

항암제 처치에 의한 신 혈관 형성 관련 유전자 표현양상이 암세포 고사에 미치는 영향에 관한 연구

한양대학교 의과대학 산부인과학교실, 임상 교수 연구실*, 관동대학교 의과대학 명지병원 산부인과*
김영재 · 이윤영 · 이영미* · 장성렬* · 김승룡 · 김경태 · 황윤영 · 조삼현 · 류기영†

The Influence of Angiogenic Gene Expression Following Management with Antineoplastic Agents to the Apoptosis of Malignant Tumor Cell

Young Jae Kim, M.D., Yoon Young Lee, M.D., Young Me Lee, M.S.*,
Sung Yeoul Chang, Ph.D.*, Seung Ryong Kim, M.D., Kyung Tai Kim, M.D.,
Youn Yeung Hwang, M.D., Sam Hyun Cho, M.D. and Ki Young Ryu, M.D.†

Department of Obstetrics and Gynecology, Laboratory for Clinical Investigation,
College of Medicine, Hanyang University, Seoul, Korea, Department of Obstetrics and Gynecology,
College of Medicine, Kwandong University, Myongji Hospital, Koyang, Korea†*

Objective : We evaluated the alteration in the expression of the genes which are related to the angiogenesis in tumor bed following the management with antineoplastic agents to the various gynecologic cancer cell lines.

Methods : To evaluate the alteration in the expression of the genes which are related to the angiogenesis in tumor bed, VEGF, bFGF, and TSP-1, in parallel with the tumor cell proliferation inhibition, apoptosis, following the management with cisplatin(0, 30, 50, and 100 uM), paclitaxel(0.002, 0.005, and 0.01uM), and thalidomide(0, 50, 100, 200ug/ml) in a dose-dependent fashion to the cell lines, Ovarian (A2780), cisplatin resists ovarian(A2780 CDDP), breast (MCF-7), and squamous cell carcinoma of uterus(SiHa,) cancer cell lines were investigated by means of MTT staining for formazan formation, FACS analysis for DNA damage, and isolation of total RNA and RT-PCR.

Results : The percentage of the cell proliferation inhibition and apoptosis after management of cisplatin were 0.00, 21.07, 39.19, and 62.45% : 9.5, 13.65, 13.25, and 25.8% in A2780, 0.00, 14.23, 24.85, and 43.48% : 14.25, 17.22, 22.76 and 39.91% in A2780 CDDP, 0.00, 3.26, 8.54, and 29.11% : 24.84, 27.56, 29.47, and 56.07% in MCF-7, but the proliferation inhibition was not heralded under the concentration of 30 uM although increased percentage of apoptosis under the serial concentrations of cisplatin in SiHa. In the cases with paclitaxel in accordance with the concentration, the degree of proliferation inhibition revealed as 0.00, 16, 92, 27.68, and 51.75% in A2780, 0.00, 28.84, 41.24, and 46.6% in A2780CDDP, 0.00, 7.92, 29.23, 41.58% in MCF-7, and 0.00, 37.24, 40.23, and 42.57% in SiHa. but the majority of apoptosis had been developed under the 1st infusion dose with 0.02 uM. Because of this phenomenon, too narrow cytotoxic effect of paclitaxel, it is difficult to define relation between apoptosis and alteration of gene expression. The proliferation inhibition and apoptotic effect of thalidomide were 0.00, 15.39, 19.06, 59.06% : 5.99, 8.49, 11.23, and 13.04% in A2780, 0.00, 1.97, 32.25, 50.42% : 12.16, 12.62, 12.77, and 13.48% in A2780CDDP, 0.00, 9.78, 30.65, and 50.27% : 27.00, 29.41, 30.37, and 36.11% in MCF-7, and 0.00, 9.87, 26.46, and 53.45% : 6.00, 6.96, 6.34, 7.09% in SiHa. Among the targeted genes which were related angiogenesis in tumor bed, VEGF, and bFGF were amplified as size as 212 bp sized VEGF, and 238 bp sized bFGF. However, 492 bp sized TSP-1 was not amplified in MCF-7 and SiHa under the treatment with cisplatin and paclitaxel, and A2780 CDDP, MCF-7, and SiHa which was managed with thalidomide. TSP-2 was not amplified at all in each targeted cell lines. The dose-dependent effect of targeted gene expression was not shown even in the cases with paclitaxel infusion, which was belong to the type 1 antiangiogenesis agent which can be a

direct effector to the VEGF, or bFGF in tumor vascular beds. Furthermore, cisplatin induced cytotoxicity was not developed in parallel with the alteration of expression of bFGF.

Conclusion : These result suggest that ongoing research for the evaluation of antiangiogenic effect with various cytotoxic agents, the objective tool should be proposed for the fine differentiation of the real antiangiogenic effect of cytotoxic and antiproliferating agent to endothelial cell., especially in the experiments with type 1 antiangiogenic agent. In the case with type 2 antiangiogenic agents, it will be helpful to construct the condition with vector related transfection to the targeted cell lines, and to include various cytokines as a target to know the paracrine effects of the tumor cells in normal environment of the animal or other host.

Key words : Angiogenesis, Antineoplastic agent, Gynecologic cancer

서 론

암세포 살상과 증식 저지에 직접적인 목표를 두고 있는 항암 화학 요법은 다양한 약제 개발에도 불구하고 암세포의 유전적 불안정성과 높은 돌연 변이 때문에 약제 내성이 불가피하다고 알려져 있다.¹

따라서 최대 살상 효과에 따른 치료율을 증폭시키기 위하여 최대 내성 용량인 고농도 선행 용량 투여(bolus injection)가 주된 투여 방법이나² 이러한 투여 방식은 정상세포(예, 생성반감기가 짧은 조혈모세포)의 회복을 위하여 비교적 오랜 기간의 투여 중지 기간이 필요하다.³ 이때에 암 종괴 내의 혈관 내피세포가 재생되어 암 세포 증식이 재현됨에 따라 투여되는 항암제에 대한 내성을 가진 암 세포 출현을 야기시키기 때문에 암 세포의 전멸이 불가능해져 완치를 이룰 수 없어⁴ 이를 극복하기 위한 대안으로 저용량의 반복 투여(frequent low-dose administration)인 소위 metronomic dosing이 제시되고 있다.⁵⁻⁷

따라서 종양에서 강화된 내피세포 증식율이 기존 항암제에 의한 종양 신 혈관 형성 억제 효과를 가능케 하는 요인인데 실제로 기존의 여타 항암제들은 약제 내성을 획득한 종양에서 조차 신 혈관 형성 억제 효과가 있음이 보고 되며 종양 치료의 새로운 장을 신속히 확립하고자 기존 항암제의 신 혈관 형성 저해 효과에 대한 보다 세밀한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 첫째 항암제는 암세포 증식 억제 효과를 나타내는 농도보다 유의하게 낮은 농도에서 혈관 내피세포의 운동(motility), 이동(migration), 관 형성(tube formation)에 영향을 미칠 가능성과,⁸ 둘째, 혈관 내피세포는 유전적으로 안정성이 보다 크기 때문에 약제 내성이 발현하지 않을 가능성에 따라⁹ 암세포 보다는 신 혈관 형성 저지 유도를 위한 혈액 내 적정 약제 농도에 대하여 연구가

집중되고 있다.¹⁰

그러나 신 혈관 내피 세포의 유전적 안정성에 대해서는 논란이 분분한데 최근 보고에 의하면 종양내의 혈관계는 상당히 비정상적이고 내피세포는 정상 조직의 내피세포와는 여러 면에서 틀릴 뿐 아니라^{11,12} 종양 내의 혈관들이 이질적이고 지엽적 미세 환경 및 종양 세포, 대식세포(macrophage), 그리고 다른 세포들에서 분비되는 cytokines에 의해 영향을 받으며^{13,14} 종양 핵심부와 변경부의 미세 환경 또한 상당한 차이가 있기에^{15,16} 이러한 관찰 요소들이 혈관 관련 치료 구상에 고려할 관건으로 작용하기도 한다.

나아가서 신 혈관 형성 관련 성장인자중의 하나인 bFGF는 유방암 세포주 MCF-7에서 cisplatin에 의해 유발되는 세포 독성도를 증폭시킨다는 보고가 있다.¹⁷

따라서 본 연구자는 우리나라 부인암의 수위를 점하고 있는 유방암, 자궁경부암, 그리고 치사율이 가장 높은 난소암¹⁸ 세포주에서 항암제 및 신 혈관 형성 억제제 투여에 따르는 암 세포 사멸, 성장 억제에 신 혈관 형성 관련 유전자 발현 변화에 따른 영향을 파악하여 항암제의 종양 내 신 혈관 형성 저해 연구에 필요한 기초적인 실험 조건 구축과 표적자를 탐지하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구 자료

난소암 세포주 A2780과 동일 세포주에서 분리한 cisplatin 내성 주 A2780 CDDP는 경북대학교로부터 분양 받았으며 유방암 세포주 MCF-7과 자궁경부 편평상피암 세포주 SiHa는 서울 대학교 세포주 은행으로부터 분양 받아 사용하였다. 본 연구에 이용된 항암제

는 cisplatin과 paclitaxel(Sigma, St. Louis, USA)이었으며 신 혈관 형성 억제제로 thalidomide(Calbiochem, Darmstadt, Germany)가 이용되었다.

II. 방법

1. 세포주 배양

난소암 및 유방암 세포주는 RPMI 1640(Gibco, BRL, USA)배지를 사용하였고 자궁경부암 세포주는 DMEM(Gibco, BRL, USA)배지를 이용하였는데 각 배지에 1% penicillin-streptomycin(Gibco, BRL, USA)과 10% fetal bovine serum(BIOFLUIDS, Rockville, MD, USA)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator(Nuaire, USA)에서 배양하였다.

2. 배양 세포주 적정 농도 결정

각 세포주는 well당 1×10^7 cell/ml에서부터 2배씩 연속 희석한 세포 현탁액 200 μ l를 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 4일간 배양하였으며 배양 마지막 4시간은 MTT(3-[4, 5-dimethylthiazole-2-yl]-2, 5-diphenyltetra-zolium bromide: Sigma, St. Louis, USA) 용액 50 μ l를, 각 well plate에 처리하여 배양하였고, 4시간 후에 1,500 rpm으로 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 DMSO(dimethyl sulphoxide)(Lancaster, UK) 150 μ l로 처리한 15분후에 ELISA(Molecule Device, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정한 다음, 지수기에 해당하는 흡광도 0.6-0.7사이의 값을 적정 농도로 산정하였다.

3. 세포 성장 억제 물질 처리

각 세포주를 5×10^5 cell/ml가 되도록 희석 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 70-80% 배양시킨 다음, cisplatin을 0.9% NaCl에 용해하여 3 mM stock solution으로 만든 후, 1% FBS가 첨가된 배지에 0-100 μ M의 농도로 투여하여 3시간 배양 한 다음, drug-free media에서 24시간 배양 하였고 paclitaxel은 DMSO로 0.2 M stock solution을 조성한 다음, 0-0.1 μ M 농도로 투여하여 24시간 배양 한 다음, drug-free media에서 24시간 추가 배양 하였다. Paclitaxel 처리군과 대조군의 DMSO 농도는 0.2% 이내로 유지하였다(Zaffaroni et al. 1998). Thalidomide는 DMSO에 용해시켜 100 mg/ml stock solution을 조성 한 다음 0-200 μ g/ml 농도로 처리하여 6시간 배양 한 다음, drug-free media에서 1시간 더 배

양하여 실험에 이용했는데 이 때의 처리군과 대조군의 DMSO농도는 0.5% 이내로 유지하였다.

4. 세포 성장 억제 측정

농도별 세포 성장 억제정도를 측정하기 위하여 배양 마지막 4시간 동안 각 well에 MTT(3-[4, 5-dimethylthiazole-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma, St. Louis, USA)dye (2mg/ml)를 50 μ l 첨가하여 37°C에서 배양 한 후, microplate를 1,500rpm으로 원심 분리하여 상층액을 제거하고 DMSO용액을 각 well에 150 μ l 씩 분주하여 형성된 formazen이 고르게 될 때까지 흔들어 준 다음 ELISA reader(Molecule Device, USA)로 570 nm에서 각 세포 성장 억제제에 대한 성장 억제를 측정하였다.

5. 세포 사멸 측정

각 세포주를 well 당 5×10^5 cells 가 되도록 희석, 분주하여, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 하룻밤 배양한 다음, 세포성장 억제제를 첨가하여 재 배양하였다. 배양한 세포는 trypsin-EDTA(Gibco, BRL, USA)로 처리하여 분리시킨 후, 10% FBS가 첨가된 동량의 RPMI 1640 배지를 첨가하여 eppendorf tube에 수거한 다음, 1,500 rpm 으로 5분간 원심 분리하여 상층액을 버리고 차가운 PBS로 세척하여 재 원심 분리한 다음 propidium iodide (50 μ g/ml) (R&D, MN, USA) 10 μ l와 10 \times binding buffer 10 μ l를 첨가한 100 μ l의 incubation reagent를 각 tube에 첨가하여 15분간 18-24°C에서 빛을 차단한 채 반응시킨 후, binding buffer를 400 μ l 씩 더 첨가하여 5 ml tube에 옮겨 FASTA flow cytometry (Becton Dickinson, San-Diego, CA, USA)에서 apoptosis를 측정하였다.

6. RNA 추출

각 세포주를 well 당 5×10^5 cells가 되도록 희석, 분주하여 각 농도별로 세포 성장 억제 물질을 첨가하여 배양 한 다음, trypsin-EDTA (Gibco BRL, USA)로 처리하여 1,500rpm에서 5분간 원심분리하여 DEPC (Diethyl Pyrocarbonate, Sigma, St. Louis, USA)로 처리된 PBS (Gibco BRL, USA) 10 ml로 세포 pellet을 세척하여 배지성분을 제거한 후, PBS 1 ml에 부유시켜 새로운 microcentrifuge tube에 옮겨 12,000 rpm에서 1-2분간 원심분리 하였다. 모아진 세포는 QIAGEN RNeasy Mini Kit (QIAGEN, GmbH Germany)를 사용하여 제조사의 protocol에 따라 RNA를 신속하게 추출한 후, DEPC처

리된 증류수에 1: 500으로 희석하여 U.V. spectrophotometer (Pharmacia Biotech, Cambridge, England)를 사용하여 260nm 파장에서 흡광도를 측정하여 농도를 결정한 후, 실험 전 까지 -70℃ deep freezer에 보관하였다.

7. 역전사 반응 (Reverse Transcription)

mRNA의 발현도를 검증하기 위한 first strand cDNA를 합성하고자 Promega 사 (WI. USA)에서 제공한 protocol에 따라 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RTase)를 사용하여 역전사 반응을 시켰다. Microcentrifuge tube에 준비된 RNA 2 ug과 Oligo (dT)15 (Promega, WI. USA) (0.5 ug/1ug RNA)를 혼합하여 DEPC로 처리된 증류수로 15 uL를 맞춘 후, 70℃에서 5분간 incubation 시켜 잠시 얼음에 방치하였다가 spin-down 시켜 준비하였다. 각 tube에 5×buffer, dNTP, RNasin과 M-MLV RTase를 첨가하여 DEPC water로 25 uL를 맞춘 후 42℃에서 60분간 incubation 하고 반응이 끝나면 -20℃에서 보관하였다.

8. 중합 효소 연쇄 반응 (Polymerase chain reaction)

각 cDNA 1ul에 10×buffer, 200 uM dNTP, 0.25U Taq polymerase (Takara, Shiga Japan)와 212 base pair(bp) VEGF, 238 bp의 bFGF, 492 bp의 TSP-1 그리고 433 bp의 TSP-2의 primer (Bioneer, Korea) (Table 1) 1 pmol을 혼합한 다음, 멸균 증류수로 총 25 uL가 되게 조성한 다음, Gene Amp PCR system 9600 (Perkin-Elmer, USA)에서 반응 시켰다. TSP-1 gene을 증폭하기 위해서 94℃에서 3분간 predenaturation 한 후, 94℃에서 1분, 60℃에서 1분 그리고 72℃에서 1분간 반응시키는 과정을 35회 반복시킨 다음 72℃에서 10분간 final extension 시켰다. VEGF와 bFGF gene을 증폭하기

위해서는 95℃에서 10분간 predenaturation을 시킨 후, 95℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 1분간 반응시키는 과정을 40회 반복한 후 72℃에서 5분간 final extension 시켜 준비 하였다. 증폭된 유전자는 1.8% agarose gel (Intron Biotechnology, Korea)에서 전기영동하여 EtBr (0.5 ug/ml)가 첨가된 0.5% TBE buffer에서 20분간 staining 한 후, 10분간 buffer에서 destaining 하여 U.V 하에서 확인 하였다. PCR 시 internal standard 는 β -actin primer(Table 1)를 이용하였다. 결과 분석은 Quantity One program (Bio-rad, CA. USA)를 사용하여 증폭된 실험과 형성 관련 유전자 VEGF, bFGF 및 TSP-1 gene들의 각 band의 optical density(OD) 값을 β -actin의 OD값으로 보정하여 얻어진 결과로 최소 3회씩 실험하여 얻어진 수치를 이용하였다.

결 과

1. 세포 성장 억제 측정 (MTT assay)

(1) Cisplatin

각 세포주는 1% FBS를 포함한 배지에 Cisplatin 을 0, 30, 50, 100 uM의 농도로 희석하여 처리한 다음, 3 시간 후 새로운 배지에서 24시간 배양하여 측정된 결과, A2780에서의 세포 성장 억제 정도는 30 uM에서 21.07%, 50 uM에서 39.19%, 100 uM에서 62.45%이었고, A2780CDDP의 경우는, 농도별로 각각 14.23, 24.85, 43.48%이었으며, MCF-7인 경우, 각각 3.26, 8.54, 29.11%이었으나 bFGF의 발현차를 밝힐 수 없어 세포 성장 억제차를 확인할 수 없었으며 SiHa에서는 30 uM에서 오히려 5.95% 세포 성장이 증가하였으나 50 uM에서는 0.77%, 100 uM에서는 27% 억제되었다. 동량의 세

Table 1. The sequences of primers used in this study

Gene	Primer sequences
VEGF	Sense : 5' CAGAATCATCACGAAGTGG 3'
	Antisense : 5' CATGGTGATGTTGGACTCC 3'
bFGF	Sense : 5' GTGTGTGCTAACCGTTACCT 3'
	Antisense : 5' GCTCTTAGCAGACATTGGAAG 3'
TSP-1	Sense : 5' ACCGCATTCCAGAGTCTGGC 3'
	Antisense : 5' ATGGGGACGTCCAACCTCAGC 3'
TSP-2	Sense : 5' CTGTGTCAACACTCAGCCTGGC 3'
	Antisense : 5' TCCTTCTCATCGGTACACCG 3'
β -actin	Sense : 5' TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCAT 3'
	Antisense : 5' CTAGAAGCATTTCGCGGTGGACGATGGA 3'

포 독성제에 대한 세포 성장 억제에 어떤 세포주에서 보다 뚜렷한 A2780의 IC50 농도는 73.29 μ M 이었고 여타의 세포주에서는 모두 100 μ M을 훨씬 상회하였다(Fig. 1).

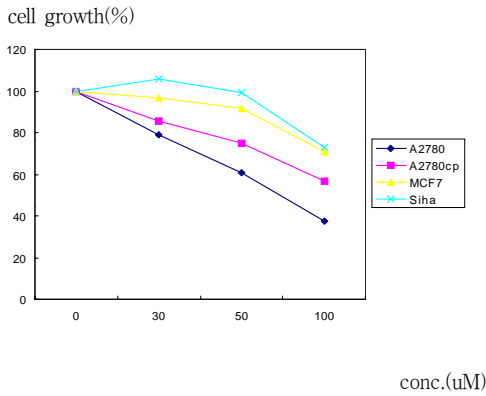


Fig. 1. Cell growth after management with cisplatin for 3hours

(2) Paclitaxel

Paclitaxel에 의한 세포 성장 억제 정도는 A2780의 경우, 0.02 μ M에서 16.92%, 0.05 μ M에서 27.68%, 0.1 μ M에서 51.75%이었으며 A2780 CDDP에서는 각각 28.84, 41.24, 46.46%, MCF-7; 7.92, 29.23, 41.58%, 그리고 SiHa에서는 각각 37.24, 40.23, 42.57%를 나타내었으며 A2780의 IC50은 0.1 μ M이나 다른 세포주에서는 이 수치 보다 훨씬 높은 IC50치를 보였다(Fig. 2).

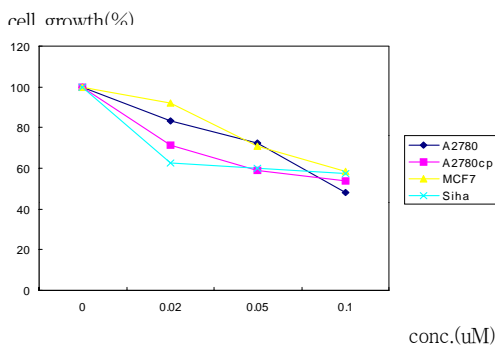


Fig. 2. Cell growth after management with paclitaxel for 3hours

(3) Thalidomide

A2780에서 세포성장 억제 정도는 thalidomide 50 μ g/ml에서 15, 39%, 100 μ g/ml에서 19.06%, 200 μ g/ml

에서 59.06%이었으며, A2780 CDDP에서는 각각 1.97, 32.25, 50.42%이었고 MCF-7 경우, 9.78, 30.65, 50.27%. SiHa 는 9.87, 26.46, 53.45%로 이들의 IC50은 순서대로 177, 29, 197.58, 198.69, <200이었으며 상기 세포 독성제들에 의한 성장 억제에 요구되는 농도간의 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 3).

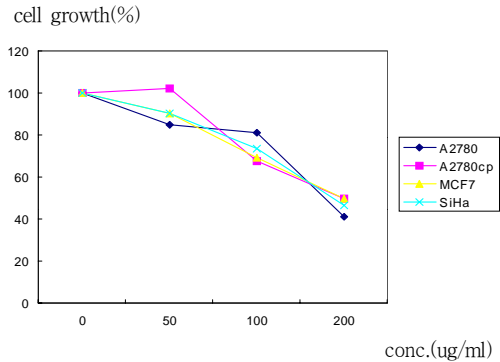


Fig. 3. Cell growth after management with thalidomide for 3hours

2. 세포 사멸 측정 (Apoptosis detection)

(1) Cisplatin

A2780의 경우, 대조군에서 9.5%, 30 μ M에서 13.65%, 50 μ M에서 13.25% 그리고 100 μ M에서 25.8%의 세포 사멸을 보였으며 A2780CDDP의 경우에는 각각 14.25, 17.22, 22.76 39.91%, MCF7에서는 24.84, 27.56, 29.47, 56.07%이었는 데 bFGF의 발현 차이가 없어서 세포 사멸의 증폭 여부를 밝힐 수 없었다. SiHa의 경우는, 9.42, 13.47, 14.81, 28.82%이었다.

(2) Paclitaxel

A2780의 경우, 대조군에서 5.76%, 0.02 μ M에서 27.97%, 0.05 μ M에서 41.73% 그리고 0.1 μ M에서는 49.75%의 세포 사멸을 보였으며. A2780CDDP의 경우, 각각 17.95, 51.38, 50.89, 52.55%이었고 MCF7에서는 27.19, 42.26, 46.91, 51.71%를 나타내었으며 SiHa, 4.59, 43.67, 44.09, 50.73%이었다.

(3) Thalidomide

A2780의 경우, 대조군에서 5.99%를, 50 μ g/ml에서 8.49%, 100 μ g/ml에서 11.23% 그리고 200 μ g/ml에서는 13.04%의 세포 사멸율을 보였으며 A2780CDDP의 경

Table 2. RT-PCR result of VEGF gene, before and following treatment with Cisplatin, Paclitaxel and Thalidomide

		Cisplatin	<i>p value</i>	Paclitaxel	<i>p value</i>	Thalidomide	<i>p value</i>
A2780	Control	0.8267400		0.8593000		0.8579000	
	Treatment	0.8762200	0.25	0.9209300	0.25	0.8934386	0.25
A2780 CDDP	Control	0.9435500		0.8632800		0.7304883	
	Treatment	0.9058540	0.25	0.8772188	0.75	0.8431322	0.75
MCF7	Control	0.9094670		0.8792273		0.9096503	
	Treatment	0.8837560	0.25	0.8831133	1.00	0.9168362	1.00
SiHa	Control	0.8841800		0.8362042		0.9563641	
	Treatment	0.8946280	1.00	0.8744894	0.75	0.9612765	1.00

A2780 : Ovarian Cancer Cell Line

A2780cp : Cisplatin Resistant Ovarian Cancer Cell Line

MCF 7 : Breast Cancer Cell Line

SiHa : Uterine Cancer Cell Line

Table 3. RT-PCR result of bFGF gene, before and following treatment with cisplatin, taxol and thalidomide

		Cisplatin	<i>p value</i>	Paclitaxel	<i>p value</i>	Thalidomide	<i>p value</i>
A2780	Control	0.872375		0.958721		0.982563	
	Treatment	0.917100	0.75	0.747554	0.25	0.9283216	0.25
A2780 CDDP	Control	1.005008		0.972796		0.9508643	
	Treatment	1.003461	1	0.984993	0.25	0.9877492	0.5
MCF7	Control	0.573184		0.840572		0.9533945	
	Treatment	0.630300	0.75	0.346013	0.25	0.7032082	0.25
SiHa	Control	0.903460		0.794624		0.9543066	
	Treatment	0.908119	1	0.854665	0.25	0.97219	0.5

A2780 : Ovarian Cancer Cell Line

A2780cp : Cisplatin Resistant Ovarian Cancer Cell Line

MCF 7 : Breast Cancer Cell Line

SiHa : Uterine Cancer Cell Line

우, 각각 12.16, 12.62, 12.77, 13.48%이었고, MCF7에서는, 27.00, 29.41, 0.37, 36.11%이었다. SiHa에서는 6.00, 6.96, 6.34, 7.09%를 나타내었다.

3. 신 혈관 형성 관련 유전자의 동태 변이

연구 대상 세포주들에 세포 성장 억제 물질들을 농도별로 처리한 후, 신혈관 형성 관련 유전자의 발현 변화도를 측정하고자 역전사 효소 반응을 실시하여 얻은 결과는 다음과 같다.

(1) 신혈관 형성 관련 유전자 합성

A2780, A2780CDDP, MCF-7과 SiHa에 cisplatin, paclitaxel, thalidomide를 세포 성장 억제 및 세포 사멸

측정 시와 동일한 농도로 처리한 후 획득된 RNA로 신혈관 형성 관련 유전자인 VEGF, bFGF, TSP-1,2를 증폭하기 위하여 polymerase chain reaction을 실시한 결과, VEGF, bFGF는 공히 증폭된 반면, TSP-1의 경우, cisplatin과 paclitaxel을 처리한 A2780과 A2780CDDP에서는 증폭되지 않았으며, thalidomide를 처리한 A2780에서는 증폭되지 않았다. 그리고 TSP-2 유전자는 본 연구에서 사용한 조건에서는 모든 세포주에서 전혀 증폭되지 않았다.(Table 2, 3, 4)

(2) 세포 성장 억제 물질 처리에 따른 Band Intensity 비교

Quantity one program (Bio-rad, CA, USA)을 이용하

Table 4. RT-PCR result of TSP-1 gene, before and following treatment with cisplatin, taxol and thalidomide

		Cisplatin	<i>p value</i>	Paclitaxel	<i>p value</i>	Thalidomide	<i>p value</i>
A2780	Control	0.675376		0.352104		0.7027268	
	Treatment	0.727245	0.75	0.467145	0.25	0.4435616	0.25
A2780 CDDP	Control	0.869126		0.505493		0.5958720	
	Treatment	0.880948	0.75	0.667966	0.25	0.4978596	1
MCF7	Control	0.946894		0.808615		0.7803906	
	Treatment	0.895371	1	0.570459	0.25	0.8697108	0.25
SiHa	Control	0.916512		0.934383		0.9491272	
	Treatment	0.892316	0.75	0.793784	0.25	0.8610638	0.25

A2780 : Ovarian Cancer Cell Line

A2780cp : Cisplatin Resistant Ovarian Cancer Cell Line

MCF 7 : Breast Cancer Cell Line

SiHa : Uterine Cancer Cell Line

여 증폭된 신 혈관 형성 관련 유전자 VEGF, bFGF 및 TSP-1 들의 각 band intensity를 β -actin의 band intensity로 보정하여 얻어진 결과는 아래와 같다.

i) VEGF gene의 band intensity 변화

A2780의 경우, cisplatin을 control, 30, 50, 및 100 μ M의 농도로 처리하였을 때 band intensity는 각각 1.8, 0.94, 1.55, 1.41로 약간의 저하 양상을 보였으나 A2780CDDP의 경우, 1.2, 0.98, 1.14, 1.17로 뚜렷한 변동을 보이지 않았으며 MCF-7에서는 0.78, 1.08, 2.02, 1.48이었고, SiHa에서도 각각 2.16, 1.61, 1.47, 1.80로 순차적인 감소나 증가 양상을 보이지 않았다. Paclitaxel 처리 후의 결과는 control, 0.02, 0.05 및 0.1 μ M의 농도로 처리하였을 때 A2780의 경우, 각각 1.11, 1.12, 1.24, 0.98, A2780CDDP, 1.05, 1.04, 0.99, 1.20, MCF7 1.16, 1.03, 0.99, 0.94이었으며 SiHa 2.61, 1.48, 1.45, 1.90로 판명되었다. Thalidomide를 control, 50, 100 및 200 μ g/ml의 농도로 처리하였을 때 A2780의 경우, 각각 1.17, 1.30, 1.22, 1.24이었고 A2780CDDP에서는 0.58, 1.32, 1.37, 1.28이었으며 MCF-7는 1.34, 1.41, 1.36, 1.45, SiHa는 1.21, 1.37, 1.29, 1.18로 나타났다.

ii) bFGF gene의 band intensity 변화

A2780의 경우, cisplatin을 전기, 같은 농도로 처리한 후, band intensity의 변화 양상은 각각 1.09, 0.99, 1.17, 0.64이었으며. A2780CDDP에서는 1.61, 1.60, 1.26, 1.52, MCF-7에서는 0.74, 0.89, 1.06, 1.11, SiHa 경우, 0.94, 0.81, 0.69, 0.56을 나타내었다. Paclitaxel을 control, 0.02, 0.05 및 0.1 μ M의 농도로 처리하였을 때 band intensity는 A2780의 경우, 0.83, 1.08, 0.88, 0.82이었으며 A2780CDDP에서는, 1.28, 1.82, 1.68, 1.63, MCF-7에

서는 1.27, 0.96, 0.90, 0.99를 나타내었고, SiHa는 0.74, 0.93, 1.01, 1.08이었다. Thalidomide를 control, 50, 100 및 200 μ g/ml의 농도로 처리하였을 때 A2780의 경우, band intensity가 각각 1.40, 1.42, 1.57, 1.41이었고. A2780CDDP의 경우, 1.23, 1.54, 1.46, 1.08을 나타내었다. MCF-7의 경우에는 1.36, 1.40, 1.25, 1.07였으며, SiHa에서는 0.99, 0.85, 1.13, 0.79를 나타내었다.

iii) TSP-1 gene의 band intensity 변화

Cisplatin을 control, 30, 50 및 100 μ M의 농도로 처리하였을 때, A2780과 A2780CDDP의 경우, 본 연구의 조건에서는 증폭이 이루어지지 않았으나 MCF-7에서는 0.77, 0.58, 0.46, 0을 나타내었고, SiHa의 경우, 각각 0.68, 1.02, 0.85, 0.48을 나타내었다. Paclitaxel을 처리하였을 경우에도 A2780과 A2780CDDP에서는 증폭이 이루어지지 않았지만 control, 0.02, 0.05 및 0.1 μ M의 농도로 처리하였을 때 MCF-7의 경우에는 0.44, 0.59, 0.57, 0.40의 변화를 보였고, SiHa 경우, 각각 0.60, 1.08, 1.04, 0.73을 나타내었다. Thalidomide를 control, 50, 100 및 200 μ g/ml의 농도로 처리하였을 때 A2780의 경우에는 증폭이 이루어지지 않았으나, A2780CDDP의 경우에는 약하게 발현되었지만 각각 0.47, 0.65, 0.49, 0.57을 나타내었다. MCF-7에서는 0.93, 0.87, 0.85, 1.01이었고, SiHa에서는 각각 1.23, 1.13, 1.30, 1.01이었다.

고 찰

대부분의 항암제는 therapeutic window가 협소하기 때문에 혈관 내피세포 고사에 필요한 투여 요구량이

암세포 고사에 필요한 용량보다 높다면 항암제의 항 신 혈관 효과를 기대할 수 없으며 항 신 혈관 효과가 세포독성제의 독성에 기인하거나 혹은 암세포 고사 후에 나타난다면 항 신 혈관 효과를 임상에 응용하기가 어렵다.¹⁹

그러나 최근 보고에 의하면 암 종괴 내의 혈관 내피 세포 분열은 암 세포 분열 보다 느리기 때문에 항암제의 항 신생 혈관 효과는 암 세포 고사를 일으키는 데 필요한 요구량에 훨씬 못 미치는 저 용량에서 나타난다고 한다.^{19,22}

나아가서 흥미로운 사실은 암 세포 존재 자체가 환자의 생명을 위협하지 않고 무증상으로 남은 여생을 지낼 수 있다는 증거가 사체 검안을 통하여 밝혀지고 있는데,²³ 이러한 결과는 사멸되지 않았으나 휴면기의 암 세포군으로 전환되었기 때문이라 생각하며 이 전환 기전의 하나로 항 신 혈관 효과를 지적하고 있다.^{21,24} 환언하면, 상당수의 암 환자가 암과 함께 건장한 삶을 영위하는 것은 반드시 암세포의 전멸이 환자 생존의 전제 조건이 아니기 때문에 가급적 장기적으로 암 용적의 최소화를 유도해주는 것이 하나의 현실적으로 수용 가능한 대체 방안으로 제시되고 있으며 오로지 metronomic dosing에 의한 항 신 혈관 효과에 의해서만 해결할 수 있는 것이라 강조하고 있다.²⁵⁻²⁹

본 연구에서 이용된 cisplatin과 paclitaxel의 대상 세포주에 투여된 최초 용량은 Zaffaroni등이 제시한 30uM과 0.02uM이었는데³⁰ 암 세포주를 이용한 세포독성제의 신 혈관 형성 억제 효과를 검증하는 cisplatin의 적정 농도 기준이 제시되지는 않았으나, 항암제 내성을 해결하는 일환으로 항암제 투여를 기존의 maximum tolerated dose의 1/10로 줄인 metronomic dose를 제시하고 있기는 하다.⁷ Paclitaxel의 신 혈관 형성 억제 적정 투여량은 암 세포 고사 요구량의 1/100 에서 1/10을 제시하고 있음을 감안 한다면 고 용량이 투여되었다.²⁷ 그러나 본 연구의 목적은 투여되는 세포독성제의 신생 혈관 형성 저지 효과에만 지향을 둔 것이 아니고 신 혈관 형성 관련 유전자의 발현 변화에 따른 암 세포 성장 억제 및 고사에 미치는 영향을 아울러 탐지하기 위한 연구이기 때문에 암 세포 성장 지연과 고사에 요구되는 최소 용량이 투여되어야 한다고 판단하였다. 나아가서 신 혈관 형성 관련 유전자중의 하나인 bFGF는 본 연구 대상인 유방암 세포주 MCF-7에서 cisplatin에 의해 야기되는 세포 독성도를 증폭시킨다

는 보고때문에¹⁷ 세포 고사에 요구되는 최초 용량 투여가 무엇보다 더 절실했었다. 그러나 thalidomide의 경우는 세포 독성제라기 보다는 그 기전이 완전히 구명되지는 않았으나 신 혈관 형성 억제 효과가 인정되는 만큼³¹ 신 혈관 형성 억제량인 50 ug/ml를 최초 투여량으로 하여³² 신 혈관 형성 관련 유전자 변화 동태의 조절군으로 삼고자 하였다.

본 실험 결과 cisplatin 의 각 농도 별 세포성장 억제 및 사멸율은 난소암 세포주 A2780에서 21.07에서 62.45%와 13.65에서 25.8%로 cisplatin 내성주인 A2780 CDDP의 14.23에서 43.48%, 그리고 14.25에서 39.91% 보다 높은 성장 억제율을 보였으나 세포 사멸정도는 내성주에서 보다 높았다. 유방암 세포주 MCF-7에서는 3.26,에서 29.11%와 27.56에서 56.07%이었으며 bFGF 발현차가 없어서 cisplatin에 의해 유발되는 세포 독성 효과의 증폭 현상을 밝힐 수 없었다. 자궁경부 편평 상피암 세포주 SiHa에서는 30 uM에서 오히려 5.955 성장 촉진을 보였으나 50 uM에서는 0.77%, 100 uM에서 27% 억제율을 보였는데 세포 사멸은 일관되게 30 uM시 일시적 세포성장에도 불구하고 13.47%의 사멸을 보였으며 농도 증가에 따라 14.81, 그리고 28.82%의 사멸정도를 보였다. 따라서 50 uM 까지는 세포사멸의 정도가 전체 1/4을 상회하지 않아 이 이하 농도에서 항 신혈관 효과가 발생하는 effective window가 아닐까 하는 기대를 하게 되었다.

Paclitaxel의 농도 별 세포성장 억제율은 A2780인 경우, 16.92에서 51.75%, A2780 CDDP에서는 28.84에서 46.46%의 범위이었고. MCF-7에서는 7.92에서 41.58%사이였으며. SiHa에서 37.24에서, 42.57% 로 cisplatin 내성주가 아닌 난소암 세포주와 MCF-7에서만 농도별 세포 성장 억제를 보였으며 세포 사멸은 상기 순서별 로 투여 전에는 5.76, 17.95, 27.19, 4.59인 반면 가장 최소 용량인 0.02 uM로 처리했을 때부터 거의 전체 1/3에 가까운 세포 사멸을 보여 신 혈관 형성 관련 유전자의 동태 변이를 파악하는 데 부적합한 농도라 생각되었다.

Thalidomide 농도 별 세포 성장 억제 및 고사율은 A2780에서 15.39에서, 59.06%와 8.49에서 13.04%이었고 A2780 CDDP인 경우, 1.97에서 50.42%와 12.62, 에서 13.48%였으며 MCF-7에서는 9.78와 50.27%, 그리고 29.41와 36.11%, SiHa에서는 9.87과 53.45%, 6.96과 7.09% 사이로 A2780을 제외한 세포주들에서 점진적 세포 성장 억제 곡선을 보였으나 세포 사멸은 MCF-7

을 제외한 다른 세포주에서는 매 농도에 따라 전체 15%이하였기 때문에 진정한 세포독성제의 효과는 확인되지 않았다.

본 연구에서 목표한 신 혈관 형성 관련 유전자중 3회의 반복된 RT-PCR로 증폭된 유전자중 VEGF와 bFGF는 모든 연구 대상 세포주에서 세포 독성제 및 신 혈관 형성 억제제의 농도 별 투여에 무관하게 증폭된 반면 TSP-1은 cisplatin과 paclitaxel을 처리한 A2780, A2780CDDP와, thalidomide를 처리한 A2780 에서는 증폭되지 않았으며 TSP-2 유전자는 모든 세포주에서 전혀 증폭되지 않았다. 나아가서 증폭된 신혈관 형성 관련 유전자들도 세포 사멸이 전체 1/3 이하인 항암제 농도에서 전혀 유의할 만한 변화를 보이지 않아 cisplatin, paclitaxel 뿐 아니라 항 신혈관 형성 효과가 보고된 thalidomide 처리군에서 조차 세포 고사 전 농도와 세포 고사를 충분히 일으킨 농도 차에 따른 신 혈관 형성 관련 유전자 증폭 변화를 파악할 수 없었으며 나아가서 유방암 세포주 MCF-7에서 bFGF의 증폭 정도에 따른 cisplatin의 세포 고사율의 강화를 전혀 밝혀내지 못하였다. 이는 base pair 크기가 212, 238로 큰 차이가 나지 않은 유전자들의 발현 변화를 각 band의 optical density로 판정하는데 그 폭이 너무 작아 객관적 판단 기준으로 설정하기에는 한계가 있어 향후 신 혈관 형성 억제 효과 입증에 보다 구체적인 판정 기준의 필요성이 절실하였다.

Tumor bearing animal model을 이용한 실험 결과, 항암제에 의한 항 신 혈관 형성 억제 기전은 두 가지 유형으로 대별되는데,³³ 첫째 유형은 암 혈관 내피세포에 직접 영향을 미치는 제제로 어떤 세포주에서도 항구적인 효과가 있으며 대표적인 제제로는 본 실험에서 이용된 paclitaxel과³⁴ 이 밖에 bleomycin 및 vinka alkaloid이다.³ 두 번째 유형은 암 혈관 내피세포에 직접 작용하는 것이 아니고 암 세포나 숙주의 혈관 내피세포가 아닌 다른 세포의 세포 성장 억제에 따라 나타나는 부수적 효과로 암세포로 하여금 angiogenic growth factor나 angiogenesis related protease를 유리하지 못하게 하여 나타나는 것이 아닌가 유추하고 있으며 이용 세포주에 따라 그 효과가 모두 공히 나타나는 것이 아니다.³³ 이 군에는 doxorubicin, adriamycin, etoposide와 5-FU가 포함된다. 따라서 본 연구에서 paclitaxel 투여에 따른 신 혈관 형성 관련 유전자의 변이는 기존 사실로 받아들여지고 있으나 세포 고사량의 용량으로는 신 혈관 형성 관련 유전자 변화 동태를 밝혀낼 수 없

음이 재 확인 되어 세포 독성제에 의한 신 혈관 형성 억제 효과는 암 세포 살상력의 1/10 내지는 1/100이면 충분히 발휘할 수 있다는²⁷ 주장이 타당한 것으로 사료되었으며 cisplatin은 IL-1과 6을 유리시키고 matrix metalloproteinase-2와 urokinase plasmin activator를 감소시키는 효과에 의한 항 신 혈관 효과가 있는 것으로 보아³⁵ 두 번째 유형에 속하는 것으로 인정되기 때문에 첫 번째 유형의 신 혈관 형성 관련 인자에 대한 영향 평가 보다는 암 세포의 paracrine effect를 평가하기 위한 실험 환경 구축이 보다 현실적인 방안으로 생각되며, thalidomide는 항 신 혈관, 면역 조정, 신경계 및 항염 작용등 그 효과가 다양한데,^{36,37} 항 신 혈관 형성 효과는 생체 및 chick chorioallantoic membrane assay 결과, TNF α , bFGF와 VEGF의 down regulation에 의해 입증되기는 하나³⁸ 본 연구에서 이용된 세포주를 대상으로한 결과는 신 혈관 형성 억제 용량에도 불구하고 혈관 내피세포 성장과 관련된 유전자들에는 효과를 미치지 못하는 것을 감안할 때 thalidomide의 다양한 효과 때문에 공인할만한 검증 방법이 없어 진정한 항 신 혈관 효과를 입증할 수가 없다고 제시한 결과와³⁹ 일치한다고 판단되었다.

따라서 추후 신 혈관 형성 관련 유전자 변이에 따른 암 세포 고사율에 대한 연구에서는 base pair의 차이가 크지 않은 유전자 증폭에 목표를 두기 보다는 위의 세포주들에 대한 신 혈관 형성 관련 인자들의 vector related transfection에 따른 실험 환경 구축으로 발현의 차이를 보다 객관적으로 인정할 수 있는 최종 대상 목표 설정이 필요하고^{17,20} cisplatin 과 thalidomide에 의한 연구 시 종양 세포 내의 신 혈관 형성 관련 인자들이 아닌 tumor cell의 paracrine effect를 파악할 수 있는 생체 내 실험 조건을 조성하여 이에 의해 발생하는 여러 cytokines에 초점을 경주하여야 할 것으로 사료되었다.

참고문헌

1. Bailar JC 3rd, Gornik HL. Cancer undefeated. N Engl. J Med. 1997; 336: 1569-74.
2. Skipper HE, Schabel FM, and Wilcox WS. Experimental evaluation of potential anticancer agents. XIII. On the criteria and kinetics associated with "curability" of experimental leukemia. Cancer Chemother. Rep., 1964; 35: 1-111.
3. Hill DL. A review of cyclophosphamide. Springfield, IL: Charles C. Thomas, 1975.

4. Baldi A, Dragonetti E, Battista T, Groeger AM, Esposito V, Baldi G, et al. Detection of circulating malignant cells by RT-PCR in long-term clinically disease-free I stage melanoma patients. *Anticancer Res* 2000; 20: 3923-8.
5. Klement G, Baruchel S, rak J et al. Continuous low-dose therapy with vinblastin and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *J Clin Invest* 2000; 105: R15-R24.
6. Hanahan D, Bergers G, Bergsland E. Less is more, regularly: Metronomic dosing of cytotoxicity drugs can target tumor angiogenesis in mice. *J Clin Invest* 2000; 105: 1045-7.
7. Kerbel RS, Klement G, Pritchard KI et al. Continuous-low dose anti-angiogenic/metronomic chemotherapy: From the research laboratory into the oncology clinic. *Ann Oncol* 2002; 13: 12-5.
8. Vacca A, Iurlaro M, Ribatti D, Minischetti M, Nica B, Ria R, Pellegrino A, and Dammacco F. Antiangiogenesis is produced by nontoxic doses of vinblastin. *Blood* 1999; 94: 4143-55.
9. Kerbel RS. Inhibition of tumor angiogenesis as a strategy to circumvent acquired resistance to anti-cancer therapeutic agents. *Bioassay* 1991; 13: 31-6.
10. Schirner M. Antiangiogenic chemotherapeutic agents. *Cancer and Metastasis Rev.*, 2000; 19: 67-73.
11. McDonald DM, Foss AJ. Endothelial cells of tumor vessels: Abnormal but not absent. *Cancer Metastasis Rev.*, 2000; 19: 109-20.
12. St. Croix B, Rago C, Velculescu V et al. Gene expressed in human tumor endothelium. *Science* 289:1197-1202, 2000
13. Singh RK, and Fidler IJ. Regulation of tumor angiogenesis by organ -specific cytokines. *Curr To Microbiol Immunol.*, 1996; 213: 1-11.
14. Luca M, Huang S, Gershenwald JE et al. Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. *Am J. Pathol.* 1997; 151: 1105-13.
15. Eberhard A, Kahert S, Goede V, Hemmerlein B, Plate KH, Augustin HG, Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors; implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res.* 2000; 60: 1388-93.
16. Eatock MM, Schatzlein A, and Kaye SB. Tumor vasculature as a target for anticancer therapy. *Cancer Treat Rev.* 2000; 26: 191-204.
17. Fenig E, Livnat T, Sharkon-Polak S, Wassermann L, Beery E, Lilling G, et al. Basic fibroblast growth factor potentiates cisplatin- induced cytotoxicity in MCF-7 human breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1999; 125: 556-62.
18. 보건복지부. 한국중앙암등록사업 연례 보고서; 2002
19. Miller KD, Sweeney CJ, Sledge GW, Jr. Redfining the target: Chemotherapeutics as antiangiogenics. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1195-206.
20. Browder T, Butterfield CE, Kraling BM, Shi B, Marshall B, O'Reilly MS, et al. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res.* 2000, 60: 1878-86.
21. Hahnfeldt P, Sachs RK. Radiation damage to a dynamic cell population. In; *Advances in Mathematical Population dynamics: Molecules, Cell and Man*(Arino O, Axelrod D and Kimmel M. eds). Series in Mathematical Biokogy and Medicine, Vol. 6. River Edge, NJ: World Scientific. 1997
22. Folkman J. Angiogenesis and apoptosis. *Semin Cancer Biol.* 2003; 13: 159-67.
23. Black WC, and Welch HG. Advances in diagnostic imaging and overestimations of disease prevalence and benefits of therapy. *New Engl. J Med* 1993; 328: 1237-43.
24. Holmgren L, O'Reilly MS, and Folkman J. Dormancy of micrometastases; balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis supression. *Nat Med* 1995; 1: 149-53.
25. Braunschweiger PG, Schiffer LM. Cell kinetic-directed sequential chemotherapy with cyclophosphamide and adriamycin in T 1699 mammary tumors. *Cancer Res* 1980; 40: 737-43.
26. Hansen RM, Ryan L, Anderson T, Krzywda B, Quebbeman E, Benson III A, et al. Phase III study of bolus versus infusion fluorouracil with or without cisplatin in advanced colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 668-74.
27. Grant DS, William TL, Zahaczewsky M, Dicker AP. Comparison of antiangiogenic activities using paclitaxel (taxol) and docetaxel(taxotere). *Int J cancer* 2003; 104: 121-9.
28. Wolma N, Piedbois P, Buyse M, Carlson R, Rustum Y, Erlichman C. Efficacy of intravenous continuous infusion of fluorouracil compared with bolus administration in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16: 301-8.
29. Seidman AD, Hudis CA, Albanel J, Tong W, Tepler I, Currie V, et al. Dose-dense therapy with weekly 1- hour paclitaxel infusions in the treatment of metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16: 3353-61.
30. Zaffaroni N, Silvestrini R, Orlandi L, Bearzatto A, Gornati D, Villa R. Induction of apoptosis by taxol and cisplatin and effect on cell cycle-related proteins in cisplatin-sensitive and resistant human ovarian cancer cells. *BJC* 1998; 77: 1378-85.
31. Calabrese LDO and Fleisher, Jr AB. Thalidomide: Current and potential clinical application. *Am J Med* 2000; 108: 487-95.
32. Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinas A, Frindt P, Kendall AS, Kaplan G. Thalidomide exerts its inhibitory action on

- tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *J Exp Med* 1993; 177: 1675-80.
33. Schirner M, Hoffmann J, Menrad A, Schneider MR. Antiangiogenic chemotherapeutic agents: Characterization in comparison to their tumor growth inhibition in human renal cell carcinoma models. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1331-36.
 34. Belotti D, Vergani V, Drudis T, Borsotti P, Piletti MR, Viale G, et al. The microtubule-affecting drug paclitaxel has antiangiogenic activity.? *Clin Cancer Res*. 1996; 2: 1843-9.
 35. Shi Y, Inoue S, Shinozaki R et al. release of cytokines from human umbilical vein endothelial cells treated with platinum compounds in vitro. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89: 757-67.
 36. D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91: 4082-5.
 37. Thomas DA and Kantarjian HM. Current role of thalidomide in cancer treatment. *Curr Opin Oncol* 2000; 12: 564-73.
 38. Little RF, Wyville KM, Pluda JM et al. Activity of thalidomide in AIDs-related kaposi's sarcoma. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2593-602.
 39. Singhal S, Mehta J, Desikan R et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *New Engl. J Med* 1999; 341:1565-71.

국문초록

암 세포의 유전적 불안정에 의해 투여된 항암제에 내성을 가진 암 세포의 발현은 항암제에 의한 암 치료의 효과를 한정 짓는 요소이어서 이를 극복하고자 하는 노력으로 최근 종양내의 신 혈관 형성 억제에 많은 연구가 집중되고 있다. 항암제에 의한 신 혈관 형성 억제 효과가 항암제 치료의 궁극적인 목표인 생존율 증가에 큰 역할을 할 수 있으리라는 예측을 불러일으키고 있는데 항암제에 의한 신 혈관 형성 저해가 항암제 내성을 지닌 종양 세포의 복원 시 종양내의 신 혈관 형성과 직접 관련이 있어 종양 내의 혈관 내피세포 사멸에 신 혈관 형성 억제제와 함께 상호 보완적으로 작용하고 신 혈관 내피 세포 사멸이 암 세포 사멸 전에 이루어짐을 구명하게 되었다.

이에 본 연구자는 우리나라 부인암의 수위를 점하고 있는 유방암, 자궁경부암, 그리고 치사율이 제일 높은 난소암 세포주에 가장 보편적이면서도 치료 성적이 양호한 cisplatin과 paclitaxel, 그리고 최근 다시 각광 받기 시작한 면역 조정제이며 항 신 혈관 형성 제제로 간주되고 있는 thalidomide를 연구 재료로 하여 투여 농도 별로 각 대상 세포주의 성장 억제를 MTT dye staining에 근거한 formazen 형성 방법으로 조사하였고 flowcytometry에 의한 세포 고사율을 파악하여 RT-PCR에 의한 신 혈관 형성 관련 유전자 VEGF, bFGF 및 TSP-1의 발현 변이에 미치는 영향을 비교 분석한 바, 다음과 같은 결과를 얻었다.

cisplatin 0, 30, 50, 100 uM 씩 처리한 세포성장 억제 및 사멸율은 난소암 세포주 A2780에서는 각각 0.00, 21.07, 39.19, 62.45%: 9.5, 13.65, 13.25, 25.8%를, cisplatin 내성주인 A2780 CDDP에서는 0.00, 14.23, 24.85, 43.48%: 14.25, 17.22, 22.76, 39.91%의 결과를 보였다. 유방암 세포주 MCF-7에서는 0.00, 3.26, 8.54, 29.11%: 24.84, 27.56, 29.47, 56.07%를, 자궁경부 편평 상피암 세포주 SiHa에서는 30uM에서 오히려 5.95% 성장 촉진을 보였으나 50 uM에서는 0.77%, 100uM에서 27.00% 억제율을 보였고, 세포 사멸은 일관되게 30uM시 일시적 세포성장에도 불구하고 13.47%의 사멸을 보였으며 농도 증가에 따라 14.81, 그리고 28.82%의 사멸정도를 보였다. 따라서 50 uM 까지는 세포사멸의 정도가 전체 1/4을 상회하지 않아 이 이하 농도에서 항 신 혈관 효과가 발생하는 effective window로 기대하였다.

Paclitaxel 0.00, 0.02, 0.05, 0.1 uM 별 세포 성장 억제율은 A2780인 경우, 0.00, 16.92, 27.68, 51.75%이었고 A2780 CDDP에서는 0.00, 28.84, 41.24, 46.46%. MCF-7에서는 0.00, 7.92, 29.23, 41.58%, SiHa에서 0.00, 37.24, 40.23, 42.57%를 보였으나, 세포 사멸은 공히 가장 최소 용량인 0.02 uM로 처리했을 때부터 거의 전체 1/3에 가까운 세포 사멸을 보여 항 신 혈관 효과를 입증하는 농도로는 부적합 하였다. Thalidomide 0, 50, 100, 200ug/ml 당 결과는 A2780에서 0.00, 15.39, 19.06, 59.06%: 5.99, 8.49, 11.23, 13.04%이었고 A2780 CDDP인 경우, 0.00, 1.97, 32.25, 50.42%: 12.16, 12.62, 12.77, 13.48% 였으며 MCF-7에서는 0.00, 9.78, 30.65, 50.27%: 27.00, 29.41, 30.37, 36.11%이었고 SiHa에서는 0.00, 9.87, 26.46, 53.45%: 6.00, 6.96, 6.34, 7.09%의 결과를 보였다.

본 연구에서 목표한 신 혈관 형성 관련 유전자 중 VEGF, bFGF는 모든 연구 대상 세포주에서 증폭된 반면 TSP-1은 cisplatin과 paclitaxel을 처리한 A2780과 A2780CDDP에서는 증폭되지 않았으며, thalidomide를 처리한 A2780 에서도 증폭되지 않았고 TSP-2 유전자는 모든 세포주에서 전혀 증폭되지 않았다. VEGF 및 bFGF에 영향을 미쳐 혈관신생억제제효과가 있는 것으로 알려진 paclitaxel처리 후에도 처리용량 증가에 따른 유전자 발현 정도의 변화를 관찰할 수 없었으며, bFGF의 발현차에 따른 cisplatin의 세포 독성도의 변화도 관찰되지 않았다.

따라서 세포 독성제에 의한 신 혈관 형성 관련 유전자 변이에 따른 암 세포 고사율에 대한 연구에서는 base pair의 차이 폭이 크지 않은 유전자 증폭에 목표를 두지 말고 세포주들에 대한 신 혈관 형성 관련 인자들에 대한 vector related transfection등의 조치와 함께 cisplatin과 thalidomide의 신 혈관 형성 억제 효과 파악 연구에는 종양 세포내의 직접적인 신 혈관 형성 관련 유전자가 아닌 종양 세포의 paracrine effect를 파악할 수 있는 생체내 실험 조건을 조성하여 이에 의해 산출되는 cytokines에 대한 연구가 필요한 것으로 사료되었다.

중심단어 : 혈관신생, 종양억제제, 부인암