

□ 원 저 □

TNF에 대한 내성획득에서 MnSOD의 역할에 관한 연구

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 의학연구원 폐연구소

이혁표*, 유철규, 김영환, 한성구, 심영수

= Abstract =

The Role of MnSOD in the Mechanisms of Acquired Resistance to TNF

Hyuk Pyo Lee, M.D.*, Chul Gyu Yoo, M.D., Young Whan Kim, M.D.,
Sung Koo Han, M.D., Young-Soo Shim, M.D.

*Department of Internal Medicine, College of Medicine and Lung Institute,
Medical Research Center, Seoul National University, Seoul, Korea*

Background : Tumor necrosis factor(TNF) has been considered as an important candidate for cancer gene therapy based on its potent anti-tumor activity. However, since the efficiency of current techniques of gene transfer is not satisfactory, the majority of current protocols is aiming the in vitro gene transfer to cancer cells and re-introducing genetically modified cancer cells to host. In the previous study, it was shown that TNF-sensitive cancer cells transfected with TNF- α cDNA would become highly resistant to TNF, and the probability was shown that the acquired resistance to TNF might be associated with synthesis of some protective protein. Understanding the mechanisms of TNF-resistance in TNF- α cDNA transfected cancer cells would be an important step for improving the efficacy of cancer gene therapy as well as for better understandings of tumor biology. This study was designed to evaluate the role of MnSOD, an antioxidant enzyme, in the acquired resistance to TNF of TNF- α cDNA transfected cancer cells.

Method : We transfected TNF- α c-DNA to WEHI164(murine fibrosarcoma cell line), NCI-H2058(human mesothelioma cell line), A549(human non-small cell lung cancer cell line), ME180(human cervix cancer cell line) cells using retroviral vector(pLT12SN(TNF)) and confirm the expression of TNF with PCR, ELISA, MTT assay. Then we determined the TNF resistance of TNF- α cDNA transfected cells(WEHI164-TNF, NCI-H2058-TNF, A549-TNF, ME180-TNF) and the changes of MnSOD mRNA expressions with Northern blot analysis.

“이 논문은 1994년도 서울대학교병원 지정연구비(02-94-13)의 지원에 의해 이루어진 것임”

*현재는 인제대학교 의과대학 내과학교실 근무

Results : The MnSOD mRNA expressions of parental cells and genetically modified cells of WEHI164 and ME180 cells(both are naturally TNF sensitive) were not significantly different. The MnSOD mRNA expressions of genetically modified cells of NCI-H2058 and A549(both are naturally TNF resistant) were higher than those of the parental cells, while those of parental cells with exogenous TNF were also elevated.

Conclusion : The acquired resistance to TNF after TNF- α cDNA transfection may not be associated with the change in the MnSOD expression, but the difference in natural TNF sensitivity of each cell may be associated with the level of the MnSOD expression.

Key words : Tumor necrosis factor(TNF), Gene transfection, Resistance, Mechanism, Protective protein, MnSOD

서 론

사망원인중 암이 차지하는 비율은 꾸준히 상승하고 있으며¹⁾ 그 발병 기전에 대한 연구가 활발히 진행되고 있지만 밝혀야 할 부분이 많이 남아있는 상태이다. 암의 치료면에서 수술과 방사선치료와 함께 항암화학요법이 시행되어 왔으나 전통적인 항암화학요법은 전신독성과 항암제에 내성을 가진 암세포가 선택적으로 자라나게 되는 한계점이 있다. 암의 치료에 있어 새로운 방법으로 주목받고 있는 것이 유전자요법으로²⁾, 종양괴사인자는 중요한 대상 cytokine중 하나이다³⁾.

BCG(bacillus Calmette-Guerin)로 전처치한 생쥐에 내독소(endotoxin)를 준 뒤 얻은 혈청에서 종양의 괴사를 유도하는 물질이 발견되어 종양괴사인자(tumor necrosis factor : TNF)로 명명된⁴⁾ 이래, TNF가 여러 암세포에 대해서 생체 내에서 세포독성을 보임이 알려졌고^{5,6)} 이런 성질을 이용하여 암을 치료하려는 시도는 전신적으로 쓸 때는 짧은 반감기와 심각한 부작용으로 현실적으로 불가능하다는 것이 밝혀졌다⁷⁾. 이것을 극복하기 위해 암이 있는 국소에만 작용하게 할 목적으로 최근 급속한 진전을 보이는 분자 생물학적 방법을 이용하여 사람의 TNF 유전자를 retrovirus를 vector로 이용 여러 cell line에 이입시키는 것이 가능하게 되었다⁸⁾.

과거의 저자들의 연구에서 TNF 유전자를 이입받은 세포는 TNF의 세포독성에 대한 감수성에 변화를 일

어져 TNF에 감수성이 있던 세포도 TNF에 내성을 보인다는 것이 증명되었으며⁹⁾, 그 과정에 미지의 유전자의 전사과정을 수반한 어떤 방어적 단백질이 관여할 것이라는 시사가 있었으나¹⁰⁾ 그것이 무엇인지 구체적인 기전은 밝혀져 있지 않은 상태이다. 이러한 내성의 기전을 밝히는 것은 일반적인 종양생물학의 이해를 넓히기위해서 뿐만 아니라 효과적인 cytokine을 이용한 항암 유전자요법을 위해서도 매우 중요한 과제라 생각되는 바이다.

TNF의 세포독성의 기전으로 산소기(oxygen radical)가 중요하게 생각되고 있는 바^{11,12)}, TNF에 감수성이 있는 세포주라도 미리 치사량에 미치지 못하는 농도의 TNF를 처리하면 다음에 TNF에 의한 세포독성이 감소한다는 보고가 있고¹³⁾, 여러 암세포주에서 IL-1이나 TNF를 처리하면 항산화효소의 하나인 MnSOD(manganese superoxide dismutase)발현이 증가하고^{14,15)} TNF에 의한 세포독성이 감소한다는 보고도 있어¹⁶⁾ MnSOD가 TNF에 대한 내성에 관여할 가능성이 있는 바, TNF 유전자를 이입받아 TNF를 발현할 능력을 갖게된 세포의 TNF에 대한 내성 획득도 MnSOD의 발현 증가에 의한 것이라는 추론을 할 수 있겠다.

이에 저자들은 MnSOD가 TNF 유전자 이입후의 세포의 TNF에 대한 획득 내성에 관여하는 지를 알기 위해 TNF에 대한 감수성을 달리하는 여러 암세포주(cancer cell line)를 대상으로 TNF 유전자 이입 전

후의 MnSOD mRNA의 발현 정도를 관찰하였다.

대상 및 방법

1. 세포주와 배양법

이 실험에는 4가지의 인체 및 생쥐 기원의 암세포주, 즉 생쥐 섬유육종 세포주(murine fibrosarcoma cell line)인 WEHI164 세포주(ATCC CRL # 1751), 인체 중피종 세포주(human mesothelioma cell line)인 NCI-H2058 세포주(ATCC 미등록 세포주), 인체 비소세포폐암 세포주(human non-small cell lung cancer cell line)인 A549 세포주(ATCC CCL # 185), 인체 경부암 세포주(human cervix cancer cell line)인 ME180 세포주(ATCC HTB # 33) 등 4가지의 세포주를 사용하였다.

각 세포주와 TNF 유전자를 함유한 retroviral vector를 포함하는 pLT12SN plasmid, 그리고 packaging 세포주인 PA317은 미국 국립보건원(NIH)에서 얻었다. 각 세포주는 RPMI-1640 배지에 10% 우태혈청과 항생제(sodium penicillin G 10,000U/ml, streptomycin 10mg/ml)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

2. Retroviral vector의 생산

본 실험에서 사용된 retroviral vector는 Moloney murine leukemia virus를 변형시킨 것으로, Moloney murine leukemia virus의 gag, pol, env gene 대신에 사람 TNF- α 유전자와 선택표식 유전자(selectable marker gene)인 Neo^R 유전자를 삽입하여, retrovirus의 5'LTR(long terminal repeat)이 TNF- α 유전자를 promote하고 SV40 promotor는 Neo^R 유전자를 promote하도록 설계되어 있다^{9,10}. 이 retroviral vector를 calcium-phosphate 침전법에 의해서 packaging cell line인 PA317에 transfection시킨 후 neomycin ana-

logue인 G418(0.8mg/ml)을 포함하는 배지에 배양하여 유전자가 이입된 clone을 선택하였다. 그런 다음 PA317세포를 직경 10cm dish에 배양하여 dish를 60% 채울 정도로 자라게 되면 배지를 교환하였다. 다시 24시간 배양 후 PA317세포를 배양한 배양액을 0.22 μ m 필터로 걸러서 인체 세포에 대한 감염성을 지닌 재합성 retroviral vector를 얻었으며 실험에 사용하기 전까지 -70°C에 얼려 보관하였다.

3. 세포주에 TNF 유전자 이입과 선택

각 세포주는 배양하여 직경 10cm dish를 70% 정도 채우게 자라면 -70°C에 보관한 감염력있는 재합성 retrovirus vector를 함유하는 배양액으로 교환하여 polybrene(최종농도 8 μ g/ml)을 첨가하고 하루밤동안 배양하였다. 다음날 retrovirus 함유 배지를 버리고 RPMI-1640으로 바꾸어 24시간 추가 배양하였다. 그리고나서 G418(최종농도 1mg/ml)이 포함된 배지에서 배양하여, Neo^R 유전자를 선택표식 유전자(selectable marker gene)로 하여 TNF 유전자가 이입된 세포의 선택을 시행하였다.

4. TNF 유전자 이입 확인

실험 대상 세포의 genomic DNA에 TNF 유전자가 이입되었는지는 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, 이하 PCR로 약함)으로 확인하였다.

TNF 유전자 이입을 확인하고자 하는 각 세포주(WEHI164-TNF, NCI-H2058-TNF, A549-TNF, ME180-TNF), 그리고 각각의 모세포주(parental cell line)에서 genomic DNA를 다음과 같은 방법으로 추출하였다. 100 μ g/ml의 proteinase K와 0.5% SDS(sodium dodecyl sulfate)를 포함하는 digestion buffer 1ml를 10cm dish에 꽉 차게 자란 세포에 넣고 이리저리 흔든 다음 microcentrifuge tube에 옮긴 후, 12~16시간 동안 50°C에서 반응시켰다. 그후 sample의 1/2부피의 phenol과 sample

의 1/2부피의 chloroform/isoamyl alcohol(24 : 1)을 넣고 서서히 섞어 주었다. 그런 다음 6,800g로 10분간 원침한 후 상층액을 얻었고, phenol과 chloroform/isoamyl alcohol 처리 과정을 한 번 더 반복하였다. 이렇게 얻은 상층액에 7.5M ammonium acetate를 1/2부피 추가하고, 냉장 보관한 100% ethanol을 sample의 2배 부피로 추가하여 DNA가 닥이 침전됨을 확인하였고, 1,700g에서 2분간 원침하여 genomic DNA를 얻었다.

이와 같이 추출한 genomic DNA를 PCR의 template로 삼았다. 그리고 TNF 유전자 함유 retroviral vector의 선택표식으로 사용한 Neo^R 유전자의 일부 염기 서열(Neo 1, Neo 5)을 primer⁹ 10로 써서 PCR(95°C 1분, 64°C 1분, 72°C 1분씩 30회 반복)을 시행하였다. 시행 후 1% agarose gel로 전기영동시킨 다음 ethidium bromide로 염색하여 DNA band를 관찰하였다. 이때 음성 대조군(negative control)으로 증류수와 TNF 유전자를 이입시키지 않은 각 모세포주들을 이용하였고, 양성 대조군(positive control)으로는 본 실험에 이용한 retroviral vector를 포함하는 plasmid인 pLT12SN의 DNA를 이용하였다.

5. ELISA를 이용한 이입된 TNF 유전자 발현 확인

TNF 유전자가 이입된 세포주로부터 TNF가 발현되어 생산되는지 TNF ELISA kit(R&D사, QuantikineTM human TNF- α Immunoassay)를 이용하여 측정하였다.

TNF 유전자의 이입을 시도하고 G418로 선택 배양한 각 세포주(WEHI164-TNF, NCI-H2058-TNF, A549-TNF, ME180-TNF)를 10⁶개씩 직경 5cm dish에 배지의 양이 3ml되도록 심어서 24시간 동안 생산한 TNF의 양을 ELISA를 이용하여 측정하였다. 대조군으로 각 모세포주도 동일한 방법으로 상

층 배양액을 얻어 TNF를 생산하는지 비교하였다.

6. 모세포와 TNF 유전자 이입 세포의 TNF에 대한 감수성 측정

각 모세포주와 TNF 유전자가 이입된 세포주를 각각 well당 10⁴세포씩 96well plate에 심은 후 12시간 배양한 다음 TNF(Genzyme사, recombinant human TNF- α)를 최종농도가 1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml이 되도록 well에 첨가하였다. 36시간 추가 배양 후 세포 사망률을 MTT assay로 측정하였다. 즉 MTT용액(2mg/ml)을 well당 50 μ l씩 넣고 4시간 동안 37°C에서 배양한 후 200g 10분 원침하여 상층액을 버리고 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 150 μ l/well 넣고 15분간 흔들어 섞고 하루밤 배양하여 microplate판독기(Molecular Device사, Thermo-max)로 540nm에서 흡광도를 측정하였으며 세포사망률(cytotoxicity)은 다음과 같이 구하였다.

$$\text{cytotoxicity}(\%) = \left(1 - \frac{\text{optical density with TNF}}{\text{optical density without TNF}}\right) \times 100$$

7. 모세포와 TNF 유전자 이입 세포의 MnSOD mRNA 발현

1) 실험 조건

각 모세포주와 TNF 유전자가 이입된 세포주를 직경 10cm dish에 2개씩 배양하여 거의 채울 정도로 자라면, 그 중 하나는 보통의 배양액으로 배양액을 갈아주고, 또 하나는 최종 농도 10ng/ml의 TNF(Genzyme사, recombinant human TNF- α)를 포함하는 배양액으로 갈아주어 똑같이 12시간 추가로 배양한 후 총RNA를 추출하여 Northern blot analysis를 시행하였다.

2) Northern blot analysis

총RNA의 추출에는 Chomczynski와 Sacchi의 single step acid guanidium-thiocyanate-phenol-chloroform 추출법¹⁷⁾을 modify한 GIBCO BRL사의 TRIZOL[®] reagent를 이용하였다.

모두의 배지를 제거하고 phosphated buffered saline(PBS)로 2번 씻어낸 후 TRIZOL reagent 1.5ml를 넣어 cell lysate를 만들어 여러번 pipette를 통과시키고 1.5ml microcentrifuge tube로 옮겨 상온에서 5분 방치하고 0.2ml의 chloroform을 첨가하여 15초간 세게 흔든다. 상온에서 2~3분 배양하고 12,000g 4도에서 15분 원침하여 상층부를 새 tube에 옮기고 0.7ml의 isopropyl alcohol을 넣고 섞어 RNA를 precipitate시키면서 상온에서 10분간 방치한 후 12,000g 4도로 10분간 원침하여 상층부를 버리고 75% ethanol 1ml로 RNA 침전물을 세척한다. RNA 침전물을 적당히 물기를 말린 후 DEPC-treated water로 녹이고 정량하여 다음 실험에 사용할 때까지 냉동 보관한다.

동량의 RNA(5 μ g)를 formaldehyde를 함유하는 1.2% agarose gel에 전기영동하여 분리하고 RNA를 capillary method를 이용하여 nylon membrane으로 transfer시키고 UV를 사용하여 고정시켰다.

Oncor사의 HybrisolTM[®] (containing 50% formamide, 10% dextran sulfate, 1% SDS, blocking reagent)을 사용하여 42도 1시간 prehybridization을 하고 Promega사의 Prime-a-Gene[®] labelling system(random hexamer법)을 이용하여 ³²P labelling한 MnSOD cDNA를 넣어 42도 16시간 hybridization시키고 washing solution(solution I: 1x SSC/0.1% SDS 15분, solution II: 0.1x SSC/0.1% SDS 15분)으로 씻어내고 intensifying screen이 들어있는 X-ray film cassette에 membrane을 넣어 -70도에서 3일간 autoradiography를 시행하고 laser densitometry로 정량하였다. 정확히 동량의 RNA로 보정하기위해

house keeping gene인 β -actin cDNA로 같은 membrane을 다시 hybridization 및 autoradiography, densitometry하여 그 relative density를 가지고 TNF 유전자 이입 유무 및 TNF 처리 유무에 따른 mRNA 발현의 차이를 비교하였다.

8. 결과 분석

모든 자료의 그래프는 평균 \pm 표준편차로 나타내었고, 각 군간의 비교는 스튜던트 t-검정을 적용하였다.

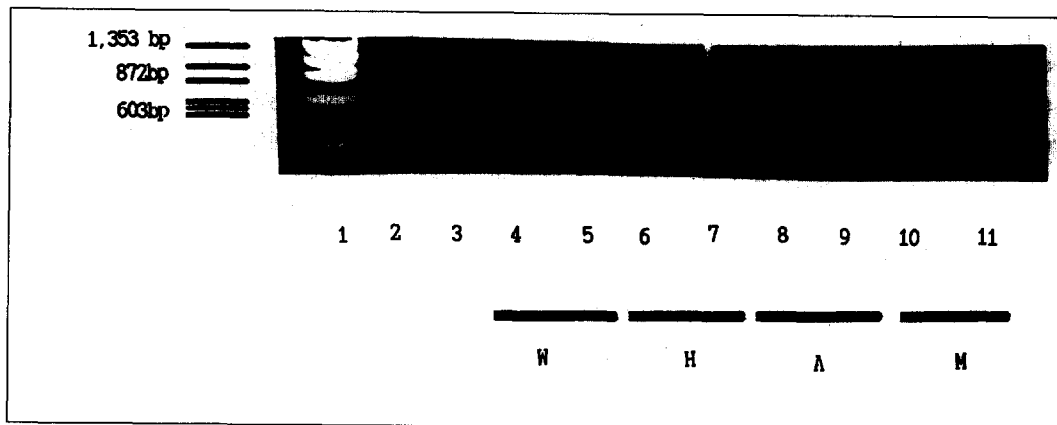
결 과

1. DNA 수준에서 유전자 이입의 확인

각 모세포주에 TNF 유전자가 제대로 이입되었는지를 확인하기 위하여 그 genomic DNA를 가지고 PCR을 시행하였고, TNF 유전자를 이입시키지 않은 모세포주의 genomic DNA를 가지고 PCR 시행한 것과 양성 대조군인 pLT12SN(TNF)를 PCR 시행한 것과 함께 전기영동하여 비교하였다(Fig. 1). 그 결과 TNF 유전자가 이입된 세포주(WEHI164-TNF, NCI-H2058-TNF, A549-TNF, ME180-TNF) 및 양성 대조군인 pLT12SN(TNF)는 790 base pair 크기의 진한 DNA band를 보이는 반면 모세포주인 WEHI164, NCI-H2058, A549, ME180 세포주에서는 790 base pair의 DNA band가 보이지 않아서 retroviral vector를 이용한 유전자 이입이 이루어졌음을 확인할 수 있었다.

2. ELISA를 이용한 이입된 TNF 유전자의 단백질 수준의 발현 확인

TNF 유전자가 이입된 세포주를 배양한 배양 상층액에서 ELISA로 TNF양을 측정한 결과(Table. 1), WEHI164-TNF 세포는 $1.91 \pm 0.12 \text{ ng/24hr/10}^6$ cells, NCI-H2058-TNF 세포는 $3.63 \pm 0.20 \text{ ng/}$



- 1 : size marker
 2 : contamination control(DW)
 3 : positive control(pLT12SN(TNF))
 4 : WEHI164
 5 : WEHI164-TNF
 6 : NCI-H2058
 7 : NCI-H2058-TNF
 8 : A549
 9 : A549-TNF
 10 : ME180
 11 : ME180-TNF

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of NEO^R gene PCR amplification.

Table 1. Total TNF produced by 10⁶cells during 24hr culture

Cell	TNF produced (ng/24hr/10 ⁶ cells)
WEHI164	ND
WEHI164-TNF	1.91 ± 0.12
NCI-H2058	ND
NCI-H2058-TNF	3.63 ± 0.20
A549	ND
A549-TNF	3.90 ± 0.05
ME180	ND
ME180-TNF	3.91 ± 0.13

*ND : not detectable

24hr/10⁶cells, A549-TNF 세포는 3.90 ± 0.05ng/24hr/10⁶cells, ME180-TNF 세포는 3.91 ± 0.13ng/24hr/10⁶cells의 TNF를 생산하였다. 반면, 모세포주인 WEHI164, NCI-H2058, A549, ME180 세포는 TNF를 검출 가능한 수준으로는 생산하지 않았다.

3. TNF 유전자 이입 전후, 암세포의 TNF에 대한 감수성 비교

TNF 유전자 이입 전후의 TNF에 대한 세포주의 감수성(세포사망률)을 TNF의 농도 변화에 따라 비교하였다(Fig. 2, Fig. 3).

WEHI164의 경우 TNF 농도 100ng/ml에서 모세포는 82.9 ± 0.7%의 세포독성을 보인 반면 TNF 유전자 이입 후에는 20.3 ± 4.4%의 세포독성을 보여 통계적으로 유의한 차이가 있었고($p < 0.01$), NCI-H2058(12.0 ± 3.3% 대 0.7 ± 1.2%, $p < 0.01$)와 ME180(55.8 ± 1.5% 대 2.2 ± 5.1%, $p < 0.01$)도 차이가 있었으나, A549(27.9 ± 1.8% 대 22.9 ± 3.0%, $p = 0.0686$)는 유의한 차이가 없었다. NCI-H2058과 A549 세포주가 TNF에 비교적 내성을 보인다는 점을 고려하면 적어도 TNF에 감수성을 보이는 세포주에서는 TNF 유전자가 이입된 후 자신의 모세포주에 비해 TNF에 의한 세포독성에 뚜렷한 내성을 획득함을 알 수 있었다.

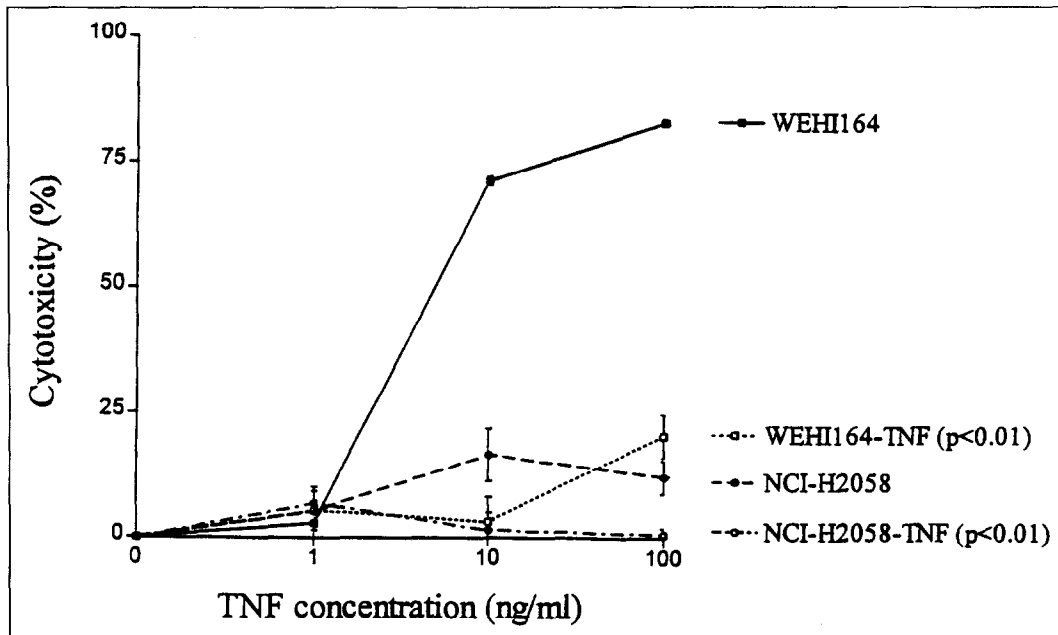


Fig. 2. Comparison of sensitivity of WEHI164 and NCI-H2058 to exogenous TNF before and after TNF- α gene transfection.

4. TNF 유전자 이입 전후의 MnSOD mRNA 발현 양상(spontaneous & with exogenous TNF)

4 가지 모세포주와 TNF 유전자가 이입된 세포주에서 exogenous TNF 처리 유무로 나누어 MnSOD mRNA(1kbp)의 발현 정도를 β -actin mRNA 발현에 대한 상대적 density를 가지고 비교하였다(Fig. 4, Fig. 5).

모세포주가 TNF 감수성인 WEHI164 세포주와 ME180 세포주에서는 모세포에 exogenous TNF를 처리한 것이나, TNF 유전자를 이입한 것(with/without exogenous TNF) 모두에서 기저 상태에 비해 MnSOD mRNA 발현이 증가되지 않았다.

모세포주가 TNF 내성을 보이는 NCI-H2058 세포주와 A549 세포주에서는 모세포를 TNF로 처리했을 때 MnSOD mRNA 발현이 크게 증가하였고, TNF 유전자를 이입한 것(without exogenous TNF)에서

도 기저 상태에 비해 상당히 증가되었으나, TNF 유전자를 이입한 것에 exogenous TNF를 처리한 경우에는 TNF 유전자를 이입한 것(without exogenous TNF)에 비해서는 추가적인 MnSOD mRNA 발현의 증가는 없었다.

고 찰

1980년대 초에 retrovirus를 이용한 유전자 이입이 시도된 이래, 최근에는 환자 치료에까지 retrovirus를 이용한 유전자 이입 방법이 시도되고 있다^{18,19}. Retrovirus를 이용한 유전자 이입법은 이입된 유전자가 숙주 세포의 genomic DNA에 삽입되어 지속적으로 이입된 유전자를 발현시키는 장점과, 물리적인 방법이나 화학적인 방법으로 유전자를 이입하는 것보다 유전자 이입률이 높은 장점이 있어서 최근 임상적으로 응용되는 유전자 이입은 대부분 retrovirus를 이용한

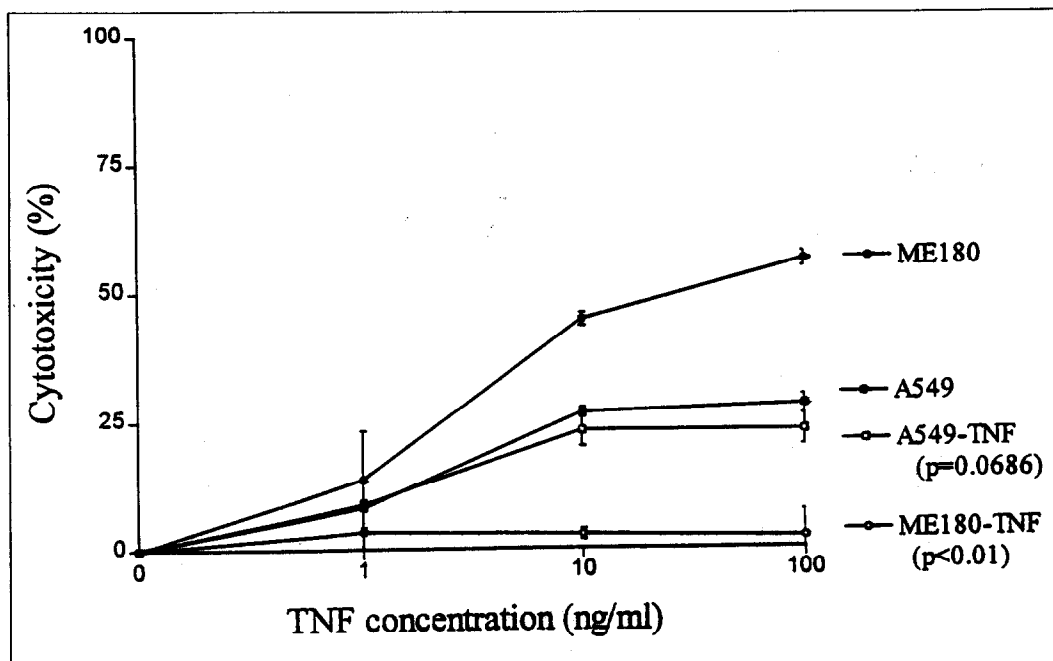


Fig. 3. Comparison of sensitivity of A549 and ME180 to exogenous TNF before and after TNF- α gene transfection.

유전자 이입법을 쓰고 있다. 그러나, retrovirus를 이용한 유전자 이입은 생체 내에서 직접 적용하여 감염시킬 경우 그 효율이 낮기 때문에, 생체 외에서 retroviral vector를 이용하여 세포에 유전자의 이입을 시도한 후 선택과정을 거쳐 숙주(host)에 주입하는 방법을 쓴다. 그런데, 이 과정에서 이입된 유전자가 TNF 등의 세포독성이 있는 cytokine일 경우 내성이 문제가 된다²⁰⁾.

Tumor Necrosis Factor는 1975년 생쥐를 BCG로 전처치한 다음 내독소를 주어서 얻은 생쥐의 혈청에서 발견한 이래, 여러 암세포에 생체 내(in vivo)에서는 출혈성 괴사를 일으키고, 생체 외(in vitro)에서는 cytotoxicity를 보임이 밝혀져 있다^{5,6)}. 그러나, 이런 TNF의 암세포에 대한 세포독성을 인체에 응용하기에는 문제점이 있다. 즉, TNF가 효과적인 항암효과를 나타낼 수 있는 용량은 400~500 $\mu\text{g/kg/day}$ 이지만 TNF의 전신 독성 때문에 5 $\mu\text{g/kg/day}$

이상으로 인체내에 투여할 수 없다⁷⁾. 이런 TNF의 전신 독성을 피하면서 TNF의 효과를 나타내게 하기 위하여, TNF 유전자를 암세포주에 이입시키고 발현시켜서 암세포 주위에서만 TNF의 농도를 높게 유지하는 방법이 시도되었다²¹⁾. 이런 시도 중, 생체 외(in vitro) 실험의 경우 기대한 바와는 달리, TNF에 감수성이 있어서 TNF에 의해 죽던 모세포가 TNF 유전자가 암세포주에 이입되고 나서는 TNF의 세포독성에 내성을 보인다는 연구 결과가 보고되고 있다²²⁾. TNF 유전자의 이입후에 TNF에 내성을 띄게된 세포에 유전자의 전사(transcription) 과정을 차단하는 것으로 알려진 actinomycin을 처리하면 다시 TNF에 대한 감수성을 회복하는 것을 확인함으로써 이 획득내성에는 어떤 방어진백질의 de novo 합성에 의한 것이라는 과거의 저자들의 연구가 있었고¹⁰⁾, HEK293 세포주에 MnSOD sense cDNA와 antisense cDNA를 각각 이입하여 MnSOD 발현을

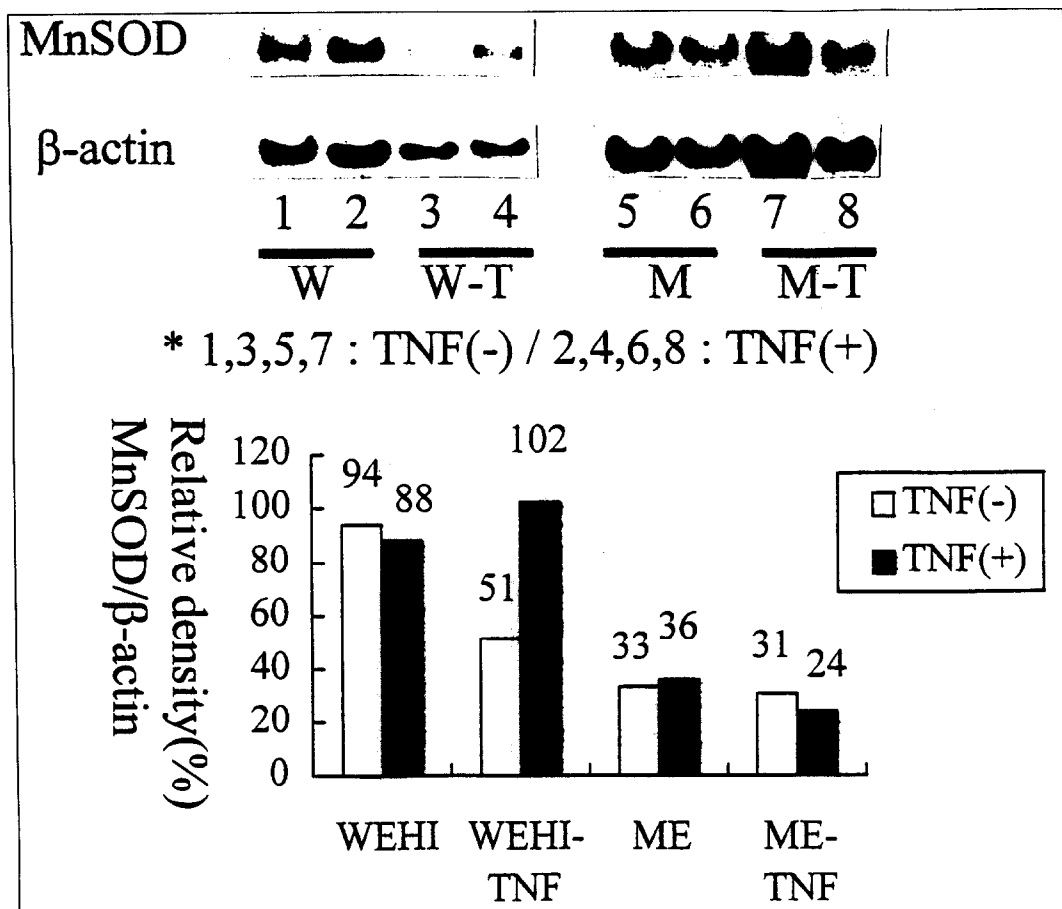


Fig. 4. Comparison of MnSOD mRNA expression before and after TNF- α gene transfection (without/with exogenous TNF treatment)-I.

조작하였을 때 sense cDNA가 이입되어 MnSOD가 과발현된 세포는 TNF에 대한 내성이 증가하고 antisense cDNA가 이입되어 antisense mRNA가 발현된 세포는 TNF에 대한 감수성이 증가했다는 보고도 있어²³⁾, MnSOD발현의 차이로 TNF 유전자 이입후의 TNF에 대한 획득내성을 설명해보고자 본 실험을 시행하였다.

그 결과 자연 상태에서 TNF에 감수성인 WEHI 164와 ME180세포는 모세포에 TNF를 처리해도 MnSOD mRNA 발현이 기저 상태보다 증가하지 않

았을 뿐만 아니라 TNF 유전자를 이입한 세포주에서도 TNF 처리와 관계없이 MnSOD mRNA 발현이 변화가 없었고, 자연 상태에서 TNF에 내성을 보이는 NCI-H2058과 A549세포는 모세포에 TNF를 처리할 때나 TNF 유전자를 이입한 것 모두에서 MnSOD mRNA 발현이 크게 증가하였다. 따라서 MnSOD는 우리가 기대하였던 TNF 유전자 이입후의 TNF에 대한 획득내성의 기전에 관여하기 보다는 자연 상태의 내성에 관계가 된다고 볼 수 있겠고, 자연 상태에서 내성을 보이는 세포가 TNF(외부에서 주었던 자신이

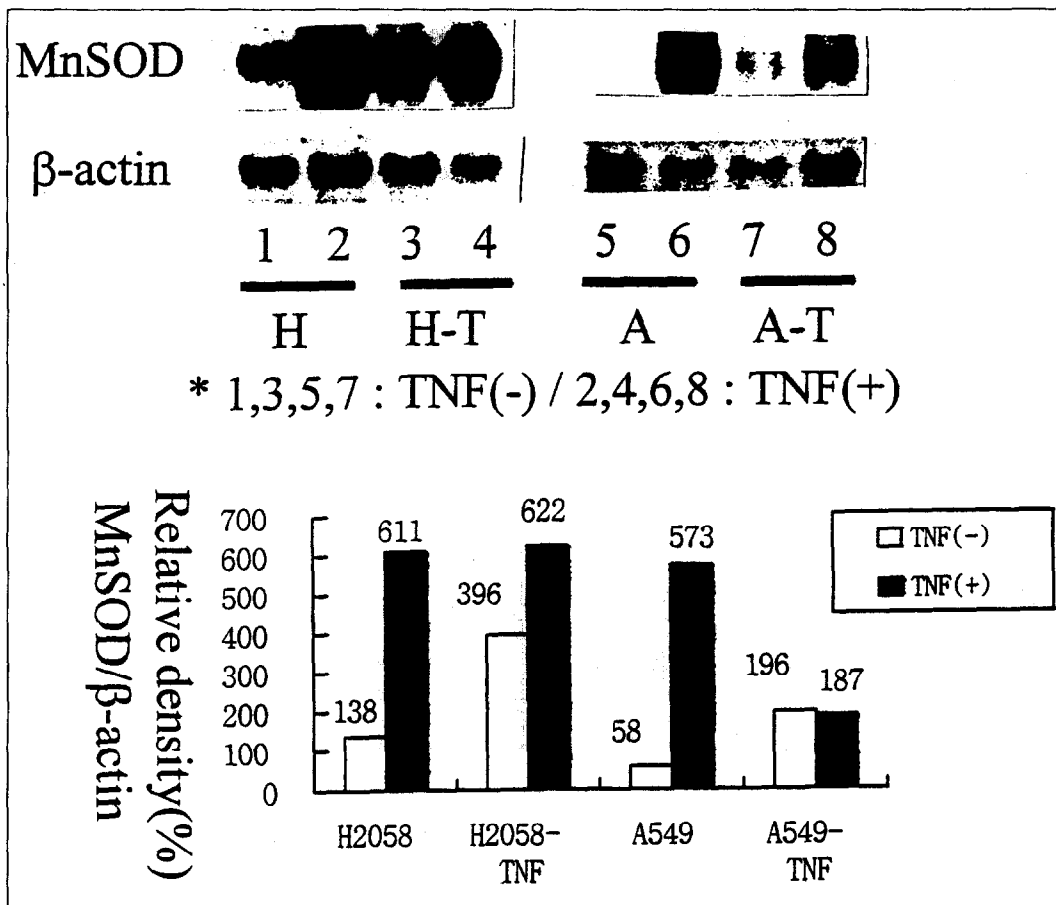


Fig. 5. Comparison of MnSOD mRNA expression before and after TNF- α gene transfection (without/with exogenous TNF treatment)-II.

생산하였든 관계없이)에 노출되면 이에 대한 반응으로 MnSOD를 발현시키는 것으로 이해된다.

MnSOD cDNA 이입 연구를 한 Wong 등은 MnSOD가 TNF 세포독성에 대한 내성에 필수적인 요소라고 주장한 바 있지만²³⁾ 생쥐의 변성된 섬유아 세포주의 TNF에 감수성과 내성을 띄는 subclone들을 가지고 연구했던 Boss 등은 TNF에 대한 내성과 MnSOD mRNA 발현과는 연관관계를 발견하지 못하였다고 보고한 바 있다²⁴⁾. Fujii 등의 연구에서 TNF나 IL-1 β 등 여러 물질로 세포들을 자극하였을

때 TNF에 내성을 보이는 세포는 MnSOD mRNA 발현의 증가가 유도되었으나 TNF에 감수성을 보이는 세포는 증가가 유도되지 않아 본 연구와는 상통하는 결과를 보고한 바 있다²⁵⁾. 전술한 Wong 등의 연구 자체에서도 MnSOD의 level과 TNF에 대한 감수성은 정확히 비례하지 않아 MnSOD 이외의 다른 방어 단백질이 같이 관여할 가능성을 시사하였었다²³⁾.

이번 연구에서 TNF 유전자의 이입후 TNF에 대한 내성을 획득하게 되는 기전에 MnSOD의 발현능력의 향상은 관여되지 않는다는 것을 확인하였으므로 다른

방어 단백질에 대한 추가적인 연구가 필요하겠다.

요 약

연구배경 :

종양괴사인자(tumor necrosis factor ; TNF)는 다양한 생물학적 기능을 가지고 있는 바, 그 중 생체 외에서 증명된 뚜렷한 항암 효과로 말미암아 최근 항암 유전자요법의 중요한 대상으로 관심을 모으고 있다. 현재 유전자 이입의 기술적 문제로 생체 외에서 암세포에 유전자 이입을 시행한 후 이를 다시 환자의 생체 내로 이식하는 방법이 연구의 주종을 이루고 있다. 그러나 저자들의 과거의 연구를 포함한 여러 연구에서 TNF가 이입된 암세포는 TNF에 대해 내성을 보이는 것으로 증명되었고 이에 새로운 방어 단백질을 합성하는 것이 관여할 것이라는 시사가 있었다. 이 획득내성의 기전을 밝히는 것이 종양생물학의 이해를 넓히고 보다 효과적인 항암 유전자요법을 개발하기위한 매우 중요한 과제로 생각된다.

저자들은 TNF 유전자 이입에 따른 암세포의 TNF에 대한 획득내성에, 일부 세포에서 TNF에 의해 발현이 유도된다는 것이 밝혀진, 항산화효소의 하나인 MnSOD의 발현의 변화가 관여하는 지를 규명하고자 본 실험을 수행하였다.

방 법 :

TNF에 다양한 감수성을 보이는 인체 및 생쥐 기원의 4가지 암세포주(WEHI164, NCI-H2058, A549, ME180)에 TNF- α 유전자를 retroviral vector를 이용하여 이입하고 TNF의 발현을 시도하여 PCR, ELISA, MTT assay로 확인하였고, TNF 유전자가 이입된 세포(WEHI164-TNF, NCI-H2058-TNF, A549-TNF, ME180-TNF)는 TNF에 내성을 보이는지 역시 MTT assay로 검증하였다. TNF 유전자 이입 전후의 MnSOD mRNA 발현의 차이는 Northern blot analysis를 통하여 비교하였다.

결 과 :

1) TNF- α 유전자 이입 및 발현 확인

PCR을 시행한 결과 TNF 유전자가 이입된 각 세포주는 790 base pair 크기의 진한 DNA band를 보인 반면 모세포주는 보이지 않아서 retroviral vector를 이용한 유전자 이입이 DNA 수준에서 이루어졌음을 확인할 수 있었다. 그리고 TNF 유전자가 이입된 세포의 배양상층액에서 TNF양을 ELISA로 측정된 결과 TNF를 세포에 따라 1.91ng/24hr/10⁶ cells에서 3.91ng/24hr/10⁶cells 생산함을 알 수 있었다.

2) TNF 유전자 이입 전후, 암세포의 TNF에 대한 감수성 비교

TNF 농도 100ng/ml에서 WEHI164-TNF와 ME180-TNF 세포는 통계적으로 유의하게 ($p < 0.01$) TNF에 대한 내성을 획득함을 알 수 있었다.

3) TNF 유전자 이입 전후의 MnSOD mRNA 발현 양상

TNF에 감수성을 보이는 WEHI164와 ME180세포는 TNF 유전자 이입 후에 MnSOD mRNA 발현이 증가되지 않았으며, TNF에 내성을 보이는 NCI-H2058과 A549세포는 TNF 유전자 이입 후에 MnSOD mRNA 발현의 증가가 관찰되었으나 이는 모세포에 외부에서 TNF를 주었을 때도 관찰되었다.

결 론 :

세포주에 TNF 유전자를 이입하여 TNF를 발현하게 하였을 때 그 세포 자신은 TNF에 대해 내성을 획득하게 되는데, 이 획득내성은 MnSOD 발현 능력의 향상에 의한 것은 아닐 것으로 판단되나 각 세포주의 자연 상태의 TNF에 대한 감수성 여부는 MnSOD의 발현 차이가 관련될 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Miller RA, Ries LA, Hankey BF : Cancer statistics Review 1973-1990. Bethesda, MD, US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 93-2789, 1993
2. Hanania EG, Kavanagh J, Hortobagyi G, Giles

- R, Champlin R, Deisseroth AB : Recent advances in the application of gene therapy to human disease. *Am J Med* 99 : 537, 1995
3. Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K : Gene transfer into humans-immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor infiltrating lymphocytes mediated by retroviral gene transduction. *New Engl J Med* 323 : 570, 1990
4. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B : An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 72 : 3666, 1975
5. Matthews N : Tumor necrosis factor from the rabbit. *Br J Cancer* 38 : 310, 1978
6. Sargarmen BJ, Aggarwall BB, Hass PE : Recombinant human tumor necrosis factor- α : effect on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 230 : 943, 1985
7. Champan PB, Lester TJ, Casper ES, Gabrilove JL : Clinical pharmacology of recombinant human tumor necrosis factor in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 5 : 1942, 1987
8. Varmus HE : Form and function of retroviral provirus. *Science* 216 : 812, 1982
9. 오연목, 박계영, 정만표, 유철규, 김영환, 한성구, 심영수, 한용철 : Retroviral vector를 이용한 TNF- α 유전자의 이입이 암세포의 종양괴사인자(TNF) 감수성에 미치는 효과. *결핵 및 호흡기질환* 41(2) : 87, 1994
10. 이혁표, 오연목, 유철규, 김영환, 심영수, 한성구 : 암세포에서 retroviral vector를 이용한 종양괴사인자 유전자 이입후 획득된 종양괴사인자 내성의 기전. *결핵 및 호흡기질환* 44(3) : 547, 1997
11. Yamauchi N, Kuriyama H, Watanabe N, Neda H, Maeda M, Niitsu Y : Intracellular hydroxyl radical production induced by recombinant human tumor necrosis factor and its implication in the killing of tumor cells in vitro. *Cancer Res* 49 : 1671, 1989
12. Zimmerman RJ, Chan A, Leadon SA : Oxidative damage in murine tumor cells treated in vitro by recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer Res* 49 : 1644, 1989
13. Wallach D : Preparations of lymphotoxin induce resistance to their own cytotoxic effect. *J Immunol* 132 : 2464, 1984
14. Masuda A, Longo DL, Kobayashi Y, Appella E, Oppenheim JJ, Matsushima K : Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase by interleukin 1. *FASEB J* 2 : 3087, 1988
15. Wong GHW, Goeddel DV : Induction of manganese superoxide dismutase by tumor necrosis factor : possible protective mechanism. *Science* 242 : 941, 1988
16. Holtmann H, Wallach D : Down regulation of the receptors for tumor necrosis factor by interleukin 1 and 4 β -phorbol-12-myristate-13-acetate. *J Immunol* 139 : 1161, 1987
17. Chomczynski P, Sacchi N : Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analyt Biochem* 162 : 156, 1987
18. Cone RD, Mulligan RC : High-efficiency gene transfer into mammalian cells : generation of helper-free recombinant retrovirus with broad mammalian host range. *Proc Natl Acad Sci USA* 81 : 6349, 1984
19. Miller AD, Rosman GJ : Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *BioTechniques* 7 : 980, 1989
20. Vanhaesebroeck B, Decoster E, Ostade XV : Expression of an exogenous tumor necrosis factor (TNF) gene in TNF-sensitive cell lines confers

- resistance to TNF-mediated cell lysis. *J Immunol* 148 : 2785, 1992
21. Anderson WF : Human gene therapy. *Science* 256 : 808, 1992
22. Han SK, Brody SL, Crystal RG : Suppression of in vivo tumorigenicity of human lung cancer cells by retrovirus-mediated transfer of human tumor necrosis factor- α cDNA. *Am Rev Respir Dis* 147 : A457, 1993
23. Wong GHW, Elwell JH, Oberley LW, Goeddel DV : Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell* 58 : 923, 1989
24. Boss JM, Laster SM, Gooding LR : Sensitivity to TNF-mediated cytotoxicity is unrelated to MnSOD mRNA levels among transformed mouse fibroblasts. *Immunology* 73 : 309, 1991
25. Fujii J, Taniguchi N : Phorbol ester induces manganese-superoxide dismutase in tumor necrosis factor-resistant cells. *J Biol Chem* 266 : 23142, 1991
-