Adenovirus-p53이 비소세포폐암세포 성장에 미치는 영향에 관한 연구

박 종 호* · 이 춘 택** · 김 주 현***

=Abstract=

Effect of Adenovirus-p53 to Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines

Jong Ho Park, M.D.*, Choon-Taek Lee, M.D.**, Joo Hyun Kim, M.D.***

Background: The tumor suppressor gene p53 is one of the most frequently altered genes in human tumors, including those of the lung. There is now a compelling evidence that wild-type p53 can negatively influence cell growth by causing G1 arrest or by inducing apoptosis. The possibilities of using p53 for gene therapy are also gathering much interest. ***Material and Method:*** Our approach towards understanding p53 function would be to study the biological consequences of overexpression of wild-type p53 in normal and tumor cells by using adenovirus vectors capable of giving high levels of the p53 gene product in cells. We have used this vector containing wild-type p53 to infect tumor cells with different p53 status (null, mutant, or wild-type) to confirm that expression of p53 in null or mutant cell lines becomes possible by Adenovirus-p53 transduction, to examine the effects of high levels of p53 expression on the growth properties of tumor cells, to evaluate the role of apoptosis in p53-mediated biological effects, and to examine the effect of Adenovirus-p53 on the tumorigenicities of the lung cancer cell lines in vitro. ***Result:*** The results of our study showed that cells expressing endogenous mutant p53 and those devoid of p53 expression altogether were significantly more sensitive to Adenovirus-p53-mediated cytotoxicity compared to tumor cells expressing endogenous wild-type p53 and that overexpression of wild-type p53 induced programmed cell death. Also we knew that Adenovirus-p53 significantly reduced tumor colony formation of human non-small cell lung cancer cell lines, and decreased the growth of pre-formed colonies in vitro. ***Conclusion:*** These results suggest that adenovirus is an efficient vector for mediating transfer and expression of tumor suppressor genes in human non-small cell lung cancer cells and that the tumor cells null for p53 or expressing mutant p53 readily undergo apoptosis by Adenovirus-p53.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1998;31:1134-46)

Key word : 1. Carcinoma, non-small cell, lung
2. Gene therapy

* 원자력병원 흉부외과
Dept. of Thoracic Surgery, Korea Cancer Center Hospital, Seoul, Korea
** 원자력병원 호흡기내과
Dept. of Internal Medicine, Korea Cancer Center Hospital, Seoul, Korea
*** 서울대학교 의과대학 흉부외과학교실
Dept. of Thoracic & Cardiovascular Surgery, Seoul National University Hospital, Seoul, Korea
논문접수일 : 98년 4월 9일 심사통과일 : 98년 7월 1일
책임저자 : 박종호, (139-706) 서울특별시 노원구 공릉동 215-4, 원자력병원 흉부외과. (Tel) 02-970-1240, (Fax) 02-970-1239
본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

대흉외지
1998;31:1134-46

서 론

지난 10여년간 암 유전자와 종양억제 유전자들에 대한 많은 연구의 결과로 암은 세포내 유전자 변이에 의하여 발생된다는 사실이 밝혀지게 되었다[1]. 한편 고식적인 암치료 방법은 한계에 이르게 되었고 보다 효과적인 새로운 치료방법들이 연구되고 있는 실정이다. 이 중에 한 가지가 암에 대한 유전자 치료법인데, 이는 종양억제 유전자나 암 유전자에 대한 anti-sense, 또는 이와 관련된 다른 유전자를 치료에 이용하는 방법이다[2,3]. 궁극적으로 암에 대한 유전자 치료법이란 소실된 종양억제 유전자의 기능을 회복 시키거나, 암을 유발시킬 수 있는 유전자의 기능을 제거하는 것이다. 이를 위해서는 치료 유전자들이 종양세포 안으로 쉽게, 그리고 효과적으로 전달될 수 있어야 함은 물론이다.

종양억제 유전자중 하나인 p53은 폐암 등을 비롯한 악성종양에 가장 흔히 발견되는 유전자 변이의 대상이 되고 있으며, 종양의 유전자치료에 가장 광범위하게 연구되고 있다[4,5]. 최근에는 정상세포 안에서의 p53 기능 및 p53 변이와 세포성장과의 관계, 그리고 유전자 치료에서 정상 p53의 역할 등에 관한 연구가 관심을 끌고 있다[6,7]. 이런 여러 실험을 통하여 정상적인 p53은 G1 arrest나 세포자멸을 통하여 세포성장을 억제한다는 사실이 알려지게 되었다[8,9]. 아울러 p53 변이가 있는 세포에서는 p53 기능들이 소실되어 비정상적인 세포성장이 야기된다는 것도 밝혀졌다[4,10]. p53 단백질은 진화 과정에서 매우 보존적이며, 지금까지 알려진 정상 p53의 기능을 보면 세포 사이클의 조절, 전사 조절, DNA 복제, 그리고 세포자멸의 발현 등에 관여하는 것으로 알려져 있다[11-14].

최근들어 adenovirus, herpesvirus, vaccinia virus, 그리고 adeno-associated virus(AAV) 등과 같은 DNA viruses 성질을 이용한 많은 유전자 전달중개물 들이 개발되었다[15-17]. 이런 유전자 전달체계 중 하나인 adenovirus 중개물은 다른 virus 중개물이나 인위적으로 DNA를 성숙핵세포(eukaryotic cell) 안으로 이입 시키는 방법들에 비하여 많은 장점들을 지니고 있다. 즉 adenovirus 중개물은 비교적 큰 유전자의 전달이 가능하고, 배양 및 조작이 간편하며, 광범위한 숙주와 다양한 주입 경로가 있으며, 숙주세포에 다른 유전자변이를 유발시킬 가능성이 낮다는 장점들을 지니고 있다[18,19].

따라서 이번 실험의 목적은 기존의 치료방법으로는 한계에 이른 비소세포폐암에 대하여 유전자 치료에 대한 가능성을 파악하기 위하여 가장 많이 연구되고 있는 종양억제 유전자인 p53과 최근 많은 관심이 집중되고 있는 유전자 전달 중개물인 adenovirus를 이용하여 각각 다른 p53 성질 (null, mutant, or wild-type)을 가지고 있는 비소세포폐암 세포들을 대상으로 각각의 세포성장 및 종양형성능력에 p53 단백질이 미치는 영향을 관찰하고, p53에 의한 세포독성과 세포자멸의 관계를 조사하는데 있었다.

Table 1. p53 status of Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines.

Cell line	p53 charachter
NCI H358 cell line	Null for p53
NCI H441 cell line	mutant p53 (Exon 5-codon 158)
NCI H460 cell line	normal p53
PC9 cell line	mutant p52 (Exon 7)

대상 및 방법

1. 실험 대상

실험 대상은 모두 4가지의 인체 비소세포폐암 세포주를 이용하였다. ATCC(American Type Culture Collection)로부터 공급받은 NCI H 358 세포주와 NCI H 441 세포주, 그리고 서울대학교 의과대학 한국 세포주 은행에서 구입한 NCI H 460 세포주를 이용하였으며, 여기에 원자력병원 분자종양학 연구실에서 보관중인 PC 9 세포주를 추가 하였다. 이 세포들은 37℃, 5% CO_2 배양기에서 5% fetal bovine 혈청과 균 증식 억제를 위한 penicillin-streptomycin을 첨가한 RPMI 배지에서 배양하였으며, 배지 및 혈청은 미국의 Sigma Chemical Co.(St. Louis, Mo)로부터 구입한 제품을 사용하였다. 이 4가지 세포주들의 p53에 대한 특징은 Table 1과 같다.

2. 실험 방법

(1) Recombinant Adenovirus-p53의 제작

이번 실험에서 사용된 p53 표현중개물은 adenovirus를 이용하였으며, 이는 미국 Texas 대학, Southwestern Medical Center의 Dr. Robert Gerard로부터 제공받은 pACCMV-p53을 사용하여 제작하였다. pACCMV-p53은 pACCMVpLpA plasmid의 pUC19 multicloning site에 정상 p53 cDNA를 이입시켜 만든 것이다. 그리고 pACCMVpLpA plasmid는 pAC plasmid의 변형체이며, 이는 pAC plasmid에 CMV promoter/enhancer element, pUC19 cloning cassette, 그리고 SV40 polyadenylation signal 등이 이입되어 형성된 것이다. pACCMV-p53와 recombinant plasmid인 pJM17을 293 세포주에서 Calcium Phosphate method를 이용하여 cotransfection 시켜 homologous recombination이 일어나게 하였다. 세포배양 부유물로부터 채취된 DNA sample을 이용하여 PCR을 시행하여 homologous recombination이 계획된대로 일어났는지 확인하였다. 한편 CsCl-gradient-

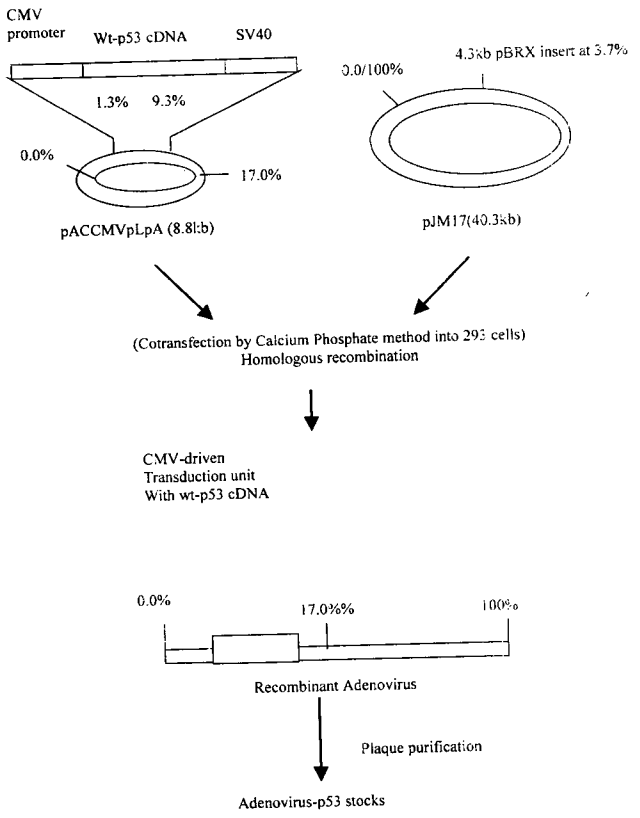


Fig. 1. Scheme for generation of recombinant Adenovirus-p53

purification method를 이용하여 실험에 사용될 Adenovirus-p53을 대량 생산하였으며 Plaque assay method를 이용하여 이를 정량화 하였다. 그리고 transduction efficiency test에 사용될 Adenovirus-LacZ도 이와 같은 방법으로 제작하였다. 이번 실험에 사용된 Adenovirus-p53의 제작 과정은 Fig. 1에 요약되어 있다

(2) Transduction efficiency test with Adenovirus-LacZ

Adenovirus-LacZ를 여러 다른 MOI(multiplicity of infection)로 폐암 세포주(NCI H358, NCI H460, PC 9)에 이입시켜 측정하였다. NCI H358(5×10^4), NCI H460(5×10^4), PC 9(1×10^5) 세포주들을 6-well plate에 분주하고 하루 정도 배양시켜 plate에 세포를 고정시켰다. 대상 세포의 수를 세고 대상 세포당 0 MOI(비교군), 5 MOI, 10 MOI, 20 MOI, 50 MOI로 이입시킨 후 50분 동안 배양기에서 배양하였고 virus 상층액을 제거한 후 각각의 세포에 맞는 배지(RPMI+8% FBS)로 채운 뒤 이틀간 CO_2 배양기 안에서 배양하였다. 이를 0.5% glutaldehyde 용액으로 고정후 X-gal 용액을 넣고 배양기에서 2시간 염색하였다. X-gal 용액으로 염색한 후 푸른색으로 염색된 세포와 염색되지 않은 세포의 수를 세어 백분율로 이입률(transduction efficiency)을 계산하였다.

(3) Western blotting analysis

Adenovirus-p53이 p53 단백질을 생성하는 지를 확인하기 위하여 Western blot assay를 실시하였다.

대상 세포를 각각 60mm plate에 5×10^5 개씩 분주하고, Adenovirus-p53을 이입시킨 후 24시간 동안 배양하였다. 이를 phosphate buffered saline으로 세척후 SDS-PAGE sample buffer로 녹여 세포 용해물을 얻었다. 일정량의 용해물을 부은 후 SDS-PAGE 전기영동을 실시하였다. Gel의 단백질을 Hybond-ECL membrane (Amersham)에 흡착시킨 후 반응중지 완충제(5% nonfat milk/0.2% Tx-100/PBS)로 고정시켰다. 새로운 반응중지 완충제에 일차 항체(Mouse Monoclonal Ab, NCL-p53-DO7, NOVOCASTRA)를 반응시키고, 이차 항체인 Bio-Rad 항체(Goat Anti-Mouse IgG(H+L)-AP Conjugated, BIO-RAD)를 이용하여 반응시켰다. 발색을 유도하고 이를 실온에서 말린 후 판독하였다.

(4) Immunoprecipitation

역시 Adenovirus-p53이 p53 단백질을 생성시키는지 확인하기 위하여 면역침전법(Immunoprecipitation)을 실시하였다. 실험 대상 세포는 NCI H 358 세포주와 PC 9 세포주였으며, 각각 대조군, Adenovirus-Luc, 그리고 Adenovirus-p53을 이용하여 비교하였다. 각각의 세포주를 4개의 10cm plate에 10×10^5 씩 분주하고 mock infection, Adenovirus-Luc, 10MOI의 Adenovirus-p53 그리고 50MOI의 Adenovirus-p53으로 이입시킨 후 24시간 동안 배양하였다. 여기에 methionine-free DMEM(Biofluids)를 넣고 배양한 후 PBS 용액으로 세척시키고 완충액에 녹였다. 500 μl ^{35}S-labeled된 용해물에 1:50으로 희석시킨 anti-p53 mAb PAb 1801(Ab-2 ; Oncogene Science, Uniondale, NY)을 첨가하여 반응시키고 15 μl의 protein A/G agarose(Oncogene Science)를 첨가하였다. 각각을 원심 분리하여 압축결정으로 만들고 Immunoadsorbent로부터 p53 단백질을 분리하기 위하여 50 μl의 1X SDS gel-loading buffer를 첨가하고 가열하였다. 각각을 원심분리 시킨 후, 20 μl의 상층액을 8% SDS-PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)에 부과하여 전기영동을 실시하였다. Gel을 분리한 후 이를 건조 시킨 후 X-ray film에 현상하였다.

(5) In vitro growth assay after transduction with Adenovirus-p53

Adenovirus를 이용한 p53이입이 폐암 세포의 성장에 미치는 영향을 알아 보기 위하여 NCI H 358 세포주, NCI H 441

세포주, NCI H 460 세포주 그리고 PC 9 세포주를 대상으로 대조군(배양 배지를 이용함), Adenovirus-Luc, 그리고 Adenovirus-53을 20MOI로 이입시킨 후 6 well plate에서의 성장을 5일 동안 비교 관찰하였다. NCI H 358 세포주(5×10^5/plate), NCI H 441 세포주(5×10^4/plate), NCI H 460 세포주(5×10^5/plate) 그리고 PC 9 세포주 (5×10^4/plate)을 6 well plate에 분주 하였다. 한 개의 세포주 당 18 well에 분주하였으며 각각의 plate에 대조군은 배양 배지를, 그리고 다음은 Adenovirus-Luc, Adenovirus-p53을 각각 20 MOI씩 6 well plate에 덮어서 이입을 시도하였다. 하루 간격으로 hemocytometer를 이용하여 5일 동안 각각의 세포수를 측정하였다.

(6) Adenovirus-p53 mediated apoptosis

Adenovirus-p53에 의한 폐암 세포주의 성장억제 기전을 알아 보기 위하여 세포자멸에 의해 나타나는 DNA fragmentation을 관찰하였으며, 또 세포자멸의 형태학적 검사도 시도하였다. DNA fragmentation assay는 NCI H 358 세포주와 NCI H 460 세포주를 대상으로 실험하였으며, 형태학적 검사는 NCI H 358 세포주를 대상으로 실시하였다.

1) DNA fragmentation assay

NCI H 358 세포주와 NCI H 460 세포주를 대상으로 대조군과 Adenovirus-p53 이입군으로 나누었다. Adenovirus-p53은 50MOI로 이입시킨 후 24시간 동안 배양하였으며 이를 원심분리하여 압축결정으로 만든 후 완충액에 반응시켜 DNA를 분리하였다. 여기에 phenol/chloroform extraction method를 이용하여 DNA를 추출한 후 건조시켰다. 이렇게 추출된 DNA를 다시 물에 녹여 각각의 DNA sample을 1.5% agarose gel에 부과한 후 전기 영동을 실시하였으며, 이를 ethidium bromide로 염색 후 UV-light를 쪼여서 DNA fragmentation 여부를 확인하였다.

2) 세포자멸의 형태학적 검사

NCI H 358 세포주를 분주시킨 후 50MOI의 Adenovirus-p53을 이입시킨 후 배양하였다. 4% formaldehyde(pH 7.4)를 이용하여 고정시키고, 5g/ml의 Hoechst dye 33258(Sigma Chemical Co.)를 이용하여 반응시켰다. 이를 PBS 용액으로 세척시킨 후, glycerol을 함유한 PBS(PBS : glycerol = 3:1)로 mounting하고 fluorescence microscope을 이용하여 세포자멸체(apoptosis body)의 존재 여부를 관찰하였다.

(7) Soft agar clonogenic assay

폐암세포에 의하여 형성된 집락(colony)에 Adenovirus-p53이 미치는 영향을 관찰하기 위하여 soft agar clonogenic assay를 시행하였다. NCI H 358 세포주, NCI H 460 세포주 그리고 PC 9 세포주를 대상으로 각각 대조군 (배양 배지를 이용함), Adenovirus-Luc, 그리고 Adenovirus-p53으로 이입시켜 실험을 실시하였다. 아울러 이미 형성된 집락에 Adenovirus-p53이 미치는 영향에 대해서도 실험을 실시하였다.

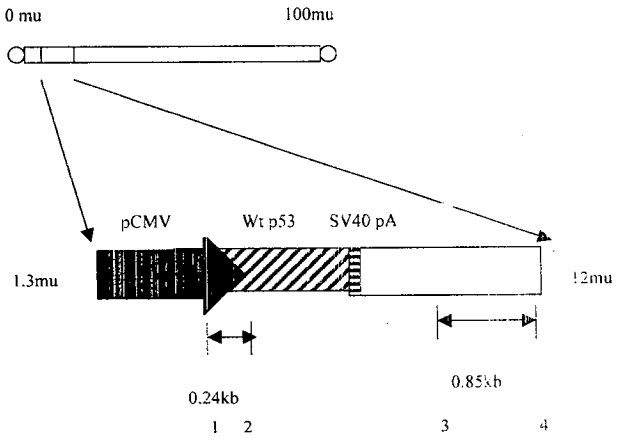
각각의 세포주를 배양한 후 원심분리 시켰다. 이를 7% FBS RPMI 배지에 희석시킨 후 hemocytometer를 이용하여 세포농도를 계산하고 20 MOI의 Adenovirus-Luc와 Adenovirus-p53을 넣은 후 24시간동안 반응시켰다. 한편으로 50cc Falcon tube에 2% agarous gel 3cc와 두 배로 희석된 16% Fetal Bovine 혈청, 그리고 항생제가 혼합된 RPMI 3cc를 섞은 후 굳기 전에 well당 1cc씩 부었다(underlay). 그리고 다시 50cc Falcon tube에 각각의 세포를 5×10^3개씩 넣고 여기에 항생제가 함유된 2배 가량의 16% FBS RPMI 배지 및 0.4% agarous gel 1.5 cc를 넣어 이전에 준비한 underlay 6 well에 1cc씩 분주하였다. 다시 RPMI와 0.4% agarous gel을 44℃ 정도로 데운 후 6 well plate를 overlay하였다(triplicate). 상온에서 overlay가 굳으면 이를 37℃, CO_2 배양기 안에 넣고 배양시켰다. 2~3주 후에 크기가 200m 이상인 집락수를 세었다.

그리고 위의 방법에서 단지 Adenovirus-Luc와 Adenovirus-p53으로 이입시키지 않은 soft agar clonogenic assay dish를 만들어 약 1주일 가량 배양시키면 작은 집락들이 형성된다. 여기에 각각 RPMI 1cc, RPMI 1cc + Adenovirus-Luc 50 MOI, 그리고 RPMI 1cc + Adenovirus-p53 50MOI의 혼합물을 만들어 붓고 배양시킨 후, 1주일 뒤에 한 차례 더 혼합물을 만들어 붓고 4주간 배양하였다. 4주후 크기가 200μm 이상인 집락수를 세었다.

결 과

(1) Recombinant Adenovirus-p53의 제작 및 확인

미국의 Dr. Robert Gerard (University of Texas, Southwestern Medical Center)로부터 공급받은 pACCMV-p53 (p53 expression vector)를 이용하여 Adenovirus-p53을 제작하였다. 이를 recombinant plasmid인 pJM17과 293 세포에서 cotransfection시켜 homologous recombination이 일어나게 하였다(Fig. 1). 이렇게 만들어진 Adenovirus-p53의 예상되는 genome 구조는 Fig. 2와 같으며, 확인 과정은 DNA sample에 대한 PCR 과정을 통하여 실시하였다(Fig. 3). 여기에 사용된 primer들은 Fig.2에 표시하였다. 그리고 CsCl gradient-purified Adenovirus-p53 DNA를 가지고 HinIII를 이용한 restriction mapping을 실시하여 다시 한번 확인 과정을 거쳤다(Fig. 4). Adenovirus-p53은 adenovirus의 E1 region을 p53 expression cassettes로 대치한 것이기 때문에 E1 deletion을 보충해 줄 수 있는 293 세포 안에서만 번식할 수 있고, Adenovirus-p53의 5′ end는 AdWTp53의 expression cassette (10.3mu)이 차지하고 있으며, 나머지는



Primer 1: 5'-ATCTACAGTCCCCCTTGCCG-3'
Primer 2: 5'-GCAACTGACCGTGCAAGTCA-3'
Primer 3: 5'-TCGTTTCTCAGCAGCTGTTG-3'
Primer 4: 5'-CATCTGAACTCAAAGCGTGG-3'

Fig. 2. Adenovirus-p53 genome structure, PCR primer locations and their sequences

adenovirus genome이 연결되어 있다. Adenovirus-p53 expression cassette의 주요 부위는 5′ end로부터 left inverted terminal repeat, adenoviral origin of replication, encapsidation signal, E1a enhancer, cytomegalovirus immediate early promotor, human wild-type p53 cDNA, 그리고 SV40 polyadenylation signal등으로 구성되어 있다(Fig. 2).

(2) Transduction efficiency test with Adenovirus-LacZ staining

유전자를 전달하는 중개물로서 adenovirus의 장점 중에 하나는 바로 여러 종류의 숙주세포 들에 대한 감염력이 매우 높다는 점이다. 그러나 여러 종류의 세포주들은 흡수능력이나 유전자를 통한 발현 능력에 차이가 있으므로, 이번 실험에 사용된 비소세포폐암 세포들에 대한 Adenovirus-p53의 이입력(transduction efficiency)에 관하여 먼저 실험을 실시하였다. 실험은 p53 유전자가 소실된 NCI H358 세포주, 정상적인 p53을 가지고 있는 NCI H460 세포주와 p53 점변이가 있는 PC9 세포주를 대상으로 Adenovirus-LacZ을 이용하여 실시하였다. 각기 다른 농도의(0, 5, 10, 20, 50 MOI) Adenovirus-LacZ을 이입시킨 후 X-gal 염색을 하여 푸른색으로 염색된 세포와 염색되지 않은 세포를 세어 백분율로 표시하였다. Fig. 5는 각각의 농도에 따른 이입력(transduction efficiency)을 나타낸 것인데 20 MOI의 Adenovirus-LacZ로 이입시킬 경우 세포의 98~100%가 염색된다는 사실을 알 수 있었다.

Fig. 3. Amplification of p53 target sequences in recombinant Adenovirus-p53

(M: 1kb DNA Ladder, Lane 1: Adenovirus-p53 with p53 primers (#4), Lane 2: Adenovirus-p53 with adenoviral primers, Lane 3: Lung cancer control with p53 primers (#4), Lane 4: Adenovirus-Luc with adenoviral primers, Lane 5: Negative control)

p53 primers (#4) S : 5'-ATCTACAGTCCCCCTTGCCG-3'
AS : 5'-GCAACTGACCGTGCAAGTCA-3'
Adenoviral primers S : 5'-TCGTTTCTCAGCAGCTGTTG-3'
AS : 5'-CATCTGAACTCAAAGCGTGG-3'

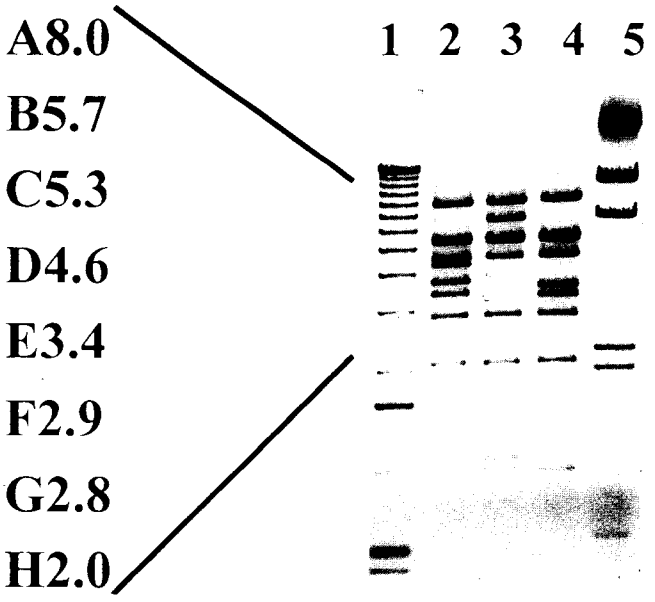


Fig. 4. HindIII restriction digests of recombinant adenoviruses

(Lane 1: 1 kb molecular weight marker, Lane 2: HindIII digest of pJM17, Lane 3: HindIII digest of Adenovirus β-gal, Lane 4: HindIII digest of Adenovirus-p53, Lane 5: λ DNA-HindIII marker)

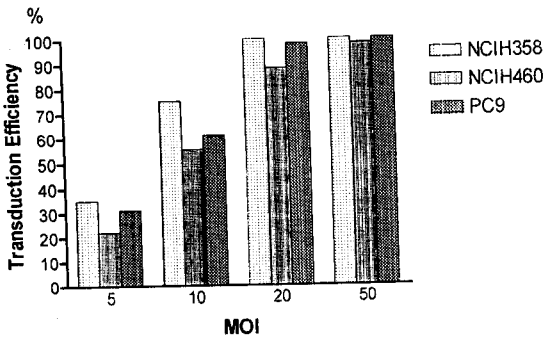


Fig. 5. In vitro transduction efficiency of non-small cell lung cancer cell lines with Adenovirus β-gal staining. (MOI: multiplicity of infection)

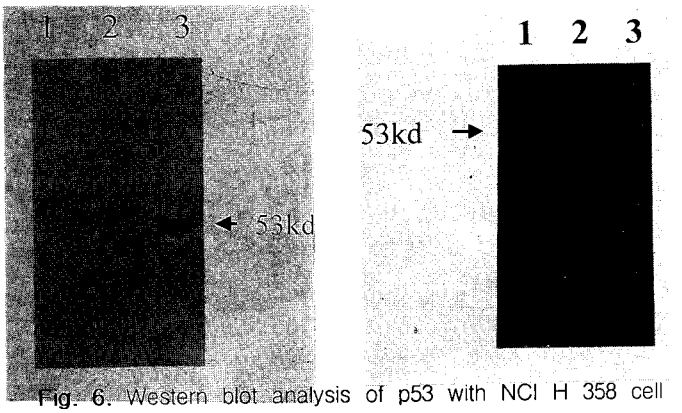


Fig. 6. Western blot analysis of p53 with NCI H 358 cell line(a), and NCI H 460 cell line (b).
(Lane 1: Control, Lane 2 : Adenovirus-Luc, Lane 3 Adenovirus-p53)

(3) Western blot analysis

Adenovirus-p53으로 이입시킬 경우 p53 단백질을 생성할 수 있는가를 확인 하기 위하여 Western blot assay를 실시하였다. 대상은 정상적인 p53을 가지고 있는 NCI H460 세포주와 p53 소실이 있는 NCI H358 세포주로 하였다. 결과를 보면 NCI H358 세포주를 Adenovirus-p53으로 이입하는 경우, 대조군 (mock infection with media) 또는 Adenovirus-Luc로 이입하는 경우보다 p53 단백질 생성이 현저히 증가되어 있는 것을 알 수 있었으나 NCI H460 세포주에서는 세 군 사이에 차이가 없었다(Fig. 6).

(4) Immunoprecipitation

역시 마찬가지로 Adenovirus-p53으로 이입시킬 경우 p53 단백질을 생성하는가를 확인하기 위하여 면역침전법을 실시하였다. 대상은 p53 점변이가 있는 PC 9 세포주와 p53 유전자 소실이 있는 NCI H358 세포주로 하였다. 각각 대조군, Adenovirus-Luc, 10 MOI Adenovirus-p53, 그리고 50 MOI Adenovirus-p53으로 이입시킨 후 비교하였다. Fig. 7이 그 결과를 보여주고 있는데, mock infection 또는 Adenovirus-Luc로 이입시킨 후에는 p53이 보이지 않으나 Adenovirus-p53으로 이입시킨 경우에는 쉽게 p53 단백질이 보이고 있다. 또 Adenovirus-p53의 양을 증가시킬수록 p53 단백질의 양도 따라서 많아짐을 알 수 있다.

In vitro growth assay after transduction with Adenovirus-p53

각각의 세포주는 대조군(배양 배지 사용), Adenovirus-Luc, 그리고 20MOI의 Adenovirus-p53을 이입시킨 후 5일간 관찰하였으며, 매일 세포수를 세었다. 결과를 보면 p53 유전자 소실이 있는 NCI H358 세포주와 p53 점변이가 있는 NCI H441과 PC 9 세포주들은 각각의 대조군에 비하여 98%, 92%, 그리고 44%의 성장억제 효과를 보였으나, 정상적인 p53을 가지고

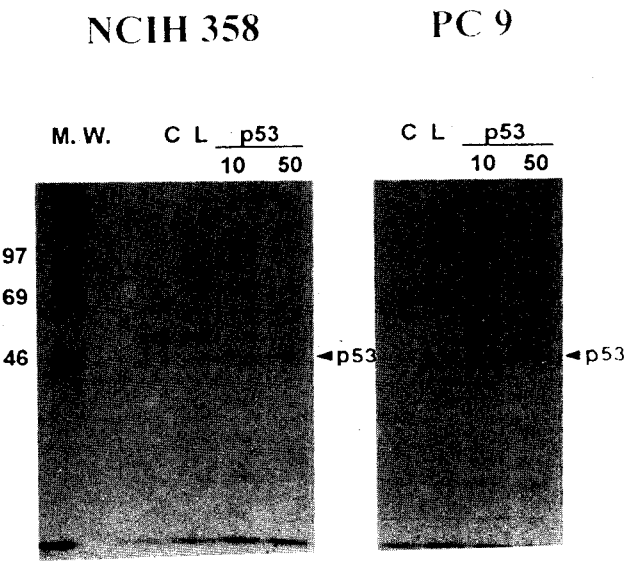


Fig. 7. Immunoprecipitation for p53 expression analysis in NCI H 358 and PC 9 cell lines after Adenovirus-p53 transduction(C: Control, L: Adenovirus-Luc, p53: Adenovirus-p53, 10: 10MOI transduction, 50: 50MOI transduction)

있는 NCI H460 세포주에서는 대조군에 비하여 단지 27%정도의 성장억제만을 보였다(Fig. 8). 그리고 대조군과 Adenovirus-Luc군간의 성장억제는 거의 비슷함을 알 수 있었다.

(6) Adenovirus-p53 mediated apoptosis

(1) DNA fragmentation assay

Adenovirus-p53으로 이입시킬 경우에 nucleosomal DNA fragmentation을 유발 시키는지 여부를 확인하여 보았다. 대상은 p53이 없는 NCI H358 세포주와 정상적인 p53을 가지고 있는 NCI H460 세포주로 설정하였다. Fig.9에서 보듯이 각각의 세포주들을 50MOI의 Adenovirus-p53으로 24시간 반응시

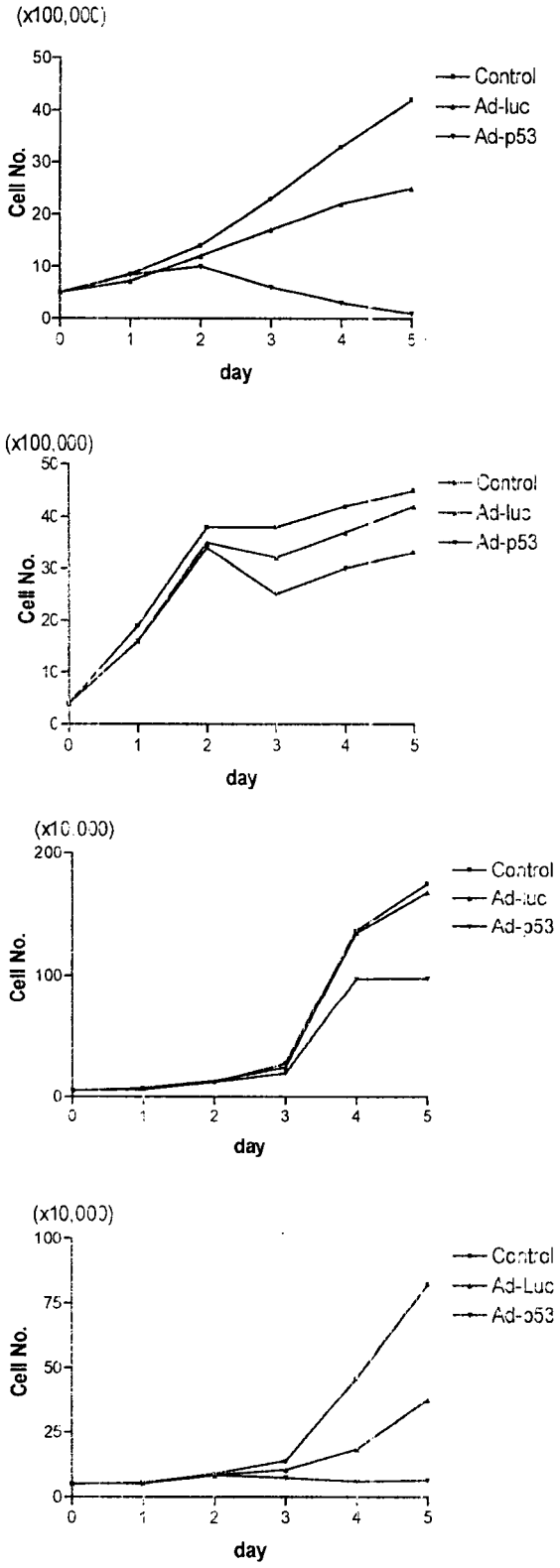


Fig. 8. Growth curve of non-small cell lung cancer cell lines after transduction of Adenovirus-p53.
(a): NCI H 358 cell line, (b): NCI H 460 cell line, (c): PC 9 cell line, (d): NCI H 441 cell line

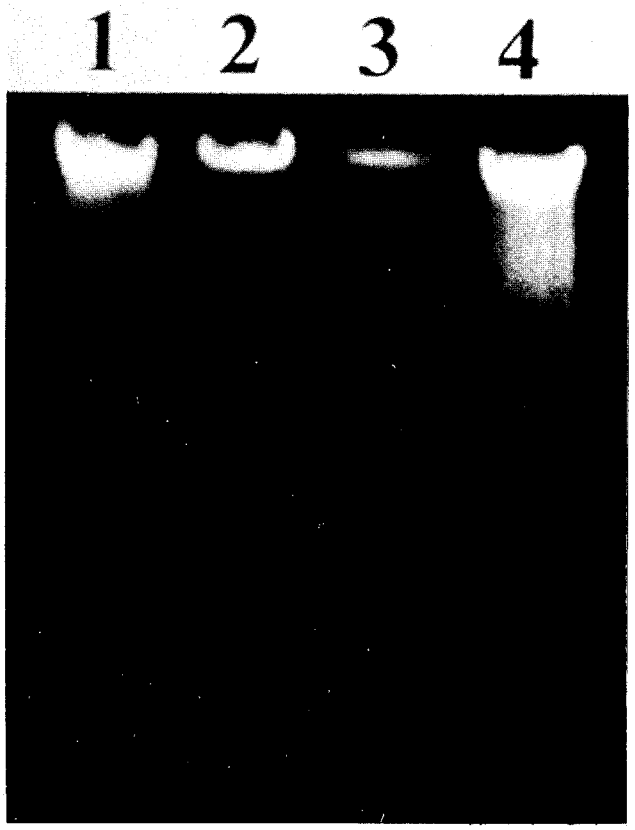


Fig. 9. Nucleosomal DNA fragmentation in Adenovirus-p53 infected NCI H 358 and 460
non-small cell lung cancer cell lines.
Lane 1: NCI H460 control,
Lane 2: NCI H460 Adenovirus-p53 transduction,
Lane 3: NCI H358 control,
Lane 4: NCI H358 Adenovirus-p53 transduction

킨 후 살펴 보았다. NCI H358 세포주에서는 세포자멸이 일어난 세포들에 특징적으로 나타나는 145~1050 bp 사이에 lower molecular weight DNA bands(DNA laddering)를 확인할 수 있었다. 그러나 Adenovirus-p53이 이입된 NCI H460 세포주와 이입되지 않은 대조군에서는 DNA laddering을 관찰할 수 없었다.

2) 세포자멸의 형태학적 관찰

DNA fragmentation assay에서 DNA laddering을 보인 NCI H358 세포주가 세포자멸에 의한 것임을 다시 확인하기 위하여 세포자멸체(apoptosis body)를 광학현미경으로 살펴 보았다. 실험방법은 전술한 바와 같이 in situ apoptosis detection deoxynucleotidyl transferase end labeling 방법에 의하여 형광물질을 띄는 세포자멸체의 유무를 확인하였다. Fig.10은 NCI H358 세포주에서의 형광성 세포자멸체를 보여주고 있다. 이

Fig. 10. Morphologic evaluation of apoptosis in NCI H358 cells with Hoechst dye 33258.
[White Arrows indicate condensed chromatins (apoptosis bodies)]

상의 실험 결과에서 p53이 없거나 내부 변이성 p53을 가진 세포들이 Adenovirus-p53에 이입된 후의 성장억제 기전은 세포자멸에 기인한다는 것을 알 수 있었으며, 반면에 정상적인 p53을 가지고 있는 경우에는 Adenovirus-p53에 의한 세포자멸이 일어나지 않음을 관찰할 수 있었다.

7) Soft agar clonogenic assay

비소세포폐암의 형성된 집락(colony)에 Adenovirus-p53이 미치는 영향을 관찰하기 위하여 Soft agar clonogenic assay를 실시하였다. 대상은 p53이 없는 NCI H358 세포주와 정상적인 p53을 가지고 있는 NCI H460 세포주, 그리고 p53 점변이가 있는 PC 9 세포주 등으로 하였으며, 각각을 대조군, Adenovirus-Luc 이입군, 그리고 Adenovirus-p53 이입군으로 나누었다. NCI H358 세포주에서는 예상대로 Adenovirus-p53으로 이입된 경우 집락 형성이 거의 완전히 억제되었으며(99%), NCI H460 세포주에서는 집락 형성이 크게 억제되지 않을 것으로 예상되었으나, 역시 대조군에 비하여 80% 정도나 성장이 억제되었다. 또 집락 성장이 크게 억제되리라 생각되었던 p53 점변이가 있는 PC 9 세포주의 성장은 55% 정도에 불과하였다(Fig. 11).

그리고 집락이 이미 형성된 비소세포폐암에 Adenovirus-p53이 미치는 영향을 관찰하기 위하여 p53이 없는 NCI H358 세포주와 정상적인 p53을 가지고 있는 NCI H460 세포주를 대상으로 실험을 실시하였다. 예상대로 NCI H358 세포주에서는 집락 성장이 대조군에 비하여 86%나 감소 하였으나, NCI H460 세포주에서는 60% 정도의 성장 감소만이 관찰되었다(Fig. 12).

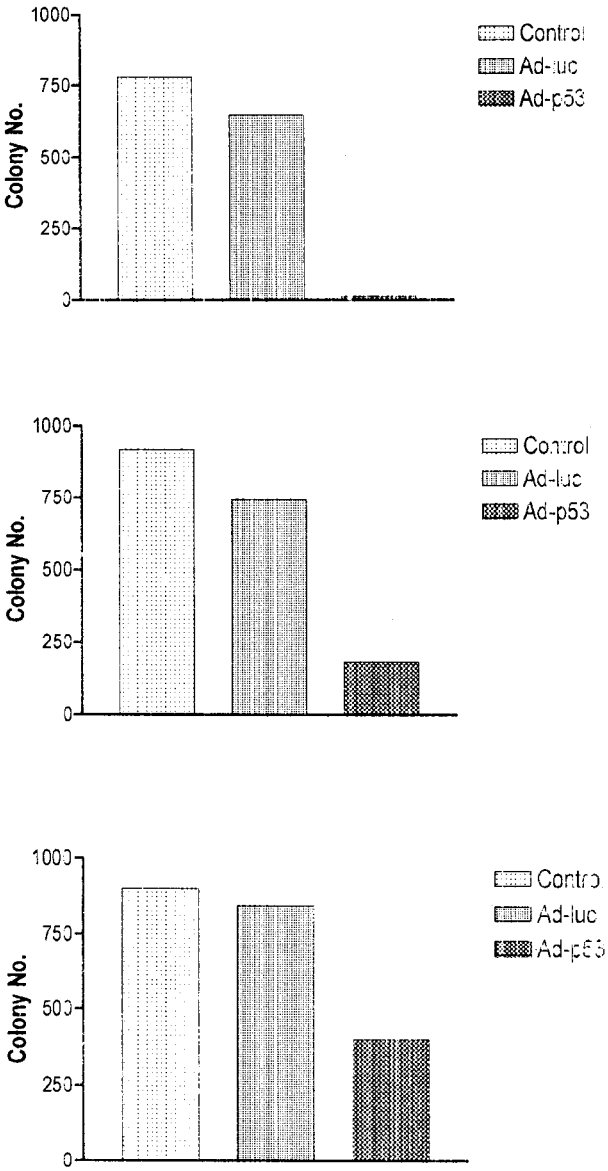


Fig. 11. Soft agar clonogenic assay after transduction of Adenovirus-p53. (a): NCI H358 cell lines, (b): NCI H460 cell lines, (c): PC9 cell lines

고 찰

그 동안 오랜 연구결과에 의하여 viruses들은 숙주세포 안으로 유전 정보를 전달할 수 있다는 것이 알려지게 되었고, recombinant DNA technology의 발전과 함께 이를 유전자 전

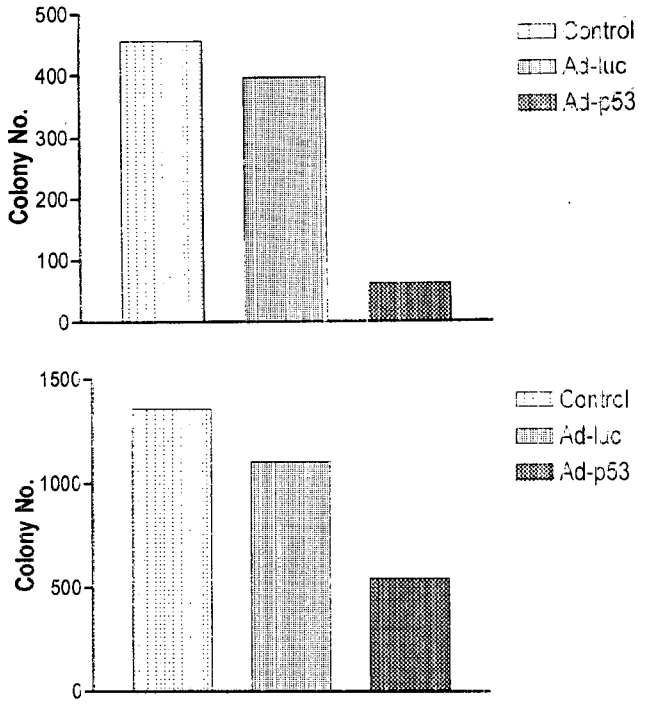


Fig. 12. Regression of established colony by Adenovirus-p53. (a): NCI H358 cell lines, (b): NCI H 460 cell lines.

달 매개물로 활용할 수 있는 길이 열리게 되었다. Viruses의 genome은 retrovirus인 경우는 RNA들로, 또 다른 viruses들은 DNA들로 구성되어 있고, 이들에 대한 생활환(life cycle)이나 생물학적 특성들이 집중적으로 연구되어 왔다[15-17]. 1980년대 초에 DNA viruses와 RNA viruses를 이용한 여러 유전자 전달 매개물에 대한 연구가 동시에 진행되었으나, 처음 대부분의 동물세포 안으로 유전자 정보를 전달할 수 있는 virus 중개물을 이용한 연구들은 retroviruses에 집중되었다. 이는 아마도 retrovirus는 자신의 RNA genome을 proviral DNA에 역전사가 가능하고, 이런 proviral DNA는 동물세포의 genomic DNA와 결합할 수 있는 능력이 있기 때문이 아닌가 생각된다. 비록 recombinant gene과 cellular genomic DNA와의 결합이 세포분열 시 유전자 정보를 전달해 주지만, 이는 아울러 변이 유전자의 삽입 및 암유발 유전자의 활성화 등을 통하여 세포 변형의 위험성도 높일 수 있으며, 더군다나 전달된 유전자가 표현되기 위해서는 retroviral genome이 결합 하여야 하고, 이런 결합은 세포분열시 나타나는 여러 세포 요소들의 도움이 꼭 필요하므로 분열 가능한 세포 안에서만 가능하다는 단점이 있다. 그럼에도 불구하고 retroviruses에 대한 집중적인 연구는 중개물의 고안(vector design), 특히 아주 위험한 replication-competent recombinant strains의 생성을 억제할 수 있는 helper viruses 생산 분야에 획기적인 공헌을 하게되었고, 많는 유전자 치료에서 disabled murine retroviruses을 이용하고있는 실정이다[15-17,20].

최근 들어 DNA viruses가 강력한 유전자 전달 매개물로 관심을 끌고 있다[15-17,21]. 이들 DNA viruses들은 각각의 장점 및 단점을 지니고 있다. 예를 들면 vaccinia viruses는 25kb 이상의 큰 유전자 정보를 전달할 수 있는 반면, 감염된 숙주 안에서 homologous recombination에 의해서만 recombinant viruses의 생성이 가능하다. 그러나 이는 비효율적이며 recombinant viruses를 선택하는데 유전자 기법이 필요하다는 단점이 있다[22]. Adeno-assisted viruses는 사람의 염색체 19(19q13.3qter)에 장소 특이성으로 결합하는 성질이 있다[23]. 그러나 recombinant AAV virions는 이런 장소 특이성 결합력을 상실한다. 더군다나 AAV genome의 크기가 매우 작아(4680bp) recombinant inserts의 크기에 있어서 제한을 받으며, 이는 parvovirus이므로 복제시 adenovirus 유전자들을 활성화시켜야만 가능하다. 그리고 AAV 중개물은 recombinant AAV virions들이 adenovirus에 감염된 packing 세포주에서 번식하는데 꼭 필요한 genome이 상실된 상태이므로 다른 특성을 보여주기도 한다. 이런 이유들로 인하여 아직까지 viral stock이 생산되지 않고 있는 실정이다.

Adenovirus를 효과가 오래 지속되는 유전자 치료(long-term gene therapy)에 사용할 수 있는지에 대해서는 아직 확실하지 않지만, 사용 가능한 DNA virus system 중에는 이는 가장 많이 연구되고 사용하기 간편하며 또 일반적으로 널리 이용되고 있는 DNA virus이다. 이런 adenovirus의 장점들을 살펴 보면, 비교적 큰 DNA inserts(helper virus의 사용 없이 7kb까지 가능)를 표현할 수 있으며, 고농도의 viral stock 생산이 쉽고, 여러 종류의 동물 세포에 대한 감염력이 높다. 그리고 다른 promoters를 지닌 수많은 다른 중개물로의 이용이 가능하다. 처음 주입된 virus에 의하여 면역체계가 활성화되기 때문에 유전자 정보의 지속적인 발현을 위한 반복 주입도 불가능한 실정이며, 주로 episomal mode로 존재하기 때문에 삽입된 유전자의 발현 기간이 제한을 받는다는 단점이 있다. 그러나 곧 유전자 공학을 이용하여 이런 장점들을 유지하면서 단점들을 보완한 새로운 차세대 DNA virus 중개물이 등장할 전망이다.

아울러 p53 종양억제 유전자 또한 그 동안 가장 많이 연구되어 오고, 종양 치료에 가장 큰 가능성을 지닌 유전자 중 하나이다. 지금까지 알려진 p53의 기능은 생활환의 조절을 통한 세포성장 조절, DNA 복제조절, 전사 조절, 그리고 세포자멸을 유도하는 것으로 알려져 있다[11-14,24]. 그래서 이번 실험에서는 정상적인 p53을 표현해낼 수 있는 recombinant adenovirus를 먼저 제작, 확인하는 과정을 거쳤다. Adenovirus-p53은 human CMV promoter와 human wild-type p53 cDNA, 그

리고 SV40 early polyadenylation signal을 지닌 expression cassette을 지니고 있으며, 이런 expression cassette은 adenovirus의 E1 region을 대치하여 adenovirus의 복제력이 소실되도록 만든 것이다. 이런 recombinant adenovirus는 293 세포안에서만 생산이 가능한데, 이는 293 세포가 소실된 adenovirus의 E1 단백질을 공급하여 주기 때문이다. 그러므로 293 세포안에서의 Adenovirus-p53 번식에는 helper virus가 필요하지않다.

Adenovirus-p53의 효과는 각기 다른 p53 성질을 지니고 있는 네 개의 비소세포폐암 세포를 대상으로 실험을 실시하였다. NCI H358 세포주는 p53 유전자의 소실이 있는 세포이고, NCI H460 세포주는 정상적인 p53 유전자를 지니고 있는 세포이다. 그리고 PC9 세포주와 NCI H441 세포주는 p53 점변이가 있는 세포들이다. Gene transfer efficiency tests는 human CMV IE promoter가 전사된 LacZ 유전자를 전달할 수 있는 Adenovirus-LacZ를 이용하여 실시하였으며, 그 결과 20MOI로 이입된 경우 약 98%에서 100%가 X-gal 염색에 의하여 β-galactosidase activity가 나타남을 알 수 있었다. 이 실험에서 adenovirus는 암세포에 유전자를 전달하는 데 매우 효과적인 매개체임을 알 수 있었다.

그리고 Western blot assay를 통하여 Adenovirus-p53은 비소세포폐암 세포주에 고농도의 p53 단백질을 생산해낼 수 있음이 확인되었다. 이렇듯 p53 단백질이 많이 발현되는 것은 아주 효율적으로 유전자가 전달되고, 강력한 CMV promoter에 의하여 p53 cDNA가 유도되며, adenoviral E1 enhancer에 의하여 p53 cDNA의 전사가 잘 이루어지기 때문인 것으로 생각되었다. 따라서 Adenovirus-p53이 이입될 경우 정상적인 p53 단백질이 빠르게 형성됨을 알았으며, 이런 성질을 이용하여 각기 다른 p53 성질을 갖고 있는 비소세포폐암 세포를 대상으로 p53 단백질의 생물학적 특성을 연구할 수 있었다.

이번 실험에서 Adenovirus-p53은 실험관 안에서 비소세포폐암 세포의 성장을 강력히 억제할 수 있음을 알았다. Zhang 등은 비소세포폐암을 대상으로 한 실험에서 Ad5CMV-p53을 이용하여 감염시켰을 경우, 1MOI 이하인 경우는 성장억제 효과가 거의 없었고 100MOI 이상인 경우에는 Ad5/RSV/GL2를 이용한 대조군과 비슷하게 성장이 억제된다는 사실을 보고한 바 있다[25]. 이번 성장속도 비교실험에서도 10~20MOI가 적절한 Adenovirus-p53의 주입 농도임을 알았으며, 이 범위 안에서 성장속도 억제정도는 p53 단백질 농도와 비례한다는 사실을 알게 되었다. 그리고 NCI H358 세포주나 NCI H460 세포주에 10 또는 20MOI로 이입시켰을 경우에는 전형적인 세포자멸성 DNA fragmentation을 발견 할 수 없었으나, 50MOI로 이입시켰을 경우에는 발견할 수 있었다. 이 결과를 토대로 Adenovirus-p53이 비소세포폐암의 성장을 억제시키는 기전 중에 세포자멸도 포함되어 있음을 알 수 있었다.

그리고 Soft agar clonogenic assay의 결과를 통하여 실험관내에서 비소세포폐암의 종양형성 능력도 Adenovirus-p53에 의하여 억제된다는 사실을 확인하였다. 특히 Adenovirus-Luc에 의한 것보다 Adenovirus-p53에 의한 성장 억제 효과가 월등함을 볼 때 p53 단백질이 치료 효과를 나타냄을 확인할 수 있었고, 일시적으로 고농도의 p53 단백질에 노출되어도 충분한 항암효과를 기대할 수 있음을 알았다. 그리고 성장억제 정도는 세포자체의 p53 유전자 상태에 따라서도 좌우됨을 확인하였다. 즉 p53 유전자의 변이가 있거나(NCI H441 & PC 9), p53 유전자의 표현이 전혀 되지 않는(NCI H 358) 비소세포폐암 세포는 정상적인 p53을 지니고 있는 세포에(NCI H 460) 비하여 Adenovirus-p53에 의한 성장이 더 억제되었다. 더욱이 과량의 정상적인 p53에 노출될 경우에 p53 유전자가 결여된 NCI H358 세포주에서는 세포자멸이 발생하였지만 NCI H460 세포주에서는 세포자멸이 일어나지 않았다. 이는 여러 기전으로 설명 할 수 있는데, 세포가 파괴되는 것은 여러 다른 세포로부터 형성된 p53의 양, p53 단백질의 안정성, 세포 안에서의 p53 분포, 그리고 p53 단백질의 다른 세포 요소 또는 down stream signal transduction pathway와의 결합력에 비례하여 발생될 수 있기 때문이다.

세포수는 세포증식과 세포사의 균형에 의하여 유지된다. 세포증식이란 수많은 점검과 균형에 의하여 정밀하게 조절되는 기전이다. 최근에는 세포 성장인자, 암 유전자, 또는 암억제 유전자 등이 세포주기 조절 등 세포증식의 조절기전에 미치는 영향 등에 관한 많은 정보들이 보고되고 있는 실정이다. 그러나 세포사의 조절기전도 세포증식 조절기전 못지않게 복잡하며 세포사의 중요성이 세포증식에 뒤지지 않는다는 사실이 인정된 것은 아주 최근의 일이다. 다세포 생물의 분화된 세포는 스스로 죽을 수 있는 능력을 가지는데 이는 내부에 존재하는 자살계획에 의한다. 이 자살계획이 활성화되면 자멸이라 불리는 특징적인 형태의 세포사가 일어나는데 자멸은 내부 또는 외부로부터의 다양한 자극에 의하여 촉발될 수 있다. 최근에 이르기까지 자멸의 중요성이 부각되지 않는 이유 중의 하나는 형태학적으로 쉽게 눈에 띄지 않는다는 점이다. 세포자멸이 쉽게 눈에 띄지 않는 것은 첫째 생체 내의 자멸은 한정된 특정 세포에서 한시적으로 일어나므로 생체 전체로 볼 때 흔하지 않은 현상이며, 둘째 자멸체의 크기가 작아서 광학현미경으로 잘 관찰되지 않는 경우가 있고, 셋째 주위의 세포가 자멸세포를 신속하게 탐식하며, 넷째 주위 조직에 염증반응을 일으키지 않고, 다섯째 괴사와의 감별이 때로는 쉽지 않기 때문이다. 아직까지 세포자멸을 평가하는 데 있어서 표준이 될 만한 생화학적 표지자가 알려지지는 않았으나 여러 가지의 형태학적인 변화와 DNA

fragmentation을 측정하는 방법이 개발되어 이용되고 있다. 물론 현재까지 가장 널리 인정되는 자멸 표지자는 전자현미경으로 관찰한 chromatin의 농축과 핵의 fragmentation이지만 위상차 또는 주사 전자현미경으로 세포막의 bleb을 관찰하거나 위상차 또는 광학현미경으로 chromatin의 농축과 핵의 fragmentation 또는 자멸체를 관찰할 수 있으며, 때에 따라서는 DNA에 결합하는 색소를 처리한 다음 형광현미경으로 DNA의 양 또는 핵의 fragmentation정도를 평가함으로써 자멸을 증명할 수 있다. 또한 자멸체는 guanidine hydrochloride, urea 및 detergent에 용해되지 않는 특성을 가지는데 이를 이용하여 자멸을 평가하기도 한다. DNA의 fragmentation은 비록 모든 자멸에서 나타나는 현상은 아니지만 자멸을 평가하는데 가장 보편적으로 쓰이고 있다. 이 방법은 DNA fragmentation의 정도를 측정함으로써 자멸을 양적으로도 평가할 수 있다는 장점이 있다. 700, 300 및 50 kb의 큰 DNA fragmentation은 pulse field gel electrophoresis로 알아 보며 이어서 나타나는 oligonucleosomal DNA fragment는 agarose gel 전기영동에서 약 180 염기 배수 크기의 밴드로 보이는데 이를 DNA ladder라 부르고 DNA fragmentation을 알아보기 위하여 흔히 쓰이는 방법이다. 유세포분석(flow cytometry)으로 자멸과 연관된 세포의 성상 변화를 알아볼 수 있는데 chromatin의 물리화학적 상태, 세포 내 DNA 양 또는 nicking/breaking, 세포주기 분석, light scatter 특성을 이용한 세포의 크기 분석 등이 흔히 쓰이는 방법이며 세포막의 투과도를 측정함으로써 세포의 생존을 직접적으로 측정할 수도 있다. 세포자멸의 기전 및 조절에 대한 지식이 급속하게 축적되고 있음에도 불구하고 세포 내의 생화학적인 변화에 대해 알려진 바는 미미한 실정이다. 자멸을 유발하기 위하여 세포 내에서 macromolecule 합성을 필요로 하는지의 여부에 따라 세포자멸을 유도경로(induction pathway), 유리경로(release pathway) 및 전달경로(transduction pathway)로 나누고 있다. 새로운 유전자가 발현되고 단백질이 합성되어야 세포자멸이 일어나는 것을 유도경로라 하는 한편, 단백질이나 mRNA 합성을 억제할 때 자멸이 유발되는 현상을 유리경로라 부른다. 후자의 경우에는 자멸을 유발시키는 경로는 항상 발현되어 있는데 이는 수명이 매우 짧은 억제인자에 의하여 정지되어 있다가 macromolecule 합성 억제제에 의하여 자멸 억제인자가 소멸되면 자멸이 유발되는 것을 말한다. 마지막의 전달경로는 macromolecule 합성의 억제 여부와 무관한 세포자멸을 일컫는데 세포독성 T세포 매개 자멸이 그 예이다. p53 또한 자멸 유도에서 중요한 역할을 담당한다. p53 단백은 세포주기 G1기의 점검점(check point)을 통제하여 S기에 진입하기에 앞서 DNA의 상태를 감시한다. p53은 DNA 결합단백으로 전사활성인자이다. DNA가 손상된 세포에서 p53에 의하여 p21 (WAF1, Cip1, 또는 sdi1)의 전사가 증가하는데 p21이 G1기에는 cyclin E-cdk2와 결합하며 S기에는 PCNA(proliferating cell nuclear antigen)와 결합함으로써 세포주기의 진행을 차단한다. p53 결실 마우스에서 방사선 조사 또는 etoposide에 의한 자멸은 억제되지만 다른 자극에 의한 자멸은 영향을 받지 않는 것으로 보아 p53 의존성 자멸은 DNA가 손상된 세포를 제거하는 역할 수행임을 알 수 있다. 즉 p53은 DNA가 손상된 세포의 자멸을 유발하는 유전자로서 정상적인 유전자를 유지시키는 데 중요한 역할을 하므로 guardian of the genome이라 불린다. 어떤 종류의 종양형성 바이러스는 p53 단백질과 결합하여 이를 비활성화시키는 단백질을 생산한다. 따라서 DNA가 손상된 세포가 제거되지 않고 복제되기 때문에 이차적인 변이가 일어나 암이 유발된다.

이번 실험을 통하여 비소세포폐암에 대하여 Adenovirus-p53은 충분한 치료 효과를 기대할 수 있는 치료제가 될 수 있고 더욱 더 연구할 만한 가치가 있음을 알았으나, 앞으로 해결해야 할 문제점들도 많이 남아있다. 우선은 종양세포에만 선택적으로 전달될 수 있는 새로운 방법이 개발되어야 하며, 동물 또는 인체에서 virus 치료 후 발생되는 항체에 의한 neutralizing effect를 최소화할 수 있는 방법이 모색되어야 한다. 더불어 Adenovirus-p53의 유전자 구조도 더욱 치료 효과를 높일 수 있는, 그러면서 더 오랫동안 치료 효과를 지속시킬 수 있도록 개선되어야 한다. 이를 위해서는 조직 특이성이 있으면서 p53을 더욱 오랫동안 표현할 수 있는 새로운 expression cassette의 개발 및 adenovirus 자체의 세포 독성을 줄일 수 있는 방법의 개발, 그리고 다른 치료 효과가 있는 유전자를 추가할 수 있는 방법의 개발 등이 이루어져야 한다고 생각된다.

한편으로는 인체에서 발생되는 종양들은 변이가 일어난 p53을 갖고 있는 경우가 많으므로, adenovirus 중개물을 이용하여 종양억제 유전자인 p53 유전자를 재구성시키는 것도 종양의 유전자 치료에 흥미를 불러일으킬 수 있는 방법이다. adenovirus는 충분히 낮은 pH endosome-mediated endocytosis에 의하여 인간의 상피세포 안으로 들어갈 수 있기 때문에 상피세포에서 발생된 종양은 Adenovirus-p53에 의하여 치료될 가능성이 있다[26]. 이미 Liu 등은 cis-platinum이 있는 경우에 adenovirus를 이용하여 p53을 증가시킬 경우 두경부 종양 및 비소세포폐암 세포주가 괴사된다는 보고를 한 바 있다[27]. 이번 실험에서도 보듯이 정상적인 p53을 지닌 세포는 Adenovirus-p53에 의한 세포자멸에 저항력을 보이지만, p53 유전자가 없거나 변이된 경우에는 쉽게 세포자멸이 일어나는 것을 알 수 있었다. 따라서 Adenovirus-p53을 종양에 대한 유전자 치료에 활용하기 위해서는 좀더 세분화된 실험 및 접근 방법을 강구하여야 할 것이다.

결 론

이번 실험을 통하여 adenovirus는 어렵지 않게 고농도의 stock 생산이 가능하고, 유전자 전달 능력이 매우 뛰어난 매개물임을 알 수 있었다. 한편 adenovirus를 이용하여 recombinant Adenovirus p53을 생산하였으며, 이는 실험관 안에서, 정상적인 p53 유전자가 소실되거나, 변이를 일으킨 비소세포폐암 세포주의 성장 및 이미 형성된 종양의 성장도 강력히 억제할 수 있음을 알 수 있었다. 더불어 그 성장 억제 기전 중에 세포자멸이 중요한 역할을 한다는 사실도 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 토대로 이를 임상에 적용하기 위한 동물 실험의 대상이 될 수 있다고 생각되어지며, 한편으로는 이의 단점을 보완할 수 있는 새로운 매개물 개발도 동시에 진행되어야 한다는 결론을 얻을 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Weinberg RA. *Tumor suppressor genes. Science* 1991; 254:1138-46.
2. Friedmann T. *Progress toward human gene therapy.* Science 1989;244:1275-81.
3. Friedmann T. *Gene therapy of cancer through restoration of tumor-suppressor functions?* Cancer 1992;70(suppl): 1810-7.
4. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, et al. *Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types.* Nature. 1989;342:705-8.
5. Srivastava S, Zou Z, Pirollo K, Blattner W, Chang EH. *Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome.* Nature 1990;348:747-9.
6. Montenarh M. *Biochemical immunological, and functional aspects of the growth-suppressor/oncoprotein p53.* Crit Rev Oncog 1992;3:233-56.
7. Gottesman MM. *Report of a meeting: molecular basis of cancer therapy.* J Natl Cancer Inst 1994;86:1277-85.
8. Dulic V, Kaufmann WK, Wilson SJ, Tlsty TD, Lees E, Harper JW. *P53-dependent inhibition of cyclin-dependent ase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest.* Cell 1994;76:1013-23.
9. Chiou S, Rao L, White E. *Bcl-2 blocks p53-dependent apoptosis.* Mol Cell Biol. 1994;14:2556-63.
10. Chen P, Chen Y, Bookstein R, Lee W. *Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene.* Science 1990;250:1576-9.
11. Mercer WE. *Cell cycle regulation and the p53 tumor ressor protein.* Crit Rev Eukaryot Gene Expr 1992;2: 251-63.
12. Mietz JA, Unger T, Huibregtse JM, Howley PM. *The transcriptional transactivation function of wild-type p53 is inhibited by SV40 large T-antigen and by HPV-16 E6 oncoprotein.* EMBO J 1992;11:5013-20.
13. Wilcock D, Lane DP. *Localization of p53, retinoblastoma, and host replication proteins at sites of viral replication in herpes-infected cells.* Nature 1991;349:429-31.
14. Show P, Bovey R, Tardy S, Sahli R, Sordat B, Costa J. *Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line.* Proc Natl Acad Sci USA 1992;89: 4495-9.
15. Miller AD. *Human gene therapy comes of age.* Nature 1992;357: 455-60.
16. Morgan RA, Anderson FW. *Human gene therapy.* Annu Rev Biochem 1993;62:191-217.
17. Nienhuis A, Walsh CE, Liu J. *Viruses as therapeutic gene transfer vectors.* Hematology 1993;16:353-414.
18. Stratford-Perricaudet L, Levrero M, Chasse JF, Perricaudet M, Briand CB. *Evaluation of the transfer and expression in mice of an enzyme-encoding gene using a human adenovirus vector* Human Gene Ther 1991;1:241-56.
19. Grunhaus A, Horwitz MS. *Adenoviruses as cloning vectors.* Semin Virol 1992;3:237-52.
20. Varmus, H. *Retrovirus.* Science 1988;240:1427-35.
21. Graham, FL, Prevec L. *Manipulation of adenovirus vectors.* In: Murray EJ, ed. *Methods in Molecular Biology.* Clifton, New Jersey: The Humana Press Inc; 1991;7:109-128.
22. Smith GL. *Vaccinia virus vectors for gene expression.* Curr Opin Biotechnol 1991;2: 713-7.
23. Kotin RM, Meninger JC, Ward DC, Berns KI. *Mapping and direct visualization of a region-specific viral DNA intergration site on chromosome 19q13-qter.* Genomics 1991;10:831-4.
24. Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Rotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M. *Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukemic cells that is inhibited by interleukin-6.* Nature 1991;352:345-7.
25. Zhang WW, Fang X, Mazur W, French BA, Georges RN, Roth JA. *High-efficiency gene transfer and high-level expression of wild-type p53 in human lung cancer cells mediated by recombinant adenovirus.* Cancer Gene Therapy 1994;1:5-13.
26. Seth P, Rosenfeld M, Higginbotham J, Crystal RG. *Mechanism of enhancement of DNA expression consequent to cointernalization of a replication-deficient adenovirus and unmodified plasma DNA.* J Virol 1994;68:933-40.
27. Liu T, Zhang W, Taylor D, Roth JA, Goepfert H, Clayman GL. *Growth suppression of human head and neck cancer cells by the introduction of a wild-type p53 gene via recombinant adenovirus.* Cancer Res 1994;54: 3662-7.

대흉외지
1998;31:1134-46

=국문초록=

배경: 종양억제 유전자인 p53은 폐암을 비롯하여 인체에 발생될 수 있는 다양한 종양들에 있어서 가장 빈번히 변이를 일으키는 유전자로 알려져 왔으며, 정상적인 p53은 세포분화 과정 중 G1 arrest 또는 세포자멸을 통하여 세포 성장을 억제한다는 증거들이 발견되고있다. 더불어 유전자 치료에 p53을 사용할 수 있는지에 대해서도 많은 연구가 진행 중이다. ***대상 및 방법:*** 이런 p53 단백질의 기능을 이해하기 위한 한 가지 방법으로 정상세포나 종양세포 안에 과량의 p53을 발현시킬 수 있는 p53 표현 중개물(expression vectors)을 이용할 수 있다. 우리는 각기 다른 p53 성질을 지니고 있는 네가지 비소세포폐암 세포를 대상으로 정상적인 p53을 지닌 adenovirus를 이용하여 비소세포폐암에 Adenovirus-p53을 이입시킬 경우 p53 단백질이 증가하는지의 여부와 Adenovirus-p53이 종양세포의 성장에 미치는 영향을 관찰하였으며, p53에 의한 세포 독성에 있어서 세포자멸과의 관련성 여부 및 실험관 안에서 Adenovirus-p53이 비소세포폐암의 종양형성 능력에 미치는 영향을 관찰하였다. ***결과:*** 이번 실험 결과는 다음과 같이 요약될 수 있다. 변이성 p53을 갖고 있거나 p53 유전자가 없는 비소세포폐암 세포는 정상적인 p53을 가지고 있는 종양세포에 비하여 Adenovirus-p53에 의한 세포성장 억제정도가 높았으며, p53을 과발현시킬 경우 세포자멸을 관찰할 수 있었다. 그리고 Adenovirus-p53은 비소세포폐암의 집락 형성 능력을 억제할 수 있고, 또 이미 형성된 집락도 그 성장을 억제할 수 있다는 사실도 확인하였다. ***결과:*** 이번 실험의 결과로 adenovirus는 비소세포폐암 세포에 종양억제유전자를 이입시키는데 매우 효과적인 매개물이며, 특히 p53이 소실되거나, 변이를 일으킨 종양세포들은 Adenovirus-p53에 의하여 쉽게 세포자멸이 유발된다는 사실을 알게 되었다.

중심단어: 1. Adenovirus, p53, 비소세포폐암, 유전자 치료