

# TCDD에 노출된 갑상샘 유두암종 세포주에서 선택적 Cyclooxygenase 2 억제제의 효과

김해성<sup>1,2</sup> · 안광성<sup>1</sup> · 이정현<sup>1</sup>  
채양석<sup>1</sup> · 원남희<sup>1</sup> · 최종상<sup>1</sup>  
김철환<sup>1</sup>

<sup>1</sup>고려대학교 의과대학 병리학교실 및  
<sup>2</sup>제일엔도내과

접 수: 2010년 7월 12일  
게재승인: 2010년 10월 8일

책임저자: 김 철 환  
우 136-705 서울시 성북구 안암동 5가 126-1  
고려대학교안암병원 병리학교실  
전화: +82-2-920-5991  
Fax: +82-2-920-6576  
E-mail: chkap@korea.ac.kr

## Effect of Selective Cyclooxygenase 2 Inhibitor in TCDD Pre-exposed Thyroid Papillary Carcinoma Cell Line

Hae Sung Kim<sup>1,2</sup> · Kwang Sung Ahn<sup>1</sup> · Jeong Hyeon Lee<sup>1</sup> · Yang-Seok Chae<sup>1</sup>  
Nam Hee Won<sup>1</sup> · Jong Sang Choi<sup>1</sup> · Chul Hwan Kim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, Korea University College of Medicine; <sup>2</sup>Cheil Endocrinology Clinic, Seoul, Korea

**Background:** Cyclooxygenase 2 (COX-2) is related to carcinogenesis and progression of cancer. COX-2 has been detected in thyroid cancer. This suggests that COX-2 inhibitor may be useful to control the growth of thyroid cancer cells as well as the progression of thyroid cancer. Tetrachlorodibenzodioxin (TCDD), acting as an inflammatory cytokine, directly induces the expression of COX-2. We examine whether TCDD controls the effect of COX-2 inhibitor on thyroid cancer cells.

**Methods:** The effects of TCDD and celecoxib on thyroid papillary carcinoma cell line (SNU790) were examined using cell proliferation and fluorescence-activated cell sorting analysis. Western blot analysis was performed to determine the expressed COX-2 levels and the cell cycle-related proteins. The matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) expression and gelatinolytic activity were examined using real time-polymerase chain reaction and zymography. **Results:** TCDD directly induced the growth of SNU790 and the expression of cyclin D1, cyclin A, cyclin E, p21 and COX-2. Celecoxib suppressed the growth of SNU790 and the expression of cyclin D1 and cyclin E. Celecoxib reduced the MMP-2 expression and the gelatinolytic activity, but those effects were decreased in the SNU790 by either pre-treatment with TCDD or co-treatment with TCDD and celecoxib. **Conclusions:** Celecoxib effect is directly reduced depending on the exposure to TCDD. TCDD exposure should be considered in the treatment with Celecoxib.

**Key Words:** Cyclooxygenase 2; Cyclooxygenase 2 inhibitors; Tetrachlorodibenzodioxin; Carcinoma, papillary; Thyroid gland

갑상샘암의 성장과 진행에 관여하는 다양한 원인 중에 염증세포에서 유발되는 다양한 시토카인들이 관여하기 때문에 환경호르몬들이 염증 유발에 직접적으로 관여한다는 보고가 최근 발표되고 있다.<sup>1,2</sup> 따라서 환경호르몬인 다이옥신에 의해 다양한 시토카인들이 염증세포를 활성화하고, 이들이 갑상샘암 세포의 성장과 진행에 관여할 수 있다는 근거를 제시할 수 있게 되었다. 즉 염증세포에서 유도되는 다양한 시토카인들이 염증을 유발하는 cyclooxygenase (COX) 2의 활성을 유도하여 갑상샘 암세포의 성장과 혈관 신생(angio genesis)에 직접적으로 영향을 준다는 것이다.

COX는 혈액 응고와 염증에 중요한 영향을 미치는 요소로서 인체 내의 생리화학적 과정 및 종양 진행 과정에 있어 중요한 역할을 하는 arachidonic acid, prostaglandins, thromboxan 등을 형성한다. COX-1은 arachidonic acid에서 prostaglandin으로 합성되는 과정을

촉매하고, COX-2는 유도형 동종형태(inducible isoform)로 발현된다.<sup>3</sup>

COX-2는 mitogen, tumor promoters, 시토카인, 혈청, 그리고 유리지방산 등의 다양한 물질들에 의해 증가되며, 암세포의 세포자멸사(apoptosis)를 방해하고 혈관 신생을 촉진하는데, 이는 nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) 또는 선택적 COX-2 억제제에 의해서 조절된다.<sup>1</sup>

최근에 COX-2의 발현이 대장암, 궤양성대장염 관련 종양, 간암, 헬리코박터 관련 위암, 식도암 및 폐암 등에서 증가되는 것이 알려지면서 각종 암의 발생 및 진행에 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있다.<sup>4-10</sup> 더욱이 COX-2 억제제 투여가 이러한 암 발생의 위험도를 줄이는 것으로 보고되고 있어 이에 대한 관심도 증폭되고 있다.<sup>11-13</sup>

COX-2 발현에 대한 연구에서 대장샘종의 43%, 대장암의 86%에서 COX-2가 발현되었음이 보고되었으며,<sup>4</sup> 또 다른 연구에서는 대장샘종의 66%, 대장암의 92%에서 COX-2가 발현됨으로써 대장 샘종의 세포성장 과정에 COX-2가 관여한다고 보고되었다.<sup>5</sup> 이와 유사하게 림프구성 갑상샘염 및 갑상샘암에서도 뚜렷한 COX-2의 과발현이 보고되어<sup>14-16</sup> 갑상샘암의 세포성장 과정의 조기단계에도 관여할 것으로 추정된다.

이렇듯 지금까지의 연구 결과에 의하면 COX-2의 과발현이 세포자멸사에 대한 저항성과 관련이 있고, COX-2 억제제는 세포증식의 억제와 세포자멸사를 유도하는 것으로 밝혀졌으며,<sup>17,18</sup> *in vivo*에서는 COX-2의 활성 억제가 혈관 신생의 억제와 종양세포 성장의 감소를 가져오는 것으로 보고되고 있다.<sup>19,20</sup> 또 COX-2의 활성은 염증과 직접적인 관련이 있으며, 염증세포의 유발과 관련이 있는 다양한 시토카인들이 COX-2의 과발현을 유도, 과발현된 COX-2는 암 발생과 진행에 직접 혹은 간접적으로 관여한다고 볼 수 있다.<sup>21,22</sup> 이러한 연구 결과는 COX-2 억제제인 celecoxib의 갑상샘암에 대한 항암효과를 기대할 수 있는데, 최근에는 다이옥신이 종양세포를 자극하여 염증 유발에 관여하는 시토카인들의 발현을 증가시키고, 다이옥신에 의하여 증가된 시토카인들이 종양세포의 성장과 생물학적 특성의 변화를 유도할 수 있다고 보고되고 있다.<sup>22,23</sup>

이와 같이 갑상샘암도 내분비 종양으로 환경호르몬, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) 등에 의해 영향을 받을 수 있다는 근거를 제시할 수 있지만, 이에 대한 명확한 기전은 규명되어 있지 않다. 또 갑상샘 암세포가 환경호르몬인 TCDD에 과노출된 경우 갑상샘암의 항암효과에 대한 연구가 밝혀진 바 없어, 본 연구에서는 환경호르몬이 갑상샘암의 치료제로 제시되고 있는 celecoxib의 항암효과에 미치는 영향을 분석하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 세포주 배양

실험에 사용할 갑상샘 유두암종 세포주(SNU790)는 한국 세포주 은행에서 구입하였으며 이 세포주를 열처리 비활성 우태아혈청 (fetal bovine serum)(Gibco, Grand Island, NY, USA) 10%가 첨가된 RPMI-1640 배지(Gibco)에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 환경의 항온 항습 배양기로 배양하였다.

### 세포증식 분석(cell proliferation assay)

세포의 생존은 미토콘드리아의 succinic dehydrogenase에 의해 수용성의 황색 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)가 보라색 MTT formazan 산물로 환원됨을 이용한 MTT assay로 측정하였다. 이때 세포주 SNU790은 각 well 당  $5 \times 10^3$ 으로 96 well plate에 도포

하였으며, celecoxib 또는 TCDD를 각각 특정 농도와 시간에 맞추어 처리한 후, MTT 시약을 각 well 당 5 mg/mL 10  $\mu$ L를 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 배양하였다. 그렇게 반응을 살핀 후 상층액을 제거하고 dimethyl sulfoxide 50  $\mu$ L 를 첨가한 뒤 595 nm에서의 흡광도를 ELISA reader (Uniskan II, Flow Lab., Irvine, UK)를 이용하여 측정하였다.

### 면역조직화학염색

갑상샘 정상 조직과 갑상샘 유두암 파라핀 조직을 4  $\mu$ m로 연속 박절한 다음 자일렌으로 파라핀을 제거한 후 에탄올에서 단계적으로 흡수하였다. 그리고 pH 6.0 구연산 완충액이 포함된 단지에 넣고 전자레인지로 20분간 가열하여 항원의 회복을 시도한 후 차단 과정을 거쳐 1:500으로 희석한 일차 항체 polyclonal anti-prostaglandin E2 (anti-PGE2; BD Pharmingen, San Diego, CA, USA)를 이용 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 그리고 난 후 LSAB kit (Dako, Carpinteria, CA, USA)를 사용하여 면역조직화학염색을 시행하였으며, 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride chromogen (Zymed Lab, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 발색한 후 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하였다.

### Western blot analysis

세포주를 phosphate buffered saline (PBS)으로 수세하고 용해액 (radio immune precipitation assay [RIPA] buffer, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, protease inhibitor cocktail solution)과 혼합한 후 원심 분리하여 상층액을 취하였다. 그런 후 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis 겔을 만들어 일정량의 세포 용해액을 넣고 전기영동한 후 겔을 분리하고 이것을 polyvinylidene fluoride (PVDF; Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA) 판막에 150 mA로 90 분간 전사시켰다. 그리고 PVDF 판막을 Ponceau's 용액에 염색해 단백질 띠를 확인한 후 증류수로 세척하고 Ponceau's 용액을 제거하였다. 그 다음 차단완충액(blocking buffer, tris buffered saline [TBS]+5% skim milk)에서 약 1시간 동안 처리한 후 일차항체들(COX-2, cytochrome P-450 [CYP]1A1, CYP1B1, p65, cyclin D1, cyclin E, cyclin A, cyclin dependent kinase [CDK]2, CDK4, p21)은 blocking buffer에 희석하여 시행하고, 이차 항체는 각각에 대해 horseradish peroxidase linked 항체를 희석하여 반응시킨 후 TBS-T (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20)로 씻었다. 또 PVDF membrane을 enhanced chemiluminescence (ECL) kit 내에 있는 검출액 A, B (Amersham Pharmacia Biotech Inc.)와 동량 혼합 반응시킨 후 hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia Biotech Inc.)에 노출시켜 띠를 얻었다.

## FACScan 유세포 분석기를 이용한 COX-2 억제제 처리 후 세포주기 분석

COX-2 억제 약제로 사용한 약제는 celecoxib (Janssen Pharmaceutica, Titusville, NJ, USA)이며 약제가 포함된 RPMI-1640 배지에서 배양하였다. 이때 약물의 농도는 3단계로 나누어 각각의 세포주에서 실험 전에 신선한 배지에서 희석하였는데, 배양된 세포는 propidium iodide (PI) 염색법(Pharmingen Co., San Diego, CA, USA)을 이용해 세포 주기를 분석하였다.

이때 사용한 PI 염색법은 다음과 같다. 약  $1 \times 10^5$ 의 세포를 2번 PBS로 씻어주고 PI 결합 완충액에 세포를 다시 풀어주었다. 그런 다음 5  $\mu$ L의 propidium iodide solution (Pharmingen Co.)을 tube에 첨가한 후 잘 혼합하여 약 15분간 암실에서 반응시키고 FACScan 유세포 분석기(Epics XL, Coulter, Marseille, France)로 분석하였다.

## 종양세포의 matrix metalloproteinase (MMP) 활성을 분석하기 위한 zymography

Whole cell lysate와 extracellular extracts를 RIPA buffer와 ammonium sulfate fraction 등의 방법으로 분리하였다. 이때 cell extract의 전기영동기는 mini protein II system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하고, 사용된 gel은 2.5 mL의 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8), 3.3 mL의 30% polyacrylamide, 10  $\mu$ L의 10% SDS, 3 mL의 증류수, 100  $\mu$ L의 10% ammonium persulfate, 그리고 2  $\mu$ L의 tetramethylethylenediamine (TEMED)를 구성하고 있는 buffer에 1 mg/mL의 gelatin을 포함하고 있는 10% polyacrylamide 겔과 540  $\mu$ L의 30% acrylamide 500  $\mu$ L의 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 2.83 mL의 distilled water, 40  $\mu$ L의 10% ammonium persulfate, 4  $\mu$ L의 TEMED로 이루어진 4% polyacrylamide stocking 겔을 사용하였다.

검체는 50% glycerol과 0.4% bromophenol blue가 포함된 1 M Tris (pH 6.8)로 이루어진 dye를 1/2로 희석하여 섞어서 사용하였는데, 이때 24 mM Tris, 192 mM glycine, 0.347 mM SDS로 이루어진 buffer상에서 80 V로 2시간 전기영동을 하였다. 그런 후 전기영동으로 얻어진 겔을 2.5% Triton X-100에 넣어 Hoefer rocker (Hoefer Instrument, San Francisco, CA, USA)로 30분간 2회 씻어준 다음, 100 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.005% Brij-35, 0.001% NaNO<sub>3</sub>로 이루어진 collagenase buffer (pH 7.5)로 37°C에서 6시간 동안 반응시켰다. 그리고 0.5% Coomassie brilliant blue G-250 (50% methanol, 10% acetic acid) 염색액에서 염색한 다음 40% methanol과 10% acetic acid로 이루어진 탈염색액으로 탈색시킨 후 band를 확인하였다.

## Real time polymerase chain reaction (PCR)

mRNA 발현을 정량적으로 관찰하기 위해 세포를 배양시킨 후 RNA를 TRIZOL reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 추출하였다. 이렇게 추출한 1  $\mu$ g의 total RNA에 oligo-dT, M-MLV

reverse transcriptase, RNaseOUT, 25 mM dNTP (Invitrogen)를 첨가하여 95°C에서 5분, 42°C에서 60분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

Real time PCR은 assay-on-demand 방법으로 TaqMan probe (Assay ID Hs01548733\_m1, Gene bank accession number NM\_004530; MMP-9: Assay ID Hs00234579\_m1, Gene bank accession number NM\_004994)를 구입한 다음 TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 혼합하여 ABI PRISM® 7700 sequence detection system (Applied Biosystems)으로 quantitative PCR 증폭을 시행하였다. 이때 PCR 반응의 조건은 50°C에서 2분, 95°C에서 10분간 반응시킨 다음 95°C에서 15초, 60°C에서 1분을 40회 반복하여 반응시켰다.

또한 annealing 조건하에서 TaqMan probe는 template DNA와 특이적으로 hybridization하지만 형광은 quencher에 의해 억제되어 있는데, extension 반응 시 Taq polymerase가 가진 5' → 3' exonuclease 활성에 의해 template가 분해되고 quencher에 의한 억제가 해소되어 나타나는 형광을 검출하였다. 그리고 발현 정도를 알고 있는 cDNA를 순차적으로 희석하여 standard curve를 만들고 반응시켜 검출한 형광 값을 endogenous control의 형광값의 비율로 환산하여 각 세포군 간의 mRNA 발현 정도를 비교하였다.

## 통계 처리

GraphPad Prism ver. 4 프로그램(GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA)에 의한 t-test값을 이용하여 통계 처리하였다.

## 결 과

### 갑상샘 유두암종에서 PGE2의 발현

갑상샘암과 COX-2의 발현 유무를 분석하기 위해 갑상샘 조직과 갑상샘 유두암종 조직에서 COX-2의 생성에 직접적으로 영향을 주는 PGE2의 발현을 분석한 결과, 갑상샘 유두암종에서 PGE2가 과발현되는 것이 관찰되었다(Fig. 1). 이러한 결과는 COX-2 억제제가 갑상샘암의 종양치료제로 이용될 수 있다는 근거를 제시하는 것이다.

### SNU790 세포에서 TCDD에 의한 celecoxib의 항암 효과 억제

SNU790을 다양한 TCDD의 농도에 72시간 동안 노출시킨 후, MTT assay의 방법을 이용하여 세포의 성장을 분석한 결과, TCDD에 의하여 SNU790 세포가 성장되는 것이 관찰되었다. 하지만 10 nM 이상의 TCDD 농도에서 SNU790 세포의 성장이 5 nM TCDD보다 낮게 나타났다(Fig. 2A). 특히 SNU790 세포에 celecoxib를 농도 별로 처리했을 때, 농도에 따라 효과적으로 암세포의 성장이 억제되는 것이 관찰되었으며, 72시간을 처리했을 때 IC<sub>50</sub>값이 15 nM로

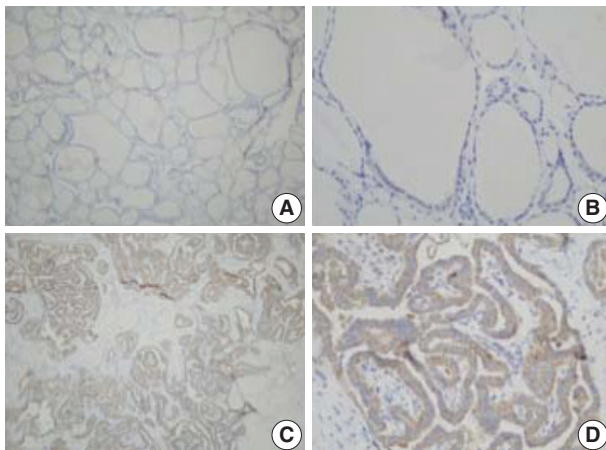
관찰되었다(Fig. 2B). 또 TCDD와 celecoxib를 병합하여 처리했을 때는 celecoxib에 의한 성장 억제가 1.9배 감소하는 것이 관찰되었으며, TCDD에 의하여 성장이 낮은 10 nM TCDD에서 celecoxib에 의한 성장 억제가 가장 효과적으로 나타나는 것이 관찰되었다(Fig. 2C).

TCDD가 갑상샘 암세포의 성장에 어떠한 영향을 주는지를 분석하기 위해 SNU790 세포주에 10 nM TCDD를 처리한 후, 4시간, 8시간, 그리고 12시간 후, 세포주기에 관여하는 단백질을 분석한 결과 TCDD에 의하여 세포주기를 조절하는 단백질의 발현이 조절되는 것이 관찰되었으며, 시간에 따라 cyclin D1, cyclin A, 그리고 cyclin E의 발현이 증가되었다. 또한 TCDD에 의하여 p21의 단백질이 증가되었다(Fig. 3A).

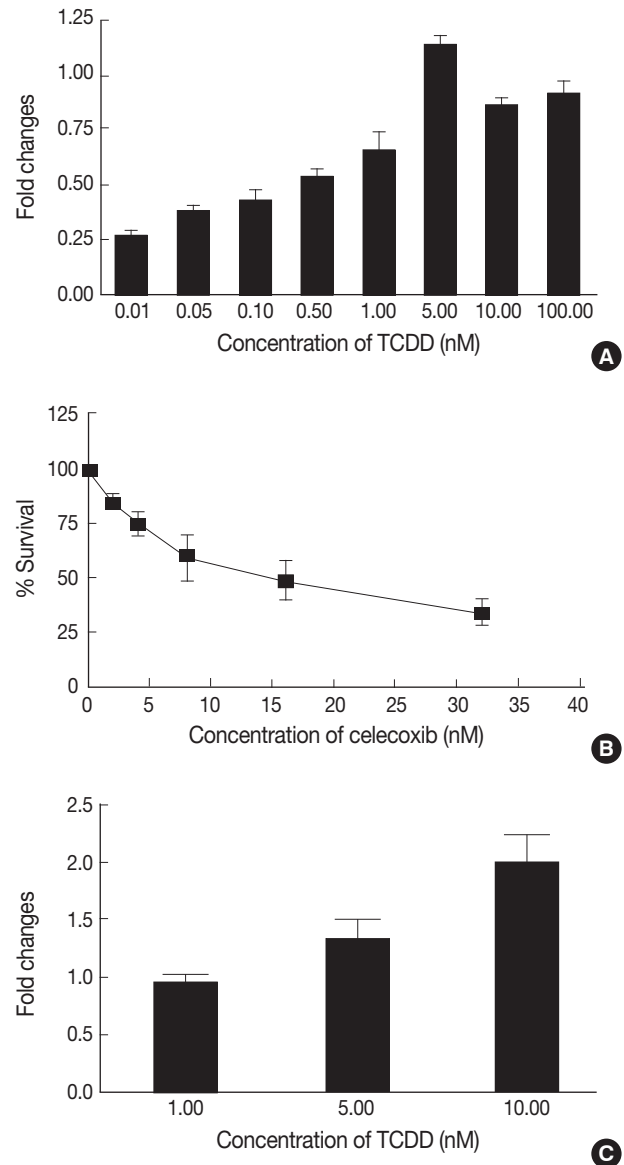
또 TCDD에 의하여 COX-2의 발현이 시간에 따라 증가되는 것이 관찰되었으며, TCDD에 의하여 발현이 조절되는 CYP1A1의 발현도 증가되는 것이 관찰되었다(Fig. 3B). TCDD와 celecoxib를 12시간 동안 각각 혹은 병합처리하여 세포주기 관련 유전자의 발현을 분석한 결과 병합처리했을 때 celecoxib에 의하여 감소된 cyclin D1, cyclin A, 그리고 cyclin E의 발현이 다시 TCDD 단독으로 처리된 경우와 같이 증가되는 것이 관찰되었다(Fig. 4A). 그리고 celecoxib에 의하여 감소된 COX-2의 발현이 TCDD와 병합처리되었을 때 감소되는 정도가 약하게 관찰되었다. CYP1A1의 발현은 celecoxib에 의하여 약간 감소되는 것이 관찰되었지만, 병합처리한 경우는 TCDD를 단독처리한 경우와 같이 CYP1A1의 발현이 증가되는 것이 관찰되었다(Fig. 4B). 또한 fluorescence-activated cell sorting analysis를 수행한 결과, 15 nM celecoxib를 SNU790에 처리한 경우, G1과 G2/M이 억제되는 것이 관찰되었으나, TCDD를 전처리한 경우는 15 nM celecoxib에 의해 억제되지 않는 것이 관찰되었다(Fig. 5).

#### TCDD가 celecoxib에 의한 MMP의 발현 억제에 미치는 영향

Celecoxib는 세포자멸사를 촉진할 뿐 아니라, MMP의 활성에 의

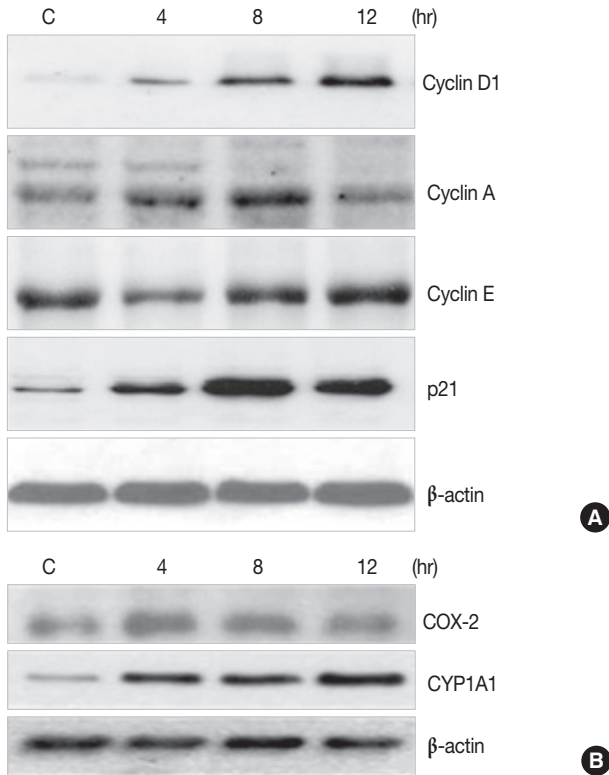


**Fig. 1.** Normal thyroid tissue (A, B) and papillary carcinoma tissue (C, D) are stained with monoclonal antibody against prostaglandin E2 (PGE2). On immunostaining, PGE2 is over-expressed in the papillary carcinoma.



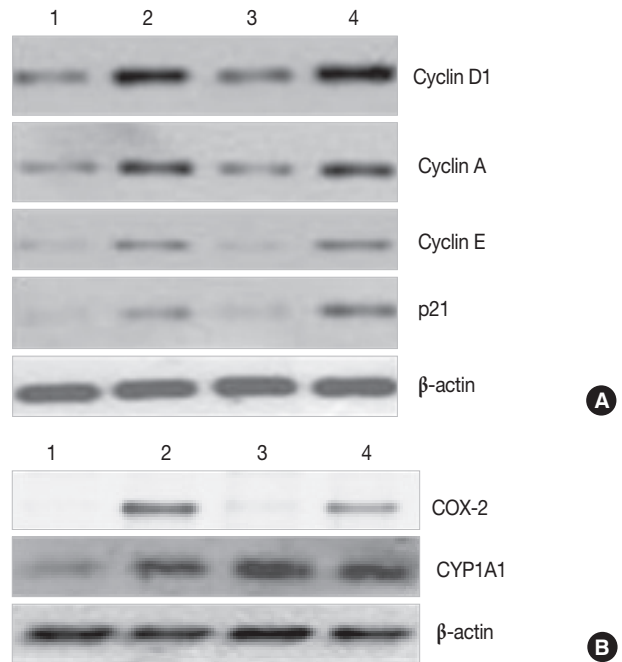
**Fig. 2.** Effects of tetrachlorodibenzodioxin (TCDD) on the celecoxib-mediated growth inhibition of the SNU790 cells. (A) The effect of TCDD on the growth of SNU790 cells. After the SNU790 cells are treated with various concentrations of TCDD for 72 hr, MTT assay are performed to determine the growth effects of TCDD on the SNU790 cells. Fold changes are calculated by dividing the growth of treated cells by the growth of the controls. (B) Effect of celecoxib on the growth inhibition of SNU790 cells. After the SNU790 cells are treated with various concentrations of celecoxib for 72 hr, MTT assay is performed to determine the growth-inhibitory effects of celecoxib on the SNU790 cells. (C) Effects of TCDD on celecoxib-mediated growth inhibition of the SNU790 cells. After the SNU790 cells were treated with co-treated with 15 nM celecoxib and various concentration of TCDD (1 nM, 5 nM, and 10 nM) for 72 hr, MTT assay was performed to determine the effects of TCDD on the growth-inhibitory effects of celecoxib on the SNU790 cells. Fold changes are calculated by dividing the growth of treated cells by the growth of the controls.

한 중앙의 침윤 억제 효과가 있어, 암의 전이에도 억제효과가 있음이 규명되고 있다. 따라서 TCDD가 celecoxib의 MMP 활성 억제 효과를 저해하는지를 분석하기 위해 TCDD와 celecoxib를 SNU790 세포에 병합처리하고, 젤라틴 효소의 활성화와 type IV collagenase인 MMP-2와 MMP-9의 발현을 real time PCR 방법으로 분석하였다. 분

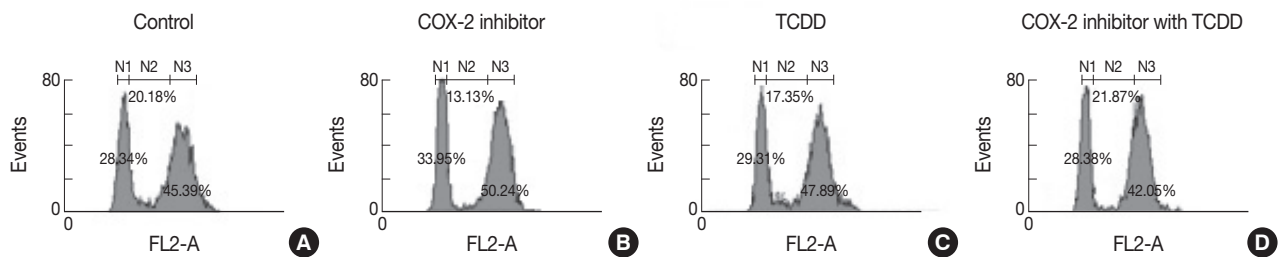


**Fig. 3.** The effects of tetrachlorodibenzodioxin (TCDD) on the cell cycle-related proteins and the cyclooxygenase 2 (COX-2) expression of the SNU790 cells. After the SNU790 cells are treated with 10 nM TCDD for 24 hr, the whole cell lysates are isolated to determine the expressed levels of the cell cycle-related proteins (cyclin D1, cyclin A, and cyclin E) and the COX-2 expression. (A) TCDD induces the expression of cyclin D1, cyclin A, and cyclin E. (B) TCDD induces the expression of COX-2. CYP1A1, cytochrome P-450 1A1.

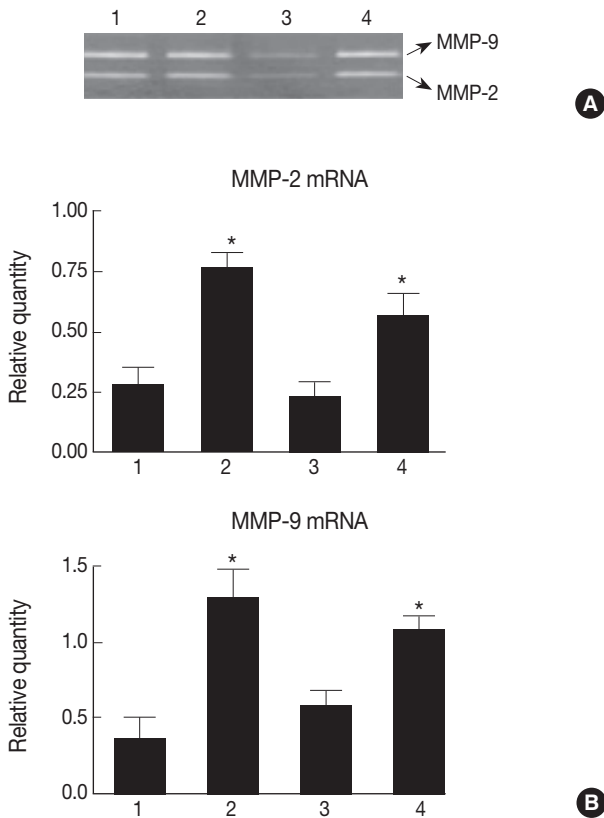
석 결과 gelatinase의 활성이 TCDD에 의하여 증가되는 것이 관찰되지 않았고, celecoxib에 의하여 효과적으로 감소되는 것이 관찰되었다. 그리고 TCDD와 celecoxib를 병합처리한 경우는 celecoxib에 의한 활성 억제 및 발현 억제 효과가 관찰되지 않았다(Fig. 6A).



**Fig. 4.** Tetrachlorodibenzodioxin (TCDD) reduces the inhibitory effects of celecoxib on the cell cycle-related proteins and cyclooxygenase 2 (COX-2) of the SNU790 cells. After the SNU790 cells are treated with a combined treatment of 10 nM TCDD and 15 nM celecoxib for 24 hr, the whole cell lysates are isolated to determine the expressed levels of the cell cycle-related proteins (cyclin D1, cyclin A, and cyclin E) and the COX-2 expression. (A) TCDD reduces the inhibitory effects on the expression of cyclin D1, cyclin A, and cyclin E. (B) TCDD reduces the inhibitory effects on the expression of COX-2. Lanes: 1, Control (The SNU790 cells are treated with vehicle); 2, The SNU790 cells are treated with 10 nM TCDD for 24 hr; 3, The SNU790 cells are treated with 15 nM celecoxib for 24 hr; 4, The SNU790 cells are treated with combined treatment of 10 nM TCDD and 15 nM celecoxib for 24 hr. CYP1A1, cytochrome P-450 1A1.



**Fig. 5.** (A-D) Cell cycle analysis of the SNU790 cells. After the SNU790 cells are treated with 10 nM tetrachlorodibenzodioxin (TCDD) only, 15 nM celecoxib only, and combined treatment of 10 nM TCDD and 15 nM celecoxib for 24 hr, respectively, the SNU790 cells are harvested and then are stained with propidium iodide. The stained SNU790 cells are subjected to analysis of the alternations of the cell cycle. COX-2, cyclooxygenase 2.



**Fig. 6.** Tetrachlorodibenzodioxin (TCDD) reduces inhibitory effects of celecoxib on the cell gelatinolytic activities and matrix metalloproteinase (MMP) expressions of the SNU790 cells. (A) TCDD restores the reduction of gelatinolytic activity by celecoxib. (B) TCDD restores the reduction of MMP-2 and MMP-9 by celecoxib. Lanes: 1, Control (The SNU790 cells are treated with vehicle); 2, The SNU790 cells are treated with 10 nM TCDD for 24 hr; 3, The SNU790 cells are treated with 15 nM celecoxib for 24 hr; 4, The SNU790 cells are treated with a combined treatment of 10 nM TCDD and 15 nM celecoxib for 24 hr.

TCDD에 의하여 증가되는 MMP-2 발현이 선택적 COX-2 억제제의 농도에 따라 조절받는 것을 분석하기 위해 TCDD를 SNU790 세포에서 처리한 후, 다양한 농도의 선택적 COX-2 억제제를 처리하고 real time PCR을 통하여 분석하였다. 분석 결과 TCDD에 의하여 발현이 증가된 MMP-2는 15 nM의 선택적 COX-2 억제제에 의하여 발현이 억제되는 것을 알 수 있었으며( $p < 0.01$ ) (Fig. 6B), 15 nM의 선택적 COX-2 억제제에 의해서는 억제되지 않는 것을 관찰할 수 있었다( $p > 0.05$ ).

## 고 찰

COX-2는 주로 단핵구 염증세포(mononuclear inflammatory cells)에서 발현되는데, 실제로 만성 림프구성 갑상샘염을 비롯해 *Helicobacter pylori* 관련 위염 및 궤양성 대장염에서도 COX-2가

발현된다는 것이 이미 알려진 바 있다.<sup>1</sup> 또 갑상샘 유두암종 및 여포암종에서도 COX-2의 발현이 증가되는 것이 보고되고 있는데, 이는 곧 COX-2가 갑상샘암 발생에 중요한 역할을 한다는 것을 시사하는 것이다. COX-2의 발현은 세포성장과 밀접한 관련이 있으며, arachidonic acid의 대사를 통하여 형성된 물질이 세포자멸사 억제 효과 및 종양세포의 진행에 관련된 혈관 신생과 밀접한 관련이 있어 COX-2의 과발현이 악성 종양세포에서 관찰되고 있고, 이러한 근거로 COX-2의 생물학적 활성이 종양의 진행에 중요한 역할을 하기 때문에 궁극적으로 종양세포에서 COX-2의 발현 조절은 종양세포의 생물학적 특성을 규명하는 데 많은 도움이 될 것이다.<sup>2</sup>

특히 암조직에서 COX-2의 과발현이 세포자멸사에 대한 세포의 저항과 연관이 있으며, 동물실험을 통해 COX-2 억제제를 투여하여 약제가 세포자멸사를 증진시키고 세포성장을 억제한다는 것을 밝혀냈다고 보고하였다.<sup>24</sup> 또한 COX-2가 암 발생에 있어 중요한 시발점이고, 암세포의 혈관 신생을 촉진시킨다고 보고되고 있는데, 현재 NSAIDs를 투여한 대장암 환자군에서 생존율이 증가하였음이 알려지고 있다.<sup>4</sup>

Prescott와 Fitzpatrick<sup>25</sup>은 만성적인 염증이 유전자 불안정을 유발하여 암의 발생을 촉진시킨다고 보고하였으며, Berg 등<sup>26</sup>은 형질 전환된 갑상샘 세포는 interleukin (IL)-1 $\beta$ 와 tumor necrosis factor- $\alpha$ 에 반응하여 COX-2와 IL-6를 분비한다고 보고하였다. 또한 Cornetta 등<sup>24</sup>은 하시모토 갑상샘염에서 갑상샘 세포가 IL-6를 분비하여 갑상샘암을 유발시킬 수 있다고 주장하고, 하시모토 갑상샘염을 가진 환자군 중 100%에서 COX-2의 발현이 나타나며, 갑상샘 유두암종 환자 중 하시모토 갑상샘염이 동반된 경우 66%에서 COX-2의 발현을 나타냈다고 보고하였다. 본 연구에서는 갑상샘 유두암종 조직에서 면역조직화학염색을 통하여 COX-2의 발현을 직접 확인하고자 하였으나 어려움이 있어 COX-2에 의해 합성되는 PGE2의 활성 여부를 면역조직화학염색을 통해 확인하였다. 그 결과 PGE2가 갑상샘암 조직에서 과발현되는 것이 관찰되었으며, 정상 갑상샘 조직에서는 발현이 되지 않는 것이 관찰되었다.

PGE2의 합성은 COX-2의 활성을 입증하는 것이기 때문에 갑상샘암에서 COX-2의 활성을 예측할 수 있었다. 이러한 결과는 선택적 COX-2 억제제가 갑상샘암의 항암제로 이용될 수 있다는 근거를 제시하는 것으로, 본 연구에서 celecoxib의 항암 효과를 분석한 결과 갑상샘 암세포주인 SNU790 세포의 세포자멸사가 효과적으로 유도되었다.

한편 환경 독성 물질이 인체에 노출되는 경우 다양한 측면에서 세포에 영향을 주게 되는데, 최근에 여성호르몬의 노출과 관련된 모델로서 알려진 bisphenol의 유방 관상 상피세포 증식과 상피내암 등과의 관련성이 알려지고 있다. 또한 본 연구에 이용한 TCDD의 유방암세포 및 간암세포와의 관련성도 알려져 있는데<sup>27,28</sup> 이는 환경독성 물질인 TCDD에 의하여 종양세포가 영향을 받을 수 있다는 근거를 제시하고 있다.

TCDD는 mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 활성화와 밀접한 관련이 있는데,<sup>29</sup> MAPK의 활성화는 arachidonic acid의 대사 과

정과 밀접한 관련이 있어, COX-2의 활성을 유도할 수 있다는 근거로 삼을 수 있다. 본 연구에서도 TCDD를 갑상샘암 세포에 처리한 후, COX-2의 발현 양상을 분석했는데, 그 결과 TCDD에 의하여 COX-2의 발현이 증가된 것을 알 수 있었다. 또한 세포주기에 관련된 다양한 유전자가 TCDD에 의하여 시간별로 증가되는 것이 관찰되었는데, 특히 p21의 증가는 세포자멸사와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있지만, TCDD에 의한 p21의 발현 증가는 세포자멸사를 유도하는 것보다는 DNA 복구활동의 활성을 유도하는 세포의 가이드 역할을 하는 것으로 유추된다. 이러한 결과로 TCDD가 선택적 COX-2 억제제에 의한 세포자멸사 억제 효과를 갖도록 유도할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

TCDD를 매개로 한 갑상샘암 세포의 성장이 유도되고 TCDD에 의하여 COX-2의 발현이 촉진되기 때문에 TCDD를 전처리하거나 혹은 병합처리하여 선택적 COX-2 억제제에 의한 세포자멸사를 분석하였다. 연구 결과에서 보여 준 바와 같이 TCDD를 전처리하지 않고 선택적 COX-2 억제제를 처리한 결과 세포주기의 억제가 관찰된 반면, TCDD를 전처리한 후 선택적 COX-2 억제제를 처리한 경우는 세포주기가 억제되지 않는 것을 알 수 있었다. 이로써 TCDD에 의하여 COX-2의 발현이 증가되는 경우는 선택적 COX-2 억제제에 의하여 COX-2의 발현이 억제되지 않으며, TCDD에 의하여 세포 성장이 되는 경우는 선택적 COX-2 억제제에 의하여 성장 억제가 약하게 되는 것을 알 수 있었다. 그리고 이러한 결과는 TCDD가 COX-2를 매개로 세포성장을 유도하기 때문에 선택적 COX-2 억제제에 의한 세포자멸사에 영향을 준다는 사실을 말해주는 것이라고 할 수 있다.

COX-2의 발현과 관련, nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 연관 통로가 활성화되면서 종양 침윤 작용이 알려지게 되었는데,<sup>29</sup> 내분비계 교란 물질인 TCDD의 암 발생 과정 중 MAPK 관련 통로와 NF- $\kappa$ B의 활성에 의한 종양 침윤과 관련된 일련의 과정이 COX-2 관련 과정과 비슷한 것으로 알려져 있어,<sup>25</sup> 본 연구에서도 COX-2의 발현과 TCDD의 연관성이 확인되어 TCDD에 의하여 COX-2의 발현이 증가되고, SNU790 세포주의 세포성장이 유도되는 것을 확인하였다. 이는 곧 TCDD에 의한 COX-2의 발현 증가가 세포성장에 관여할 수 있다는 근거를 제시하는 것이다.

또한 COX-2의 발현 증가는 TCDD에 의한 MAPK 활성 경로와 관련이 있으며 선택적 COX-2 억제제와 TCDD에 의한 세포성장 효과는 SNU790 세포의 세포자멸사로 확인할 수 있었다.

SNU790 세포에서 선택적 COX-2 억제제에 의한 MMP의 활성 억제 효과가 있기 때문에, 암의 진행에 관여하는 종양 침윤 억제 효과가 있지만 TCDD를 재처리하였을 때, COX-2의 발현이 다시 회복되었다. 이러한 결과는 TCDD와 MAPK에 의한 activator protein 1의 활성 그리고 NF- $\kappa$ B의 활성이 밀접한 관련이 있고<sup>29</sup> TCDD에 의한 MAPK의 활성이 COX-2의 발현을 증가시킴으로써 MMP를 유도하는 것을 억제하는 것으로 생각된다.

또한 TCDD를 단독 처리하였을 경우, MMP의 활성 증가가 COX-2의 활성과 병행하여 이루어지기 때문에 본 연구의 결과에서 보여

준 바와 같이 TCDD를 전처리하였을 경우, 선택적 COX-2 억제제가 COX-2를 억제하지만, MMP의 활성 억제는 TCDD에 의하여 직접적인 영향을 억제할 수 없기 때문에 종양 침윤에 관여하는 MMP의 활성이 남아 있는 것으로 유추된다.

결론적으로 갑상샘암의 치료제로 선택적 COX-2 억제제를 이용할 가능성이 있지만, 다이옥신에 과노출된 갑상샘암에서는 세포종식 억제 효과가 미비할 수도 있음을 간과해서는 안 된다. 따라서 이에 대해서는 앞으로 더 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

## 참고문헌

1. Guarino V, Castellone MD, Avilla E, Melillo RM. Thyroid cancer and inflammation. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 321: 94-102.
2. Matsumura F. The significance of the nongenomic pathway in mediating inflammatory signaling of the dioxin-activated Ah receptor to cause toxic effects. *Biochem Pharmacol* 2009; 77: 608-26.
3. Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, *et al.* The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* 2009; 30: 377-86.
4. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994; 107: 1183-8.
5. Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, *et al.* Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 3785-9.
6. Agoff SN, Brentnall TA, Crispin DA, *et al.* The role of cyclooxygenase 2 in ulcerative colitis-associated neoplasia. *Am J Pathol* 2000; 157: 737-45.
7. Koga H, Sakisaka S, Ohishi M, *et al.* Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation. *Hepatology* 1999; 29: 688-96.
8. Sung JJ, Leung WK, Go MY, *et al.* Cyclooxygenase-2 expression in *Helicobacter pylori*-associated premalignant and malignant gastric lesions. *Am J Pathol* 2000; 157: 729-35.
9. Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA, Borchard F, Gabbert HE, Schrör K. Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. *Cancer Res* 1999; 59: 198-204.
10. Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, *et al.* COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer* 2000; 89: 2637-45.
11. Kune GA, Kune S, Watson LF. Colorectal cancer risk, chronic illnesses, operations, and medications: case control results from the Melbourne Colorectal Cancer Study. *Cancer Res* 1988; 48: 4399-404.
12. Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CW Jr. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Engl J Med* 1991; 325: 1593-6.

13. Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ, *et al.* Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993; 328: 1313-6.
14. Cornetta AJ, Russell JP, Cunnane M, Keane WM, Rothstein JL. Cyclooxygenase-2 expression in human thyroid carcinoma and Hashimoto's thyroiditis. *Laryngoscope* 2002; 112: 238-42.
15. Singh B, Shaha AR, Trivedi H, Carew JF, Poluri A, Shah JP. Coexistent Hashimoto's thyroiditis with papillary thyroid carcinoma: impact on presentation, management, and outcome. *Surgery* 1999; 126: 1070-6.
16. Tamimi DM. The association between chronic lymphocytic thyroiditis and thyroid tumors. *Int J Surg Pathol* 2002; 10: 141-6.
17. Sawaoka H, Kawano S, Tsuji S, *et al.* Cyclooxygenase-2 inhibitors suppress the growth of gastric cancer xenografts via induction of apoptosis in nude mice. *Am J Physiol* 1998; 274(6 Pt 1): G1061-7.
18. Liu XH, Yao S, Kirschenbaum A, Levine AC. NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells. *Cancer Res* 1998; 58: 4245-9.
19. Sawaoka H, Tsuji S, Tsujii M, *et al.* Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth in vivo. *Lab Invest* 1999; 79: 1469-77.
20. Williams CS, Tsujii M, Reese J, Dey SK, DuBois RN. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Invest* 2000; 105: 1589-94.
21. Dannenberg AJ, Altorki NK, Boyle JO, *et al.* Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncol* 2001; 2: 544-51.
22. Russell JP, Engiles JB, Rothstein JL. Proinflammatory mediators and genetic background in oncogene mediated tumor progression. *J Immunol* 2004; 172: 4059-67.
23. Portier CJ. Endocrine dismodulation and cancer. *Neuro Endocrinol Lett* 2002; 23 Suppl 2: 43-7.
24. Nose F, Ichikawa T, Fujiwara M, Okayasu I. Up-regulation of cyclooxygenase-2 expression in lymphocytic thyroiditis and thyroid tumors: significant correlation with inducible nitric oxide synthase. *Am J Clin Pathol* 2002; 117: 546-51.
25. Prescott SM, Fitzpatrick FA. Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1470: M69-78.
26. Berg J, Stöcher M, Bogner S, Wölfl S, Pichler R, Stekel H. Inducible cyclooxygenase-2 gene expression in the human thyroid epithelial cell line Nthy-ori3-1. *Inflamm Res* 2000; 49: 139-43.
27. Marquez-Bravo LG, Gierthy JF. Differential expression of estrogen receptor alpha (ERalpha) protein in MCF-7 breast cancer cells chronically exposed to TCDD. *J Cell Biochem* 2008; 103: 636-47.
28. Chao HR, Tsou TC, Li LA, *et al.* Arsenic inhibits induction of cytochrome P450 1A1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in human hepatoma cells. *J Hazard Mater* 2006; 137: 716-22.
29. Kwon MJ, Jeong KS, Choi EJ, Lee BH. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathway in Jurkat T cells. *Pharmacol Toxicol* 2003; 93: 186-90.