대한외과학회지 : 제 64 권 제 3 호
Vol. 64, No. 3, March, 2003

□ 원 저 □

Nitric Oxide에 의한 위암 세포 MKN-28의 증식에 대한 Protein Kinase C-δ의 매개 역할

동아대학교 의과대학 외과학교실, [1]생화학교실

김 형 호 · 박 기 재 · 곽 종 영[1]

Protein Kinase C-δ Mediates Nitric Oxide-induced Proliferation of Gastric Cancer Cells, MKN-28

Hyung Ho Kim, M.D.**, Ki Jae Park,** M.D. and **Jong Young Kwak,** M.D.[1]

Purpose: The purpose of this study was to investigate the effect of exogenous nitric oxide (NO) on the proliferation of gastric carcinoma cells and the signaling pathways that regulate these responses.
Methods: MKN-28 cells were obtained from the Korean Cell Line Bank (KCLB) and maintained in DMEM culture media. The effect of sodium nitroprusside (SNP), a NO donor, on the proliferation of a serum-starved gastric carcinoma cell line, MKN-28, was examined by [^{3}H]thymidine incorporation. Western blot was performed to analyze the translocation of protein kinase C (PKC)-δ from the cytosol to the plasma membrane of the MKN-28 cells.
Results: The proliferation of MKN-28 cells was significantly increased by SNP. It was also found that the proliferation was significantly inhibited by the protein kinase A (PKA) inhibitor, KT5720, and the protein kinase G inhibitor (PKG), KT5823, in SNP-treated cells. The SNP-induced proliferation was also inhibited by the PKC-δ specific inhibitor, rottlerin (1μM), but was increased by the PKC-β inhibitor, Go6976 (1μM). The amount of translocated PKC-δ protein in the plasma membrane from the cytosol increased time-dependently after treating the cells with SNP, suggesting that NO activates PKC-δ. Anti-inflammatory drugs, including dexamethasone, aspirin, indomethacin, mephenamic acid, and acetaminophen inhibited the SNP-induced proliferation of the cells and blocked of PKC-δ activation.
Conclusion: NO stimulates the proliferation of serum-starved gastric cancer cells. The NO-induced proliferation may be mediated by PKC-δ. The inhibitory effect of anti-inflammatory drugs on cell proliferation may be related to the inhibition of PKC-δ activity. **(J Korean Surg Soc 2003;64:194-200)**

Key Words: Gastric carcinoma, MKN-28 cell, Nitric oxide, Protein kinase C-δ
중심 단어: 위암, MKN-28 세포, 산화질소, 단백질인산화 효소 C-δ

Departments of Surgery and [1]Biochemistry, Dong-A University College of Medicine, Busan, Korea

책임저자 : 김형호, 부산광역시 서구 동대신동 3가 1번지
㉾ 602-103, 동아대학교 의과대학 외과학교실
Tel: 051-240-5146(7), Fax: 051-247-9316
E-mail: hhkim@daunet.donga.ac.kr

접수일 : 2002년 10월 1일, 게재승인일 : 2002년 11월 26일
이 논문은 1999학년도 동아대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

서 론

위암은 가장 빈도가 높은 암 중의 하나로 한국인 암 환자에서 위암에 의한 사망이 약 24%로 보고되고 있다.(*1*) 위암을 유발하는 여러 인자들을 밝히려는 많은 연구가 진행되고 있는데 그중 활성 산소종이나 nitric oxide (NO)가 암을 유발하는 중요한 인자라는 것이 제안되고 있다. NO가 암 유발인자로서의 작용은 nitrosamine의 형성, DNA 손상 유발, 만성 염증과 연관된 조직 손상으로 알려져 있다.(*2-4*)

NO는 Nitric oxide synthase (NOS)에 의하여 기질인 알기닌에서 생성되어 신경전달 물질로 작용하거나 혈관 확장 및 점막의 면역에 관여하는 물질이다. NO는 혈관내피 세포의 성장을 유도하며 항종양 면역 반응을 억제함으로써 종양의 성장을 촉진한다고 알려져 있다.(*5,6*) 종양의 생성과 성장에서 NO의 역할은 아직 명확하지는 않으나 위암의 경우에는 유익하거나 유해한 영향을 모두 나타내는 것으로 보고 있다.(*7*) 최근, 위암 조직에서는 NOS의 활성이 정상조직보다 증가되어 있다고 보고되었으며(*8*) 종양 부위에는 대식세포와 같은 면역세포의 침윤이 동반되는데 특히, 위암에서는 *Helicobacter pylori*의 감염과 함께 단핵구의 침윤이 증가되고 세포가 활성화되어 NO의 생성이 증가되고 암의 발생과 연관이 있을 것으로 제안되었다.(*9,10*) 그러나 백혈

구 세포들의 활성화에 의하여 생성되는 NO가 위암의 발생에 관여한다고 제안됨으로써 위암 발생에서 NO의 역할을 조사하는 것이 중요한데 아직까지 NO가 직접적으로 위암 세포의 증식에 어떠한 영향을 미치는 가는 연구된 바가 없다.

위장관의 암세포주에서 프로스타글란딘 생성에 관여하는 효소인 cyclooxygenase-2 (Cox-2)의 억제제를 투여하면 Cox-2발현이 높은 세포주에서만 세포의 증식이 억제된다는 실험 결과는 이 단백질에서 생성되는 물질이 암세포의 증식에 관여한다는 것을 시사한다.(*11*) 실험 동물에서 아스피린, 인도메타신 및 설린닥과 같은 항염증 약물은 화학물질에 의한 대장암의 발생을 억제하였다.(*12*) 이와 유사하게 식도나 위암에서도 아스피린의 사용은 치사율을 줄이지만 위장관 이외의 암에서는 큰 효과가 없다고 보고함으로써 위장관의 암의 발생에 프로스타글란딘의 생성이 중요하다는 것이 제시되고 있다.(*13*) 덱사메타손이나 아스피린이 inducible NOS (iNOS)의 발현을 억제할 뿐만 아니라 NO의 생성도 억제한다는 결과는 프로스타글란딘이나 Cox가 NO의 작용에 연관되어 있다는 사실을 제시하고 있다.(*14,15*) 그러나 아직까지 항염증 약물이 어떠한 작용을 통하여 세포의 증식에 영향을 주는가는 연구된 바가 없다.

본 연구에서는 위암세포 내 생성된 NO 세포 증식에 직접적으로 영향을 미치는가를 조사하고 어떠한 신호전달 경로가 관여하며 그에 대한 항염증 약물의 효과를 조사하였다.

방 법

1) MKN-28 세포배양

위암세포주 MKN-28세포는 한국세포주은행(KCLB)으로부터 구입하여 배양하였다. Dulbeco's modified eagles medium (DMEM)에 10% 소혈청, 100 U/ml 페니실린, 100 U/ml 스트렙토마이신 및 10 mM sodium bicarbonate를 첨가하였다. 100 mm 원형플라스크에 2.5×10^5 cells/cm^2의 세포를 분주하고 상기의 DMEM 배양액에 실험에 필요한 시약을 첨가한 다음 5% CO_2와 37°C하에서 배양하였다. 세포는 3~4일마다 계대 배양하고 계대 배양 5일 후에 250μM sodium nitroprusside (SNP) 등의 약물을 처리하였다. 약물을 투여한 다음 2시간 후부터 24시간 동안 배양하였다. 일부 실험에서는 약물처리 12시간 전에 소혈청이 들어 있지 않은 배양액으로 처리한 다음 약물을 처리하였다. 배양된 세포가 들어 있는 플라스크는 인산염 완충액(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na_2HPO_4, 및 1.4 mM KH_2PO_4, pH 7.3)으로 3회 세척하고 2 ml의 trypsin/EDTA를 넣고 5분간 처리하여 세포를 분리한 다음 여기에 10 ml의 인산염완충액을 넣고 800×g에서 10분간 원심분리하여 세포를 분리하였다.

2) 세포막성분과 세포질의 분리

약물 처리한 세포를 인산염완충액으로 세척한 다음 단백질 분해효소 억제제가 첨가된 세포용해완충액(50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4)에서 초음파 세포분쇄기(W380 Ultrasonic processing, USA)를 이용하여 10초간 분쇄하였다. 파괴된 세포를 함유하는 용액을 4°C 상태에서 Eppendorf microfuge를 이용하여 16,000×g로 10분간 원심분리하여 핵 성분 및 파괴되지 않은 세포 등을 침전시키고 상층액을 얻었다. 상층액을 30%/50% sucrose 용액에 얹고 55,000 rpm에서 20분간 원심분리(Table top ultracentrifuge, Beckman, USA)하여 세포막과 세포질 성분을 분리하였다. 단백질 양을 측정한 다음 전기영동에 이용하였다.

3) 세포증식: [^{3}H] thymidine incorporation assay

세포의 증식을 측정하기 위하여 24 well 플레이트에 MKN-28세포를 5×10^4이 되도록 분주시키고 300μl의 배양액을 첨가하였다. 세포를 배양한 다음 혈청이 들어있지 않은 배양액으로 바꾸어서 다시 24시간을 배양하였다. 각각의 세포에 1μCi의 [^{3}H]thymidine을 넣고 NO 생성을 증가시키는 SNP를 포함한 여러 검사 물질을 투여한 뒤 24시간 동안 배양하였다. 세포를 처리한 후 인산염완충액으로 2회 세척하고 5% trichloroacetic acid를 500μl 첨가하여 다시 세척한 후 1N NaOH를 500μl 넣고 37°C에서 1시간 동안 방치하여 세포를 용해시킨다. 여기에 500μl의 1N HCl을 가하여 중화시킨 후 5 ml의 scintillation cocktail용액을 넣고 Scintilla tion counter (Beckman, USA)에서 cpm을 측정하였다.

4) 효소 단백질 발현의 측정

전기영동 및 Western blot 세포막 및 세포질에서의 PKC-δ의 단백질 양을 보기 위하여 전기영동을 한 다음 Western blot을 시행하였다. 전기영동은 10% 폴리아크릴아마이드 겔을 사용하였다. 30 mA에서 1시간 동안 전기영동 후 겔의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 전이시켰다. 전이 후 nitrocellulose membrane을 10 mM Tris HCl, 0.15 M NaCl, 0.1% sodium azide로 구성된 완충액에 5% 탈지분유를 포함하는 블록완충액으로 1시간 처리하였다. 1차 항원-항체결합에 사용하는 항체는 1: 1000으로 블록완충액에 희석하여 실온에서 12시간 이상 반응시켰다. Santa-Cruz사(California USA)에서 제작한 PKC-δ에 대한 토끼항체를 1차 항원으로 본 실험에서 사용하였다. 2차 항체로는 horse-radish peroxidase가 결합된 항체를 사용하여 실온에서 1시간 동안 반응시키고 블록완충액으로 15분간 3회 세척한 다음 ECL방법으로 전개시켰다.(*16*)

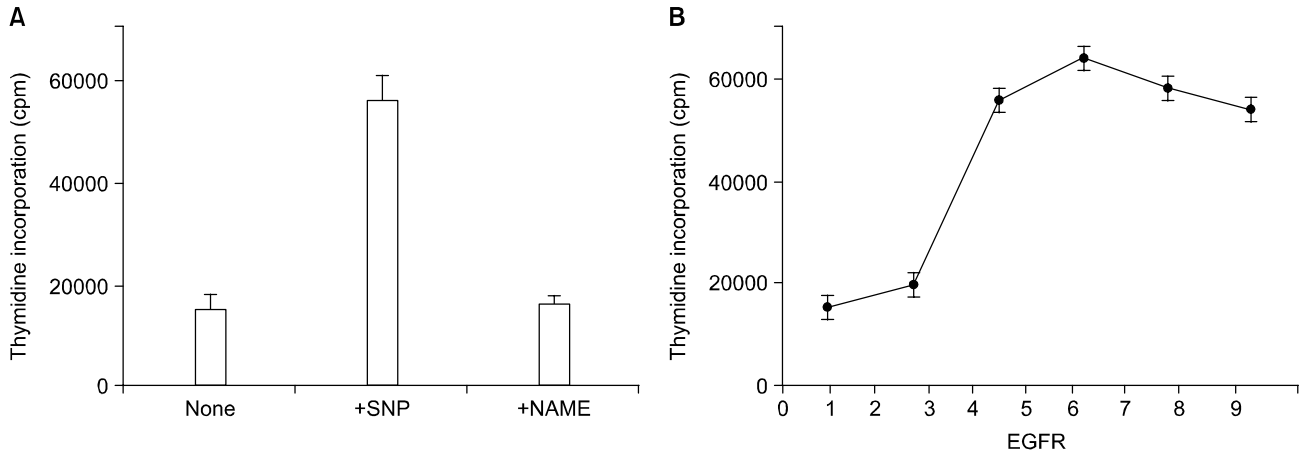

Fig. 1. Effects of NO on the proliferation of MKN-28 cells. (A) MKN-28 cells (5×10^4) were treated with 500μM L-NAME and 250μM sodium nitroprusside (SNP). After 36 hr, cells were harvested and [^{3}H]thymidine incorporation was measured, as described in Materials and Methods. (B) MNK-28 cells were treated with 250μM sodium nitroprusside for indicating times. The results are average values±S.E. of three independent experiments (each performed in triplicate).

결 과

1) NO ㅣ의한 위암 세포주의 증식

MKN-28 세포를 250μM 농도의 SNP로 24시간 처리한 후 세포 내로 thymidine이 흡수되는 정도로서 세포 증식을 측정하였다. Fig. 1에서와 같이 SNP를 처리한 세포에서는 약물을 처리하지 않은 세포와 비교하여 현저하게 세포증식이 증가하는 것으로 나타났다. SNP를 처리한 후 24시간 동안에는 큰 영향이 없는 것으로 나타났으나 36시간에서 세포 증식이 급격히 증가하였고 48시간 이후에는 더 이상의 증가는 없었다(Fig. 1B). 이는 배양 상태에서 세포의 밀도가 급격히 증가한 것으로 생각된다. 이와 비교하여 세포 내 NO와 결합하여 NO의 생성을 억제하는 약물인 NAME는 세포 증식에는 큰 영향을 주지 못하였다. 이러한 결과들은 NO에 의하여 MKN-28 위암 세포주는 증식이 촉진된다는 것을 일 수 있다.

2) NO에 의한 위암 세포주의 증식에 관여하는 인산화 효소

여러 세포들의 증식에는 인산화 효소가 관여한다. 따라서 본 연구에서는 MKN-28세포에서 NO에 의한 세포증식은 어떠한 인산화 효소의 활성화에 의하여 일어나는가를 조사하였다. Fig. 2에서와 같이 여러 가지의 인산화 효소의 억제제들을 전처리하고 SNP를 36시간 처리하였다. Tyrosine kinase 억제제(Genistein), extracellar signal-regulated kinase (ERK) 억제제(PD98059), p38-mitogen activated protein kinase (p38-MAPK)의 억제제(SB203580) 및 phosphoinositid 3-kinase (PI3-K)의 억제제(LY294002)는 SNP에 의한 세포의 증식을 억제하지 못하였다. PKC 억제제들 중에서 PKC-α의 억제제인 Go6976은 SNP의 효과를 억제하지 못하였으나 PKC-δ 억제제인 rottlerin은 SNP에 의한 세포 증식을 현저히 감소시켰다. 또한 PKA나 PKG가 어떠한 영향이 있는가를 조사하였을 때 이들 효소의 억제제들에 의하여 세포증식은 억제되었는데 PKA 억제제가 더욱 큰 효과를 나타내었다. 이들 결과는 NO에 의한 위암 세포의 증식은 PKA,

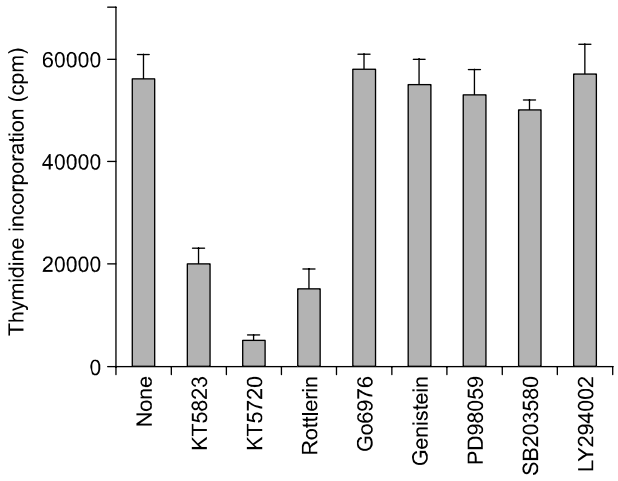

Fig. 2. Effect of protein kinase inhibitors on sodium nitroprusside--induced proliferation of MKN-28 cells. MKN-28 cells were pre-treated with various inhibitors for 1 hr and incubated for 36 hrs with 250μM sodium nitroprusside at 37°C. The following concentrations of the inhibitors were used: KT5823 1μM, KT5720 1μM, Rottlerin 5μM, Go6976 10 nM, Genistein 1μM, PD98059 10μM, SB203580 10μM, and LY294002 1μM. The results are average values±S.E. from three independent experiments.

PKG 및 PKC-δ를 활성화하여 일어난다는 것을 제시하고 있다.

3) NO에 의한 위암 세포의 증식에 대한 항염증 약물의 효과

항염증 약물은 위장관계의 암의 성장을 억제함으로써 암의 치료제로서의 가능성을 제시하였으나 그 작용 기전은 아직 충분히 밝혀지지 않았다. 본 연구에서는 NO에 의한 세포 증식에서 항염증 약물이 어떠한 영향을 주는가를 조사하였다. Fig. 3에서와 같이 아스피린, 덱사메타손, 인도메타신, 메페나믹산 및 아세트아미노펜을 각각 0.1 mM의 농도로 전처리하였을 때 SNP에 의한 thymidine의 흡수량은 현저히 감소하였다. 이들 약물 중에서 인도메타신과 메페나믹산이 가장 큰 억제효과를 나타내었고 덱사메타손은 다른 약물에 비교하여 효과가 적었으나 처리하지 않은 세포보다는 세포증식을 감소시켰다. SNP를 첨가하지 않고 이들 약물을 단독으로 36시간 처리하였을 때 세포증식에는 아무런 영향이 없음을 관찰하였다. 따라서 이들 결과는 항염증 약물의 위암 세포증식의 억제는 NO에 의한 영향을 봉쇄함으로써 일어난다는 것을 제시하고 있다.

4) PKC-δ 활성에 대한 NO의 영향과 항염증 약물의 효과

MKN-28 세포에서 NO에 의하여 PKC-δ가 활성화되는가를 조사하였는데 활성화되는 정도는 PKC-δ가 세포질에서 세포막으로 전이되는 정도를 Western blot으로 측정하였다. 250μM 농도의 SNP를 30분간 처리하였을 때 세포질에 나타나는 PKC-δ는 현저히 감소하였으며 세포막 성분에서 단백질 양이 증가하여 나타났다(Fig. 4). 이러한 결과는 SNP에 의하여 PKC-δ가 활성화된다는 것을 보여주고 있다. 같은 농도의 SNP는 처리 10분에서 PKC-δ의 전이를 촉진하였으며 1시간까지 지속하였다(결과 미제시). SNP의 효과가 PKC-δ에 특이적인가를 확인하기 위하여 억제제인 rottlerin을 전처리하였을 때 PKC-δ의 전이는 현저히 감소하였고 PKC-β의 억제제인 Go6976은 영향이 없었다.

다음으로 항염증 약물이 NO에 의한 증식을 억제하는 것이 PKC-δ에 영향을 미쳐서 일어나는가를 조사하였다. Fig. 5에서와 같이 항염증 약물들 중에서 인도메타신과 메페나믹산은 PKC-δ의 전이를 현저히 억제하였으나 아스피린이

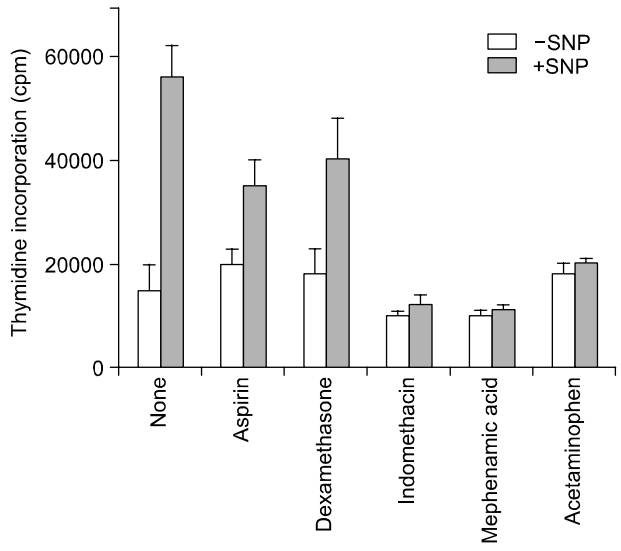

Fig. 3. Effect of anti-inflammatory compounds on sodium nitroprusside(SNP)-induced proliferation of MKN-28 cells. Cells were pre-treated with 10^{-4} M Aspirin, dexamethasone, indomethacin, mephenamic acid, and acetaminophen for 1 hr and incubated for 36 hrs in the presence or absence of 250μM sodium nitroprusside at 37°C. The results are average values±S.E. from three independent experiments.

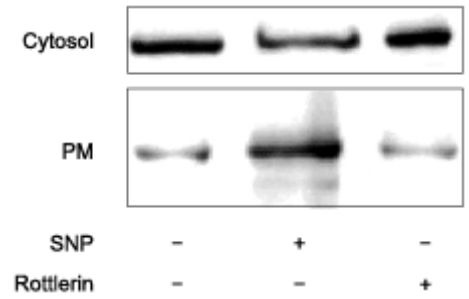

Fig. 4. Western blot analysis for sodium nitroprusside (SNP)-induced activation of PKC-δ in MKN-28 cells. Cells (1×10^7) were incubated in serum-free medium for 36 hrs and then exposed to 250μM sodium nitroprusside for 30 min. The cells were pre-treated with 5μM of rottlerin before the addition of sodium nitroprusside. Plasma membranes (PM) and cytosol were isolated as described in Materials and Methods. Figures represent the results of one of three similar experiments.

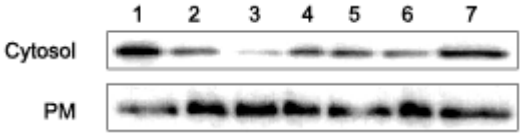

Fig. 5. Effect of anti-inflammatory compounds on PKC-δ activation induced by sodium nitroprusside. MKN-28 cells were cultured for 24 hrs in serum-free medium. Cells (1×10^7) were pre-treated for 10 min with various anti-inflammtory compounds as in Fig. 3; 1; control, 2; +SNP, 3; +SNP +aspirin, 4; +SNP +dexamethasone, 5; +SNP +indomethacin, 6; +SNP +mephenamic acid, 7; +SNP +acetaminophen. The cells were further incubated for 30 min with sodium nitroprusside.

나 덱사메타손은 영향이 미미하였다. 따라서 이들 결과로부터 항염증 약물에 의한 세포증식 억제 정도와 같은 경향을 보임으로써 항염증 약물의 작용은 PKC-δ의 활성 억제를 통하여 일어날 것으로 추측할 수 있다.

고 찰

암의 생성과 성장에서 NO의 역할은 두 가지의 가능성이 있다. 즉, NO에 의한 세포사망이 증가하여 암의 성장이 억제되거나 NO에 의한 혈관 생성이나 세포 증식에 영향을 주어서 성장이 촉진되는 경우이다. 비록 면역세포에서 생성되는 NO에 의하여 위암 세포의 증식이 억제될 것이라고 추측할 수 있으나 본 연구결과에서 보면 높은 농도의 NO가 생성되는 것은 오히려 암세포의 증식을 촉진한다는 것을 보여주고 있다. 또한, NO는 위암 세포의 증식을 촉진하거나 혈관신생을 유도함으로써 종양의 크기를 더욱 증가시킬 가능성이 있으므로 NO의 생성조절이 위암의 진행을 막는 치료의 대상이 될 수 있다. 특히, 본 연구에서는 항염증 약물들이 NO에 의한 위암의 증식을 억제한다는 사실을 밝혀냄으로써 이들 약물의 치료효과가 최소한 NO의 억제에 의한다는 것을 알 수 있다.

다른 연구자의 조직 면역법을 이용한 결과에서 보면 위암 조직에서는 정상 조직에서보다 NOS의 발현이 감소되어 있다고 보고하였으나,(*17*) 또 다른 연구자에 의한 결과는 위암 조직에서 NOS의 활성은 정상조직에서보다 증가되어 있다고 하였는데(*8*) 이들의 연구 결과는 본 연구 결과와 비교하여 NO가 암 세포의 증식에 관여한다는 것을 시사하고 있다. MKN-28세포에서 eNOS는 Western blot에서 나타났으나 iNOS나 neuronal NOS (nNOS)는 측정되지 않았다(결과 미제시). 위암 조직의 선 상피세포에서는 iNOS의 발현이 정상 조직보다도 현저히 증가되어 있다고 보고되었으나,(*8*) MKN-28세포에서는 iNOS의 발현은 Western blot으로 검출되지 않았으며 SNP에 의하여도 발현되지는 않았다. 비록 위암 세포의 증식을 촉진하는 NO가 어떤 세포로부터 유래되는가는 아직 밝히지 못하였으나 그 유래와는 관계없이 위암 세포내의 증가된 NO는 암세포의 증식을 촉진한다는 사실을 알 수 있다.

Holian 등(*18*)은 SNU-1의 위암 세포주를 사용하여 SNP를 투여하였을 때 세포 증식은 오히려 억제된다고 하였다. 이러한 억제 현상은 세포 내 생성된 활성 산소종과 NO가 결합함으로써 활성 산소종에 의한 세포증식을 억제한다고 제안하였다. 이들 결과는 본 연구 결과와는 상반되는 것으로서 어떠한 원인에 의한 것인지는 확인할 수 없지만 본 연구에서도 소혈청이 10%가 첨가된 배양액에 SNP를 투여하였을 때는 위암 세포의 증식은 약간 감소하거나 큰 차이가 없었으며 세포를 혈청이 들어 있지 않은 상태로 24시간 이상 배양 후 SNP를 처리하여 36시간 후부터 세포 증식이 현저히 증가함을 관찰하였다(Fig. 1). 따라서 실험적 조건의 차이점 때문이라고 추측하고 있으며 혈청에 포함된 여러 세포증식에 관여하는 인자를 제거한 상태에서는 위암 세포는 NO에 의하여 세포 증식이 현저히 증가한다는 사실을 밝혔다.

PKC는 여러 종류의 아이소엔자임으로 구성되어 있으며 각각은 세포 증식에 다른 신호전달의 역할을 한다고 알려져 있으나 암 세포에서 그들의 작용은 세포의 종류마다 다르고 서로 작용하는 인자들이 복잡하다.(*19*) PKC-δ를 과발현시킨 세포들을 이용한 실험에서는 세포 성장은 주로 증가하는 것으로 알려져 있으나,(*20*) 본 연구 결과에서는 NO에 의한 세포증식은 PKC-δ의 특이적인 억제제인 rottlerin에 의하여 억제되었으나 PKC-β 억제제인 Go6976에 의하여는 영향을 받지 않았고 SNP를 처리한 세포에서 PKC-δ가 세포질로부터 세포막 성분으로의 전이가 증가되는 것으로 보아 PKC-δ의 활성화가 위암 세포의 증식에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있다. 대식세포에서는 NO에 의하여 PKC-δ의 발현이 감소한다고 보고되었으나,(*21*) 본 연구에서는 SNP가 PKC-δ의 발현에는 아무런 영향을 미치지 못하였다(결과 미제시). 본 연구 결과로부터 NO 생성을 억제시키는 물질이나 PKC-δ의 억제제가 위암에서 NO에 의한 암 발생을 억제할 수 있는 물질이 될 수 있음을 알 수 있다. 앞으로 다른 세포에서와는 다르게 PKC-δ가 세포증식을 증가시키는 작용기전은 더욱 연구하여야 할 것이다.

NO에 의한 세포 증식은 PKA나 PKG의 억제제에 의하여 감소하였는데 이는 NO나 cGMP가 세포증식을 촉진할 수 있는 것은 세포 내에서 PKA와 PKG는 같은 기질을 인산화시킬 수 있기 때문에 cGMP가 PKG뿐만 아니라 PKA도 교차 활성화할 수 있기 때문으로 생각할 수 있다.(*22*) 그러나 본 연구에서 PKA와 PKC를 활성화시키는 약물인 dibutyryl cAMP나 dibutyryl cGMP를 투여하였을 때 세포 증식은 증가하지 않았다. 이러한 결과는 PKA나 PKG를 단독으로 직접 활성화시키는 것이 세포 증식에는 충분하지 않다는 것으로 추측된다. 또한 프로스타글란딘 E1을 투여하였을 때도 세포증식은 증가하지 않았다. 하나의 가능성으로는 PKC 효소 자체도 인산화에 의하여 활성의 조절을 받는데 위암 세포에서도 NO에 의한 PKA나 PKG의 활성에 의한 PKC-δ의 활성화가 일어날 가능성도 추측할 수 있으나 아직 증명되지는 못하였다.

프로스타글란딘의 생성은 아라키돈산에서 Cox의 작용에 의해 이루어지는데 Cox-1과 Cox-2의 두 종류가 있다. Cox-2가 암의 성장에 관여하는 기전으로 제기되는 것은 생성된 프로스타노이드가 성장과 분화, 면역억제 및 혈관신생에 관여하는 것과 관련이 있다고 생각하고 있다.(*23*,*24*) 항염증 약물은 여러 암에서 예후를 좋게 한다는 보고가 있으나 그 기전은 밝혀져 있지 않다.(*23*,*24*) 아스피린이 대장암 세포의 세포사멸을 증가시킴으로써 종양의 성장을 억제한다는 가

능성도 제기되었지만,(25) 본 저자들이 DNA를 propidium iodide로 염색하여 FACS으로 조사한 경우 세포사멸은 증가되지 않았다. 따라서 NO에 의한 세포증식에 대한 아스피린 등의 항염증 약물의 억제는 세포사멸의 유도 때문은 아닌 것으로 추측할 수 있다. 또한, 항염증 약물들은 SNP에 의한 nitrite의 생성에 아무런 변화를 주지 않았는데 이러한 결과는 이들 약물 자체가 SNP에 의한 NO의 생성에 영향을 주지는 않는다는 것을 알 수 있다(결과 미제시). NO는 Cox의 활성을 조절하는 것으로 알려져 있다.(26) 그러나 본 연구에서는 SNP를 투여한 위암 세포에서 Cox-2의 발현은 변화가 없다는 것을 Western blot으로 확인하였다. 비록 프로스타그란딘을 투여하였을 때 세포 증식은 일어나지 않았지만 항염증 약물은 NO에 의한 세포증식이나 PKC-δ의 활성화를 억제한다는 것을 본 연구에서 밝혔다. 따라서 항염증 약물의 작용은 프로스타글란딘의 생성을 억제하여 나타내지만 그 이외의 작용도 가진다는 것을 시사한다. 이와 유사한 결과로는 대장암 세포의 증식에서 아스피린 등의 항염증 약물이 세포증식을 억제시켰으나 Cox-비의존적으로 일어난다고 보고된 바 있다.(27)

결 론

이 연구에서 저자들은 위암 세포주 MKN-28 세포에서 NO의 생성 물질인 SNP에 의하여 세포증식이 촉진된다는 것을 밝혔다. NO에 의한 세포 증식은 PKC-δ, PKA 및 PKG의 활성을 통하여 일어나며 항염증 약물에 의하여 NO에 의한 세포 증식과 PKC-δ의 활성은 억제된다는 것을 알았다. 따라서 본 연구에서는 NO에 의한 위암세포의 증식에 대한 기전의 일부를 밝혔으며 이를 기초로 하여 NO의 생성을 억제하는 약물들을 위암의 성장을 억제하는 치료제로서의 개발할 가능성을 제시하였다.

REFERENCES

1) National cancer center: Cancer statistics in Korea. 2000
2) Liew FY, Cox FEG. Nonspecific defense mechanism: the role of nitric oxide. Immunol Today 1991;12:A17-A21.
3) Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox- activated forms. Science 1992;258:1898-902.
4) Ohshima H, Bartsch H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. Mutat Res 1994;305:253-64.
5) Jenkins DC, Charles IG, Thomsen LL, Moss DW, Holmes LS, Baylis SA, et al. Roles of nitric oxide in tumor growth. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:4392-6.
6) Morisaki T, Katano M, Ikubo A, Anan K, Nakamura M, Nakamura K, et al. Immunosuppressive cytokines (IL-10, TGF-β) genes expression in human gastric carcinoma tissues. J Surg Oncol 1996;63:234-9.
7) Papapetropoulos A, Desai KM, Rudic RD, Mayer B, Zhang R, Ruiz-Torres MP, et al. Nitric oxide synthase inhibitors attenuate transforming-growth-factor-β 1-stimulated capillary organization in vitro. Am J Pathol 1997;150:1835-44.
8) Koh E, Noh SH, Lee YD, Lee HY, Han JW, Lee HW, et al. Differential expression of nitric oxide synthase in human stomach cancer. Cancer Lett 1999;146:173-80.
9) Billiar TR. Nitric oxide. Novel biology with clinical relevance. Ann Surg 1995;221:339-49.
10) Goto T, Haruma K, Kitadai Y, Ito M, Yoshihara M, Sumii K, et al. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in gastric mucosa of gastric cancer patients. Clin Cancer Res 1999;5:1411-5.
11) Tsuji S, Kawano S, Sawaoka H, Takei Y, Kobayashi I, Nagano K, et al. Evidences for involvement of cyclooxygenase-2 in proliferation of two gastrointestinal cancer cell lines. Prostaglandins Leuko Essent Fatty acids 1996;55:179-83.
12) Arber N, DuBois RN. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and prevention of colorectal cancer. Curr Gastroenterol Rep 1999;1:441-8.
13) Thun MJ, Namboodiri MM, Calle EE, Flanders WD, Heath CW Jr. Aspirin use and risk of fatal cancer. Cancer Res 1993; 53:1322-7.
14) Dudek RR, Wildhirt S, Pinto V, Giesler G, Bing RJ. Dexamethasone inhibits the expression of an inducible nitric oxide synthase in infarcted rabbit myocardium. Biochem Biophys Res Commun 1994;202:1120-6.
15) Kwon G, Hill JR, Corbett JA, McDaniel ML. Effects of aspirin on nitric oxide formation and de novo protein synthesis by RINm5F cells and rat islets. Mol Pharmacol 1997;52:398-405.
16) Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Smith JA, Seidman JG, et al. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York
17) Rajnakova A, Goh PM, Chan ST, Ngoi SS, Alponat A, Moochhala S. Expression of differential nitric oxide synthase isoforms in human normal gastric mucosa and gastric cancer tissue. Carcinogenesis 1997;18:1841-5.
18) Holian O, Wahid S, Atten MJ, Attar BM. Inhibition of gastric cancer cell proliferation by resveratrol: role of nitric oxide. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2002;282:G809-16.
19) Hofmann J. Modulation of protein kinase C in antitumor treatment. Rev Physiol Biochem Pharmacol 2001;142:1-96.
20) Gschwendt M. Protein kinase Cδ. Eur J Biochem 1999; 259:555-64.
21) Jun CD, Choi BM, Lee SY, Kang SS, Kim HM, Chung HT. Nitric oxide inhibits the expression of protein kinase Cδ gene in the murine peritoneal macrophages. Biochem Biophys Res Commun 1994;204:105-11.
22) Cornwell TL, Arnold E, Boerth NJ, Lincoln TM. Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. Am J Physiol

1994;267:C1405-13.
23) Shiff SJ, Rigas B. Nonsteriodal anti-inflammatory drugs and colorectal cancer: Evolving concepts of their chemopreventive actions. Gastroenterology 1997;113:1992-8.
24) Smalley W, DuBois RN. Colorectal cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Adv Pharmacol 1997;39:1-20.
25) Qiao L, Hanif R, Sphicas E, Shiff SJ, Rigas B. Effect of aspirin on induction of apoptosis in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. Biochem Pharmacol 1998;55:53-64.
26) Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:7240-4.
27) Hanif R, Pittas A, Feng Y, Koutsos MI, Qiao L, Staiano-Coico L, 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 1996;52:237-45.