creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:24011-200000264744
조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

2015년 2월
석사학위논문

아데노신에 의해 유도되는 사람 유래 구강 편평암세포종인 YD-10B와 YD-38의 세포성 세포치사 기작

조선대학교 대학원

치의학과

신 보 수

2015년 2월 석사학위논문 아데노신에 의해 유도되는 사람 유래 구강 편평암세포종인 YD-10B와 YD-38의 세포성 세포치사 기작 신 보 수

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

아데노신에 의해 유도되는 사람 유래 구강 편평암세포종인 YD-10B와 YD-38의 세포성 세포치사 기작

Identification of the cellular mechanism of adenosine-induced cell death in YD-10B and YD-38 human oral squamous cell carcinoma

2015년 2월 25일

조선대학교 대학원

치의학과

신 보 수

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

아데노신에 의해 유도되는 사람 유래 구강 편평암세포종인 YD-10B와 YD-38의 세포성 세포치사 기작

지도교수 오 지 수

이 논문을 치의학 석사학위신청 논문으로 제출함

2014년 10월

조선대학교 대학원

치의학과

신 보 수

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

신보수의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교 수 김 수 관 (인)

위 원 조선대학교 교 수 김 춘 성 (인)

위 원 조선대학교 교 수 오 지 수 (인)

2014년 11월

조선대학교 대학원

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

목 차

ABSTRACT ····· iii

I. 서론 ····· 1

II. 재료 및 방법 ····· 3

Ⅲ. 결과 ····· 6

Ⅳ. 고찰 ····· 12

참고문헌 ····· 14

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

List of figures

Figure 1. Dose-Dependent inhibition of cell viability by adenosine in the YD-10 and YD-38 human oral squamous cell carcinoma ····· 6

Figure 2. Cytopathic effect and Fragmentation of genomic DNA by adenosine in YD-10B and YD-38 human oral squamous cell carcinoma ····· 7

Figure 3. The effect of adenosine on pro-apoptotic and anti-apoptotic related protein in YD-10B and YD-38 human oral squamous cell carcinoma ····· 9

Figure 4. Activation of CDK4 and CDK inhibitors (p15, p16) by adenosine treatment in YD-10B and YD-38 human oral squamous cell carcinoma ····· 11

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

ABSTRACT

Identification of the cellular mechanism of adenosine-induced cell death in YD-10B and YD-38 human oral squamous cell carcinoma

Shin, Bo Su

Advisor : Prof. Oh, Ji-Su, D.D.S., Ph.D.

Department of Dentistry,

Graduate School of Chosun University

Adenosine is known to purine nucleoside composed of adenine molecule attached to a ribose sugar molecule moiety. It is present in all biological organs, tissues, and cells. Adenosine has been shown to induce cell death in a variety of cancer cells via diverse cellular mechanism. It has been established that adenosine regulates cell proliferation, apoptosis, differentiation, angiogenesis and metastasis in many tumors such as breast, colon, leukemia, liver and melanoma. However, cellular mechanisms of cell death by adenosine in human oral squamous cell carcinoma (OSCC) has not been studied. This study investigated to

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

understand a cellular mechanism of adenosine-induced cell death in the YD-10B and YD-38 human OSCC.

To verify the cell viability and cytopathic effect of adenosine in YD-10B and YD-38 human OSCC, MTT assay and crystal violet staining were performed. Cell viability reduces to 50% of control level on 24 h at 3.0 mM treatment. And crystal violet staining showed that adenosine treatment reduced the cell staining. Moreover, to understand cellular mechanism underlying the apoptosis in YD-10B and YD-38, DNA fragmentation assay and western blot analysis were performed. A DNA ladder formation was found in cells adenosine (3.0 mM) treated cells. In western blot analysis, adenosine treatment consistently increased accumulation of Bax and decreased of Bcl-2. It also adenosine induced activation of caspase-9, the effector caspase-3 and PARP cleavage indicating the mitochondrial mediated apoptosis in YD-38. In order to investigate, whether the cellular mechanisms of adenosine involved in the regulation G1/S cell cycle arrest in YD-10B and YD-38, the expression G1/S cell cycle regulatory proteins such as CDK4, p15, p16 were examined. CDK4 protein level was downregulated but p15 and p16 protein levels were upregulated in adenosine (3 mM) treated cells in YD-10B. In contrast, G1/S cell cycle regulatory protiens levels were not changed in adenosine treated YD-38 cells. This data indicated that adenosine treatment induced the apoptosis in YD-10B and YD-38 cells. However, cell cycle arrest caused only in YD-10B not in YD-38 cells.

The present study suggest that adenosine can induce cell death through G1/S cell cycle arrest and mitochondrial mediated apoptosis depend on cell contexts.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

I. 서 론

아데노신은 세포 내에서 ATP (아데노신 삼인산, adenosine triphosphate)의 분해에 의해 생성되는 퓨린 뉴클레오사이드(purine uncleoside)로서, 세포 내·외에서 물질운반, 물질합성, 신경자극전도, 근육운동, 체온유지 등의 생명활동에 이용되는 주 에너지원으로 사용될 뿐만 아니라 세포의 다양한 생리적 기능에 관여하며 사람을 포함한 모든 생물체에 존재하는 물질로 세포의 성장이나 분화 및 항상성에 직접적으로 관여한다고 알려져 있다(1,2). 또한 아데노신이 다양한 암 세포에서 세포 내·외부적 세포성 세포치사 기작을 통하여 세포 성장 억제 및 세포치사를 유도한다고 보고되고 있다(3). 세포사(Cell death) 중 세포치사는 개시동안 여러 종류의 proapoptic, antiapoptic 단백질의 발현이 조절되며 이에 따라 caspase가 활성화 되고, 세포수축, 세포막 수축, 염색질 응축, DNA 분절 현상이 야기되며, 세포치사 후반기에는 apoptic body를 형성하여 세포를 파괴한다(4). 이러한 세포치사를 일으키는 신호는 여러 가지가 있으나 최근 간암 세포에서 아데노신에 의한 Fas 외부 자극 인자에 의해 caspase-8의 단백질을 활성화시켜 세포사멸을 유도하는 미토콘드리아 extrinsic 경로를 통해 PARP가 절단되어 세포사멸을 유도하며(5,6), 대장암 세포나 유방암세포에서는 아데노신이 아데노신 수용체인 A_1, A_{2a}, A_{2b}, A_3를 통하여 세포 내로 유입되어 G 단백질과 결합하여 단백질 키나이제를 활성화 시켜 세포사멸을 유도한다고 보고 된 바 있다(7-9). 또한 전립선암에서는 세포 성장주기에 관여하는 G0/G1기에 중요한 조절자인 CDK4/CyclinD1-mediated pathway를 통해 세포 성장을 억제하여 세포치사에 이르게 한다고 보고되고 있다(10). 이와 같이 아데노신은 다양한 암에서 서로 다른 기작을 통하여 세포사멸을 유도하는 것을 확인 할 수 있다. 구강암은 구강 종양 중 악성종양을 일컫는 말로 발생 위치에 따라 구순암, 구강저암, 구개암, 설암, 치은암 등으로 구분한다. 구강은 점막, 근육, 골, 타액선 등의 조직으로 구성되어 구강암의 종류도 다양 할 뿐 아니라, 부위에 다른 임상적 소견도 다양하다(11,12). 구강암의 발생률은 인종, 지역 및 사회경제적 여건에 따라 차이가 있는데, 선진국에서는 구강암이 전체 암의 5%보다 적게 발생하지만, 개발도상국에서는 경부암과 위암 다음 세 번째로 많이 발생하는 것으로 보고되고 있다(13,14). 구강암

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

은 주로 술과 담배가 유의한 위험인자로 알려져 있으나, 최근에는 이외에 인간유두종바이러스(human papilloma virus, HPV)도 구인두 편평세포암에서 흡연여부와 관계없이 위험인자로 보고되었다(15,16). 구강암의 치료는 대부분 수술, 방사선 및 항암치료를 병합하여 시행하고 있으나 기존의 항암요법이 여러 가지 문제점들에 의해 새로운 치료법의 필요성이 대두되었고, 최근 암의 발생에 대한 분자생물학적 기전과 신호전달기전에 대한 이해가 증가하면서 특정 분자를 표적으로 하는 암 치료에 대한 관심이 높아 졌으며, 이에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다(17-19).

본 연구에서는 아데노신이 여러 암 세포에서 다양한 세포성 기작을 통해 세포치사를 유도함을 근거하여, 사람 유래 구강 편평암세포종인 YD-10B, YD-38에서 세포성장 억제 및 세포치사에 대한 분자적 기전에 대하여 연구를 수행하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅱ. 재료 및 방법

1. Material and cell line culture

Sigma에서 아데노신을 구입하여 DMSO에 녹여서 사용하였다. 사람 유래 구강 편평암세포종 중에 설암인 YD-10B 암과 치은암인 YD-38 암은 한국세포주은행(Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)으로부터 구입하였으며, 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Rockville, MD, USA) 및 항생제(100 ㎍/㎖ penicillin, 100 Unit streptomysin)가 함유된 RPMI-1640 배지에서 37℃의 온도와 5% CO_2가 유지되는 환경에서 배양하였다.

2. MTT assay

YD-10B와 YD-38 암세포의 생존율을 조사하기 위하여 12 well culture plate에 4×10^5 cells/well 세포를 seeding 하고 24 시간 후에 아데노신을 농도별로(1.0 mM-5.0 mM)로 처리하여 24시간 후 세포생존율을 측정하였다. 12 well plate에 있는 배양액을 제거 한 후 900 ㎕ RPMI-1640 배양액과 100 ㎕ MTT 용액를 첨가 한 후 12 well plate을 37℃, 5% CO_2 배양기에서 4 시간 반응하였다. 배양액을 제거하고 DMSO 1 ㎖ 첨가하여 96 well culture plate에 100 ㎕를 분주한 후 Epoch Bioteck ELISA reader (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT)를 사용하여 562 ㎚ 흡광도를 이용하여 세포생존률을 확인하였다.

3. Crystal violet staining

YD-10B와 YD-38 암세포의 세포병변효과를 조사하기 위하여 12 well culture plate에 4×10^5 cells/well 세포를 seeding 하고 24 시간 후에 아데노신을 3 mM 처리하였다. 12 well plate에 있는 배양액을 제거 한 후 인산완충액으로 well plate를 washing 한 후 0.2% Crystal violet solution (0.5g crystal violet, 35% formaldehyde, 100% Ethanol)을 500 ㎕ 첨가 후 실온에서 15분 반응 시켰다. 반응 후 인산완충액으로 3회 washing후 10% SDS 500 ㎕ 첨가하여 96 well culture plate에 100 ㎕를 분주 한 후 Epoch Bioteck ELISA reader (Bio-Tek

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Instruments Inc., Winooski, VT)를 사용하여 562 ㎚ 흡광도를 이용하여 세포 병변효과를 확인하였다.

4. DNA fragmentation assay

DNA 분절화 현상을 조사하기 위해 4×10^5 cells/well 세포를 seeding 하고 아데노신 3 mM을 처리하여 24 시간 후 1,500 rpm으로 5 분 동안 원심분리 후 세포를 수집하였다. 500 ㎕ genomic DNA extraction buffer (20 mM EDTA, 10 mM Tris pH8.0, 200 mM NaCl, 0.2% Triton X-100, 100 ㎍/㎖l Proteinase K)로 56℃ incubator에 1 시간 동안 세포를 용해 시킨 후 12,000 rpm으로 5 분 동안 원심분리하여 상층액을 새로운 튜브에 옮겨 동량의 PCI solution (Phenol:Chloroform:isoamylalcoho 25:24:1) 을 넣고 실온에서 5분 반응시킨 뒤 12,000 rpm으로 20 분 동안 원심분리하여 genomic DNA을 분리하였다. 분리한 genomic DNA를 Ethanol precipitation하여 ethidium bromide가 포함된 1.5% agarose gel을 이용하여 100 voltage에서 30분 전기영동하여 UV transilluminator (Spectronics Corporation Westbury, NY, USA)하에서 genomic DNA 분절을 관찰하였다.

5. Western blot analysis

4×10^5 FaDu 암세포를 12 well plate에 배양 후 아데노신 3 mM을 처리하여 24 시간 후 1,500 rpm으로 5 분 동안 원심분리하여 세포를 수집하여 인산완충용액으로 두 번 세척하고 protein lysis buffer를 이용하여 단백질을 분리한 후 BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockgord, IL, USA)을 이용하여 단백질을 정량 하였다. 20 ㎍의 단백질을 12% SDS-PAGE에 loading 한 후 150 voltage에서 1 시간 동안 전기영동 하였다. 젤 상에서 분리된 단백질은 western blot analysis를 수행하기 위해 polyvinylidene fluoride(PVDF) membrane에 transfer 한 후, blocking solution (5% BSA in TBS-T containing 0.1% Tween-20)을 이용하여 1 시간 동안 반응하였다. 1차 항체 Bax, Bcl-2, cleaved caspase-9, -3, PARP, CDK4, p15, p16(Cell Signaling Technology, Beverly, MA)와 actin(Santa cruz Biotechnology, Inc)를 TBS-T를 이용하여 1:2000 비율로 희석한 후 4℃ 조건 하에 16 시간 동안 반응하였다. TBS-T를 이용하여 3번 세척

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

후 2차 항체 anti-rabbit 또는 anti-mouse antibody(Amersham Biociences, UK)는 TBS-T를 이용하여 1:2,000 비율로 희석하여 1 시간 반응 후 ECL kit (Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL, USA)을 이용하여 western blot을 수행 하였다.

6. 실험자료의 통계학적 검정

모든 실험성적은 평균 ± 표준편차로 나타냈고, 각 실험군 간의 유의성 검정은 ANOVA 검증 후에 student's t-test를 하였으며, p-value가 0.05 미만(*, $p<0.05$)의 경우에서 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅲ. 결 과

1. 아데노신에 의한 구강 편평암세포의 성장억제 효과

아데노신에 의한 사람 유래 구강 편평암세포종인 YD-10B, YD-38 세포의 성장억제 효과를 확인하기 위하여 1.0 mM, 2.0 mM, 3.0 mM, 4.0 mM. 5.0 mM 농도로 24 시간 동안 처리하여 MTT assay를 수행한 결과 3.0 mM에서 농도 의존적으로 세포성장이 억제됨을 확인 하였으며, 세포 반수치사량 IC_{50}은 3.0 mM 임을 확인하였다(Fig 1A, B)

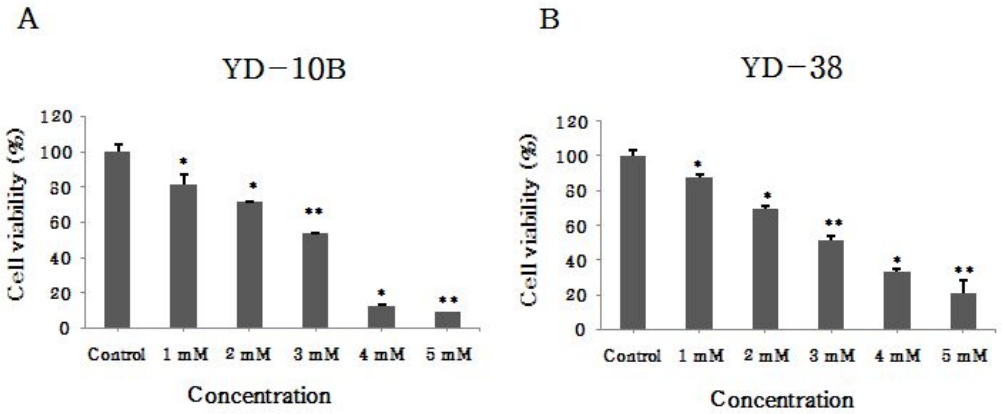

Figure 1. Dose-Dependent inhibition of cell viability by adenosine in the YD-10B and YD-38 human oral squamous cell carcinoma. (A) The effect of adenosine on cell viability in YD-10B and (B) YD-38 human oral squamous cell carcinoma were treated with various concentrations (1.0-5.0 mM) of adenosine alone for 24 h, and viability was assessed by MTT assay. Adenosine reduced cell viability in YD-10B, YD-38 human oral squamous cell carcinoma in a dose-dependent manner. Results (mean ± SD) were calculated as percent of corresponding control values. *P<0.05, **P<0.01, are significant. Statistical analysis was performed by ANOVA. Each point represents four repeats, each triplicate.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 구강 편평암세포의 세포 병변 효과 및 핵 내 형태학적 변화 확인

아데노신에 의한 사람 유래 구강 편평암세포종인 YD-10B, YD-38 세포에서 세포 병변 효과를 확인하기 위하여 아데노신을 3.0 mM 농도로 24시간 동안 처리하여 Crystal violet 염색을 수행한 결과 아데노신을 3.0 mM 처리 한 세포에서 세포 병변 효과의 감소를 확인하였다(Fig. 2A). 세포치사 유도에서 나타나는 형태학적 특성으로 알려져 있는 DNA 분절화를 확인하기위해 DNA fragmentation assay 실험을 수행하였다. YD-10B, YD-38 세포에 아데노신 3 mM을 처리하여 24 시간 후 세포를 수집하여 genomic DNA을 분리하여 확인한 결과, YD-38 세포에서 뚜렷한 DNA 분절화를 확인 할 수 있었고, 반면 YD-10B 세포에서는 DNA 분절화가 일어나지 않음을 확인하였다(Fig. 2B).

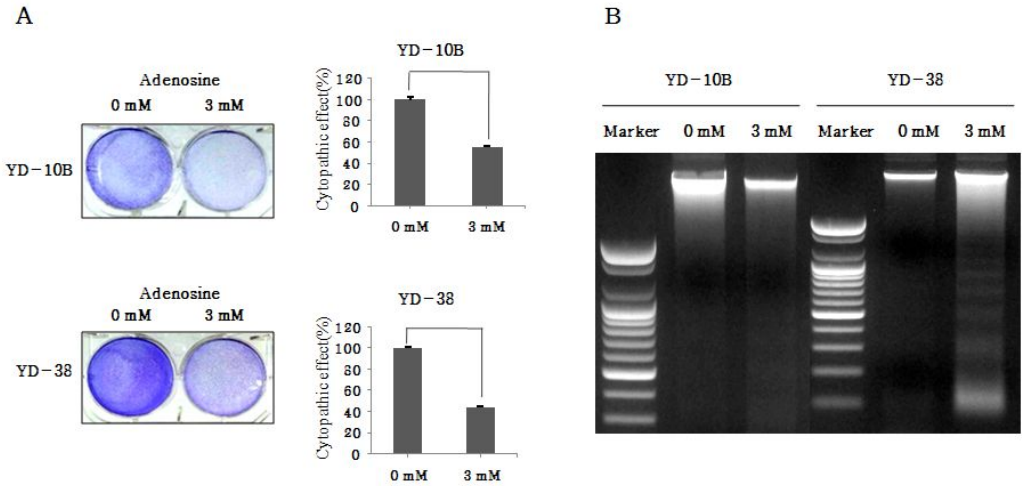

Figure 2. Cytopathic effect and Fragmentation of genomic DNA by adenosine in YD-10B and YD-38 human oral squamous cell carcinoma. Cells were seeded at 4×10^5 and then treated with 3.0 mM of adenosine for 24 h. (A) Cytopatic effect was observed by crystal violet staining at 24h after treatment. (B) Electrophoretic analysis of internucleosomal DNA fragmentation. Genomic DNA was subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3. 구강 편평암세포에서 세포치사에 관여하는 단백질 발현 확인

YD-10B, YD-38 구강 편평암세포에서 아데노신의 세포치사 유도의 분자적 기전을 규명하기 위해 미토콘드리아 외막에 존재하는 세포사멸 유도인자인 Bax 단백질과 세포사멸 억제인자인 Bcl-2 단백질 발현을 확인하였다. YD-38 세포에서 Bax 발현이 증가하였으며, Bcl-2 발현은 감소하였다. YD-10B 세포에서는 반대로 Bax 발현은 감소하고, Bcl-2 단백질 발현이 증가하였다. 또한 YD-38세포에서 세포치사 경로의 하방에서 신호 전달의 필수적인 역할을 하는 cleaved caspase-9, -3의 발현이 증가하고 PARP가 활성화되어 세포치사를 유도함을 확인하였다(Fig. 3B). 그러나 YD-10B 세포에서 cleaved caspase-9, -3 발현에 변함이 없었으며, cleaved PARP 발현은 감소하였다(Fig. 3A).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

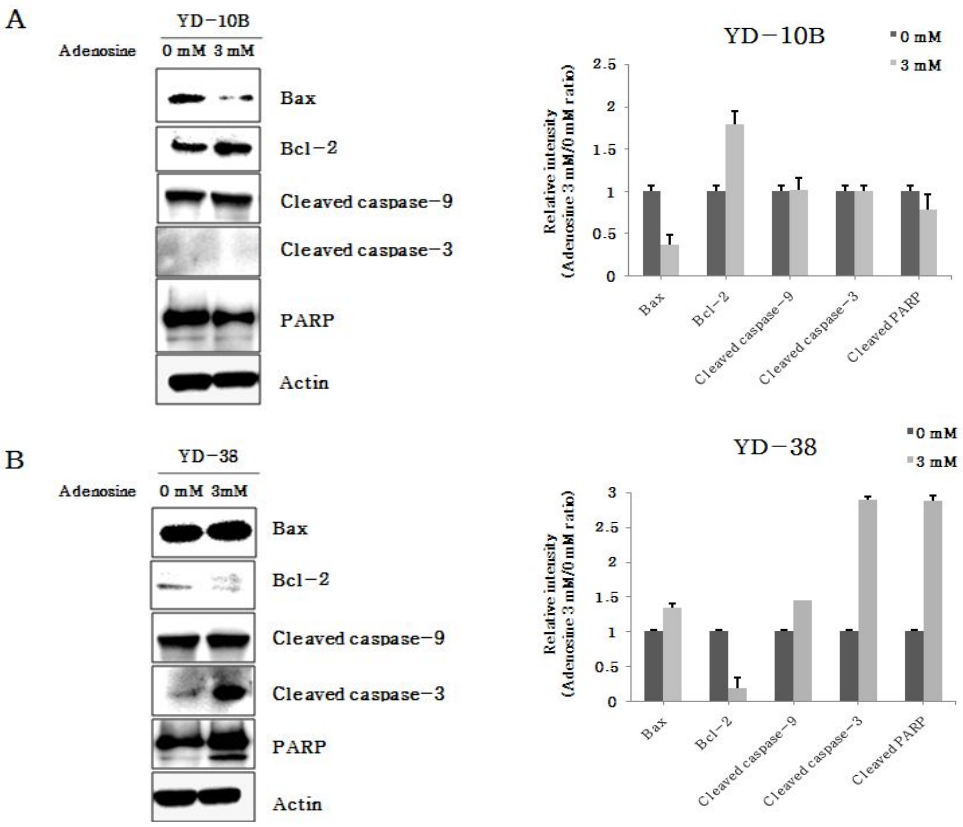

Figure 3. The effect of adenosine on pro-apoptotic and anti-apoptotic related proteins in YD-10B and YD-38 human oral squamous cell carcinoma. Cells were treated with 3 mM of adenosine for an indicated time. Total proteins (20 ug) were prepared and the expressions of Bax, Bcl-2, cleaved caspase-9, -3 and PARP proteins were analyzed by Western blot analysis. (A) The expression of pro-apoptotic and anti-apoptotic relate proteins in YD-10B, (B) YD-38 human oral squamous cell carcinoma. Each column represents the mean (± SEM) fold change larger than non adenosine-treated groups.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

4. 구강 편평암세포에서 세포주기 진행 억제에 관여하는 단백질 발현 확인

아데노신이 YD-10B, YD-38 구강 편평암세포에서 세포 증식을 억제시키는지에 대한 분자적 기전을 규명하기 위하여 세포주기 관련인자들의 발현 정도를 확인하였다. 세포주기와 관련이 높은 인자 중 CDK4의 발현을 측정한 결과 YD-10B 세포에 아데노신을 3 mM 처리 시 발현이 현저히 감소하였으며, YD-38 세포에서는 거의 변화가 없었다. CDK 저해인자로 알려져 있는 p15, p16의 발현정도를 측정 한 결과 YD-10B 세포에서 p15, p16의 발현이 증가하였으며, YD-38세포에서 p15의 발현은 증가하였으며, p16의 발현은 거의 변화가 없음을 확인하였다(Fig. 4A, B).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

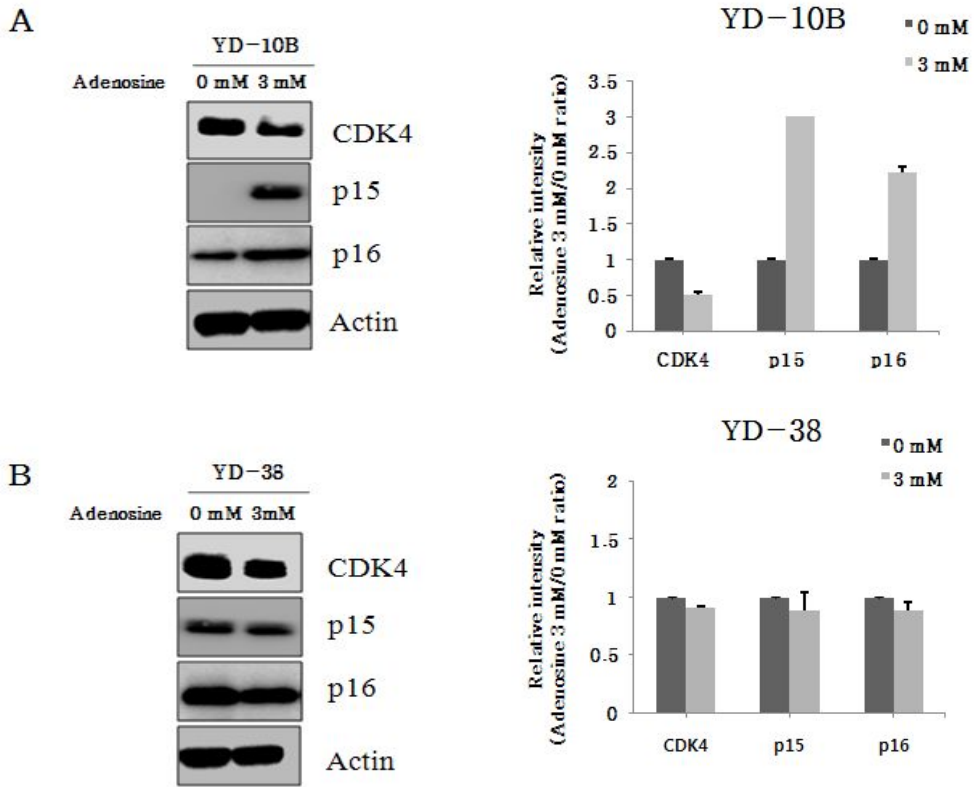

Figure 4. Activation of CDK4 and CDK inhibitors (p15, p16) by adenosine treatment in YD-10B and YD-38 human oral squamous cell carcinoma. Cells were treated with 3 mM of adenosine for an indicated time. Total proteins (20 ug) were prepared and the expressions of CDK4 and p15, p16 proteins were analyzed by Western blot analysis. (A) The expression of CDK4 and CDK inhibitors (p15, p16) proteins in YD-10B, (B) YD-38 human oral squamous cell carcinoma. Each column represents the mean (± SEM) fold change larger than non adenosine-treated groups.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅳ. 고 찰

편평암세포는 인간의 암 중에서 가장 일반적이고 높은 발생 빈도를 차지하고 있으며, 그 중에서도 구강 편평암세포의 경우는 발생 후 5년 생존율이 50% 정도에 그치고 있다(20). 근래 구강암 연구에 대하여 다양한 한약재 및 천연물을 이용한 연구가 진행되고 있으며 버섯, 콩, 진달래꽃, 활나물 등의 추출물이 구강 편평암세포에 대하여 유의한 세포독성을 나타내며 이러한 세포독성은 세포치사에 의한 것임을 밝혔다(21,22). 대부분 암 치료제는 세포치사를 유도한다고 보고 되고 있으며, 세포치사의 유발인자는 세포 증식 조절과 생존 조절의 균형에 의해 결정된다. 아데노신은 세포치사와 관련된 유전자들을 활성화시킴으로써 HuH-7 간암 세포에서는 C-FLIP발현을 감소시켜 caspase -8, -3의 발현을 활성화 시켜서 PARP를 절단하여 세포사멸을 유도하는 분자적 기전을 보고 하였으며(23), LNcap-FGC-10, DU-145, PC3 전립선암세포에서는 아데노신을 처리한 결과 세포주기 억제에 관여하는 cyclic dependent kinasse (CDK)의 발현을 감소하여 G1 arrest가 유도되어 세포성장이 억제됨을 보고 하였다(10). 또한 GT3-TKB 폐암세포에서는 아데노신 카이네이즈에 의해 AMP로 전환되고, AMPK (AMP-activated protein kinas)의 활성으로 세포치사를 유도함을 보고 하였다(3). 위와 같이 아데노신으로 여러 암세포주를 이용하여 세포주기에 의한 세포성장 억제 및 세포사멸에 의한 성장 억제에 대한 다양한 분자적 기전에 대하여 연구하고 있지만 구강 편평암세포를 이용한 세포성장 억제 및 세포치사에 대한 분자적 기전에 대한 실험은 보고 된 바 없다. 본 연구는 구강 편평암세포 중 YD-10B와 YD-38 세포를 이용하여 아데노신에 의한 다양한 세포성 세포치사 기전에 대하여 확인하기 위한 기초적인 연구라 할 수 있다. YD-10B와 YD-38 구강 편평암세포의 성장 억제효과를 확인하기 위하여 먼저 암세포에 아데노신 1.0 mM에서 5.0 mM 까지 처리하여 24 시간 후 MTT assay를 이용하여 성장 억제를 확인 한 결과 3.0 mM 농도에서 세포성장을 억제함을 확인하였다(Fig. 1A, B). 또한 세포 내 직접 Crystal violet 염색약을 처리하여 세포 병변효과를 확인하였다(Fig. 2A). 암세포의 성장억제는 세포주기의 진행 억제 또는 세포치사 유도에 의해서 이루어진다. 아데노신에 의한 YD-10B와 YD-38 구강 편평암세포의

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

성장억제의 기전을 확인하기 위하여 단백질 면역 발색법, DNA 분절화을 수행하였다. 암세포 사멸에 대표적인 형태학적 현상인 염색체 DNA의 분절화를 확인하였을 때 같은 농도 3 mM 처리한 YD-38 세포에서 뚜렷한 분절화 현상을 확인할 수 있었고(Fig. 2B), Bax 단백질 발현의 증가와 Bcl-2 단백질 발현의 감소, cleaved caspase -9, -3 활성화를 통해 PARP의 절단에 의하여 세포치사를 유도함을 확인하였다(Fig. 3B). 또한 YD-10B 세포에서는 DNA 분절이 일어나지 않았으며(Fig. 2B) 세포주기에 진행 억제에 관여하는 CDK4 발현의 감소와 p15, p16 발현의 증가로 인해 G1 arrest가 유도되어 세포 성장이 억제됨을 확인하였다(Fig. 4B). 위 연구를 종합 해 볼 때, 사람 유래 구강 편평암세포종인 YD-10B 세포는 아데노신에 의해 DNA 분절화 같은 세포치사로 진행되는 형태변화를 보였으며, 이 과정에서 caspase 활성 증가로 인한 PARP 절단에 의한 세포치사 유도를 실험으로 확인하였으며, YD-38 세포에서는 G0/G1 phase arrest를 유도함으로써 세포주기 진행을 억제함을 알 수 있었다. 따라서 아데노신에 의한 여러 가지 세포치사 기전을 응용함으로써 구강 편평암세포에 있어서 새로운 치료제의 가능성에 관한 정보의 제공과 함께 다양한 기전의 응용에도 도움을 줄 것으로 사료되며, 앞으로 이에 대한 지속적인 연구가 필요하리라 생각된다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

참고문헌

1. Nishizaki T, lkeuchi Y. Adenosine evokes potassium currents by protein kinase C activated via a novel signaling pathway in superior colliculus neurons, *FEBS Lett.* 1996;378:1-6.

2. Gessi S, Merighi S, Sacchetto V, Simioni C, Borea PA. Adenosine receptors and cancer, *Biochim Biophys Acta..* 2011;1808:1400 - 12.

3. Tsuchiya A, Kanno T, Nishizaki T. Adenosine exerts potent anticancer effects through diverse signaling pathway, *Personalized Medicine Universe.* 2014;3:35-37.

4. Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC, Stoneman VE, Longthorne VL, Culhane AC, Williams GT. Apoptosis: molecular regulation of cell death, *Eur J Biochem.* 1996;236:1-26.

5. Barry CP, Lind SE. Adenosine-mediated killing of cultured epithelial cancer cells, *Cancer Res.* 2000;60:1887 - 94.

6. Schrier SM, van Tilburg EW, van der Meulen H, Ijzerman AP, Mulder GJ, Nagelkerke JF. Extracellular adenosine- induced apoptosis in mouse neuroblastoma cells: studies on involvement of adenosine receptors and adenosine uptake, *Biochem Pharmacol.* 2001;61:417 - 25.

7. Yasuda Y, Saito M, Yamamura T. Extracellular adenosine induces apoptosis in Caco-2 human colonic cancer cells by activating caspase-9/-3 via A_{2a} adenosine receptors, *J Gastroenterol.* 2009;44:56-65.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

8. J, Pierron A, Ravid K. An adenosine analogue, IB-MECA, down-regulates estrogen receptor a and suppresses human breast cancer cell proliferation, *Cancer Res.* 2003;63:6413 - 23.

9. Tsuchiya A, Kanno T, Saito M. Intracellularly transported adnosine in duces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells by accumulating AMID in the nucleus, *Cancer Lett.* 2012;321:65-72.

10. Aghaei M, Karami-Tehrani F, Panjehpour M, Salami S, Fallahian F. Adenosine induces Cell-Cycle Arrest and Apoptosis in Androgen-Dependent and -Independent Prostate Cancer Cell Line, LNcap-FGC-10, Du-145 and PC3, *The prostate.* 2012;72:361-375.

11. Hopper C, Kübler A, Lewis H, Tan I.B, Putnam G. mTHPC-mediated photodynamic therapy for early oral squamous cell carcinoma, *Int J Cancer.* 2004;111:138-146.

12. Bodin I, Jäghagen EL, Isberg A. Intraoral sensation before and after radiotherapy and surgery for and pharynegal cancer, *Head and Neck.* 2004;26:923-929.

13. Arbes SJ Jr, Olshan AF, Caplan DJ, Schoenbach VJ, Slade GD, Symons MJ. Factors contributing to the poorer survival of black Americans diagnosed with oral cancer, *Cancer Causes and Control.* 1999;10:513-23.

14. Parken DM, Laara E, Muir CS. Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cnacers in 1980. *Int J cancer.* 1998;41:184-97.

15. Bodin I, Jäghagen EL, Isberg A. Intraoral sensation before and after

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

radiotherapy and surgery for and pharynegal cancer, *Head and Neck*. 2004;26:923-929.

16. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, NguyenTan PF. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer, *N Engl J Med*. 2010;361(1):24-35.

17. Crown J, O'Leary M, Ooi WS. Docetaxel and paclitaxel in the treatment of breast cancer: a review of clinical experience, *Oncologist*, 2004;2:24-32.

18. Ward BB. Targeted therapy in head and neck cancer, *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2013;25(1):83-92.

19. Schmitz S, Ang KK, Vermorken J, Haddad R, Suarez C, Wolf GT. Targeted therapies for squamous cell carcinoma of the head and neck: current knowledge and future directions. *Cancer Treat Rev*. 2014;40(3):390-404.

20. MJ Kim. Oral Cancer, *Seoul; Jisung Publishing*. 2002.

21. Kish JA, Drelichman A, Jacobs J. Clinical trial of cislatin and 5-fluorouracil infusion as initial treatment of advanced squamous cell carcinoma of the head and neck, *Cancer treat res*. 1982;66:471-474.

22. Mukherjee AK, Basu S, Sarkar N, Ghosh AC. Advances in cancer therapy with plant based natural products, *Curr Med Chem*. 2001;8:1467-1486.

23. Donggin Y, Takahiro Y, Hideyuki Y, Nishizaki T. Intracellularly

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

transported adenosine induces apoptosis in HuH-7 human hapatoma cells by downregulating c-FLIP expression causing caspase-3/-8 activation, *ScienceDirect.* 2007;73:1665-1675.

Collection @ chosun