

SYNERGISTIC EFFECTS OF SORAFENIB AND CELECOXIB INHIBIT GROWTH AND VEGF EXPRESSION IN HEC-1A ENDOMETRIAL CANCER CELL LINE

Jeong Sig Kim, MD¹, Bo Ra Park, MD¹, Gye Hyun Nam, MD², Dong Han Bae, MD³

Department of Obstetrics and Gynecology, ¹Soonchunhyang Seoul Hospital, Soonchunhyang University College of Medicine, Seoul; ²Soonchunhyang Bucheon Hospital, Soonchunhyang University College of Medicine, Bucheon; ³Soonchunhyang Cheonan Hospital, Soonchunhyang University College of Medicine, Cheonan, Korea

Objective

The aim of this study was to investigate whether combination of sorafenib and celecoxib exhibited an anti-tumor efficacy or altered expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in Hec-1A endometrial cancer cell line.

Methods

To determine whether sorafenib or celecoxib-induced growth inhibition was determined by the (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-5-[3-carboxymethoxyphenyl]-2-[4-sulfophenyl]-2H-tetrazolium, inner salt) assay. Expression of VEGF and p53 were evaluated using the reverse transcription polymerase chain reaction.

Results

Combination of sorafenib 10 ng/mL and celecoxib 50 μ mol/L exhibited synergistic inhibitory effects compared to treatment with each agent alone ($P < 0.0001$). VEGF expression was also down regulated after 24 hours or 72 hours of treatment with sorafenib alone or in combination with sorafenib and celecoxib in Hec-1A cells. However, there was no alteration of p53 expression in Hec-1A cells after 24 hours or 72 hours of treatment with sorafenib alone or in combination with sorafenib and celecoxib.

Conclusion

Combination treatment of sorafenib and celecoxib to Hec-1A endometrial cancer cell line revealed the ability to inhibit growth and expression of VEGF.

Keywords: Endometrial cancer; Sorafenib; Celecoxib; Vascular endothelial growth factor

자궁내막암은 국내의 경우 부인암 등록 사업을 시작한 1991년에 비해 2004년도에는 6배 이상으로 꾸준히 증가하였으며 자궁경부암, 난소암 및 자궁체부암 등의 부인과 암들 중에서 가장 현저한 증가 추세를 보이고 있다[1]. 미국의 경우 유방암, 폐암, 피부암에 이어서 4위를 차지하고 여성생식기에서 발생하는 암 중 가장 많이 발생하는 질환이며[2], 국내에서도 평균 수명 연장으로 인한 노인인구의 증가, 호르몬 보충요법 등으로 인해 다른 부인암들보다 더욱 급속히 증가하고 있다[3]. 우리나라의 경우 International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) 병기별로 병기 I, II가 73.6%이며 III, IV가 26.4%로 대부분 초기에 발견되고 있으며[1], 주로 폐경 이후에 발생하는 질환이지만 폐경기 이전의 젊은 여성에서도 발생 빈도가 점점 증가하고 있다[4]. 이러한 자궁내막암의 예후인자들로는 암의 병기가 가장 중요한 예후인자이며, 환자의 나이, 세포 형태와 조직학적 분화도, 자궁근층 침범, 림프혈관 침윤성, 종양의 크기, 호르몬 수용체 유무, 유전적 및 분

자적 종양표지자 등이 보고되어 있다[5-7]. 최근에는 괄목할만한 발전을 보이고 있는 분자생물학의 발달로 인하여 생물학적 예후인자에 대

Received: 2012.8.9. Revised: 2012.9.18. Accepted: 2012.9.18.

Corresponding author: Jeong Sig Kim, MD

Department of Obstetrics and Gynecology, Soonchunhyang Seoul Hospital, Soonchunhyang University College of Medicine, 59

Daesagwan-ro, Yongsan-gu, Seoul 140-743, Korea

Tel: +82-2-709-9337 Fax: +82-2-709-9332

E-mail: jskim@schmc.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.

Copyright © 2012. Korean Society of Obstetrics and Gynecology

한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 인체 종양에서 가장 흔한 변성을 보이고 암 발생과의 연관성이 밝혀진 p53 종양억제 유전자와 vascular endothelial growth factor (VEGF)가 최근에 표적치료제로 사용되는 약제들에 대하여 특히, 자궁내막암 세포주에서 어떤 변화가 있는지는 많이 보고되어 있지 않다. 본 연구에서는 VEGF를 표적으로 하는 약제들 중 VEG receptor 2 (VEGFR-2)와 VEGF receptor 3 (VEGFR-3) 등을 억제하는 것으로 알려진 sorafenib을 선택하였고 또한, 혈관신생과 연관되어 VEGF 발현을 증가시킨다고 알려진 cyclooxygenase-2 (Cox-2)에 대한 억제제로 celecoxib를 실험에 사용하였다. 위 두 가지 약제들을 자궁내막암 세포주인 Hec-1A에 단독 또는 병용 투여 시 이들 약제가 세포주에 어떠한 영향을 주며, 이들 약제에 의한 VEGF와 p53의 발현 양상을 연구하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 자궁내막암 세포주와 배양

인간 자궁내막 선암 세포주인 Hec-1A는 분화도가 2이고 에스트로겐 수용체 양성인 자궁내막 선암에서 유래된 세포주(ATCC, HTB-112)로 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 배양액은 10% 우태 혈청(fetal bovine serum)이 함유된 McCoy's 5a Medium 혼합액에 스트렙토마이신을 첨가하여 사용하였고, 이들 세포를 75 cm² 조직배양 플라스크에 배양하여 37°C, 5% CO₂ incubator (Thermo, Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)에서 배양하였다. 배양액은 2-3일마다 교환하였다.

2. 약제

Hec-1A에 대한 sorafenib (Nexavar, Bayer, Leverkusen, Germany)과 celecoxib (Celebrex, Pfizer, New York, NY, USA)의 세포증식억제 현상을 살펴보기 위하여 sorafenib을 5 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, 50 ng/mL의 농도로 처리하였으며, celecoxib는 20 μmol/L, 40 μmol/L, 60 μmol/L, 80 μmol/L, 100 μmol/L의 농도로 처리하였다. 각각에 대해 24시간 동안 배양한 후 (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-5-[3-carboxymethoxyphenyl]-2-[4-sulfophenyl]-2H-tetrazolium, inner salt) (MTS) assay를 이용하여 세포생존율을 측정하였다. 또한 sorafenib과 celecoxib를 병용처리 하였을 때의 세포생존율도 측정하였다.

3. 세포생존율 측정

Hec-1A 세포주에 대한 sorafenib과 celecoxib의 처치 농도와 시간에 따른 세포 증식의 변화를 MTS assay (CellTiter96 Aqueous, Promega, Madison, WI, USA)로 측정하였다. 지수증식에 있는 자궁내막암 세포들을 각각 분리 수확한 후, 배양액 1 mL당 3×10⁴이 되도록 세포의 농도를 조정하고 96-well tissue culture plate (Costar, Cambridge, MA, USA)에 well당 100 μL씩 각각 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 여기에 5 ng/mL, 10 ng/mL, 20

ng/mL, 50 ng/mL의 농도로 sorafenib을 처리하였고, celecoxib는 20 μmol/L, 40 μmol/L, 60 μmol/L, 80 μmol/L, 100 μmol/L의 농도로 각각 처리하였다. 또한, sorafenib 10 ng/mL로 단독 처리한 세포들과 sorafenib 10 ng/mL와 celecoxib 50 μmol/L를 병용 처리한 세포들을 24시간 배양하였다. 대조군으로는 배양액만을 첨가하였다. MTS용액 (MTS, 5-diphenyltetrazoliumbromide) 20 μL를 첨가하고 37°C에서 4시간 동안 반응시키면 살아있는 암세포는 미토콘드리아의 탈수소 효소 작용에 의하여 노란색 수용성 tetrazolium salt를 자주색을 띠는 비수용성의 formazan salt로 환원시키므로 용액이 자주색으로 바뀐다. 이후, ELISA plate reader (VERSA max, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 판독한 실험군의 흡광도를 대조군의 흡광도와 비교하여 세포들의 생존도를 산출하였다. 세포 활성은 대조군에 대한 실험군의 흡광도를 비율로 환산하여 평가하였으며, Triple 웰을 한 실험군으로 3회 반복 실험을 실시하여 평균값(표준편차)으로 표시하였다.

4. mRNA 분리 및 역전사-중합효소연쇄반응

총 RNA는 TRI REAGENT (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH, USA)와 chloroform을 사용하여 추출하였다. 혼입된 DNA를 제거하기 위해 37°C에서 15분간 1 μL의 RNase-free DNase I (10,000 U/mL, Stratagene, La Jolla, CA, USA)을 첨가하고 37°C 수조에서 15분간 반응시켰다. DNase I 처리된 RNA는 분광광도계를 이용하여 순도 및 양을 측정하였다. cDNA 합성을 위해 2 μg의 RNA와 1 μL의 oligo dT (0.5 μg/mL)와 1 μL의 2.5 mM dNTP를 혼합하여 65°C에서 5분간 열처리 후 바로 42°C에 냉각시켰다. Spin down 후 5X buffer, 0.1 mM DTT, RNase inhibitor (40 U/μL)를 첨가하고 42°C에서 2분간 전 처리한 후 1 μL의 SuperScript II (200 U/μL, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 42°C에서 50분간 처리한다. 효소의 활성을 정지시키기 위해 70°C에서 15분간 처리하였다.

cDNA와 각각의 human VEGF, human p53 primer, PCR premix Taq polymerase 1 U, dNTPs 0.25 mM, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 40 mM, Tris-HCl (pH 9.0) 10 mM, Glycerol 10% (Genotech, Daejeon, Korea)를 섞어 iCycler thermalcycler (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)로 역전사-중합효소연쇄반응을 하였다. 양성 대조군으로 β-actin을 이용하였다. VEGF, p53, β-actin 모두 35회 증폭(95°C 1분, 50°C 1분, 72°C 1분), (95°C 1분, 57°C 1분, 72°C 1분), (95°C 1분, 55°C 1분, 72°C 1분)하였다.

VEGF (233 bp) forward 5'-GCACCCATGGCAGAAGG-3'
reverse 5'-CTCGATTGGATGGCAGTAGCT-3'
p53 (122 bp) forward 5'-GTTCCGAGAGCTGAATGAGG-3'
reverse 5'-TTATGGCGGGAGGTAGACTG-3'
β-actin (233 bp) forward 5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3'
reverse 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'

역전사-중합효소연쇄반응을 통하여 얻어진 산물을 1% agarose gel 에 전기영동하고 mRNA발현 정도는 밀도계측기(densitometry)를 이용

하여 반정량적으로 분석하였다. β -actin은 각 역전사-중합효소연쇄반응의 산물인 cDNA의 실질적 양에 대한 지시자로 사용하였다.

5. 통계학적 분석

모든 자료수치는 세 번 이상의 실험에서 평균(표준편차)으로 표시되었다. 통계분석에는 SAS ver. 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 사용하였으며, one-way analysis of variance와 각 군 간 다중비교를 위하여 Duncan's multiple-range test를 시행하였고, 유의성은 $P < 0.05$ 로 하였다.

결과

1. 자궁내막암 세포주에서 세포생존율검사

1) Sorafenib에 의한 세포생존율

Sorafenib을 약품처리하지 않은 대조군, 5 ng/mL (Sora 5), 10 ng/mL (Sora 10), 20 ng/mL (Sora 20), 50 ng/mL (Sora 50)으로

처리한 군에서 생존율(흡광도, 평균±표준편차)은 각각 1.07 ± 0.29 , 0.75 ± 0.31 , 0.57 ± 0.21 , 0.40 ± 0.14 , 0.21 ± 0.08 로 측정되었다(Fig. 1A). Hec-1A cell에 대한 Sorafenib의 $IC_{50} = 10$ ng/mL이었다. 각 세포주에 sorafenib의 농도를 달리하여 투여하였을 때, 각 군들 간 평균치 차이가 통계적으로 유의하였으며, 어느 농도에서 차이가 나는지 평가하기 위하여 농도별 다중비교를 실시한 결과, 모든 농도군이 별개의 그룹으로 분류됨으로써 모든 농도군에서 대조군보다 통계적으로 유의하게 세포증식을 억제한다고 평가하였다.

2) Celecoxib에 의한 세포생존율

Celecoxib를 대조군, 20 μ mol/L, 40 μ mol/L, 60 μ mol/L, 80 μ mol/L, 100 μ mol/L로 처리한 군들 사이에서 생존율(흡광도, 평균±표준편차)이 각각 0.87 ± 0.17 , 0.86 ± 0.21 , 0.77 ± 0.21 , 0.63 ± 0.15 , 0.46 ± 0.09 , 0.33 ± 0.04 로 나타났다. Hec-1A cell에 대한 Celecoxib의 $IC_{50} = 80$ μ mol/L이었다(Fig. 1B). 각 세포주에 celecoxib 농도를 다르게 하여 투여 시, 각 군들 간에 평균치 차이가 통계적으로 유의하였으며, 어느 농도에서 차이가 나는지에 대한 평가를 위해 농도별 다중비교

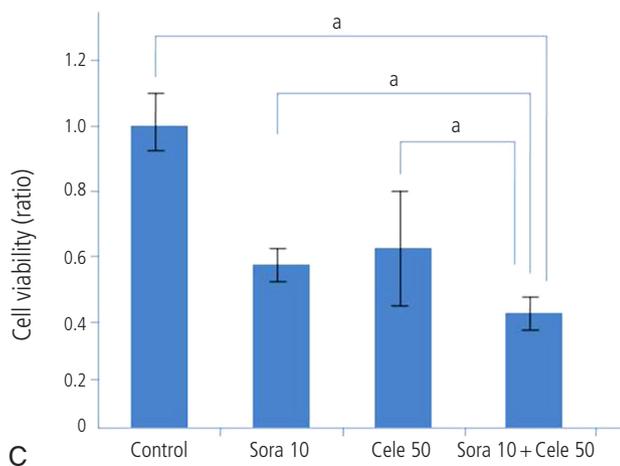
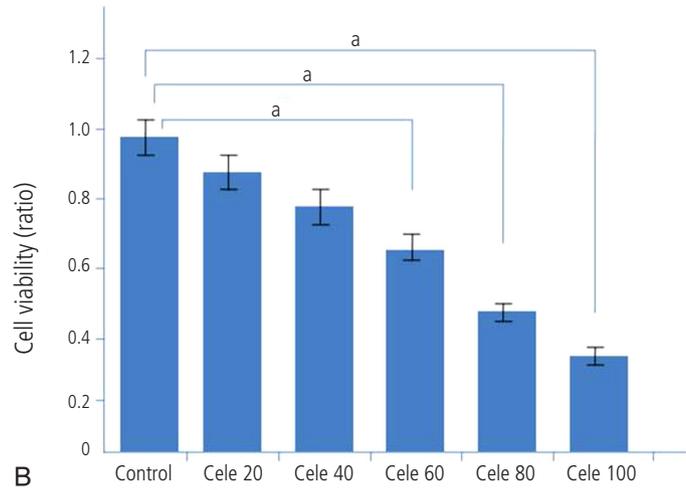
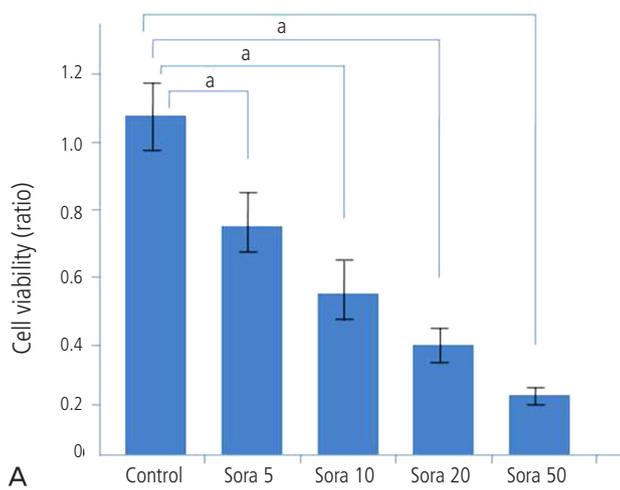


Fig. 1. (A) Viability of Hec-1A cells treated with 5 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, and 50 ng/mL of sorafenib after 24 hours of treatment. Cell growth was inhibited by sorafenib treatment in a concentration-dependent manner. Significant differences are indicated by ($^aP < 0.0001$ vs. control condition). (B) Viability of Hec-1A cells treated with celecoxib in rising concentrations between 20 μ mol/L and 100 μ mol/L after 24 hours of treatment. Significant differences are indicated by ($^aP < 0.0001$ vs. nontreated control). (C) Viability of Hec-1A cells treated with sorafenib 10 ng/mL, celecoxib 50 μ mol/L or in combination with sorafenib 10 ng/mL and celecoxib 50 μ mol/L. $^aP < 0.0001$ when compared with cells under 'sorafenib 10 + celecoxib 50' conditions.

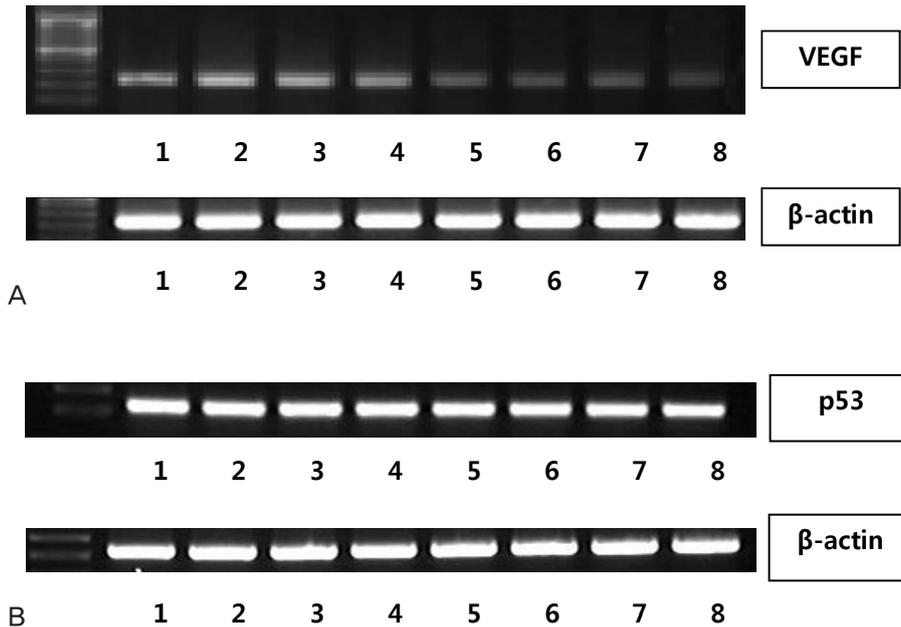


Fig. 2. (A) Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in Hec-1A cells after 24 hours or 72 hours of treatment with sorafenib alone or in combination with sorafenib and celecoxib. Endometrial cancer cell line was treated with sorafenib and/or celecoxib for indicated concentrations. β -actin was used as a control for protein loading. (B) Expression of p53 in Hec-1A cells after 24 hours or 72 hours of treatment with sorafenib alone or in combination with sorafenib and celecoxib. Endometrial cancer cell line was treated with sorafenib and/or celecoxib for indicated concentrations. β -actin represents the loading control. 24 hours: 1, control; 2, sorafenib 10 ng/mL; 3, sorafenib 10 ng/mL + celecoxib 100 μ mol/L; 4, sorafenib 100 ng/mL + celecoxib 100 μ mol/L; 72 hours: 5, control; 6, sorafenib 10 ng/mL; 7, sorafenib 10 ng/mL + celecoxib 100 μ mol/L; 8, sorafenib 100 ng/mL + celecoxib 100 μ mol/L.

를 실시한 결과, 대조군과 celecoxib 20 μ mol/L (Cele 20)군이 같은 그룹으로서, 대조군과 Cele 20군은 차이가 없는 것으로 분류되었고, 또한 Cele 20군과 celecoxib 40 μ mol/L (Cele 40)군 또한 차이가 없는 것으로 분류되었으며, celecoxib 50 μ mol/L (Cele 50)의 농도에서도 세포 증식을 의미 있게 억제하지 않았지만(data not shown), celecoxib 60 μ mol/L (Cele 60), 80 μ mol/L (Cele 80), 100 μ mol/L (Cele 100)군들은 모두 별개의 군으로 분류됨으로써 Cele 60군부터 통계적으로 유의하게 차이가 났다($P < 0.0001$).

3) Sorafenib과 celecoxib의 병용 처리에 의한 세포생존율

Hec-1A cell에서 sorafenib을 단독 처리하였을 때와 sorafenib과 celecoxib를 병용 처리하였을 때 세포주의 생존에 미치는 영향을 비교하였다.

Sorafenib을 5 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, 50 ng/mL로 처리하였을 때 모든 농도에서 의미 있는 세포증식 억제를 보이므로 sorafenib의 IC_{50} 인 10 ng/mL을 선택하였고, celecoxib 농도는 50 μ mol/L의 농도 이하에서는 세포증식 억제의 차이를 보이지 않으므로 이를 기준으로 하여, sorafenib 10 ng/mL으로 처리 시 celecoxib 50 μ mol/L을 병용하면 서로의 상승 효과(synergistic effect)를 나타내는지 실험을 하였다. 대조군의 생존율(흡광도, 평균 \pm 표준편차)을 기준으로 하여, sorafenib 10 ng/mL와 celecoxib 50 μ mol/L을 단독으로 처리한 군에서의 생존율은 각각 0.67 ± 0.19 , 0.71 ± 0.32 로 나타났고, sorafenib 10 ng/mL와 celecoxib 50 μ mol/L를 병용 처리한 군에서는 생존율이 0.51 ± 0.15 로 나타났다. 두 약물을 혼합하여 처리한 연구에서, 각각의 다른 군들과의 평균치 차이가 통계적으로 유의하였다($P < 0.0001$). 즉, sorafenib 또는 celecoxib를 각각 단독으로 처리한 군과 비교 시 sorafenib과

celecoxib를 병용처리한 군에서 통계적으로 유의하게 세포 증식을 억제하며 celecoxib로 인해 sorafenib의 상승 효과가 있음을 보여주고 있다(Fig. 1C).

2. 역전사-중합효소연쇄반응을 이용한 VEGF의 발현 양상

혈관신생과 관련된 VEGF의 발현은 24시간 동안 세포주를 배양한 후 sorafenib 10 ng/mL으로 단독 처리하였을 때보다 celecoxib를 병합하여 처리하였을 때에 발현감소가 현저하였다. 72시간 배양 후에 이들 약제들을 같은 방법으로 처리하였을 때에도 sorafenib 단독 처리보다는 celecoxib를 병합하여 처리하였을 때 VEGF의 발현이 더 의미 있게 감소하였다(Fig. 2A).

3. 역전사-중합효소연쇄반응을 이용한 p53의 발현 양상

자궁내막암 세포주인 Hec-1A에서 p53은 sorafenib이나 celecoxib를 각각 또는 병합처리하며 시간과 농도를 다르게 하여도 발현의 차이는 보이지 않았다(Fig. 2B).

고 찰

종양이 성장과 전이를 하기 위해서는 신생혈관 형성이 필수 과정이다[8,9]. 종양의 성장에서 종양이 직경 1 mm 이상의 크기로 자라려면 주위의 기존 모세혈관에서 새로운 모세혈관이 생겨나야 한다[10]. 신생혈관 형성은 증식하는 종양에 영양분과 산소를 공급해 줄 뿐만 아니라 원발병소로부터 혈관벽을 통한 종양 세포의 관통과 원격 장기로의 전이를 가능하게 한다. 그러므로 종양의 성장과 전이에는 혈관신생

이 반드시 필요하며, 혈관신생을 억제하면 종양의 성장을 둔화시킬 수 있을 것이다. 이러한 혈관신생은 종양세포, 종양 주변부위 환경에 있는 대식세포, 혹은 다른 내재된 세포에서 분비되는 혈관형성 촉진인자의 분비나 혈관형성 억제인자의 소실에 의해 유도되는데, 촉진 인자로는 VEGF, 섬유아세포 성장인자(basic fibroblast growth factor), 표피 성장인자(epithelial growth factor), interleukin-8, transforming growth factor- β 등이 있고, 억제 인자로는 thrombospondin-1, angiostatin, endostatin 등이 있다[11-14]. 이들 중에서도 VEGF는 신생혈관 형성에 가장 강력한 촉진인자이며[12], 혈관 증식, 투과성 및 기능을 조절하는 proangiogenic growth factor로 신생혈관의 사멸에 보호적인 요소이고[15], 또한, 방사선이나 세포독성제에 의한 암 세포 사멸을 방어하여 암세포의 회생 효과가 있다고 보고되었다[16]. VEGF는 여러 종류의 종양세포에서 발현되며, 신장이나 방광, 위, 식도, 대장 등 여러 장기의 악성 종양에서 VEGF mRNA의 발현이 종양의 예후와도 관련이 있다고 하였다[17-20].

Sorafenib (BAY 43-90006, Nexavar)은 경구치료제로서 multi-kinase inhibitor이며, 특히 Raf kinase와 VEGFR-2, VEGFR-3, platelet derived growth factor receptor (PDGFR), c-Kit, Flt3 등을 억제한다. 신세포암에 대한 치료로 Food and Drug Administration의 승인을 받았으며, 세포 증식과 혈관 생성을 억제하는 역할을 하므로 여러 항암제들과 병용 투여하여 치료 효과가 있는가에 대한 활발한 연구가 진행 중에 있다. VEGFR-2에 의한 혈관내막세포의 VEGF의 활성화는 혈관신생에서 매우 중요하다. VEGF의 활성화는 혈관내막 세포의 신호전달을 유도하여 혈관내막 세포의 증식, 이동, 생존을 조절한다. 이러한 과정에 관여하는 두 가지 중요한 전달과정에는 PI3K-AKT와 Raf-MEK-ERK pathway가 있으며[21,22], 혈관신생에는 이들 두 가지의 전달과정이 반드시 필요하다. 그러므로, sorafenib은 VEGFR-2와 Raf를 억제하는 역할을 하므로 sorafenib을 투여 시 혈관신생을 억제하리라 기대할 수 있다. 이번 실험에서도 자궁내막암 세포주에 sorafenib 투여 후 VEGF의 발현이 의미 있게 감소하였다. 자궁내막암 환자에 대한 임상 연구는 진행 중에 있지만, 신세포암 환자에 sorafenib을 사용한 임상 연구에서는 위약군에 비해 2배의 무진행 생존율(progression-free survival)을 보였다[23]. Chen 등[24]은 자궁내막암 조직의 VEGF가 질병 진행 및 전이와도 연관성이 있어 무병생존율(disease-free survival)에 대한 독립적인 예후인자로서도 가능할 것으로 분석하였다.

Cox-2는 성장인자, cytokine, 종양촉진인자(tumor promoter) 등에 의하여 유도되어, 염증 반응 및 병적 상태에서 작용하는 prostaglandin을 합성하고, 세포자멸사가 일어나지 않도록 억제하여 종양 발생을 촉진시키며, 세포의 기질을 분해하는 효소인 matrix metalloproteinase-2를 활성화하여 종양 침윤을 증가시킨다[25]. Cox-2 유전자는 또한 세포의 성장과 분화에 관여하는 유전자로 여러 세포에서 세포자멸사 과정을 방해하고, 혈관의 생성과 관련이 있어 종양의 침윤 및 전이에도 기여할 것으로 추측된다. Cox-2의 과발현은 상피세포의 세포자멸사를 억제하며 암세포의 침투성을 증가시키기 때문에 Cox-2 억제제에 의하여 암세포의 세포자멸사를 유도할 수 있을 것으로 판단이 된다

[26]. Cox-2를 활성화시키는 자극들은 또한 종양억제유전자인 p53 발현을 증가시켜 세포주기를 정지시키고 손상된 DNA를 복구하거나 세포자멸사를 유도한다. p53 유전자에 의해서도 Cox-2의 발현이 증가하거나 감소하기도 하며, Cox-2의 과발현에 의해 p53 유전자가 억제되기도 한다[27,28]. 그러므로, p53과 Cox-2는 상호 간에 연관성은 있으나, p53 유발(induction)과 Cox-2의 과발현이 암 발생 전이나 발생 시 서로 협력하는지 아니면 상쇄하는지에 대해서는 아직도 논란이 되고 있다. 자궁내막암 세포주인 Hec-1A cell에 대해서도 Cox-2 억제제인 celecoxib 투여 후 세포증식이 억제되는 양상을 보였다. 반면에, Fig. 2C에서 보는 바와 같이 sorafenib에 celecoxib를 병합하여 처치 시 celecoxib의 농도를 증가시켜도 p53의 발현에는 변화가 없었다. 혈관신생에 대해서는 Cox-2와 관련성이 있어 Cox-2 억제제에 의해 혈관신생이 감소하며[29], Cox-2에 의한 혈관신생의 경우 증가된 cAMP를 통해 혈관신생인자인 VEGF를 발현시키고, thromboxane A_2 , PGE $_2$, PGI $_2$ 를 생성시켜 직접적으로 혈관 내피세포의 이동과 증식을 자극한다[30]. 또한, Cox-2가 Bcl-2나 Akt 유전자를 활성화시켜 혈관 내피세포의 증식을 자극한다는 연구보고도 있다[31]. Ohno 등[32]은 자궁내막암 조직에서 Cox-2 발현이 있는 예에서 발현이 없는 조직보다 세포자멸사 지수가 더 낮게 나타났고, 미세혈관 밀도 또한 Cox-2 발현이 양성인 조직에서 높게 나타났으며, Cox-2의 과발현 시 예후가 좋지 않다고 보고하였다. 부인암 영역에서 Cox-2 발현은 자궁내막 선암과 난소의 장액성 낭성 암에서 자궁경부 편평세포암보다 더 많이 나타나며[33], 높은 미세혈관 수와 VEGF 발현과도 연관이 있으나 자궁내막암의 임상예후 인자들과는 연관이 없다는 보고도 있다[34].

혈관형성인자와 혈관 형성억제인자의 분비조절 기전은 아직 분명하지 않으나 종양 유전자와 종양억제유전자가 관여한다. 종양억제유전자인 p53 유전자는 다른 유전자의 전사(transcription)에 영향을 주는 인자로 세포고사를 유도하고 암변환을 억제한다. 또한 혈관 내피 성장인자의 촉진자를 하향 조절하여 전사(transcription)를 억제하고, 신생혈관 형성을 방해하는 thrombospondin-1을 상향 조절하여 신생혈관 형성을 억제한다. 반면에 돌연변이형 p53 유전자는 p53 유전자의 혈관내피 성장인자의 억제기능을 상실한다. 그러므로 p53 유전자가 신생혈관 형성과 관계가 있으며, 특히 인체의 고형 암종에서 p53 유전자의 변이가 VEGF의 과발현과 깊은 연관성이 있다고 보고되었다[35,36]. 그러나, p53과 같은 종양관련 유전자의 변이와 혈관신생과의 관련성에 대한 최근 연구를 보면 연구자에 따라 이견이 많다. Kieser 등[37]은 p53 단백질의 변이는 VEGF의 과발현을 유도하여 혈관신생을 조절한다고 하였지만, Giatromanolaki 등[38]의 연구에 의하면 p53은 신생혈관 생성 과정에 관여하지 않는다고 하였다. 본 연구에서도 자궁내막암 세포주에 sorafenib과 celecoxib를 투여하였지만, p53의 변화는 나타나지 않았다.

본 실험 결과를 보면 자궁내막암 세포주인 Hec-1A cell이 sorafenib과 celecoxib 두 약제를 단독으로 처리한 경우에도 증식이 억제되며, 병용 처리시에는 상승효과로 인하여 세포 증식이 억제되는 반응을 보였기에 두 약제 간 적어도 부가 효과 이상의 상호작용이 있는 것으로 나

타났다. 그렇지만, 이번 연구는 체외실험이고 Hec-1A 단독 세포주에 대한 결과이기 때문에 연구 결과의 신뢰도에 문제점이 없는 것은 아니다. 특히, 생체내 혈관신생은 더욱 복잡하므로, 향후 실험결과와 신뢰성을 좀 더 확보하기 위해서는 다른 자궁내막암 세포주들이나 mouse 등을 이용한 실험 및 혈관신생과 관련된 다른 인자들에 대한 연구가 필요하다. 이러한 연구들을 통하여 자궁내막암 치료에 대한 새로운 임상 연구에 도움을 줄 수 있으리라 생각된다.

자궁내막암 세포주 Hec-1A를 대상으로 sorafenib과 celecoxib의 세포증식억제 및 VEGF의 발현 변화에 대한 연구에서 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) Sorafenib과 celecoxib 각각을 자궁내막암 세포주에 투여 시 두 약제의 농도가 증가함에 따라 세포증식이 억제되었다. Sorafenib은 5 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, 50 ng/mL의 모든 농도군에서 대조군보다 의미 있게 세포증식을 억제하였다. Celecoxib는 20 μmol/L, 40 μmol/L, 60 μmol/L, 80 μmol/L, 100 μmol/L으로 처리하였을 때 60 μmol/L 군부터 통계적으로 유의하게 차이가 났다($P < 0.0001$). 2) Sorafenib 10 ng/mL에 celecoxib 50 μmol/L를 병용 처리한 군에서는 sorafenib 단독으로 처리하였을 때보다 celecoxib로 인한 상승효과로 세포증식이 통계적으로 의미 있게 억제되었다($P < 0.0001$). 3) 혈관신생과 관련된 VEGF는 sorafenib 10 ng/mL과 celecoxib 100 μmol/L 각각의 약제를 처리한 경우보다 병합하여 처리한 군에서 또한 발현이 더 감소하였다. 그러나, p53의 경우 약제들을 각각 처리한 경우 및 병합처리한 경우 모두에서 발현의 차이는 없었다.

References

1. SOG Gynecologic Oncology Committee, Korean Society of Obstetrics and Gynecology. Annual report of gynecologic cancer registry program in Korea for 2004 (Jan. 1st, 2004-Dec. 31st, 2004). Korean J Obstet Gynecol 2007;50:28-78.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. CA Cancer J Clin 2009;59:225-49.
3. Kim JW, Kim SH, Kim YT, Kim DK. Clinicopathologic and biological parameters predicting the prognosis in endometrial cancer. Yonsei Med J 2002;43:769-78.
4. Lee SE, Kim JW, Park NH, Song YS, Kang SB, Lee HP. Contemporary trends of endometrial cancer in Korean women. Korean J Gynecol Oncol 2005;16:215-20.
5. Cohn DE, Horowitz NS, Mutch DG, Kim SM, Manolitsas T, Fowler JM. Should the presence of lymphovascular space involvement be used to assign patients to adjuvant therapy following hysterectomy for unstaged endometrial cancer? Gynecol Oncol 2002;87:243-6.
6. Morrow CP, Bundy BN, Kurman RJ, Creasman WT, Heller P,

- Homesley HD, et al. Relationship between surgical-pathological risk factors and outcome in clinical stage I and II carcinoma of the endometrium: a Gynecologic Oncology Group study. Gynecol Oncol 1991;40:55-65.
7. Mariani A, Webb MJ, Keeney GL, Aletti G, Podratz KC. Endometrial cancer: predictors of peritoneal failure. Gynecol Oncol 2003;89:236-42.
8. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J Natl Cancer Inst 1990;82:4-6.
9. Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. Semin Cancer Biol 1992;3:65-71.
10. Folkman J. Tumor angiogenesis. Adv Cancer Res 1985;43:175-203.
11. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. Science 1987;235:442-7.
12. Maeda K, Kang SM, Ogawa M, Onoda N, Sawada T, Nakata B, et al. Combined analysis of vascular endothelial growth factor and platelet-derived endothelial cell growth factor expression in gastric carcinoma. Int J Cancer 1997;74:545-50.
13. Malden LT, Novak U, Burgess AW. Expression of transforming growth factor alpha messenger RNA in the normal and neoplastic gastro-intestinal tract. Int J Cancer 1989;43:380-4.
14. Chung CK, Antoniades HN. Expression of c-sis/platelet-derived growth factor B, insulin-like growth factor I, and transforming growth factor alpha messenger RNAs and their respective receptor messenger RNAs in primary human gastric carcinomas: in vivo studies with in situ hybridization and immunocytochemistry. Cancer Res 1992;52:3453-9.
15. Rosen LS. Clinical experience with angiogenesis signaling inhibitors: focus on vascular endothelial growth factor (VEGF) blockers. Cancer Control 2002;9:36-44.
16. Harmey JH, Bouchier-Hayes D. Vascular endothelial growth factor (VEGF), a survival factor for tumour cells: implications for anti-angiogenic therapy. Bioessays 2002;24:280-3.
17. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Dvorak HF, et al. Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. Am J Pathol 1993;143:1255-62.
18. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. Cancer Res 1995;55:3964-8.
19. Inoue K, Ozeki Y, Sukanuma T, Sugiura Y, Tanaka S. Vascular endothelial growth factor expression in primary esophageal

- squamous cell carcinoma. Association with angiogenesis and tumor progression. *Cancer* 1997;79:206-13.
20. Maeda K, Chung YS, Ogawa Y, Takatsuka S, Kang SM, Ogawa M, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 1996;77:858-63.
 21. Thakker GD, Hajjar DP, Muller WA, Rosengart TK. The role of phosphatidylinositol 3-kinase in vascular endothelial growth factor signaling. *J Biol Chem* 1999;274:10002-7.
 22. Gupta K, Kshirsagar S, Li W, Gui L, Ramakrishnan S, Gupta P, et al. VEGF prevents apoptosis of human microvascular endothelial cells via opposing effects on MAPK/ERK and SAPK/JNK signaling. *Exp Cell Res* 1999;247:495-504.
 23. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007;356:125-34.
 24. Chen CA, Cheng WF, Lee CN, Wei LH, Chu JS, Hsieh FJ, et al. Cytosol vascular endothelial growth factor in endometrial carcinoma: correlation with disease-free survival. *Gynecol Oncol* 2001;80:207-12.
 25. Liu XH, Yao S, Kirschenbaum A, Levine AC. NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells. *Cancer Res* 1998;58:4245-9.
 26. Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 1995;83:493-501.
 27. Corcoran CA, He Q, Huang Y, Sheikh MS. Cyclooxygenase-2 interacts with p53 and interferes with p53-dependent transcription and apoptosis. *Oncogene* 2005;24:1634-40.
 28. Choi EM, Heo JI, Oh JY, Kim YM, Ha KS, Kim JI, et al. COX-2 regulates p53 activity and inhibits DNA damage-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;328:1107-12.
 29. Williams CS, Tsujii M, Reese J, Dey SK, DuBois RN. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Invest* 2000;105:1589-94.
 30. Cao Y, Prescott SM. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *J Cell Physiol* 2002;190:279-86.
 31. Gately S. The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 2000;19:19-27.
 32. Ohno S, Ohno Y, Suzuki N, Soma G, Inoue M. Cyclooxygenase-2 expression correlates with apoptosis and angiogenesis in endometrial cancer tissue. *Anticancer Res* 2007;27:3765-70.
 33. Landen CN Jr, Mathur SP, Richardson MS, Creasman WT. Expression of cyclooxygenase-2 in cervical, endometrial, and ovarian malignancies. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:1174-6.
 34. Fujiwaki R, Iida K, Kanasaki H, Ozaki T, Hata K, Miyazaki K. Cyclooxygenase-2 expression in endometrial cancer: correlation with microvessel count and expression of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase. *Hum Pathol* 2002;33:213-9.
 35. Maeda K, Kang SM, Onoda N, Ogawa M, Sawada T, Nakata B, et al. Expression of p53 and vascular endothelial growth factor associated with tumor angiogenesis and prognosis in gastric cancer. *Oncology* 1998;55:594-9.
 36. Fontanini G, Boldrini L, Vignati S, Chinè S, Basolo F, Silvestri V, et al. Bcl2 and p53 regulate vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis in non-small cell lung carcinoma. *Eur J Cancer* 1998;34:718-23.
 37. Kieser A, Weich HA, Brandner G, Marmé D, Kolch W. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* 1994;9:963-9.
 38. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Kakolyris S, Turley H, O'Byrne K, Scott PA, et al. Vascular endothelial growth factor, wild-type p53, and angiogenesis in early operable non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 1998;4:3017-24.

자궁내막암 세포주 Hec-1A에서 sorafenib과 celecoxib에 의한 세포증식억제와 혈관내피성장인자의 발현 변화

순천향대학교 의과대학 ¹서울병원, ²부천병원, ³천안병원 산부인과학교실
김정식¹, 박보라¹, 남계현², 배동한³

목적

자궁내막암 세포주 Hec-1A에서 sorafenib과 celecoxib에 의한 세포증식억제 및 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)의 발현 변화에 대해 연구하고자 하였다.

연구방법

Hec-1A 세포주에 대한 sorafenib과 celecoxib의 처치 농도와 시간에 따른 세포증식억제 작용을 (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-5-[3-carboxymethoxyphenyl]-2-[4-sulfophenyl]-2H-tetrazolium, inner salt) assay로 측정하였으며, 또한 위 약제들을 단독 또는 병합투여 시 VEGF, p53의 변화를 역전사-중합효소연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction)으로 측정하였다.

결과

Sorafenib과 celecoxib 각각을 자궁내막암 세포주인 Hec-1A에 처치 시, sorafenib의 농도를 5 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, 50 ng/mL로 증가시킬수록 모든 농도에서 의미 있게 점차적으로 세포들의 증식이 억제되었으며, celecoxib는 60 μ mol/L의 농도에서부터 통계적으로 유의하게 차이가 났다. Sorafenib 10 ng/mL을 단독 처리하였을 때보다 celecoxib를 병합처리하였을 때 약제 간 상승 작용으로 세포증식억제의 차이가 통계적으로 의미 있게 나타났다($P < 0.0001$). 혈관신생과 관련된 VEGF는 sorafenib과 celecoxib 두 가지 약제를 동시에 병합 시 sorafenib 단독 처리보다 발현감소가 의미 있게 나타났다. 그러나 p53의 경우 sorafenib이나 celecoxib를 각각 또는 병합처리하며 시간과 농도를 다르게 하여도 약제들에 따른 발현의 변화는 나타나지 않았다.

결론

본 연구결과로 sorafenib과 celecoxib의 병합처치에 의해 Hec-1A자궁내막암 세포주의 증식과 VEGF의 발현이 억제되므로, 자궁내막암의 기존 치료요법에 위 약제들이 보조적인 역할을 할 수 있으리라 생각된다.

중심단어: 자궁내막암 세포주, Sorafenib, Celecoxib, 혈관내피성장인자