

두경부 종양세포주에 대한 Mithramycin A의 세포자멸사 유도성 및 Cisplatin 항암작용 증가효과

이강대¹, 손성환¹, 박종욱², 김영록¹, 이봉주¹, 김주연¹

고신대학교 의과대학 이비인후과학교실¹, 계명대학교 의과대학 면역학교실²

Mithramycin a Induces Apoptosis and Potentiates Anti-tumor Activity of Cisplatin in Head and Neck Cancer Cell Line

Kang-Dae Lee¹, Seong-Hwan Sohn¹, Jong-Wook Park², Young-Rok Kim¹, Bong-Ju Lee¹, Joo-Yeun Kim¹

¹Department of Otolaryngology, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea ; and

²Department of Immunology, Keimyung University College of Medicine, Daegu, Korea

Abstract

Background and Objectives : Cisplatin (CP) is a major chemotherapeutic agent for head and neck cancer. However, cancer cells can get drug resistance through recovering the DNA damage by CP. Mithramycin A (MA) can inhibit gene expression of multidrug resistance gene 1, c-myc or h-ras. The goal of this study is to evaluate the therapeutic effect of MA alone and combination of MA and CP on head and neck cancer cell lines.

Materials and Methods : Two head and neck cancer cell lines (AMC-HN4, AMC-HN7) were treated with MA. The cellular proliferation, apoptosis and protein expression were measured with XTT assay, FACS analysis, and western blotting, respectively after MA treatment in cell lines. In order to know the combination effect of MA with CP, the cancer cell lines were treated with MA, CP, and MA/CP combination, and cellular proliferation, apoptosis and expression of apoptosis-associated proteins were measured.

Results : MA inhibited the proliferation of head and neck cancer cells and induce apoptosis. Increase of caspase activation, PLC- γ 1 fragmentation and percent apoptosis by MA treatment was blocked by z-VAD-fms, but not blocked by N-Acetyl Cystein. Combination of MA and CP significantly inhibited cancer cell growth and increased apoptosis compared to MA and CP alone, and it also suppressed the expression of anti-apoptotic proteins such as XIAP and Mcl-1.

Conclusions : The present study suggests that MA alone and MA/CP combination chemotherapy could be a potential regimen for the control of the head and neck cancer.

Key words : Head and neck cancer, Cisplatin, Mithramycin A, Apoptosis, XIAP

서론

당 항암 화학요법은 진행된 두경부 악성종양에 대한 효과적인 치료방법 중의 하나로서, 종양전이감소, 생존율 증가 및 장기기능보존 등의 장점이 있다. 두경부 종양치료에 사용되는 항암제중 가장 대표적인 약제는 cisplatin (CP) 으로서 DNA를 손상시켜 세포독성을 나타낸다. 그

러나 종양세포는 CP에 의한 DNA 손상을 극복하여 약제 내성을 일으킬 수 있는데 이러한 점은 항암제로서 CP의 활용성을 감소시킨다.^{1,2)}

두경부 종양세포의 CP에 대한 감수성을 증가시키기 위해 여러 가지 물질들을 CP와 병용하여 사용하는 연구들이 진행되고 있다. Gleevec은 CP와 병용시 세포주기를 S/G2에 머물게하여 세포 증식성을 억제시키며³⁾, EGFR tyrosine kinase 억제제인 ZD1839 (Iressa) 역시 CP의 세포 독성과 세포자멸사를 증가시키며,⁴⁾ 세포표면 사멸수용체의 자극을 통해 세포자멸사를 유발하는 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) 및 카레

교신저자 : 이 강 대

주소 : 602-702 부산시 서구 압남동 34번지
고신대학교 복음병원 이비인후과 교실
TEL : 051-990-6284, FAX : 051-245-8539
E-mail : Kdlee@ns.kosinmed.or.kr

에서 추출되는 curcumin 등 다양한 물질들이 CP의 항암성을 증가시키는 것으로 보고되고 있다.⁵⁾ 이러한 물질들은 CP에 대한 종양세포 감수성을 높임으로써 CP의 종양치료 효과를 증가시키고 CP 내성 종양의 출현을 예방할 수 있다. 또 CP의 사용량을 줄임으로써 고용량에 의한 부작용을 줄이는 기대효과를 가질 수 있다.

Mithramycin A (MA)는 *Streptomyces griseus*에서 분리되었으며 plicamycin으로도 불리는 chemotherapeutic agent로서 종양치료를 위해 hydroxyurea 또는 alpha-interferon과 병용되어 사용되어져 왔다.^{6,7)} MA는 tumor necrosis factor (TNF)가 유발하는 세포자멸사에 종양세포가 감수성을 가지게 하며, 백혈병 세포주에 Fas 회로를 활성화 시켜 세포자멸사를 증가시키는 작용을 한다.⁸⁾ MA의 항암 작용기전은 multidrug resistance gene 1, c-myc 또는 h-ras 등의 유전자 promotor에 있는 GC-rich domain에 작용하여 이들의 발현을 제어하는 것이다.⁹⁾ 이러한 사실은 MA가 종양세포의 항암제 감수성을 증가시키는 역할을 하여 항암제에 대한 내성발생을 방지하는데 사용될 수 있음을 의미한다. 그러나 아직 두경부암에서 MA 자체의 항암효과와 기전을 연구한 바가 없으며, 또 두경부 종양에서 MA와 CP를 병용할 때 종양세포가 CP에 더 감수성을 가지게 되는지에 대한 연구는 없다.

본 연구에서는 인간 두경부 종양세포주를 대상으로 MA가 이 세포의 증식억제와 세포자멸사를 일으킬 수 있는지를 규명하고, 또 MA를 CP 병용시 항암효과 변화 및 그 기전을 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상 및 재료

항암제는 CP (동아제약, Korea) 및 MA (Sigma, USA, Fig. 1)를 사용하였으며, 항암제에 의한 세포자멸사 기전을 분석하기 위해 caspase inhibitor인 z-VAD-fmk (Calbiochem, Germany) 및 antioxidant 인 N-acetylcysteine (NAC, Calbiochem, Germany)을 사용하였다. 또 MA 자체 및 MA와 CP 병용에 의한 세포자멸사 관련 단백질 발현 변화를 분석하기 위해 caspase 3 (Santa Cruz, USA), X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP, BD transduction, USA), cellular inhibitor of apoptosis (CIAP 2, Santa Cruz, USA), myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1, Santa Cruz, USA) 및 heat shock protein (HSP) 70 (Santa Cruz, USA)에 대한 항체를 Western blotting 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) 세포배양

두경부 종양세포주 인 AMC-HN4, AMC-HN7 cell을 10% heat-inactivated fetal bovine serum 및 antibiotic-antimycotic(Gibco, USA)가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (Welgene inc, Korea)에 배양하였다.

2) 세포증식성 검사

2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt (XTT) assay를 통해 세포증식성을 측정하였다. 간단히 기술하면 두경부 종양 세포주를 배지에 $2.5-3 \times 10^3$ cells / 100ul 농도로 부유시킨 후 96-Well plates (Nunc, USA)에 100 ul 씩 분주하였다. 24시간 배양하여 세포를 안정화 시킨 후 약물을 첨가하여 48-72시간 배양하였다. 48-72 시간 배양 후 XTT 시약 1 ml 와 phenazine methosulfate 시약 20 ul를 혼합하여 세포가 들어 있는 각 well에 20 ul를 첨가한 후 4시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 반응시키고 450 nm의 파장에서 spectrophotometer (Shimadzu사, Japan)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 세포생존율 (% survival)은 다음의 공식을 이용해 구하였다. 세포생존율 = 약물 처치한 군의 흡광도 / 대조군의 흡광도 X 100.

3) 세포자멸사 분석

항암제가 함유된 배지에서 배양된 세포를 2.5배 trypsin-EDTA (Gibco, USA)로 떼어내어 세포를 수거한 후 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척하였다. PBS 100 ul를 첨가하여 세포를 재부유 시키고 여기에 100% ethanol을 200 ul 첨가하여 4°C에서 1시간 이상 세포를 고정시켰다. 세포를 원심하여 상층을 제거한 후 PBS 100ul를 첨가하여 세포를 부유시켰다. 여기에 50 ug/mL RNase A(Sigma, USA)를 250ul 넣고 37°C에서 30분간 incubation한 후 50 ug/mL propidium iodide(Sigma, USA)를 동량 첨가하고 빛을 차광하여 37°C에서 20분간 반응시켰다. 세포주기분석은 FACS Calibur-A flow cytometer (BD, USA)를 사용하여 세포주기와 % apoptosis를 측정하였다.

4) Western blotting

항암제가 함유된 배지에서 배양된 세포를 수거한 후

0.8 x 10⁶ 개의 세포를 lysis buffer(137 mM NaCl, 15 mM EGTA, 0.1 mM sodium orthovanadate, 15mM MgCl₂ 0.1% Triton X-100, 25mM MOPS, 100uM phenylmethylsulfonylfluoride and 20uM leupeptin, adjusted to pH 7.2) 50- 100ul에 부유시켜 세포를 용해시켰다. 용해된 세포를 12,000rpm으로 30분간 원심하여 상층을 수거하였다. Pierce 사(USA)의 단백질 정량 키트로 단백질 농도를 측정하고 정량한 후 동일량을 polyacrylamide gel에 점종하여 전기영동하였다. 영동 후 Immobilon-P membranes (Millipore corporation, USA)에 단백질을 옮긴 후 항체를 붙여서 ECL Western blotting kit (Millipore corporation, USA)을 이용해 특이적인 단백질을 검출하였다.

결 과

1. MA가 두경부 종양세포 증식에 미치는 영향

MA가 두경부 종양세포 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 96 well 시험관에 AMC-HN4 세포 및 AMC-HN7 세포를 분주하고 여기에 다양한 농도의 MA를 첨가한 뒤 배양하였다. 배양 48시간 및 72시간 후 세포증식 정도를 분석하기 위해 XTT assay를 실시하고 세포생존율을 구하였다. AMC-HN4 및 AMC-HN7 두 세포주에서 MA의 농도가 증가할 수록 세포생존율이 감소하였으며, 배양 72 시간 때 MA의 50% inhibitory concentration (IC₅₀)은 AMC-HN4의 경우 5-10 nM, AMC-HN7의 경우 20-40 nM로 나타났다(Fig. 2).

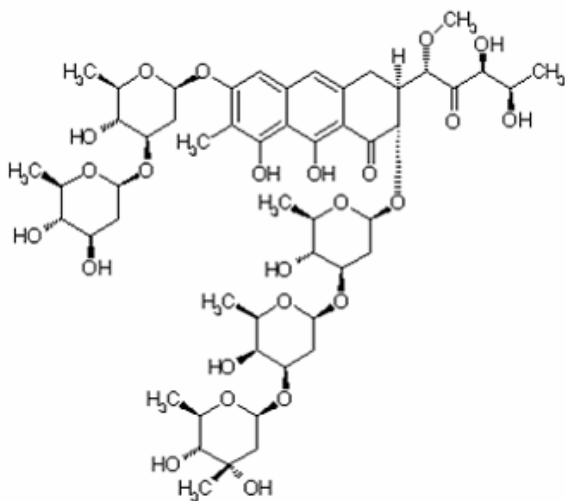


Fig. 1. Structure of Mithramycin A.

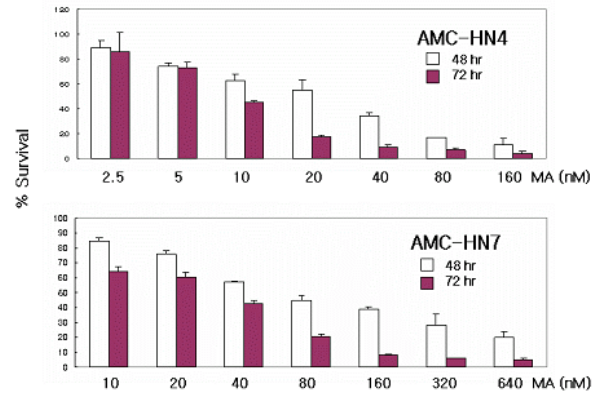


Fig. 2. Effect of MA on the growth of head and neck cancer cell lines. AMC-HN4 and AMC-HN7 cells were cultured in media containing MA for 48 or 72 hours. Cell growth was measured by XTT assay.

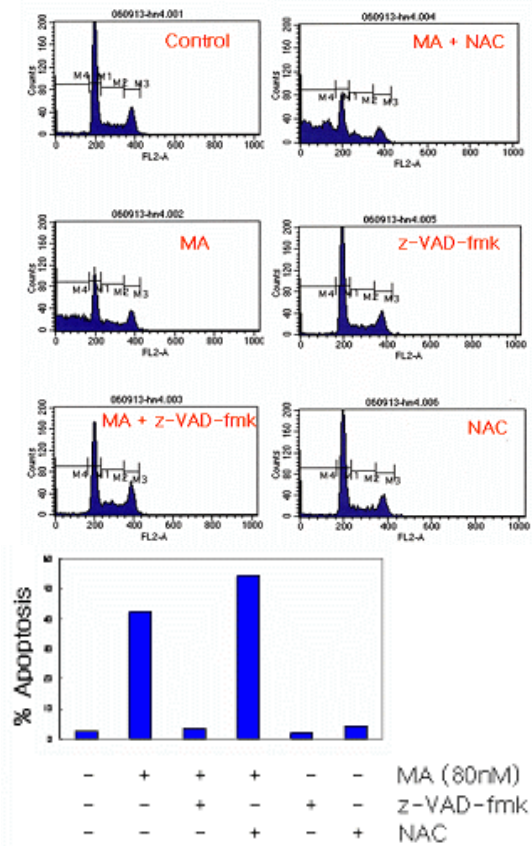


Fig. 3. Caspase-mediated apoptosis induced by MA. AMC- HN4 cells were incubated 50 μ M z-VAD-fmk or 10 mM NAC or solvent for 1 hour before treatment with 80 nM MA. Cells were treated for 24 hours and then evaluated for DNA content after propidium iodide staining, and cell cycles were analyzed.

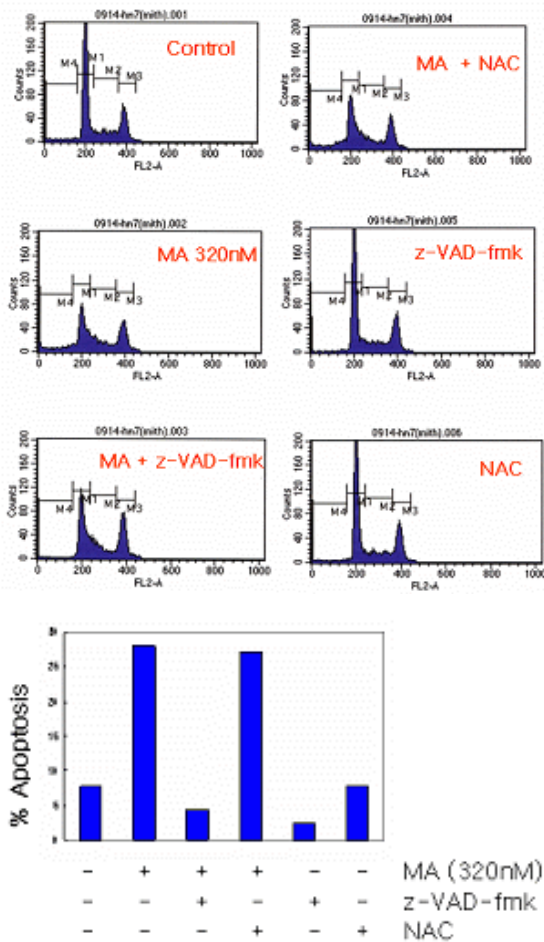


Fig. 4. Caspase-mediated apoptosis induced by MA. AMC-HN7 cells were incubated with 50 μ M z-VAD-fmk or 10 mM NAC or solvent for 1 hour before treatment with 80 nM MA. Cells were treated for 24 hours and then evaluated for DNA content after propidium iodide staining, and cell cycles were analyzed.

2. MA에 의한 두경부 종양세포 세포자멸사 유도성

MA가 두경부 세포의 증식을 억제한 것이 세포자멸사에 의한 것인가를 알아보기 위해 1) AMC-HN4 세포주에 MA를 80 nM 농도로, AMC-HN7 세포주에 MA를 320 nM 농도로 각각 처리한 군과 2) 상기한 바와 같이 MA를 처리한 군에 caspase inhibitor인 Z-VAD 또는 ROS inhibitor인 NAC을 처리한 군을 만들어 24시간 배양한 후 대조군과 더불어 FACS 분석을 하였으며 % apoptotic cell (sub-G1)을 구하였다. AMC-HN4 세포주의 % apoptotic cell은 대조군은 2.55%, MA 단독처리군은 42.53%, MA와 z-VAD-fmk 동시 처리군은 3.21%, MA와 NAC 동시처리군은 54.35%, z-VAD-fmk 단독처리군은 1.87%, NAC 단독처리군은 4.19%로 나타났다(Fig. 3).

AMC-HN7 세포주의 % apoptotic cell은 대조군은 7.79%, MA 단독처리군은 28.09%, MA와 z-VAD-fmk 동시 처리군은 4.37%, MA와 NAC 동시처리군은 27.3%, z-VAD-fmk 단독처리군은 2.49%, NAC 단독처리군은 7.71%로 나타났다(Fig. 4). 이상의 결과로 보아 두 세포주 모두에서 MA를 처리할 경우 대조군에 비해 세포자멸사가 현저히 증가되며, MA에 의해 유발되는 세포자멸사는 z-VAD-fmk에 의해 차단되나 NAC에 의해서는 차단되지 않음을 알 수 있다.

3. MA가 두경부 종양세포주의 PLC- γ 절단에 미치는 영향

MA 처리에 의해 나타나는 세포자멸사가 caspase 의존성인가를 확인하기 위해 AMC-HN4 세포주에 MA를 80 nM 농도로 AMC-HN7 세포주에 MA를 320 nM 농도로 처리한 군과 MA와 z-VAD-fmk 또는 NAC 병용 처리한 군을 각각 만들어 24시간 배양한 후 대조군과 더불어 단백질을 추출하여 caspase 기질인 phospholipase C gamma-1 (PLC- γ 1)의 분절 생성도를 Western blotting을 실시하여 관찰하였다. 두 세포주에서 공통적으로 대조군, z-VAD-fmk 및 NAC을 단독처리한 군에 비해 MA를 처리한 군에서 분절된 PLC- γ 1 분절이 증가되었다. 그러나 MA와 z-VAD-fmk를 같이 처리한 군에서는 PLC- γ 1 분절 증가가 차단되었으며, MA와 NAC을 같이 처리한 군에서는 MA를 단독처리한 군과 같이 PLC- γ 1 분절이 증

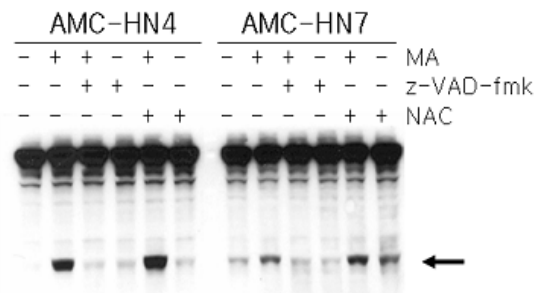


Fig. 5. Effect of z-VAD-fmk and NAC on MA-mediated cleavage of PCL- γ 1. AMC-HN4 and -HN7 cells were incubated 50 μ M z-VAD-fmk or 10 mM NAC or solvent for 1 hour before treatment with 80 nM MA. Cells were treated for 24 hours and then equal amounts of cell lysates (40 μ g) were subjected to electrophoresis and analyzed by Western blot for PCL- γ 1. The proteolytic cleavage of PCL- γ 1 was indicated by arrow.

가됨을 관찰하였다(Fig. 5).

4. MA와 CP 병용이 두경부 종양세포 증식에 미치는 영향

MA와 CP 각각 단독 또는 병용이 두경부 종양세포 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 두 세포주에 MA (10 nM) 및 CP (8 μ M)를 각각 단독 또는 병용하여 처리하고 72 시간 배양한 후 대조군과 더불어 XTT assay를 실시하고 % survival을 구하였다. 두 세포 모두 CP 또는 MA를 단독으로 처리한 군은 % survival이 70% 이상이었으나 두 약제를 병용한 경우 AMC-HN4는 41%,

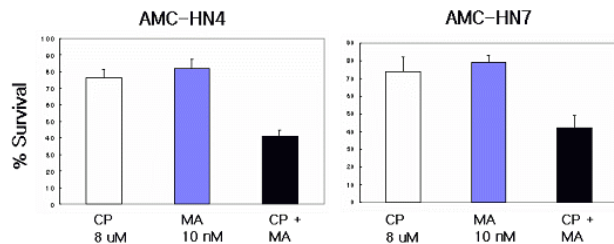


Fig. 6. Treatment with mithramycin A enhances sensitization of head and neck carcinoma cell to cisplatin. HN-4 and HN-7 cells were treated with 8 μ M of CP and/or 10 nM of MA for 72 hours, and % survival was estimated by XTT assay. Data are mean values obtained from three independent experiments and bars represent standard deviation.

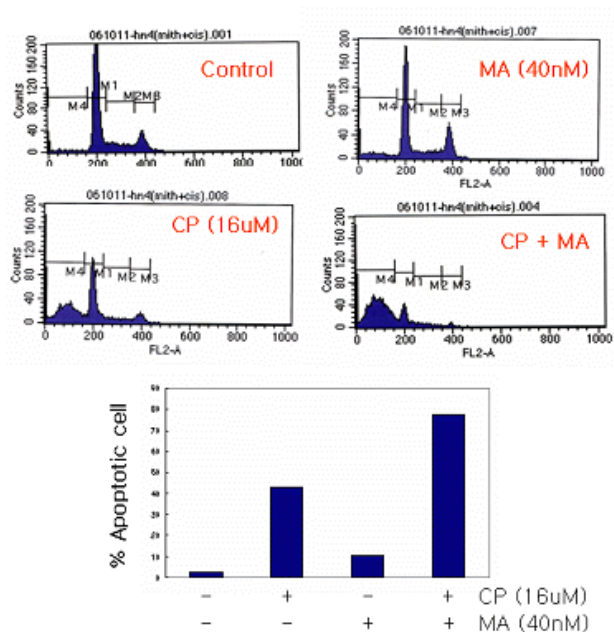


Fig. 7. Combination of MA and CP increased apoptosis of AMC-HN4 cells. AMC-HN4 cells were incubated with 40 nM and/or 16 μ M CP for 24 hours and then evaluated for DNA content after propidium iodide staining.

AMC-HN7은 42%로 세포증식이 현저히 억제됨을 관찰하였다(Fig. 6).

5. MA와 CP 병용이 두경부 종양세포 사멸에 미치는 영향

MA와 CP 병용이 두경부 종양세포 사멸을 증가시키는 것을 알아보기 위하여 AMC-HN4 세포주에 MA (40 nM)와 CP (16 μ M)를 각각 단독 또는 병용하여 처리하고 대조군과 더불어 24시간 배양한 후 FACS 분석을 통해 세포자멸사 정도를 조사하였다. 대조군의 % apoptotic cell (sub-G1)가 2.5%인데 반해 MA 처리군과 CP 처리군은 각각 10.6% 및 43%로 나타났으며, 두 약제를 병용한 경우 77.4%로 나타났다(Fig. 7).

6. MA 및 CP에 의해 발현이 변화되는 세포자멸사 관련 단백질 분석

MA와 CP 병용에 의한 세포자멸사 상승 또는 부가효과의 기전을 규명하기 위하여 AMC-HN4 세포주에 MA와 CP를 각각 40 nM 및 16 μ M 농도로 단독 또는 병용 처리한 후 24시간 배양하였으며, 대조군과 더불어 단백질을 추출하여 Western blotting을 실시하였다. 대조군, CP 단독처리군, MA 단독처리군에 비해 CP와 MA를 병용한 군에서 caspase 활성화와 PLC- γ 1 분절이 증가하였으며, XIAP 및 Mcl-1의 경우 두 약물을 각각 처리한 군에 비해

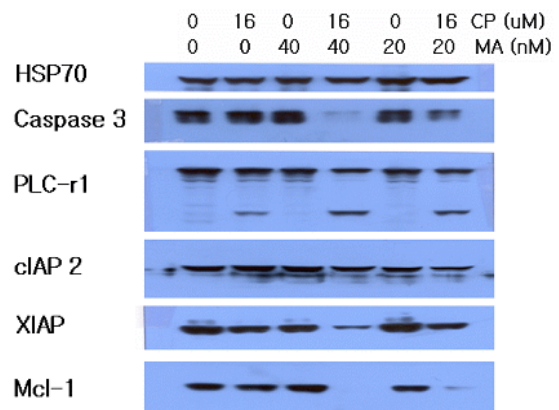


Fig. 8. Combination of MA and CP decreased expression of XIAP and Mcl-1. AMC-HN4 cells were incubated with 20 or 40 nM MA and/or 16 μ M CP for 24 hours and then equal amounts of cell lysates (40 μ g) were subjected to electrophoresis and analyzed by Western blot for caspase 3, PLC-r1, IAPs and Mcl-1.

병용처치한 군에서 단백질 발현이 현저히 감소하였다 (Fig. 8).

고 찰

MA는 *Streptomyces griseus*에서 분리되었으며 hydroxurea 또는 alpha-interferon과 병용되어 종양치료를 위한 chemotherapeutic agent로서 사용되어져 왔다.^{6,7)} 이 연구에서는 MA가 두경부암 세포주에도 효과적으로 작용하여 세포자멸사를 일으키는 것을 밝혀내었다. MA는 두경부 종양세포주인 AMC-HN4와 AMC-HN7의 증식을 억제시키고 세포자멸사를 유발시켰다. MA에 의한 종양 세포주 사멸은 caspase inhibitor인 z-VAD-fmk에 의해 차단되었다. 또 MA 처리에 의해 나타난 PLC- γ 1 분절 역시 z-VAD-fmk 처리에 의해 사라짐을 보아 MA에 의한 두경부 종양세포주의 세포자멸사는 caspase에 의존적임을 알 수 있다.

Caspase를 활성화 시켜 세포자멸사를 일으키는 경로는 크게 3가지, 즉 사멸수용체 매개 세포자멸사, 미토콘드리아 매개 세포자멸사 및 Endoplasmic Reticulum stress 매개 세포자멸사로 분류된다.¹⁰⁾ MA는 bid 활성화를 초래치 않으며 FADD 및 caspase 8 발현을 증가시켜 death-inducing signaling complex 형성을 촉진시키고 그 결과로 세포자멸사를 증가시키는 작용을 한다고 알려져 있다.⁸⁾ 이러한 사실은 MA에 의한 세포자멸사에는 사멸 수용체를 통한 caspase cascade 활성화가 관여함을 나타낸다. 본 연구 결과에서 MA 처리에 의해 유발되는 세포자멸사와 PLC- γ 1 분절 생성이 z-VAD-fmk에 의해서는 차단이 됨으로 보아 caspase에 의존적임을 알 수 있으며, 세포자멸사가 항산화제인 NAC에 의해서는 차단되지 않음으로 보아 MA에 의한 세포자멸사 유발에 reactive oxygen species는 크게 관여하지 않는 것으로 생각된다.

CP는 대표적인 두경부 종양 치료제로서 사용되어져 오고 있으나 두경부 종양에서 CP에 내성인 경우도 많이 보고되고 있다. 두경부 종양세포가 CP에 내성을 획득하는 분자생물학적 기전은 아직 확실히 규명되어 있지는 않으나, CP/DNA 화합물 형성 감소,¹¹⁾ DNA 복구 및 세포주기에 관여하는 유전자의 발현 변화,¹²⁾ 세포내 glutathione 증가¹³⁾ 등이 관여하는 것으로 보고되고 있다. 또 CP는 다른 항암제와 마찬가지로 고환, 조혈계, 신장 및 위장관계 등에 다양한 독성을 나타내고 있다.¹⁴⁾ 따라서 CP에 대한 내성출현을 억제하고 종양에 대한 CP감수

성을 높여 CP 사용량을 줄임으로써 부작용 발생을 줄이는 방법은 임상적으로 매우 중요하게 쓰일 수 있다. MA는 multidrug resistance gene 1, c-myc 또는 h-ras 등의 유전자 promoter에 있는 GC rich domain에 작용하여 이들의 발현을 제어할 수 있으며,⁹⁾ 이러한 특성은 MA가 항암제에 대한 내성을 방지하고 종양세포의 항암제 감수성을 증가시키는 역할을 할 수 있음을 의미한다. 본 연구에서는 MA가 두경부 종양세포주의 CP에 대한 감수성을 증가시키는 것을 알아보기 위하여 두경부 종양세포주에 CP와 준치사량(sublethal dose)의 MA를 처리하고 세포증식과 세포자멸사 유도성을 관찰한 결과 MA는 CP와 병용시 각각 단독 사용에 비해 종양세포 증식억제와 세포자멸사를 더욱 촉진시킴을 알 수 있었다. MA와 CP 병용에 의한 세포자멸사 증가 기전을 규명하기 위해 두 약제를 단독 또는 병용하여 처리하고 단백질을 추출하여 세포자멸 관련 단백질의 변화를 관찰한 결과 MA와 CP 각각 단독 처리 시에 비해 병용시 caspase 3 활성화와 PLC- γ 1 분절화가 현저히 증가하였다. 이는 두 약제 병용에 의한 세포자멸사 증가가 caspase 의존적임을 의미한다. 또 세포자멸사 조절 단백질 중 inhibitor of apoptosis proteins (IAP) 발현을 조사한 결과 두 약제 병용에 의해 XIAP 발현이 현저히 감소됨을 관찰하였다. XIAP는 IAP 계열의 단백질로서 caspase의 작용을 억제하여 세포자멸사를 차단하는 작용을 하며,¹⁵⁾ XIAP 과 발현은 종양세포가 doxorubicin, anoikis, TRAIL, 및 docetaxol 등의 각종 항암물질에 내성을 가지게 하는 작용을 한다.¹⁶⁾ CP는 XIAP의 발현을 감소시키는 작용이 있으나,¹⁷⁾ CP에 내성 종양 세포주의 경우 CP 내성정도에 비례하여 XIAP 발현이 증가되어 있으며,¹⁸⁾ CP가 종양세포의 XIAP 발현을 억제할 수 있는가는 종양세포의 CP에 대한 감수성을 결정하는데 매우 중요하다고 보고되고 있다.¹⁹⁾ 본 결과에서 저용량의 CP 단독만으로는 XIAP 발현저하가 나타나지 않았으나, MA를 CP와 병용시 XIAP 발현이 현저히 저하되고 caspase 활성화에 의한 세포사멸은 증가함을 보였다. 따라서 두 약제 병용에 의한 XIAP 감소는 caspase에 의존적인 세포자멸사에 종양세포가 더욱 감수성을 가지게 한다고 생각된다.

MA와 CP의 병용은 또 다른 세포자멸사 억제단백질인 Mcl-1의 발현을 현저히 차단하였다. Mcl-1은 두경부 악성종양의 92%에서 발현이 되고 있어 두경부 종양의 생존에도 매우 중요한 단백질로 생각된다. Mcl-1은 세포자멸사를 억제하는 Bcl-2 단백질군의 하나로서, 활성화된

(truncated) Bid에 작용하여 cytochrome C 분비를 차단함으로써 세포자멸사를 억제한다.²⁰⁾ 따라서 MA와 CP 병용에 의한 Mcl-1의 발현 억제는 두경부 종양세포의 세포자멸사를 증가시키는 중요기전이라 생각된다.

이 연구를 통하여 MA가 caspase에 의존적으로 두경부 종양세포의 세포자멸사를 유발할 수 있으며, MA를 CP와 병용시 XIAP 및 Mcl-1의 발현을 억제시켜 종양세포의 세포자멸사를 증가시킴을 처음 규명하였다. 이상의 연구결과를 통하여 MA는 단독으로 두경부 종양치료제로서 사용될 수 있으며, 또 CP와 병용하여 CP의 항암력을 증가시키는 보조제로 사용할 수 있다고 생각된다.

결 론

종양세포의 CP에 대한 감수성을 증가시킴으로서 CP에 대한 내성 종양 출현과 CP에 의한 부작용을 줄일 수 있다. 이 연구에서는 MA가 단독으로 두경부 종양을 억제할 수 있는지와 CP와 병용시 종양세포주 사멸이 증가되는가를 조사하였다. MA는 농도의존적으로 두경부 종양 세포주의 증식을 억제하였으며, caspase 의존적으로 세포자멸사를 유발하였다. MA를 CP와 병용시 각각 단독 사용에 비해 세포증식 억제 및 세포자멸사 유발이 현저히 증가하였으며, Western blotting 결과에서 caspase 활성화는 증가되고 XIAP 및 Mcl-1 단백질은 억제됨을 보였다. 이 결과는 두 약제 병용에 의한 세포자멸사가 증가된 기전이 XIAP 발현저하에 의한 caspase 의존적 세포자멸사 증가와 Mcl-1 억제로 인한 미토콘드리아 매개 세포자멸사의 활성화로 생각된다. 이상의 연구결과로 보아 MA는 단독으로 두경부 종양치료제로서 사용될 수 있으며, 또 CP와 병용하여 CP의 항암력을 증가시키는 보조제로 사용할 수 있다고 생각된다.

중심단어 : 두경부암, Cisplatin, Mithramycin A, 세포자멸사, XIAP

References

- 1) Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics. CA Cancer J Clin 49:8-31, 1999
- 2) Pignon JP, Bourhis J, Domenge CD, Designe L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer.

- Lancet 355:949-55, 2000
- 3) Wang-Rodriguez J, Lopez JP, Altuna X, Chu TS, Weisman RA, Ongkeko WM. STI-571 (Gleevec) potentiates the effect of cisplatin in inhibiting the proliferation of head and neck squamous cell carcinoma in vitro. Laryngoscope 116:1409-16, 2006
- 4) Al-Hazzaa A, Bowen ID, Randerson P, Birchall MA. The effect of ZD1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in combination with cisplatin, on apoptosis in SCC-15 cells. Cell Prolif 38:77-86, 2005
- 5) Kim YH, Lee YJ. Time sequence of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and cisplatin treatment is responsible for a complex pattern of synergistic cytotoxicity. J Cell Biochem 98:1284-95, 2006
- 6) Queisser W, Herrmann F, Lindemann A, Anger B, Hiddemann W, Krey U. Therapy of the blast phase of chronic granulocytic leukemia with mithramycin and hydroxyurea. Onkologie 11:145-6, 1988
- 7) Archimbaud E, Troncy J, Sebban C, Guyotat D, Devaux Y, French M, et al. Phase II trial of plicamycin and hydroxyurea in acute myelogenous leukemia. Cancer Chemother Pharmacol 1989;25: 223-5.
- 8) Leroy I, Laurent G, Quillet-Mary A. Mithramycin A activates Fas death pathway in leukemic cell lines. Apoptosis 11:113-9, 2006
- 9) Tagashira M, Kitagawa T, Isonishi S, Okamoto A, Ochiai K, Ohtake Y. Mithramycin represses MDR1 gene expression in vitro, modulating multidrug resistance. Biol Pharm Bull 23:926-9, 2000
- 10) Wilsin MR. Apoptotic signal transduction: emerging pathways. Biochem Cell Biol 76:573-82, 1998
- 11) Yang Z, Faustino PJ, Andrews PA, Monastera R, Rasmussen AA, Ellison CD et al. Decreased cisplatin/DNA adduct formation is associated with cisplatin resistance in human head and neck cancer cell lines. Cancer Chemother Pharmacol 46:255-62, 2000
- 12) Zhang P, Zhang Z, Zhou X, Qiu W, Chen F, Chen W. Identification of genes associated with cisplatin resistance in human oral squamous cell carcinoma cell line. BMC Cancer 6:224, 2006
- 13) Newkirk K, Heffern J, Sloman-Moll E, Sessions RB, Rasmussen AA, Andrews PA et al. Glutathione content but not gamma glutamyl cysteine synthetase mRNA expression predicts cisplatin resistance in head and neck cancer cell lines. Cancer Chemother Pharmacol 40:75-80, 1997
- 14) Ikushima H, Osaki K, Furutani S, Yamashita K, Kawanaka T, Kishida Y, et al. Chemoradiation therapy for cervical cancer: toxicity of concurrent weekly cisplatin. Radiat Med 24:115-21, 2006
- 15) Deveraux QL, Stennicke HR, Salvesen GS, Reed JC. Endogenous inhibitors of caspases. J Clin Immunol 19:388-98, 1999
- 16) Spee B, Jonkers MD, Arends B, Rutteman GR, Rothuizen J, Penning LC. Specific down-regulation of XIAP with RNA interference enhances the sensitivity of canine tumor cell-lines to TRAIL and doxorubicin. Mol Cancer 5:34-43,

2006

- 17) Nomura T, Mimata H, Yamasaki M, Nomura Y. Cisplatin inhibits the expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein in human LNCaP cells. *Urol Oncol* 22:453-60, 2004
- 18) Nomura T, Yamasaki M, Nomura Y, Mimata H. Expression of the inhibitors of apoptosis proteins in cisplatin-resistant prostate cancer cells. *Oncol Rep* 14:993-7, 2005
- 19) Li J, Feng Q, Kim JM, Schneiderman D, Liston P, Li M, et al. Human ovarian cancer and cisplatin resistance: possible role of inhibitor of apoptosis proteins. *Endocrinology* 142:370-80, 2001
- 20) Whisler LC, Wood NB, Caldarelli DD, Hutchinson JC, Panje WR, Friedman M, et al. Regulators of proliferation and apoptosis in carcinoma of the larynx. *Laryngoscope*. 108:630-8, 1998