대한외과학회지 : 제 64 권 제 5 호
Vol. 64, No. 5, May, 2003

□ 원 저 □

췌장 및 담도계 암세포주에서 가스트린과 콜레시스토키닌이 종양성장에 미치는 효과

서울대학교 의과대학 [1]외과학교실, [2]암연구소 한국 세포주 은행, [3]국립암센터

장진영[1] · 김선회[1] · 윤유석[1] · 구자록[2] · 박용현[1] · 박재갑[1,2,3]

The Effect of Gastrin and Cholecystokinin on the Growth of Pancreato-biliary Cancer Cell Lines

Jin-Young Jang, M.D.[1], **Sun-Whe Kim,** M.D.[1], **Yoo-Seok Yoon,** M.D.[1], **Ja-Lok Ku,** Ph.D.[2], **Yong-Hyun Park,** M.D.[1] and **Jae-Gahb Park,** M.D.[1,2,3]

Purpose: Gastrin and cholecystokinin (CCK) have been reported to play a role in the development and growth stimulation of gastrointestinal cancers including pancreatic cancer.
Methods: We investigated the effects of gastrin and CCK on the growth of pancreatic and biliary tract cancer cell lines established at the Cancer Research Institute of Seoul National University College of Medicine, using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and slot blot hybridization, to examine the expressions of hormonal receptors in these cell lines.
Results: Of the six biliary tract, and five pancreatic, cancer cell lines, SNU-308 showed a growth stimulated effect due to gastrin-17, as did SNU-478 to both gastrin-17 and CCK-8. The trophic effect of these two hormones was completely blocked by specific antagonists (L-365,260 for gastrin and L-364,718 for CCK). The other cell lines did not respond to either the gastrin or the CCK. From the RT-PCR, the presence of the CCK-A receptor and the CCK-B/gastrin receptor mRNA was detected in all the biliary and pancreatic cancer cell lines. From the slot blot hybridization, although the cell lines that responded to the hormones showed high level of expression for receptor mRNA, so did some of those not responding to the hormones.
Conclusion: This study suggests that gastrin and CCK exert a trophic action on some biliary tract cancers due to their specific receptors. However, further studies investigating the functional and structural variation among these receptors, in relation to their subtypes and mutation/polymorphism are requisite prior to their clinical usage for adjunctive hormonal or antihormonal therapy can be recommended. **(J Korean Surg Soc 2003;64:408-417)**

Key Words: Bile duct cancer, Gallbladder cancer, Pancreatic cancer, Gastrin, Cholecystokinin
중심 단어: 담도암, 담낭암, 췌장암, 가스트린, 콜레시스토키닌

[1]Department of Surgery, [2]Laboratory of Cell Biology, Korean Cell Line Bank, Cancer Research Institute, Seoul National University College of Medicine, Seoul, [3]National Cancer Center, Gyeonggi, Korea

서 론

췌장암 및 팽대부 주위암은 종양의 위치상 주변 인접 혈관내지 각종 장기에 근접하고 있어 진단 당시 근치적 절제가 불가능할 정도의 진행성 병변일 때 발견되는 경우가 흔하고, 절제가 이루어진다고 하여도 대개 5년 생존율이 췌장암의 경우 10% 내외, 다른 팽대부 주위암의 경우 15~35% 정도로 보고되고 있어 치료 성적을 높이려고 수술과 함께 항암 치료 및 방사선 치료를 병행하고 있다. 하지만, 아직까지 이런 보조적 치료에 의한 생존율의 뚜렷한 증가는 없는 실정으로 근치적 수술요법과 함께 생존율을 향상시킬 수 있는 새로운 보조 요법의 개발이 절실한 상황이다. 따라서 최근에는 새로운 항암제의 개발 외에도 유전자 요법 등 종양의 생물학적인 특성을 고려하여 치료에 응용하려는 노력들이 계속되고 있다.(*1,2*) 이 중의 하나가 호르몬을 이용한 생물학적인 치료응용이다. 현재 임상적으로 유방암을 비롯한 전립선암, 난소암, 갑상선암 등에서는 호르몬을 이용하여 상당한 정도의 종양치료 성적을 보이고 있다. 하지만 소화기계통의 암에서는 아직까지 호르몬을 이용한 임상적 응용은 요원한 실정이다.

책임저자 : 김선회, 서울대학교 의과대학 외과학교실
㉾ 110-744, 서울특별시 종로구 연건동 28
Tel: 02-760-2315, Fax: 02-745-2282
E-mail: sunkim@snu.ac.kr
접수일 : 2003년 1월 25일, 게재승인일 : 2003년 2월 25일
본 연구는 1999년 서울대학교병원 대형공동연구의 연구비(03-1999-m080 및 082) 지원에 의해 이루어졌음.

소화기계에는 수많은 종류의 호르몬들이 분비되어 각종 소화기관의 운동, 소화, 배출, 합성, 성장 등에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이 중 가스트린과 콜레시스토키닌(cholecystokinin; CCK)은 대표적인 상부 위장관에서 분비되는 호르몬으로 위액의 분비와 췌장의 분비자극 및 담낭 수축 등의 각각의 고전적인 작용 이외에 최근에는 위암, 대장암과 같은 소화기계 종양의 성장인자로 작용한다는 보고가 있다.(*3-6*)

최근 들어서는 Smith 등(*7*)을 비롯한 여러 연구자들의 보고에 따르면 인체 췌장암세포도 가스트린과 콜레시스토키닌에 의해 in vitro 및 in vivo에서 성장이 촉진되고 각각의 길항제를 사용하여 그 작용이 억제된다고 하였다. 하지만 담관암을 비롯한 다른 팽대부주위암에서는 아직 수립된 종양세포주가 드물고, 적당한 암 모델의 부재로 소화기 호르몬에 의한 종양성장효과에 대해서는 아직 보고가 거의 없는 실정이다.

한편 췌장을 포함한 팽대부주위암에 대하여 시행하는 근치적 수술인 췌십이지장절제술은 수술형태에 따라 다르지만 가스트린, 콜레시스토키닌 분비에 큰 영향을 주고, 수술 후 투여약제에 따라서도 호르몬분비가 큰 영향을 받을 수 있다. 따라서 이들 부위에서 기원한 종양세포의 성장이 호르몬에 의해 영향을 받을 수 있다면 이는 임상적으로 매우 중요한 사실로 현재 시행되고 있는 수술원칙의 변환뿐만 아니라 소화기계 호르몬을 이용한 임상적 치료를 기대할 수도 있다. 하지만 세계적으로 췌장암 및 팽대부 주위암에서 수립된 종양 세포주가 많지 않고, 세포주에 따라 소화기 호르몬에 대한 반응도 상이하여 그 임상적 의의가 확실히 규명되어 있지 않다. 이에 저자들은 본 연구를 통해 서울대학교 의과대학 암연구소 한국 세포주 은행에서 수립된 췌장암 및 팽대부 주위암 세포주를 대상으로 가스트린과 콜레시스토키닌이 암세포 성장에 어떤 효과가 있는 지를 알아보고, 종양성장효과가 있다면 이것이 세포의 수용체를 통한 특이적 효과인지를 규명하고자 하였다.

방 법

연구는 크게 세 가지로 나누어서 우선 여러 종류의 췌장암 및 팽대부 주위암의 세포주를 대상으로 tetrazolium based colorimetric assay (3-(4,5 dimethyl thiazole-2-yl)-2,5 dephenyl tetrazolium bromide test: 이하 MTT 검사)를 이용하여 가스트린 및 콜레시스토키닌에 반응을 보이는 세포주를 가려내기 위한 선별실험을 시행하고 여기서 반응을 보인 세포주를 대상으로 본 실험을 시행하였다. 본 실험은 가스트린 및 콜레시스토키닌과 그것의 수용체 길항제인 L-365,260과 L-364,718을 사용하여 종양세포의 증식 및 길항제를 사용했을 때의 증식억제효과를 살펴보았다. 마지막 단계로 각 세포주를 대상으로 세포내 수용체의 발현유무 및 그 정도를 확인하였다.

1) 대상 세포군 및 특성

본 실험에 사용된 세포주들은 PANC-1과 MIA PaCa-2 (American Type Culture Collection, Rockville, MD)를 제외하고는 서울대학교 암연구소에서 수립된 세포주로 SNU-213, 324는 췌장두부에서 발생한 선암 세포주이고, SNU-410은 췌장선암의 간전이 부위에서 체취하여 배양된 세포주이다. SNU-245은 원위부 담도암, SNU-478과 SNU-869는 팽대부암, SNU-1079, SNU-1196은 상부 담관암에서 수립된 선암 세포주이다. SNU-308은 팽대부 주위암은 아니지만 담낭암 세포주로 실험 대상에 포함시켰다.(*8,9*) 대상 세포주는 10% 우태아 혈청이 포함된 RPMI 1640 (GIBCO-BRL, Rockville, MD, USA) 배지에서 증식시켜 실험에 사용하였다.

2) Tetrazolium based colorimetric assay (MTT 검사)

(1) 세포의 성장곡선 및 적정 접종 세포수의 결정: MTT에 필요한 지수성장기에 있는 적정 세포수를 찾기 위해 아래와 같은 방법으로 실험을 시행하였다. 96-well microplate의 첫 번째 칸에 180㎕의 배지(RPMI 1640(무혈청배지))와 PBS (phosphate buffered saline) 20㎕를 넣어 blank로 사용하였다. 두 번째 칸부터는 먼저 배지만 90㎕를 넣고, 일정한 세포밀도(400×10^3)를 가진 세포 부유액 90㎕를 넣고 접종하여 혼합하였다. 두 번째 칸에서 얻은 세포 부유액 90㎕를 세 번째 칸으로 옮겨 넣어 세포밀도를 1/2로 희석한다. 이와 같은 순서를 반복하여 8개의 순차적으로 희석된 세포 부유액을 만들고 두 번째 칸부터 마지막까지 90㎕의 배지와 20㎕의 PBS를 넣는다. 세포를 37°C, 5% CO2 하에서 4일간 배양한 후, 각 well에 0.1 mg의 MTT (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 가해주고 다시 37°C, 5% CO2 하에서 4시간 더 배양하여 MTT를 환원시켰다.

배양 종료된 용기를 450 g에서 5분간 원심 분리하여 생성된 formazan결정을 가라앉힌 후 배지를 30㎕ 정도만 남기고 multi-dispenser를 이용하여 모두 제거하였다.

배지가 제거된 각 well에 생성된 formazan결정을 용해시키기 위해 DMSO를 150㎕를 가한 후 15분간 가볍게 진탕하고 이것을 96-well plate용 ELISA 판독기로 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 이로부터 얻어진 값을 도시하여 생장곡선을 구하고, 지수성장기에 있는 적정 세포수를 결정하였다.

(2) 세포접종, 시약투여, 생존세포수의 측정: 상기 실험에서 결정된 세포 농도로 각 well에 100㎕의 세포 부유액을 접종하였다. 첫 번째 줄에는 세포 부유액에 시약 대신 R0만을 20㎕을 첨가하여 100% 대조군으로 설정하였다. 두 번째 줄부터는 실험에 사용될 성장인자로 추정되는 gastrin-17과 CCK-8 (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 미량의 DMSO에 용해 후 R0에 희석한 후 20㎕를 첨가하여10^{-6} M의 시약농도를 만들었다. 다음 줄부터는 순차적으로 10배씩 희석하여 10^{-12} M까지의 시약농도를 만든다. 암세포와 검체가 접종

된 용기를 37°C, 5% CO_2하에서 5일간 배양하였다. 이때 매일 각 well에 시약이 첨가된 배지를 20㎕씩 첨가하였다.

전술한 MTT 방법으로 생존 세포수를 측정하고 결과분석을 위해 아래와 같이 대조군의 MOD (mean optical density)와 시험군의 MOD를 백분율로 환산하여 비교하였고 실험의 재현성을 위해 4번 반복하여 실험하였다.

(MOD in test well/MOD in control well) × 100

3) 호르몬에 의한 세포성장 및 길항제의 효과

상기 검사에서 가스트린 및 콜레시스토키닌에 반응을 보인 세포주에 대해 각 호르몬의 길항제인 L-365,260과 L-364,718 (영국의 ML laboratory에서 공여 받음)을 사용하여 암세포증식 효과가 길항제에 의해 차단되는지를 확인하기 위해 대상 세포군을 배지만 첨가한 군, 호르몬만 투여한 군, 호르몬과 길항제를 같이 투여한 군, 길항제만 투여한 군으로 나누어 일정기간 배양 후 hemocytometer를 이용하여 각각의 세포수를 측정하였다.

10% 우태아혈청(fetal bovine serum)이 포함된 배지(R10)로 T75 flask (Falcon, Flankin Lake, NJ, USA)에 배양된 각 세포주를 혈청은 제외하고 L-glutamine (2 mM), Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100㎍/ml)가 포함된 RPMI-1640배지와 함께 T25 flask에 분주한 후, 37°C, 5% CO2 조건하에서 24시간 배양하고, 그 이후부터는 배지를 매일 교환하였다. 이 때부터 대상 실험군에 따라 1군에는 무혈청 배지만 교환하고, 2군에는 무혈청 배지에 가스트린 또는 콜레시스토키닌을 첨가하여(호르몬의 농도는 MTT검사에서 가장 높은 반응을 보인 농도인 10^{-9} M로 함) 매일 배지를 갈아주었다. 3군에는 무혈청 배지에 호르몬과 그에 대한 길항제를 첨가하여 배지를 교환하고, 4군에서는 길항제만을 투여한 배지를 사용하였다.

각 실험군의 세포수는 3일 간격으로 측정하여 15일 동안 관찰하였다. 세포수를 측정하기 위해 flask에 0.125% trypsin으로 3분간 처리한 후 R10으로 중화하고 멸균 피펫을 통한 반복 흡입으로 단일세포 부유액을 만들고 여기서 세포의 일부를 채취하여 부피를 측정하고 PBS로 10배 희석한 다음 hemocytometer를 사용하여 세포수를 측정하였다.

4) 호르몬 수용체 존재 및 발현 정도

(1) RNA 추출: 대상 세포주들은 10% 우태아혈청이 포함된 RPMI 1640배지에서 배양한 후, 각각 PBS 5 ml로 세척하고, trypsin-EDTA 2 ml로 처리하여 15 ml tube에 넣었다. 3,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 세포주 pellet을 얻은 후 각각의 pellet에 TRIzol® (Gibco-BRL, Rockville, MD, USA)시약을 1 ml 넣고, 4°C에서 5분간 반응시킨 후 chloroform을 200㎕씩 첨가하여 흔든 후에 14,000 rpm에서 15분간 원심분리를 하였다. 상층액만 떠서 새로운 eppendorf 튜브에 넣고 동량의 isopropyl alcohol을 첨가하였다. -20°C에서 약 10분간 방치 후에 14,000 rpm에서 15분간 원심분리를 하여 상층액을 제거하였다. 남아있는 pellet에 75% ethanol을 1 ml 넣고 잘 씻어준 다음, 14,000 rpm에서 10분간 원심분리를 시행하여 상층액을 조심스럽게 버린 후 10분 정도 상온에서 잘 건조시키고 DEPC (diethylpyrocarbonate) water를 넣어 녹인 후에 분광광도계를 사용하여 RNA를 정량하고 -20°C 냉동고에 보관하였다.

(2) 역전사: 정량한 RNA를 random primer를 사용하여 역전사하였다. 우선 RNA정량 결과에 따라 세포주마다 2㎍의 RNA를 주형(template)으로 사용하고 random primer 1㎕, dNTP mixture 1㎕, 0.1M DTT 2㎕, 5X PCR buffer 4㎕, DEPC water 9㎕, MMLV-reverse transcriptase (Gibco-BRL, Rockville, MD, USA) 1㎕를 넣고 잘 섞은 후 42°C 60분, 99°C에서 5분간 반응시켜 cDNA를 얻은 후 4°C에서 보관하였다.

(3) 연쇄중합효소 반응: Mandair 등(*10*)이 보고한 바 있는 시발체 서열을 확인하고 제작하여(Table 1) CCK-A와 CCK-B/gastrin 수용체에 대한 연쇄 중합효소 반응을 실시하였다.

cDNA는 2㎍을 사용하였고 10X PCR buffer 2㎕, dNTP mixture 2㎕를 사용하고, 시발체는 전진형과 역행형을 각각 10 pmol씩 사용하였다. Takara사(Shiga, Japan)의 Taq polymerase를 0.2㎕ (5 units/㎕)씩 첨가하였고 thermal cycler (Hybaid, Middlesex, UK)를 사용하여 β-actin은 94°C에서 1분, 55°C 1분, 72°C에서 1분의 조건으로 35 cycle반응을 시켰고, CCK-A 수용체는 94°C에서 1분, 55°C 1분, 72°C에서 1분 30초의 조건으로 40 cycle, CCK-B/gastrin 수용체는 94°C에

Table 1. Primer sequences for RT-PCR amplification

mRNA	Product size (bp)	Primer sequences 5'-3'
CCK-A receptor	340	Forward: CCTACGACACCGCCTCCGC
		Backward: TCCGTTCTTTCTTCTCTGCCTCCT
CCK-B/gastri nreceptor	430	Forward: ACCCCAACGACAGGAAAAGGT
		Backward: TTTGGGAAGGAAGGAGAGGGC
β-actin	154	Forward: CACTGTGTTGGCGTACAGGT
		Backward: TCATCACCATTGGCAATGAG

서 1분, 58°C 1분, 72°C에서 1분 30초의 조건으로 40 cycle간 증폭반응을 시켰다. 양성 대조군으로 CCK-A 수용체는 Mia PaCa-2를 사용하였고, CCK-B/gastrin 수용체에서는 LoVo 세포주를 이용하였다.(*10,11*) 이렇게 시행된 연쇄중합효소 반응 결과 얻어진 산물은 6X loading dye를 첨가하여 ethidium bromide가 첨가된 1.5% agarose gel에서 50V로 전기영동한 후 자외선 투시기하에서 띠를 확인하였다.

(4) 표식자(probe) 제작: 양성 대조군으로 사용한 Mia PaCa-2 (CCK-A 수용체)와 LoVo (CCK-B/gastrin 수용체)에서 상기 PCR결과 얻어진 산물을 QIAGEN사의 QIAquick® Gel Extraction Kit를 이용하여 정제하였다. 이것을 Taq dideoxy terminator cycle sequencing kit와 ABI 377 DNA sequencer (Perkin-Elmer, Poster City, CA, USA)를 이용하여 올바른 위치가 증폭되었는지를 확인한 후 표식자를 만들기 위해 Invitrogen사 (Carlsbad, CA, USA)의 pCR®II-TOPO vectors에 PCR 산물을 삽입시키고, competent *E. Coli*에 형질전환(transformation)시킨 후 LB (Luria-Bertani) plate에서 16시간 증식시켜서, vector가 삽입된 것으로 생각되는 10개의 집락(colony)을 따서 50㎍/ml의 ampicillin이 첨가된 LB 배지에서 16시간 동안 증식시킨 후 plasmid DNA를 급속 비등 방법을 이용하여 구한 후 EcoRI 제한효소(GIBCO-BRL, Rockville, MD, USA)로 처리하고 전기영동을 시행하여 적정 크기의 표식자가 생성된 것을 확인하였다. 해당 표식자를 정제한 후 [α-^{32}P] deoxycytidine triphosphate와 Prime-It® II random primer labeling kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA)를 사용하여 방사성 표식자(radioprobe)를 제작하였다.

(5) Slot blot 검사: 호르몬 수용체의 발현정도를 정량화하기 위해 slot blot 검사를 시행하였다.

세포주당 각각 10, 3, 1, 0.3㎍의 RNA를 slot에 가하여 나일론막에 흡착시킨 후 UV를 사용하여 cross-link를 시행하였다. 나일론막을 중합 용기(hybridization bottle)에 넣고 10 ml의 전중합(prehybridization) 용액(5X SSPE, 30% formamide 5X Denhardt's solution, 1% SDS, 100㎍/ml salmon sperm DNA)을 가하여 42°C에서 4시간 동안 반응시킨 후 방사선 동위원소로 표식된 표식자를 첨가하여 42°C에서 16시간 중합시켰다. 중합 후 용액을 버리고 5×SSPE용액을 넣고 42°C에서 20분간 세척하였다. 마지막으로 0.1X SSPE/0.1% SDS 용액을 넣고 상온에서 15분간 세척한 후 -70°C에서 X-ray film에 감광시켰다. 올바른 RNA가 부하(loading) 되었는지를 알기 위해 상기의 나일론막에서 부착된 표식자를 떼어낸 후 β-actin을 사용하여 다시 중합반응을 시행하였다. 필름의 신호강도를 분석하기 위해 밀도 분석계 (BIPS®, Biomedlab, Seoul, Korea)를 사용하여 CCK-A수용체의 발현은 10㎍을 가한 slot을 기준으로 하여 Mia PaCa-2의 발현정도를 100으로 정하고 다른 세포주의 발현을 상대적으로 비교하였고, CCK-B/gastrin수용체의 발현은 LoVo를 기준으로 하여 비교하였다.

5) 통계적 분석

각 군의 평균값을 비교하기 위해 비모수 검정 방법인 Mann-Whitney U test를 시행하였고, P-value가 0.05이하인 경우를 의미 있는 것으로 하였다.

Table 2. Effect of gastrin and CCK on pancreatic and biliary tract cancer cell lines

Cell line	Origin*	Maximum response to hormones and hormone concentration					
		Gastrin			CCK		
		Response (%)	Concentration (M)	P-value	Response (%)	Concentration (M)	P-value
SNU-245	BD	108	10^{-7}	NS	110	10^{-12}	NS
SNU-308	GB	127	10^{-9}	0.038	109	10^{-7}	NS
SNU-478	AoV	121	10^{-9}	0.047	123	10^{-9}	0.043
SNU-869	AoV	107	10^{-6}	NS	107	10^{-10}	NS
SNU-1079	BD	107	10^{-9}	NS	113	10^{-9}	NS
SNU-1196	BD	104	10^{-8}	NS	109	10^{-8}	NS
SNU-213	Pancreas	105	10^{-10}	NS	106	10^{-7}	NS
SNU-324	Pancreas	112	10^{-11}	NS	116	10^{-12}	NS
SNU-410	Pancreas	115	10^{-12}	NS	113	10^{-9}	NS
MIAPaCa-2	Pancreas	106	10^{-10}	NS	108	10^{-10}	NS
PANC-1	Pancreas	101	10^{-7}	NS	105	10^{-8}	NS

*BD = bile duct; GB = gallbladder; AoV = ampulla of Vater.

결 과

1) 선별검사 결과(Teble 2)

MTT검사를 통해 췌장암과 담도암 세포주에서의 가스트린과 콜레시스토키닌에 의해 종양세포주의 성장을 관찰한 결과 담낭암 세포주인 SNU-308은 가스트린을 투여한 경우 종양의 성장이 전반적으로 증가하였고 가스트린을 10^{-9} M의 농도로 투여한 경우에 가장 종양성장효과가 뚜렷하여 호르몬을 투여하지 않은 대조군에 비해 27% 정도 종양세포의 성장이 증가하였다(Fig. 1A). 팽대부에서 유래한 SNU-478의 경우에는 가스트린과 콜레시스토키닌 모두에서 종양의 성장이 증가되었는데 가스트린과 콜레시스토키닌의 농도가 10^{-9} M인 경우에 최대반응을 보여 대조군에 비해 각각 21%와 23%씩 성장이 증가되었다(Fig. 1B). 하지만 팽대부에서 유래한 다른 종양세포주인 SNU-869의 경우에는 두 호르몬에 의해 세포성장이 촉진되지 않았다. 원위부 담도와 상부담도에서 유래한 SNU-245, SNU-1079, SNU- 1196의 경우에도 호르몬에 의한 종양성장효과를 관찰할 수 없었고, 췌장에서 수립된 SNU-213, SNU-324, SNU-410, MIAPaCa-2, PANC-1 모두에서 호르몬에 의한 종양세포주의 증식효과는 없었다.

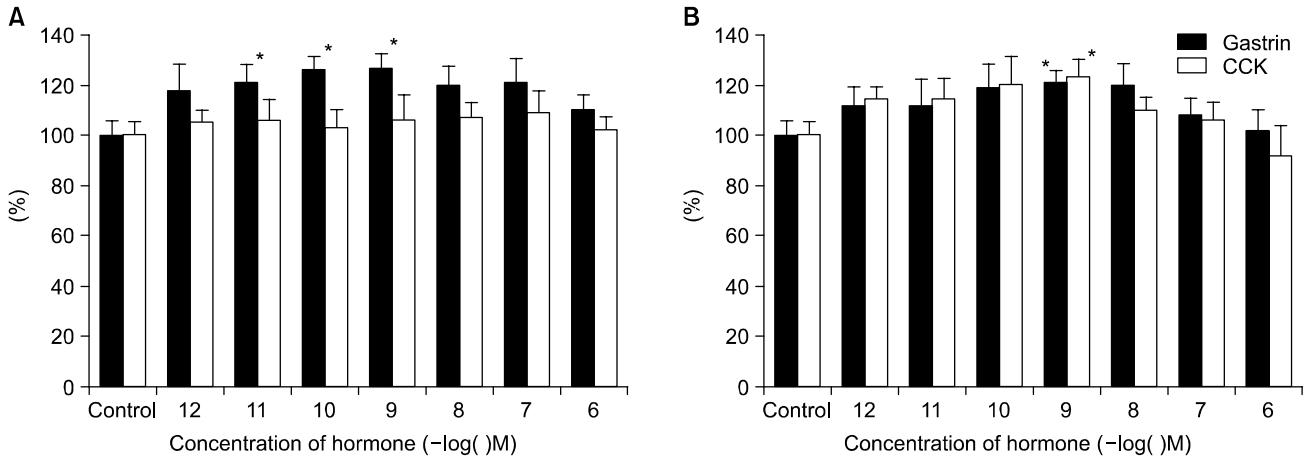

Fig. 1. Effects of gastrin and CCK on SNU-308 from gallbladder cancer (A), SNU-478 from ampulla of Vater cancer (B) in MTT assay. *P < 0.05.

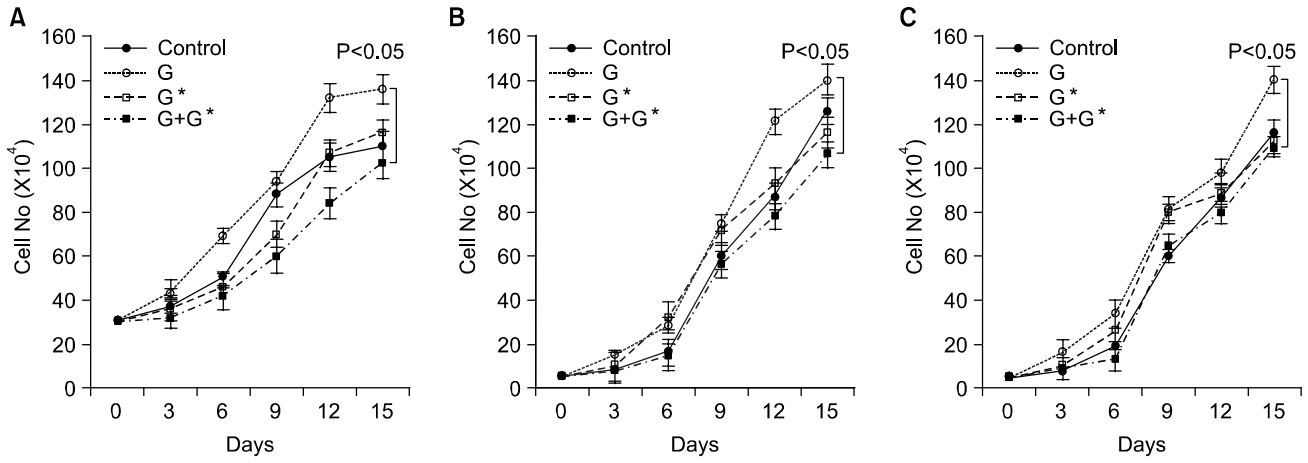

Fig. 2. Growth curves for SNU-308 (A), and SNU-478 (B, C) cells grown with either hormone or hormone combined with antagonist or antagonist, or medium only. Medium and reagents were added daily. Every third day, we harvested the cells and counted the cell number using a hemocytometer. The cell number in cultures treated with hormone was increased and its trophic effect was blocked by specific antagonists. G: gastrin-17, G*: antagonist for CCK-B/gastrin receptor (L-365,260), C: CCK-8, C*: antagonist for CCK-A receptor (L-364,718).

2) 길항제에 의한 종양성장 억제 효과

상기 MTT결과에서 가스트린에 의해 증식이 촉진되었던 SNU-308과 가스트린과 콜레시스토키닌에 의해 증식이 촉진되었던 SNU-478을 대상으로 하여 대조군, 호르몬만 투여한 군, 길항제만 투여한 군, 호르몬과 길항제를 동시에 투여한 군으로 나누어 세포의 성장을 살펴본 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 각 호르몬에 의한 세포의 성장효과가 특이 길항제의 사용으로 억제되었다.

3) 호르몬 수용체 존재 유무(Fig. 3)

역전사 연쇄중합방법을 시행한 결과 CCK-A수용체는 340 bp 위치에, CCK-B/gastrin 수용체는 430 bp 위치에서 특이적인 띠를 형성함을 알 수 있었다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 담도계암과 췌장암의 모든 세포주에서 CCK-A수용체와 CCK-B/gastrin수용체가 존재하였다.

4) 호르몬 수용체의 발현 정도

각 호르몬에 대한 수용체의 발현정도를 확인하기 위해서 시행한 slot blot 검사를 시행하였는데(Fig. 4), 각 세포에서의 발현 정도를 비교하기 위해서 CCK-A수용체는 Mia PaCa-2, CCK-B/gastrin 수용체는 LoVo를 기준으로 하여 RNA 10㎍을 투여한 것의 신호강도를 상대적으로 비교하였다(각 수용체 mRNA의 신호강도/β-actin mRNA의 신호강도). Fig. 4B, C에서 보는 바와 같이 호르몬에 의해 성장이 촉진되었던 세포주(SNU-308과 SNU-478)에서의 신호강도는 호르몬에 반응이 없었던 세포주에서의 신호강도보다는 전반적으로 높았으나, 호르몬에 반응이 없었던 일부 세포주에서는 각 수용체 mRNA의 강한 발현을 관찰할 수 있었다.

고 찰

가스트린과 콜레시스토키닌은 C-말단의 5개의 아미노산(Gly-Trp-Met-Asp-PheNH2)이 동일한 구조로 되어 있는 호르몬으로 이전부터 알려져 왔던 각 호르몬의 기능을 살펴보면, 가스트린은 위액분비 조절과 위벽 점막세포의 증식에 관여하는 것으로 알려져 있고, 콜레시스토키닌은 췌장액 분비와 담낭 수축을 유발하며 포만 유발, 위배출 지연과 위산 분비 억제, 위장관 연동운동에 관여하는 것으로 알려져 있다.

최근에는 이런 위장관의 분비 조절 기능 이외에 신경전달 물질로써의 역할과 함께 정상 위장관 점막의 성장뿐만 아니라 종양의 발생 및 암세포의 증식에도 관여한다는 보고가 있다. Johnson 등(*12*)은 백서에서 pentagastrin을 투여함으로써 위장에서는 60～100%, 십이지장에서는 300%의 점막 세포 증식을 관찰한 이래로 McGregor 등(*13*)과 Sumiyoshi 등(*14*)은 가스트린이 백서와 인체의 위암과 대장암의 증식에 관여한다고 보고하였다.

가스트린과 콜레시스토키닌에 대한 췌장에서의 연구결과를 살펴보면, Smith 등은 SW 1990, PANC-1, BxPC-3, RWP-2, CAPAN-2, MIA PaCa-2의 6개의 췌장암 세포주에서 콜레시스토키닌을 사용하여 세포수가 증가함을 관찰하였고, 이러한 작용이 CCK-A 수용체 길항제인 L-364,718에 의해 억제됨을 보고하여 콜레시스토키닌의 세포성장 촉진작용이 콜레시스토키닌 수용체를 통해서 이루어진다고 하였다.(*15,16*) 이후에도 여러 학자들에 의해 췌장암 세포주에서의 콜레시스토키닌이 종양세포의 성장을 촉진함이 보고되었고, 이런 세포주를 통한 실험 외에 Moonka 등(*17*)은 췌장암으로 수술을 시행한 환자의 종양을 대상으로 RT-PCR과

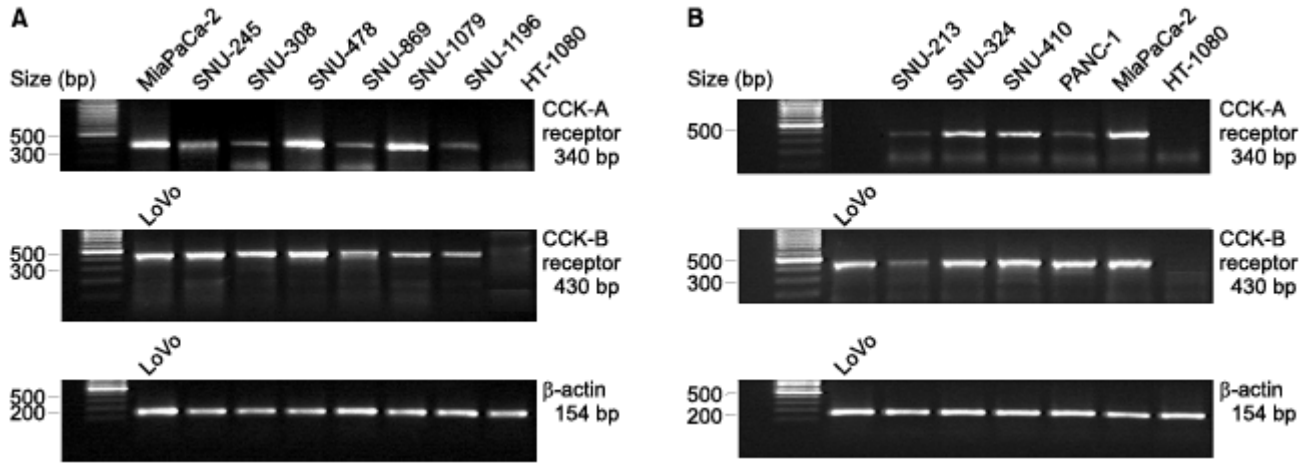

Fig. 3. Amplification of CCK-A and CCK-B receptor mRNA in human biliary tract cancer cell lines (A), and pancreatic cancer cell lines (B), by RT-PCR. The sizes of the amplified PCR fragment products were 340 bp for CCK-A receptor (A), and 430 bp for CCK-B/gastrin receptor (B). In this assay a Mia PaCa-2 cell line was used as a positive control for CCK-A receptor m RNA, a LoVo cell line for CCK-B receptor mRNA. HT-1080 from human fibrosarcoma was used as a negative control.

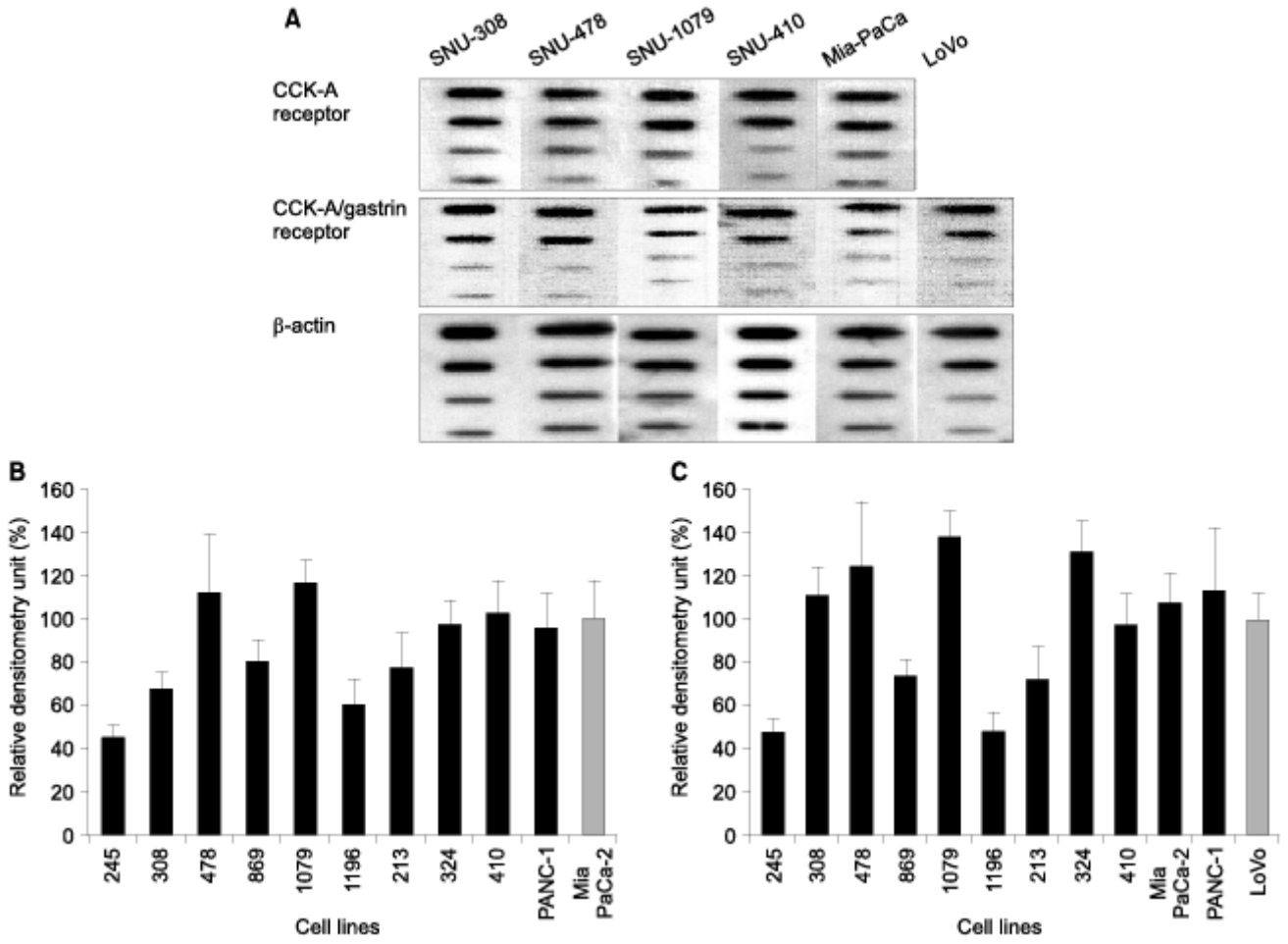

Fig. 4. Representative slot blot hybridization. (A) This figure shows the data from SNU-308, 478, 1079, 410, Mia PaCa-2, and LoVo cell lines. Hybridization with actin probe performed after de-probing the receptor probes demonstrated a comparable loading of RNA (B, C). The slot blots were quantified densitometrically. Data are mean SEM of values obtained from duplicated assays. We used the signals of Mia PaCa-2 (CCK-A receptor: Fig. 4B) and LoVo (CCK-B/gastrin receptor: Fig. 4C) as standard signals for comparison. No significant difference could be found in the intensity of the receptor expression.

in situ hybridization을 시행한 결과 CCK-A수용체가 종양조직에서만 증폭 발현됨을 보고하여 콜레시스토키닌이 종양세포에 영향을 줄 것이라고 하였다.

한편 가스트린에 대해서는 Smith 등(7)이 처음으로 인간의 췌장세포암에 가스트린을 사용하여 in vitro와 nude mice를 사용한 in vivo 실험에서 췌장암세포가 증식됨을 보고하였고 이러한 작용이 CCK-B/gastrin수용체의 길항제인 L-365,260을 사용하여 그 작용이 억제되었다고 하였다.

담관암과 관련된 연구는 많지 않지만 Yamamoto 등(*18*)은 44개의 간외 담관암을 조사한 결과 조직분화도에 따라 종양의 분화도가 좋은 경우에는 종양내 또는 종양주위에 소마토스타틴(somatostatin)이나 가스트린을 분비하는 세포가 존재할 가능성이 높은 것으로 보고하여 일부 종양, 특히 분화도가 좋은 경우일수록 이런 호르몬의 분비로 인한 종양성장에 영향을 미칠 수 있다는 가능성을 제시하였다. Caplin 등(*19*)도 종양조직과 인접 정상 조직을 이용하여 면역조직화학염색법을 이용하여 가스트린 수용체의 발현을 조사한 결과 간암에서는 65%, 간내담관암에서는 90%의 종양에서 CCK-B/gastrin수용체가 발현되어 주위 정상조직에서보다 더욱 많은 발현을 보임을 조사하여 간내담관암과 간암의 증식에 가스트린이 영향을 줄 것이라고 추론하였다.

또한 가스트린과 콜레시스토키닌은 이미 형성된 종양세포의 증식 이외에도 발암단계와 종양의 침습 및 전이에도 영향을 미친다는 보고도 있다.(*20,21*)

하지만 연구자에 따라서는 위의 결과들과는 정반대로 이들 호르몬에 의해 종양의 성장이 억제되거나 증식과는 관련이 없다는 보고도 있다. Hudd 등(*22*)은 nude mice에 위선암 세포주인 SLU-077과 총수담관 종양인 SLU-132를 xenograft했을 때 콜레시스토키닌에 의해 오히려 종양세포의 성장이 억제됨을 보였고, 췌장암세포주인 SLU-048, PANC-1,

MIA PaCa-2 등은 변화가 없다고 보고하였다. Watson 등(*23*)도 31종류의 대장암 세포주와 13종류의 위암세포의 가스트린에 대한 성장연구를 통해 대장암 세포주 중 55%에서, 위암세포주 중 69%에서 가스트린이 성장을 촉진시켰고, 나머지 세포주에서는 반응이 없었다고 하였다. Liehr 등(*24*)은 PANC-1와 MIA PaCa-2를 이용한 실험에서 콜레시스토키닌이 이들 췌장암세포의 성장에 영향을 미치지 못하였다고 보고하였다.

본 연구에서는 췌장암에서 유래한 세포주에서는 가스트린이나 콜레시스토키닌에 의해 종양의 성장이 증가됨을 확인할 수 없었고, 팽대부암에서 유래한 SNU-478은 두 호르몬에 의해 종양의 성장이 증가됨을 확인할 수 있었고, 각 호르몬 수용체에 특이적인 길항제를 투여한 결과 그 증식효과가 없어지는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 같은 팽대부에서 유래한 다른 종양세포주인 SNU-869의 경우에는 호르몬에 대한 각각의 수용체가 존재함에도 불구하고 호르몬에 의한 세포성장효과를 보이지 않았다. 담낭암에서 유래한 SNU-308의 경우에는 CCK-A와 B수용체가 모두 존재하였으나, 콜레시스토키닌에 의한 종양의 성장효과는 없었던 반면, 가스트린에 의해서는 종양의 성장이 증폭되는 효과를 보여주었다.

이상에서 본 연구와 그전의 다른 연구자들의 연구결과를 종합하여 보면 소화기 호르몬인 가스트린과 콜레시스토키닌의 종양세포성장효과에 대해서 상이한 연구결과가 발표되고 있는 것을 알 수 있는데 그 이유로 생각되는 것은 첫째로 세포의 증식조건 및 호르몬의 투여량, 투여방법에 따라 차이를 보일 수도 있을 것으로 생각된다. 특히 췌장암에서도 가장 많이 실험에 사용되었던 세포주인 PANC-1와 MIA PaCa-2의 호르몬에 대한 반응성이 실험자에 따라서는 증식효과가 아니라 억제효과를 갖는다고 보고한 경우도 있었다. 또한 상당수의 보고에서 세포의 증식효과를 보이는 농도는 실제로 인체에서 정상적인 혈중 농도보다는 높은 경우가 많아서 이런 실험결과를 바로 인체에 적용하는 것에는 한계가 있을 것으로 생각한다.

둘째로는 유방암에서 보는 것처럼 같은 조직이라 할지라도 개체에 따라 세포에서의 수용체 존재 유무가 다르고 그로 인해 호르몬에 의한 반응성에 차이가 날 가능성이 있다. 세포주에 따라 가스트린 및 콜레시스토키닌의 수용체 존재 유무가 차이가 난다는 보고는 Frucht 등(*25*)에 의해 10개의 대장암 세포주에서 3종류에서만 가스트린 수용체가 존재한다고 보고되었다. 위암 및 대장암 외에 췌장암에서의 수용체에 대한 연구도 일부 이루어졌는데 Upp 등(*26*)은 췌장선암 세포주를 이용한 실험에서 콜레시스토키닌 수용체가 있는 세포주와 수용체가 발현되지 않은 세포주를 사용하여 nude mice에 caerulein과 proglumide를 투여했을 때 콜레시스토키닌 수용체가 있는 세포주는 콜레시스토키닌에 반응하여 증식하였고, 콜레시스토키닌 수용체가 없는 세포주에서는 세포증식에 콜레시스토키닌이 영향을 미치지 못함을 보고 하였다.

그러므로, 가스트린 및 콜레시스토키닌에 대한 종양세포의 증식효과를 확인하기 위해서는 세포주의 호르몬 수용체의 존재유무 확인이 필수적이며 이를 통해 호르몬에 대한 종양세포의 증식 효과의 상이한 결과를 예상하여 임상에 적용할 수 있을 것이다. 하지만 저자의 연구결과에서 알 수 있듯이 세포에 특이 수용체가 존재하더라도 세포에 따라서는 호르몬에 의해서 세포의 성장이 촉진되는 경우도 있지만 반응이 없는 경우도 있다는 것은 수용체의 존재 유무만으로는 설명하기가 힘들 것으로 생각된다. 실제로 이 실험에서는 수용체의 존재 유무뿐만 아니라 수용체의 발현 정도를 알아보기 위해 slot blot 검사를 시행하였는데 결과에서 보는 바와 같이 호르몬에 높은 반응을 보였던 세포주들에서는 전반적으로 이들 수용체의 mRNA의 발현도 증가하였지만, 반응이 없던 세포주의 일부에서는 수용체 mRNA 발현이 증가됨을 확인할 수 있었다. 따라서 단순한 수용체의 존재 유무만으로는 호르몬에 의한 세포의 생물학적인 반응을 예측하기는 힘들 것으로 생각된다.

셋째로 각 호르몬에 대한 수용체를 가지고 있다고 하여도 이차적 신호전달 체계, 세포 내 호르몬 기능의 차이 및 새로운 기능을 갖는 수용체의 존재로 인해 세포에 따라 기능의 차이가 발생할 수 있을 것이다. 그러나 아직까지 이와 관련된 가능성에 대해서는 명확히 밝혀진 바가 없지만 최근에 Talkad 등(*27*)은 기존의 2종류의 콜레시스토키닌 수용체 외에 다른 종류의 콜레시스토키닌 수용체의 가능성에 대해 발표하였는데, 실제로 Imdahl 등(*28*)은 가스트린과 콜레시스토키닌에 대해 새로운 결합능을 가지면서 정상조직에서 발현되는 수용체와는 다른 크기를 갖는 수용체를 췌장암의 조직에서 발견하여 이를 CCK-C수용체라고 명명하였다. 하지만 아직까지 이 수용체의 기능 및 발현양상에 대해서는 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

또한 기존에 알려진 수용체에서도 약간의 구조적 변이에 의해 수용체의 기능이 크게 바뀐다는 것이 밝혀지고 있다. Hellmich 등(*29*)은 정상 점막조직에서는 발견되지 않는 intron 4에서 splicing하는 CCK-B수용체의 변이형이 대장암의 세포에서 존재하고 이것에 의해 가스트린에 대한 반응 및 성장속도가 증가됨을 확인하여 가스트린에 의한 종양성장효과는 이와 같은 수용체의 변이형에 의할 것이라고 하였다. 일반적으로 콜레시스토키닌 수용체(A, B 모두)는 7개의 transmembrane domains을 가지면서 tyrosine kinase와 연결되어 그 기능을 하는 것으로 알려져 있는데 이 중 호르몬이 결합하는 장소에서 1~2개 정도의 변이만 일어나도 수용체의 기능이 상당히 바뀐다고 보고되고 있다. Kopin 등(*30*)은 실제로 쥐와 사람, 개에서 CCK-B/gastrin수용체를 조사한 결과 이종 간뿐만 아니라 동종 간에서 수용체에 여러 형태의 다형성이 존재하고 그로 인해 수용체 길항제에 대

한 반응의 정도가 달라진다고 보고하였다.

따라서 가스트린이나 콜레시스토키닌에 의한 췌장암을 비롯한 담관암 등의 종양에서의 종양 성장인자인지에 대한 역할을 확인하기 위해서는 좀 더 많은 세포주의 확립을 통한 일반적인 반응결과에 대한 수렴과 함께 수용체 아형에 대한 구조적, 기능적 연구들이 뒷받침되어야 할 것으로 생각된다.

REFERENCES

1) Wiernik PH. Current status of and future prospects for the medical management of adenocarcinoma of the exocrine pancreas. J Clin Gastroenterol 2000;30:357-63.
2) Wolff RA, Chiao P, Lenzi R, Pisters PW, Lee JE, Janjan NA, et al. Current approaches and future strategies for pancreatic carcinoma. Invest New Drugs 2000;18:43-56.
3) Reubi JC, Schaer JC, Waser B. Cholecystokinin (CCK)-A and CCK-B/gastrin receptors in human tumors. Cancer Res 1997; 57:1377-86.
4) Watson SA, Durrant LG, Morris DL. Growth-promoting action of gastrin on human colonic and gastric tumour cells cultured in vitro. Br J Surg 1988;75:342-5.
5) Upp JR Jr, Singh P, Townsend CM Jr, Thompson JC. Clinical significance of gastrin receptors in human colon cancers. Cancer Res 1989;49:488-92.
6) Ishizuka J, Martinez J, Townsend CM Jr, Thompson JC. The effect of gastrin on growth of human stomach cancer cells. Ann Surg 1992;215:528-34.
7) Smith JP, Fantaskey AP, Liu G, Zagon IS. Identification of gastrin as a growth peptide in human pancreatic cancer. Am J Physiol 1995;268:R135-41.
8) Ku JL, Yoon KA, Kim IJ, Kim WH, Jang JY, Suh KS, et al. Establishment and characterization of six human biliary tract cancer cell lines. Br J Cancer 2002;87:187-93.
9) Ku JL, Yoon KA, Kim WH, Jang Y, Suh KS, Kim SW, et al. Establishment and characterization of four human pancreatic carcinoma cell linesGenetic alterations in the TGFBR2 gene but not in the MADH4 gene. Cell Tissue Res 2002; 308:205-14.
10) Mandair KK, Towner P, Stamford IF, Morris JD, Harper E, Benjamin IS, et al. Cholecystokinin receptors in human pancreatic cancer cell lines. Eur J Cancer 1998;34:1455-9.
11) Biagini P, Monges G, Vuaroqueaux V, Parriaux D, Cantaloube JF, De Micco P. The human gastrin/cholecystokinin receptors: type B and type C expression in colonic tumors and cell lines. Life Sci 1997;61:1009-18.
12) Johnson LR, Aures D, Yuen L. Pentagastrin-induced stimulation of protein synthesis in the gastrointestinal tract. Am J Physiol 1969;217:251-4.
13) McGregor DB, Jones RD, Karlin DA, Romsdahl MM. Trophic effects of gastrin on colorectal neoplasms in the rat. Ann Surg 1982;195:219-23.
14) Sumiyoshi H, Yasui W, Ochiai A, Tahara E. Effect of gastrin on tumour growth and cyclic nucleotide metabolism in xenotransplantable human gastric and colonic carcinomas in nude mice. Cancer Res 1984;44:4276-80.
15) Smith JP, Kramer ST, Solomon TE. CCK stimulates growth of six human pancreatic cancer cell lines in serum free medium. Regul Pept 1991;32:341-9.
16) Smith JP, Rickabaugh CA, McLauglolin PJ, Zagon IS. Cholecystokinin receptors and PANC-1 human pancreatic cancer cells. Am J Physiol 1993;265:G149-55.
17) Moonka R, Zhou W, Bell RH Jr. Cholecystokinin-A receptor messenger RNA expression in human pancreatic cancer. J Gastrointest Surg 1999;3:134-40.
18) Yamamoto M, Takahashi I, Iwamoto T, Mandai K, Tahara E. Endocrine cells in extrahepatic bile duct carcinoma. J Cancer Res Clin Oncol 1984;108:331-5.
19) Caplin M, Khan K, Savage K, Rode J, Varro A, Michaeli D, et al. Expression and processing of gastrin in hepatocellular carcinoma, fibrolamellar carcinoma and cholangiocarcinoma. J Hepatol 1999;30:519-26.
20) Howatson AG, Carter DC. Pancreatic carcinogenesis-enhancement by cholecystokinin in the hamster-nitrosamine model. Br J Cancer 1985;51:107-14.
21) Hirata M, Tsuchida A, Iwao T, Sasaki T, Matsubara K, Yamamoto S, et al. Cholecystokinin regulates the invasiveness of human pancreatic cancer cell lines via protein kinase C pathway. Int J Oncol 1999;14:1129-35.
22) Hudd C, LaRegina MC, Devine JE. Response to exogenous cholecystokinin of six human gastrointestinal cancer xenografted in nude mice. Am J Surg 1989;157:386-93.
23) Watson SA, Durrant LG, Crosbie JD, Morris DL. The in vitro growth response of primary human colorectal and gastric cancer cells to gastrin. Int J Cancer 1989;43:692-6.
24) Liehr RM, Melnykovych G, Solomon TE. Growth effects of regulatory peptides on human pancreatic cancer lines PANC-1 and MIA PaCa-2. Gastroenterology 1990;98:1666-74.
25) Frucht H, Gazdar AF. Characterization of functional receptors for gastrointestinal hormones on human colon cancer cells. Cancer Res 1992;522:1141-52.
26) Upp JR Jr., Singh P, Townsend CM Jr., Thompson JC. Predicting response to endocrine therapy in human pancreatic cancer with cholecystokinin receptors. Gastroenterology 1987; 92:1677.
27) Talkad VD, Patto RJ, Metz DC, Turner RJ, Fortune KP, Bhat ST, et al. Characterization of the three different states of the cholecystokinin (CCK) receptor in pancreatic acini. Biochim Biophys Acta 1994:1224:103-16.
28) Imdahl A, Mantamadiotis T, Eggstein S, Farthmann EH, Baldwin GS. Expression of gastrin, gastrin/CCK-B and gastrin/CCK-C receptors in human colorectal carcinomas. J Cancer Res Clin Oncol 1995;121:661-6.

29) Hellmich MR, Rui XL, Hellmich HL, Fleming RY, Evers BM, Townsend CM Jr. Human colorectal cancers express a constitutively active cholecystokinin-B/gastrin receptor that stimulates cell growth. J Biol Chem 2000;275:32122-8.

30) Kopin AS, McBride EW, Gordon MC, Quinn SM, Beinborn M. Inter- and intraspecies polymorphisms in the cholecystokinin-B/gastrin receptor alter drug efficacy. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:11043-8.