

갑상선 유두암 세포주 TPC-1에서 Cyclooxygenase-2 억제제 NS-398의 증식억제효과

충북대학교 의과대학 외과학교실

김광필 · 박진우 · 윤효영 · 장이찬 · 최재운

Antiproliferative Effect of NS-398, a Cyclooxygenase-2 Inhibitor in TPC-1 Thyroid Cancer Cell Line

Guang Bi Jin, M.D., Jin-Woo Park, M.D., Hyo-Yung Yun, M.D., Lee-Chan Jang, M.D. and Jae-Woon Choi, M.D.

Purpose: Cyclooxygenase (COX) enzymes catalyze the rate-limiting step in arachidonate metabolism. COX-1 is expressed constitutively in many cell types. However COX-2 is an inducible enzyme responsible for prostaglandin production at site of inflammation. Recently, there has been increasing evidence that COX-2 involves in development and progression of human tumors. The aim of the present investigation is to evaluate the antiproliferative effect of NS-398, a selective COX-2 inhibitor, and its mechanism in a papillary thyroid cancer cell line, TPC-1.

Methods: We used TPC-1 cell line, NS-398 and EGF. COX-2 expression was detected by RT-PCR and western blot. We used MTT assay to evaluate antiproliferative effect of NS-398. The mechanisms of growth inhibition were evaluated by apoptosis assay and cell cycle analysis using flow cytometry.

Results: COX-2 expression was identified by both RT-PCR and western blot in TPC-1 cells and it was upregulated by serum, EGF (10 ng/ml), and NS-398 (50 mM). NS-398 induced a dose-dependent inhibition of cell proliferation but did not increase apoptotic cell population significantly in the TPC-1 cell line. EGF treatment (10 ng/ml) for 72 hours did not seem to change the antiproliferative effect of NS-398. The proportion of G₀/G₁ cell cycle was increased by 10% compared with control after 36 hours of treatment with NS-398.

Conclusion: TPC-1 cells expressed COX-2 constitutively

and its expression was upregulated by serum, EGF, and NS-398. The selective COX-2 inhibitor, NS-398 inhibited cell proliferation in TPC-1 cell line rather by cell cycle arrest at G₀/G₁ phase than by inducing apoptosis. (Korean J Endocrine Surg 2003;3:106-112)

Key Words: Cyclooxygenase-2, Antiproliferation, Cell cycle arrest, Apoptosis

중심 단어: Cyclooxygenase-2, 세포증식억제, 세포 주기정지, 세포소멸

Department of Surgery, Chungbuk National University College of Medicine, Cheongju, Korea

서론

갑상선 유두암(papillary thyroid carcinoma)은 여포암(follicular carcinoma), 휘틀세포암(Hurthle cell carcinoma)과 더불어 갑상선 여포 세포에서 기원한 분화암(differentiated thyroid cancers of follicular cell origin)으로, 가장 흔히 발생하는 갑상선암이다. 대부분의 분화 갑상선암(differentiated thyroid cancers)은 적절한 외과적 치료 및 내과적 치료로 치유될 수 있다. 그러나 일부의 갑상선암은 탈분화(dedifferentiation, loss of differentiated function)를 통해 분화된 특성을 점차 소실하거나, 미분화(undifferentiated carcinoma) 상태로 바뀌어 종양의 성장이 빨라지거나, 주위 조직으로의 침윤이 증가하는 등의 보다 공격적인 생물학적 특성을 가지게 된다. 또한 이런 종양의 경우, 기존의 효과적인 수술 후 보조 요법인 방사성 요오드 요법이나, TSH 억제 요법에도 반응성이 떨어지게 되므로, 근치적 절제 이외에는 효과적인 치료법이 없는 실정이다. 갑상선 유두암의 발암기전과 그 진행은 아직 잘 밝혀져 있지 않으나, 발생과 진행에 관여하는 세포유전학적, 분자생물학적 변이의 연구를 통한 새로운 치료 대상을 찾으려는 노력이 최근 활발히 진행되고 있다. 최근 암 발생 및 진행에 연관이 있을 것으로 생각되어 활발히 연구되고 있는 cyclooxygenase (COX)-2 역시 이런

책임저자 : 박진우, 충북 청주시 흥덕구 개신동 62번지
☎ 361-711 충북대학교병원 외과
Tel: 043-269-6033, Fax: 043-266-6037
E-mail: jwpark@med.chungbuk.ac.kr
게재승인일 : 2003년 9월 5일

관점에서 좋은 연구의 대상이 될 수 있겠다.

Cyclooxygenase (COX)는 arachidonate의 중요한 속도제한 효소로서, COX-1과 COX-2의 두 가지 isoform이 알려져 있다. COX-1은 대부분의 세포에서 구성적 효소로 발현되는데 반해, COX-2는 정상 상태에서는 발현되지 않고 있다가, 염증, cytokine, 혈청, 성장인자 등에 의해 발현의 증가가 유도되는 isoform이다. COX-2는 인체 여러 암에서 과발현이 관찰되며, 갑상선에서도 특히 갑상선암과, 하시모토 갑상선염에서 과발현이 보고된다.(1) COX-2는 염증 반응뿐 아니라 세포증식의 조절에도 중요한 역할을 한다는 여러 증거들이 제시되어왔다. 종양의 발생과 COX-2의 연관성은 대장암의 경우에 많은 연구가 보고되었다.(2-7) 비특이적인 COX 억제제인 비스테로이드성 소염진통제를 꾸준히 사용한 사람에서, 그렇지 않은 사람에 비해 대장암에 의한 사망률이 감소되었다는 역학적 증거와(6) 가족성 용종증(familial adenomatous polyposis)의 쥐 모델에서 COX-2 발현을 억제시켰을 때 용종의 수와 크기가 현저히 감소되었다는 실험적 증거(4) 등이 이를 뒷받침 해 준다. 그러나 이러한 종양의 발생과 COX-2의 연관성은 대장암에만 국한되지 않고, 위선암,(8,9) 자궁 경부암(10-12) 등에서 종양의 진행과 치료 후 생존율에도 연관이 있음이 보고되어, 인체 여러 암의 발생과 진행에도 COX-2의 역할이 있을 것으로 기대된다.

갑상선암의 치료에 있어서도, 현실적으로 근치적 절제를 제외하고는 효과적인 수술 후 보조 요법이 없는, 분화가 나쁜 갑상선암(poorly differentiated thyroid carcinoma)나, 미분화 갑상선암 환자를 위한 새로운 치료제의 개발이 요구된다는 점에서, COX-2가 항암 치료의 새로운 목표물이 될 수 있는지에 대한 연구가 요구된다. 많지는 않으나, 갑상선암을 포함한 여러 갑상선 질환에서의 COX-2 발현은 이미 보고되어 있으나,(1,13,14) 저자들이 살펴본 바로는 갑상선 여포 세포 기원의 분화암 세포를 이용한 COX-2 억제제의 치료 효과는 거의 보고된 바 없다.(15) 본 연구에서는 갑상선 유두암 세포주인 TPC-1을 사용하여, 세포주의 COX-2 발현을 알아보고, COX-2 선택적 억제제인 NS-398의 투여에 의한 세포증식억제 효과와 그 기전을 알아보려고 하였다.

방 법

1) 재료

다음과 같은 재료가 실험에 사용되었다: Cellgro Mediatech (Newark, DE)으로부터 Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM): F12 media, l-glutamine, 1×Trypsin/EDTA solution, 1×PBS를 구입; Irvine Scientific (Santa Ana, CA)으로부터 penicillin-streptomycin, fetal bovine serum (FBS) 구입; Cayman Chemical (Ann Arbor, MI)로부터 anti-COX-2 mouse monoclonal antibody 구입; Oncogene Research Products (Boston, MA)로부터 Annexin V-FITC apoptosis detection kit 구입;

Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)로부터 epidermal growth factor (EGF), propidium iodide (PI), RNase 구입; BIOMOL Research Laboratories, Inc. (Plymouth Meeting, PA)로부터 COX-2의 선택적 억제제인 NS-398 구입. NS-398을 dimethylsulfoxide (DMSO)에 녹여 일차 용액(primary stock solution)을 만들고 이를 배양액에 희석하여 사용하였다. 실험에 사용된 DMSO의 최고 농도는 0.1% (v/v) 이하로 하였다.

2) 갑상선 암세포주와 배양조건

갑상선 유두암에서 기원한 세포주인 TPC-1은 Nabuo Satoh에 의해 만들어진 세포주로, UCSF/Mount Zion Medical Center의 Orlo H. Clark에 의해 공여된 것을 사용하였다. 세포주는 10% fetal bovine serum (FBS), glutamine (12.5 mg/L), penicillin (10,000 U/mL), streptomycin (10,000 U/mL)이 포함된 DMEM-12 배양액을 이용하여, 가슴 배양기에서 37°C, 5% CO₂, 95% O₂ 환경을 유지하면서 유지 배양하였다. 혈청에 의한 COX-2 발현의 변화를 보는 실험을 제외하면, 모든 실험을 혈청을 제거한 배양액을 이용하여 시행하였다. 실험에 사용된 세포가 바닥에 안정적으로 부착하여 자랄 때까지는 유지 배양에 사용된 배양액(혈청 포함)을 사용하였고, 실험 시작 24시간 전에 혈청을 제거한 배양액으로 교환하였다.

3) Western blot

갑상선 암 세포주인 TPC-1 세포를 Ø100 mm의 플레이트에 혈청이 포함된 배양액과 포함되지 않은 배양액의 두 가지 조건에서 48시간 동안 배양한 뒤, 1×PBS로 두 번 씻고, 0.5 ml의 cell lysis buffer [10% Glycerol, 25 mM HEPES (PH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 25 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1% NP-40]으로 단백질을 정제하였다. 단백질의 양은 bicinchoninic acid (BCA)를 이용하여 측정하였다. 각각의 치료 조건에서 얻은 동량의 단백질(80µg)을 sample buffer와 혼합하고 95°C에서 3분간 가열하고 바로 얼음에 식힌 뒤, 8% polyacrylamide gel에서 전기영동하고, Zata-Probe blot membran (BIO-RAD)으로 옮겼다. 5% nonfat dry milk in 10 mM of Tris-NaCl buffer를 이용하여 비특이적 결합을 차단한 뒤, mouse anti-human COX-2 antibody (Cayman Chemical)를 1 : 1000의 비율로 희석하여 4°C에서 밤새 반응시켰다. 2차 항체로는 horseradish peroxidase (HRP)가 결합된 anti-mouse IgG antibody (Amersham)를 1 : 1000의 비율로 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝나면, 세척 후 enhanced chemiluminescence (ECL) 검사 시스템 (Amersham)을 사용하여 화학발광을 시켰고 엑스선 촬영을 하여 결과를 검증하였다.(16)

4) RT-PCR

갑상선 유두암 세포주 TPC-1 세포로부터 전체 RNA를

Trizol/Chloroform method (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 추출하였고, 그 농도와 순도는 spectrophotometer를 사용하여 확인하였다. First-strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)를 사용하여 RNA 8 μ g을 이용 cDNA (complementary DNA)를 합성하였다. cDNA 합성은 전체 33 μ l의 반응으로, RNA 8 μ g을 넣고, RNase-free water로 전체 부피를 20 μ l로 만든 뒤, 65°C에서 10분간 denaturation한 뒤, 얼음에 5분간 방치하였다. 여기에 First-strand cDNA Synthesis Kit의 Bulk 1st-stand mix를 11 μ l, DTT solution 1 μ l, Pd (N)₆ 1 μ l를 첨가하였다. 혼합액을 37°C에서 1시간 동안 둔 뒤, 72°C에서 10분간 방치하여 반응을 중지시킨 뒤, 5분간 얼음에 방치한다.

RT-PCR의 조성은 필터한 3차 증류수 7.7 μ l, 25 mM의 MgCl₂ 1 μ l, 100 mM dNTP 2 μ l, COX-2 forward primer와 reverse primer 각각 2 μ l, 10 \times Buffer 2 μ l, cDNA 3 μ l, Taq polymerase 0.3 μ l로 전체 20 μ l였다. COX-2 유전자 증폭을 위해 forward primer는 5'-TTCAAATGAGATTGTGGGAAAT-3'을 reverse primer는 5'-AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTT-3'를 사용하였으며, Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 480 (USA)를 이용하여 PCR을 시행하고, 결과 산물을 전기 영동하여 304 bp의 band로 확인하였다. 내부 대조(internal control)를 위해 사용한 β -actin의 유전자 증폭에는 forward primer로 5'-AACCCTGAAAAG-ATGACCCAG-3'를, reverse primer로 5'-CTCCTGCTTGCTGATCCACAT-3'를 사용하였고, 741 bp의 band로 확인하였다. PCR 반응의 조건은 94°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 45초간 annealing, 72°C에서 45초간 extension하는 방법으로 총 35 cycle을 시행하였다. PCR 산물을 1%의 agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여, 해당 크기의 band를 관찰하였다.(16)

5) 세포 증식 검사: Colorimetric MTT (dimethylthiazoldiphenyltetrazoliumbromide) assay

세포증식 분석법인 MTT assay는 세포의 증식과 활성, growth factor와 cytokine 등에 대한 세포의 반응, 세포독성 효과(cytotoxic effects)등을 검증하는데, 민감하고, 정량적이며, 신뢰할 수 있는 방법이다.(17)

TPC-1 세포를 \varnothing 100 mm plate에서 배양하여 85~100%의 confluency를 보일 때, 1 \times Trypsin/EDTA 용액을 이용하여, 세포를 수확한 뒤, 이를 96 well plate에 매 조건당 6 well을 사용하도록 분주하였다. 각 well에는 TPC-1 세포를 4,000 개씩 분주하고, 배양액이 200 μ l이 되게 하였다. 처음 24시간은 혈청이 포함된 배양액으로 세포가 well에 안착하도록 하였고, 실험 시작 24시간 전에 혈청이 포함되지 않은 배양액으로 바꾸어 주었다. COX-2의 선택적 억제제인 NS-398을 0, 25, 50, 100 μ M 농도로 투여하였고, EGF (epidermal growth factor)는 10 ng/ml 농도가 되도록 투여하였다. 배양액의 교환과 약물의 투여는 매일 시행하였다. 약물 투여 72시간 후,

배양액을 제거하고, 새로 각 well에 100 μ l의 배양액을 넣고, 5 mg/ml의 MTT 용액을 20 μ l씩 넣어 충분히 혼합한 뒤, 37°C 배양기에서 차광 상태로 2시간 동안 두었다. 이후 각 well에 0.04 N HCl/iso-propanol/3% SDS 150 μ l를 첨가하고 충분히 혼합한 후 차광 상태에서 상온에 1시간 동안 방치하였다. ELISA microplate reader (Molecular Devices)를 이용하여, 595 nm에서 각 well의 optical density를 측정하였다.

6) 세포소멸 검사(Apoptosis assay)

세포소멸은 Annexin V-FITC Kit (Oncogene Research Products, Boston, MA)를 이용하였다. 6 well plate에서 TPC-1 세포를 각각 1 \times 10⁶ 개씩 분주하고, 처음 24시간 동안 혈청이 포함된 배양액으로 배양하고, 실험 시작 전 24시간 동안 혈청을 제거한 상태에서 배양하였다. NS-398을 여러 농도(0, 50, 100, 200 μ M)로 하여 36시간 동안 투여한 뒤, 1 \times Trypsin/EDTA 용액을 이용하여, 세포를 수확하였다. TPC-1 세포 1 \times 10⁶를 차가운 PBS로 2회 씻어낸 뒤, 원침하여 얻은 cell pellet을 1 ml의 1 \times binding buffer (10 mM Hepes/ NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, and 2.5 mM CaCl₂)와 섞고, 이 중 500 μ l를 취하여, 1.25 μ l의 Annexin V-FITC를 첨가한 다음, 15분간 암실에 방치하였다. 원침하여 결합되지 않은 Annexin V-FITC를 포함한 상층액을 제거하고, 10 μ l의 propidium iodide를 첨가한 뒤, 바로 유세포 분석을 시행하였다.(18)

7) 세포주기 분석(cell cycle analysis)

6 well plate에서 TPC-1 세포를 각각 1 \times 10⁶ 개씩 분주하고, 처음 24시간 동안 혈청이 포함된 배양액으로 배양하고, 실험 시작 전 24시간 동안 혈청을 제거한 상태에서 배양하였다. NS-398을 여러 농도(0, 25, 50, 100 μ M)로 하여 48시간 동안 투여한 뒤, 1 \times Trypsin/EDTA 용액을 이용하여, 세포를 수확하였다. 5 \times 10⁵ 세포를 200 μ l 1 \times PBS로 재 부유한 뒤, 차가운 70% ethanol 2 ml로 -20°C에서 30분간 고정하였다. 고정된 TPC-1 세포를 다시 원침하여 상층액을 버리고, 0.8 ml의 1 \times PBS로 재부유한 뒤, 1 mg/ml RNase (BIOMOL Research Laboratories, Inc., Plymouth Meeting, PA)과 400 μ g/ml PI (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)를 각각 0.1 ml씩 넣고 충분히 혼합하고 빛을 피하여 37°C에서 30분간 방치한 후 유세포 분석을 시행하였다.(19)

유세포분석은 시료가 준비되는 대로 바로 시행하였으며, Becton Dickinson 사의 FACScan을 이용하였다. 데이터 분석은 CELLQuest software를 이용하여, 분석할 세포를 선택하여(gating), 10,000 events (cells) 이상을 이용하였고, 세포주기의 분석은 Modfit software (Verity Software House, Inc.)를 이용하였다.

8) 통계 분석

통계분석은 student *t* test와 ANOVA test를 사용하였으며,

$P < 0.05$ 를 유의한 결과로 보았다.

결 과

1) 갑상선 유두암 세포주 TPC-1에서의 COX-2 발현

반정량적 방법의 RT-PCR (Fig. 1)과 western blot (Fig. 2)의 결과, 갑상선 유두암 세포주 TPC-1 세포는 다른 갑상선 세포주인 FTC-133 (여포암 기원)에 비해 COX-2의 과발현을 보였다(Fig. 2). 그러나 췌장암 세포주 Capan-1, Capan-2에 비교하면 상대적으로 발현의 정도가 낮았다. 혈청의 존재나 EGF (10 ng/ml) 또는 NS-398 (50 mM)의 투여는, 혈청을 48시간 동안 제외시킨 경우에 비해 COX-2 발현을 증가시켰다(Fig. 1).

2) NS-398의 세포증식억제효과

선택적 COX-2 억제제인 NS-398은 농도의 증가에 비례하여 TPC-1 세포의 증식을 억제하였다. TPC-1 세포를 72시간

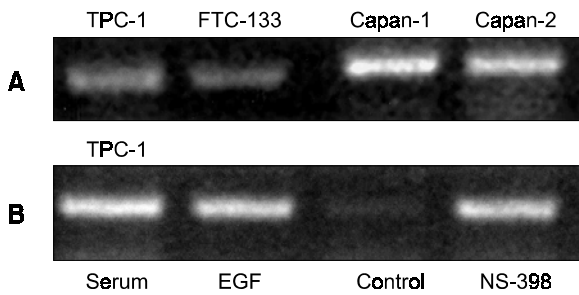


Fig. 1. RT-PCR for COX-2 expression in thyroid cancer cell lines. (A) COX-2 mRNA expression in thyroid cancer cell lines was relatively weak than that of pancreatic cancer cell lines. (B) Serum, EGF (10 ng/ml), and NS-398 (50 mM) upregulated COX-2 expression in TPC-1 cell lines. TPC-1, a papillary thyroid cancer cell line; FTC-133, a follicular thyroid cancer cell line; Capan-1 and Capan-2, pancreatic cancer cell lines.

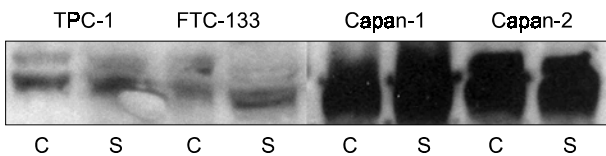


Fig. 2. Western blot for COX-2 expression in thyroid cancer cell lines. COX-2 expression in thyroid cancer cell lines was relatively weak than that of pancreatic cancer cell lines. Serum upregulated COX-2 expression in thyroid cancer cell lines. TPC-1, a papillary thyroid cancer cell line; FTC-133, a follicular thyroid cancer cell line; Capan-1 and Capan-2, pancreatic cancer cell lines.

동안 각각 25, 50, 100 μ M 농도의 NS-398에 노출하였을 때, NS-398을 투여하지 않은 대조군에 비해 세포증식이 각각 37%, 48%, 53% 억제되었다($p < 0.05$)(Fig. 3). EGF (10ng/ml) 투여는 투여하지 않은 군에 비해 약 10%의 세포 성장을 촉진시키나, 통계적으로 유의한 차이는 아니었다. EGF의 존재 여부는 NS-398의 세포증식억제에 큰 영향을 미치지 못하였다(Fig. 3).

3) 세포소멸의 유도

TPC-1 세포를 각각 50, 100, 200 μ M 농도의 NS-398에 36시간 노출시킨 뒤, Annexin V-FITC와 propidium iodide 염색을 통해 NS-398 치료에 의해 유도된 세포소멸의 정도를 대조군과 비교하였다. 유세포 분석법에서 세포소멸의 초기 단계에 있는 세포들은 Annexin V-FITC에 염색이 되지만, propidium iodide에는 염색되지 않는 특징을 보인다. 본 연구에서는 NS-398 농도를 200 μ M까지 증가하여도 세포소멸을 보이는 세포군의 유의한 증가를 관찰할 수 없었다(Fig. 4).

4) 세포 주기의 변화

TPC-1 세포를 각각 25, 50, 100 μ M 농도의 NS-398에 48시간 동안 노출시킨 뒤, 70% ethanol로 고정하고, propidium iodide로 염색한 뒤, 유세포 분석법으로 세포주기를 분석하였다. G_0/G_1 세포주기의 비율은 대조군에서 58.98%, NS-398 투여농도 25, 50, 100 μ M에서 각각 63.96%, 63.98%, 68.24%이었다. 대조군에 비해 NS-398 100 μ M 투여군에서는 G_0/G_1 세포주기 비율이 10% 정도 증가하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 5).

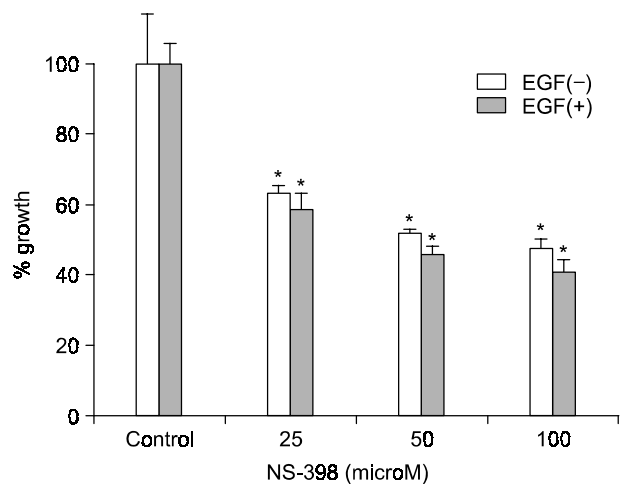


Fig. 3. Antiproliferative effect of NS-398 in TPC-1 cell line. NS-398 inhibited cell proliferation in dose-dependent manner. EGF (10 ng/ml) did not affect on antiproliferative effect of NS-398 significantly. * $p < 0.05$ between 2 adjacent groups in EGF(-) and EGF(+) groups, respectively.

고 찰

본 연구에서는 갑상선 유두암 세포주 TPC-1을 이용하여, cyclooxygenase (COX)-2의 과발현을 확인하고, 선택적 COX-2 억제제인 NS-398이 투여 용량에 비례하여 세포증식을 억제함을 관찰하였다. 갑상선 유두암 세포주 TPC-1에서의 COX-2의 세포증식 억제 작용은 세포소멸의 유도보다는 세포주기의 변화에 따른 것으로 생각된다.

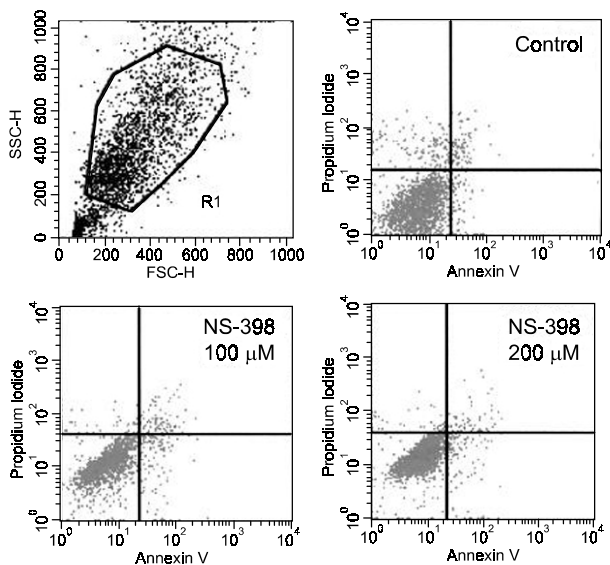


Fig. 4. Apoptotic assay after 36 hour treatment with NS-398 in TPC-1 cell line. NS-398 did not induced a significant apoptosis in TPC-1 cells. Early apoptotic cells are characterized by Annexin-V (+) and PI (-), located at lower right quadrant.

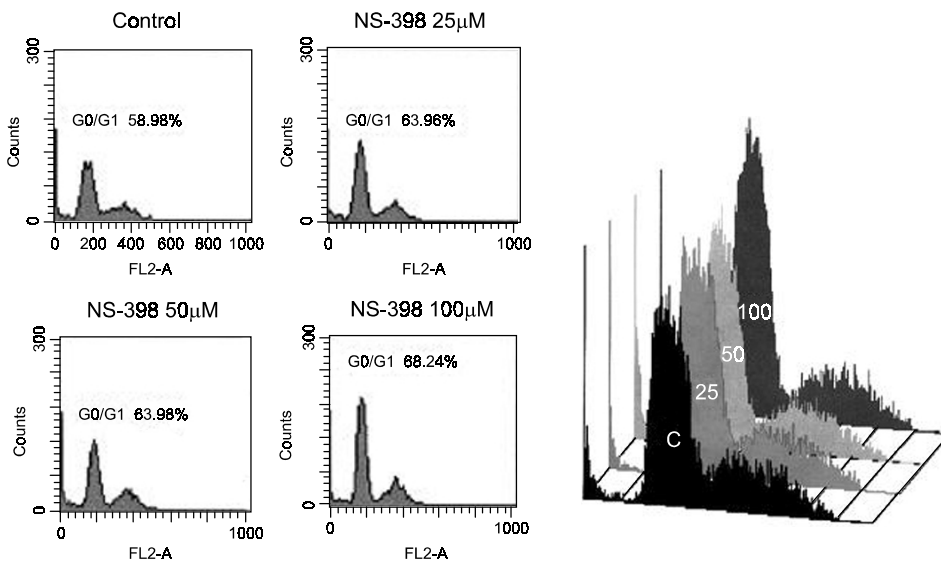


Fig. 5. Changes in cell cycle after 48 hour treatment with NS-398 in TPC-1 cell line. NS-398 increased cell population of G₀/G₁ phase by 10 % compared with control at the concentration of 100 mM.

COX는 prostaglandin 생합성의 중요한 속도제한 효소로서 arachidonate로부터 prostaglandin H₂을 생성하는 과정에 참여한다. 1976년 처음으로 정제된 cyclooxygenase는 1988년 cloning되었으며, 1991년 COX-1과 COX-2의 두 가지 isoforms이 존재한다는 것이 알려졌다.(20) COX-1은 생리적 역할의 수행에 필요한 여러 과정에 관여하는 prostaglandins (PGs)의 생성에 관여하여 구성적으로 나타나는 isoform이다. 이에 반해 COX-2는 중추신경계, 신장, 뼈 등 일부 조직에서만 구성적으로 발현되고, 그 외의 조직에서는 주로 염증세포나 면역 세포에서 endotoxin, interferon, cytokines (interleukin-1), growth factors, 그리고 phorbol ester 같은 종양 유도 물질 등에 의해 발현이 유도되고,(21,22) steroid나 interleukin-4에 의해 그 발현이 억제된다.(23) 한편, 기존의 비스테로이드성 소염진통제의 COX-1 억제에 따른 위 점막의 손상 등의 부작용을 개선하기 위해, 최근 선택적 COX-2 억제제들인 celecoxib, rofecoxib 등이 개발되어 임상에서 류마티스 질환과 골관절염의 치료에 이미 널리 사용되고 있다.

최근에는 COX-2가 염증 반응뿐 아니라, 세포 증식에도 중요한 역할을 한다는 여러 증거들이 제시되면서, 종양이나 퇴행성 질환에서의 COX-2의 역할이 활발히 연구되고 있다. 실제로 역학 조사를 통해 비스테로이드성 소염진통제(비선택적 COX 억제제)를 꾸준히 사용한 사람이 그렇지 않은 사람에 비해 대장암으로 인한 사망률이 40~50% 감소되며,(6) 알츠하이머병의 빈도 또한 감소한다는 것이 잘 알려져 있다.(24) 동물 실험에서도 가족성 용종증의 쥐 모델에서 COX-2 유전자 발현을 억제시켰을 때(APC^{Δ716} knockout mice), 발생하는 용종의 수와 크기가 현저히 감소되었다고 보고된다.(4) 그러나 COX-2가 암 발생과 진행 과정에서 구체적으로 어떤 기전을 통해 영향을 미치는가에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다. 다만 COX-2의 과발현은 세포소

멸에 대한 저항성을 높이고, 세포증식을 촉진하는데, 이 때 prosterglandin E2의 증가가 일부 세포증식에 도움이 된다고 보고된다. COX-2의 과발현은 또한 국소적 면역 억제를 유도하거나, 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF) 등을 형성하여 종양의 성장을 촉진하고, metalloproteinase 활성화를 통한 주위 조직으로의 침윤에도 관여할 것으로 추정된다.(25)

COX-2가 종양의 발생과 성장에 관여하리라는 간접적 증거의 하나는 인체 여러 암에서 과발현이 관찰된다는 점이다. Mitogenic response가 있는 경우에는 COX-2 발현이 증가되어 나타날 수 있는데, 생리적 조건 즉 창상 치유 과정뿐 아니라, 여러 종류의 전암 단계 병변 또는 암종에서도 발현이 증가되어 나타난다. 대장암, 식도암,(26) 폐암,(27) 췌장암,(16) 자궁경부암,(10-12) 전립선암(28) 등 인체의 여러 암에서 과발현이 관찰된다. 이러한 COX-2의 과발현은 전암 병변 또는 양성 종양에서부터 나타나므로, COX-2가 초기 단계에서부터 종양 발생과 진행에 연관을 가질 것으로 추정된다. 갑상선의 경우, 정상에서는 COX-2의 발현을 거의 볼 수 없고, 주로 하시모토 갑상선염과 갑상선 여포 세포에서 기원한 분화암에서 과발현됨이 보고되었다. 갑상선암의 조직학적 분류에 따른 COX-2 발현의 차이는 일정하지 않다. 본 연구에서 갑상선 세포주 TPC-1(유두암 기원)과 FTC-133 (여포암 기원)을 비교하였는데, 유두암에서 기원한 TPC-1에서 과발현이 현저하였다. TPC-1 세포의 COX-2 발현은 혈청과 NS-398 치료에 의해 증가되었으나, EGF (10 ng/ml) 투여 후에는 큰 차이가 없었다. NS-398 투여 후로 COX-2의 발현이 증가하지만, 그 활성은 모두 억제된다고 보고된다. 본 연구에서는 NS-398 투여 후 COX-2 활성의 변화를 측정하지는 않았다.

COX-2 억제를 통한 암세포 증식의 억제는 췌장암,(29) 결장암, 전립선암(30) 등에서 보고되어 있으나, 갑상선암에서는 아직 보고가 없는 실정이다. 본 연구에서는 선택적 COX-2 억제제인 NS-398을 이용하여, COX-2 과발현을 보이는 갑상선 유두암 세포주 TPC-1에 대한 세포증식억제효과를 MTT assay를 통해 알아보았다. 72시간 동안 NS-398을 25, 50, 100 μ M 농도로 투여한 결과, 대조군에 비해 각각 약 37%, 48%, 53% 세포 성장이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 NS-398의 세포증식억제효과는 EGF (10 ng/ml) 투여 유무에 영향을 받지 않았다. EGF의 투여는 일부 인체 암 세포주에서 COX-2의 과발현을 유도하는 것으로 보고되나, TPC-1 세포의 경우에는 뚜렷한 효과를 나타내지 않았고, COX-2억제제의 효과와도 무관하였다.

선택적 COX-2 억제제에 의한 세포증식억제의 기전은 조직에 따라 차이를 보이는데, 세포소멸의 유도과 세포주기의 변화, PGE₂의 생성 억제, BAX, caspase-3, caspase-9의 증가, Bcl-2 발현의 감소 등이 보고되어 있다.(31,32) 본 연구에서 TPC-1 세포를 이용, 48시간 동안 NS-398을 25, 50, 100 μ M

농도로 투여한 결과, G₀/G₁ 세포주기 비율은 각각 63.96%, 63.98%, 68.24%로 대조군의 58.98%에 비해 증가하였다. NS-398 100 μ M 농도에서 G₀/G₁ 세포주기 비율은 대조군에 비해 약 10% 정도 상승하였다. 그러나 36시간 동안 NS-398을 최고 200 μ M 농도까지 증가하여 투여하여도 유의한 세포소멸은 관찰되지 않았다. 이상의 결과로 갑상선 유두암 세포주 TPC-1에서의 NS-398의 세포증식억제는 세포소멸의 유도보다는 세포주기의 변화가 그 주요한 기전으로 생각된다.

결론

본 연구에서 갑상선 분화암에서도 선택적 COX-2 억제제가 치료적 효과를 가질 수 있음을 제시하였다. 그러나 세포증식의 억제가 세포소멸을 유도하기보다는 세포주기의 정지를 통해 이루어져, 그 효과가 가역적인 세포증식 억제로 치료를 중단할 경우 세포증식이 다시 시작될 수 있겠다. 이런 단점을 극복하기 위해서는 향후 세포주기의 정지를 통한 분화 유도 가능성에 대한 연구와 다른 항암 치료 요법과의 병행 치료에 대한 연구가 더 필요하겠다.

REFERENCES

- 1) Cornetta AJ, Russell JP, Cunnane M, Keane WM, Rothstein JL. Cyclooxygenase-2 expression in human thyroid carcinoma and Hashimoto's thyroiditis. *Laryngoscope* 2002;112:238-42.
- 2) Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, et al. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1995;55:3785-9.
- 3) Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994;107:1183-8.
- 4) Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, et al. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 1996;29:87:803-9.
- 5) Kawamori T, Rao CV, Seibert K, Reddy BS. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1998;58:409-12.
- 6) Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CW Jr. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Engl J Med* 1991;325:1593-6.
- 7) Gupta RA, DuBois RN. Aspirin, NSAIDS, and colon cancer prevention: mechanisms? *Gastroenterology* 1998;114:1095-8.
- 8) Han SL, Tang HJ, Hua YW, Ji SQ, Lin DX. Expression of COX-2 in Stomach Cancers and Its Relation to Their Biological Features. *Dig Surg* 2003;20:107-14.
- 9) Yu J, Leung WK, Lee TL, Tse PC, To KF, Sung JJ. Promoter hypermethylation of cyclooxygenase-2 in gastric carcinoma. *Int J Oncol* 2003;22:1025-31.

- 10) Chen YJ, Wang LS, Wang PH, Lai CR, Yen MS, Ng HT, et al. High cyclooxygenase-2 expression in cervical adenocarcinomas. *Gynecol Oncol* 2003;88:379-85.
- 11) Kim HJ, Wu HG, Park IA, Ha SW. High cyclooxygenase-2 expression is related with distant metastasis in cervical cancer treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 55:16-20.
- 12) Kim YB, Kim GE, Cho NH, Pyo HR, Shim SJ, Chang SK, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with a poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated with radiation and concurrent chemotherapy. *Cancer* 2002;95:531-9.
- 13) Nose F, Ichikawa T, Fujiwara M, Okayasu I. Up-regulation of cyclooxygenase-2 expression in lymphocytic thyroiditis and thyroid tumors: significant correlation with inducible nitric oxide synthase. *Am J Clin Pathol* 2002;117:546-51.
- 14) Specht MC, Tucker ON, Hovever M, Gonzalez D, Teng L, Fahey TJ 3rd. Cyclooxygenase-2 expression in thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:358-63.
- 15) Frenkian M, Segond N, Pidoux E, Cohen R, Jullienne A. Indomethacin, a cox inhibitor, enhances 15-PGDH and decreases human tumoral C cells proliferation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2001;65:11-20.
- 16) Molina MA, Sitja-Arnau M, Lemoine MG, Frazier ML, Sinicrope FA. Increased cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic carcinomas and cell lines; growth inhibition by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Res* 1999;59:4356-62.
- 17) Twentyman PR, Fox NE, Rees JK. Chemosensitivity testing of fresh leukaemia cells using the MTT colorimetric assay. *Br J Haematol* 1989;71:19-24.
- 18) Darzynkiewicz Z, Juan G, Traganos F. Assaying drug-induced apoptosis. *Methods Mol Biol* 2001;95:241-54.
- 19) Traganos F, Juan G, Darzynkiewicz Z. Related Articles, Cell-cycle analysis of drug-treated cells. *Methods Mol Biol* 2001; 95:229-40.
- 20) Smith WL, Garavito M, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthase (cyclooxygenase)-1 and -2. *Biol Chem* 1996; 271:33157-60.
- 21) Sato T, Nakajima H, Fujio K, Mori Y. Enhancement of prostaglandin E2 production by epidermal growth factor requires the coordinate activation of cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenase 2 in human squamous carcinoma A431 cells. *Prostaglandins* 1997;53:355-69.
- 22) Aliprandis ET, Merritt G, Prada F, Rigas B, Kashfi K. Fenretinide inhibits phorbol ester-induced cyclooxygenase-2 expression in human colon adenocarcinoma cells. *Biochem Soc Trans* 1997;25:457S.
- 23) Molina-Holgado E, Arevalo-Martin A, Ortiz S, Vela JM, Guaza C. Theiler's virus infection induces the expression of cyclooxygenase-2 in murine astrocytes: inhibition by the anti-inflammatory cytokines interleukin-4 and interleukin-10. *Neurosci Lett* 2002;324:237-41.
- 24) Pasinetti GM. Cyclooxygenase and inflammation in Alzheimer's disease: experimental approaches and clinical interventions. *J Neurosci Res* 1998;54:1-6.
- 25) Yu HG, Li JY, Yang YN, Luo HS, Yu JP, Meier JJ, et al. Increased abundance of cyclooxygenase-2 correlates with vascular endothelial growth factor-A abundance and tumor angiogenesis in gastric cancer. *Cancer Lett* 2003;195:43-51.
- 26) Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA, Borchard F, Gabbert HE, Schror K. Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. *Cancer Res* 1999;59:198-204.
- 27) Hida T, Yatabe Y, Achiwa H, Muramatsu H, Kozaki K, Nakamura S, et al. Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. *Cancer Res* 1998;58:3761-4.
- 28) Hussain T, Gupta S, Mukhtar H. Cyclooxygenase-2 and prostate carcinogenesis. *Cancer Lett* 2003 Mar 10;191:125-35. Review.
- 29) Nijima M, Yamaguchi T, Ishihara T, Hara T, Kato K, Kondo F, et al. Immunohistochemical analysis and in situ hybridization of cyclooxygenase-2 expression in intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas. *Cancer* 2002;94:1565-73.
- 30) Song X, Lin HP, Johnson AJ, Tseng PH, Yang YT, Kulp SK, et al. Cyclooxygenase-2, player or spectator in cyclooxygenase-2 inhibitor-induced apoptosis in prostate cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:585-91.
- 31) Minter HA, Eveson JW, Huntley S, Elder DJ, Hague A. The cyclooxygenase 2-selective inhibitor NS398 inhibits proliferation of oral carcinoma cell lines by mechanisms dependent and independent of reduced prostaglandin E2 synthesis. *Clin Cancer Res* 2003;9:1885-97.
- 32) Michael MS, Badr MZ, Badawi AF. Inhibition of cyclooxygenase-2 and activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma synergistically induces apoptosis and inhibits growth of human breast cancer cells. *Int J Mol Med* 2003;11:733-6.