

인체 상피세포에서 ras-종양유전자의 발암화가 신호 전달 기작에 미치는 영향

장도근 · 변기정* · 김진수

경북대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, 울산대학교병원 치과학교실*

Abstract

EFFECTS OF SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAY IN THE RAS-INDUCED CELLULAR TRANSFORMATION OF HUMAN EPITHELIAL CELLS IN CULTURE

Do-Geun Jang, Ki-Jeong Byeon*, Chin-Soo Kim

Department of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Kyungpook National University

Department of Dentistry, Ulsan University Hospital*

The present study has attempted to look into the mechanism of *ras*-induced carcinogenesis in a human epithelial cell system. Human epithelial cells immortalized with Ad12-SV40 hybrid virus were used to assess carcinogenic potential of the *ras*-oncogene. Cells transfected with pSV2-*ras* showed characteristics of cellular transformation. The transformation parameters such as cell density, soft-agar colony formation, and cell aggregation were significantly increased in the cells expressing *ras* oncoprotein. In addition, the duration required for the appearance of foci was shortened in the *ras*-transfected cells. Consistent with other reports, our results demonstrated an evidence that the *ras*-oncogene induced the cellular transformation of human epithelial cell system.

When a high concentration of glucocorticoid was added into the media, transformation process was accelerated. It is speculated that glucocorticoid may provide an advantageous environment for the proliferation of the transformed cells. The induction of the intracellular free calcium concentrations following agonist treatment was significantly lower in the transformed cells than in the control cells. These effects were more manifested in the presence of extracellular calcium, indicating that the transformation process may alter the influx pathway of extracellular calcium. The induction of IP₃ following agonist treatment was also lower in the transformed cells than in the control cells. Thus, it is suggested that phospholipase C-coupled pathway was down-regulated in the process of the *ras*-induced transformation. While the levels of TGF- β_1 and PAI-2 mRNAs were decreased, the level of fibronectin mRNA was increased. The results indicate that mechanism of the *ras*-induced transformation may be associated with the altered expressions of growth regulatory factors.

The present study demonstrates an evidence that the *ras*-induced cellular transformation may be associated with alteration of signal transduction and growth regulatory factors. The study will contribute to improve the understanding of molecular mechanism of epithelium-derived cancers including oral cancer.

I. 서 론

ras 종양유전자(oncogene)는 동물과 인간에서 여러 종류의 암 발생과 관련성이 있는 종양유전자이며 세포의 분화 및 증식에 관여하는 신호전달체계에 중요한 역할을 한다. *ras* oncoprotein은 GTP와 결합하여 GTPase를 활성화시키는 물질로서 *ras* 종양유전자의 돌연변이는 인체암의 약 30%에서 관찰되며, 활성이 높은 *ras* oncoprotein을 만들어 세포의 증식이나 분화에 이상을 초래한다¹⁾. 지금까지 *ras* 종양유전자의 변화와 발암현상에 대해 많은 연구들이 진행되어 왔으나, *ras* 종양유전자의 역할은 세포모델이나 동물모델에 따라 서로 차이가 있으므로 적합한 모델에서의 *ras*

종양유전자의 역할을 규명하는 일은 *ras* 종양유전자의 발암성을 이해하는 데 매우 필요한 연구이다.

ras 종양유전자는 Adenylyl cyclase의 활성의 변화에 영향을 주고 있으나 그 활성도는 *ras*에 의해 발암성을 나타낸 세포모델에 따라 서로 차이점이 있어 보다 다양한 세포모델에서 *ras* 역할의 연구가 필요한 실정이다. *Xenopus oocyte*의 경우 *ras* microinjection은 cyclase 활성도의 감소를 가져온 반면 NIH3T3 세포 체계에서는 *ras*에 의해 cyclase의 활성도의 변화가 나타나지 않았다^{2,3)}. 또한 cholera toxin이나 pertusis toxin에 의한 cyclase 활성화 자극 시에도 *ras*에 의해 변형된 세포나 모세포 사이에 Adenylyl cyclase 활성도 차이가 없어 *ras* oncogene이 Gi 또는 Gs에 직접적으로 관여하지 않는 것으로 보고되었다⁴⁾. 그러나 isoproterenol에 의한 자극에서는 Adenylyl cyclase의 활성 증가가 발암성 세포에서 낮게 나타나 *ras* oncogene에 의한 Adenylyl cyclase를 통한 신호전달체계는 확실히 밝혀져 있지 않다. 또한 Adenylyl cyclase에 의해 생성된 cAMP는 phospholipase C(PLC) 또는 phosphoinositide kinase의 활성화와 관련성이 있으며 세포의 신호전달물질에 대한 변화

장도근

790-191, 경북 포항시 남구 해동 1동 33-11

신한빌딩 2층, 장도근치과의원

Do-Geun Jang

Jang Dental Clinic, Shinhan B/D 2F

33-11, Haedo-1Dong, Nam-Ku, Pohang, Kyungpook, 790-191 Korea

Tel. 82-562-273-2804

된 암세포의 반응과도 상관성을 보이고 있다⁹. 특히 calcium, PGE₂ 등의 세포 분화촉진물질에 대한 cAMP의 축적 증가는 ras에 의해 변형된 인체 또는 동물의 세포모델에서 유의하게 감소하며 이러한 외부신호전달물질에 의한 반응변화는 NIH3T3 세포나 MDCK 세포체계에서 ras에 의한 세포의 발암성을 조절하는 데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.

포유류 동물의 신호전달체계에서 ras 종양유전자의 역할은 inositol phospholipid의 대사에서 잘 나타나는데, ras-transformed cell에서 PLC 또는 PLA₂의 활성변화가 보고되어 있으며 이러한 활성도의 변화는 제 2 신호전달물질인 Inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) 및 Diacylglycerol(DAG)의 생성과도 직접적으로 관련되어 있다⁹. ras oncogene에 의해 발암성을 보인 MDCK, rat embryo fibroblast, rat-1 fibroblast 등의 세포에서 IP₃ 및 DAG의 증가를 보였으나⁹ CCL39 chinese hamster cell에서는 이러한 제 2 신호전달물질의 증가는 나타나지 않아⁷, ras oncogene에 의한 PLC 관련 신호전달체계가 세포모델에 따라 서로 다를 수 있음을 암시하고 있다. 최근 보고에 의하면 ras oncogene에 의한 세포 발암화는 protein kinase C의 활성화와 관련성이 있는 것으로 나타났다. 208F rat fibroblast의 경우 ras에 의한 세포발암화는 PIP2-phospholipase C의 활성화와 관계없이 Kinase 활성화의 변화를 통하여 inositol phospholipid의 대사를 촉진하는 것으로 알려져 있다⁹. 따라서 ras protein의 세포발암화에 protein kinase C의 translocation, activation, downregulation이 관여할 것으로 추정 된다⁹. ras 유전자에 의한 세포 발암화는 많은 성장조절인자의 변화와 관련성이 있는데, 예를 들면 ras에 의해 변형된 Human keratinocyte의 경우 Fibronectin, TGF- α , procollagen, TGF- β 의 증가가 나타난 반면 involucrine은 감소하여 ras 유전자가 세포의 분화 및 성장에 관여함을 보였다¹⁰. 그러나 이러한 성장조절인자의 변화는 NIH3T3 세포체계나 NRK 세포체계에서는 서로 변화 양상에 차이가 있으므로 다양한 세포 체계에 대한 ras유전자의 영향을 분석할 필요성이 있다. 특히 ras oncogene의 overexpression이 인체 암과 관련성이 있는 것으로 보고된 바 있으나¹¹, 지금까지 ras에 의해 본 실험세포가 신호전달체계가 미치는 영향은 보고된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 SV40 large T antigen에 의해 불멸화되었고 정상적인 상피세포의 형태를 유지하며 nude mice assay에서는 발암성을 나타내지 않아 종양유전자 및 화학적 발암물질에 의한 발암성을 평가하는 데 적절한 세포체제로 알려져 있으며¹²⁻¹⁴ 동물 세포모델의 사용에서 나타날 수 있는 인체와 동물의 종간의 차이점을 극복할 수 있는 인체상피세포모델을 ras 종양유전자로 발암화시켜 발암화과정에 PLC와 관련된 신호전달체계의 영향을 분석하므로써 구강암 등 상피세포에 기원을 둔 종양 발생 기전의 이해증진에 기여하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 시 약

DMEM (Dulbeco's Minimum Essential Medium), RNAzol, Fetal

Bovine Serum 등은 BRL사 제품을, RNA guard는 Pharmacia사, oligo (dT), DNase는 Boeringer Mannheim사, Taq DNA polymerase는 Promega사, IBMX는 Research Biochemical사, fura-2/AM은 Molecular Probe사, ECL system, [³H]IP₃, [³²P]-dCTP는 Amersham사, ras antibody는 oncogene science사, primer합성은 고마 바이오텍, 기타 RT-PCR관련 시약은 Promega사 제품을 사용하였다. Northern blot과 western blot에 사용된 시약은 sigma사 제품을 사용하였으며 그 밖의 일반 시약들은 특급 또는 일급품을 사용하였다.

2. 인체 상피 세포배양

Ad12-SV40에 의해 불멸화된 인체상피세포의 Passage-23단계 세포군을 사용하였다. 세포 배양 조건은 37의 5% CO₂ incubator에서 배양하고 배양액은 DMEM에 EGF, Fetal Bovine Serum 10%, hydrocortisone (5ug/ml), antibiotics 등을 넣어 배양하였다. 세포가 밀집된 상태(confluent)를 이루는 시점에서 1 : 4로 계대배양(sub-culture)하였다¹⁵.

3. Calcium phosphate transfection

네 개의 100mm petri dish를 기준으로 할 때 32 μ g의 투입하고자 하는 pSV₂ ras DNA를 2ml의 water에 녹이고 0.5 M CaCl₂를 같은 tube에 넣었다. 네 개의 polypropylene tube에 각각 1ml의 Hepes NaCl, NaH₂PO₄(40:1) 혼합물을 넣은 다음 air bubble 하에서 천천히 1ml의 CaCl₂와 DNA의 혼합물을 섞었다. 30분에서 1시간 정도 방치한 다음 세포가 있는 petri dish에 2ml씩 넣었다. 37 CO₂ incubator에 넣고 24시간 후 media를 갈아 주고 G418 (Geneticin)을 함유하는 media를 넣고 control petri dish에 세포가 모두 사멸 할 때까지 G418 처리를 하였다¹⁵.

4. Soft agar colony formation

Noble agar 1.2g에 dH₂O 35ml을 넣고 30분간 autoclave한 다음 15ml의 dH₂O와 FBS 25ml, 2X DMEM 50ml을 넣어 0.9% agar base를 만들었다. 5ml의 agar base를 petri dish에 넣은 다음 밤새 37°C incubator에 두었다. 0.9g Noble agar에 dH₂O 50ml을 넣어 30분간 autoclave한 다음 dH₂O 7.2ml, FBS 7.2ml 2X DMEM 14.4ml을 넣어 0.36% top agar를 만들었다. 준비된 base agar에 1 \times 10⁶cells/dish를 포함하는 top agar-용액을 2ml씩 petri dish에 넣었다. 그후 colony형성의 크기가 0.3mm이상인 colony수를 측정하였다¹⁶.

5. Cell density 측정

세포의 contact inhibition의 변화를 측정하기 위해 5 \times 10⁶cells/cm²를 용기에 넣고 배양하였다. 배양액은 3일마다 새롭게 갈아 주고 세포가 밀집된 상태에 도달하였을 때 단위 면적당 세포수를 계산하였다¹⁶.

6. Cell aggregation 측정

Soft agar assay와 같은 방법으로 Base agar를 만들어 5ml씩 Petri dish에 넣었다. 밤새 37°C incubator에 둔 다음, 10% FBS를 포함한 배양액에 10⁶ cells/dish로 세포를 접종한 후 4일이 지난 시점에서 배양액상에 성장하는 0.5mm이상 크기의 colony의 크기 및 숫자를 측정하였다¹⁶⁾.

7. Radiolabelling

Probe의 labelling은 Pharmacia의 oligolabelling kit를 사용한다. 25에서 50ng의 Probe용 DNA를 TE buffer에 녹이고 95에서 100사이의 온탕에서 2 또는 3 분간 냉각시킨 후 원심분리기로 짧게 회전시킨 다음 여기에 denatured DNA, [α -32p]dCTP 5 μ l, 키트에서 제공하는 reagent mix 10 μ l 및 정량의 증류수를 넣어 전체 양이 49 μ l가 되게 한 다음, 1 μ l Klenow Fragment를 넣어 섞었다. 그리고 37°C 온탕에서 60분간 두었다¹⁶⁾.

8. Northern blot

세포를 PBS(pH 7.2)로 세척한 후 chomczynski의 RNAzol B 방법에 따라 RNA를 분리하였다. 총 RNA(20 μ g/lane)는 7% Formaldehyde를 포함한 1.2% agarose gel로 분석하며 전기영동은 밤새 0.2 M MOPS(pH 7.0), 50mM sod, acetate, 1mM EDTA를 포함하는 용매에서 실시하였다.

Nitrocellulose filter는 50% formamide, 5x Dehardt's, 0.5% SDS, 50mM NaPO₄(pH 6.5), 5xSCC, 100 μ g/ml의 연어정자 DNA로 42°C에서 pre-hybridization하였다. Hybridization은 조사하고자 하는 인자의 probe를 radio-labelling 한 다음 새로운 prehybridization buffer에 넣었다. Filter는 상온에서 0.1% SDS, 2x SCC 용액으로 5분씩 4회 세척한 후 다시 60°C에서 SDS 0.1x SCC 용액으로 5분간 2회 세척하였다¹⁶⁾.

9. RT-PCR(Reverse Transcription Polymerization Chain Reaction)

Total RNA를 추출한 다음 1 μ g의 total RNA에 oligo d(T) primer를 넣고 60°C에서 5분간 두어 poly A⁺를 얻었다. 30 μ l RT mix(0.1M DTT, RNA guard, RT-buffer, dNTP, dH₂O, RT)를 각 sample에 넣은 다음 37°C에서 60분, 70°C에서 10분 둔 다음 얼음 위에 놓았다. cDNA과정이 끝나면 2.5 μ l of cDNA에 47.5 μ l of PCR mix[PCR-buffer, dH₂O, Taq.pol, 5' -primer, 3' -primer, dNTP-mix(32P - labelled)]를 넣은 다음 primer에 따라 Annealing temp 및 cycle #를 최적정 수준으로 정하였다. 10% PAGE에 전기영동하고 gel dryer로 말린 후 X-ray cassette에 넣어 영하 75°C 보관후 현상하였다¹⁷⁾.

10. 세포내 칼슘농도 측정

세포내의 칼슘 이온 농도 변화를 측정하기 위하여 인체 상피세포에 2 5 μ M의 fura/AM을 처리하여 37°C에서 30-60분 배양한 후 Locke's 용액으로 잘 세척하고 250 μ M의 sulfinpyrazone을 첨가함으로써 세포로부터 fura 2 형광지시약의 누출을 막았다. 그리고 세포를 quartz cuvette에 넣고 stirring하면서 excitation wavelength를 337nm로 dual excitation 시키며 510nm에서 형광의 세기를 비교하여 세포내 Ca²⁺ 이온의 농도를 계산하였다¹⁸⁾.

11. [IP3] 측정

Inositol 1,4,5-triphosphate(IP3)의 세포내 농도는 [³H]IP₃와 IP₃ 결합 단백질과의 competition assay로 측정하였다.

간략히 서술하면 histamine, ATP, bradykinin으로 전립선 세포를 자극시킨 다음, 수용성 Inositol phosphate를 추출하였다. 추출액을 pH 7.4로 조절 한 다음 Assay buffer에, [³H]IP₃ 결합단백질과 함께 넣었다.

얼음 위에 15분간 둔 후 2000g에서 10분간 원심분리하고 침전물에 대해 방사능을 측정하였다¹⁹⁾.

12. Western blot

ras 종양유전자의 발현을 측정하기 위하여 cellular fraction 또는 extract에 대해 western blot을 실시하였다. cellular fraction의 sample을 12.5% gel에서 전기영동한 후 Bio-rad의 transfer chamber를 사용하여 nitrocellulose paper에 400mA로 4시간에 걸쳐 blotting하고 blocking buffer로 1시간 동안 반응시킨 후 각각의 monoclonal 혹은 polyclonal antibody를 적당한 비율로 희석한 후 1시간 동안 반응시켰다. 2회 세척 후 secondary IgG로 1시간 동안 반응시키고 ECL system을 사용하여 반응시키고 X-ray film에 최적의 시간 동안 노출시킨 후 현상하였다.

III. 성 적

1. H-ras 종양유전자에 의한 인체상피세포의 특성변화 (Table 1, 2 및 Fig. 1)

H-ras 종양유전자를 함유하는 pSV₂-ras를 CaPO₄ 방법으로 transfection한 후 G418으로 선별하여 지속적인 계대배양(subculture)을 실시한 결과 H-ras를 함유하는 인체세포는 많은 foci를 보인 반면 대조군은 flat한 전형적인 상피세포 형태를 유지하였다. foci의 출현시기는 transfection을 실시한 후 60일이 지난 passage-6에서 나타나기 시작하였으며 71일째인 passage-8과 76일째인 passage-9에서 더욱 많은 foci를 형성하여 foci의 출현이 시간과 계대배양 횟수의 증가에 따라 급격히 증가함을 알 수 있다. contact inhibition의 변화를 나타내는 saturation density는 H-ras에 의해 변형된 세포가 대조군에 비해 6배 증가하였으며 anchorage indepen-

Table 1. Properties of human epithelial cells at passage-9 after transfection of H-ras oncogene.

	saturation density($10^3/cm^2$)	soft agar colony formation(%)	cell aggregation† (size > 0.5mm)
control	2.2 ± 0.03	0.03 ± 0.008	-
H-ras	$12.8 \pm 0.12^*$	$0.28 \pm 0.09^*$	++

*: P < 0.05 as compared to control cells

†: -; ≤5 colonies, +; > 5 colonies, ++; > 10 colonies

The data are mean ± SD with 3 different counts.

Table 2. Morphological alteration of human cells transfected with pSV2-ras

passage	cumulative no. of days in culture after transfection	control	H-ras
1	18	.	.
4	46	.	.
6	60	.	+
7	65	.	+
8	71	.	++
9	76	.	+++

*mild to severe appearance of foci ; +<++++

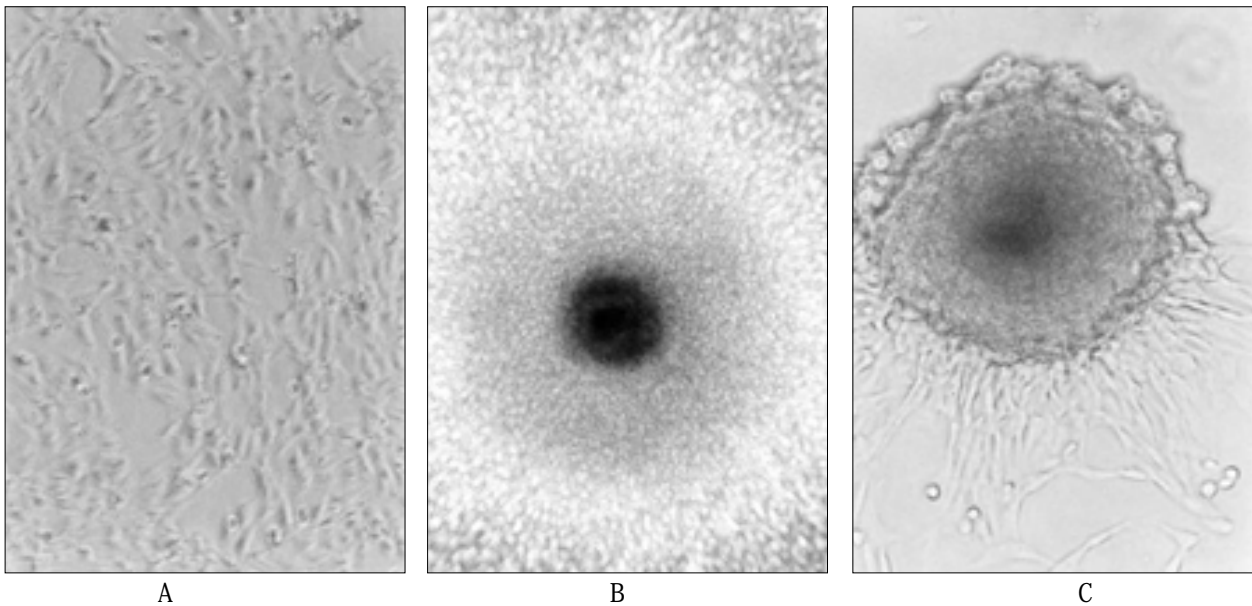


Fig. 1. Human epithelial cells transfected with pSV2-ras after passage 9. A ; contro cells(X40), B ; transformed cells(X40), C ; foci(X100)

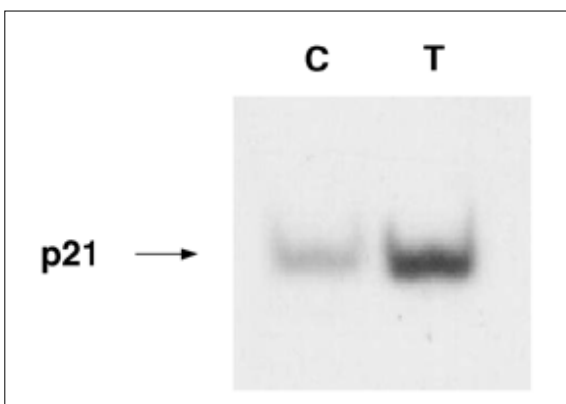


Fig. 2. Western blot analysis of ras-oncoprotein in control cells (C) and transfected cells(T).

dence를 의미하는 soft-agar colony formation도 H-ras에 의해 9배 정도 증가하였다. 또한 cellular adhesion을 평가할 수 있는 cell aggregation의 형성은 H-ras 세포에서 0.5mm 이상 크기의 colony

가 10개 이상 관찰되었다. pSV2-ras transfection에 따른 ras-oncoprotein의 발현을 Western blot으로 평가한 결과 transfection된 세포 군에서 ras-oncoprotein인 p21의 발현이 뚜렷하게 나타났다 (Fig 2).

2. Glucocorticoid steroid에 의한 발암력 변화 (Table. 3과 4)

H-ras oncoprotein을 발현하는 세포를 고농도 (10 μ g/ml)의 hydrocortisone을 함유하는 배양액으로 배양한 결과 foci의 출현은 transfection이후 60일이 지난 passage-6에서 나타나기 시작하였으며 65일이 지난 시점인 passage-7과 71일이 지난 passage-8에서 foci의 수가 점진적으로 증가함을 보였다. saturation density는 4배 증가한 반면 soft-agar colony formation은 12배 증가하여 anchorage independence의 변화에 크게 영향을 주는 것으로 나타났다.

Table 3. Properties of human epithelial cells at passage-9 after transfection of H-ras in presence of high concentration of hydrocortisone(10ug/ml).

	saturation density($10^5/cm^2$)	soft agar colony formation(%)	cell aggregation [†] (size > 0.5mm)
control	2.8±0.09	0.02±0.003	-
H-ras	11.5±0.21*	0.24±0.1*	++

* : P < 0.05 as compared to control cells

† : - ; ≤5 colonies, + ; > 5 colonies, ++ ; > 10 colonies

The data are mean ± SD with 3 different counts.

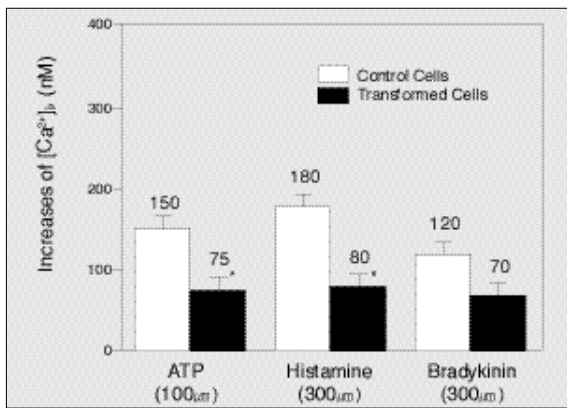


Fig. 3. Effects of ATP, histamine or bradykinin on increases of [Ca²⁺]_i in control cells and H-ras transformed cells in the absence of extracellular calcium.

*, p<0.05 as compared to control cells.

3. H-ras oncogene의 발암화가 세포내 칼슘농도 변화에 미치는 영향 (Fig. 3과 4)

세포내 칼슘농도 (free intracellular calcium concentration)의 변화와 세포발암화의 관련성을 관찰하기 위하여 세포내칼슘농도를 상승시키는 것으로 알려진 ATP, histamine, bradykinin 등을 처리하였다. 100μM ATP 처리한 결과 대조군 세포의 농도는 150nM인 반면 발암세포는 75nM로서 2배 낮았다. 300μM histamine을 처리한 결과 control 세포는 180nM, 발암세포는 80nM로서 2.3배의 유의한 차이를 나타내었다. 300μM Bradykinin 처리시 control 세포는 120nM, 발암 세포는 70nM을 각각 나타내었으나 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다 (Fig. 3).

이와 같은 촉진제에 의한 칼슘농도의 증가가 세포외부의 칼슘 유입에 의한 것인지를 분별하기 위하여 2.2mM CaCl₂ 존재 하에서 촉진물질에 의한 세포내 칼슘농도의 변화를 관찰하였다. 100μM ATP 처리 시에는 대조군 세포와 발암세포가 360nM 및 120nM을 각각 나타내어 3배의 차이를 보였으며 300μM histamine 처리 시에는 대조군 세포는 280nM, 발암세포는 100nM을 나타내어 2.8배의 차이를 보였다. 300μM의 bradykinin 처리 시에는 대조군 세

Table 4. Morphological alteration of human cells transfected with H-ras in presence of high concentration of hydrocortisone(10ug/ml).

passage	cumulative no. of days in culture after transfection	control	H-ras
1	18	.	.
4	46	.	.
6	60	.	**
7	65	.	**
8	71	.	+++
9	76	.	+++

*mild to severe appearance of foci ; +<+<+<+

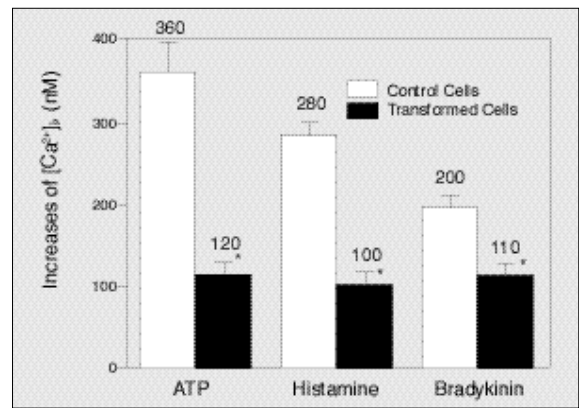


Fig. 4. Effects of ATP, histamine or bradykinin on increases of [Ca²⁺]_i in control cells and H-ras transformed cells in the absence of extracellular calcium(2.2mM CaCl₂).

*, p<0.05 as compared to control cells.

포는 200nM, 발암세포는 110nM을 나타내었으며 통계적으로 유의한 차이를 나타내어 세포의 칼슘결핍상태의 실험결과와 대조된 반응을 나타내었다 (Fig. 4).

4. H-ras 종양유전자의 발암화가 Inositol phosphate의 농도변화에 미치는 영향(Fig. 5)

phospholipase C와 관련된 제2신호전달물질인 [IP₃]의 농도변화를 측정하고 효현제들에 의한 대조군 세포와 발암세포의 반응변화를 관찰하였다. IP₃의 basal level은 발암세포는 2.8pmol, 정상세포는 2.1pmol로서 발암세포의 농도가 약간 높은 수준이었으나 통계적인 유의성은 없었다. 그러나 100μM ATP로 [IP₃]의 농도를 촉진시킨 결과 정상세포는 8.2pM, 발암세포는 5.3pM로서 발암세포의 반응이 유의한 차이로 낮았다. 또한 300μM histamine 처리시에도 정상세포는 7.8pM을 보인 반면 발암세포는 4.8pM을 보였으며 통계적으로도 유의한 차이를 나타내었다.

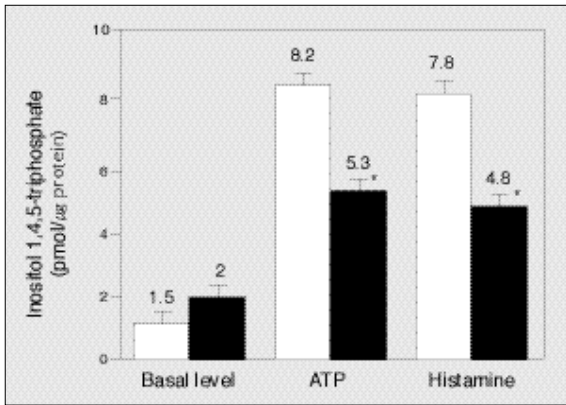


Fig. 5. Effects of APT or histamine on IP₃ generation in control cells(□) and transformed cells(■).
*, p<0.05 as compared to control cells.

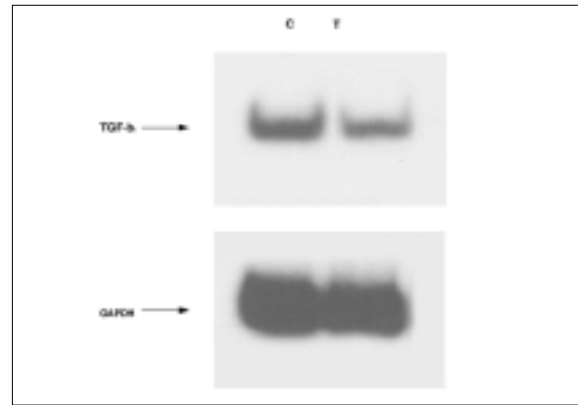


Fig. 6. Transcription of TGF- β_1 in control cells (c) and H-ras-trans-formed cells(T).

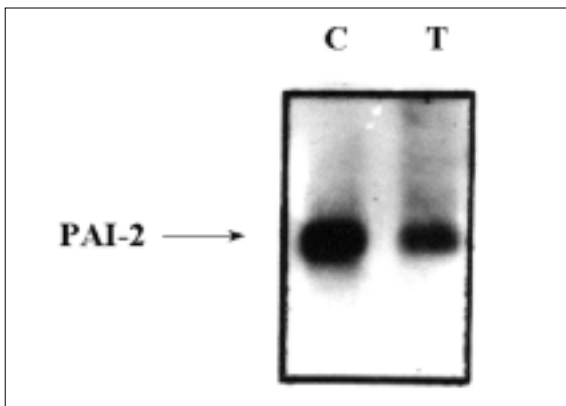


Fig. 7. RT-PCR analysis of PAI-2 in control cells (C) and H-ras-trans-formed cells(T)

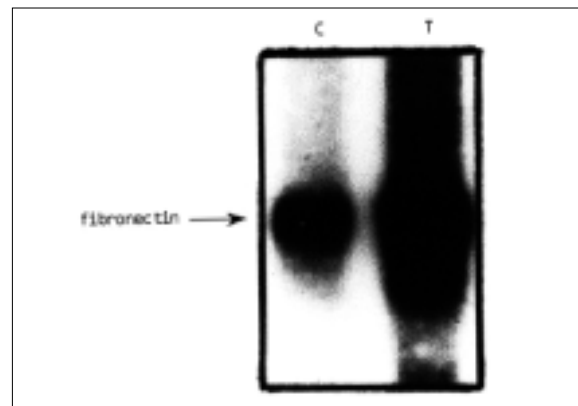


Fig. 8. Northern analysis of fibronectin RNA level in control cells (C) and H-ras-transformed cells(T)

5. H-ras 종양유전자의 세포발암화에 따른 성장조절 인자들의 변화

H-ras에 의해 발암화를 보인 세포군과 대조군 세포군의 TGF- β 1유전자 mRNA 수준을 RT-PCR로 분석한 결과 발암화 세포의 mRNA의 수준이 대조군 세포보다 낮았다 (Fig. 6). plasminogen activator inhibitor-2(PAI-2)의 mRNA양을 RT-PCR로 분석한 결과 대조군 세포에 비해 발암화 세포군의 transcription이 감소되었다(Fig. 7). 세포의 기질인 fibronectin mRNA의 변화를 Northern blot을 이용하여 측정한 결과 대조군 세포에 비해 발암화 세포군의 mRNA 수준이 높았다 (Fig. 8).

IV. 고 찰

ras-종양유전자는 여러 종양인자 중 가장 많이 연구된 생물학적 발암인자이며 인체 암의 발생과 밀접한 관계를 가지고 있다. 최근 보고에 따르면, 모든 종류의 인체암의 30%에서 ras 종양유전자의 mutation이 발견된 것으로 알려져 있으나²⁾ 지금까지의 많은 연구에도 불구하고 ras 종양유전자의 발암기전은 명확히 밝혀져 있지 않다. 실험동물 또는 실험세포모델에 따라 ras 종양유

전자에 의한 생화학적 변화가 상이하어 보다 광범위한 실험모델에 대한 연구가 요구되고 있다.

따라서 본 연구는 인체암의 발생기원이 되는 세포 형태중의 하나인 상피세포모델을 대상으로 H-ras 종양유전자에 의한 세포발암화를 규명하고 이러한 세포발암화 과정에 관여하는 성장인자 및 신호전달체계의 변화를 분석하므로써 ras 종양유전자에 의한 발암기전의 이해를 증진시키고자 하였다. 인체상피세포모델에 pSV-ras를 transfection시킨 결과 세포발암화의 지표인 foci가 출현하였으며 foci의 출현시기는 passage-6에서 시작하여 지속적인 증가를 보였는데, 이러한 결과는 발암화 특성을 지닌 세포가 ras 종양유전자에 의해 지속적인 성장을 하며 ras 종양유전자에 의한 유전자의 변화가 착상되었음을 의미한다. 만약 ras에 의한 유전자 변화가 착상되지 않을 경우는 passage의 증가에 따라 정상세포의 성장이 상대적으로 증가하여 foci의 소멸현상이 나타날 수 있다²⁾.

발암물질에 의한 상피세포의 특징적인 발암화 현상인 contact inhibition의 소실, anchorage independence의 증가, cell adhesion의 증가 등을 측정된 결과 ras를 함유하는 세포군은 대조군에 비해 saturation density가 증가하여 ras에 의해 contact inhibition의 소실이 진행되고 있음을 보여주었다. 또한 상피세포의 anchorage

independence를 평가하기 위해 soft-agar 상에서 성장하는 colony의 수를 비교한 결과 ras를 함유하는 세포군의 colony 형성이 월등히 높아 ras에 의한 anchorage independence가 나타나고 있음을 알 수 있었다. cell adhesion을 평가하기 위한 cell aggregation 실험에서도 ras 함유세포군의 세포간 접착력이 더욱 높음을 보였다. 본 연구는 인체상피세포가 ras-oncogene에 의해 발암화됨을 입증하는 또 하나의 증거를 제공하며 본 연구에 사용된 세포모델이 ras-oncogene의 발암화연구에 앞으로도 활용될 수 있음을 보여주는 결과이다.

세포의 형태학적 변화가 ras 종양유전자의 transfection에 의한 것임을 입증하기 위해 실시한 western blot 분석은 ras-oncoprotein이 세포의 형태적 변화와 관계가 있음을 명백히 보여 주고 있다. glucocorticoid에 대한 인체상피세포의 반응은 매우 다양하여 세포의 상태에 따라 세포의 성장 및 분화를 조절하는데, in vitro 상에서 세포가 정상적인 조건으로 성장할 때는 glucocorticoid가 상피세포의 성장 및 접착력을 증가시키지만 고농도로 밀집되어 있는 경우에는 오히려 세포의 분화를 촉진시킨다^{20,21}. Glucocorticoid steroid 중 hydrocortisone은 인체상피세포의 선별적인 성장촉진과 분화를 민감하게 야기시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 hydrocortisone의 이러한 선별적인 성장조절현상이 발암화에 미치는 영향을 조사하고자, 고농도의 hydrocortisone을 처리한 결과 foci의 출현시기 단축, saturation density, soft-agar colony formation, cell aggregation 등의 지표에서 뚜렷한 증가를 관찰할 수 있었다. 따라서 이러한 현상은 세포의 계대배양 직후에는 세포의 성장촉진을, 직전에는 정상세포의 분화를 촉진하여 결과적으로 hydrocortisone의 분화작용에 민감하지 않은 발암세포의 선별적인 성장을 초래하여 발암지표 상승의 원인이 된 것으로 추정된다. 따라서 hydrocortisone과 같은 steroid hormone의 이용은 in vitro 상의 실험조건에서 발암물질의 발암력을 민감하게 도출시킬 수 있어 발암예상물질의 발암력을 효율적으로 평가할 수 있는 수단으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

발암세포의 경우 세포내 칼슘농도를 비롯한 여러 가지 제2신호전달물질의 변화가 일어나는 데 이미 언급하였듯이 세포모델에 따라 많은 차이를 나타내어 보다 다양한 세포모델에서의 연구가 요구된다. 세포의 칼슘이 존재하지 않는 상태에서 효현제들을 처리한 후 세포내 칼슘농도의 변화를 관찰한 결과 대조군 세포의 농도가 발암세포에 비해 비교적 높은 편이었으나 통계적으로 유의하지 않았다. 반면 세포의 칼슘이 존재하는 상태에서 효현제를 처리한 결과 대조군 세포와 발암세포 사이에 뚜렷한 농도차이가 있었으며 대조군 세포의 농도가 높았다. 이 결과로 미루어볼 때 발암세포의 경우 세포외에 존재하는 칼슘의 유입이 발암화 과정에서 down regulation된 것으로 추정된다. 발암화에 따른 세포내 칼슘유입의 억제에는 화학적 발암물질에 의한 발암화과정에서도 보고된 바 있다²².

Phospholipase C와 연계하여 제2신호전달물질로 작용하는 IP₃의 농도를 측정된 결과 basal level의 IP₃ 농도는 발암세포에서 다소 높게 나타났으나 효현제 처리 후 IP₃의 증가폭은 발암세포에서 훨씬 낮게 나타났다. 이 결과는 ras 종양유전자에 의한 발암화

과정에서 외부 자극에 의한 IP₃의 신호전달체계가 억제되고 있음을 의미한다. 따라서 본 연구는 ras 종양유전자에 의한 세포 발암화에 phospholipase C와 관련된 신호전달기작의 억제가 관여하고 있음을 암시하고 있다.

종양인자에 의한 발암화는 성장조절인자의 변화와 밀접한 관계가 있어 H-ras에 의한 발암화세포에서 TGF-β₁의 전사가 대조군 세포에 비해 감소되어 나타났는데, TGF-β₁은 인체상피세포의 경우 일반적으로 성장을 억제하는 기능을 가지고 있으므로, TGF-β₁의 감소가 성장억제기능의 저하를 초래하여 발암화의 촉진에 관여하였을 것으로 추정된다. 그러나 이러한 결과는 TGF-β₁의 투여에 의해 본 연구에 사용된 세포모델의 성장이 얼마나 효율적으로 억제되는 지 확인되어야 할 것이며 추후 TGF-β₁의 세포성장 억제에 관한 더 많은 연구가 요구된다.

Plasminogen activator inhibitor-2(PAI-2)는 상피세포의 분화와 성장 및 이동에 관여할 뿐만 아니라 조직 용해 및 암의 진행에도 밀접한 관계를 가지고 있는 것으로 알려져 있으나^{24,25} 조직이나 암의 형태에 따라 달리 발현되므로 PAI-2의 감소나 증가가 암에 어떠한 형태로 관여하는 지는 알려져 있지 않다. 화학적 발암물질의 경우 PAI-2의 발현이 감소되어 발암화를 촉진시키는 결과가 보고된 바 있는데²⁶, 본 연구에서도 발암세포에서 PAI-2의 전사가 감소함을 나타내어 ras 종양유전자에 의한 상피세포발암화에는 PAI-2의 down-regulation이 관여할 것으로 추정된다.

Fibronectin은 암세포의 이동 및 분포에 관여하는 세포의 기질로서 발암화과정과 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되었는데¹⁰, 본 연구에서 ras에 의한 발암세포에서 fibronectin의 mRNA의 수준이 높게 나타난 것은 지금까지 선행들의 연구와와 일치되며 ras 종양유전자에 의한 상피세포의 발암화에서도 fibronectin의 증가를 관찰할 수 있었다. 이와 같은 ras 종양유전자에 의해 변화를 나타낸 성장조절인자는 인체세포 발암화를 예측할 수 있는 생물학적 지표로 개발할 수 있어서 앞으로 지속적인 연구가 요구된다.

본 연구에서 나타난 ras-oncogene에 의한 phospholipase C 관련 신호전달기작의 억제는 ras-oncogene에 의한 발암기전이해에 보다 폭넓은 자료를 제공하며 구강암을 조기에 발견하고 예방할 수 있는 생물학적 지표의 개발에 필요한 기초자료를 제공할 뿐만 아니라 암의 기원이 되는 세포형태인 상피세포의 신호전달기작 변화가 발암에 미치는 영향을 이해하는 데 기여할 것으로 전망된다.

V. 요 약

본 연구는 인체암 발생과 밀접한 관련을 가지고 있는 ras 종양 유전자의 발암화기전을 인체상피세포모델을 이용하여 규명하고자 SV40-Ad12 hybrid virus에 의해 불멸화된 인체상피세포모델에 H-ras 종양유전자를 함유하는 pSV₂-ras를 transfection하여 H-ras에 의한 세포발암화를 평가하였다. ras를 함유하는 세포군은 대조세포군에 비해 saturation density, soft-agar colony formation, cell aggregation 등의 세포 발암화지표가 유의한 수준으로 높게 나타나 H-ras에 의한 인체상피세포의 발암화를 확인하였다. 또한 H-

ras에 의한 인체세포 발암화는 hydrocortisone과 같은 glucocorticoid에 의해 촉진되어 saturation density, soft-agar colony formation의 증가 및 foci의 출현시기의 단축을 나타내었다. H-ras 종양 유전자에 의한 인체세포발암화 과정에 관여하는 신호전달기작의 영향을 평가하기 위해 효현제 처리 후 세포내 칼슘농도변화를 측정된 결과 발암세포의 세포내 칼슘농도변화가 낮게 나타났으며 특히 이러한 반응차이는 세포외 칼슘의 존재하에서 더욱 뚜렷이 나타났다. 따라서 세포외부로부터 칼슘의 세포내 이동이 발암화에 의해 억제되고 있음을 보였다.

또한 효현제 처리후 IP₃ 농도의 변화를 측정된 결과 발암세포의 IP₃ 증가폭이 대조군 세포보다 훨씬 낮았다. 이러한 결과는 H-ras에 의한 세포 발암화에 phospholipase C와 관련한 신호전달기작의 down-regulation이 관여하고 있음을 보여주고 있다. 성장조절인자의 mRNA 발현을 평가한 결과 TGF-β 및 PAI-2의 발현은 발암세포에서 낮게 나타난 반면 fibronectin의 경우는 발암세포의 발현이 높게 나타났다. 이러한 결과는 H-ras 종양유전자에 의한 발암화 과정에 성장조절인자의 변화가 관여하고 있으며 이러한 성장조절인자의 확인은 암발생의 생물학적 지표를 선별하는 데 기여할 것으로 사료된다.

본 연구는 H-ras 종양유전자에 의한 인체세포 발암화의 확인과 발암화 과정에 관여하는 신호전달기작의 변화 및 성장조절인자의 확인을 통하여 상피세포에서 나타나는 구강암 등의 발생기전 이해 뿐만 아니라 생체지표의 개발에 필요한 기초자료를 마련하는 데 기여할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Barbacid. M. : ras genes. Annu. Rev. Biochem. 56: 779-786, 1987.
2. Finidori-Lepicard J. : Progesterone inhibits membrane bound adenylylate cyclase in *Xenopus laevis* oocyte. Nature, 292: 255-259, 1988.
3. Levitzki and Rudick J. : Adenylylate cyclase activity of NIH3T3 cells morphologically trans -formed by ras genes. FEBS Lett, 197: 134-138, 1992.
4. Tarpley WG. and German RP. : Reduced hormone-stimulated adenylylate cyclase activity in NIH3T3 cells expressing the EJ human bladder ras oncogene. PNAS 83 : 3703-3709, 1986.
5. Wu, Y.Y. and Lin, M.C. : Induction of differentiation in v-H-ras transformed MDCK cells by prostaglandin E2 and 8-bromo-cyclic AMP is associated with a decrease in steady-state level of inositol 1,4,5-triphosphate. Mol. Cell. Biol. 10; 57-67, 1990.
6. Fleischman, L. F., Chahwala, S. B. and Catley, L. : Ras-transformed cells : altered levels of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and catabolites. Science 231; 407-410, 1986.
7. Seuwen KA. : Pollyssegur Derogulation of hamster fibroblast proliferation by mutated ras oncogene is not mediated by constitutive activation of phosphoinositide-specific phospholipase C. EMBO J. 7

- : 161-168, 1988.
8. Huang, M. et al : Enhancement of inositol phospholipid metabolism and activation of protein kinase C in ras transformed rat fibroblast. J. Biol. Chem. 264; 17975-17980, 1988.
9. Borner, C. et al : Expression of four protein kinase C isoforms in rat fibroblast. Differential alterations in ras-, src-, and fos-transformed cells. J. Biol. Chem. 267; 12900-12910, 1992.
10. Sheibani N, Rhim JS and Allen-Hoffman B.L. : Malignant Human papillomavirus type-16 transformed human keratinocytes exhibit altered expression of extracellular matrix glycoprotein. Cancer Res. 51: 5967-5975, 1991.
11. Viola MV et al. : Expression of ras oncogene P21 in prostate cancer. New Engl. J. Med. 314 : 133-139, 1986.
12. Rhim JS. : Stepwise immortalization and transformation of adult human prostate epithelial cells by a combination of HPV-18 and v-Ki-ras. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11874-11878, 1996.
13. Rhim JS et al. : Malignant transformation of human prostate epithelial cells by N-nitroso-N-methyl urea. Cancer Res. 57 : 576-580, 1997.
14. Lee MS, Yang JH, and Salehi Z. : Neoplastic transformation of a human keratinocyte cell line by the v-fos oncogene. Oncogene 8:387-393, 1993.
15. Yang JH, Thraves P, and Dritschilo A. : Neoplastic transformation of immortalized human keratinocytes by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Cancer 52: 3478-3482, 1992.
16. Rhim JS. : Neoplastic transformation of human epithelial cells in vitro. Anti Cancer Res. 9; 1345-1366, 1989.
17. Dohr O, Vogel C, and Abel J. : Different response of TCDD sensitive genes in human breast cancer MCF-7 cells. Arch. Biochem. Biophys. 321 : 405 - 412, 1995.
18. Gryniewicz G, Poonie M, and Tsiens RY. : A new generation of calcium indicators with greatly improved fluorescence properties. J. Biol. Chem. 260:3440-3450, 1985.
19. Downes CP, Hawkins PT, and Irvine RF. :Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate and not phosphatidylinositol 3,4-bis-phosphate is the probable precursor of inositol 1,3,4-triphosphate in agonist-stimulated parotid gland. Biochem. J. 238:501-506, 1986.
20. McClean JS, Frame MC, and Mackie AC. : Phenotypic modification of human glioma and non-small cell lung carcinoma by glucocorticoids and other agents. Anticancer res. 6:1101-1106, 1986.
21. Speirs V, Ray KP, and Freshney RI. : Pancreatic control of differentiation in alveolar carcinoma, A549, by human fetal lung fibroblasts. Br. J. Cancer 64:693-699, 1991.
22. Yang JH. : Alteration of signal transduction pathways involved in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo -p-dioxin-induced malignant transformation of human cells in culture. Chemosphere, 36(14):3015 -3031, 1998.
23. Massague J. : Transforming growth factor-b family. Annu. Rev. Cell Biol. 6:597-641, 1990.
24. Rosso MD, Fibbi, G, and Dini G. : Role of specific membrane receptors in urokinase -dependent migration of human keratinocytes. J. invest. Dermatol. 94:310-316, 1990.
25. Ishikawa N, Endo Y, and Sasaki T. : Inverse correlation between mRNA expression of PAI-2 and lymph node metastasis in human breast cancer. Jpn. J. Cancer Res. 87:480-487, 1996.
26. Yang JH, Vogel C, and Abel J. : A malignant transformation of human cells by TCDD exhibits altered expressions of growth regulatory factors. Carcinogenesis, 20(1):13-18, 1999.