

## 구강암 세포주에서 COX-2억제제에 의한 세포성장 억제 효과 및 세포사멸 기전 연구

연세대학교 치과대학 구강병리학교실, 구강종양연구소

곽영은 · 전남경 · 김 진 · 이은주

### The Mechanism of Cell Growth Inhibition and Apoptosis by Cyclooxygenase-2 Inhibitor in Oral Squamous Carcinoma Cells

Young Eun Kwak, Nam Kyeong Jeon, Jin Kim and Eun Ju Lee

Department of Oralpathology, Oral Cancer Research Institute, Yonsei University College of Dentistry, Seoul 150-752, Korea

Recently, prostaglandins have been reported to influence cell proliferation resulting in cancer development and progression. Prostaglandins are synthesized by cyclooxygenase (COX) pathway, COX-1 is constitutively present in most cells and tissues where produce prostaglandins, while COX-2 expression is a critical part of inflammation and plays a major role in defending against exogenous stimuli. Moreover, COX-2 has been known to be related to cancer progression. Accordingly, cancer prevention trials have been applied by use of COX-2 inhibitors. Several putative targets have been proposed to account for NSAID-induced growth inhibition and apoptosis. This study was aimed at investigating the growth inhibitory effect and apoptosis mechanism by selective COX-2 inhibitor, celecoxib, in human oral squamous carcinoma cancer (OCC) cell lines. As a results, Celecoxib inhibited the growth of the cell lines in a dose dependent manner. Cell cycle kinetic analysis demonstrated that Celecoxib induces a delay in cell cycle progression and a G1 arrest. This induction of a G1 arrest was associated with the up-regulation of cyclin dependent kinase inhibitors (CDKI) p27<sup>KIP1</sup> and P21<sup>CIP/WAF1</sup>. In addition, 70 uM Celecoxib induced apoptosis through caspase-3 pathway. In conclusion, this study indicates that COX-2 specific inhibitor celecoxib induces apoptosis and cell cycle arrest in two oral squamous carcinoma cell lines. (*Cancer Prev Res* 11, 89-98, 2006)

**Key Words:** Oral squamous carcinoma cell lines, Celecoxib, Cell cycle, Apoptosis, Cyclooxygenase

#### 서 론

인체에 발생하는 암 중에서 구강암은 전체 암종의 3~5% 정도를 차지하며 대부분 인도 스리랑카, 타이완과 같은 씹는 담배를 많이 사용하는 특수한 지역에서 높은 빈도로 발생하고 있다. 이 중 구강점막에서 발생하는 종

양을 포함하여 두경부에서 발생하는 악성종양의 대부분은 편평세포 암종이다.<sup>1)</sup> 구강암 현재 생존율은 약 50%이며 연간 남자 사망률이 2%, 여자 사망률이 1%를 차지한다. 구강암 발생과정은 다단계 발암과정과 field cancerization으로 설명되고 있다. 구강암의 경우 전암병소 관찰이 용이하며 다단계 발암과정이 잘 설명되는 부위이다. 즉 구강에 발생하는 암종은 정상조직으로부터 암

책임저자 : 이은주, ☎ 150-752, 서울시 서대문구 신촌동 134번지  
연세대학교 치과대학 구강종양연구소  
Tel: 02-2228-3034, Fax: 02-392-2959  
E-mail: e16lee@yumc.yonsei.ac.kr

접수일 : 2006년 5월 12일, 게재승인일 : 2006년 6월 5일

Correspondence to : Eun Ju Lee  
Oral Cancer Research Institute, Yonsei University College of Dentistry,  
134 Sinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 150-752, Korea  
Tel: +82-2-2228-3034, Fax: +82-2-392-2959  
E-mail: e16lee@yumc.yonsei.ac.kr

중으로 이행되기까지 여러 단계의 변화를 통해 진행이 된다. 암으로 진행되기 이전 전단계 병소인 구강점막의 백반증으로 시작하는 경우가 많기 때문에 암의 조기 발견이 가능하며 백반증은 4.4~17.5%가 편평상피세포암으로 이행된다. 백반증이 조직학적으로 이행성이 동반될 경우 암 발생률이 훨씬 높아진다.<sup>2)</sup> 126명의 구강암 환자의 조직 소견을 관찰한 결과에서 환자들은 다발성 종양의 빈도가 11%로 매우 높았고, 암 주위의 점막 조직이 이미 암화 과정이 진행된 상태임(condemned mucosa)을 보고하였다.<sup>3,4)</sup> 따라서 암화 과정이 어느 정도 진행된 암 주위의 전암 병변에서 새로운 종양이 발생하였을 것이라는 이론을 발표하였다. 암화 과정이 어느 정도 진행된 암 주위의 전암 병변에서 새로운 종양이 발생할 확률이 높으므로 암으로 진행된 후의 치료보다는 암으로의 진행을 예방하기 위하여 독성이나 부작용이 없는 비교적 안전한 화학물질을 이용하여 암화를 억제지연 또는 역전시키고자 하는 화학적 암 예방 연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>5,6)</sup>

최근 분자생물학 및 암 유전자 연구 발달은 암 발생 및 전이 기전을 이해하는 데 있어 많은 도움을 주고 있다. 암을 유발하는 특정 유전자에 관한 분자적 수준에서 지식은 암을 예방하고 치료하는 데 있어 중요한 역할을 한다. 최근 염증반응에 중요한 기능을 수행하는 프로스타글란딘(prostaglandin, PG)이 세포분열이나 증식에 영향을 줌으로써, 유방암, 대장암, 위암 등 각종 인체암의 발생 및 진행에 중요한 역할을 한다는 실험적 증거들이 보고되어 있다.<sup>7,8)</sup> 프로스타글란딘은 대부분의 세포에서 생성되며, 조직 내에서 광범위한 생리작용을 하며 또한 조직손상이나 염증에 대해서도 특이적인 신체반응을 매개하는 역할을 하고 있다.<sup>9)</sup> 프로스타글란딘의 생합성에 관여하는 중요한 효소인 cyclooxygenase (COX)는 두 가지 동종효소형태인 COX-1과 COX-2로 존재한다. COX-1 (72 kDa)과 COX-2 (72-74 kDa)는 분자량이 비슷하며 핵산과 아미노산의 배열도 비슷한 것으로 알려져 있다.<sup>10,11)</sup> 이 중 COX-1은 생리작용인 위장세포보호, 신장의 정상기능 유지, 혈소판 응집기능 등 우리 몸에 정상적인 기능유지에 중요한 역할을 하는 house keeping gene이다. 그에 반해 COX-2는 정상조직에서는 미미하게 발현되지만, 염증 조직, 암의 조직에서 발현되며, 최근 연구 보고에 의하면 COX-2의 과도한 발현은 암 조직에 있어서 혈관 신생 및 전이능을 높이고 암 세포의 성장과 증식을 촉진한다고 보고되고 있다.<sup>10)</sup> 즉 COX-2의 부적절한 유도 증가는 악성 또는 형질 전환된 세포의 생존을 지연시키고 전이능과 관련된 표현형의 변화를 일으킨다.

1971년 Vane 등에 의해서 NASIDs (Nonsteroid Antiinflammatory drug, NASIDs)의 작용기전이 arachidonic acid로부터 프로스타글란딘 합성억제에 효과적이라는 사실이 밝혀졌다.<sup>9)</sup> 그러나 과거에 대부분 사용하던 비스테로이드계의 약물인 아스피린 등은 COX-1과 COX-2 두 가지 효소에 모두 작용하여 염증, 통증치료에 사용하였지만, 위궤양, 위장 장애 등의 부작용이 발생하였다. 그러나 최근에는 COX-2에만 특이적으로 반응하여, 억제시키는 약물을 사용하여 부작용을 최소화하려는 연구가 진행 중이다.

현재까지 연구에서 COX-2의 선택적 억제제가 다양한 암종의 발암과정을 억제, 지연시키지만, 구강암종의 경우 어떠한 기전에 의해서 COX-2가 억제되는지는 현재 명확하게 밝혀지지 않았다. 따라서 본 연구는 구강암종 세포에 COX-2 선택적 억제제에 의한 세포주기의 변화를 통한 세포성장 억제 효과를 알아보고 세포사멸 기전 연구를 통해 구강암의 예방과 치료에 효과적임을 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포 배양

본 연구실에서 확립한 세포주 중<sup>12)</sup> YD-38 세포와 YD-10B 세포, p21<sup>CIP1/WAF1</sup> (Delta Biolabs, Gilroy, CA, USA)과 p27<sup>KIP1</sup> (Santa Cruz Biotechnology, Delaware Avenue, CA, USA)의 양성 대조군인 MCF-7 세포는 10% fetal bovine serum (FBS:Gibco, BRL, NY, USA)이 첨가된 high-glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (lg-DMEM; glucose 1g/L, Gibco BRL, NY, USA) 배지를 넣고 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 배양기 내에서 배양하였다. 세포는 70~100 passage을 사용하였고, 70~80% 정도 자라면 1:3으로 분주하여 계대배양한 세포를 실험에 이용하였다

### 2. 세포성장률 측정

Celecoxib (Pfizer Inc, New York, NY, USA) 처리에 따른 세포 생존율을 측정하기 위하여 96 well plates에 200 $\mu$ l당 2 $\times$ 10<sup>3</sup>개의 YD-38 세포와 YD-10B 세포를 24시간 동안 배양한 후, 10% fetal bovine serum (FBS: Gibco, BRL, NY, USA)이 첨가된 배지에 celecoxib를 0~100 $\mu$ M 농도로 처리하여 37°C에서 72시간 반응시킨 후 3,4,5-dimethyl N-methylthiazol-2-yl-2, 5-diphenyl tetrazolium bromid (MTT; Sigma, St. Louis MO, USA) 검사로 YD-38 세포와 YD-10B 세포의 세포성장률을 측정하였다. MTT검사는 0-100 $\mu$ M 농도로 처리한 YD-38 세포와 YD-10B 세포를 PBS로 두

번 세척하고 MTT용액을 37°C에서 3시간 처리한 후, 배양액을 버리고 dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma St. Louis MO, USA)로 녹여내어 ELISA reader (Bio-Tek Instruments, Inc. Winooski, VT, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 3. 유세포 분석기를 통한 세포주기 측정

구강암종 세포를 6 well plates에 세포가 50~60% 정도 자라면 celecoxib를 24, 48, 72시간 처리한 후, 원심 분리기로 세포를 분리하여 100% ethyl alcohol로 고정하였다.

고정된 세포에 PBS (phosphate buffered saline)로 두 번 세척 후, RNase A (Amresco, Cleveland, OH, USA)와 PBS를 1 : 8 비율로 세포에 섞어준 후, 37°C에서 30분간 반응시켰다. 30분간 반응 후, PI (Propidium Iodide, Sigma St. Louis MO, USA) 염색으로 핵의 DNA를 염색하여 유세포 분석기(FACS: Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 통해 분석하였다. 기기로 나타난 검사의 분석은 Modification Fit LT 2.0 program (Verity Software House, Topsham, ME)을 사용하여 분석하였다. 2배체를 나타내는 히스토그램, 즉 최정점은 G0/G1기의 세포집단으로 표시하였으며, 그 두 배의 형광위치에서 G2/M 기의 세포집단의 정점을 나타냈다. 사선부분은 S 세포집단으로 표시하였다.

### 4. COX-1과 COX-2의 단백질 발현 분석

구강암종세포주인 YD-38, YD-10B 세포에 celecoxib를 IC<sub>50</sub>농도인 37μM로 24, 48, 72 시간 동안 처리하여 COX-1과 COX-2의 발현양의 변화를 western blot analysis로 관찰하였다. RIPA buffer (150 mM NaCl, 0.5% Triton-X 100, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 20 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, protease inhibitor cocktail tablet (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)를 이용하여 세포를 용해시킨 후, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 회수하고, BSA (Bovine serum albumin: Sigma, St. Louis, MO, USA)로 단백질을 정량분석하였다. 각각의 암종세포주에서 모든 단백질을 30μg을 5×SDS sample buffer (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 25% glycerol, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% Bromophenol blue)에 넣고 5분간 100°C에서 denaturation시켜 10% SDS-polyacrylamide gel에서 80V로 1시간, 120V로 2시간 동안 전기영동한 후, nitrocellulose membrane에 옮겼다. Membrane은 5% fat-free dry milk-PBST buffer (PBS, 0.2% Tween-20)에서 2시간 동안 blocking 하고, 1×BST buffer로 3번씩 10분간 세척하였다. 1차 antibody는 COX-1 (Santa Cruz Biotechnology, Delaware Avenue, CA, USA), COX-2 (Santa Cruz Biotechnology, Dela-

ware Avenue, CA, USA)을 사용하여, 3% fat-free dry milk-PBS buffer에 각각 1,000배 희석하여 상온에서 3시간 혹은 4°C에서 over night한 후, 1×PBST buffer로 3번씩 10분간 세척하였다. 2차 antibody는 1 : 2,000의 비율로 COX-1은 anti-mouse antibody (Cell signaling, Beverly, MA, USA), COX-2는 anti-rabbit antibody (Cell Signaling, Beverly, MA, USA)를 사용하여 상온에서 40분간 반응시키고 1×PBST buffer로 10분간 3번씩 세척하였다. Enhanced chemiluminescence (ECL:Amersham Pharmacia biotech, Piscataway, NJ, USA) detection kit (Amersham Pharmacia biotech, Piscataway, NJ, USA)를 반응한 후, 물기는 깨끗히 제거하고 카세트에 넣어 nitrocellulose membrane (Pall Corporation, Northern Boulevard East Hills, NY, USA) 위에 x-ray 필름을 놓고 노출시킨 후, 현상하여 결과를 관찰하였다.

### 5. TUNEL assay

YD-38 세포와 YD-10B 세포를 6 well plates에 4×10<sup>5</sup>/ml를 뿌린 후, 세포가 60~70% 정도 자라면, Celecoxib를 각각 37, 70, 100μM 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포는 원심분리기로 분리하여 1×10<sup>3</sup>/ml를 세포배양 슬라이드에 올린 후, 세포 고정액으로 세포를 고정하였다. 각 슬라이드는 Tris-HCl용액(PH 8.0)에서 10분 동안 전처리하고 20분간 proteinase K (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 처리하였다. PBS 용액으로 수세한 뒤 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 조직에 있는 peroxidase를 불활성시키고 PBS로 다시 수세하였다. 면역조직화학적 관찰을 위한 양성대조군에 대해 DNA를 쉽게 깨지게 하는 buffer로 10분간 전처리하고 DNAase I (F. Hoffman-La Roche Std, Basel, Switzerland)으로 20분간 반응시켜 인위적으로 DNA를 단편화시켰다. Transferase-mediated deoxyuridine triphosphate (TdT, SIGMA, St. Louis, MO, USA) buffer에서 15분간 전처리한 후, terminal deoxytransferase와 biotin-16-2'-doxy-uridine-5'-triphosphate (dUTP, F.Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland)로 37°C에서 3시간 동안 반응시켜 dUTP를 표지하였다. 음성대조군에서는 terminal deoxytransferase 효소를 처리하지 않았다. 효소의 반응을 중지시키는 buffer에서 10분간 담가서 반응을 중지시킨 후에 2% BSA (Sigma, St. Louis, MO, USA)로 15분간 blocking 하였고, PBS로 수세 후 streptavidin-peroxidase (Sigma, St. Louis, MO, USA)로 30분간 반응시켜 DAB (Diamino-benzidine, 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride: DAKO, Glustrup, Denmark)로 발색시켰다. 대조 염색은 nuclear fast red를 사용하였다. 이 단계가 종료되면, 70, 90 그리고 100% 에틸알코올로 탈수한 후, 봉입하여 광학현미경에서 관찰하였다.

6. 세포주기와 세포사멸 조절 단백질 분석

세포성장 조절 단백질의 발현을 조사하기 위해 YD-38, YD-10B 세포를 각각 6 well plate에  $2 \times 10^4$ 개의 세포를 뿌려 배양한 후, celecoxib를 IC<sub>50</sub>농도인 37 $\mu$ M 로 24, 48, 72시간 동안 처리하여 RIPA buffer로 단백질을 분리한 후, 30 $\mu$ g의 단백질을 전기 영동하였다. 세포성장조절 단백질인 p21<sup>CIP1/WAF1</sup> (Delta Biolabs, Gilroy, CA, USA) 과 p27<sup>KIP1</sup> (Santa Cruz Biotechnology, Delaware Avenue, CA, USA) 항체를 1 : 1000의 비율로 사용하였다. 세포사멸에 중요한 역할을 하는 caspase-3 (Cell Signaling, Beverly, MA, USA) 와 caspase-9 (Santa Cruz Biotechnology, Delaware Avenue, CA, USA) 발현을 보기위해 위와 동일하게 세포를 배양한 후, celecoxib를 70 $\mu$ M을 4, 8, 12, 16, 24시간 동안 처리하여 단백질을 분리한 후, 30 $\mu$ g의 단백질을 전기 영동하여 western blot으로 단백질 발현을 분석하였다.

7. 통계처리

모든 실험은 3번씩 시행되었으며, 대조군 내 차이에 대한 유의성은 two sided t-test 방법을 이용하여 통계처리하였다. 본 논문의 수치는 평균과 표준편차로 나타내었으며, p값은 0.05에서 유의성을 결정하였다.

결 과

1. Celecoxib가 구강암세포의 성장에 미치는 효과

Celecoxib의 구강암세포 성장억제를 확인하기 위해, YD-38 세포와 YD-10B 세포주를 우혈청(10%) 배지에서 celecoxib를 0~100 $\mu$ M 농도로 72시간 동안 처리하여 MTT assay로 관찰하였다. 통계적으로 유효한 성장억제 효과를 나타내는 Celecoxib 최소 투여량은 20 $\mu$ M이었으며, YD-38 세포와 YD-10B 세포의 세포생존율이 50% 감소되는 농도인 IC<sub>50</sub>은, YD-38 세포는 37 $\mu$ M에서 YD-10B 세포는 45 $\mu$ M에서 세포생존율이 50%로 감소되었다(Fig. 1).

2. YD-38, YD-10B 세포에서 COX-1, COX-2 발현 비교

구강암종 세포주인 YD-38 세포와 YD-10B 세포에 COX-2의 선택적 억제제인 celecoxib를 처리하여 COX-1 (72kDa)과 COX-2 (72-74kDa)의 발현양을 보았다. 본 연구실에서 실험을 통해 얻은 농도 즉, IC<sub>50</sub>농도인 37 $\mu$ M를 각각 YD-38과 YD-10B 세포에 처리한 후 0, 24, 48, 72 시간 동안의 발현양을 보았다. YD-38과 YD-10B 세포 모두 에서 COX-1은 celecoxib를 처리하여도 감소하지 않았

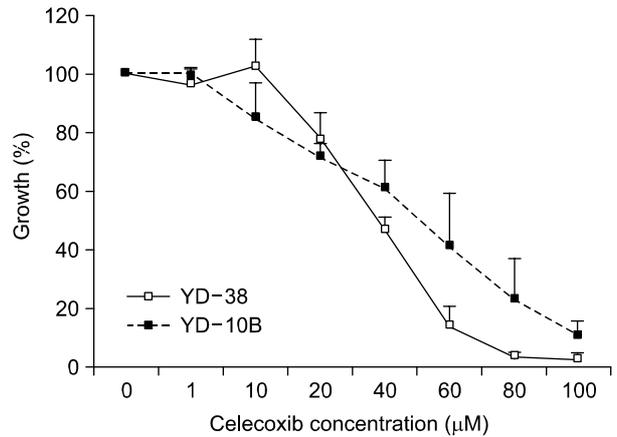


Fig. 1. Inhibition of cell growth with celecoxib. Cells were seeded onto 96-well plates at  $2.5 \times 10^3$  cells/well, and were treated with different concentrations of celecoxib, and the percentages of growth inhibition were determined by MTT assay after 72-hours of treatment.

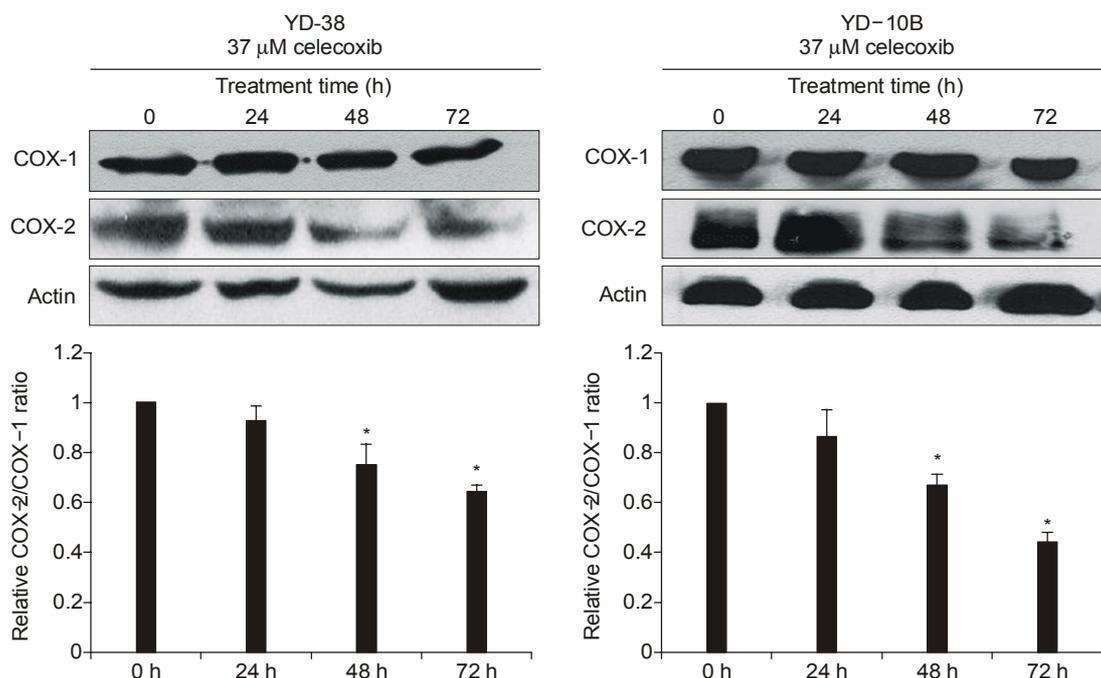
다. 그러나 COX-2는 48시간에서 감소를 보였다. COX-1과 COX-2의 발현양의 비율은 celecoxib의 처리 시간이 길수록 감소하였으며, celecoxib를 처리하지 않은 세포와 비교하였을 때, 48시간에서부터 유의한 차이를 보였다 (Fig. 2).

3. Celecoxib가 구강암세포의 세포주기분포에 미치는 영향

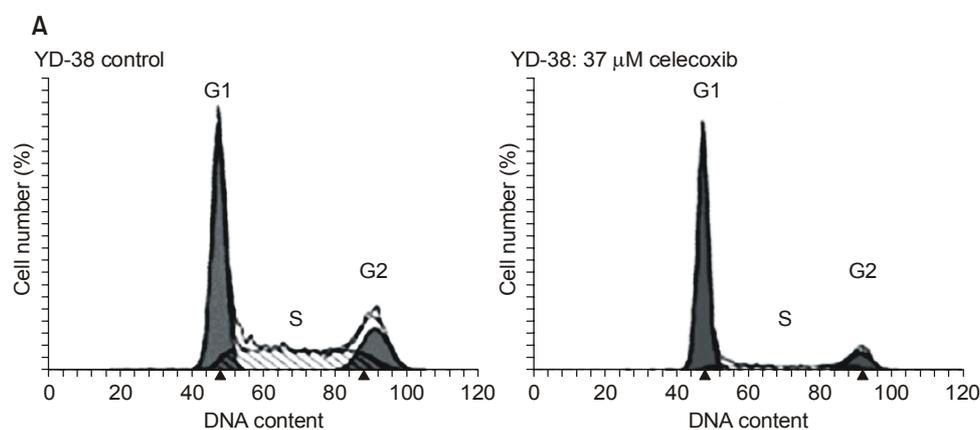
Celecoxib로 유도된 YD-10B 세포 증식의 억제가 세포 주기와 관련이 있는지를 확인하기 위해 YD-10B 와 YD-38 세포를 24, 48, 72시간 동안 celecoxib IC<sub>50</sub>를 처리하여 유세포분석기로 분석하였다. Celecoxib를 처리하지 않은 세포에서는 정상적인 세포주기가 유지되었으나, celecoxib를 처리한 세포에서는 S phase와 G2 phase가 감소하였고, G1 arrest가 유도되었다(Fig. 3). 이러한 변화가 24시간 celecoxib 처리한 곳으로부터 시작하여 72시간까지 유지되었다(Fig. 3).

4. Celecoxib가 세포주기에 변화에 관여하는 단백질에 미치는 영향

세포주기를 조절하는 CDKI중 G1 세포주기에 관여하는 cyclin을 비활성화시키는 p21<sup>CIP1/WAF1</sup>과 p27<sup>KIP1</sup> 단백질의 발현 정도를 western blot을 통해 관찰하였다. YD-38 세포에서 p21<sup>CIP1/WAF1</sup>은 발현되지 않았으나, celecoxib 37 $\mu$ M 처리 후 24시간부터 발현되었으며, p21<sup>CIP1/WAF1</sup>의 발현의 증가는 celecoxib 처리시간에 의존적으로 증가하여 72시간에서 5배 증가하였다. YD-10B 세포 역시 처리하



**Fig. 2.** COX-2 expression in YD-38 and YD-10B cell lines. Western blot analysis of COX-1 and COX-2 protein expression in human oral squamous carcinoma cells. Cells were incubated in the presence or absence of celecoxib (37μM). At different times, human oral squamous carcinoma cells were lysed, and western blot analyses were conducted. Data quantified by densitometry and calculates the COX-2/COX-1 ratio. The relative COX-2/COX-1 ratio represented the level of COX-2 normalized to the relative COX-1/-actin ratio. Each bar represents the mean±SE of triplicates, and the representative of three separate experiments. \*p<0.005, compared to celecoxib 0μM.



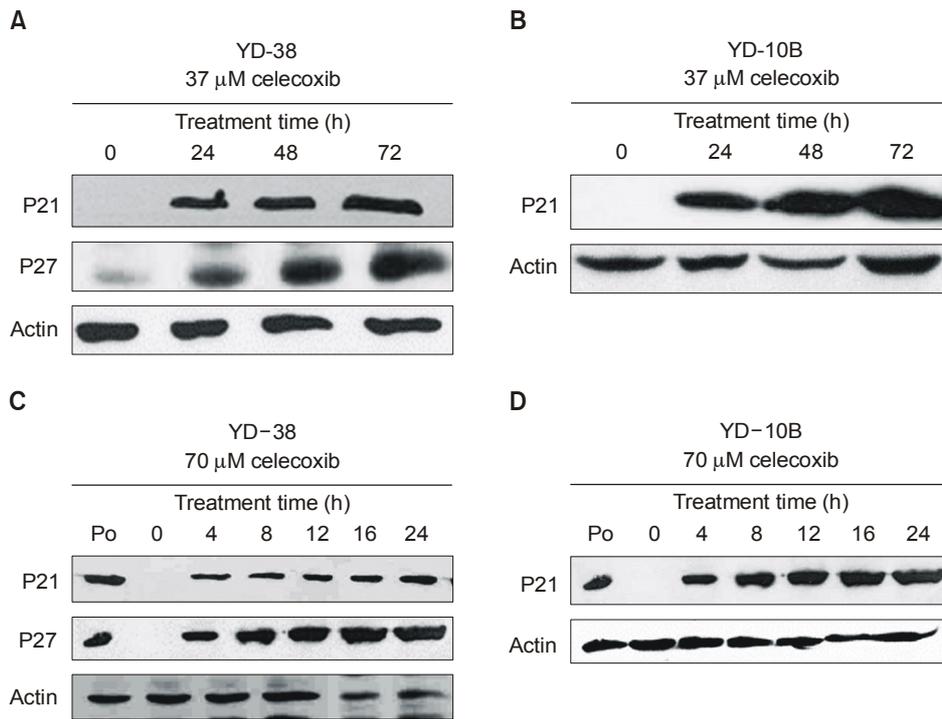
**B**

YD-38	Control	24 h	48 h	72 h
G1	52.1±10.6	70.3±6.0	79.7±5.8	77.9±7.1
S	34.4±3.1	20.3±2.7	16.6±4.4	13.9±3.5
G2	13.4±7.5	9.3±3.4	3.6±1.6	8.0±9.9

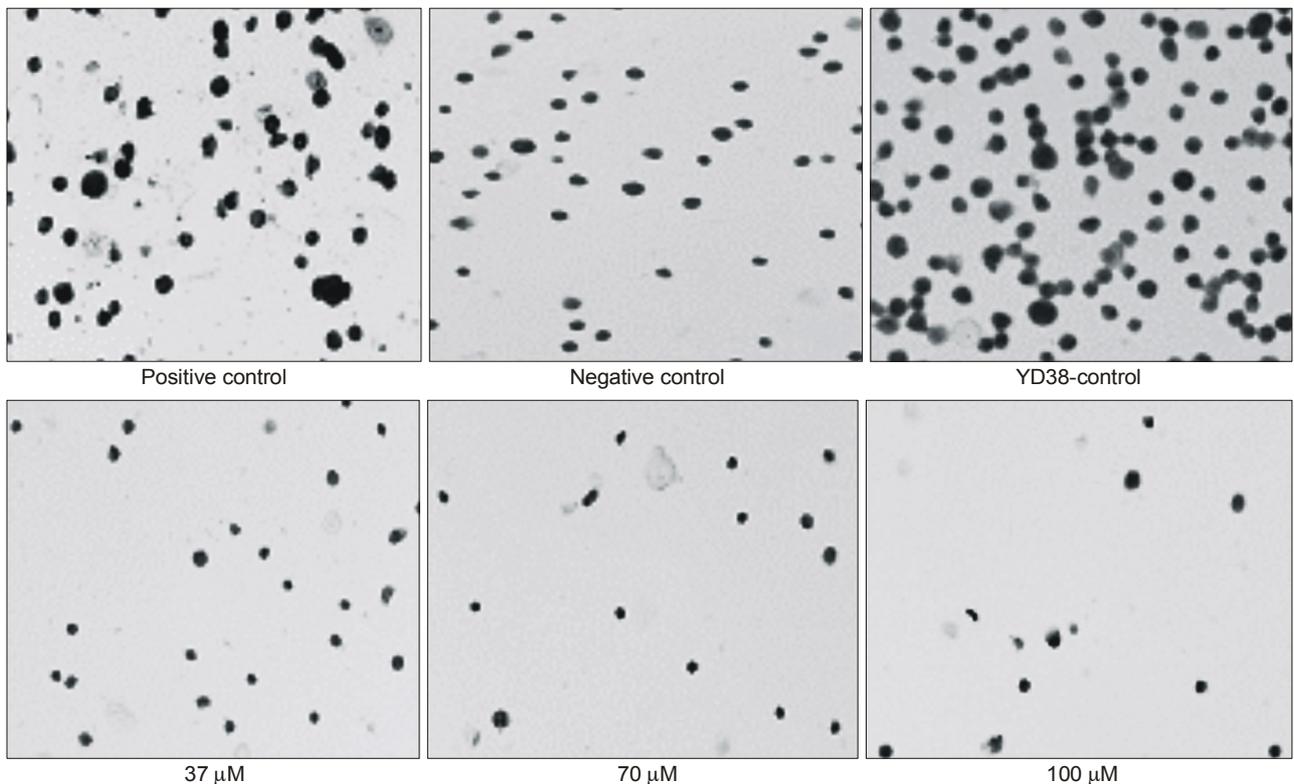
  

YD-10B	Control	24 h	48 h	72 h
G1	48.4±1.7	70.4±2.4	63.2±10.6	69.4±7.9
S	38.9±2.4	19.7±3.4	18.7±9.8	16.5±3.5
G2	13.1±4.1	9.6±1.0	17.5±10.9	14.2±4.4

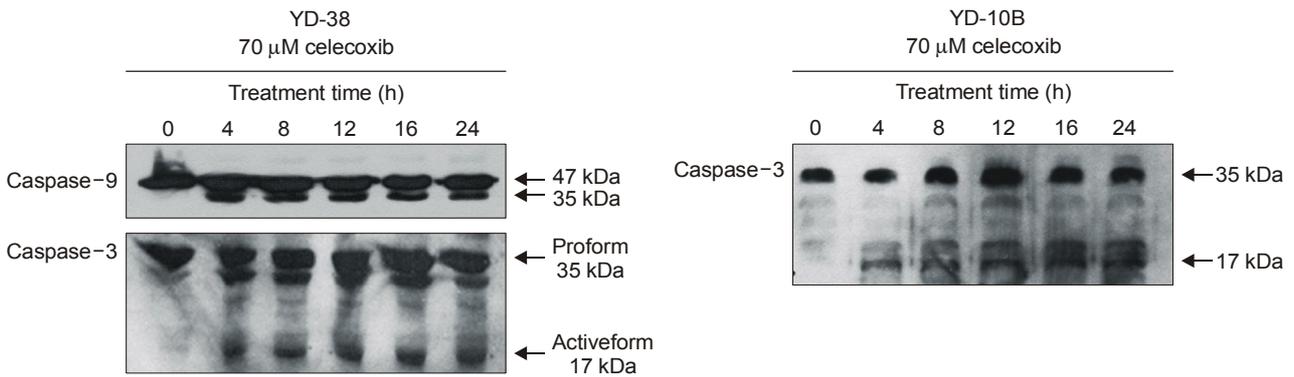
**Fig. 3.** Effect of celecoxib on cell cycle distribution in YD-38 and YD-10B cells. YD-38 and YD-10B cells were incubated in the presence or absence of celecoxib (37μM) for 72 h. (A) Human oral squamous carcinoma cells were incubated in the presence or absence of celecoxib (37μM) for 24 h. (B) Cell cycle analysis was performed as described in Material and Methods. Results from a representative analysis as shown. Cell cycle analysis of celecoxib-treated human oral squamous carcinoma cells Data are presented as mean (%)±SD (n = 3). Human oral squamous carcinoma cells were subjected to celecoxib treatment (37μM) for 24, 48, and 72h. Cells then were harvested, and the cell cycle profile was analyzed using flow cytometry.



**Fig. 4.** Western blot analysis of p21 and p27 protein expression in human oral squamous carcinoma cells. (A), (B) Effects of 37  $\mu$ M celecoxib on P21 and p27 in YD cells for 72h. (C), (D) Effects of 70 $\mu$ M celecoxib on P21 and p27 in YD cells for 24h. Actin was used as a loading control. Po; positive control, MCF7 cells.



**Fig. 5.** The TUNEL method was employed for the detection of DNA fragmentation and apoptotic bodies in cells. Using the TUNEL staining, positive apoptotic bodies were identified as dark-brown, round or oval in shape. Most apoptotic cells contained multiple brown apoptotic bodies. Negative controls were performed using distilled water for TdT Enzyme in the preparation of working TdT. Cells were treated with celecoxib for 24 h with 37, 70, or 100 $\mu$ M. Very few apoptotic cells can be identified at 24 h after treated 37 $\mu$ M celecoxib. Doses of 70~100 $\mu$ M were sufficient to induce significant apoptotic changes.



**Fig. 6.** Celecoxib induces activation of caspase for apoptotic cell death. YD cells were treated for 0, 4, 8, 12, 16, or 24 h with 70 M celecoxib, Caspase activation was then determined by Western blot analysis of cytosolic extracts with specific antibodies against the cleavage products of caspase-9 and -3.

지 않은 군에서 p21<sup>CIP1/WAF1</sup>은 발현되지 않았으나, Celecoxib 처리 후 24시간에서 약하게 발현하여 48시간까지 유지되었다(Fig. 4). IC<sub>50</sub> 농도보다 높은 70μM을 4시간부터 24시간까지 처리하였을 때, YD-38 세포에서 p21<sup>CIP1/WAF1</sup>은 4시간에서부터 발현하여 24시간까지 발현이 유지되었다(Fig. 4). Celecoxib 처리 후 p27<sup>KIP1</sup> 단백질의 발현 정도는 YD-38 세포에서는 양성 대조군으로 사용한 MCF-7만 발현되었고, Celecoxib를 처리한 군과 처리하지 않은 군에서 모두 발현되지 않았으나, YD-10B 세포에서는 Celecoxib를 처리하지 않은 군에서 약하게 발현되다가, 24시간부터 발현이 증가하여 48시간까지 발현이 5배 증가하였으며, 72시간까지 p27<sup>KIP1</sup>의 단백질 발현은 유지되었다(Fig. 4). YD-10B 세포에서 70μM celecoxib를 처리한 경우, p27<sup>KIP1</sup>의 발현은 4시간에서 발현되어 24시간까지 발현이 유지되었다(Fig. 4).

### 5. Celecoxib가 구강암세포의 세포사멸에 미치는 영향

YD-38과 YD-10B 세포에 IC<sub>50</sub>농도와 고농도인 celecoxib 처리 후에 세포사멸 일어나는지 알아보기 위하여 TUNEL assay를 실시하였다. 처리농도는 IC<sub>50</sub>농도인 37μM와 고농도인 70, 100μM을 각각 24시간 동안 처리하였다. 세포사멸이 일어난 세포의 핵이 갈색으로 염색된 세포에서 세포사멸이 일어난 것을 확인하였다. 그 결과 70μM에서 가장 많은 세포사멸이 관찰되었으며, 100μM에서는 celecoxib의 독성으로 인하여 세포괴사가 함께 일어났다(Fig. 5).

### 6. Celecoxib가 구강암세포의 세포사멸에 관여하는 단백질에 미치는 영향

Caspase는 세포사멸을 수행하는 중요 단백질 효소로

보고되고 있다. 따라서 YD-38과 YD-10 세포에서 일어난 세포사멸이 caspase의 활성화에 관련되었는지를 보기 위해 caspase-9과 caspase-3의 발현을 관찰하였다. YD-38 세포에서 caspase-9은 celecoxib를 처리하지 않은 군에서는 47kDa에서 proform의 형태만 발현되었고, active 형태는 발현되지 않았다. 그러나, celecoxib 70μM 처리 후 4시간 후부터 35kDa에서 active 형태가 나타났다. Caspase-3는 celecoxib를 처리 4시간 뒤에 active 형태가 나타났다(Fig. 6). YD-10B 세포에서 caspase-3는 celecoxib를 처리한 후, 4시간 뒤에 active 형태가 나타났다(Fig. 6). Caspase-9은 발현되지 않았다. Caspase-3가 YD-38과 YD-10B 세포에서 세포사멸의 활성화에 관여한다는 것을 명확히 확인하기 위하여 caspase-3 inhibitor 20μM (AC-DEVD-CHO)를 1시간 동안 전처리한 후, celecoxib를 다시 70μM 처리 후 caspase-3를 보았다. 세포사멸이 caspase에 의해 일어난 것인지를 알아보기 위한 것으로, inhibitor를 처리한 후에 35kDa에서만 발현되었으며, 17kDa에서 active 형태는 발현되지 않았다. 이 결과로 세포사멸이 caspase에 의한 것임을 확인하였다(Data not shown).

## 고 찰

본 연구에 사용한 구강 암종 세포는 구강병리학교실에서 확립한 9종의 세포 주<sup>12)</sup> 가운데서 p53 wild type인 YD-38 세포와 p53 frame shift mutation을 갖고 있는 YD-10B 세포를 선정하였다. COX-2의 선택적 억제제로는 NASID (nonsteroidal anti-inflammatory drugs)계의 약물인 celecoxib를 사용하였다. NASID계의 약물은 프로스타글란딘의 합성을 억제함으로써 항염작용을 하는 것으로 특히, 프로스타글란딘의 합성에 필요한 효소인 COX를

억제하는 것으로 알려져 있다.<sup>13)</sup> YD-38과 YD-10B 세포에서 모두 COX-2가 발현되었고, celecoxib를 각 농도별로 72시간까지 처리하였을 때, 고농도로 갈수록 세포의 성장률이 떨어졌다. 실험에 사용한 YD-38과 YD-10B 세포에 COX-2의 선택적 억제제인 celecoxib를 IC<sub>50</sub> 농도를 사용하여 COX-1과 COX-2의 발현양을 보았을 때, COX-1에서는 발현의 변화가 일어나지 않았지만, COX-2에서는 시간에 따른 발현양의 감소를 확인할 수 있었다.

세포의 증식 능력은 세포주기를 조절하는 활성인자의 활성화나 비활성화 인자의 비활성화에 의해서 조절된다. 세포주기에서 G1 phase에서 S phase로 G2 phase로 진행하기 위해서는 CDK (cyclin dependent kinase) 단백질의 활성이 필요하다. CDK 단독으로 활성화할 수 없으며, cyclin이라는 단백질과 결합되어야 kinase 활성을 하게 된다. Cyclin과 kinase에는 많은 종류가 있으며, S phase를 유도하는 단백질들은 주로 cyclin E, cdk4, cdk6이 있다.<sup>14)</sup> 세포주기 조절을 위해 cyclin-CDK complex의 활성을 조절하는 많은 인자들이 존재한다. 유사분열이 완료되거나 DNA 복제가 완료되면 더 이상의 kinase활성이 필요하지 않으므로 cyclin-CDK complex의 cyclin 이 분해되어 ubiquitin 단백질이 cyclin에 결합하여 cyclin 단백질을 분해한다. 세포주기를 조절하는 CDK inhibitor는 크게 CIP (CDK inhibitor protein) family와 INK4 (inhibitors of cyclin dependent kinase 4) 두 가지로 분류할 수 있다. 이 중 CIP family에는 p21<sup>CIP1/WAF1</sup>과 p27<sup>KIP1</sup>이 있다. INK4는 주로 CDK4, 6의 활성을 저해하는 p15, p16, p18, p19가 있다.

본 연구에서는 celecoxib가 구강암종세포주에서 세포주기에 미치는 영향을 보기 위하여 세포주기를 관찰하였다. 그 결과, celecoxib를 처리 후 24시간에서부터 S phase와 G2 phase의 감소를 관찰할 수 있었으며, 이것은 celecoxib에 의한 G0/G1 arrest가 일어났음을 확인할 수 있었다. 이 결과를 바탕으로 G1 phase에 관여하는 CDKI 중 p21<sup>CIP1/WAF1</sup>과 p27<sup>KIP1</sup>의 발현을 보았다. YD-38과 YD-10B 세포에서 p21<sup>CIP1/WAF1</sup>의 celecoxib 처리 24시간 후에서 발현되기 시작하여 시간이 지날수록 그 발현양의 증가를 확인할 수 있었다. 세포주기 조절을 위한 cyclin-CDK complex의 활성과 비활성을 위해 많은 조절인자가 필요하다. 그중 가장 대표적인 것이 G1 phase에서 DNA가 손상되었을 때 작용하는 p21<sup>CIP1/WAF1</sup>이다. 대부분 p21<sup>CIP1/WAF1</sup>은 DNA가 손상되었을 때 암 억제 유전자인 p53에 의해 p21이 발현된다고 알려져 있다.<sup>15)</sup> 하지만, p21<sup>CIP1/WAF1</sup>의 발현은 p53 비발현 세포에서도 p21<sup>CIP1/WAF1</sup>을 유도할 수 있다고도 보고되고 있다.<sup>16,17)</sup> 본 연구에 사용한 YD-10B세포는 p53 mutation으로 stop codon으로 p53발현이 안되는

세포지만, p21<sup>CIP1/WAF1</sup>이 발현된 것으로 p53과 비의존적으로 발현된 것으로 생각된다. p21<sup>CIP1/WAF1</sup>는 세포 주기 조절에 중추적인 역할을 하는 단백질로서, G1/S phase checkpoint에서 세포주기를 직접 정지시킨다. 또한, p21<sup>CIP1/WAF1</sup>은 G2 phase 정지 역할에도 관여하고 있다. 이것은 p21<sup>CIP1/WAF1</sup>이 세포주기의 여러 과정에서 세포주기 조절 역할을 하고 있으며, 암세포의 성장에 많은 영향을 미치고 있다는 것을 알 수 있다. p27<sup>KIP1</sup>은 p21<sup>CIP1/WAF1</sup>과 마찬가지로 cyclin E/cdk2 complex에 결합하여 그 활성화를 억제하여 세포성장을 억제하는 것으로, 본 연구에서 p27<sup>KIP1</sup>은 YD-10B 세포에서는 시간에 따른 발현의 증가를 보였으나, YD-38 세포에서는 발현되지 않았다. 이것은 YD-38과 YD-10B 세포가 모두 celecoxib 처리에 따른 G1 arrest를 겪고 있지만, 서로 다른 경로에 의한 것임을 증명해주고 있다.

NSAID계의 약물은 세포주기에서 G0/G1 arrest에 의한 세포성장 억제 이외에도 효과적인 암 예방과 치료를 위해 세포사멸을 유도한다고 보고되고 있다.<sup>15)</sup> 본 연구에서는 YD-38과 YD-10B 세포에 celecoxib를 처리하였을 때, 세포사멸과 관련이 있는지 알아보려고 하였다. Celecoxib를 IC<sub>50</sub> 농도로 처리하였을 때, 세포사멸은 관찰되지 않았으며, celecoxib를 IC<sub>50</sub>보다 고농도인 70 $\mu$ M과 100 $\mu$ M로 YD-38과 YD-10B 세포에 처리하였을 때 처리농도가 높을수록 TUNEL assay를 통해서 세포사멸을 확인할 수 있었다. 그러나 100 $\mu$ M 이상일 때는 세포사멸과 세포괴사가 함께 일어나는 것을 볼 수 있었다. 세포사멸은 농도에 의존적으로 작용하여, IC<sub>50</sub>보다 고농도를 처리해준 세포에서 세포사멸을 유도할 수 있음을 확인할 수 있었다. 또한, celecoxib처리에 의하여 세포사멸의 기전을 알아보기 위하여 세포사멸과 관련하여 caspase-9과 caspase-3의 발현을 관찰하였다.<sup>18~21)</sup> Caspase는 활성화된 mitochondria로부터 방출된 cytochrom C와 Smac/DIABLO에 의하여 활성화된 것으로 알려져 있다.<sup>17~20)</sup> Cytochrom C로부터 활성화된 caspase-9은 initiator caspase로서 활성화된 신호가 caspase-3을 활성화시키는 것으로 알려져 있다.<sup>20~23)</sup> Caspase-3은 mitochondria의 신호 이외에도 death receptor pathway에 의해서도 활성화된다. 본 실험에서는 mitochondria의 신호에서 오는 caspase-9과 caspase-3을 통한 세포사멸 기전을 연구하였다. Celecoxib처리농도는 세포사멸을 유도한 농도인 70 $\mu$ M를 처리하여 caspase-9과 caspase-3의 발현을 보았을 때, YD-38 세포에서 celecoxib 처리 4시간 후 caspase-9과 caspase-3 모두에서 proform과 active form이 발현되었다. 그러나, YD-10B 세포의 경우는 caspase-9은 발현되지 않았고, caspase-3은 4시간 후부터 proform과 active

form이 발현되었다. 세포사멸이 mitochondria에 의한 caspase-3의 활성화 때문인지를 확인하기 위하여 caspase-3 inhibitor를 처리하여 확인하였다. Inhibitor를 처리한 군에서는 celecoxib를 처리하여도 caspase-3가 활성화되지 않았기 때문에 active 형태를 볼 수 없었다. 이것으로 세포사멸의 하위 기전에 caspase cascade가 관련되어 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 YD-10B 세포에서는 caspase-9의 활성화가 일어나지 않았음에도 caspase-3의 발현을 관찰할 수 있었다. 즉, YD-38 세포와 YD-10B 세포에서는 서로 다른 기전을 통하여 caspase-3를 활성화시키는 것으로 생각되며, 어떤 다른 신호에 의해서 caspase-3가 활성화 되는지에 대해서는 추가적인 연구가 수행되어야 할 것이다. 또한, 70 $\mu$ M을 처리하였을 때, p21<sup>CIP1/WAF1</sup>과 p27<sup>KIP1</sup> 단백질 발현이 4시간에서부터 시작되어 24시간까지 유지되었다. 이것은 세포주기와 세포사멸이 서로 관련되어서 일어난다는 가능성을 제시하는 것으로써 p21<sup>CIP1/WAF1</sup>과 p27<sup>KIP1</sup> 발현이 caspase-3를 활성화시키는 기전과 관련이 있을 것으로 생각되며, 추가적으로 확인되어야 할 것이다.

## 결 론

본 연구에서는 구강암의 예방과 치료를 목적으로 COX-2의 선택적 억제제인 celecoxib를 *in vitro* 상에서 구강편평세포인 YD-38과 YD-10B 세포에 처리하여, celecoxib에 의한 세포주기 조절과 세포사멸을 알아보고자 하였다.

연구 결과 COX-2 억제제인 celecoxib를 IC<sub>50</sub> 농도로 처리하였을 때, COX-1의 발현은 변화가 없었으나, COX-2는 시간이 지남에 따라 발현이 감소되었고, 세포주기가 G0/G1 arrest로 세포성장 억제를 일으키며, 세포성장 억제는 CDKI인 p21<sup>CIP1/WAF1</sup>과 p27<sup>KIP1</sup>에 의해 조절되었다. celecoxib를 70 $\mu$ M 처리할 경우, 24시간 내에 세포사멸이 관찰되었으며, 이는 caspase-3와 caspase-9에 의해 조절됨을 알 수 있었다.

이상의 결과로 celecoxib에 의한 구강암종의 예방과 치료에 celecoxib의 사용 가능성을 확인하였다. 그러나 celecoxib의 작용기전에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부 암정복추진연구개발사업 지원(0320230)을 받아 수행된 연구임.

## 참 고 문 헌

- 1) Sudbo J, Bryne M, Mao L, Lotan R, Reith A, Kildal W, et al. Molecular based treatment of oral cancer. *Oral Oncol* 39, 749-758, 2003.
- 2) Sudbo J, Reith A. The evolution of predictive oncology and molecular-based therapy for oral cancer prevention. *Int J Cancer* 115, 339-345, 2005.
- 3) Cianfriglia F, Gregorio DI, Manieri A. Multiple primary tumors in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 35, 157-163, 1999.
- 4) Boudewijn JM, Maarten C, Rene L, Gordon B, Ruud H. Secondary primary tumor and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: molecular techniques provide new insights and definitions. *Head and Neck* 10, 198-206, 2002.
- 5) Hashibe M, Ritz B, Le AD, Li G, Sankaranarayanan R, Zhang ZF. Radiotherapy for oral cancer as a risk factor for second primary cancers. *Cancer Lett* 220, 185-195, 2005.
- 6) Ye F, Wu J, Dunn T, Yi J, Tong X, Zhang D. Inhibition of cyclooxygenase-2 activity in head and neck cancer cells by genistein. *Cancer Lett* 211, 39-46, 2004.
- 7) Kaname S, Ryutaro K, Takahiko T, Yuko N, Kunio T, Masashi H, et al. Specific inhibition of cyclooxygenase-2 results in inhibition of proliferation of oral cancer cell lines via suppression of prostaglandin E2 production. *J Oral Pathol Med* 30, 41-47, 2001.
- 8) Johnson FM, Yang P, Newman RA, Donato NJ. Cyclooxygenase-2 induction and prostaglandin E2 accumulation in squamous cell carcinoma as a consequence of epidermal growth factor receptor activation by imatinib mesylate. *J Exp Ther Oncol* 4, 317-325, 2004.
- 9) Vane J. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature* 231, 232-235, 1971.
- 10) Wu GS, Zou SQ, Liu ZR, Tang ZH, Wang JH. Celecoxib inhibits proliferation and induces apoptosis via prostaglandin E2 pathway in human cholangiocarcinoma cell lines. *World J Gastroenterol* 9, 1302-1306, 2003.
- 11) Xie W, Jeffrey G, Donald L, Robertson RL, Daniel L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin is regulated by mRNA splicing. *Science* 88, 2696-2696, 1991.
- 12) Lee, EJ, Kim J, Lee SA, Kim E, Chun Y, Ryu MH, Yook J. Characterization of newly established oral cancer cell lines derived from six squamous cell carcinoma and two mucoepidermoid carcinoma cells. *EMM* 37, 379-390, 2005
- 13) Everts B, Wahrborg P, Hedner T. COX-2-Specific inhibitors-the emergence of a new class of analgesic and anti-inflammatory drugs. *Clin Rheumatol* 19, 331-343, 2000.
- 14) Lin HP, Kulp SK, Tseng PH, Yang YT, Yang CC, Chen CS, et al. Growth inhibitory effects of celecoxib in human umbilical vein endothelial cells are mediated through G1 arrest via multiple signaling mechanisms. *Mol Cancer Ther* 3, 1671-1680, 2004.

- 15) Marra DE, Simoncini T, Liao JK. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by sodium salicylate mediated by up-regulation of p21(Waf1) and p27(Kip1). *Circulation* 102, 2124-2130, 2000.
  - 16) Albrecht JH, Poon RY, Ahonen CL, Rieland BM, Deng C, Crary GS. Involvement of p21 and p27 in the regulation of CDK activity and cell cycle progression in the regenerating liver. *Oncogene* 16, 2141-2150, 1998.
  - 17) Alban RS, Pardee AB. p21WAF1/CIP1/SDI1 is elevated through a p53-independent pathway by mimosine. *Cell Growth Differ* 7, 893-901, 1996.
  - 18) Myers C, Koki A, Pamukcu R, Wechter W, Padley RJ. Proapoptotic anti-inflammatory drugs. *Urology* 57, 73-76, 2001.
  - 19) Yu J, Zhang L. Apoptosis in human cancer cells. *Curr Opin Oncol* 16, 19-24, 2004.
  - 20) Glaser T, Weller M. Caspase-dependent chemotherapy-induced death of glioma cells requires mitochondrial cytochrome c release. *Biochem Biophys Res Commun* 281, 322-327, 2001.
  - 21) Ding H, Han C, Zhu J, Chen CS, D'Ambrosio SM. Celecoxib derivatives induce apoptosis via the disruption of mitochondrial membrane potential and activation of caspase 9. *Int J Cancer* 113, 803-810, 2005.
  - 22) Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula M, Emad S, Wang X, et al. Cytochrom c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 470-489, 1996.
  - 23) Soengas MS, Alarcon RM, Yoshida H, Giaccia AJ, Hakem R, Mak TW, et al. Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science* 284, 156-159, 1999.
-