

COX 억제제에 의해 유도되는 구강편평세포암종 세포주의 성장 억제 효과

박광진 · 한세진 · 이재훈
단국대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract

GROWTH INHIBITION OF ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA CELL LINE INDUCED BY COX INHIBITOR

Gwang-Jin Park, Se-Jin Han, Jae-Hoon Lee

Department of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Dankook University

The objectives of this study was to explore the growth pattern of the oral squamous cell carcinoma when overexpressed COX was inhibited, explore the pathway that COX inhibitors suppressed the proliferation of cancer cells, and then hereafter investigate the potential of COX as chemopreventive target for oral squamous cell carcinoma. For confirming the COX-dependent effect and mechanisms on growth of the oral cancer cells, we treated the nonselective NSAID, Mefenamic acid and COX-2 selective inhibitor, Celecoxib in HN4 cell line. And then the cell line was evaluated with MTT assay and growth curve, the production of PGE2, total RNA extraction and RT-PCR analysis, and TEM

The results were obtained as follows:

1. After administration of medication, in the result of MTT assay, Celecoxib inoculated group inhibit the cell growth rather than Mefenamic acid inoculated group.
2. The growth curve of cell line showed as time passes by there was a dramatic cell growth in the control group, and gradual growth inhibition was found in medication inoculated group and, in Celecoxib inoculated group there was more inhibition of cell growth.
3. After the administration of medication, Celecoxib tend to inhibit the synthesis of PGE2 more than Mefenamic acid. Mefenamic acid inhibit the synthesis of PGE2 more as the concentration gets high, but Celecoxib inhibited the synthesis of PGE2 even in low concentration.
4. After the administration of medication, the revelation of COX mRNA in cell line, there was a 50% decrease in COX-1, 60% decrease in COX-2 as in 50 μ M Mefenamic acid, and in Celecoxib 50 μ M there was not much difference in COX-1 and 90% decrease in COX-2 was found.
5. HN4 cell line showed broken nucleus and tangled cytoskeleton bundles in cytoplasm which meant apoptotic features after the treatment of Celecoxib in TEM view.

Depending on the above results, we estimate that the inhibition of the expression of COX-2 cause the growth suppression of the oral squamous cell carcinoma, and it get achieved through pathway of reduced PGE2 production and increased apoptosis. In addition to, because COX-2 selective inhibitor specifically act to COX-2, it is considered that COX-2 selective inhibitor has the adequate potential as chemopreventive agent for oral squamous cell carcinoma.

Key words: COX growth inhibition, Oral squamous cell carcinoma cell

I. 서론

2000년도에 발표된 통계에 의하면 전세계적으로 매년 1000만 건의 암이 새롭게 진단되고 있고, 이 암으로 인해 한해에 600만 명의 사람이 사망하며, 현재는 2200만 명이 암 투병 중인 것으로 조사되었으며, 세계 인구수의 증가 및 노령화와 맞물려 현재의 암 발생 추세가 변하지 않는다면 2020년에는 매년 1500만 건의 새로운 암이 진단되고 1000만 명의 사망자가 발생할 것으로 예상되고 있다¹⁾. 중앙 세포가 충분한 세포 분열과 분자의 변화 단계를 거쳐 임상적으로 검출 가능한 병소에 도달하기까지 약 10-25년이 걸리는데 이 기간 동안에 암 발생 억제제를 위해 현재보다 더 많은 노력이 경주되어야 할 것이다. 이는 노령화하고 있는 세계 인구에서 암의 이러한 영향력과 맞물려 효과적인 예방법을 찾아내고 적용할 필요성의 결정적인 이유가 되고 있다.

구강편평세포암종은 구강에 발생하는 암 중에서 가장 빈발하고, 장기 생존율이 50% 이하일 정도로 파괴적인 행태를 보이며, 전통적인 치료 방법인 수술, 방사선 치료 및 화학요법에서의 기술의 비약적 발전에도 불구하고 지난 40년 동안 예후가 크게 개선되지 않았다²⁾. 치료의 실패 이유는 초기 단계 질환의 경우에는 주로 두 번째 일차 종양(second primary tumor)로 인한 경우가 많았고, 좀 더 진행된 암종의 경우에는 국소적 재발과 전이로 인한 실패가 많았다^{3,4)}.

전통적인 치료 방법들의 한계를 극복하고자 화학적 암 예방법 등의 새로운 연구가 활발하게 이루어지고 있으며, 그 중에서 비스테로이드성 소염진통제(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)의 장기 복용이 암종 발현을 예방할 수 있다는 여러 보고들이 있었다. 최근의 여러 연구에서 아스피린이나 NSAIDs를 장기 복용하는 사람들에 대해 결장 직장암의 발생 가능성이 40-50%까지 감소했다는 보고가 있었으며, 이는 이 약물들이 효과적인 화학적 암 예방제제로 이용될 수 있음을 시사한다⁵⁾.

구강암의 발생과정은 다단계 발생과정과 field cancerization으로 설명되고 있다. 구강암의 경우 전암병소의 관찰이 용이하기 때문에, 암으로 진행된 후의 치료보다는 암으로의 진행을 예방하기 위하여 화학물질을 이용하여 암화를 억제시키고자 하는 화학적 암 예방의 좋은 후보군이라 할 수 있겠다.

NSAIDs가 이런 예방 효과를 일으키는 기전에 대한 관심이 증폭되고 있으며, 이로 인해 발암 과정에서 COX의 역할이 주목받고 있다. COX는 아라키돈산(arachidonic acid)이 프로스타글란딘(prostaglandin) G₂와 PGH₂로 변환되는 것을 촉매하는 효소이다. PGH₂는 이후 PGE₂, PGD₂, PGF₂, PGI₂, thromboxane A₂등 여러 종류의 eicosanoid

들로 변환하게 되고,⁶⁾ 이들 물질들은 다양한 생리적 작용을 하게 된다.

COX에는 COX-1과 COX-2의 두 가지 동질효소가 있으며, 이들은 각기 다른 유전자에 의해 인코딩되는 것으로 알려져 있다⁷⁾. 이들 동질효소의 기능은 인체 조직에서의 발현 양상과 일치하는 데, COX-1은 거의 모든 정상 조직에서 발현되어 조직 보호 등의 일상적인 역할을 하는 반면에⁸⁾, COX-2는 성장 인자, 사이토카인, 종양촉진제 등에 의해 자극되면 즉각적이고 일시적으로 발현되는 유전자에 의해 합성되며, 염증이나 암 조직에서 증가된다⁹⁻¹¹⁾.

전통적인 NSAIDs는 COX-1과 COX-2 둘 다의 활성을 방해함으로써 프로스타글란딘 합성을 감소시키게 된다¹²⁾. COX-2 선택적 억제제로 현재 Celecoxib (Searle/Pharmacia/Pfizer, New London, CT), Rofecoxib (Merck, Whitehouse, NJ) 및 Valdecoxib (Pharmacia/Pfizer)의 세 종류의 약물이 시판되고 있다. 이들 약물들은 모두 류마티스성 관절염, 골관절염, 생리통에서 나타나는 동통과 염증 치료에 사용이 승인되어졌다. 이들 COX-2 선택적 억제제는 급성 혹은 만성 염증의 치료에 전통적인 NSAIDs와 유사한 효능이 있을 뿐만 아니라, COX-1 효소를 차단하지 않음으로써 전통적인 NSAIDs 복용시 위장관계와 혈소판에 나타나는 부작용을 크게 감소시켰다.

NSAIDs의 화학적 암 예방 효과에 대한 가능성이 가족성 선종성 용종증(familial adenomatous polyposis, FAP) 환자를 sulindac으로 치료하는 과정에서 처음으로 주목받게 되었다¹³⁾. Waddell 등¹⁴⁾은 FAP과 Gardner씨 증후군 환자에 sulindac을 투여했을 때 용종의 성장이 감소되고 용종이 없어지는 현상을 발견했다. 6년 후의 추적 조사에서는 sulindac 치료를 중단한 경우에 용종이 재발된 것으로 보아 이는 sulindac의 세포독성 효과보다는 세포증식억제 효과로 인한 것이라고 설명하였다. 이 연구 이후로 이루어진 많은 연구들에서 단발성의 결장 직장암이나 FAP 환자에서 NSAIDs를 정기적으로 복용할 경우 결장 직장암이 40-50% 까지 감소한다는 것이 명백해졌다¹⁵⁾.

발암과정에서 COX-2의 역할에 대해 인정하지 않을 수 없는 증거가 쥐를 이용한 유전적 연구에서 제공되었다. Oshima 등¹⁶⁾은 FAP 쥐를 이용한 실험 모델에서 COX-2 유전자를 없앤 경우에 장 용종의 수와 크기가 크게 감소한다는 것을 보여주었다. 발암과정과 COX-2의 유전적인 관련성 외에도 COX-2 선택적 억제제가 실험동물들에서 장 종양의 발생을 방해했다¹⁷⁾. 이러한 연구들로 인해 상피세포 기원의 몇몇 암종의 화학적 암 예방에 COX-2 선택적 억제제를 사용할 수 있는 근거가 마련되었다.

한편 구강암에 대한 경우에는, Chan 등¹⁸⁾은 정상적인 구강 점막에 비해 두경부의 편평세포암종에서 COX-2

mRNA가 150배 증가했으며, COX-2 단백질도 6 증례의 두경부 편평세포암종에서 다 발견되었는데 반해 정상 구강점막에서는 검출되지 않았다고 하였다. 이처럼 대부분의 구강편평세포암종에서 COX-2가 과발현되고, COX-2의 발현이 증가됨에 따라 종양세포의 세포사멸이 억제되고 혈관신생이 유도되며 면역계가 파괴되어 종양세포의 성장과 침투가 증가된다고 알려져 있다¹⁹⁾.

그러나 종양세포가 COX-2를 과발현하게 되는 원인이나, 증가된 COX-2가 이러한 현상들을 매개하는 분자적 기전은 아직 잘 규명되어있지 않으며, 프로스타글란딘의 합성을 촉발함으로써 프로스타글란딘이 암발생과정에서 미치는 역할과 세포사멸을 억제하는 기전으로 작용할 것이라고 추측되고 있다. 마찬가지로 NSAIDs가 암발생과정에서 작동하는 방식도 프로스타글란딘의 합성을 방해하는 경로와, 합성을 방해하지 않는 다른 경로를 통해 효과를 발휘한다고 알려져 있다²⁰⁾. COX-2 선택적 억제제가 COX-2 발현을 변화시키는 것만을 통해서 작용한다면 COX-2 선택적 억제제를 이용한 치료는 COX-2를 과형성하는 종양에만 제한될 것이므로 이 약제의 작동 방식에 대한 이해가 임상적으로 매우 중요하다 할 것이다.

본 연구는 구강편평세포암종에서 과발현된 COX를 억제할 때 종양의 성장 양상이 어떻게 변하는지 확인하고, COX 억제제가 어떤 경로를 통해 세포의 증식을 억제하는지를 고찰하며, 향후 구강암의 화학적 암 예방을 위한 제제로서 COX 억제제의 가능성을 타진하기 위해 수행되었다. COX가 구강편평세포암종의 성장에 미치는 영향과 그 기전을 확인하기 위해, 본 연구에서는 HN4 세포주에 비선택적 COX 억제제인 Mefenamic acid와 COX-2 선택적 억제제인 Celecoxib를 투여했을 때 종양세포의 성장, PGE2의 합성, COX mRNA의 발현 및 세포사멸을 관찰하였다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 구강편평세포암종 세포주 배양

구강편평세포암종 세포주로는 ATCC(Manassas, VA, USA)사에서 구입한 HN4 세포주를 사용하였으며, 10% FBS(fetal bovine serum)가 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco, USA) 배양액을 넣고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 이후 100mm 세포배양접시에 HN4 종양세포 2×10⁵개씩을 분주하여 계대배양한 세포를 실험에 이용하였다.

2. Mefenamic acid와 Celecoxib의 농도 조절 및 약제 투여

Mefenamic acid(Pontal[®])와 Celecoxib(Celebrex[®])를 각각 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹이고 DMEM으로 희석하여 stock solution으로 1mg/ml의 농도로 만들었다. 대조군으로는 약제가 포함되지 않은 HN4 세포주를 이용하였고, 실험군은 투여된 약제의 농도가 30, 50, 100μM인 3군으로 분류하였다.

3. 약제 투여 후 구강편평세포암종 세포주의 MTT Assay

HN4 종양세포를 96-well plate에 배양액 200μl에서 well당 세포수가 2×10⁵개가 되도록 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 그 후 Mefenamic acid와 Celecoxib를 각각 30, 50, 100μM 농도로 투여한 배양액을 넣고 37°C에서 48시간 동안 반응시켰다. 약제 처리한 세포를 PBS로 두 번 세척하고 MTT 50μg/ml가 포함된 배양액에 추가로 3시간을 배양하였다. 배양액을 버리고 2ml의 DMSO를 넣고 실온에서 5분간 처리한 후 분광광도계로 550nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 약제 투여 후 구강편평세포암종 세포주의 성장곡선

HN4 종양세포 2×10⁵개를 100mm 세포배양접시 3개에 분주하고, Mefenamic acid(농도 50μM)와 Celecoxib(농도 30μM, 50μM)를 투여한 군으로 나누어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7일째 각각 DPBS로 세포를 세척하고 각 well에 Trypsin-EDTA 용액(0.5% Trypsin-0.53mM EDTA 4Na)을 넣고 5분간 기다린 후 세포를 수거하여 원심 분리하였다. DMEM 배양액 4ml씩을 원심 분리관에 혼합한 후 90μl를 튜브에 옮겨담고 0.4% Trypsin-blue 용액 10μl를 혼합하여 헤모사이토미터로 세포수를 측정하였다. 세포배양접시당 총세포수를 투여한 약제의 농도에 따라 환산하여 성장곡선을 표시하였다.

5. 약제 투여 후 구강편평세포암종 세포주의 PGE2 합성 측정

종양세포로부터 합성되는 PGE2의 양을 측정하기 위해서 PGE2 검출 키트(Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ, USA)를 이용한 competitive PGE2 enzyme immunoassay를 시행하였다. HN4 종양세포를 Mefenamic acid와 Celecoxib 각각 30μM, 50μM로 72시

간 동안 처리하고 종양세포주의 배양액을 채취해서 세포 잔사를 제거하기 위해 2500g에서 2분 동안 원심분리한 후, 부유액을 깨끗한 튜브로 옮겨 담고 검사할 때까지 -70℃에서 보관하였다. 이 샘플을 희석한 후 well로 옮겨놓고 피펫을 이용하여 PGE2 conjugate를 각 well에 첨가하였다. 이후 PGE2에 대한 monoclonal antibody를 각 well에 첨가한 후 4℃에서 18시간 동안 처리하였다. Well plate를 4번 수세하고 tetramethylbenzidine 기질을 첨가하여 염색하였다. 실온에서 30분 동안 반응시킨 후 1M sulfuric acid를 첨가하여 염색 반응을 정지시켰다. ELx800 reader (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)로 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 아울러 광학현미경으로 세포의 총 개수를 세어 PGE2의 양을 106개의 세포당 pg 단위로 표현하였다.

6. Total RNA Extraction

Mefenamic acid와 Celecoxib를 각각 30μM, 50μM 투여한 HN4 세포주를 세포배양접시에서 70-80% 정도 성장시킨 후 배양액을 제거하고 pH 7.4 PBS(Gibco BRL, USA)로 수세하였다. Guanidinium thiocyanate 방법이 total RNA 추출에 사용되었고, RNA 추출 버퍼로 Guanidinium thiocyanate 용액(4M Guanidinium thiocyanate, 1% β-mercaptoethanol, 0.1M Tris-Cl pH 7.5)을 세포주에 떨어뜨린 후 10% sodium lauryl sarcosinate 용액과 혼합하여 0.5% 농도로 만들었다. 원심 분리 후 pH 5.5인 2M의 아세트산칼륨 용액 0.5ml와 1M의 아세트산 0.8ml를 혼합하여 -20℃의 에탄올 7.5ml에 보관하였다. 건조된 침전물을 Guanidine-HCl 용액(8M Guanidine-HCl, 0.1M sodium acetate pH 7.0, 1% β-mercaptoethanol, 20mM EDTA)에 용해시켰다. 상층부의 액체를 제거하고 pH 8.0, 20mM EDTA를 첨가하여 침전물을 용해시켰다.

Chloroform/n-butanol(4:1 v/v)을 배양액과 1:1로 만

들어 혼합하고 배양한 후, 원심 분리하고 4mM 아세트산 나트륨 용액(pH 7.0)을 3배로 해서 혼합하고 -20℃에서 2시간 저장하였다. 다시 원심 분리하여 50μl diethyl pyrocarbonate(DEPC)로 용해 후 분광광도계를 사용하여 RNA의 양을 260nm에서 측정하였다. 일부의 시료는 -20℃로 냉동 보관하여 다음 실험에 사용하였다. Total RNA를 확인하기 위해 전기영동을 시행하였다. 10X 3-(N-morpholino)prapanesulfonic acid(MOPS), 50mM sodium acetate, 0.5M EDTA(pH 8.0), 10N NaOH(pH 7.0) 용액에 1% 아가로스 젤을 만들고, 실온에서 젤을 굳힌 후, 3μg RNA, 1.25μl 10X MOPS, 2μl formaldehyde, 6.25μl formamide를 혼합하고 65℃에서 5분간 가열하고 얼음에 식혔다. 1.25μl 젤 로딩 용액을 섞고, 완충 용액으로 1X MOPS를 쓰고 120 V/cm으로 하여 bromophenol blue의 푸른색이 전체 젤의 2/3까지 나오도록 전기영동을 시행하였다.

7. RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction) 증폭

1μg의 DNase로 처리된 total RNA를 random hexamer primer에 70℃에서 10분 간 섞은 후 얼음 속에 넣어두었다. 이것을 다시 첫 번째 strand buffer의 5배로 섞고, 100mM dithiothreitol(DTT), 10mM dNTPs, 10U RNase와 200U/μl superscript II reverse transcriptase(Gibco BRL, USA)를 섞어 42℃에 60분간 처리한 후 cDNA를 만들었다. 이 cDNA를 80μl 물에 희석한 후 1.5mM MgCl, 50mM KCl, 100mM Tris-HCl, pH 8.3 200μM dTAD, dTTP, dGTP, biotinylated dCTP를 0.75μl씩 만들고 double 2.5μl cDNA가 포함된 1 unit Tag-polymerase(Gibco BRL, USA)를 반응물 총량이 50μl로 만들어 PCR 증폭을 시행하였다. PCR 조건의 한 cycle은 변색 과정은 95℃에서 1분, 증폭을 위해 95℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 1분간 처리하고, 마지막 확장

Table 1. Sequences of primers for amplified cDNA of *Cox-1*, *Cox-2* and *GAPDH*

Gene	Primer	Sequence
<i>Cox-1</i>	sense	5'-GGGACACAGCCGTGAGTAAT-3'
	antisense	5'-TCACTGCTGTTGGGTCTCTG-3'
<i>Cox-2</i>	sence	5'-TGAGCATCTACGGTTTGCTG-3'
	antisense	5'-TGCTTGTCTGGAACAACACTGC-3'
<i>GAPDH</i>	sence	5'-TGCATCCTGCACCAACCAACT-3'
	antisense	5'-TGCATCCTGCACCACCAACT-3'

위해 72°C에서 10분간 시행하였다.

이 실험은 PCR primer(Table 1)를 이용하여 증폭을 시행하였다. 약제를 넣지 않은 세포의 glyceraldehyde phosphate dehydrogenase(GAPDH)를 대조군으로 위의 방법으로 증폭시켰으며, PCR 생성물을 2% 아가로스 겔에서 전기영동하고 젤 건조기에 말린 후 enhanced chemiluminescence(ECL, Gibco BRL, USA) 방법을 사용하였다. 필름에 노출 후 현상을 하고 농도계를 사용한 반정량적 방법으로 각각의 mRNA 수준을 GAPDH 수준으로 나누어 평균을 구하여 상호 비교하였다.

대조군은 COX-1 mRNA expression/GAPDH mRNA expression과 COX-2 mRNA expression/GAPDH mRNA expression를 1로 하고, 실험군의 유전자 발현량은 대조군과 비교한 비율로 환산하여 그래프에 표시하였다.

8. 투과전자현미경 관찰

70~80% 정도의 증만전(preconfluency) 상태에서 배양된 HN4 세포주에 Mefenamic acid 50 μ M과 Celecoxib 50 μ M을 각각 투여한 후 0.1M cacodylate buffer(pH 7.4)하의 2.0% glutaraldehyde에 4°C에서 1시간 고정 후, 0.1M cacodylate buffer(pH 7.4)하여 1.0% osmium tetroxide에 4°C에서 후고정하였다. Graded ethanol에서 탈수 후 Epon812(TAAB Lab., Berk)에 포매한 후 LKB microtome에서 diamond knife를 이용하여 초박절편을 제작하였다. Uranyl acetate lead citrate로 염색 후 투과전자현미경(H-800 TEM, Hitachi, Tokyo, Japan)에서 관찰하였다.

III. 연구 결과

1. COX 억제제가 구강편평세포암종 세포주의 성장에 미치는 효과

Mefenamic acid와 COX-2 선택적 억제제인 Celecoxib가 구강편평세포암종의 성장에 어떤 영향을 미치는지 확인하기 위해서 HN4 세포주에 Mefenamic acid와 Celecoxib를 각각 30, 50, 100 μ M 농도로 48시간 동안 처리하여 MTT assay로 관찰하였다. DMSO만을 첨가한 배양액에 있는 세포와 비교했을 때, Mefenamic acid는 각 농도에서 약 10, 20, 70%, Celecoxib는 각 농도에서 20, 50, 90%로 succinyl dehydrogenase 활성도가 낮아져서 각각의 농도에서 Celecoxib가 Mefenamic acid에 비해 농도에 따르는 세포성장 방해 효과가 더 큰 것으로 나타났다(Fig. 1). Mefenamic acid를 투여한 군에서는 50 μ M 이상에서 유의한 성장의 저하가 나타났고, Celecoxib를 투여한 군에서는 30 μ M에서도 뚜렷한 성장의 저하가 나타났다. 세포의 성장이 50% 감소되는 농도인 IC₅₀은 Celecoxib의 경우에 50 μ M이었다. 이러한 데이터는 종양세포에서 과발현된 COX가 종양의 성장과 관련이 있으며, COX-2 선택적 억제제의 효과가 더 크게 나타나므로 특히 COX-2가 종양의 성장을 촉진시킨다는 것을 보여준다.

한편 약제를 투여한 기간에 따른 세포의 성장곡선을 관찰한 결과 약제 처리하지 않은 대조군에서는 기하급수적인 세포성장이 나타나는 데 비해, Mefenamic acid와 Celecoxib 50 μ M를 처리한 군에서는 1일 이후부터 7일까지 완만한 세포의 성장 억제가 나타났고, Celecoxib를 투여한 군에서 성장의 억제가 더 크게 나타났다(Fig. 2). 이 결과는 MTT

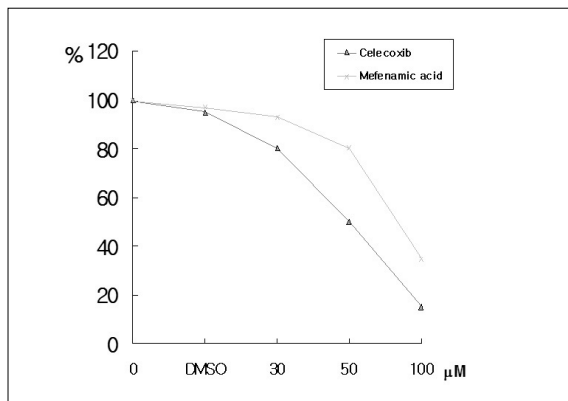


Fig. 1. MTT assay of HN4 cell line according to concentration.

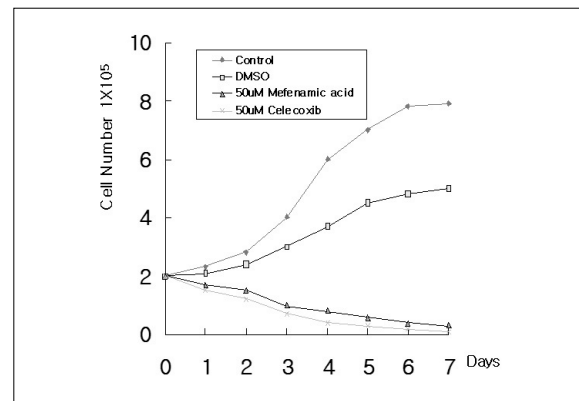


Fig. 2. Growth curve of HN4 cell line according to 50 μ M Mefenamic acid and Celecoxib.

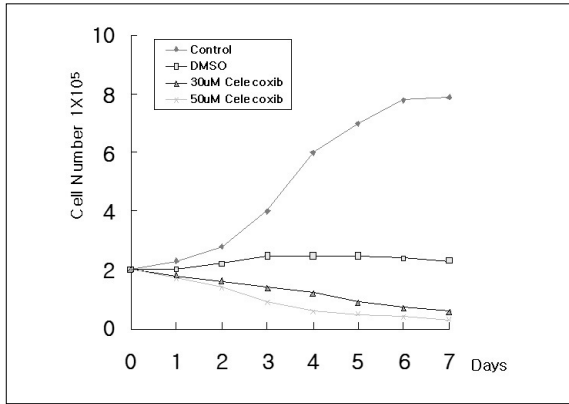


Fig. 3. Growth curve of HN4 cell line according to 30µM and 50µM Celecoxib.

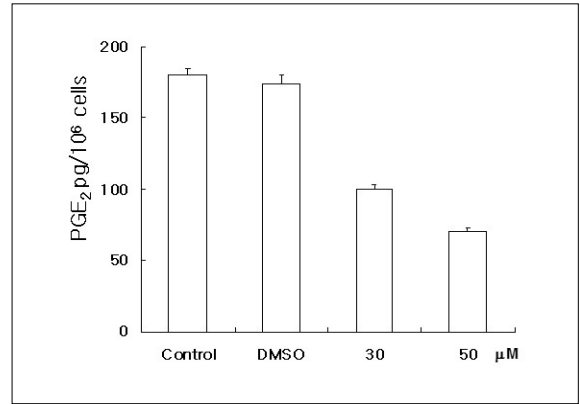


Fig. 4. Inhibition of PGE₂ synthesis by Mefenamic acid in HN4 cell line.

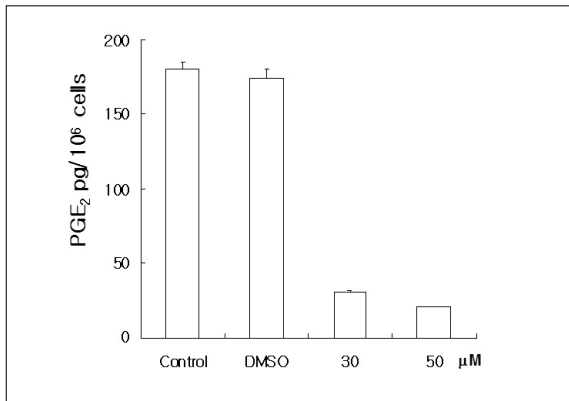


Fig. 5. Inhibition of PGE₂ synthesis by Celecoxib in HN4 cell line.

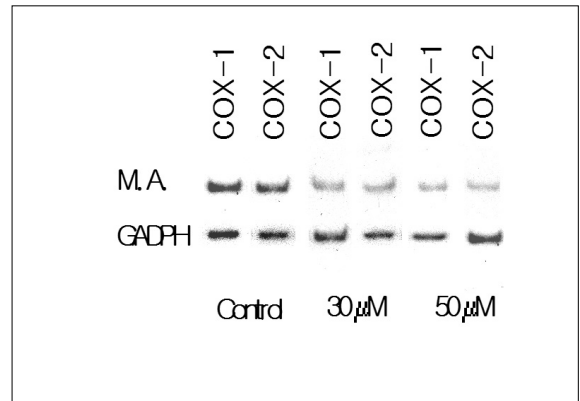


Fig. 6. COX-1 and COX-2 mRNA determination of RT-PCR in HN4 cell line by Mefenamic acid.

assay를 통해 나타난 결과를 뒷받침한다. Celecoxib를 30 µM과 50µM을 투여한 결과에서는 50µM을 투여한 군에서 더 큰 성장억제가 나타났다(Fig. 3). 이상의 결과에서 COX-2 선택적 억제제를 더 큰 농도와 더 긴 시간 동안 투여하여 COX-2를 더 많이 억제할수록 세포의 성장을 더 억제할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

2. COX 억제제가 구강편평세포암종 세포주의 PGE₂ 합성에 미치는 효과

Mefenamic acid와 Celecoxib가 종양세포의 PGE₂ 합성에 미치는 효과를 확인하기 위해서 Mefenamic acid와 Celecoxib를 각각 30, 50µM 농도로 HN4 세포주를 72시간 동안 처리한 후 배양액을 수거하여 PGE₂ immunoassay를 시행하였다. 약제를 투여하지 않은 대조군과 DMSO

만을 투여한 군에서의 PGE₂ 합성량은 큰 변화가 없는데 비해서 Mefenamic acid 30µM을 투여했을 때 약 45%, 50µM을 투여했을 때 60%까지 PGE₂의 합성이 떨어지는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). Celecoxib를 투여한 군에서는 30µM을 투여했을 때 85%, 50µM을 투여했을 때 90%까지 PGE₂의 합성이 억제되었다(Fig. 5). COX-2 선택적 억제제가 비선택적 NSAIDs에 비해 각 농도에서 PGE₂의 합성을 더 저해하며, 각 약제의 농도에 따른 PGE₂의 합성과의 관계는 비선택적 NSAIDs는 농도의 차이에 따라 PGE₂ 합성의 저해가 더 큰 폭으로 나타나는 데 비해, COX-2 선택적 억제제는 낮은 농도에서도 합성 방해 효과가 크게 나타났다. 이상의 결과에서 COX-2 선택적 억제제가 PGE₂의 합성을 방해하는 경로를 통해 종양의 성장을 억제시키는 것을 확인하였으며, 이는 PGE₂가 종양의 성장에 크게 관여한다는 것을 반증한다.

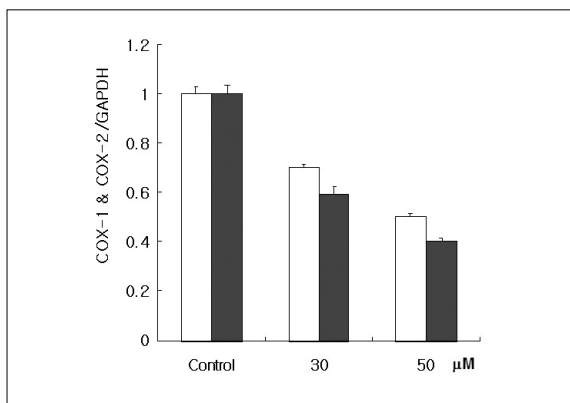


Fig. 7. COX-1 and COX-2 mRNA determination of RT-PCR in HN4 cell line by Mefenamic acid.

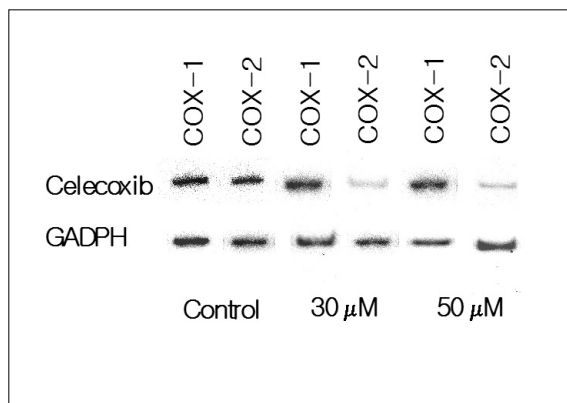


Fig. 8. COX-1 and COX-2 mRNA determination of RT-PCR in HN4 cell line by Celecoxib.

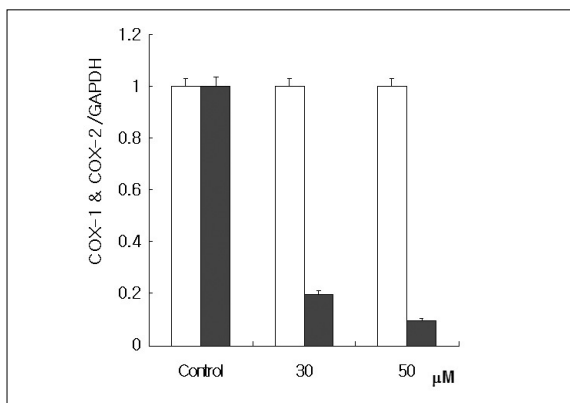


Fig. 9. COX-1 and COX-2 mRNA determination of RT-PCR in HN4 cell line by Celecoxib.

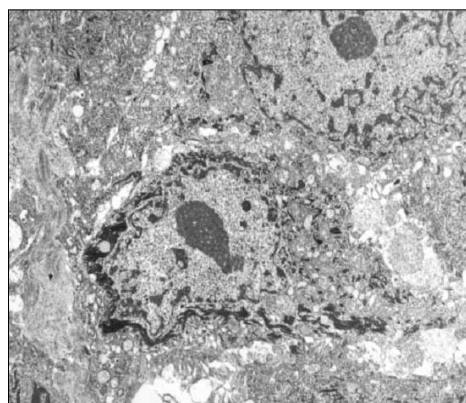


Fig. 10. TEM view of control HN4 cell line group.

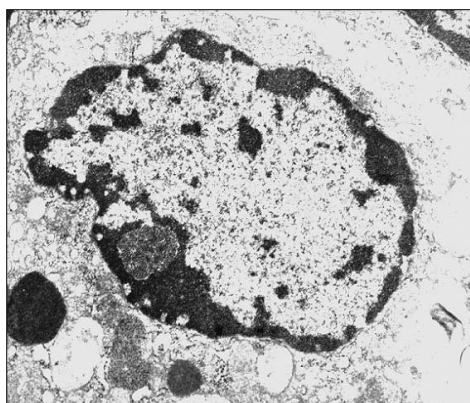


Fig. 11. TEM view of 50 μM Mefenamic acid HN4 cell line group.

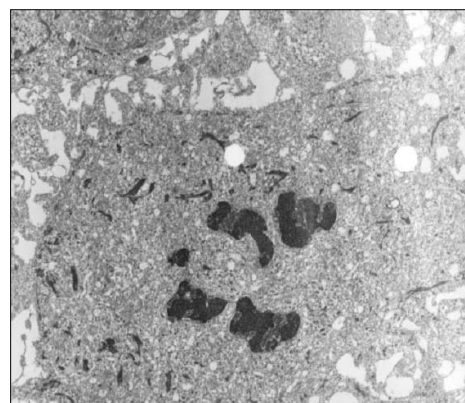


Fig. 12. TEM view of 50 μM Celecoxib HN4 cell lineroup.

3. COX 억제제가 구강편평세포암종 세포주의 COX mRNA 발현에 미치는 효과

Mefenamic acid와 Celecoxib를 각각 30 μ M, 50 μ M을 투여한 후 종양세포에서 COX mRNA의 발현 양상을 관찰하기 위해 total RNA extraction과 RT-PCR 증폭을 이용해 측정하였다. Mefenamic acid를 처리했을 때 mRNA의 발현량은 COX-1은 30 μ M 농도에서 대조군에 비해 30%, 50 μ M 농도에서 50% 정도 줄었고, COX-2는 30 μ M에서 40%, 50 μ M에서 60% 정도 감소되는 것을 확인하였다 (Fig. 6, 7). 이에 반해 Celecoxib를 처리한 경우에는 COX-1의 mRNA 발현량은 차이가 없었으며, COX-2의 경우에는 30 μ M에서는 80%, 50 μ M에서는 90% 정도까지 큰 폭으로 감소하였다 (Fig. 8, 9). 이상의 결과로 미루어 보아 COX-2 선택적 억제제는 COX-1에는 전혀 영향을 미치지 않으며 COX-2에만 특이적으로 작용하여 COX-2에 의해 매개되는 종양세포의 성장을 차단하기 위해 이 약제를 사용할 수 있는 근거를 보여주었다.

4. COX 억제제 투여 후 구강편평세포암종 세포주의 전자현미경 소견

종양세포의 성장이 억제되는 원인을 찾기 위해 HN4 세포주에 Mefenamic acid와 Celecoxib를 각각 50 μ M을 투여한 후 투과전자현미경으로 관찰한 결과, 약제를 투여하지 않은 대조군에서는 세포골격(cytoskeleton)이 고르게 분포되어 있는 세포질과 비교적 큰 핵, 그리고 핵인이 두드러져 보이는 소견으로 보아 단백질 합성이 활발하게 진행되고 있는 상태임을 알 수 있었다 (Fig. 10). 그에 비해 Mefenamic acid를 투여한 군에서는 염색체가 핵 변연으로 이행(chromosome margination)되고 액포(vacuole)이 형성되는 등 세포사멸의 초기 현상들이 관찰되었고 (Fig. 11), Celecoxib를 투여한 군에서는 세포골격이 뒤엉켜 있고, 핵이 분절된 소견 등 세포사멸이 진행중인 세포에서 특징적으로 관찰되는 소견들이 많이 관찰되고 있어 (Fig. 12), COX-2 선택적 억제제가 세포사멸의 증가를 통해 종양세포주의 성장을 억제시키는 또 다른 경로를 확인할 수 있었다.

IV. 총괄 및 고찰

COX-2는 종양 유전자, 성장 인자, 사이토카인, 종양 촉진제 등에 의해 세포에 자극이 가해졌을 때 발현되며, 위장, 간, 결장, 두경부 등 거의 모든 인체조직의 전암병소 및 암병소에서 COX-2 mRNA와 단백질의 발현이 증가되는 것으로 밝혀졌다²¹⁾. 그러나 암중에서 COX-2의 발현이 증가

되는 기전은 아직 밝혀지지 않은 상태이며, β -catenin oncoprotein에 의해 COX-2 유전자가 활성화된다는 가설과²²⁾ Ras 유전자의 돌연변이에 의해 기시되는 세포내 특정 신호체계의 활성화²³⁾을 통해 COX-2 발현이 증가된다는 설이 유력하다.

두경부 편평세포암종에서도 COX-2의 발현이 증가된다는 여러 보고들이 있었다. Chan¹⁸⁾ 등은 두경부 암종을 가진 24명의 환자에서 RT-PCR을 사용하여 COX-2 mRNA를 측정하여 17명의 대조군 환자의 mRNA 양과의 결과를 비교하였는데 암종 환자에서 COX-2 mRNA의 양이 150배 증가되며, 암 병소에 인접한 정상 조직에서도 정상 구강점막에 비해 mRNA 수준이 50배나 높다는 것을 발견했다. 추가로 전암병소인 구강 백반증에서 COX-2 단백질이 발현된다는 것도 밝혀냈다. 이처럼 구강암의 발암과정에서도 COX의 활성이 중요한 역할을 한다는 것을 말해준다.

본 연구에서는 구강 편평세포암종의 성장에 미치는 COX의 효과와 COX-1과 COX-2의 차이를 알기 위해서, 비선택적 NSAID인 Mefenamic acid와 COX-2 선택적 억제제인 Celecoxib를 투여하고 MTT assay를 통해 분석한 결과 Celecoxib가 Mefenamic acid에 비해 구강편평세포암종 세포주의 성장 방해 효과가 더 큰 것으로 나타났다. Mefenamic acid를 30 μ M 투여한 군에서는 세포의 성장저하가 미미한 데 반해 Celecoxib를 같은 농도로 투여한 경우에는 뚜렷한 성장의 저하가 나타났다. 이 결과는 종양세포에서 과발현된 COX와 종양의 성장 사이에 직접적인 관련이 있음을 보여주며, COX-2 선택적 억제제의 효과가 더 큰 것으로 미루어 보아 COX-2가 종양의 성장을 촉진시킨다는 것을 보여준다. 약제를 투여한 기간에 따른 세포의 성장곡선을 비교한 결과에서도 Celecoxib를 투여한 군에서 성장의 억제가 더 컸으며 이는 MTT assay를 통해 나타난 결과를 뒷받침하고 있다. Celecoxib를 다른 농도로 투여했을 경우에 고농도에서 세포주의 성장이 더 억제되어 COX-2를 더 억제시킬수록 세포의 성장을 더 억제할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

COX-2가 어떤 경로를 통하여 종양세포의 성장에 영향을 미치는지를 고찰할 때, COX-2가 아라키돈산을 프로스타글란딘으로 변환시키는 과정에서의 중심 효소이기 때문에 COX 억제제가 이 효소에 작용해서 COX-2의 활성을 감소시키거나 발현을 방해함으로써 PGE₂의 합성이 감소되며 감소된 프로스타글란딘이 세포의 성장에 영향을 미친다고 생각되기 쉽다. 유선, 폐, 직결장, 두경부 등 여러 부위의 암종에서 COX-2의 발현과 프로스타글란딘의 합성이 증가되며, 동물과 인체 실험에서 프로스타글란딘의 합성을 방해함으로써 이런 암종을 억제시킬 수 있다는 보고 등 암병소에서 COX-2의 과발현과 프로스타글란딘 양의 증가 사이의

관계가 이미 알려져 있다²⁴⁾.

프로스타글란딘은 세포사멸을 억제시키고 혈관신생 및 종양의 침습성 증가, 염증 조절, 면역 억제 등 다양한 기전을 통해 발암과정에 작용하는 것으로 보고되고 있다²⁵⁻²⁸⁾. 프로스타글란딘, 특히 PGE2는 혈관신생과정에서의 작용을 통해 종양의 발생에 관여하며^{29,30)}, 또한 PGE2의 합성이 많은 조직에서 T-lymphocyte의 증식이 억제되고, 사이토카인 합성 억제 및 세포독성이 감소되는 등 면역 억제가 일어났다³¹⁾. 최근에는 COX-2 억제제를 투여했을 때 면역세포들의 기능이 회복되었다는 보고가 있었다³²⁾.

PGE2는 구강편평세포암종 세포에서 합성되는 주요 프로스타글란딘이므로³³⁾, PGE2의 합성량을 측정함으로써 COX의 활성도를 알 수 있을 것으로 사료되어 HN4 세포주에 약제를 투여했을 때의 PGE2의 합성량을 측정하였다. 본 연구에서 Celecoxib와 Mefenamic acid 둘 다 PGE2의 합성을 방해하지만 Celecoxib의 효과가 컸을 뿐 아니라 낮은 농도에서도 합성 방해 효과가 크게 나타났다. 두 약제의 HN4 세포주 성장 억제 효과와 PGE2의 합성을 억제시키는 효과 사이의 결과를 통해 PGE2가 종양세포 성장에 크게 관여한다는 것이 입증되었으며, COX-2 선택적 억제제가 PGE2의 합성을 방해하는 경로를 통해 종양의 성장을 억제시키는 것을 추론할 수 있었다. PGE2가 구강편평세포암종에서 유리되는 주 프로스타글란딘이기 때문에 본 연구에서는 PGE2의 합성양에 초점을 맞추었지만 PGD2, PGF2, PGI2, thromboxane A2 등 다른 프로스타글란딘의 역할에 대해서도 배제할 수 없으며 다른 프로스타글란딘에 대한 추가적인 연구 및 분석이 필요할 것이다.

PGE2의 합성량과 세포의 증식 간의 관계를 연결지을 수 있는 분자적 기전은 아직 명확하지 않다. PGE2가 세포 표면에 있는 프로스타글란딘 수용체, 특히 EP2와 결합함으로써 종양세포의 증식을 조절한다고 알려져 있다³⁴⁾. 프로스타글란딘 수용체가 감작되면 종양세포 내에 cyclic AMP 수준이 증가되어 세포내 신호 전달 체계를 왜곡함으로써 세포의 증식이 조절되지 못하게 된다³⁵⁾. COX 억제제로 인해 PGE2의 합성이 감소되면 프로스타글란딘 수용체도 그만큼 활성화되지 못하게 되어 G0/G1 세포주기를 조절하는 데 필수적인 인자인 cyclin D1과 cyclin E 단백질의 발현이 감소됨으로써 세포의 증식을 감소시키는 것도 가능한 한 가지 기전이라 할 수 있겠다³⁶⁾.

세포증식과 세포사멸 사이의 균형이 깨질 때 종양의 성장이 크게 증가하게 된다³⁷⁾. 직장결장암에서 NSAID를 투여했을 때 종양이 억제되는 과정에서 NSAID에 의해 유도되는 세포사멸을 관찰할 수 있었다^{38,39)}. 이 과정에서 COX-2는 세포사멸을 막는 물질인 프로스타글란딘의 합성을 촉진 시킴으로써 세포사멸을 억제시키며^{40,41)}, 세포사멸의 감소로

인해 유전적 변화가 축적되어 암발생의 위험성을 증가시킬 수 있다. Celecoxib가 PGE2의 합성과 관계없이 종양세포주의 성장을 억제시키는 기전으로 프로스타글란딘의 전구체인 아라키돈산의 축적을 통해 세포의 사멸을 유도하는 것으로 생각될 수도 있다. 아라키돈산은 세포사멸의 신호체계에 관여하는 중간물질인 ceramide로 변환될 수 있고 이 물질은 암세포에서 NSAID에 의해 유도되는 세포사멸을 야기한다고 알려져 있다⁴²⁾. Celecoxib를 투여했을 때 쥐 유선종양세포주에서 ceramide에 의해 세포사멸이 발생하는 현상이 관찰된 바 있다⁴³⁾. Ceramide에 의한 세포사멸의 유도 현상은 잘 확립되어 있지만 발암과정을 방해하는 데 있어서 이 기전이 어느 정도의 역할을 하는지는 불분명하다⁴⁴⁾. 프로스타글란딘과 세포사멸의 두 기전이 합동으로 작용하겠지만 어느 과정에 더 중요한지는 추가적인 연구를 통해 밝혀져야 할 것이다.

본 연구에서 종양세포의 성장이 억제되는 원인을 찾기 위해 HN4 세포주에 Celecoxib 50 μ M을 투여한 후 배양액에 부유하는 세포들을 투과전자현미경으로 관찰한 결과, 약제를 투여하지 않은 대조군에서는 cytoskeleton이 고르게 분포되어 있는 세포질과 비교적 큰 핵, 그리고 핵인이 두드러져 보이는 소견으로 보아 단백질 합성이 활발하게 진행되고 있는 상태임을 알 수 있었다. 그에 비해 Celecoxib를 투여한 배양액에서 부유하는 세포들 중 대조군과 비교했을 때 훨씬 더 많은 세포들에서 cytoskeleton이 뒤엉켜 있고, 핵이 분절된 소견 등 세포사멸이 진행 중인 세포에서 특징적으로 관찰되는 소견들이 관찰되고 있어, COX-2 선택적 억제제가 세포사멸의 증가를 통해 종양세포주의 성장을 억제시키는 또 다른 경로를 확인할 수 있었다.

COX-2 억제제와 세포주기와의 연관성은 보고되고 있는 데이터가 아직 혼란스러운 양상을 보이고 있는데 COX-2 과발현이 G1 arrest를 유도하며⁴⁵⁾, 역으로 COX-2 억제제가 G1 arrest를 유도하든가⁴⁶⁾ 혹은 세포에 따라서 G2/M arrest를 야기한다⁴⁷⁾는 보고도 있다. 아울러 같은 세포에서도 세포주기에 따라서 COX-2 mRNA의 발현량이 차이가 있다고 보고되기도 하였다^{48,49)}. 종합하여 볼 때 COX-2 억제제는 세포에 따라 다르기는 하지만 세포주기 조절기전과 관련이 있는 것으로 생각되고 있다.

본 실험에서는 total RNA extraction과 RT-PCR을 이용해서 COX-2 mRNA의 발현을 관찰한 결과 Mefenamic acid로 처리했을 때 COX-1과 COX-2 mRNA 둘 다 일정 정도 감소하였으나 Celecoxib를 투여한 경우 COX-1 mRNA의 발현양은 변화가 없는 반면에 COX-2는 대폭적인 감소를 보여 Celecoxib가 COX-2의 활성보다는 발현에 더 큰 영향을 미친다는 것을 나타내 주는 결과이며, 또한 이는 Celecoxib의 COX-2 특이성을 보여주는 결과로서 구강

암에서 과발현되는 COX-2에 의해 매개되는 종양세포의 성장을 차단하기 위해 이 약제를 사용할 수 있는 근거가 된다고 할 것이다.

Celecoxib의 구강편평세포암종 억제 효과를 규명하기 위해 더 많은 세포주를 이용하여 일차적인 타겟의 규명과 세포 손상의 정확한 분자적 기전에 대한 분석이 필요하다. COX-2 선택적 억제제가 비선택적 NSAIDs와 다른 화학요법 제제보다 훨씬 안전하고 독성이 없기 때문에, 화학적 암 예방을 위한 타겟으로서 COX-2의 가능성이 높다고 할 것이다. 대부분의 임상전 연구에서 COX-2 선택적 억제제가 발생된 종양을 없애기 보다는 종양의 성장 속도를 감소시킨다고 보고하고 있다²¹⁾. 그러나 구강암 치료과정에 기존의 수술 및 방사선과 화학요법에 아울러 COX-2 선택적 억제제가 주 치료방법의 일부로서는 상당한 이득이 있을 것으로 보인다. 구강암의 치료에 있어서 치료 효과를 증진시키기 위해 가능한 많은 암발생 경로를 동시에 겨냥하는 치료 전략이 절실하다. Moore 등⁵⁰⁾은 직장결장암 모델에서 5-fluorouracil이나 cyclophosphamide와 함께 Celecoxib를 투여했을 때 화학요법의 효과를 크게 증강시켰다고 보고했다. 방사선 치료와 병행했을 때도 종양에 대한 방사능의 효과가 증진되었다는 보고도 있다⁵¹⁾. 또한 최근에는 Celecoxib가 쥐에서 화학적으로 유도한 유선 종양의 발생을 예방한다는 보고도 있었다⁵²⁾. 이러한 연구들을 종합해 볼 때 COX-2 선택적 억제제가 구강암의 화학적 암 예방과 치료에 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 생각된다. 하지만 PGE2가 종양세포의 성장에 관여하는 분자적 기전이 규명되고, COX-2가 어떤 경로를 통해 세포의 사멸에 관여하는 지에 대한 이해가 선행되어야 구강암의 예방과 치료에 COX-2 선택적 억제제를 안전하고 효과적으로 사용할 수 있게 될 것이며 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

V. 결 론

COX가 구강편평세포암종의 성장에 미치는 영향과 그 기전을 확인하기 위해, HN4 세포주에 비선택적 COX 억제제인 Mefenamic acid와 COX-2 선택적 억제제인 Celecoxib를 각각 투여한 후 종양세포주의 MTT assay와 성장곡선, PGE2의 합성 측정, total RNA extraction과 RT-PCR 분석 및 투과전자현미경으로 관찰한 후 다음의 결과를 얻었다.

1. 약제 투여 후 종양세포주의 MTT assay 결과 각 농도에서 Celecoxib 투여군이 Mefenamic acid 투여군보다 세포성장을 더 억제시켰다.
2. 종양세포주의 성장곡선을 관찰한 결과 시간이 지날수록 대조군에서는 기하급수적인 세포성장이 나타나는데 비해, 약제 투여군에서는 완만한 세포의 성장 억제

가 나타났고, Celecoxib를 투여한 군에서 성장의 억제가 더 크게 나타났다.

3. 약제 투여 후 종양세포의 PGE2 합성에서는 Celecoxib가 Mefenamic acid에 비해 각 농도에서 PGE2의 합성을 더 저해하며, 각 약제의 농도에 따른 PGE2의 합성과의 관계는 Mefenamic acid는 농도의 차이에 따라 PGE2 합성의 저해가 더 큰 폭으로 나타나는데 비해, Celecoxib는 낮은 농도에서도 합성 방해 효과가 크게 나타났다.
4. 약제 투여 후 종양세포주의 COX mRNA 발현은 50 μ M Mefenamic acid에서 COX-1은 50%, COX-2는 60% 감소되었고, 50 μ M Celecoxib에서는 COX-1은 변화가 거의 없었고 COX-2 90%까지 감소하였다.
5. 투과전자현미경 상에서는 Celecoxib 투여군에서 핵의 분절, 세포골격이 얽혀있는 소견 등 세포사멸의 특징들이 관찰되었다.

이상의 결과로 COX-2의 발현을 억제시키면 구강편평세포암종의 성장을 억제할 수 있으며, 이는 PGE2의 합성을 방해하는 경로와 세포사멸을 활성화시키는 경로를 통해 이루어진다고 생각되지만, PGE2가 종양세포의 성장을 촉진시키는 분자적 기전이나 COX-2가 직접적인 작용을 통해 세포사멸을 감소시키는지 아니면 PGE2를 매개로 세포사멸을 감소시키는지 등에 대한 추가적인 연구가 필요하다. 하지만 COX-2 선택적 억제제는 COX-2에만 특이적으로 작용함으로써 부작용이 감소되었고 종양의 성장을 억제시킬 수 있기 때문에 향후 구강편평세포암종의 화학적 암 예방을 위한 제제로서 충분한 가능성이 있다고 생각된다.

REFERENCES

1. Parkin DM : Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2 : 533, 2001.
2. Mork J : Forty years of monitoring head and neck cancer in Norway? no good news. *Anticancer Res* 18 : 3705, 1998.
3. Forastiere A, Koch W, Trotti A *et al* : Head and neck cancer. *N Engl J Med* 345 : 1890, 2001.
4. Lippman SM, Hong WK : Second malignant tumors in head and neck squamous cell carcinoma: the overshadowing threat for patients with early-stage disease. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 17 : 691, 1989.
5. Thun MJ, Henley SJ, Patrono C : Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J Natl Cancer Inst* (Bethesda) 94 : 252, 2002.
6. DuBois RN, Abramson SB, Crofford L *et al* : Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 12 : 1063, 1998.
7. Reed DW, Bradshaw WS, Xie W *et al* : *In vivo* and *in vitro* expression of a non-mammalian cyclooxygenase-1. *Prostaglandins* 52 : 269, 1996.
8. Williams CW, DuBois RN : Prostaglandin endoperoxide syn-

- thase: why two isoforms? *Am J Physiol* 270 : G393, 1996.
9. Nathans D, Lau LF, Christy B *et al* : Genomic response to growth factors. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 53 : 893, 1998.
 10. Herschman HR : Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Ann Rev Biochem* 60 : 281, 1991.
 11. Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT *et al* : Selective inhibition of inducible cyclooxygenase-2 *in vivo* is anti-inflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 3228, 1994.
 12. Simon LS : Actions and toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Curr Opin Rheum* 8 : 169, 1996.
 13. Waddell WR, Loughry RW : Sulindac for polyposis of the colon. *J Surg Oncol* 24 : 83, 1983.
 14. Waddell WR, Ganser GF, Cerise EJ *et al* : Sulindac for polyposis of the colon. *Am J Surg* 157 : 175, 1989.
 15. Smalley WE, DuBois RN : Colorectal cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Adv Pharmacol* 39 : 1, 1997.
 16. Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL *et al* : Suppression of intestinal polyposis in *Apc716* knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 87 : 803, 1996.
 17. Kawamori T, Rao CV, Seibert K *et al* : Chemopreventive activity of Celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Res* 58 : 409, 1998.
 18. Chan G, Boyle JO, Yang EK *et al* : Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 59 : 991, 1999.
 19. Brown JR, DuBois RN : COX-2: A molecular target for colorectal cancer prevention. *J Clin Oncol* 23 : 2840, 2005.
 20. Hanif R, Pittas A, Feng Y *et al* : Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway. *Biochem Pharmacol* 52 : 237, 1996.
 21. Dannenberg AJ, Altorki NK, Boyle JO *et al* : Cyclo-oxygenase 2: A pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncol* 2 : 544, 2001.
 22. Bright-Thomas RM, Hargest R : APC, beta-Catenin and hTCF-4: An unholy trinity in the genesis of colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 29 : 107, 2003.
 23. Dannenberg AJ, DuBois RN(eds) : COX-2: A New Target for Cancer Prevention and Treatment. New York, NY, Karger, 2003, p.52.
 24. Scioscia KA, Snyderman CH, Rueger R *et al* : Role of arachidonic acid metabolites in tumor growth inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Otol* 18 : 1, 1997.
 25. Tsujii M, DuBois RN : Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 83 : 705, 1995.
 26. Hong SH, Ondt FG, Avis IM *et al* : Cyclooxygenase regulates human oropharyngeal carcinomas via the proinflammatory cytokine IL-6: a general role for inflammation? *FASEB J* 14 : 1449, 2000.
 27. Kelly DJ, Mestre JR, Subramaniak K *et al* : Benzo[a]pyrene up-regulates cyclooxygenase-2 gene expression in oral epithelial cells. *Carcinogenesis* 18 : 795, 1997.
 28. Eling TE, Thompson DC, Foureman GL *et al* : Prostaglandin H synthase and xenobiotic oxidation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30 : 1, 1990.
 29. Ziche M, Jones J, Gullino PM : Role of prostaglandin E1 and copper in angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 69 : 475, 1982.
 30. Form DM, Auerbach R : PGE2 and angiogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 172 : 214, 1983.
 31. Goodwin JS, Ceuppens J : Regulation of the immune response by prostaglandins. *J Clin Immunol* 3 : 295, 1983.
 32. Lang S, Lauffer L, Clausen C *et al* : Impaired monocyte function in cancer patients: Restoration with a cyclooxygenase-2 inhibitor. *FASEB J* 17 : 286, 2003.
 33. El Attar TM, Lin HS : Prostaglandin synthesis by squamous carcinoma cells of head and neck, and its inhibition by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Oral Pathol* 16 : 483, 1987.
 34. Jabbour H, Milne S, Williams A *et al* : Expression of COX-2 and PGE synthase and synthesis of PGE2 in endometrial adenocarcinoma: a possible autocrine/paracrine regulation of neoplastic cell function via EP2/EP4 receptors. *Br J Cancer* 85 : 1023, 2001.
 35. Sonoshita M, Takaku K, Sasaki N *et al* : Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP2 in APC (716) knockout mice. *Nat Med* 7 : 1048, 2001.
 36. Yip-Schneider MT, Sweeney CJ, Jung SH *et al* : Cell cycle effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and enhanced growth inhibition in combination with gemcitabine in pancreatic carcinoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* 298 : 976, 2001.
 37. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J : Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1 : 149, 1995.
 38. Boolbol SK, Dannenberg AJ, Chadburn A *et al* : Cyclooxygenase-2 overexpression and tumor formation are blocked by sulindac in a murine model of familial adenomatous polyposis. *Cancer Res* 56 : 2556, 1996.
 39. Barnes CJ, Lee M : Chemoprevention of spontaneous intestinal adenomas in the adenomatous polyposis coli Min mouse model with aspirin. *Gastroenterology* 114 : 873, 1998.
 40. Sheng H, Shao J, Morrow JD *et al* : Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 58 : 362, 1998.
 41. Cutler NS, Graves-Deal R, LaFleur BJ *et al* : Stromal production of prostacyclin confers an antiapoptotic effect to colonic epithelial cells. *Cancer Res* 63 : 1748, 2003.
 42. Chan TA, Morin PJ, Vogelstein B *et al* : Mechanisms underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 681, 1998.
 43. Kundu N, Smyth MJ, Samsel L *et al* : Cyclooxygenase inhibitors block cell growth, increase ceramide and inhibit cell cycle. *Breast Cancer Res Treat* 76 : 57, 2002.
 44. Reed JC : Fenretinide: the death of a tumor cell. *J Natl Cancer Inst* 91 : 1099, 1999.
 45. DuBois RN, Shao J, Tsujii M *et al* : G1 delay in cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2. *Cancer Res* 56 : 733, 1996.
 46. Toyoshima T, Kamijo R, Takizawa K *et al* : Inhibitor of cyclooxygenase-2 induces cell-cycle arrest in the epithelial cancer cell line via up-regulation of cyclin dependent kinase inhibitor p21. *Br J Cancer* 86 : 1150, 2002.
 47. Furuta Y, Hall ER, Sanduja S *et al* : Prostaglandin production by murine tumors as a predictor for therapeutic response to indomethacin. *Cancer Res* 48 : 3002, 1988.
 48. Gilroy D, Saunders M, Wu K : COX-2 expression and cell cycle progression in human fibroblasts. *Am J Physiol Cell*

- Physiol 281 : C188, 2001.
49. Gilroy D, Saunders M, Sansores-Garcia L *et al* : Cell cycle-dependent expression of cyclooxygenase-2 in human fibroblasts. FASEB J 15 : 288, 2001.
50. Moore RJ, Zweifel BS, Heuvelman DM *et al* : Enhanced antitumor activity co-administration of celecoxib and the chemotherapeutic agents cyclophosphamide and 5-fu. Proceedings of the American Association for Cancer Research: 1-5 April Cadmus Journal Services, Linticum, MD USA Abstract 2600, 2000, p.409.
51. Kishi K, Petersen S, Petersen C *et al* : Preferential enhancement of tumor radioresponse by a cyclooxygenase-2 inhibitor. Cancer Res 60 : 1326, 2000.
52. Harris RE, Alshafie GA, Abou-Issa H *et al* : Chemoprevention of breast cancer in rats by celecoxib, a cyclooxygenase 2 inhibitor. Cancer Res 60 : 2101, 2000.

저자 연락처

우편번호 330-716
충남 천안시 안서동 29
단국대학교 치과대학 부속병원 구강외과
이재훈

원고 접수일 2007년 12월 29일
게재 확정일 2008년 7월 8일

Reprint Requests

Jae-Hoon Lee
Dept. of OMFS, College of Dentistry, Dankook University,
29 Anseodong, Choeran, Chungnam, 330-716, Korea
Tel: 82-41-550-1991
E-mail: lee201@dku.edu

Paper received 29 December 2007
Paper accepted 8 July 2008