA)를 이용하였다. 침윤능 검색을 위하여 filter 위에 Matrigel (1:10)을 도포시킨 후 37°C에서 2시간 배양하여 젤화되도록 한 다음 세포현탁액 200 µl (2×10⁵ cells)를 upper chamber에 넣고 lower chamber에는 DHA가 포함된 배양액을 넣은 후 일정시간 배양시켰다. 배양이 끝나면 filter 윗면의 세포들을 면봉을 이용해 제거한 후 filter를 분리해 hematoxylin-eosin으로 염색한 후 현미경을 이용해 filter 아랫면의 세포수를 검경 계수하여 판독하였다.

Colony-formation assay

Colony formation assay는 Franken [10] 등의 방법에 준하여 시행하였다. 즉 fSCC-9sc 등 세포(1×10³)를 6 well plate에 배양하고 2주 후 0.5%의 crystal violet로 염색한 다음 형성된 colony를 관찰하였다.

종양 형성능 측정

실험에 사용할 생쥐는 특정 미생물 미감염(SPF) 하에서 유지하였으며, 충남대학교병원 실험동물위원회의 가이드라인에 따라 시행 하였다(동물승인번호: CNUH-017-A0002). Nude mice에서 *fat-1* 유전자의 SCC-9 stable cell (fSCC-9sc)과 SCC-9 control cell (fSCC-9cc)의 종양 형성능의 차이를 검색하기 위하여 이들 세포를 배양하여 3×10⁶ cells/100 µl로 조절한 후 6주령된 nude mice의 오른쪽 옆구리의 피하에 각각 주입하고 종양의 발생 및 성장에 미치는 영향을 검색하였다. 종양형성이 육안으로 확인된 날부터 2주 동안 종양의 크기 및 용적계측

을 시행하였다. 종양의 용적은 다음의 공식으로 계산하였다. Tumor size = L × W; Tumor volume = L × W² × 0.5.

통계분석

3번 이상의 독립적인 실험을 수행하였으며, 그 실험 결과의 통계 처리는 student's t-test에 준하여 처리하였고, P-value가 최대치 0.05 (p<0.05) 이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

혀의 편평세포암 세포에서 DHA에 의한 침윤능의 억제

암세포의 전이에는 암세포의 혈관벽을 통한 침윤이 일차적으로 중요하다고 알려져 있다. Song 등[33]은 체장암세포에서, Yun [41] 등은 유방암세포에서 오메가-3가 각각 침윤능을 억제한다고 보고하였다. 이에 혀의 편평세포암 세포에서 *fat-1* 유전자 발현에 따른 침윤능의 영향을 검색하기에 앞서, 먼저 *in vitro* 실험으로 오메가-3인 DHA가 혀의 편평세포암 세포인 SCC 세포의 침윤능을 억제할 수 있는가를 확인하였다. SCC-4 및 SCC-9 세포를 transwell chamber에 5×10⁵ cells/well로 조절하고, 10 µM의 DHA로 처리한 다음 48시간 후에 filter를 통해 이동한 세포를 관찰하여 침윤능을 검색하였다. 오메가-3인 DHA에 의해 SCC-4 (Fig. 1A) 및 SCC-9 세포(Fig. 1B)의 침윤능은 현저히 억제되었으나 오메가-6인 AA에 의해서는 거의 영향이 없었다. 이는 오메가-3인 DHA가 혀의 편평암세포의 침윤을 억제할 수 있으나, 오메가-6인 AA는 전혀 영향이 없음을 감안 할 때, DHA에 의한 침윤능 억제는 오메가-3의 특이 작용임을 시사한다.

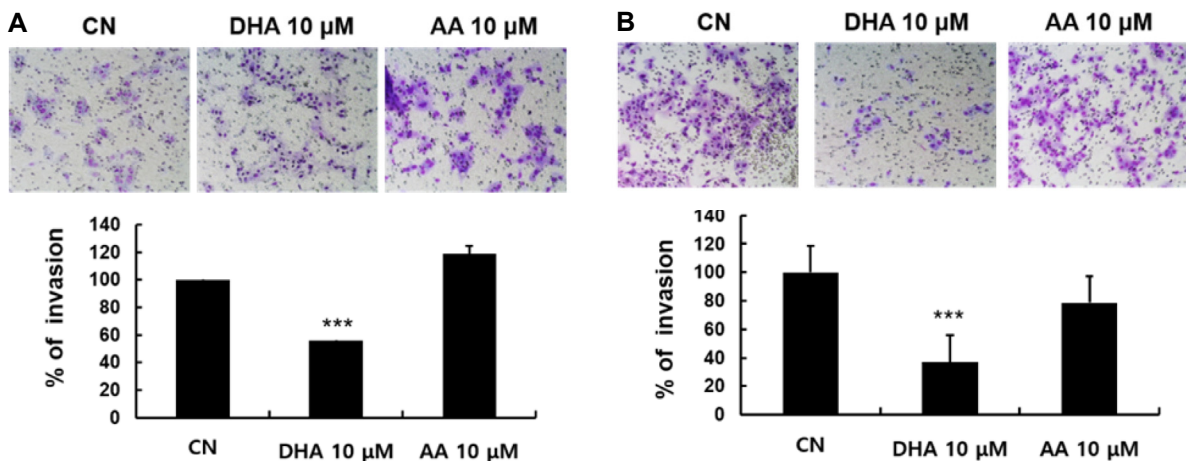


Fig. 1. DHA inhibits *in vitro* cell invasion of human tongue squamous cell carcinoma cells. The cells were loaded onto matrigel-coated upper chamber transwell as described in Materials and Methods. The cells were treated with DHA for 48 hr and the filtrated cells were stained. Upper panel, microphotographs of filters of matrigel chamber invasion assay; Lower panel, numbers of invasive cells (mean ± SD) counted in ten random fields. CN, control; bars, SD; ***, p<0.001 compared with control. A, SCC-4 cell; B, SCC-9 cell.

혀의 편평세포암 세포에서 MMP-2 및 MMP-9 활성화에 대한 DHA의 영향

암세포의 침윤은 원발성 암이 다른 장기로 전이하는데 중요한 과정으로 알려져 있다. 암세포의 침윤에는 matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 등 MMP들의 활성이 중요하며[27, 29, 34], 최근 오메가-3가 침윤을 억제한다고 보고된 바, 즉 Yun [41] 등은 유방암 세포에서 DHA에 의해 MMP-2 및 MMP-9 활성이 억제된다고 하였다. 이에 본 연구에서 인체 혀의 편평세포암 세포에서 MMP-2 및 MMP-9 활성화에 대한 오메가-3인 DHA의 영향을 검색하였다. 먼저 SCC-4 세포에서 오메가-3인 DHA 처리 후 condition medium을 조제하여 gelatin zymography를 시행한 바 DHA의 농도 의존적으로 MMP-2 및 MMP-9의 활성은 억제되었으나, 오메가-6인 AA에 의해서 거의 영향이 없었다(Fig. 2A). 이상의 결과는 인체 편평세포암 세포인 SCC-4 세포에서 오메가-3인 DHA에 의해 MMP-2 및 MMP-9의 활성이 억제될 수 있으며, 이는 오메가-3 지방산의 특이 작용임을 시사하는 것이다.

오메가-6인 AA와는 달리 DHA에 의해 MMP-2 및 MMP-9 활성이 각각 억제되었는데 이들의 억제가 전사 단계에서 조절되는지 확인하기 위해, DHA 처리 후 MMP-2 및 MMP-9의 promoter 활성을 측정하였다. SCC-4 및 SCC-9 세포를 6-well plate에 배양하여 MMP-2 및 MMP-9 promoter 유전자가 포함된 reporter plasmid를 각각 transient transfection 후 그 활성화에 대한 DHA의 영향을 luciferase 활성을 측정함으로써 검색하였는데, 먼저 MMP-2 promoter의 luciferase 활성은 SCC-4 및 SCC-9 세포에서 DHA 처리 후 억제되었고 이는 농도 의존적으로 나타났으며(Fig. 2B), 또한 MMP-9 promoter 활성도 DHA 처리 후 억제되었다(Fig. 2C). 이는 오메가-3인 DHA가 인체 혀의 편평암 세포에서 MMP-2 및 MMP-9의 활성 뿐만 아니라 전사도 억제할 수 있음을 시사한다.

혀의 편평세포암 세포에서 DHA에 의한 COX-2 및 VEGF promoter 활성의 억제

COX-1 및 COX-2는 AA를 PGE2 및 thromboxane A2 등으

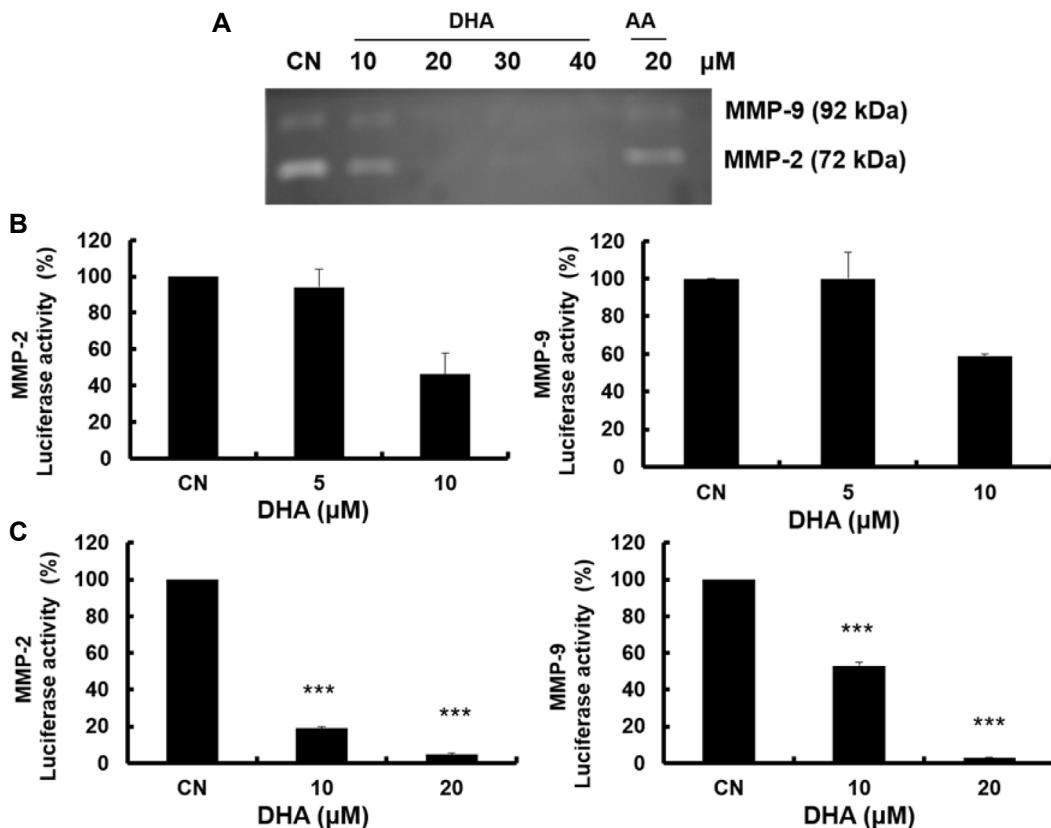


Fig. 2. DHA inhibits MMP-2 and MMP-9 activities in human tongue squamous cell carcinoma cells. A: SCC-9 cells were treated with increased dose of DHA (0-40 μM) in serum-free media for 24 hr. Then, the condition media were prepared and the activity of MMP-2 and MMP-9 were analyzed using gelatin zymography. B and C: SCC-4 (B) and SCC-9 (C) cells were plated and MMP-2 or MMP-9 luciferase reporter gene was transfected by using lipofectamin reagent as described in Materials and Methods. After the transfection performed, the cells were treated with DHA for 24 hr, and then the luciferase activity was measured using the dual luciferase assay system (Promega) in luminometer (Thermo). CN, control; columns, mean of four independent experiments; bars, SD; ***, $p < 0.001$ compared with control.

로 전환하는 효소인 바, 이중 COX-2는 염증 및 암발생과 밀접히 관련되어 있는데[7, 20], 즉 간암을 포함한 수종 암에서 암세포의 침윤 및 종양 형성능을 촉진한다고 알려져 있다[21]. 많은 암에서 COX-2 발현이 증가 되어 있는 바, Bu 등[4]은 췌장암에서 MMP-9 발현의 증가에 COX-2 및 PGE2가 밀접히 관련되어 있다고 하였으며, 황[14]등은 두경부 편평세포암에서 COX-2, MMP-9 및 혈관신생에 중요한 인자인 VEGF가 동시에 발현한다고 보고 하였다. 한편 Lim 등은 오메가-3가 간세포암[22] 및 간담도암[22] 세포에서 COX-2 promoter 활성을 억제한다고 하였다. 이에 허 편평세포암 세포에서도 오메가-3인 DHA가 COX-2 promoter 활성의 억제를 통해 침윤이 억제 되었는지 검색하기 위해, SCC-4 및 SCC-9 세포에 COX-2 promoter reporter plasmid를 transfection한 후 DHA를 처리했을 때 COX-2 promoter 활성은 DHA 처리 후 억제 되었다(Fig. 3).

Yun [41] 등은 오메가-3 지방산을 합성할 수 있는 *fat-1* transgenic mice에서 유방암 세포의 종양형성 억제에 VEGF에 감소에 따른 혈관신생이 억제가 관련 되어 있다고 하였다. 이에 허의 편평세포암 세포에서 VEGF 발현에 대한 오메가-3의 영향을 검색하기 위해, SCC-4 및 SCC-9 세포에서 VEGF promoter reporter plasmid를 transient transfection 하여 오메가-3인 DHA의 영향을 luciferase 활성을 측정함으로 검색하였다. SCC-4 및 SCC-9를 6-well plate에 배양한 후 VEGF promoter report plasmid를 transient transfection하고 DHA를 처리하였을 때 SCC-4 및 SCC-9 세포 모두에서 VEGF promoter 활성은 농도의존적으로 억제 되었다(Fig. 3). 이는 오메가-3 지방산인 DHA가 VEGF 발현을 억제함으로 허의 편평세포암

세포의 혈관신생도 억제할 수 있음을 시사한다

MMP-9 [1, 9], VEGF [18, 35] 유전자의 전사조절에는 NF-kB가 전사인자로서 중요하다고 알려져 있다. Yeh 등[39]은 간암세포의 전이에 NF-kB에 의한 MMP-9의 증가가 중요하다고 하였으며, Yun 등[41]은 MDA-MB-231 유방암 세포에서 오메가-3인 DHA가 NF-kB 활성을 억제한다고 하였다. 이에 DHA에 의한 NF-kB 활성 변동을 검색하기 위해 허의 편평세포암 세포에서 NF-kB 활성에 대한 DHA의 영향을 검색하였다. SCC-4 및 SCC-9 세포에 NF-kB binding element를 가진 reporter plasmid를 transient transfection 한 다음 오메가-3인 DHA를 처리하고 NF-kB reporter 활성을 측정하였는데 NF-kB report 활성은 DHA 처리 후 현저히 감소하였으며, 농도의존적으로 나타났다(Fig. 3). 이는 오메가-3인 DHA가 NF-kB 작용을 억제함으로 COX-2, VEGF 및 MMP-9 발현을 조절할 가능성을 시사한다.

Fat-1 유전자 발현에 의한 허의 편평암 세포의 세포증식, 종양형성능 및 침윤 억제

홍 등[13]은 오메가-3인 DHA를 SCC-4 및 SCC-9를 배양하면서 처리했을 때 세포증식을 억제하고, 자가사멸 및 자가포식에 의해 세포독성을 나타낸다고 보고 하였다. 이에 내인성 오메가-3의 영향을 규명하기 위해, 오메가-6를 오메가-3로 전환하는 효소인 ω 3-desaturase (Fat-1) 단백을 발현하는 *fat-1* 유전자 stable SCC-9 세포인 fSCC-9sc를 확립하고, 먼저 이 세포의 세포증식능을 검색하였다. 실험방법에 따라 *fat-1* 유전자를 SSC-9 세포에 삽입하여 *fat-1* 유전자 stable SCC-9 세포인

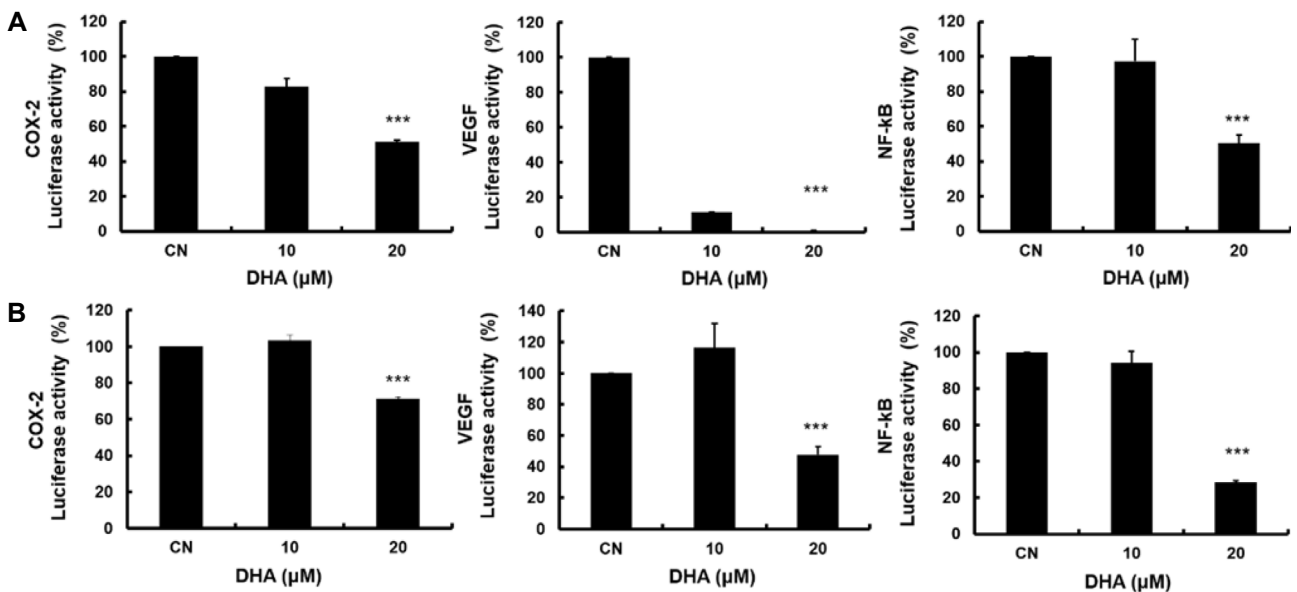


Fig. 3. DHA suppresses COX-2, VEGF and NF-kB promoter activity. SCC-4 (A) and SCC-9 (B) were transfected with luciferase reporter containing COX-2, VEGF or NF-kB promoter and treated with DHA for 24 hr. Then, the cells were lysed and the luciferase activity was measured with the dual luciferase assay. ***, $p < 0.001$ compared with control. The other assays were performed as described in Materials and Methods.

fSCC-9sc를 얻었으며 이를 대조군인 fSCC-9cc와 함께 RT-PCR로 *fat-1* 유전자의 발현을 확인함으로 fSCC-9sc가 잘 확립되었음을 알 수 있다(Fig. 4A). Lu 등[24]은 인체 전립선암 세포인 DU145 및 PC3 세포의 *fat-1* 유전자 stable cell들에서 오메가-6/오메가-3 비율이 현저히 저하 되어 있는데, 이는 *fat-1* 유전자의 발현에 따른 내인성 오메가-3가 증가되었기 때문이라고 하며, 이 때 이들의 세포증식도 억제된다고 하였다. 한편 홍 등[13]은 SCC-9을 배양하면서 오메가-3인 DHA를 처리했을 때 세포증식이 억제된다고 하였다. 이에 혀의 편평세포암 세포에서 *fat-1* 유전자 발현에 의해 증가된 내인성 오메가-3의 영향을 검색하기 위해, 96 well tissue plate에 fSCC-9sc 세포를 $0.5 \sim 1 \times 10^4$ cells/well 로 배양한 다음 24시간 후 MTT로 세포 증식능을 측정하였다. 이때 대조군으로는 SCC-9 세포 및 control vector의 stable cell 인 fSCC-9cc로 하였다. fSCC-9cc에 비해 fSCC-9sc의 세포 증식은 시간 경과에 따라 현저히 억제됨을 알 수 있었다(Fig. 4B). 이는 혀의 편평세포암 세포에서 *fat-1* 유전자의 발현에 따른 내인성 오메가-3에 의해서도 세포증식이 억제 될 수 있음을 시사하는 것이다.

또한 *fat-1* 유전자 발현에 의해 fSCC-9sc세포의 세포증식 억제를 확인하기 위해 fSCC-9sc세포의 colony formation assay를 시행하였다. fSCC-9sc 세포의 colony formation은 대조군인 fSCC-9cc에 비해 현저히 감소되었는데 이는 fSCC-9sc 세

포의 증식 억제가 *fat-1* 유전자의 발현에 따른 내인성 오메가-3 증가에 의해 억제됨을 강력히 시사한다(Fig. 4C).

오메가-3는 nude mouse에서 대장암세포등의 종양형성능을 억제한다[2, 5, 30]고 하며, Xia 등[36]은 *C. elegans*의 *fat-1* 유전자를 주입한 transgenic mice인 Fat-1 mice에서 melanoma 세포의 종양 형성능이, Lim 등[21]은 간암세포의 종양형성능이 억제된다고 하였고, Lu 등은 nude mice에서 전립선암세포의 *fat-1* 유전자 stable cell의 종양형성이 억제된다고 하였다[24] 이에 본 실험에서 fSCC-9sc 세포의 종양형성능을 검색하기 위해 nude mice (n=5)에 fSCC-9sc 세포를 3×10^6 cells/100 μ l를 오른편 옆구리에 피하 주사하여 4일 후부터 2일마다 종양의 크기를 측정하였다. fSCC-9sc 세포에서의 종양의 형성능은 control 세포인 fSCC-9cc에 비해 크기 및 용적이 현저히 작았다(Fig. 5A). 이는 오메가-3가 혀의 편평세포암의 종양형성능을 억제할 수 있음을 시사한다.

홍 등[13]은 SCC-4 및 SCC-9 세포에서 오메가-3인 DHA가 세포사멸을 유도한다고 하였다. 상기 실험에서 fSCC-9sc 세포의 종양 형성능이 감소 되었던 바 이의 자가사멸 가능성을 확인하기 위해, 형성된 종양조직에서 TUNEL assay를 시행하여 apoptotic cells를 검색하였다. fSCC-9sc 세포 형성된 종양조직에서는 fSCC-9cc 세포에 의해 형성된 종양조직에 비해 apoptotic index가 현저히 증가 하였으며($p < 0.01$) 이는 fSCC-

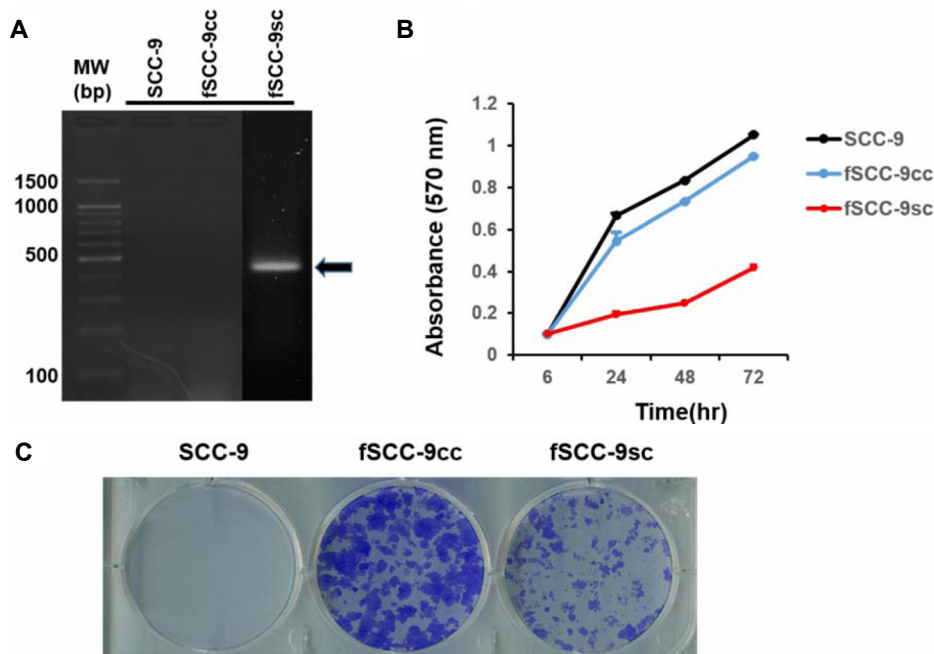


Fig. 4. Expression of the *fat-1* gene inhibits the cell proliferation in SSC-9 cells. A, RT-PCR analysis. Expression of *fat-1* gene was identified by RT-PCR analysis as described in Materials and Methods. B, MTT assay. SCC-9 cell was stably transfected with either *fat-1* gene or empty vector. Non-transfected cells, one positive clone and one control clone were plated in 96-well plates at $0.5 \sim 1 \times 10^4$ cells/well. After indicated time of incubation, the cell numbers were examined by MTT assay. C, Colony formation assay. The fSCC-9sc cells were plated in 6-well plates at 1×10^3 cells per well. Colonies were counted after 2 wk of incubation.

9sc 세포의 종양조직에서 자가사멸이 증가함에 따라 그 종양 형성능이 감소한 것이라 생각된다(Fig. 5B).

상기 침윤 실험 결과에서 오메가-3인 DHA가 SCC-9 세포의 침윤능을 억제하였는데, *fat-1* 유전자의 발현에 따른 내인성 오메가-3에 의해서도 침윤을 억제하는지 밝히기 위해, *fat-1* 유전자의 stable cell인 fSCC-9sc의 침윤능을 fSCC-9cc를 대조군으로 하여 비교 검색하였다. fSCC-9sc 및 fSCC-9cc 세포를 transwell chamber에 5×10^5 cells/well로 조절하고 24~48시간 후에 filter를 통해 이동한 세포를 측정하여 침윤능을 검색하였

을 때 fSCC-9sc의 침윤능은 fSCC-9cc 세포에 비해 현저히 억제되었다(Fig. 6). 이는 *fat-1* 유전자의 발현에 따른 내인성 오메가-3 지방산이 혀의 편평상세포의 침윤을 억제할 수 있음을 시사한다.

이상의 결과로 오메가-3는 인체 혀의 편평세포암 세포의 침윤 뿐만 아니라 종양 형성능을 억제하여 항암작용을 나타낼 수 있음을 시사하며, 따라서 오메가-3가 혀의 편평세포암의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있으리라 생각된다.

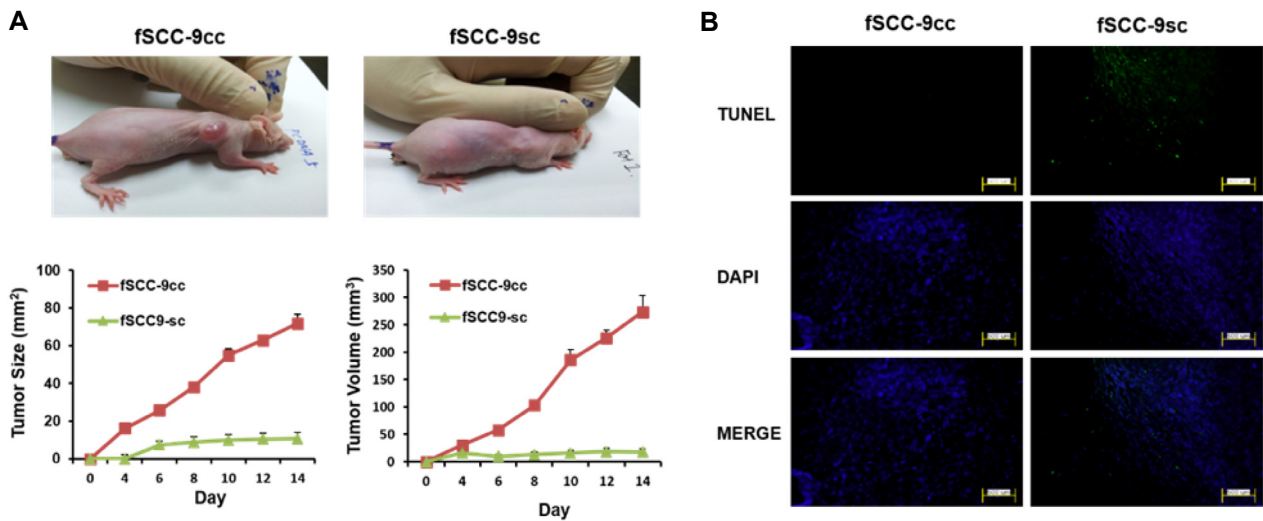


Fig. 5. Tumorigenicity of fSCC-9sc in nude mice. Nude mice were implanted with fSCC-9sc cells. After inoculation, the animals were closely monitored for the development of subcutaneous tumor. Day of the implantation of the tumor cells was designated day 0. A: Cultured fSCC-9sc cells were washed with DMEM/F12 and 3×10^6 cells were injected s.c. into the right flank in each mouse. The tumor size was measured at indicated time with a caliper. The tumor's greatest dimension and the one perpendicular to it were measured using calipers and calculated as length \times width = tumor size and $0.5 \times (\text{width})^2 \times \text{length}$ = tumor volume. WT, wild type. B: The animals were sacrificed at two weeks after implanted, and tumor tissues were fixed with formalin and TUNEL stain was performed. The apoptotic index of tumor tissue derived from fSCC-9sc was compared with fSCC-9cc (apoptotic cells appear fluorescent green). **, $p < 0.01$ compared with WT; original magnification $\times 100$.

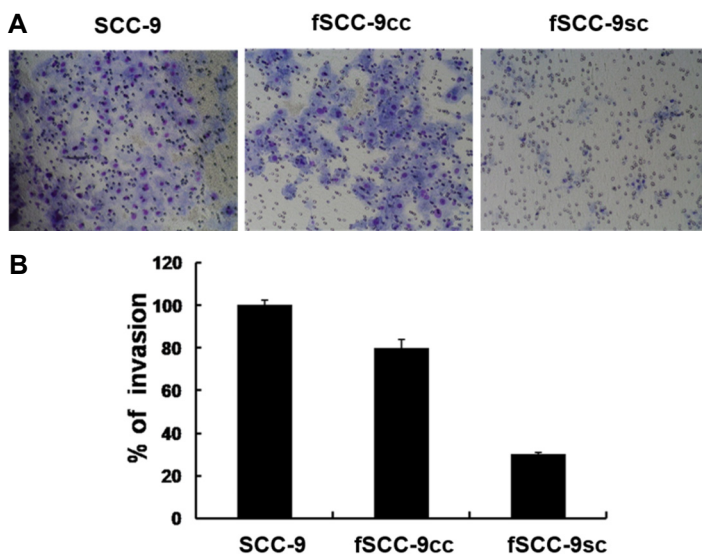


Fig. 6. Effect of stable *fat-1* gene expression on the invasion of SCC-9 cells. The cells were loaded onto matrigel-coated upper chamber transwell as described in Materials and Methods. After 48 hr, the filtrated cells were stained by hematoxylin-eosin. Upper panel, microphotographs of filters of matrigel chamber invasion assay; Lower panel, numbers of invasive cells (mean \pm SD) counted in ten random fields. CN, control; bars, SD; ***, $p < 0.001$ compared with control.

감사의 글

본 연구는 2016년 충남대학교 학술연구비에 의해 지원 되었음. 본 연구에 사용한 *fat-1* 유전자(pST180 및 pST128 plasmid)를 기증해 주신 중국의 Nanjing Medical University의 Yifan Dai 박사님에게 감사 드립니다.

References

- Bond, M., Chase, A. J., Baker, A. H. and Newby, A. C. 2001. Inhibition of transcription factor NF-kappaB reduces matrix metalloproteinase-1, -3 and -9 production by vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* **50**, 556-565.
- Boudreau, M. D., Sohn, K. H., Rhee, S. H., Lee, S. W., Hunt, J. D. and Hwang, D. H. 2001. Suppression of tumor cell growth both in nude mice and in culture by n-3 polyunsaturated fatty acids: mediation through cyclooxygenase-independent pathways. *Cancer Res.* **61**, 1386-1391.
- Bougnoux, P. 1999. n-3 polyunsaturated fatty acids and cancer. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2**, 121-126.
- Bu, X., Zhao, C. and Dai, X. 2011. Involvement of COX-2/PGE(2) pathway in the upregulation of MMP-9 expression in pancreatic cancer. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2011**, 214269.
- Calviello, G., Di Nicuolo, F., Gragnoli, S., Piccioni, E., Serini, S., Maggiano, N., Tringali, G., Navarra, P., Ranelletti, F. O. and Palozza, P. 2004. n-3 PUFAs reduce VEGF expression in human colon cancer cells modulating the COX-2/PGE2 induced ERK-1 and -2 and HIF-1alpha induction pathway. *Carcinogenesis* **25**, 2303-2310.
- Chen, P. N., Hsieh, Y. S., Chiang, C. L., Chiou, H. L., Yang, S. F. and Chu, S. C. 2006. Silibinin inhibits invasion of oral cancer cells by suppressing the MAPK pathway. *J. Dent. Res.* **85**, 220-225.
- Cheng, A. S., Chan, H. L., To, K. F., Leung, W. K., Chan, K. K., Liew, C. T. and Sung, J. J. 2004. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Int. J. Oncol.* **24**, 853-860.
- Collett, E. D., Davidson, L. A., Fan, Y. Y., Lupton, J. R. and Chapkin, R. S. 2001. n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids differentially modulate oncogenic Ras activation in colonocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **280**, C1066-1075.
- Eberhardt, W., Huwiler, A., Beck, K. F., Walpen, S. and Pfeilschifter, J. 2000. Amplification of IL-1 beta-induced matrix metalloproteinase-9 expression by superoxide in rat glomerular mesangial cells is mediated by increased activities of NF-kappa B and activating protein-1 and involves activation of the mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Immunol.* **165**, 5788-5797.
- Franken, N. A., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J. and van Bree, C. 2006. Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nat. Protoc.* **1**, 2315-2319.
- Ge, Y., Chen, Z., Kang, Z. B., Cluette-Brown, J., Laposata, M. and Kang, J. X. 2002. Effects of adenoviral gene transfer of *C. elegans* n-3 fatty acid desaturase on the lipid profile and growth of human breast cancer cells. *Anticancer Res.* **22**, 537-543.
- Hammamieh, R., Chakraborty, N., Miller, S. A., Waddy, E., Barmada, M., Das, R., Peel, S. A., Day, A. A. and Jett, M. 2007. Differential effects of omega-3 and omega-6 Fatty acids on gene expression in breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **101**, 7-16.
- Hong, T. H., Kim, H., Shin, S., Jing, K., Jeong, S., Lim, H., Yun, D. H., Jeong, K. E., Lee, M. R., Park, J. I., Kweon, G. R., Park, S. K., Hwang, B. D. and Lim, K. 2013. Cytotoxic mechanism of docosahexaenoic acid in human oral cancer cells. *J. Life Sci.* **23**, 689-697.
- Hwang, J. Y., Lee, G. H., Yoo, J. H., Lee, S. Y. and Yang, H. S. 2008. Combined expression of COX-2, MMP-9, p53 and VEGF in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Kor. J. Otorhinolaryngol-Head Neck Surg.* **51**, 1036-1042.
- Jing, K., Shin, S., Jeong, S., Kim, S., Song, K. S., Park, J. H., Heo, J. Y., Seo, K. S., Park, S. K., Kweon, G. R., Wu, T., Park, J. I. and Lim, K. 2014. Docosahexaenoic acid induces the degradation of HPV E6/E7 oncoproteins by activating the ubiquitin-proteasome system. *Cell Death Dis.* **5**, e1524.
- Jing, K., Song, K. S., Shin, S., Kim, N., Jeong, S., Oh, H. R., Park, J. H., Seo, K. S., Heo, J. Y., Han, J., Park, J. I., Han, C., Wu, T., Kweon, G. R., Park, S. K., Yoon, W. H., Hwang, B. D. and Lim, K. 2011. Docosahexaenoic acid induces autophagy through p53/AMPK/mTOR signaling and promotes apoptosis in human cancer cells harboring wild-type p53. *Autophagy* **7**, 1348-1358.
- Jung, K. W., Won, Y. J., Kong, H. J., Lee, E. S. and Community of Population-based Regional Cancer, R. 2018. Cancer Statistics in Korea: Incidence, Mortality, Survival, and Prevalence in 2015. *Cancer Res Treat.*
- Konstantinopoulos, P. A., Vandroos, G. P., Karamouzis, M. V., Gkermepesi, M., Sotiropoulou-Bonikou, G. and Papavasiliou, A. G. 2007. EGF-R is expressed and AP-1 and NF-kappaB are activated in stromal myofibroblasts surrounding colon adenocarcinomas paralleling expression of COX-2 and VEGF. *Cell Oncol.* **29**, 477-482.
- Larsson, S. C., Kumlin, M., Ingelman-Sundberg, M. and Wolk, A. 2004. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 935-945.
- Leng, J., Han, C., Demetris, A. J., Michalopoulos, G. K. and Wu, T. 2003. Cyclooxygenase-2 promotes hepatocellular carcinoma cell growth through Akt activation: evidence for Akt inhibition in celecoxib-induced apoptosis. *Hepatology* **38**, 756-768.
- Lim, K., Han, C., Dai, Y., Shen, M. and Wu, T. 2009. Omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit hepatocellular carcinoma cell growth through blocking beta-catenin and cyclooxygenase-2. *Mol. Cancer Ther.* **8**, 3046-3055.
- Lim, K., Han, C., Xu, L., Isse, K., Demetris, A. J. and Wu, T. 2008. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 activates beta-catenin in human cholangiocarcinoma cells: evi-

- dence for inhibition of these signaling pathways by omega 3 polyunsaturated fatty acids. *Cancer Res.* **68**, 553-560.
23. Liu, G., Bibus, D. M., Bode, A. M., Ma, W. Y., Holman, R. T. and Dong, Z. 2001. Omega 3 but not omega 6 fatty acids inhibit AP-1 activity and cell transformation in JB6 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 7510-7515.
 24. Lu, Y., Nie, D., Witt, W. T., Chen, Q., Shen, M., Xie, H., Lai, L., Dai, Y. and Zhang, J. 2008. Expression of the fat-1 gene diminishes prostate cancer growth *in vivo* through enhancing apoptosis and inhibiting GSK-3 beta phosphorylation. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 3203-3211.
 25. Minami, Y., Nishino, Y., Tsubono, Y., Tsuji, I. and Hisamichi, S. 2006. Increase of colon and rectal cancer incidence rates in Japan: trends in incidence rates in Miyagi Prefecture, 1959-1997. *J. Epidemiol.* **16**, 240-248.
 26. Mukutmoni-Norris, M., Hubbard, N. E. and Erickson, K. L. 2000. Modulation of murine mammary tumor vasculature by dietary n-3 fatty acids in fish oil. *Cancer Lett.* **150**, 101-109.
 27. Nagase, H. and Woessner, J. F., Jr. 1999. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* **274**, 21491-21494.
 28. Narayanan, B. A., Narayanan, N. K., Desai, D., Pittman, B. and Reddy, B. S. 2004. Effects of a combination of docosahexaenoic acid and 1,4-phenylene bis (methylene) selenocyanate on cyclooxygenase 2, inducible nitric oxide synthase and beta-catenin pathways in colon cancer cells. *Carcinogenesis* **25**, 2443-2449.
 29. Okada, Y., Gonoji, Y., Naka, K., Tomita, K., Nakanishi, I., Iwata, K., Yamashita, K. and Hayakawa, T. 1992. Matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase) from HT 1080 human fibrosarcoma cells. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. *J. Biol. Chem.* **267**, 21712-21719.
 30. Paulsen, J. E., Elvsaa, I. K., Steffensen, I. L. and Alexander, J. 1997. A fish oil derived concentrate enriched in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid as ethyl ester suppresses the formation and growth of intestinal polyps in the Min mouse. *Carcinogenesis* **18**, 1905-1910.
 31. Rose, D. P. and Connolly, J. M. 1999. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacol. Ther.* **83**, 217-244.
 32. Siegel, R. L., Miller, K. D. and Jemal, A. 2018. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J. Clin.* **68**, 7-30.
 33. Song, K. S., Jing, K., Kim, J. S., Yun, E. J., Shin, S., Seo, K. S., Park, J. H., Heo, J. Y., Kang, J. X., Suh, K. S., Wu, T., Park, J. I., Kweon, G. R., Yoon, W. H., Hwang, B. D. and Lim, K. 2011. Omega-3-polyunsaturated fatty acids suppress pancreatic cancer cell growth *in vitro* and *in vivo* via downregulation of Wnt/Beta-catenin signaling. *Pancreatology* **11**, 574-584.
 34. Suzuki, K., Enghild, J. J., Morodomi, T., Salvesen, G. and Nagase, H. 1990. Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry* **29**, 10261-10270.
 35. Tong, Q., Zheng, L., Lin, L., Li, B., Wang, D., Huang, C., Matuschak, G. M. and Li, D. 2006. Participation of the PI-3K/Akt-NF-kappa B signaling pathways in hypoxia-induced mitogenic factor-stimulated Flk-1 expression in endothelial cells. *Respir Res.* **7**, 101.
 36. Xia, S., Lu, Y., Wang, J., He, C., Hong, S., Serhan, C. N. and Kang, J. X. 2006. Melanoma growth is reduced in fat-1 transgenic mice: impact of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 12499-12504.
 37. Xia, S. H., Wang, J. and Kang, J. X. 2005. Decreased n-6/n-3 fatty acid ratio reduces the invasive potential of human lung cancer cells by downregulation of cell adhesion/invasion-related genes. *Carcinogenesis* **26**, 779-784.
 38. Yao, L., Han, C., Song, K., Zhang, J., Lim, K. and Wu, T. 2015. Omega-3 polyunsaturated fatty acids upregulate 15-PGDH expression in cholangiocarcinoma cells by inhibiting miR-26a/b expression. *Cancer Res.* **75**, 1388-1398.
 39. Yeh, C. B., Hsieh, M. J., Hsieh, Y. H., Chien, M. H., Chiou, H. L. and Yang, S. F. 2012. Antimetastatic effects of norcantharidin on hepatocellular carcinoma by transcriptional inhibition of MMP-9 through modulation of NF-kB activity. *PLoS One* **7**, e31055.
 40. Yoon, W. H., Jung, Y. J., Kim, T. D., Li, G., Park, B. J., Kim, J. Y., Lee, Y. C., Kim, J. M., Park, J. I., Park, H. D., No, Z. S., Lim, K., Hwang, B. D. and Kim, Y. S. 2004. Gabexate mesilate inhibits colon cancer growth, invasion, and metastasis by reducing matrix metalloproteinases and angiogenesis. *Clin. Cancer Res.* **10**, 4517-4526.
 41. Yun, E. J., Song, K. S., Shin, S., Kim, S., Heo, J. Y., Kweon, G. R., Wu, T., Park, J. I. and Lim, K. 2016. Docosahexaenoic acid suppresses breast cancer cell metastasis by targeting matrix-metalloproteinases. *Oncotarget* **7**, 49961-49971.
 42. Zhang, X., Liu, Y., Gilcrease, M. Z., Yuan, X. H., Clayman, G. L., Adler-Storthz, K. and Chen, Z. 2002. A lymph node metastatic mouse model reveals alterations of metastasis-related gene expression in metastatic human oral carcinoma sublines selected from a poorly metastatic parental cell line. *Cancer* **95**, 1663-1672.

초록 : 인체 혀의 편평세포암 세포에서 ω 3-fatty acid desaturase 유전자 발현이 침윤 및 종양형성에 미치는 영향

홍태화^{1*} · 신소연^{1*} · 한승현¹ · 황병두¹ · 임규^{1,2*}

(¹충남대학교 의과대학 생화학교실, ²충남대학교 암연구소)

오메가-3 지방산(오메가-3)은 수종의 암에 대해 종양형성 억제 및 침윤이 억제됨이 알려져 있다. 그러나 혀의 편평세포암 세포에서 내인성 오메가-3에 의한 침윤 및 종양형성 억제 대한 연구가 명확하게 보고된 바 없다. 이에 본 연구는 혀의 편평세포암 세포에서 ω 3-fatty acid desaturase의 유전자 발현이 침윤 및 종양형성에 미치는 영향을 규명하였다. 먼저 SCC-4 및 SCC-9세포의 침윤능은 오메가-3인 DHA 처리에 의해 억제 됨을 확인 하였다. DHA 처리 후 MMP-9 및 MMP-2 활성이 감소 되었을 뿐만 아니라 그 promoter의 reporter 활성도 억제하였다. 또한 COX-2 및 VEGF promoter 활성 뿐만 아니라 NF-kB 활성도 DHA에 의해 억제 되었다. SCC-9의 ω 3-desaturase 유전자 stable 세포(fSCC-9sc)의 세포증식 및 colony formation이 억제 되었으며, *in vivo* 동물실험에서 fSCC-9sc 세포의 종양형성능은 현저히 억제 되었고, 면역형광염색법을 이용한 fSCC-9sc 세포의 종양 조직에서의 TUNEL 양성세포는 대조군인 fSCC-9cc 세포에 비해 현저히 증가하였다. 이상의 결과로 오메가-3는 인체 혀의 편평세포암 세포의 침윤 뿐만 아니라 종양형성을 억제하여 항암작용을 나타낼 수 있으며 따라서 오메가-3는 인체 혀의 편평암의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있으리라 생각된다.