



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](#)

2015년 2월

2015년 2월  
박사학위논문

박사학위논문

사람 유래 FaDu 하인두  
편평세포암에서 아데노신의 mTOR  
인산화에 관여한 세포성장 억제

김철만

사람 유래 FaDu 하인두  
편평세포암에서 아데노신의 mTOR  
인산화에 관여한 세포성장 억제

조선대학교 대학원

치의학과

김 철 만

사람 유래 FaDu 하인두  
편평세포암에서 아데노신의 mTOR  
인산화에 관여한 세포성장 억제

Inhibition of cell proliferation through the mTOR  
phosphorylation by adenosine treatment in human FaDu  
hypopharynx squamous cell carcinoma

2015년 2월 25일

조선대학교 대학원

치의학과

김 철 만

사람 유래 FaDu 하인두  
편평세포암에서 아데노신의 mTOR  
인산화에 관여한 세포성장 억제

지도교수 김 수 관

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함.

2014년 10월

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 철 만

## 김철만의 박사학위 논문을 인준함

위원장	서울대학교	교수	김영균	(인)
위원	울산대학교	교수	이부규	(인)
위원	조선대학교	교수	김수관	(인)
위원	조선대학교	교수	김춘성	(인)
위원	조선대학교	교수	임성철	(인)

2014년 12월

조선대학교 대학원

## 목 차

ABSTRACT .....	iii
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	3
III. 결과 .....	6
IV. 고찰 .....	12
참고문헌 .....	14

## List of figures

<b>Figure 1.</b> Inhibition of cell viability by adenosine in human FaDu hypopharynx squamous cell carcinoma .....	6
<b>Figure 2.</b> Cytopathic effect by adenosine in human FaDu hypopharynx squamous cell carcinoma .....	7
<b>Figure 3.</b> Fragmentation of inter-nucleosomal DNA and condensation of nuclei by adenosine in FaDu human hypopharyngeal squamous cell carcinoma .....	8
<b>Figure 4.</b> Adenosine induced apoptosis in FaDu human hypopharyngeal squamous cell carcinoma .....	9
<b>Figure 5.</b> Adenosine inhibits mTOR activation in FaDu human hypopharyngeal squamous cell carcinoma .....	10
<b>Figure 6.</b> Activation of mitochondria related proteins by treatment of adenosine in FaDu human hypopharyngeal squamous cell carcinomas .....	11

## ABSTRACT

### Inhibition of cell proliferation through the mTOR phosphorylation by adenosine treatment in human FaDu hypopharynx squamous cell carcinoma

Chul Man Kim

Advisor : Prof. Kim, Soo-Gwan, D.D.S.

Department of Dentistry,

Graduate School of Chosun University

The akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) signal transduction is considered to be a central regulator of protein synthesis, involving the regulation of cell proliferation, differentiation, and survival in cancer cells. The inhibitors of mTOR as anticancer reagents are undergoing active evaluation in various cancer cells. However, akt/mTOR signal transduction in human head and neck squamous carcinoma for adenosine effect remain unknown. This study performed to understand a akt/mTOR signal transduction of adenosine-induced cell death in human FaDu hypopharynx squamous cell carcinoma. To verify the cell viability and cytopathic effect of adenosine in human FaDu cells, MTT assay and crystal violet staining were performed. To understand the mechanism of cell death by adenosine treatment in cells, DNA fragmentation and western blot analysis were examined. Adenosine reduced FaDu cell viability in a concentration (1.5 mM, 3.0 mM) compared with untreated with adenosine ( $p < 0.01$ , ANOVA) for 24 h and cell staining was



gradually reduced, which indicated the elevation of cytopathic effect for adenosine in FaDu cells. After treatment with adenosine (1.5 mM, 3.0 mM) for 24 h, FaDu cells harvested and then confirmed apoptosis by DNA fragmentation assay. A DNA ladder formation was clearly found with cells adenosine (3.0 mM) treatment for 24 h, indicating that adenosine induces apoptosis in FaDu cells. Moreover, to understand mTOR signal transduction for adenosine effect underlying the inhibition of cell growth in FaDu cell, western blot analysis was performed. Adenosine significantly decreased phosphorylation of PI3K, akt, mTOR, 4E-BP1 and S6-ribosomal protein. It also downregulated Bcl-2 expression and then caused activation of caspase-9, the effector caspase-3 and PARP cleavage.

This present study demonstrates that adenosine can negatively regulate akt-mTOR pathways, which is associated with cell proliferation. It also suggest that cell proliferation inhibits by a novel signal transduction for adenosine effect in human FaDu hypopharynx squamous cell carcinoma cells.

## I. 서론

전 세계적으로 두경부암의 유병률은 전체 암 중에 약 7 % 차지하고 있으며 노령화에 의해 지속적으로 증가하는 추세이다. 주로 술과 담배가 유의한 위험인자로 알려져 있으며, 최근에는 이 외에 인간유두종바이러스(human papilloma virus, HPV)도 하인두 편평세포암에서 흡연여부와 관계없이 위험인자로 보고되었다(1). 두경부암 환자의 반수 이상이 국소 진행된 단계에서 진단되며, 지난 수십 년간, 치료로 대부분 수술, 방사선 및 항암치료를 병합하여 시행하고 있다. 여러 가지의 항암제 개발에도 불구하고 두경부 암환자는 5년 내에 반 이상 사망하며, 재발된 환자 또는 전이를 동반하는 환자의 경우 일 년 이내에 사망하며 기존의 항암제에 비해 생존률이 현저히 개선되지는 못하고 있다(2). 이러한 항암제는 두경부암에 선택적으로 항암효과가 나타나지 않고 있으며, 암전이가 유발되며 또한 소화기계 합병증, 면역력 저하, 골수기능저하등과 같은 심각한 전신독성을 나타내고 있다(3, 4, 5). 최근에는 기존의 항암제의 효능 미비 및 전신독성과 같은 부작용을 극복하기 위해 새로운 치료법이 부각되고 있으며, 암의 발생에 대한 세포신호전달과 같은 분자생물학적 기전에 대한 이해가 증가하면서 암 발생에 관여하는 특정 분자를 선택적으로 인지하여 치료하는 분자표적치료에 대한 관심이 대두되고 있다(6, 7). 이러한 분자표적치료가 부각됨으로서 여러 연구자들이 기존의 항암제와 두경부암 발생에 관여하는 인자를 억제하는 억제제를 병행하여 항암효과를 나타내는 실험을 수행하고 있다. 최근 보고에 의하면 두경부암 환자의 90% 정도 akt-mTOR 신호가 활성화되어 기존의 두경부암 환자에 투여하는 cetuximab 또는 docetaxel 과 같은 항암제와 병행하여 Akt-mTOR 억제제를 투여하여 치료하는 임상연구가 진행 중에 있다(8). Mammalian target of rapamycin (mTOR)는 포유류의 세포 내에서 세포 생존 및 성장을 촉진하는 다양한 신호 전달체계에서 발견 되는 세린/트레오닌 키나아제(serine/threonine kinase)의 일종으로 phosphoinositol 3'-kinase (PI3K)/Akt 경로를 하향 조절하는 단백질로 알려져 있다(9). mTOR가 활성화되면 40S 리보솜단백질인 p70 S6

kinase와 4E-binding protein-1 (4EBP1)을 인산화 및 활성화시켜 세포의 성장 및 단백질 번역을 촉진시키는데 다양한 암종에서 이러한 전달 경로에 대한 억제제가 일어나지 않는 것으로 보고되고 있다(10).

본 연구에서는 사람 유래 FaDu 하인두 암세포에서 아데노신에 의한 세포성장 억제를 확인한 후 두경부암 발생에 관여하는 분자적 기전 중에 Akt-mTOR 신호전달체계에 관여하는 단백질들의 인산화 억제에 관여하는 아데노신의 효과를 확인한 후 기존의 항암제와 병행하여 기존의 두경부 항암제 효과 미비 및 부작용을 최소화 할 수 있는 기반을 마련하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 아데노신 준비 및 세포배양

시그마 알드리치에서 아데노신을 구입하여 DMSO에 녹여서 사용하였다. 사람 유래 FaDu 하인두암 세포주(ATCC® HTB-43™)는 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Rockville, MD, USA) 및 항생제(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  penicillin, 100 Unit streptomycin)가 함유된 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Gibco BRL, Rockville, MD, USA)을 사용하였다.

### 2. MTT assay

사람 유래 FaDu 하인두암 세포의 생존율을 조사하기 위하여 well plate에 세포를 seeding한 후 24 시간 후에 500  $\mu\text{M}$ , 1.0 mM, 1.5 mM, 3.0 mM 농도의 아데노신을 처리하였다. 아데노신을 세포에 처리 후 24 시간 후에 배양액에 제거한 후 인산완충액으로 well plate를 washing 한 후 450  $\mu\text{l}$  DMEM 배양액과 50  $\mu\text{l}$  MTT 용액을 첨가하여 4 시간 반응하였다. MTT 용액이 첨가된 배양액을 제거하고 DMSO 500  $\mu\text{l}$  첨가하여 실온에서 30 분 반응 후 96 well culture plate에 100  $\mu\text{l}$ 를 분주하여 Epoch Biotek ELISA reader (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT) 565 nm 흡광도를 이용하여 세포 생존율을 확인하였다.

### 3. 세포변형효과

사람 유래 FaDu 하인두암 세포의 생존율을 조사하기 위하여 well plate에 세포를 seeding한 후 24 시간 후에 500  $\mu\text{M}$ , 1.0 mM, 1.5 mM, 3.0 mM 농도의 아데노신을 처리하였다. 아데노신을 세포에 처리 후 24 시간 후에 배양액에 제거한 후 인산완충액으로 well plate를 washing 한 후 0.2% crystal violet solution (0.5 g crystal violet, 35% formaldehyde, 100% ethanol)을 500  $\mu\text{l}$  첨가 후 암실에서 15 분 동안 반응시켰다. 15 분 반응 후 인산완충액으로 3 번 세척 후 10% SDS 500  $\mu\text{l}$  첨가하여 염색하였다.

#### 4. DNA 분절화 현상

아데노신 1.5 mM, 3.0 mM을 처리하여 24 시간 후 1500 rpm으로 5 분 동안 원심 분리하여 세포를 수집 한 후 500  $\mu$ l genomic DNA extraction buffer (20 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl, 0.2 % Triton X-100, 100  $\mu$ g/ml proteinase K)로 세포를 용해시켜 56°C incubator에 1 시간 동안 반응 시킨 후 12,000 rpm으로 5 분 동안 원심분리 하여 상층액을 새로운 튜브에 옮겨 동량의 Phenol : Chloroform : isoamylalcohol (PCI) solution을 넣고 실온에서 5분 동안 반응 후 12,000 rpm으로 20 분 동안 원심분리하여 상층액을 새로운 Tube 에 옮긴 후 100% 에탄올을 이용하여 genomic DNA을 침전하여 분리하였다. 분리한 genomic DNA를 ethidium bromide가 포함된 1.5% 아가로즈 이용하여 150 voltage 에서 30 분 동안 전기영동하여 UV transilluminator (Spectronics Corporation Westbury, NY, USA)하에서 genomic DNA 분절을 확인하였다.

#### 5. 단백질 항체 발색법

아데노신 1.5 mM, 3.0 mM을 처리하여 24시간 후 1500 rpm으로 5 분 동안 원심 분리하여 세포를 수집하여 인산완충액으로 세 번 세척하고, 단백질 lysis buffer를 이용하여 단백질을 분리한 후 BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA)을 이용하여 정량하였다. 20  $\mu$ g 단백질을 12% SDS-PAGE gel에 loading 한 후 150 voltage에서 1 시간 동안 전기영동 하였다. 젤 상에서 분리된 단백질은 western blot analysis을 수행하기 위해 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 transfer 한 후, blocking solution (5% BSA in TBS containing 0.1% Tween-20)을 이용하여 1 시간 동안 blocking하였다. 1차 항체 p-akt, p-mTOR, p-70s6, p-4EBP1, Bcl-2, cleaved caspase-9, cleaved caspase-3, 그리고 cleaved PARP (Cell Signaling Technology, Beverly, MA)와 actin (Santa cruz Biotechnology, Inc)를 TBS-T (TBS containing 0.1% Tween-20)를 이용하여 1:2000 비율로 희석한 후 4°C 조건하에 16 시간 동안 반응하였다. TBS-T를 이용하여 세 번 세척 후 2차 항체 anti-rabbit 또는

anti-mouse antibody (Amersham Biociences, UK)는 TBS-T (TBS containing 0.1% Tween-20)를 이용하여 1:5,000 비율로 희석하여 1 시간 반응 후 ECL kit (Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL, USA) 을 처리 후 Microchemi 4.2 (DNR Bio-Imaging Systems Ltd, USA)을 이용하여 단백질 발현 변화를 확인하였다.

## 6. 유세포 분석

Annexin V는 phosphatidylserine (PS)과 높은 결합력을 갖는 칼슘의존성 인지질 결합 단백질이다. 그것은 세포외막의 PS 노출에 대한 민감한 표시제이기 때문에 apoptosis 측정에 매우 유용하게 사용된다. 또한 annexin V와 PI을 동시에 처리 했을 때 세포사멸에 대한 apoptosis와 necrosis 여부를 판단할 수 있다. 따라서 본 실험에서는 annexin V와 PI을 아데노신을 처리한 FaDu 하인두암 세포에 동시에 처리하여 유세포 분석을 수행하였다.

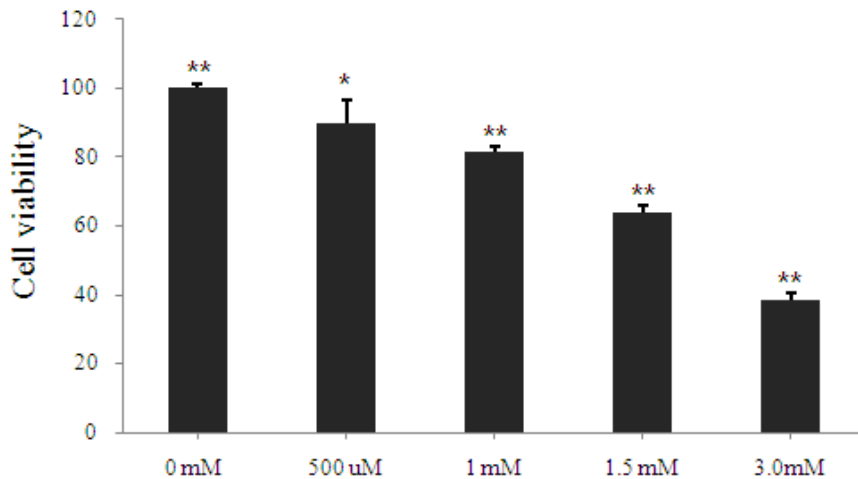
## 7. 실험자료의 통계학적 검정

모든 실험성적은 평균  $\pm$  표준편차로 나타냈고, 각 실험군 간의 유의성 검정은 ANOVA 검증 후에 student's t-test를 하였으며, p-value가 \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$ 의 경우에서 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다

### III. 결 과

#### 1. 아데노신에 의한 사람 유래 FaDu 하인두암세포 성장억제

아데노신에 의한 FaDu 하인두암세포의 성장억제를 확인하기 위해 500 uM, 1.5 mM, 3 mM을 24 시간 처리 후 MTT assay를 수행하였다. 아데노신 1.5 mM에서 약 30% 정도 세포성장이 억제되었으며, 세포 반수치사량 IC<sub>50</sub>은 3.0 mM임을 확인하였다(Fig.1).



**Figure 1. Inhibition of cell viability by adenosine in human FaDu hypopharynx squamous cell carcinoma.** The effect of adenosine on cell viability in human FaDu cells were treated with various concentrations (0.5–3 mM) of adenosine alone for 24 h, and viability was assessed by MTT assay. Adenosine reduced cell viability in FaDu cells in a dose-dependent manner. Results (mean  $\pm$  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.

## 2. 사람 유래 FaDu 하인두암세포 사멸에 의한 세포병변 효과

FaDu 세포에서 아데노신에 의해 세포성장이 억제 되었을 때 나타내는 세포병변 효과를 확인하기 위해 crystal violet 염색약을 이용하여 세포 내 직접 염색 하였다. 아데노신을 1.5 mM과 3.0 mM 처리 하였을 때 점차로 염색이 줄어드는 것을 확인하였다(Fig.2).

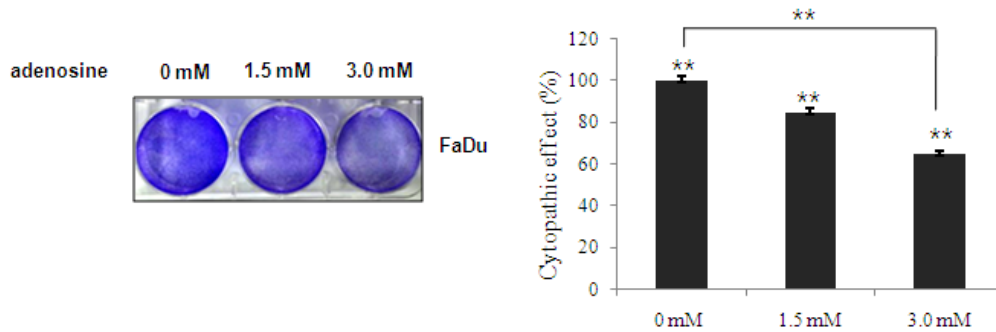


Figure 2. Cytopathic effect by adenosine in human FaDu hypopharynx squamous cell carcinoma. Cells were seeded at  $4 \times 10^5$  and then treated with 1.5 mM and 3.0 mM of adenosine for 24 h. Cytopathic effect was observed by crystal violet staining.  $**p < 0.01$ , are significant. Statistical analysis was performed by ANOVA. Each point represents four repeats, each triplicate.

## 3. 사람 유래 FaDu 하인두암세포 성장억제에 의한 핵 내 형태학적 변화

세포사멸 유도에 형태학적 특성을 확인하기 위해 DNA 분절화 및 핵 내 DNA 응축을 DNA fragmentation assay 이용하여 실험을 수행하였다. FaDu 암 세포에 아데노신 1.5 mM, 3.0 mM을 처리하여 24 시간 후 세포를 수집하여



genomic DNA을 분리하여 1.2% 아가로스 겔에 전기영동하여 DNA가 분절화 되는 것을 확인한 결과 3.0 mM에서 DNA 단편이 확연하게 보이는 것을 확인하였다(Fig. 3).

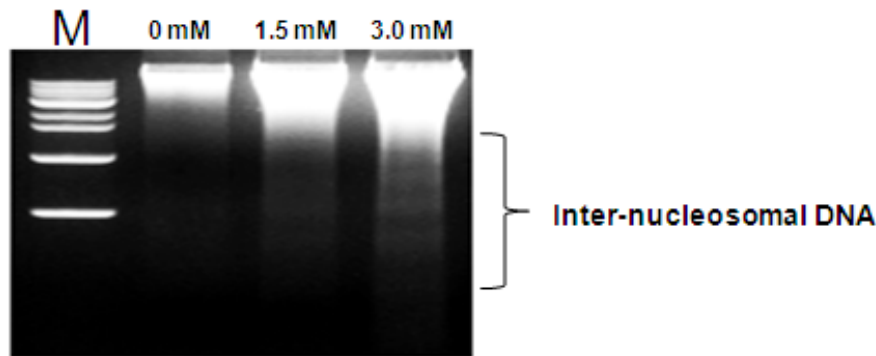
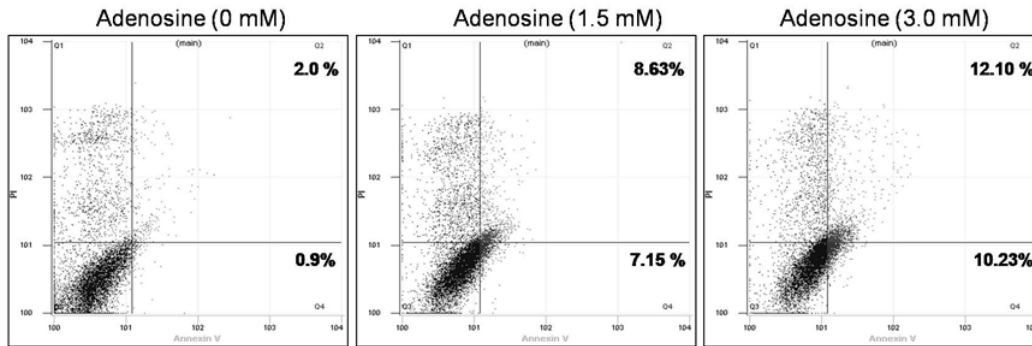


Figure 3. Fragmentation of inter-nucleosomal DNA and condensation of nuclei by adenosine in FaDu human hypopharyngeal squamous cell carcinoma. Cells were seeded at  $4 \times 10^5$  and then treated with 1.5 mM and 3.0 mM of adenosine for 24 h. Genomic DNA was subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis (A). Adenosine treated cells were stained with  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  of Hoechst solution.

#### 4. 유세포 분석을 이용하여 사람 유래 FaDu 하인두암세포 사멸

FaDu 암세포에 아데노신 1.5 mM, 3.0 mM를 24 시간 처리하여 Annexin V와 PI을 동시에 염색하여 세포사멸을 확인 한 결과 대조군 보다 아데노신을 3.0 mM 처리한 세포군에서 초기 세포사멸(lower right quadrant)이 10.14% 증가 하였으며, 후기세포사멸(upper right quadrant)은 10.10% 증가함을 확인한 결과 아데노신이 FaDu 암세포의 성장을 억제 하는데 효과가 있음을 확인하였다(Fig. 4).

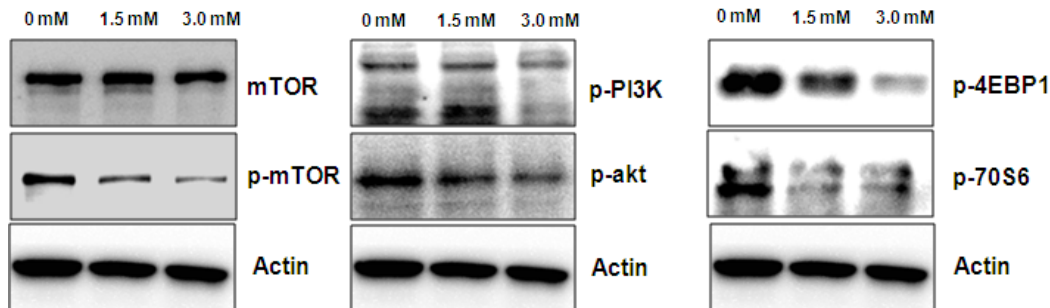


**Figure 4. Adenosine induced apoptosis in FaDu human hypopharyngeal squamous cell carcinoma.** The cells were treated with 1.5 mM and 3 mM adenosine for 24 h. The cells stained using Annexin V/PI. The apoptotic cells were then analyzed by FACS analysis. This was determined by FACS analysis showing the percentage of early (lower right quadrant) and late (upper right quadrant) apoptotic cells.

### 5. 사람 유래 FaDu 하인두암세포의 akt-mTOR 세포전달 신호기작

아데노신에 의해 암세포의 증식, 분화, 생존, 이동 및 대사에 관여하는 단백질의 조절을 담당하는 akt/mTOR 신호전달 경로에 관여하는 단백질의 인산화 발현 변화를 확인 하였다. mTOR는 세포가 외부로부터 성장에 관한 자극을 받게 되면, PI3K에 의해 세포막의 PI(phosphatidylinositol)를 인산화 시키고 이에 따라 Akt kinase가 인산화 되어 암세포를 성장시키는데 아데노신 1.0 mM에서부터 Akt와 PI3K의 단백질의 인산화 발현이 억제됨을 확인하였다. 또한 mTOR는 akt kinase에 의해 활성화된 후, 다음과 같은 경로를 통하여 mRNA의 번역에 관여하게 된다. 첫째로 mTOR는 4EBP1(Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1)을 인산화 시켜 cyclin D1의 단백질 발현을 증가시키며, 둘째로 p70 S6 kinase을 인산화 시켜 elongation factor의 mRNA를 선택적으로 증가시켜 세포의 성장과 분열을 촉진시키게 된다. 본 실험결과에서는 아데노신

1.5 mM 처리한 세포부터 4EBP1, 70S6의 단백질 인산화가 현저하게 감소함을 확인하였다(Fig.5).



**Figure 5. Adenosine inhibits mTOR activation in FaDu human hypopharyngeal squamous cell carcinoma.** Cells were treated with adenosine at indicated concentration for 24 h, phosphorylation levels of PI3K, akt, 4EBP1 and 70S6 were confirmed by western blot analysis. Actin was used as an internal control.

## 6. 사람 유래 FaDu 하인두암세포 사멸에 관여하는 caspase 의존성 단백질 발현

FaDu 암세포에서 아데노신을 처리 하였을때 암세포 성장에 관여하는 mTOR 신호전달에 관여하는 조절인자의 인산화를 억제하여 미토콘드리아 의존성 세포치사를 확인하기 위해 미토콘드리아 외막에 존재하는 세포치사 억제인자로 알려져 있는 Bcl-2 단백질 발현을 확인하였다. 아데노신을 24 시간 처리 후 미토콘드리아와 관여하는 단백질 발현을 확인하였다. 아데노신 1.5 mM과 3.0 mM에서 점차적으로 감소함을 확인하였다. 또한 세포사멸 경로의 하방에서 신호 전달의 필수적인 역할을 하는 cleaved caspase-9과 cleaved caspase-3의 발현이 증가하고 PARP의 절단이 활성화되어 세포치사를 유도하는 것을 확인하였다(Fig. 6).

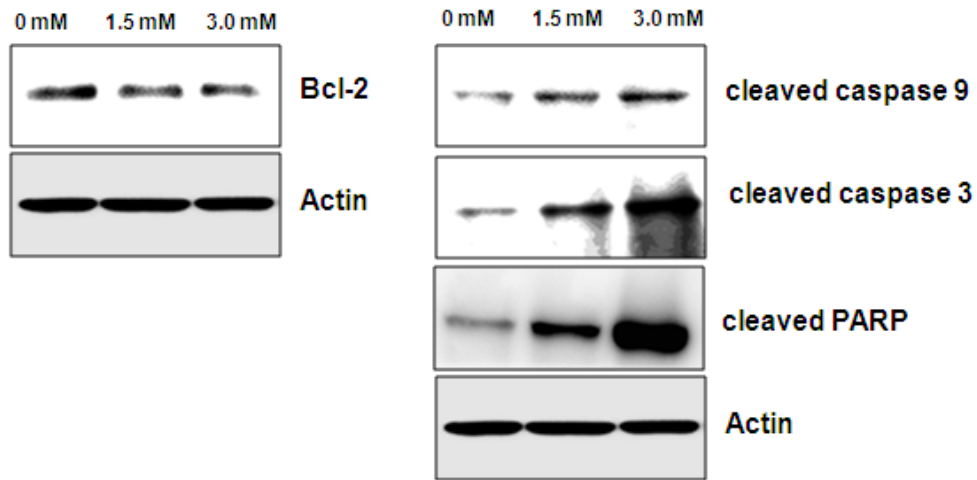


Figure 6. Activation of mitochondria related proteins by treatment of adenosine in FaDu human hypopharyngeal squamous cell carcinomas. Cells were treated with different concentrations of adenosine for an indicated time. Total proteins (50 ug) were prepared and the expressions of Bax, Bcl-2, cleaved caspase-3 and PARP proteins were analyzed using Western blot. The expression of Bcl-2 protein was significantly decreased in response to the treatment with adenosine. Actin was used as an internal control

## IV. 고 찰

최근 항암 치료제 개발은 다양한 암에서 발생에 관여하는 특정 분자를 선택하여 치료하는 분자표적치료(molecular targeted therapy)가 대두되고 있다(11). 현재 간세포암에서 세포표면 수용체와 성장인자가 결합하여 단백질을 인산화시켜 증식성 신호전달체계를 활성화시켜 핵 내로 전달하여 간암세포가 증식되어지며 이러한 신호전달체계에 관여하는 표적인자로는 표피 성장 인자(epidermal growth factor), 인슐린 성장 인자(insulin like growth factor), 혈관내피 세포 성장인자(vascular endothelial growth), 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor), 혈소판유도 성장인자(platelet-derived growth factor)등이 있으며 이러한 신호전달 인자를 표적으로 치료하는 항암제 개발이 활발히 연구되고 있다(12, 13). 또한 유방암에서는 에스트로겐 수용체 양성인 경우와 HER2/*neu* 양성인 경우에서 mTOR 억제제로 알려져 있는 라파마이신이 항암효과가 있다는 연구가 보고되었으며 akt 신호 전달 경로를 활성화시키므로 mTOR 억제제를 투여할 경우 유방암 억제에 효과가 있는 것으로 알려져 akt-mTOR 신호전달에 관여하는 표적인자를 이용하여 유방암 치료 연구가 진행되고 있다(14, 15). 고령화에 의해 증가되고 있는 두경부암 환자에 약 40-90% 정도가 상피성장인자(epidermal growth factor) receptor mRNA와 단백질이 과발현 되어 있는 것으로 보고되었고(16, 17), 이와 같은 성장인자를 표적으로 하는 항암치료 연구가 현재 진행되고 있다(18).

본 논문에서는 두경부세포암종으로 알려져 있는 사람 유래 FaDu 하인두 암세포에서 아데노신에 처리 하였을 때 세포성장이 억제됨을 유세포분석을 수행하여 확인하였다(Fig. 4). 또한 아데노신 3 mM 처리 하였을 때 세포사멸의 형태학적 특성으로 알려져 있는 DNA 분절화 현상 선명하게 나타남을 확인하였으며(Fig. 3) crystal violet 염색을 수행하여 세포병변 효과도 확인하였다(Fig. 2). 이와 같이 FaDu 하인두암세포 성장의 억제가 어떤 분자적 기전을 통하여 나타나는지 확인하기 위해 단백질 항체 발색법을 수행하였다. 아데노신을 FaDu 하인

두암세포에 처리한 후 mTOR 신호전달의 하위에 관여하는 70S6와 4EBP1의 인산화가 억제되는 것을 확인하였으며, mTOR 신호전달을 조절하는 PI3K와 akt의 인산화가 억제됨을 확인하였다(Fig. 5). 위와 같은 신호전달 기작에 의해 세포사멸에 관여하는 caspase-9, caspase-3 그리고 PARP의 활성화가 유도됨을 확인하였다(Fig. 6). 이러한 결과는 아테노신이 mTOR를 표적으로 하는 PI3K/akt 신호전달경로의 억제에 의해 FaDu 하인두암 세포성장 억제가 유도됨을 알 수 있었다. 이러한 결과는 아테노신이 기존의 항암제와 병행하여 처리 하였을때 mTOR의 저항성을 갖는 두경부암세포 치료의 새로운 장을 열 수 있을 것으로 기대된다. 그리고 아직 두경부세포암종에서 akt-mTOR의 모든 기능과 메커니즘이 정확히 규명된 것이 아니므로 이를 알아내는 연구도 진행되어야 할 것이다.

최근 식생활이 서구화 되고 고령화에 의해 현대인들에게 두경부암 발병률은 증가하는 추세를 보이고 있으며 암의 예방을 위한 연구와 이를 제대로 치료 할 수 있는 표적 치료제에 대한 연구가 더욱 필요하다고 사료된다.

## 참고문헌

1. Hopper C., Kübler A., Lewis H., Tan I.B., Putnam G. mTHPC-mediated photodynamic therapy for early oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 111, 138-146, 2004
2. Bodin I., Jäghagen EL., Isberg A. Intraoral sensation before and after radiotherapy and surgery for and pharyngeal cancer. *Head and Neck* 26, 923-929, 2004.
3. Yamachika E., Habte T., Oda D. Artemisinin: an alternative treatment for oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 24, 2153-2160, 2004.
4. Crown J., O'Leary M., Ooi WS. Docetaxel and paclitaxel in the treatment of breast cancer: a review of clinical experience. *Oncologist* 2, 24-32, 2004.
5. Datta R., Kojima H., Yoshida K., and Kufe D. Caspase-3-mediated cleavage of protein kinase C theta in induction of apoptosis. *J Biol Chem* 272, 20317-20320, 1997.
6. Ward BB. Targeted therapy in head and neck cancer. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 25(1):83-92, vi-vii. 2013.
7. Schmitz S, Ang KK, Vermorken J, Haddad R, Suarez C, Wolf GT, et al. Targeted therapies for squamous cell carcinoma of the head and neck: current knowledge and future directions. *Cancer Treat Rev*, 40(3):390-404, 2014.
8. Keysar SB, Le PN, Anderson RT, Morton JJ, Bowles DW, Paylor JJ, et al. Hedgehog signaling alters reliance on EGF receptor signaling and mediates anti-EGFR therapeutic resistance in head and neck cancer. *Cancer Res*, 73(11):3381-92, 2013.
9. Park, W., L. S. Kim, T. H. Kim, B. Park, H. Y. Park, B. J. Song, J. B. Lee, C. W. Jeon and U. Choi, *J Breast Cancer*, 12(4), 229-234, 2009.

10. Han, S. W., M. S. Lee, S. Y. Kim, G. H. Kang, Z. S. Kim, C. W. Lim, J. H. Lee, H. J. Lee, M. Oh and M. H. Lee, "The relationship between Estrogen/Progesterone receptor and expression of mTOR/pAkt proteins and the analysis of prognosis in breast cancer," *Journal of Breast Disease*, 1(1), 8-14 2013.
11. Zhang L, Castanaro C, Luan B, Yang K, Fan L, Fairhurst JL, et al. ERBB3/HER2 signaling promotes resistance to EGFR blockade in head and neck and colorectal cancer models. *Mol Cancer Ther*, 13(5):1345-55, 2014.
12. Philip PA, Mahoney MR, Allmer C, Thomas J, Pitot HC, Kim G, et al. Phase II study of Erlotinib (OSI-774) in patients with advanced hepatocellular cancer. *J Clin Oncol*, 23: 6657-63, 2005.
13. Thomas MB, Chadha R, Glover K, Wang X, Morris J, Brown T, et al. Phase 2 study of erlotinib in patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 110: 1059-67, 2007.
14. Witton CJ. Determining sensitivity to rapamycin and its analogues in breast cancer patients. *Breast Cancer Res*, 7:41-2, 2005.
15. Chan S. Targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR): a new approach to treating cancer. *Br J Cancer*, 91:1420-4, 2004.
16. Rabinowits G, Haddad RI. Overcoming resistance to EGFR inhibitor in head and neck cancer: a review of the literature. *Oral Oncol*, 48(11):1085-9, 2012.
17. Zalcman G. [EGFR pathway and mechanism of action of tyrosine kinase inhibitors]. *Rev Pneumol Clin*, 63(1 Pt 2):2S5-6 2007.
18. Lenz HJ. Anti-EGFR mechanism of action: antitumor effect and underlying cause of adverse events. *Oncology*, 20(5 Suppl 2):5-13 2006.