



레트로바이러스와 p53항암유전자가 암세포의 유전자치료에 미치는 영향

Effect of Retrovirus and p53 Tumor Suppressor Gene in Gene Therapy of Cancer Cells

저자 (Authors)	서민호, 서성일, 백원기, 조재위 Min-Ho Suh, Seong-II Suh, Won-Ki Baek , Jae-We Cho
출처 (Source)	The Journal of the Korean Society for Microbiology 33(2) , 1998.4, 227-235 (9 pages)
발행처 (Publisher)	대한미생물학회 The Korean Society For Microbiology
URL	http://www.dbpia.co.kr/Article/NODE01490897
APA Style	서민호, 서성일, 백원기, 조재위 (1998). 레트로바이러스와 p53항암유전자가 암세포의 유전자치료에 미치는 영향. The Journal of the Korean Society for Microbiology, 33(2), 227-235.
이용정보 (Accessed)	계명대학교 114.71.5.213 2016/01/11 10:00 (KST)

저작권 안내

DBpia에서 제공되는 모든 저작물의 저작권은 원저작자에게 있으며, 누리미디어는 각 저작물의 내용을 보증하거나 책임을 지지 않습니다.

이 자료를 원저작자와의 협의 없이 무단게재 할 경우, 저작권법 및 관련법령에 따라 민, 형사상의 책임을 질 수 있습니다.

Copyright Information

The copyright of all works provided by DBpia belongs to the original author(s). Nurimedia is not responsible for contents of each work. Nor does it guarantee the contents.

You might take civil and criminal liabilities according to copyright and other relevant laws if you publish the contents without consultation with the original author(s).

레트로바이러스와 p53항암유전자가 암세포의 유전자치료에 미치는 영향*

계명대학교 의과대학 미생물학교실, 의과학연구소, 의학유전연구소
서민호** · 서성일 · 백원기 · 조재위

=Abstract=

Effect of Retrovirus and p53 Tumor Suppressor Gene in Gene Therapy of Cancer Cells

Min-Ho Suh**, Seong-Il Suh, Won-Ki Baek and Jae-We Cho

*Department of Microbiology, School of Medicine; Institute for Medical Science;
and Institute for Medical Genetics, Keimyung University, Taegu, South Korea*

Cancer is considered to occur through abnormal growth and differentiation processes, in which oncogenes and tumor suppressor genes are deeply related. Cellular responses to DNA-damaging agents are believed to be critical determinants of human tumorigenesis. Cell cycle arrests and DNA repair following DNA damage require the coordination of multiple gene products that, as a whole, serve to maintain the integrity of the genome. Within the cell cycle, both G1-S and G2-M phase transitions are under constant surveillance by checkpoint genes for the protection of cells from either exogenous or endogenous DNA-damaging agents. p53 tumor suppressor gene mediates cell cycle perturbations in response to DNA damage, and play a role in cell death, genetic stability, and cancer susceptibility.

Recently, gene therapy with p53 tumor suppressor gene is expected as a new effective therapeutic strategy in many kinds of cancer. By using retroviral vector system, we transduced p53 tumor suppressor gene into human osteosarcoma cells, and analysed its growth suppression and apoptosis inducing effects. Combined effects of p53^{WT} gene therapy with chemotherapeutic agent or radiation were also analysed.

Titer of ecotrophic p53^{WT} retrovirus was 5.0×10^5 /ml, and that of amphotrophic p53^{WT} retrovirus was 2.0×10^5 /ml when NIH3T3 cells were used as target cells. Human osteosarcoma cells infected with amphotrophic p53^{WT} retroviruses showed increased p21^{WAF1} gene expression, which acts as a major cyclin-dependent kinase inhibitor in DNA damage responses. In normal DMEM media, human skin fibroblasts infected with amphotrophic p53^{WT} retroviruses showed very slow growing (1.7 fold increase in doubling time) and very low saturation density (50% decrease in cell density). In media containing chemotherapeutic agent, human osteosarcoma cells infected with p53^{WT} retroviruses died rapidly; 75% of them died within 4 days and all of them died within 10

접수 : 1998년 3월 25일, 게재결정 : 1998년 5월 20일

* 본 연구는 1997년도 계명대학교 비사연구기금으로 이루어졌음.

** Corresponding author: 서민호, 700-712 대구시 중구 동산동 194번지, 계명대학교 의과대학 미생물학교실. Tel: 053-250-7441, Fax: 053-255-1398, Email: minho@dsmc.or.kr

days of incubation with chemotherapeutic agent. Their DNAs were extracted and electrophoresed in agarose gel, and we identified DNA ladders characteristic of apoptotic cell death. When human osteosarcoma cells infected with p53^{WT} retroviruses were irradiated with ultraviolet light, more than 95% of cancer cells died within 1 day; whereas mock infected cells showed only less than 5% of cell death.

These findings suggest that retroviral vector mediated p53 tumor suppressor gene transfer into cancer cells can suppress tumor cell growth and decrease tumor cell density effectively. These findings also suggest that effective induction of tumor cell apoptosis can be obtained when p53^{WT} gene therapy is used in combination with chemotherapy or radiotherapy.

Key Words: p53 gene therapy, Retroviral vector, Human osteosarcoma, Apoptosis

서 론

정상세포는 세포내외의 여러 가지 원인에 의하여 DNA에 손상이 발생하였을 때 다양한 유전자들의 협동작용으로 세포가 G1기에 정지하고 손상된 DNA를 적절히 수리하여 복구하거나, 손상이 너무 심한 경우에는 미리 계획된 자살경로가 작동하여 apoptosis로 죽어버리게 된다^{4,8,19}. 그러나 이러한 DNA손상 인지 및 복구계통의 유전자에 장애가 생기거나 apoptosis조절유전자에 장애가 발생하면 세포는 DNA가 손상된 상태로 계속해서 세포주기를 돌게 되며, DNA손상이 계속 축적되어 마침내 암세포로 발전되게 된다^{11,16}.

그동안 인류는 암을 치료하기 위해 수술, 방사선, 화학요법 및 면역요법 등을 개발하였으나 일부종양에서만 그 효과를 보일 뿐, 기존의 치료방식으로는 암치료를 한계를 느끼고 있는데², 최근에 손상된 유전자 자체를 수리함으로써 암을 근본적으로 치료하고자 하는 유전자치료법 (gene therapy)이 소개되어 큰 관심을 불러 일으키고 있다^{5,12,18,21}. 특히 항암유전자에 관한 분자생물학적 지식이 축적되면서 항암유전자를 암세포에 도입시켜 암세포의 성장을 억제하거나 apoptosis를 유도시켜 암세포를 제거하고자 하는 새로운 항암요법이 주목을 받고 있다^{12,18,20}. 또한 유전자치료법은 21세기의 생명공학산업에 있어서도 큰 비중을 차지할 전망이어서 유전자치료법에 관련된 각종 기술과 정보의 구축은 분자의학적 연구개발에 있어서 대단히 중요한 분야라고 볼 수 있다¹.

이러한 중요성을 감안하여 저자들은 유전자전달의 중추적 기술인 retrovirus감염법과, DNA손상시 가장 핵심적인 방어역할을 하는 p53항암유전

자를 이용하여 종양세포에 항암유전자치료를 시도함으로써, 효율적인 암세포제거 및 성장억제에 관한 기술 및 정보를 구축하고자 본 연구를 실시하여 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 세포주 및 세포배양

Bosc23 packaging cell, NIH 3T3 cell, human skin fibroblast (HSF) 및 Saos2 cell은 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine이 함유된 DMEM high glucose media를 사용하여 36℃, 5% CO₂에서 배양하였고, PA317 packaging cell은 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 1X HAT이 함유된 DMEM high glucose media를 사용하여 36℃, 5% CO₂에서 배양하였다.

2. Trypan blue exclusion assay

0.4% trypan blue 50 µl에 세포 50 µl를 넣고 섞은 후 hemocytometer에 접종하고 1분 후 세포수를 세어 생존세포수를 계수하였으며, 두 개의 시료를 각각 계수 후 그 평균치를 취하였다.

3. BES transfection 및 ecotrophic retrovirus산생

Transfection에 사용한 plasmid들은 wild-type p53 (p53^{WT}) 유전자가 클로닝된 pNLN retroviral vector 및 빈 vector (mock)로서 미국 University of California (San Diego)의 Dr. Jean Wang 및 Dr. Yen Chen으로부터 분양받아 사용하였다. Ecotrophic retrovirus의 산생은 Bosc23 packaging cell을 이용하여 바이러스를 산생시켰다. 즉, retroviral vector plasmid DNA 18 µg을 함유하는 0.25 M CaCl₂ 500 µl를 500 µl의 2X BBS (50 mM BES, 280 mM

CaCl₂, 1.5 mM NaHPO₄)와 섞은 후 상온에 20분간 방치하고 이를 24시간 배양한 5x10⁶ Bosc23 packaging cell plate에 균일하게 dropping한 후, 37°C CO₂ incubator에서 12시간 배양하고 phosphate buffered saline (PBS)로 세척 후 48시간 배양하고, 상층액 (바이러스액)을 0.45 µm filter로 여과한 후 바로 사용하거나 -80°C에 보관하면서 사용하였다.

4. Amphotrophic retrovirus산생

직경 6cm의 culture dish에 2x10⁵의 PA317 packaging cell을 18시간 배양한 후, 배양액을 제거하고 100 µl의 ecotrophic retrovirus들과 8 µg의 polybrene (hexadimethrine bromide)를 포함한 배양액 1 ml로 37°C CO₂ incubator에서 2.5시간 둔 후, 배양액 3 ml를 가하고 3일간 배양하였다. 배양된 세포를 trypsin처리하여 1/20세포를 6cm culture dish에서 G418을 포함하는 selection media로 배양하였다. 3~5일마다 selection media를 갈아주면서 2~3주간 배양한 후 clone을 harvest하여 바이러스산생용 세포주로 사용하였다. Amphotrophic retrovirus를 산생하는 PA317 세포를 G418이 없는 배양액에서 2일간 배양한 후, 배양액을 모아 0.45 µm filter로 여과한 후 곧바로 표적세포에 감염시키거나 -80°C에 보관하면서 사용하였다.

5. Retrovirus감염 및 역가측정

각종 retrovirus의 역가를 측정하기 위해서는 직경 6cm의 culture dish에 2x10⁵의 NIH3T3세포 및 HSF세포를 18시간 배양한 후 배양액을 제거하고, 순차적으로 10배수씩 희석된 retrovirus액 100 µl와 8 µg/ml의 polybrene를 포함한 배양액 1 ml로 37°C CO₂ incubator에서 2.5시간 두어 감염시킨 후 배양액 4 ml를 가하고 3일간 배양하였다. 배양된 세포를 trypsin처리하고 그 중에서 1/20의 세포 (200 µl)를 6cm culture dish에서 G418을 포함하는 selection media로 배양하였다. 3~4일마다 selection media를 갈아주면서 2~3주간 배양 후 나타나는 세포집락을 1% crystal violet으로 염색하고 총 집락수를 계수한 후, retrovirus 10배 희석액 감염시의 집락이 5개일때 1x10⁴ viruses/ml로, 집락이 50개일때 1x10⁵ viruses/ml로, 집락이 500개일때 1x10⁶ viruses/ml로 virus의 역가를 계산하였다⁹⁾.

Amphotrophic p53^{WT} retrovirus 및 amphotrophic mock retrovirus의 발현 및 항암효과 검사는 인간

골육종암세포 (osteosarcoma)인 Saos2세포를 감염시켜 실시하였다.

6. 자외선 조사실험

직경 6cm dish에 2x10⁵ 세포를 접종 후 1일간 배양하고, 각각의 retrovirus를 감염시킨 후 3일 후에 배양액을 제거하고 250 nm 파장의 UV를 45cm거리에서 각각의 세포에 1분간 조사 후, 새 배양액을 넣고 36°C, 5% CO₂에서 10시간~1일간 배양한 다음, 배양액을 제거하고 PBS로 씻은 후 crystal violet로 잔존세포를 염색하여 관찰하였다.

7. SDS-PAGE 및 western blot analysis

Amphotrophic retrovirus에 의한 p53 항암단백질의 발현을 조사하기 위하여 배양된 세포들을 lysis buffer (10 mM Tris-Cl (pH 7.4), 5 mM EDTA (pH 8.0), 130 mM NaCl, 1% Triton X-100), 0.2 M phenyl-methyl-sulfonyl fluoride, proteinase inhibitor cocktail을 넣고 ice에서 30분간 둔 후 원심하여 상층액을 취한 후 Bio-Rad protein assay kit로 정량하였다. 얻어진 단백질 분획을 SDS-PAGE로 전기영동하고 nitrocellulose paper (Millipore사, Immobilon)로 electrotransfer를 시행하였다. Transfer된 membrane을 Blotto용액 (5% skim dry milk in TBS-T buffer)에 넣어 cold chamber내에서 일주야 shaking하였다. Blotto용액을 제거하고 primary Ab용액 (실온)에 2시간 두고 TBS-T buffer로 세척한 다음 secondary Ab용액 (실온)에서 1시간 두었다. 이를 다시 TBS-T buffer로 세척한 후 ECL (Amersham사)로 검출하였다. Primary Ab는 미국 Oncogene Science사의 anti-p53 antibody를 사용하였다.

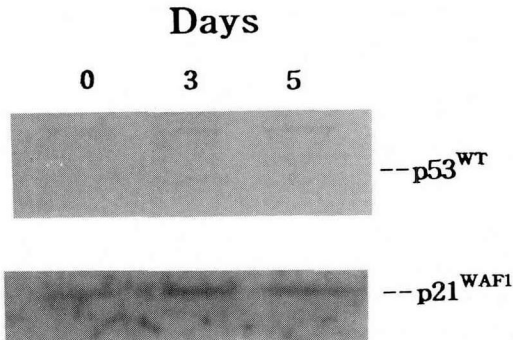
8. Apoptotic DNA fragmentation assay

배양된 0.5x10⁶ cell을 eppendorf-tube로 옮긴 후 2000 rpm에서 2분간 원심하여 세포를 얻은 후 20 µl의 lysis buffer (20 mM EDTA, 100 mM Tris, pH 8.0, 0.8% (W/V) sodium lauryl sarcosine)와 2 µl의 RNase A (5 mg/ml)를 섞고 37°C에서 1시간 incubation한 후, 20 µl의 proteinase K를 넣고 50°C에서 1시간 30분 혹은 overnight incubation 시켰다. 여기에 gel loading buffer 5 µl를 넣고 섞은 후 1.2% agarose gel로 50 volt로 5시간 dry gel electrophoresis를 실시 후 Polaroid촬영을 하여 판독하였다.

Table 1. Titers (viruses/ml) of retroviruses tested

Virus	Ecotrophic virus	Amphotrophic virus	
	Titers in NIH3T3	Titers in NIH3T3	Titers in HSF*
Mock	1.0×10^6	2.7×10^5	1.0×10^5
p53 ^{WT}	5.0×10^5	2.0×10^5	2.0×10^4

*Human skin fibroblast

**Fig. 1.** Western blot of p53^{WT} and p21^{WAF1} in osteosarcoma cells infected with amphotrophic retroviruses expressing wild-type p53 along the time courses after infection.

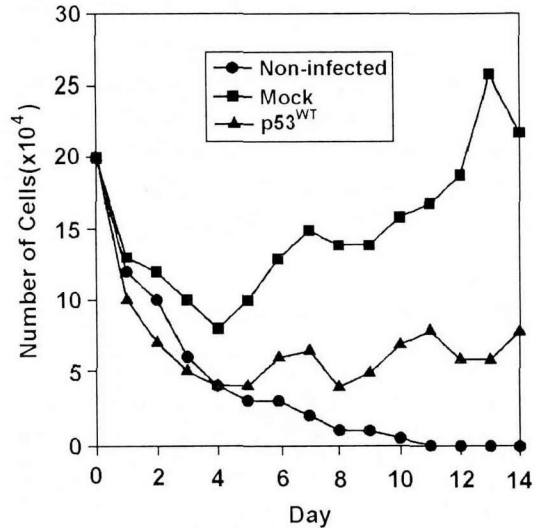
결 과

1. Retrovirus산생 및 역가측정

Bosc23 세포에서 산생된 ecotrophic retrovirus의 역가를 NIH3T3세포를 이용하여 측정한 결과 mock retrovirus는 1.0×10^6 /ml이었고, p53^{WT} retrovirus는 5.0×10^5 /ml이었다. PA317 세포에서 산생된 amphotrophic retrovirus의 역가는 NIH3T3세포를 사용했을 때 mock retrovirus는 2.7×10^5 /ml이었고, p53^{WT} retrovirus는 2.0×10^5 /ml이었으며, HSF를 사용했을 때 mock retrovirus는 1.0×10^5 /ml이었고, p53^{WT} retrovirus는 2.0×10^4 /ml이었다 (Table 1).

2. p53^{WT} 및 p21^{WAF1} 발현도 조사

p53^{WT} retrovirus에 감염된 Saos2 osteosarcoma암 세포에서의 p53^{WT} 및 p21^{WAF1}의 발현도를 조사하기 위하여 western blot을 실시한 결과, p53^{WT} retrovirus감염 후 3~5일경에 아주 미미한 p53의 발현을 볼 수 있었으나 뚜렷한 발현증가는 볼 수 없었고, p21^{WAF1}은 p53^{WT} retrovirus감염 후 3~5일경에 비교적 뚜렷한 발현증가 (3배)를 나타내었다

**Fig. 2.** Viable counting of human skin fibroblasts infected with Mock or p53 retroviruses in media containing G418.

(Fig. 1).

3. p53^{WT} retrovirus감염이 세포 성장에 미치는 영향

G418이 함유된 DMEM배지에서 배양시킬 때, 비감염 HSF세포는 배양 4일경에 75% 이상의 세포가 사망하였고 배양 10일경에는 거의 모든 세포가 사망하였는데, mock retrovirus에 감염된 HSF 세포는 배양 4일경에 50%의 세포가 사망하였다가 세포수가 다시 회복되어 배양 13일 후에는 25%의 세포수 증가를 보였다. p53^{WT} retrovirus에 감염된 HSF세포는 배양 2~4일경에는 비감염세포보다 더 빠른 세포사망을 보여서 배양 3일경에 75% 이상의 세포가 사망하였고 배양 5일경까지 세포수가 감소하다가 그 후에는 약 25~35%의 세포가 잔존하는 상태로 완만한 증가를 보였다 (Fig. 2). 정상적인 DMEM배지에서 배양시킬 때, mock retrovirus에 감염된 HSF세포는 정상성장곡선을 그리며 성장하였고 배양 11일경에 포화상태에 이르렀는데 세포수는 약 8.3×10^5 에 도달하였다. p53^{WT} retrovirus에 감염된 HSF세포는 mock에 비하여 약 1.7배 느린 속도의 성장을 보였고 배양 12일경에 포화상태에 이르렀는데 세포수는 약 4.2×10^5 으로서 mock에 비해 절반 (50.6%)에 불과하였다 (Fig. 3). Osteosarcoma세포인 Saos2암 세포를 p53^{WT} 및 mock retrovirus에 감염시킨 후

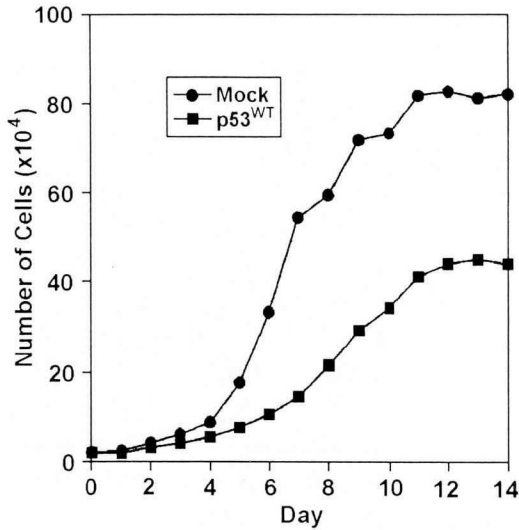


Fig. 3. Viable counting of human skin fibroblasts infected with Mock or p53 retroviruses in normal DMEM media.

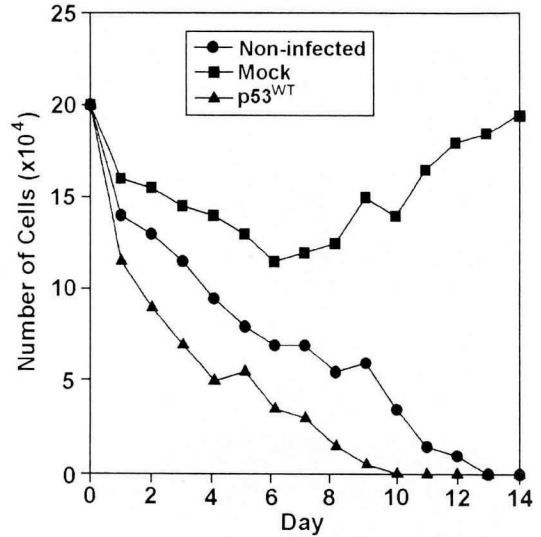


Fig. 4. Viable counting of human osteosarcoma cells infected with Mock or p53 retroviruses in media containing G418.

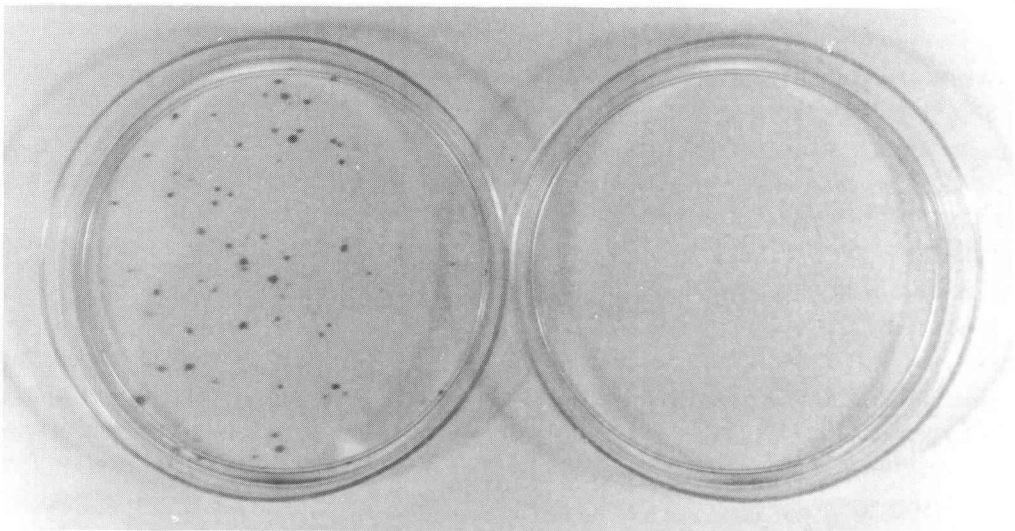


Fig. 5. Colony formations of human osteosarcoma cells 14 days after infections with Mock or p53^{WT} retroviruses in media containing G418.

G418이 함유된 DMEM배지에서 배양시키면서 생존세포수를 측정하였는데 비감염세포는 지속적으로 세포가 사망하여 배양 10일경에는 약 75%의 세포가 사망하였고 배양 13일 이내에 100%의 암세포가 사망하였다. Mock retrovirus에 감염된 암세포는 배양 6일경까지 완전한 세포사망을 보여서 약 35%의 암세포가 사망하였으나 그후 지

속적인 세포수 증가를 보여서 배양 14일경에는 원래의 세포수를 회복하였다. p53^{WT} retrovirus에 감염된 암세포는 급속한 세포사망을 보였는데 배양 2일 후에 50%의 암세포가 사망하였고 배양 4일 후에는 75%의 암세포가 사망하였으며, 배양 10일 이내에 100%의 암세포가 사망하였다 (Fig. 4). Mock 및 p53^{WT} retrovirus에 감염된 Saos2암세

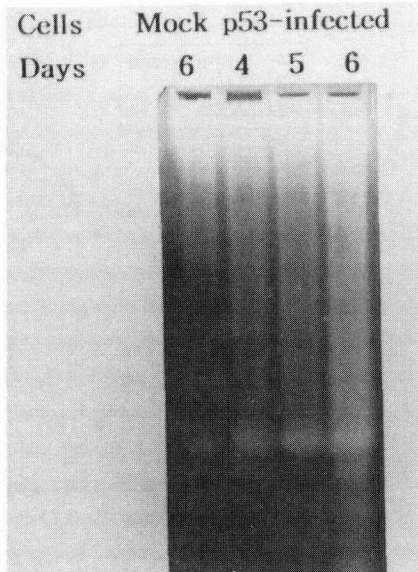


Fig. 6. Apoptotic DNA fragments of wild-type p53 expressing human osteosarcoma cells in media containing G418 (1000 µg/ml). Days: duration of culture in G418 media.

포를 G418이 함유된 DMEM배지에서 14일간 배양시킨 후 형성된 세포집락수를 측정한 결과 mock retrovirus에 감염된 암세포는 132개의 집락을 형성하였고, p53^{WT} retrovirus에 감염된 암세포에서는 집락형성을 관찰할 수 없었고 모든 암세포가 사망하였다 (Fig. 5). p53^{WT} 발현에 따른 암세포 사망의 원인을 조사하기 위해 암세포로부터 DNA를 추출하여 agarose gel전기영동에 의한 apoptotic DNA fragment형성여부를 조사한 결과 mock retrovirus에 감염된 암세포에서는 DNA fragment가 없었으며, p53^{WT} retrovirus에 감염된 암세포에서는 화학요법에 노출 후 4~6일 만에 DNA fragment가 관찰되었다 (Fig. 6).

4. p53^{WT} retrovirus감염과 자외선 조사가 세포 성장에 미치는 영향

Mock 및 p53^{WT} retrovirus에 감염된 Saos2암세포를 250 nm 파장의 자외선으로 45cm거리에서 1분간 조사하고, 12시간 배양시킨 후 염색하여 잔존하는 세포수를 측정한 결과 mock retrovirus에 감염된 암세포는 90% 이상의 세포가 생존하였고, p53^{WT} retrovirus에 감염된 암세포는 5% 이하의 세포만이 잔존하였다 (Fig. 7).

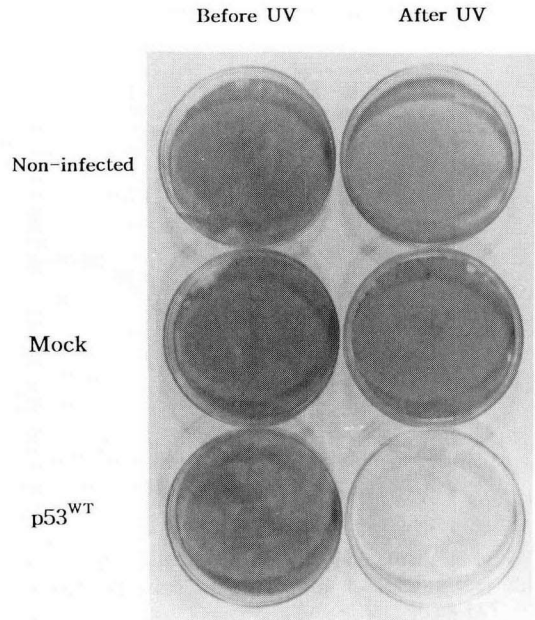


Fig. 7. Growth patterns of human osteosarcoma cells infected with Mock or p53 retroviruses after irradiations with ultraviolet light.

고 찰

암은 세포가 정상적인 조절을 벗어나 성장 및 분화의 균형이 깨어져서 발생하는 것으로 생각되고 있으며 그 중에서도 암유전자와 항암유전자가 중요하다는 것이 보고되어 있다^{3,10,16}. 특히 p53항암유전자는 세포가 S phase로 들어가서 증식할 것인지, G1에 머물면서 손상된 DNA를 수리할 것인지, DNA손상이나 기타의 장애가 너무 심해서 apoptosis로 죽을 것인지 여부를 결정하는 G1 checkpoint의 핵심인자로서 알려져 있다^{4,7,14,19}. 만일 p53항암유전자에 돌연변이나 소실(deletion)이 발생한다면 DNA손상의 수리 혹은 손상 세포의 제거가 제대로 되지 않아서 암세포로 발전될 가능성이 대단히 높게 되며, 실제로 약 55%의 인체 암에서 p53의 이상이 발견되고 있다^{7,8,14}. p53항암유전자에 이상이 있는 암세포에 인위적으로 p53항암유전자를 전달시키면 G1정지에 의한 암세포 성장억제 혹은 apoptosis에 의한 암세포 소멸효과가 기대되므로 암의 새로운 치료방식으로 응용되고 있다^{12,18}.

현재까지 알려진 세포내 유전자 도입방법은 recombinant viral vector법, cationic liposome법, par-

ticle bombardment법, receptor-mediated endocytosis 법 등이 있으나 그중에서도 retrovirus vector계를 이용하는 방법이 효과면이나 안정성면에서 신뢰성이 높고, 도입시킨 유전자를 영구적으로 발현 유도할 수 있기 때문에 가장 널리 쓰이고 있다¹⁾. Retrovirus를 도입했을 때 영구적으로 provirus상태로 머물러야지 잘못되어 바이러스 복제가 일어나면 큰 문제가 발생하는데, 이것을 방지하기 위해 바이러스 복제에 필수적인 packaging관련 유전자를 retroviral vector에서 제거하고 그대신 독립적인 세포계로 하여금 바이러스 packaging기능을 담당하도록 하는, 이른바 packaging cell line체계가 개발되어 있으며, 산생되는 바이러스의 역가를 높이기 위한 많은 노력이 이루어지고 있다^{13,21)}. 이 연구에서는 고효율의 ecotrophic retrovirus를 산생하는 Bosc23 packaging cell을 이용하여 ecotrophic retrovirus를 산생시킨 후, amphotrophic retrovirus를 산생하는 PA317 packaging cell에 ecotrophic retrovirus를 감염시켜 바이러스를 산생케 함으로써 고효율의 amphotrophic retrovirus를 산생시키고자 하였다¹³⁾. 실제로 Bosc23 세포에서 산생된 대조용 (mock) ecotrophic retrovirus의 역가는 배양액 1 ml당 100만개의 바이러스가 산생되어 대단히 높았으며, ecotrophic retrovirus를 PA317 세포에 감염시켜 구축된 세포에서 산생된 amphotrophic mock retrovirus의 역가도 2.7×10^5 /ml로서 비교적 높았다. p53^{WT} retrovirus는 NIH3T3세포 기준으로는 2.0×10^5 /ml이었으며, HSF기준으로는 2.0×10^4 /ml이었는데, 세포나 유전자의 종류에 따라 역가가 다르게 나타나는 이유는 p53항암유전자가 beta-galactosidase나 adenosine deaminase 등과는 달리 세포의 성장에 직접적으로 영향을 주며 발현도에 따라 G1정지나 apoptosis를 유도하는 유전자이기 때문인 것으로 생각된다²⁰⁾. 즉, p53^{WT}의 발현이 높은 세포는 미처 세포집락으로 형성되기 전에 apoptosis를 일으켜 죽어버리고 p53^{WT}의 발현도가 비교적 낮은 세포만 생존하여 집락을 형성하기 때문인 것으로 생각되며^{20,25)}, HSF에 비해 NIH3T3세포에서 역가가 높이 나온 이유로는 HSF는 원래 정상 p53항암유전자를 가진 세포이고 NIH3T3세포는 p53 돌연변이를 가지는 경우가 흔하기 때문에, 도입된 정상 p53의 기능을 길항하기 때문인 것으로 생각된다. 그러므로 실제의 p53^{WT} retrovirus의 역가는 집락수 환산으로 추측한 수치보다 훨씬 더 높을 것으로 생각된다.

DNA손상에 의해 활성화된 p53^{WT}이 세포를 G1에 정지시키는 기전으로는 p53^{WT}의 전사촉진 작용으로 p21^{WAF1}의 발현이 증가되기 때문인 것으로 알려져 있다^{4,6)}. p21^{WAF1}은 cyclin E-cyclin-dependent kinase (CDK) 2, cyclin D-CDK4 및 기타 CDK들을 억제하여 retinoblastoma 항암단백질 (Rb)의 인산화를 억제한다^{15,17)}. 그 결과 Rb는 E2F 등의 전사인자를 계속 억제하여 세포는 G1에 정지하게 된다^{3,7,22,23)}. 이 연구에서도 p53^{WT} retrovirus에 감염된 Saos2 osteosarcoma암세포에서의 p53^{WT} 및 p21^{WAF1} 단백질의 발현도를 조사한 바, p53^{WT} retrovirus감염 후 3~5일경에 아주 미미한 p53^{WT}의 발현을 볼 수 있었으나 뚜렷한 발현증가는 볼 수 없었다. 그러나 CDK2 및 4를 억제하여 세포를 G1에 정지시키는 역할을 하는 p21^{WAF1}은 p53^{WT} retrovirus감염 후 3~5일경에 비교적 뚜렷한 발현증가를 나타낸 것으로 보아 p53^{WT} 유전자 도입으로 인해 p21^{WAF1}의 발현이 증가되었기 때문인 것으로 사료되며^{4,6)}, 이로써 p53항암유전자 도입이 효율적으로 이루어졌음을 알 수 있었다. 그리고 정상적인 DMEM배지에서 세포들을 배양시킬 때, mock retrovirus에 감염된 HSF세포는 정상적으로 성장하였으나, p53^{WT} retrovirus에 감염된 HSF세포는 mock에 비하여 약 1.7배 이상 느린 성장속도와 절반 정도의 포화밀도 (saturation density)를 보여서, p53항암유전자의 도입이 암세포의 성장을 억제하고 암의 포화밀도를 저하시킴을 알 수 있었다.

p53항암유전자는 DNA의 손상이 심한 경우에는 단순한 G1정지효과를 넘어서 apoptosis를 유도하여 손상된 세포를 제거하는 것으로 알려져 있다^{4,19)}. 이 연구에서도 p53^{WT} retrovirus에 감염된 Saos2 osteosarcoma암세포는 화학요법에 매우 민감한 반응을 보여서 Yang *et al.*²⁴⁾의 보고와 유사하였는데, 화학요법제 처리 2일 후에 50%의 암세포가 사망하였고 4일 후에는 75%의 암세포가 사망하였으며, 10일 이내에 100%의 암세포가 사망하였다. 그리고 p53^{WT} retrovirus에 감염된 Saos2 암세포는 방사선에도 매우 예민한 반응을 보였는데, mock retrovirus에 감염된 암세포는 자외선으로 조사한 후 10% 미만의 세포만이 사망한 반면, p53^{WT} retrovirus에 감염된 암세포는 95% 이상의 세포가 사망하였다. p53발현에 따른 암세포 사망의 원인을 apoptotic DNA fragment형성여부로 조사해 본 결과, mock retrovirus에 감염된 암세포에서는 DNA fragment가 없었으며, p53^{WT} retro-

virus에 감염된 암세포에서는 화학요법에 노출 후 4~6일 때에 DNA fragment가 관찰되어 p53발현에 따른 암세포 사멸의 원인이 apoptosis인 것을 알 수 있었다^{4,11)}. 즉, 세포의 스트레스가 적을 때는 p53^{WT}의 발현이 세포성장 정지를 유발하고, 화학요법제나 방사선 조사 등으로 세포의 스트레스가 증가되면 p53^{WT}의 발현이 apoptosis에 의한 세포사멸을 초래함으로써 항암효과를 나타내는 것으로 생각된다^{4,7,19)}. 이러한 사실로 보아 유전자요법에 화학요법이나 방사선요법을 병행함으로써 암세포를 훨씬 더 효과적으로 제거할 수 있을 것으로 생각되며, 앞으로 p53^{WT} 뿐 아니라 Rb를 비롯한 여러 가지 항암유전자에 대한 유전자치료효과가 규명되게 되면, 항암유전자요법은 난치병인 암의 새로운 치료법으로서 매우 중요한 비중을 차지하게 될 것으로 생각된다.

결 론

최근에 미국을 비롯한 선진국에서는 난치병인 암의 유전자 자체를 치료함으로써 암을 근본적으로 치료코자 하는 유전자치료가 큰 관심을 불러일으키고 있다. 이러한 추세에 부응하여 이 연구에서는 항암유전자의 핵심위치를 차지하고 있는 p53항암유전자와, 유전자전달법의 주축을 이루고 있는 retroviral vector계가 인간 골육종암세포의 유전자치료에 미치는 영향을 분석하였다.

Bosc23 세포에서 산생된 ecotrophic p53^{WT} retrovirus의 역가를 NIH3T3세포를 이용하여 측정한 결과 5.0x10⁵/ml이었다. PA317 세포에서 산생된 amphotrophic p53^{WT} retrovirus의 역가는 NIH3T3를 사용했을 때 2.0x10⁵/ml이었으며, human skin fibroblast(HSF)를 사용했을 때는 2.0x10⁴/ml로서, 세포의 종류에 따라 virus의 역가가 큰 차이를 보였다.

p53^{WT} retrovirus에 감염된 Saos2 osteosarcoma암세포에서의 p53^{WT} 발현도는 대조군에 비해 아주 미미한 발현증가를 보였고, p21^{WAF1}은 3배정도의 발현증가를 보였다.

G418이 함유된 DMEM배지에서 p53^{WT} retrovirus에 감염된 HSF세포는 빠른 세포사멸을 보여서 배양 3일경에 75% 이상의 세포가 사망하였고 배양 5일경까지 세포수가 감소하다가 그후에는 약 25-35%의 세포가 잔존하는 상태로 완만한 증가를 보였다. 정상적인 DMEM배지에서 p53 retrovirus에 감염된 HSF세포는 대조군에 비하여 약

1.7배 느린 속도의 성장을 보였고 배양 12일경에 포화상태에 이르렀는데 세포수는 약 4.2x10⁵으로서 대조군에 비해 절반 (50.6%)에 불과하였다. p53^{WT} retrovirus에 감염된 osteosarcoma암세포는 급속한 세포사멸을 보였는데, 배양 4일 후에는 75%의 암세포가 사망하였으며, 배양 10일 이내에 100%의 암세포가 사망하였다. 세포집락수 측정에서도 mock retrovirus에 감염된 암세포는 132개의 집락을 형성한 반면, p53^{WT} retrovirus에 감염된 암세포는 집락형성이 없었고 모든 암세포가 사망하였다. Agarose gel전기영동에 의한 apoptotic DNA fragment분석을 통하여 p53^{WT}발현에 따른 암세포 사멸의 원인이 apoptosis인 것을 알 수 있었다.

p53^{WT} retrovirus에 감염된 osteosarcoma암세포를 자외선으로 조사한 결과 1일 이내에 95% 이상의 암세포가 사망하여, 대조군에 비하여 18배 이상의 예민도를 나타내었다.

이상과 같이 retrovirus를 이용한 암세포내에서의 p53^{WT}항암유전자의 과발현은 암세포사멸 내지 성장억제를 유도하며, 화학요법제나 방사선에 대한 예민도를 높일 수 있을 것으로 판단된다. 결론적으로 레트로바이러스와 p53^{WT}항암유전자를 이용한 유전자치료법을 화학요법 혹은 방사선요법과 병행하여, 향후 골육종과 같은 난치병의 치료에 활용함으로써 더욱 우수한 암치료효과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) 김연수: 레트로바이러스벡터의 제조와 응용. 생화학분자생물학소식 4: 26-33, 1997.
- 2) 김주향, 문유선, 신동환, 송재진, 공수정, 라선영, 김수경, 정숙정, 정현철, 노재경, 민진식, 김병수: 인체 위암 세포주에 retroviral vector를 이용한 p53 종양억제 유전자의 형질도입에 관한 연구. 대한암학회지 29: 754-764, 1997.
- 3) Bartek J, Bartkova J, Lukas J: The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *Curr Opin Cell Biol* 8: 805-814, 1996.
- 4) Bates S, Vousden KH: p53 in signaling checkpoint arrest or apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 6: 12-18, 1996.
- 5) Crystal RG: Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science* 270: 404-410, 1995.

- 6) El-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM: WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* **54**: 1169-1174, 1994.
- 7) Haffner R, Oren M: Biochemical properties and biological effects of p53. *Curr Opin Genet Dev* **5**: 84-90, 1995.
- 8) Ko LJ, Prives C: p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* **10**: 1054-1072, 1996.
- 9) Krieglner M: Gene transfer and expression. A laboratory manual. Stockton Press, New York, 1990.
- 10) Levine AJ: The tumor suppressor genes. *Annu Rev Biochem* **62**: 623-651, 1993.
- 11) Martin SJ, Green DR: Apoptosis and cancer: the failure of controls on cell death and cell survival. *Crit Rev Oncol Hematol* **18**: 137-153, 1995.
- 12) Mujoo K, Maneval DC, Anderson SA, Guttermann JU: Adenoviral-mediated p53 tumor suppressor gene therapy of human ovarian carcinoma. *Oncogene* **12**: 1617-1623, 1996.
- 13) Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D: Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 8392-8396, 1993.
- 14) Prives C, Manfredi JJ: The p53 tumor suppressor protein: meeting review. *Genes Dev* **7**: 529-534, 1993.
- 15) Sherr CJ: Mammalian G1 cyclins. *Cell* **73**: 1059-1065, 1993.
- 16) Sherr CJ: Cancer cell cycles. *Science* **274**: 1672-1677, 1996.
- 17) Sherr CJ, Roberts JM: Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* **9**: 1149-1163, 1995.
- 18) Spitz FR, Nguyen D, Skibber JM, Meyn RE, Cristiano RJ, Roth JA: Adenoviral-mediated wild-type p53 gene expression sensitizes colorectal cancer cells to ionizing radiation. *Clinical Cancer Res* **2**: 1665-1671, 1996.
- 19) Steller H: Mechanisms and Genes of Cellular Suicide. *Science* **267**: 1445-1449, 1995.
- 20) Symonds H, Krall L, Reimington L: p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell* **78**: 703-711, 1994.
- 21) Verma IM: Gene therapy. *Sci Am* **263**: 68-84, 1990.
- 22) Wang JY, Knudsen ES, Welch PJ: The retinoblastoma tumor suppressor protein. *Adv Cancer Res* **64**: 25-85, 1994.
- 23) Weinberg RA: The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**: 323-330, 1995.
- 24) Yang B, Eshleman JR, Berger NA, Markowitz SD: Wild-type p53 protein potentiates cytotoxicity of therapeutic agents in human colon cancer cells. *Clinical Cancer Res* **2**: 1649-1657, 1996.
- 25) Yang B, Stambrook PJ, Markowitz SD: Wild-type p53 demonstrates functional dominance in a human colon carcinoma cell line in which it induces reversible growth arrest. *Clinical Cancer Res* **2**: 1639-1647, 1996.