

□ 원 저 □

호흡기계암세포주에서 TNF- α 유전자의 이입이 항암제 감수성에 미치는 효과

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 결핵 연구소

모은경 · 이재호 · 이계영* · 유철규
김영환 · 한성구 · 심영수

지방공사 강남병원 내과

최 형 석

= Abstract =

Effect of TNF- α Gene Transfer to Respiratory Cancer Cell Lines on Sensitivity to Anticancer drugs

Eun Kyung Mo, M.D., Jae Ho Lee, M.D., Kye Young Lee, M.D.,* Chul-Gyu Yoo, M.D.,
Young Whan Kim, M.D., Sung Koo Han, M.D. and Young-Soo Shim, M.D.

Department of Internal Medicine and Tuberculosis Research Institute,
Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Hyung-Seok Choi, M.D.

Department of Internal Medicine, Kangnam General Hospital Public Corporation, Seoul, Korea

Background: Tumor necrosis factor(TNF) showed antitumor cytolytic effects on sensitive tumor cells in numerous *in vivo* and *in vitro* studies. But it could not be administered systemically to human because of severe systemic adverse effects at effective concentrations against tumor cells. Many studies showed that a high concentrations of TNF in the local milieu may evoke *in vivo* TNF-responsive mechanisms sufficient to suppress tumor growth. Recently developed technique of TNF gene transfer to tumor cells using retrovirus vector could be a good candidate for local TNF administration. TNF is also known to synergistically enhance *in vitro* cytotoxicity of chemotherapeutic drugs targeted to DNA topoisomerase II against TNF-sensitive tumor cell lines. In this study the *in vitro* chemosensitivity against DNA topoisomerase II targeted chemotherapeutic drugs was evaluated using some respiratory cancer cell lines to which TNF gene had been transferred.

본 연구는 1994년도 서울 대학교 병원 지정연구비의 보조로 이루어 졌음.

*현재 단국대학교 의과대학 내과학교실 근무.

Method: NCI-H2058, a human mesothelioma cell line, A549, a human lung adenocarcinoma cell line and WEHI 164 cell line, a murine fibrosarcoma cell line were treated with etoposide and doxorubicin, which are typical topoisomerase II - targeted chemotherapeutic agents, at different concentration. The resultant cytotoxicity was measured by MTT assay. Then the cytotoxicity of the same chemotherapeutic agents was measured after TNF- α gene-transfer and the two results were compared.

Results: The cytotoxicity was not increased significantly in WEHI164 cell line and A549 cell line but statistically significant increase was observed in H2058 cell line when TNF- α gene was transferred($p < 0.05$).

Conclusion: These findings show that TNF- α gene transfer to respiratory cancer cell lines results in variable effects on chemosensitivity against topoisomerase II inhibitor among different cell lines *in vitro* and can be additively cytotoxic in certain selective tumor cell lines.

Key Words: Tumor Necrosis Factor(TNF), Gene transfer, Chemosensitivity.

서 론

TNF- α 는 원래 생쥐를 BCG(Bacillus Calmette-Guerin)로 전처치한 후 내독소를 주사하였을 때 그 혈청에서 처음 발견된 단백질이다. 이 물질은 생체내에서 어떤 종류의 이식된 종양의 출혈성 괴사를 일으키는 사실이 관찰되었고 시험관내 실험에서 감수성을 보이는 종양 세포주에 대하여 직접 독성을 보이는 현상이 관찰되었다¹⁾. TNF- α 의 분리가 이루어지고 그 후의 연구 결과에 따라 이 물질은 정상 및 형질이 변환된 세포들에 대하여 다양한 생물학적 작용을 가지고 있음이 밝혀졌다²⁾. TNF- α 의 비세포독성 작용으로는 주로 염증반응 및 면역조절(immunomodulation)에 관계되는 작용으로서 과립구(granulocyte), 혈관 내피세포(endothelial cell)나 골세포(osteoclast) 등의 활성화, 세포 표면 표식자(cell surface marker)나 급성기 반응성 단백질(acute phase protein), cytokine 유전자들의 발현 유도(induction), 효소 체계의 활성화 또는 억제(suppression), 섬유아세포의 성장 촉진과 항 바이러스 작용등이 있다³⁾. 또한 TNF- α 는 T림파구와 B림파구의 분화와 성장을 촉진하며 거대 세포(macrophage)에 대한 중요한 활성화 인자이다.

TNF- α 는 주로 내독소와 같은 세균의 산물로 활성화

된 거대세포에서 분비된다. 또한 임파구와 같은 다른 세포도 lymphotoxin이나 TNF- α 를 분비한다. 마찬가지로 어떤 종류의 상피암 세포주나 섬유육종 세포주도 TNF- α 를 생산할 수 있다⁴⁾.

TNF- α 와 상호 상승적인 작용을 보이는 여러 가지 물질에 대한 연구가 진행되고 있고 이러한 연구로부터 그 작용 기전의 실마리가 풀릴 것으로 기대되고 있다. 현재까지 알려진 상승적인(synergistic)작용을 하는 물질로는 interferons^{5,6)}, actinomycin-D나 5-fluorouracil과 같은 mRNA 생성의 억제제, cyclophosphamide나 cisplatin과 같은 alkylating agent 및 doxorubicin(adriamycin)이나 etoposide 또는 amsacrine과 같은 topoisomerase II inhibitor chemotherapeutic agent가 있다. 이들 topoisomerase II inhibitor들은 생체외(*in vitro*)로 TNF- α 와 상승적으로 세포독성 작용을 보이는 것이 이전의 연구에서 비교적 잘 알려져 있다^{7~9)}. 따라서 임상에서 널리 쓰이는 topoisomerase II inhibitor 작용을 가진 항암제로 폐암에 대한 항암 화학 요법을 시행할 경우 TNF- α 는 이론적으로 중요한 보조적 약제가 될 수 있을 것이나 현재까지는 TNF- α 를 전신적으로 투여하였을 경우의 독작용 때문에 그 사용이 제한되고 있다.

최근 섬유육종 세포주를 이용한 연구에서 TNF- α 를 생산하는 선택된 종양세포는 생체외에서 외부에서 투여된 TNF- α 에 저항성을 보이며(TNF-resistant) TNF- α

를 생산하는 종양세포를 nude mouse에 피하 주사하였을 때 종양 생성과 그 성장이 감소되었으며, 이는 생산된 TNF- α 의 양과 상관 관계가 있다는 연구 결과들이 발표되었다^{10,11)}.

또 다른 최근의 연구에서는 retrovirus vector를 이용하여 TNF- α 의 cDNA를 인체의 폐암세포주에 이입하고 이 세포를 nude mouse에게 피하 주사하였을 때 전신적인 부작용의 증거없이 종양의 생성이 감소하였고 이는 TNF- α 에 대한 항체를 국소에 주사하여 특이적으로 억제할 수 있었다고 하였다¹²⁾.

이들 연구의 공통점은 유전자요법으로도 종양의 성장을 억제할 수 있다는 사실을 밝힌 것이었다. 그러나 유전자 요법 그 자체 만으로는 암을 완전히 제거하지는 못하므로 보조적인 요법이 필요할 것이다. 항암 화학요법은 중요한 보조적 요법으로서 TNF와 topoisomerase II와의 상관 관계를 고려할 때 이 두가지를 함께 종양 세포에 작용시킬 경우 항암제 감수성의 변화가 올 것으로 예상할 수 있다.

이러한 종양에 대한 TNF의 성질을 이용하여 본 연구에서는 TNF를 이입한 종양 세포, 특히 호흡기계 암 세포주에서 topoisomerase II inhibitor drug에 대한 세포 독성이 어떠한 경향을 보이는 지를 밝혀서 향후 인체 호흡기계암의 치료에 있어서 TNF- α 유전자의 이입 방법을 사용하는데 도움이 되는 자료를 얻고자 하였다. 이를 위하여 연구자는 모세포주로서 사람의 폐암 세포주인 A549 세포주, 인체 중피종 세포주인 NCI-H2058 세포주와 생쥐의 섬유육종 세포주인 WEHI164 세포주에 topoisomerase II inhibitor drug중 임상에서 폐암 치료에 널리 쓰이는 etoposide와 doxorubicin (Adriamycin)을 각각 가하여 세포독성의 정도를 관찰하고 이어 같은 모세포주에 외부에서(exogenous) TNF- α 를 가하여 전처리한 후 같은 항암제를 가하였을 경우의 세포독성을 측정한 후 각 모세포에 retrovirus vector를 이용하여 TNF- α 유전자를 이입하여 형질 변환시킨 세포주에 같은 항암제를 가하였을 경우의 세포 독성의 정도를 관찰하여 그 결과를 비교 분석하였다.

대상 및 방법

1. 세포주와 배양법

실험에 사용된 모세포는 인체 폐암 세포주(adenocarcinoma cell line)인 A549 세포주와 TNF- α 에 감수성을 보이는 사람의 중피종 세포인 NCI-H2058 세포주와 생쥐의 섬유육종 세포주인 WEHI164 세포주를 사용하였다. NCI-H2058 세포주는 사람의 중피종 세포주로서 중피종은 말기까지도 원격전이가 드물고 극악강이라는 한정된 공간안에서만 성장하기 때문에 유전자 이입과 유전자 요법의 좋은 대상이 되리라 생각되고 WEHI164 세포주는 TNF- α 에 대한 감수성이 매우 큰 세포로 알려져 있기 때문에 본 실험에 사용되었다.

이들 세포주들은 RPMI-1640배지에 10% 우태 혈청과 항생제(gentamicin 50 μ g/ml)를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

2. TNF- α 유전자의 이입

각 모세포로부터 TNF- α 유전자를 이입하여 변환시킨 세포주를 얻었다. 그 방법을 요약하면 각 세포주가 직경 10cm dish를 70% 정도 채우도록 자라면 -70 $^{\circ}$ C에 보관된 감염력이 있는 재합성 retrovirus vector를 함유하는 배양액으로 교환하여 배양하였다. 여기에 polybrene(최종 농도 8 μ g/ml)을 첨가하고 하루밤 동안 배양하였다. 다음날 retrovirus 함유 배지를 버리고 RPMI-1640배지로 바꾸어 24시간 동안 추가로 배양하였다. 그리고 나서 G418(최종 농도 1mg/mL)이 포함된 배지에서 배양하여, Neo^R 유전자를 선택 표식 유전자(selectable marker gene)로 하여 TNF- α 유전자가 이입된 세포의 선택을 시행하였다. 이렇게 선택된 암세포가 TNF- α 를 생성하는지의 여부와 생성된 TNF- α 가 생물학적인 활성도를 가지고 있는지는 오동의 연구에서¹³⁾, 이미 기술된 방법으로 확인하였으며 생성된 TNF- α 의 활성도는 NCI-H2058-TNF 세포주에서 23.6 \pm 0.84ng/24hr-10⁶cells였고 WEHI164-TNF 세포주는 12.2 \pm 0.36ng/24hr-10⁶cells 였다.

3. 모세포주의 Topoisomerase II Targeted Chemotherapeutic Drug에 대한 항암제 감수성(Chemosensitivity)의 평가

모세포주를 각각 10^6 개씩 직경 5cm dish에 배지의 양이 3mL가 되도록 심어서 24시간 동안 배양하였다. 모세포주를 96well plate에 well당 10^4 개의 세포가 되도록 심고 12시간 동안 배양한 후 etoposide의 최종농도가 각각 0.1, 0.5, 1, 5, $10\mu\text{g/mL}$ 로 첨가된 배지로 교환하여 36시간동안 추가로 더 배양하였다. 그런 후 생존한 세포의 비율(백분율)을 MTT(dimethylthiazolyl diphenyltetrazolium bromide) assay로 측정하였다^{14,15}.

한편으로 다른 well에서는 각 모세포주에 대하여 마찬가지로 방법으로 doxorubicin(adriamycin)을 각각 농도 0.01, 0.1, 1.0, $10.0\mu\text{g/mL}$ 가 각각 포함된 배지를 가하여 MTT assay로 세포의 생존율을 구하였다. 각각의 측정치는 6개의 well에서 측정된 값의 평균이었다.

MTT assay 방법을 요약하면, MTT용액(2 mg/mL)을 각 세포주가 있는 well당 $50\mu\text{L}$ 씩 넣고 4시간 동안 37°C 에서 원침(200g, 10분)하였다. 그런 다음 상층액을 버리고 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 $150\mu\text{L}$ /well씩 넣은 후 15분간 잘 흔들어 섞어 주었다. 하루 밤새 배양한 후 microplate판독기(Molecular Devices사, 모델명 Thermo-max)로 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도로 부터 아래와 같이 생존한 세포의 비율을 구하였다.

$$\text{Percent of viable cells(\%)} = \frac{\text{optical density with cytotoxic drug}}{\text{optical density without cytotoxic drug}} \times 100$$

4. 모세포주를 Topoisomerase II Targeted Drug으로 전처리한 후 Exogenous TNF- α 를 가하였을 때의 세포 생존율의 측정

모세포주를 96well plate에 well당 10^4 개의 세포를 심고 12시간 배양한 후 etoposide 및 doxorubicin을 전술한 바와 같은 농도로 각각 첨가하고 TNF- α (recombinant human TNF- α , Genzyme사)를 최종농도가 10

ng/mL가 되도록 첨가하여 36시간 동안 추가로 배양하였다. 이렇게 추가 배양한후 세포생존율은 마찬가지로 MTT assay로 측정하였다.

5. TNF- α 유전자를 이입하여 변형시킨 모세포주에 Topoisomerase II Targeted Drug을 가하였을 때의 세포 생존율 측정

미리 TNF- α 유전자가 이입된 세가지 모세포주를 각각 96well plate에 10^4 cells/well이 되게 분주하고 12시간 배지에서 배양한 후 etoposide의 최종농도가 각각 0.1, 0.5, 1, 5, $10\mu\text{g/mL}$ 로 첨가된 배지로 교환하여 36시간 추가로 더 배양하였다. 그 후 생존한 세포의 비율을 MTT assay로 측정하였다.

모세포주의 경우와 마찬가지로 다른 well에는 adriamycin이 최종농도가 각각 0.01, 0.1, 1.0, $10.0\mu\text{g/mL}$ 로 첨가된 배지를 가하여 세포 생존율을 같은 방법으로 측정하였다.

6. 결과 분석 및 통계 처리

각 측정치는 6 well 이상에서 측정된 세포 생존율의 평균값으로 표시하였고 세 군에서 측정된 생존율의 각 군간 차이의 통계적인 유의성 검증은 Student's two-tailed t-test로 하였고 $p < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의한 차이를 보이는 것으로 생각하였다.

결 과

1. WEHI164 세포주에서 Etoposide에 대한 감수성의 비교

모세포주 WEHI164에 etoposide를 가하였을 때 etoposide의 농도와 세포의 생존율은 용량반응 관계를 보이며 농도가 높을 수록 세포 생존율은 낮았다. exogenous TNF- α (농도 10ng/mL)를 가한 군은 가장 생존율이 낮았고 TNF- α 유전자를 이입하여 변형시킨(transformed) 세포군은 가장 생존율이 높았다. 따라서 WEHI 164세포주에서는 TNF- α 와 etoposide를 같이 투여하면 세포 독성이 증대되었으나, TNF- α 유전자를 이입한 세포주에서는 오히려 항암제 감수성이 감소된 ($p < 0.05$) 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

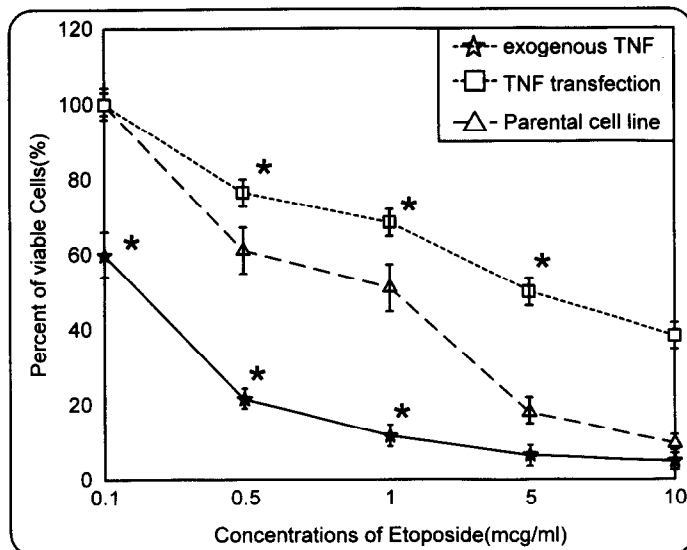


Fig. 1. Cell viability of WEHI 164 on etoposide treatment.

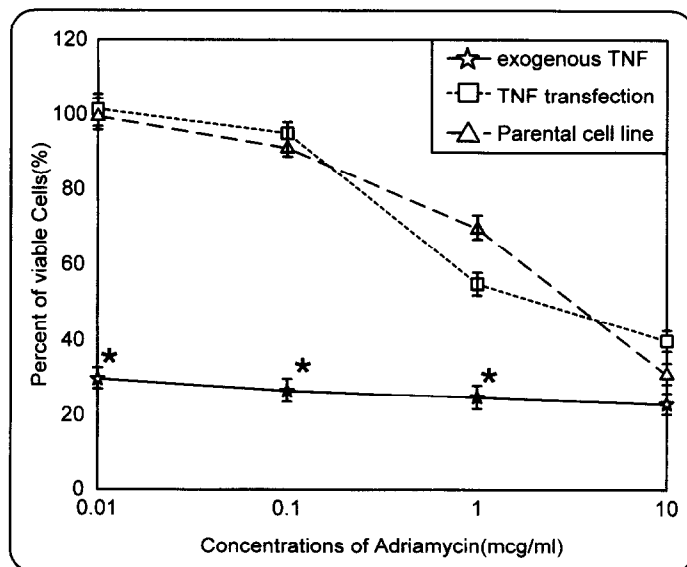


Fig. 2. Cell viability of WEHI 164 on adriamycin treatment.

2. WEHI164 세포주에서 Adriamycin에 대한 감수성의 비교

모세포주 WEHI164 세포주에 adriamycin을 가하였을 경우(대조군) adriamycin의 농도와 세포 생존율은 용량 반응관계를 보이며, 농도가 높을수록 세포 생존율

은 낮았다. exogenous TNF- α 를 가한 군은 각 농도에서 세포 생존율이 가장 낮았고($p < 0.05$) TNF- α 유전자를 이입한 군은 대조군과 세포 생존율의 차이가 없었고 통계적으로도 유의하지 않았다($p > 0.05$). 따라서 모세포에서 TNF- α 와 adriamycin을 병용하였을 때 adriamycin 단독에 비해서 세포 독성이 증가하지만 TNF- α 유전

자를 이입한 군에서는 항암제 감수성이 변화하지 않았음을 알 수 있었다(Fig. 2).

3. A549 세포주에서 Etoposide에 대한 감수성의 비교

모세포주 A549에 topoisomerase II inhibitor 항암제로서 etoposide를 가하였을 경우(대조군) etoposide의 농도와 세포 생존율은 용량 반응관계를 보이며 농도가 높을수록 세포 생존율은 낮았다. exogenous TNF- α 를

가한 군은 각 농도에서 모두 세포 생존율이 가장 낮았으나($p < 0.05$) TNF- α 를 이입한 세포주는 대조군에 비하여 오히려 세포 생존율이 의미있게 높아 항암제에 대한 내성을 보였다($p < 0.05$). 따라서 TNF- α 유전자를 이입한 세포주에서 대조군에 비하여 etoposide에 대한 항암제 감수성이 증가되지 않았음을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

또한 TNF- α 유전자를 이입한 군은 exogenous TNF- α 를 가한 군에 비하여 유의하게 세포 생존율이 높아 내

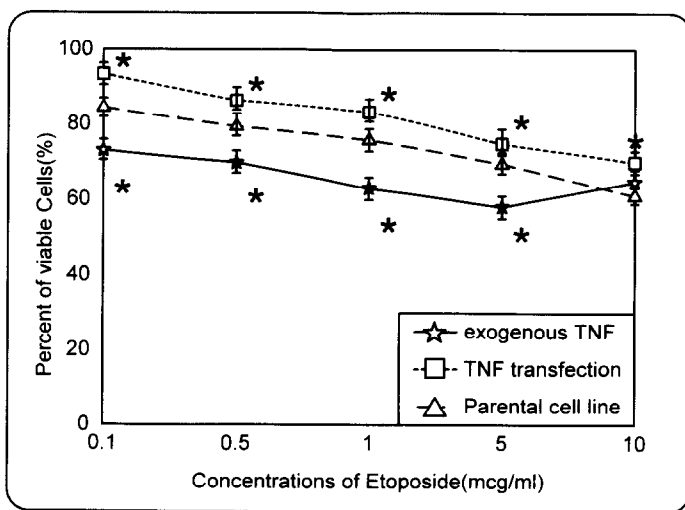


Fig. 3. Cell viability of A549 on etoposide treatment.

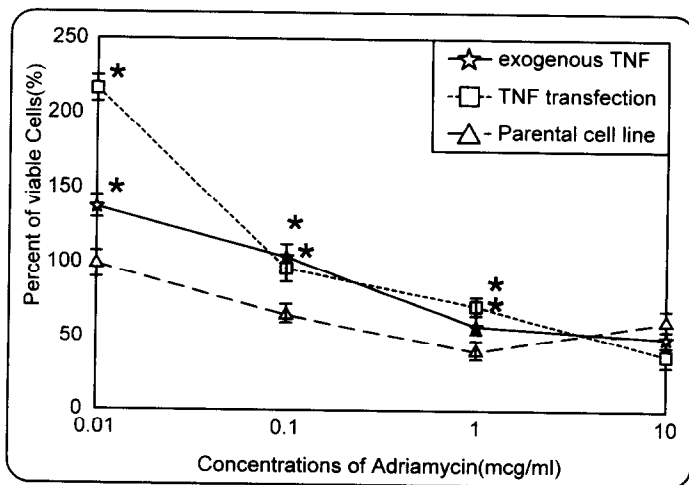


Fig. 4. Cell viability of A549 on adriamycin treatment.

성을 보였다($p < 0.05$).

4. A549 세포주에서 Adriamycin에 대한 감수성의 비교

모세포주인 A549 세포주에 adriamycin을 가하였을 경우(대조군) adriamycin의 농도와 세포 생존율은 용량

반응관계를 보이며 항암제 농도가 높을 수록 세포 생존율은 낮았다. exogenous TNF- α 를 가한 군은 대조군에 비하여 세포 생존율이 의미있게 높아($p < 0.05$) 항암제에 대한 내성을 보였고 TNF- α 유전자를 이입한 군에서도 대조군에 비하여 세포 생존율이 높아($p < 0.05$) 내성을 보였다. 따라서 TNF- α 유전자를 이입한 세포주에

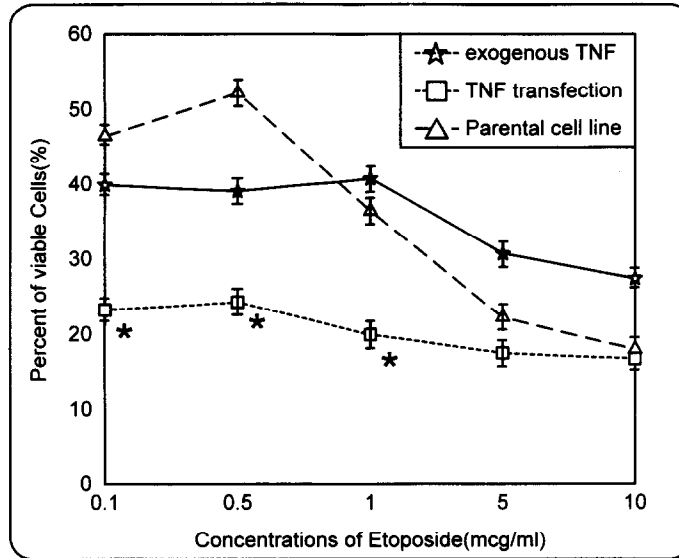


Fig. 5. Cell viability of H2058 on Etoposide Treatment.

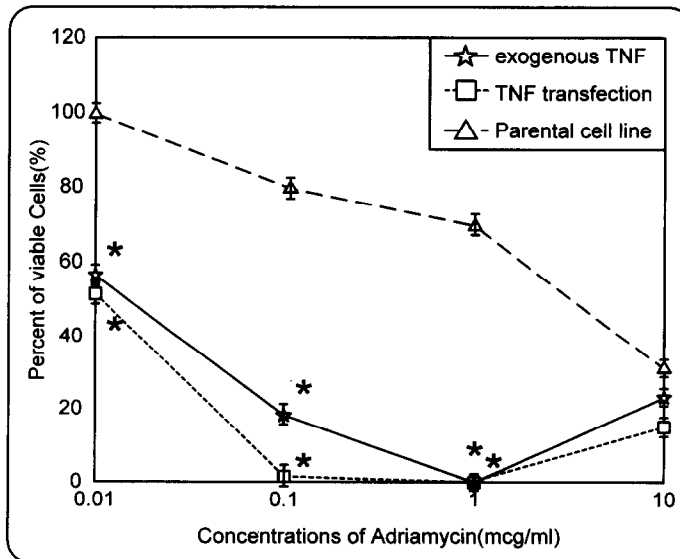


Fig. 6. Cell viability of H2058 on Adriamycin Treatment.

서 adriamycin에 대한 감수성이 대조군에 비해 오히려 감소되었음을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

5. H2058 세포주에서 Etoposide에 대한 감수성의 비교

모세포주 H2058에 etoposide를 가하였을 경우(대조군) etoposide농도와 세포 생존율은 용량 반응 관계를 보이며 농도가 높을수록 세포 생존율은 낮았다. exogenous TNF- α 를 가한 군은 세포 생존율이 대조군과 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않아($p > 0.05$), 항암제 감수성에 변화가 없었다. 반면 TNF- α 유전자를 이입한 세포주에서는 세포 생존율이 세군중 가장 낮았고 대조군에 비하여 통계적으로도 유의한 차이를 보여($p < 0.05$), TNF- α 유전자의 이입이 H2058 세포주에서는 항암제 감수성을 증가시킴을 알 수 있었다(Fig. 5).

6. H2058 세포주에서 Adriamycin에 대한 감수성의 비교

모세포주 H2058에 adriamycin을 가하였을 경우 adriamycin의 농도와 세포 생존율은 용량 반응관계를 보이며 농도가 높을수록 세포 생존율은 낮았다. Exogenous TNF- α 를 가한 군은 각 농도의 adriamycin에서 세포 생존율이 대조군보다는 낮았으나($p < 0.05$), TNF- α 유전자를 이입한 군보다는 높았다. TNF- α 유전자를 이입한 세포주에서는 세포 생존율이 가장 낮았고 이는 대조군과 비교하여 통계적으로도 유의한 차이를 보여서 H2058 세포주에서는 TNF- α 유전자의 이입이 adriamycin에 대하여 항암제 감수성을 증가시키는 것을 알 수 있었다(Fig. 6).

고 찰

TNF- α 의 생물학적 작용은 크게 비세포독성(nontoxic) 작용과 세포 독성(cytotoxic) 작용으로 나누어 생각할 수 있는데 비세포독성작용이란 주로 염증 반응과 면역 조절 반응에 관여하는 것을 말하며¹⁰⁾, 세포독성 작용이란 여러 종류의 인체 및 배지 종양 세포주에 대하여 세포 증식 억제(cytostatic) 또는 세포 용해(cytolytic) 작용을 말한다^{16,17)}.

TNF- α 는 주로 세균의 산물에 의하여 자극되어 대식세포(macrophage)에서 생산되거나 임파구도 TNF- α 를 분비하며 임파구는 또한 lymphotoxin을 생산한다¹⁸⁾. lymphotoxin은 임파구에서 생성된 종양분해 작용을 가진 단백질로서 1980년대에 동정 및 분리되었고 TNF- α 와 30%의 구조적 동질성(homology)을 가지며 TNF- β 로 불리기도 한다. 그 작용도 TNF- α 와 유사점이 많으며 TNF- α 와 같은 수용체(receptor)에 작용하고 생체외로(*in vitro*) 변환(transformed)된 세포에 대하여는 성장 억제(antiproliferative) 작용을 보인다¹⁹⁾. 또한 몇몇 상피 암종 및 섬유육종 세포의 변형된 세포주(transformed cell line)도 생체외에서(*in vitro*) TNF- α 를 생산할 수 있다는 사실이 알려져 있다^{20,21)}.

최근까지 TNF의 세포독성 작용, 특히 항암 세포에 대한 독성 작용을 이용하여 이를 암의 치료에 이용하고자 하는 많은 연구가 진행되어 왔다^{22,23)}. 그러나 TNF가 가진 암세포에 대한 세포독성을 인체에 직접 적용하기에는 많은 문제점이 있다는 사실이 역시 알려 졌다. 즉 TNF가 효과적인 항암 효과를 나타낼 수 있는 용량은 400~500 $\mu\text{g/kg/day}$ 이지만 5 $\mu\text{g/kg/day}$ 이상을 인체에 투여하였을 경우 심한 전신적 독작용이 발생하므로 적정량을 투여할 수가 없다는 것이다^{6,13)}. 따라서 TNF의 전신 독성을 피하면서 동시에 TNF의 효과를 나타내게 하기 위하여 암세포 주위에서만 국소적으로 작용할 수 있게 하는 방법이 모색되었다.

최근 분자 생물학의 눈부신 발전으로 인하여 유전자 치료(gene therapy)기법이 많이 발전하면서 항암 작용을 국소적으로 종양의 주위에서만 일어나도록 하는 연구가 시도되고 있다. Interleukin-2에 의하여 활성화된 종양 침윤 임파구(Tumor infiltrating lymphocyte, TIL)를 인체 흑색종에 주입하여 항암 효과를 얻었고²⁴⁾, 이후 retrovirus vector를 이용한 유전자 이입 기법이 발전되어 왔다. 이러한 연구중 자연적으로 TNF를 분비하는 종양 세포주를 생체내로(*in vivo*) nude mouse에 주입하였을 경우 생쥐 섬유 육종 세포주의 성장 및 침습성(invasiveness)이 감소하였다는 연구 결과가 보고되었고, retrovirus vector를 이용하여 TNF 유전자를 이입한 폐암세포주를 생체내로 nude mouse에게 주입하였을 때 실험적으로 생쥐에서 생겼던 종양이 그 성장이 억제

되거나 종양의 생성 자체가 억제되었으며²⁵⁾, 이러한 현상은 항 TNF항체로 역전되었다는 연구 결과가 보고되었다¹²⁾. 따라서 TNF 유전자를 암세포에 효과적으로 이입할 수 있다면 이를 인체 호흡기계암의 치료에도 응용할 수 있을 것이라는 가정을 해볼 수 있다¹²⁾. 그러나 이 연구에서도 TNF- α 유전자를 이입한 암세포에서 9개월째에도 육안적인 종양의 발생은 없었으나 현미경적인 미세 종양을 가지고 있어 종양의 완전한 소멸이 이루어지지 않음을 보여주었으므로 유전자 요법 단독으로는 종양의 완전한 치료가 불가능하여 복합요법이 필요함을 시사하였다.

한편 생체외로(*in vitro*) 투여한 recombinant TNF- α 와 chemotherapeutic agent, 특히 topoisomerase II targeted drug²⁶⁾을 함께 종양 세포주에 작용시켰을 때 양자의 항암세포 독성이 서로 상승적으로(synergistic) 작용하여 그 세포 독성이 증가되었다는 연구 결과들이 보고되었다^{5,9)}.

이러한 제반 연구결과들에 나타난 사실들을 기초로 하여 본 연구에서는 인체의 폐암 세포주, 중피종 세포주와 생쥐의 섬유육종 세포주에 대하여 임상에서 폐암의 항암 화학 요법에 쓰이는 대표적인 topoisomerase II targeted drug인 etoposide(VP-16)와 doxorubicin(adriamycin)을 가하였을 때 나타나는 항암 세포 독성 작용의 크기가 TNF- α 를 함께 배양조건에 투여하였을 때 상승적으로 증가되는지 확인하고, 다음으로는 TNF- α 유전자를 이입하여 TNF- α 를 발현시킨 세포주에서 각 항암제에 대한 세포 독성의 크기가 어떻게 변화하는지를 살펴 보고 만약 TNF- α 유전자 이입이 항암제에 대한 감수성을 증가시키는 것이 관찰된다면 호흡기계암의 치료에 있어 새로운 방법이 모색될 수 있으리라고 가정하였다.

본 연구의 결과에서 보인 바 외부에서 투여한 TNF- α 에 의하여 각 세포주의 topoisomerase II targeted drug에 대한 항암제 감수성은 WEHI164 세포주와 A549 세포주에서는 추가적으로 증가하였다. H2058 세포주에서는 doxorubicin에는 상승작용을 보이며 세포독성이 증가하였으나 etoposide에는 서로 상승작용을 보이지 않았는데, 그 이유는 명확하지 않았으나 세포주의 TNF- α 와 항암제에 대한 감수성의 차이 때문이라고 생각되

었다. 즉 WEHI164 세포주는 TNF- α 에 아주 감수성이 크고(highly sensitive) H2058 세포주는 중등도로 감수성이 있으며(moderately sensitive) A549세포주는 비교적 저항성을 보인다(resistant).

한편 각 모세포주로부터 변형된(transformed), 즉 TNF- α 유전자를 이입하였던 세포주에 topoisomerase II targeted drug을 작용시킨 경우 WEHI164 세포주와 A549 세포주에서는 모두 세포 독성을 증가시키지 못하였고 오히려 모세포주의 경우보다 세포 독성이 낮아 항암제에 대한 내성(resistance)을 보였다. WEHI164 세포주의 경우, 모세포주는 TNF- α 에 감수성이 크지만 TNF- α 유전자를 이입하여 변형시킨 세포주는 TNF- α 에 저항성을 보이는 것이 한 원인이 될 수 있으리라 생각된다. 그러나 H2058 세포주의 경우는 TNF- α 유전자의 이입이 etoposide나 doxorubicin에 대하여 모두 항암제 감수성을 증가시키는 것으로 나타났고 이는 외부에서(exogenous) TNF- α 를 투여한 경우보다도 오히려 세포 독성이 더 큰 것으로 관찰되었다.

WEHI164 세포주의 경우 외부에서 투여한 TNF- α 에는 항암제에 대한 감수성이 상승작용을 보였으나 TNF- α 유전자를 이입한 경우 오히려 저항성이 증가하였는데, 이는 TNF- α 에 감수성이 높은 세포가 TNF- α 유전자를 이입한 후 TNF- α 에 저항성을 가지게 되는 현상과 연관이 있으리라 보인다²⁵⁾. TNF- α 유전자의 이입이 TNF- α 에 대한 저항성을 가지게 되는 경우 그 기전은 명확하지 않으나 TNF 수용체의 하향 조절(down-regulation)이나 새로운 방어 작용을 가지는 단백질(protective protein)의 생성과 관련이 되리라고 생각되고 있으며 이 과정에서 항암제에 대하여도 유사한 기전으로 내성을 획득할 가능성을 생각할 수 있다.

이상의 결과로 TNF- α 유전자의 이입이 topoisomerase II targeted drug에 대한 항암제 감수성에 미치는 영향은 생체외(*in vitro*)의 경우 세포주에 따라 다양한 결과를 보여 일정한 규칙을 보이지는 않음을 알 수 있었다. 이로써 TNF- α 를 이입할 경우에 예상되는 항암제 감수성의 증대 효과는 모든 종류의 암세포주에 대하여 동일한 방향으로 나타나지는 않으나 암세포의 종류에 따라서는 유효한 효과를 나타낼 수도 있을 것으로 사료되었으며 향후 생체외로 여러가지 다양한 세포주에 대

한 TNF- α 유전자의 이입이 항암제 감수성에 대하여 미치는 효과를 관찰하여 더 일반적인 자료를 얻고 나아가 생체내로 어떤 효과를 얻을 수 있는 지에 대하여도 연구가 필요하다고 하겠다.

요 약

연구배경: 종양괴사인자(Tumor necrosis factor; TNF)는 다양한 생물학적인 작용을 가지며 종양 세포에 대한 세포 독성은 그 대표적인 기능중의 하나이다. TNF- α 는 생체외에서(*in vitro*) 몇몇 종양 세포주에 대하여 항암제, 특히 topoisomerase II targeted chemotherapeutic agent의 세포 독성 효과를 상승적으로 증가시키는 것이 알려져 있다. 최근 암세포에 대한 cytokine 유전자 요법에서 TNF는 중요한 대상으로 여겨지고 있으며, 유전자 이입에 의해 암조각이 TNF를 생성하게 될 경우 암 증식 억제 효과가 있음이 보고되고 있다. 연구자는 암세포에 TNF- α 유전자를 이입하여 자신이 TNF- α 를 생성하도록 형질을 변환시킨 암세포는 topoisomerase II 억제 항암제에 대한 감수성에 변화가 있을 것이라는 가설을 수립하였고 이를 검증하고자 본 연구를 수행하였다. 본 연구에서는 생체외로(*in vitro*) TNF- α 유전자를 이입하여 TNF- α 를 생성하는 암세포주에서 topoisomerase II targeted drug에 대한 항암제 감수성 효과가 모세포주에 비하여 증대될 수 있는지를 알아 보고자 하였다.

방법: TNF- α 에 감수성을 보이는 것으로 알려진 인체 중피종 세포주인 NCI-H2058 세포주 및 생쥐의 섬유육종 세포주인 WEHI164 세포주와 인체 비소세포 폐암 세포주인 A549 세포주를 배양하여, 먼저 임상에서 흔히 폐암의 항암 화학 요법 치료에 널리 쓰이는 대표적인 topoisomerase II targeted chemotherapeutic drug인 etoposide(VP-16)와 doxorubicin(adriamycin)을 가하였을 때 관찰된 세포 독성을 MTT assay로 측정하고, 각 모세포주(parental cell line)에 TNF- α 의 유전자를 이입시켜서 형질 변환한 세포주(transformed cell line)에 대하여 각각 동일한 항암제를 가하였을 때 관찰된 세포 독성의 정도를 같은 방법으로 측정하여, 그 결과를 비교 분석하였다. 또한 모세포주에 외부에서 TNF를

가하여 전처리한 후 동일한 항암제를 가하였을 때의 세포독성을 관찰하여 비교 분석하였다.

결과: H2058 세포주에서는 TNF- α 유전자를 이입한 세포주에 topoisomerase II targeted drug을 가하였을 때, 항암제 감수성이 모세포주에 같은 항암제를 가하였을 때에 비하여 의미있게 증가함을 관찰할 수 있었으나 ($p < 0.05$), WEHI 세포주와 A549 세포주에 있어서는 TNF- α 유전자를 이입한 세포주에서 모세포주에 비하여 항암제 감수성이 증가하지는 않았다.

결론: TNF- α 유전자의 이입이 topoisomerase II targeted chemotherapeutic drug에 대한 항암제 감수성을 증가시키는 효과는 세포주에 따라 다양한 결과를 보이는 것을 알 수 있었으며, 적어도 선택된 특정 종류의 호홉기계 암세포주에 있어서는 TNF- α 유전자의 이입으로 항암제 감수성(chemosensitivity)을 증가시킬 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) 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
- 2) Marmenout A, Fransen L, Tavernier J, Heyden J, Tizard R, Kawashima E, Shaw A, Johnson M, Semon D, Muller R, Ruyschaert M, Vliet VA, Fiers W: Molecular cloning and expression of human tumor necrosis factor and comparison with mouse tumor necrosis factor. Eur J Biochem 152:515, 1985
- 3) Beutler B, Cerami A: The biology of cachectin/ TNF - a primary mediator of the host response. Annu Rev Immunol 7:625, 1989
- 4) Philip R, Epstein LB: Tumor necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, γ -interferon and interleukin-1. Nature(Lond.) 323:86, 1986
- 5) Dawson DE, Fapany M, Burgess RC, Boesen PV, Headley DB: Tumor Necrosis Factor and

- Chemotherapeutic agents: Potentiation of cytotoxicity with interferon gamma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 118:1168, 1992
- 6) Williamson BD, Carswell EA, Rubin BY, Old LJ: Human tumor necrosis factor produced by human B-cell lines: Synergistic cytotoxic interaction with human interferon. Proc Natl Acad Sci USA 80:5397, 1983
 - 7) Giaccone G, Kadoyama C, Maneckjee R, Venzon D, Alexander RB, Gazdar AF: Effects of tumor necrosis factor, alone or in combination with topoisomerase-II-targeted drugs, on human lung cancer cell lines. Int J Cancer 46:326, 1990
 - 8) Doyle LA, Hamburger AW, Goldstein LG, Park HJ: Interaction of recombinant human tumor necrosis factor and etoposide in human lung cancer cell lines. Mol Biother 2:169, 1990
 - 9) Alexander RB, Nelson WG, Coffey DS: Synergistic enhancement by tumor necrosis factor of *in vitro* cytotoxicity from chemotherapeutic drugs targeted at DNA topoisomerase II. Cancer Res 47:2403, 1987
 - 10) Vanhaesebroeck B, Mareel M, Van Roy F, Grooten J, Fiers W: Expression of the tumor necrosis factor gene in tumor cells correlates with reduced tumorigenicity and reduced invasiveness *in vivo*. Cancer Res 51:2229, 1991
 - 11) Kirstein M, Fiers W, Baglioni C: Growth inhibition and cytotoxicity of tumor necrosis factor in L929 cells is enhanced by high cell density and inhibition of mRNA synthesis. J Immunol 137: 2277, 1986
 - 12) 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
 - 13) 오연목, 박계영, 정만표, 유철규, 김영환, 한성구, 심영수, 한용철: Retroviral vector를 이용한 TNF- α 유전자의 이입이 암세포의 종양괴사인자 감수성에 미치는 효과. 결핵 및 호흡기 질환 41:87, 1994
 - 14) Carmichael J, Degraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB: Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res 47:936, 1987
 - 15) Heo DS, Park J, Hata K, Day R, Herberman RB, Whiteside TL: Evaluation of tetrazolium-based semiautomatic colorimetric assay for measurement of human antitumor cytotoxicity. Cancer research 50:3681, 1990
 - 16) Old LJ: Tumor necrosis factor(TNF). Science (Washington DC) 230:630, 1985
 - 17) Fiers W, Beyaert R, Brouckaert P: Gene cloning and structure-function relationship of cytokines such as TNF and interleukins. Immunol Lett 16: 219, 1987
 - 18) Cuturi MC, Murphy M, Costa-Giomi MP: Independant regulation of tumor necrosis factor and lymphotoxin production by human peripheral blood lymphocytes. J Exp Med 165:1581, 1987
 - 19) Aggarwal BB, Mottat B, Harkins RN: Human lymphotoxin production by lymphoblastoid line, purification and initial characterization. J Biol Chem 35:686, 1984
 - 20) Spriggs DR, Imamura K, Rodriguez C, Sariban E, Kufe DW: Tumor necrosis factor expression in human epithelial tumor cell lines. J Clin Invest 81:455, 1988
 - 21) Spriggs DR, Imamura K, Rodriguez C: Induction of tumor necrosis factor expression and resistance in a human breast tumor cell line. Proc Natl Acad Sci USA 84:6563, 1987
 - 22) Vanhaesebroeck B, Van Bladel S, Lenaerts A, Suffys P, Beyaert R, Lucas R, Roy VF, Fiers W: Two discrete types of tumor necrosis factor-resistant cells derived from the same cell line. Cancer Res 51:2469, 1991

- 23) Darzynkiewicz Z, Williamson B, Carswell EA, Old LJ: Cell Cycle-specific effects of tumor necrosis factor. *Cancer Res* **44**:83, 1984
- 24) Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R: A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor infiltrating lymphocytes. *Science* **233**:1318, 1986
- 25) Vanhaesebroeck B, Decoster E, Ostade VX, Bladel VS, Lenaerts A, Roy FV, Fiers W: Expression of an exogenous tumor necrosis factor gene in TNF-sensitive cell lines confers resistance to TNF-mediated cell lysis. *J Immunol* **148**:2785, 1992
- 26) Liu LF: DNA topoisomerases - enzymes that catalyze the breaking and rejoining of DNA. *CRC Crit Rev Biochem* **15**:1, 1983
-