

인체위암세포주(AGC)의 증식에 미치는 lovastatin의 억제효과

김지연, 김성훈, 서수홍, 최병주, 김현영, 노치환, 김동완, 김기환, 박무인, 구자영

고신대학교 의학부 내과학교실

The effect of Lovastatin on the Human Gastric Carcinoma Cells

Jee Yeon Kim, Seoung Hoon Kim, Soo Hong Seo, Beyoung Ju Choi, Hyun Young Kim,
Chi Hwan No, Dong Wan Kim, Ki Hwan Kim, Moo In Park, Ja Young Koo

Department of Internal Medicine, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Abstract

Background At the first step of cholesterol synthesis, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase(HMG-CoA reductase) catalyzes the formation of mevalonate, which is the precursor of isoprenoid moieties that are incorporated into or linked to several molecules for cell growth and replication, which include Ras, Rho, G proteins and nuclear laminin B. Lovastatin(mevinolin), as an inhibitor of HMG-CoA reductase, blocks mevalonate synthesis, by which also prevents the isoprenylation of several proteins such as Ras, display antitumor effect in experimental models. In the present study the effects of lovastatin on the growth of human gastric carcinoma cell line, AGS cells were examined and the effects of 5-fluorouracil(5-FU) were also studied. Cell cycle analysis was done to examine the mechanisms for the inhibitory effects of lovastatin. **Methods** The growth of AGS cells were examined by counting cell number on one and three days treatment with 0.2umol/L, 0.4umol/L, 0.8umol/L, 1.6umol/L, 3.2umol/L lovastatin, and 0.1ug/ml, 0.3ug/ml 5-FU, after plating AGS cells into 35nm² plastic dishes at a density of 10*10⁴ cells/dish. The reversibility of the effects of lovastatin was examined on one day to seven days treatment with 0.8umol/L lovastatin after seeding 10*10⁴ cells/dish. To examine the mechanisms for the inhibitory effects of lovastatin, cell cycle analysis was done on the cells after four days treatment with 0.8umol/L lovastatin. **Results** Lovastatin significantly inhibited the growth of AGS cells in a dose-dependent fashion(p<0.05). Forty-eight percent inhibition of growth was found at an lovastatin concentration of 0.8umol/L and ninety-three percent inhibition of growth was found at an lovastatin concentration of 3.2umol/L after 4 days treatment. The inhibitory effect of lovastatin on the growth of AGS cells was firstly shown at the concentration of 0.4umol/L. The removal of lovastatin by a media change after 24hours treatment of lovastatin was note different from that of control group, which was not treated by lovastatin. Lovastatin combined with 5-FU significantly inhibited the growth of AGS cells in a dose-dependent fasion compared to lovastatin or 5-FU alone(p<0.05), which suggested additive effect of the two drugs. After four days treatment with 0.8umol/L lovastatin, the fraction of cells in G0-G1 phase, S phase and G2-M phase was 51.5%, 31.5%, 17.0% respectively in the control group, and 50.6%, 32.6%, 16.7% in the lovastatin group(0.8umol/L), showing no significant differences between the two. **Conclusions** Lovastatin significantly inhibited the growth of AGS cells in a dose-dependent fashion, The inhibitory effect for lovastatin on the growth of AGS cells was reversible since the growth of AGS cells after removal of lovastatin by a media change after 24-48hours treatment of lovastatin was note different from that of control group which was note treated by lovastatin. The reversibility of growth inhibition suggests that lovastatin is not a non-specific cytotoxin for AGS cells. This is the first report that lovastatin may be very useful for the treatment of gastric carcinoma, especially in conjunction with 5-FU, because the concentrations(0.2-3.2umol/L) used in our study were within the ranges of steady-state concentrations(0.15-0.3umol/L) attainable in human serum by chronic administration of maximum recommended dose(80mg/day) of lovastatin and additive effect of lovastatin and 5-FU. More studies by animal experiments and clinical trials are needed to establish lovastatin as an anticancer drug for human gastric carcinoma.

Key words: Lovastatin, 5-FU, human gastric carcinoma cells(AGS)

서론

위암은 진단시에 이미 병의 진행이 많이 되어 있어서 수술로서 완치가 불가능한 경우가 많고, 이러한 경우에는 항암치료나 방사선치료등을 시도하지만 그 효과가 좋지 않고 부작용 또한 적지 않아서 만족할 만한 치료법이 되지는 못한다.¹⁾ 따라서 이러한 항암제와 작용기전이 다르면서도 병용 투여시에 항암제의 부작용을 줄이거나 항암제의 효과를 증강시킴으로써 그 치료효과를 높일 수 있는 약물들에 대한 연구는 매우 바람직하며 또한 필요한 실정인데, 이러한 약물들 중의 하나로 lovastatin(mevinolin)을 들 수 있다.

lovastatin²⁾은 지질의 대사가 암에 미치는 영향에 대해서 연구하던 중 암에 대한 작용이 밝혀진 약물이다. 지질의 대사가 암에 미치는 영향에 대해서 Fugamalli등³⁾은 암세포에서 콜레스테롤합성이 많이 이루어 진다는 것을 처음 밝혔고, 그 후 Maltese등⁴⁾은 인체내에서 자체적으로 생산되는 콜레스테롤의 합성에 관계하며 그 속도를 조절하는 주요 효소인 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA(HMG-CoA) reductase가 암조직에서 증가하는 것을 밝혔다. HMG-CoA reductase는 콜레스테롤 합성의 초기 단계인 Hydroxymethylglutaryl-CoA에서 mevalonic acid(mevalonate)의 합성을 촉매하는 microsomal 효소이며, 이에 의해서 합성되는 mevalonate는 콜레스테롤합성의 중간단계에서 콜레스테롤외에 세포의 여러 종류의 단백질에 결합해서 그 단백질들을 세포막에 부착시키거나 그 단백질들의 활동을 조절하는 isoprenoids를 합성하는데 중요한 전구물질로 작용한다.⁵⁻⁷⁾

이렇게 isoprenoid와 결합함으로써 활성화되는 단백질로서는 haem A, ubiquinone, dolichol, isopentyladenine 및 farnesylated proteins이 있는데, 특히 farnesyl transferase(FTase)에 의해 생성되는 farnesyl화 단백질 가운데는 Ras, Rho, G-protein, nuclear laminin B등 세포신호전달이나 세포분열에 관여함으로써 세포분열 및 증식에 관여하는 인자들이 많이 있고, 이러한 인자들의 합성을 담당하는 효소들, 특히 HMG-CoA reductase나 FTase등의 작용을 억제할 수 있는 약물들은 암의 증식을 억제하는 것이 밝혀 졌으며,^{8,9)} 이 중 HMG-CoA reductase 억제약물로 lovastatin²⁾이 있다.

lovastatin은 *Aspergillus terreus*곰팡이의 발효산

물로서 불활성화되어 있는 화합물인데 가수분해에 의해서 수종의 대사산물을 생산하며,²⁾ 이 대사산물들이 콜레스테롤 합성경로의 초기산물인 mevalonate의 합성을 촉진하는 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMG-CoA reductase)를 억제하여 Ras 암 유전자산물인 Ras 단백질의 활성화에 필요한 세포막 부착에 필요한 farnesyl의 생산을 저하시킴으로써 결과적으로 ras암유전자의 활성화를 막는 작용을 하며,⁵⁻⁷⁾ 실험실에서 세포주기진행을 억제시키고,⁸⁻¹⁰⁾ 세포증식을 억제하거나 세포자연사를 유도하며,¹¹⁻¹³⁾ 동물실험에서는 암의 성장을 저해하는 작용을 가지고 있다.¹⁴⁾

따라서 이 lovastatin에 대해서 대장암, 간암, 췌장암, 방광암, 중추신경계통의 암 및 급성골수백혈병등 여러 종류의암에 대해 연구들¹⁵⁻¹⁹⁾이 되어 있으나 위암에 대해서는 지금까지 연구된 바가 없다. 이 에 본 연구에서는 lovastatin이 위암의 치료에 도움이 될지를 좀 더 자세히 구명하기 위해 세포배양실험을 통하여 lovastatin이 AGS 인체 위암세포(이하 AGS세포라 함)의 증식에 미치는 효과를 조사하고, 기존의 항암제 5-fluorouracil(5-FU)과의 병용효과를 조사하였다. 또한 그 작용기전을 좀 더 자세히 구명하기 위해 증식억제에 따르는 각 세포주기별 비율을 flow cytometry를 이용하여 분석하였다.

재료 및 방법

1. 재료

lovastatin(mevinolin), 5-FU 및 DMSO(dimethyl sulfoxide)는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, RPMI 1640, fetal bovine serum(FBS), 0.05% trypsin-0.02% EDTA 그리고 100units/ml penicillin-streptomycin은 GIBCO사(USA)로부터 구입하여 사용하였다. lovastatin은 실험할 때에 DMSO 용액에 녹여서 바로 사용하였고, 5-FU는 실험할 때에 PBS에 녹여 바로 사용하였다.

2. 세포 배양

AGS 세포는 한국세포주은행(AGS, KCLB No. 21739)으로부터 분양받아 배양하면서 실험에 사용하였고, 세포배양은 CO₂ incubator(Sanyo, model MCO96,

Japan)를 사용하였다. AGS 세포는 100units/ml의 penicilin-streptomycin과 10%의 FBS가 함유된 RPMI 1640을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 각각의 암세포는 일주일에 2~3회 refeeding하고 6~7일 만에 PBS로 세척한 후 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하였다. 분리된 세포를 원심분리하여 집적된 암세포에 배지를 넣고 피펫으로 암세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 6~7일 마다 분주하여 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. 계대 배양시 각각의 passage number를 기록하였고 passage number가 10회 이상일 때는 새로운 암세포를 액체질소 탱크로부터 꺼내어 다시 배양하여 실험하였다.

3. Lovastatin의 AGS 세포 증식억제 효과

증식기에 있는 AGS 세포를 PBS로 세척한 후 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심분리한 후 집적된 암세포를 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 6 well plate에 10×10^4 cells/well 농도로 분주하여 24시간 배양하였다. 암세포가 plate에 부착되었음을 확인한 후, 10% FBS가 있는 배지에 0.2 μ mol/L, 0.4 μ mol/L, 0.8 μ mol/L, 1.6 μ mol/L, 3.2 μ mol/L 농도의 lovastatin 10 μ l를 각각 3 well에 첨가하고(triplicate), 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 부착세포는 시료처리한 날로부터 1일, 3일 후 및 2일, 4일 후에, 증식된 세포를 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 분리하여 각 세포 수를 hemocytometer로 측정하였으며, 이 때 세포의 생존여부는 trypan blue염색으로 확인하였고, 그렇게 측정된 세포 수를 0.4% DMSO용액만을 첨가한 대조군의 세포 수와 비교하여 암세포 증식 억제효과를 관찰하였다.

4. Lovastatin의 AGS 세포 증식억제 효과의 가역성

lovastatin이 AGS 세포에 미치는 증식억제작용의 가역성 여부를 조사하기 위해서 증식기에 있는 AGS 세포를 PBS로 세척한 후 0.05% trypsin-0.02% 10% FBS가 있는 배지로 갈아 준 후 EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심분리한 후 집적된 암세포를 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 6 well plate에 10×10^4 cells/well 농도로 seeding하여 24시간 배양하였다.

암세포가 plate에 부착되었음을 확인한 후, 10% FBS가 있는 배지로 갈아 주면서 3 well에는 lovastatin 0.8 μ mol/L를 첨가하고 다른 3 well에는 대조군으로서 0.4% DMSO용액을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 다시 24시간 및 48시간 배양한 후에 10% FBS가 있는 배지로 갈아 주면서 세포 수를 계산하였고(0일), 그 후 1일, 3일, 5일 및 7일 째에 증식된 세포를 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 분리하여 각 세포수를 hemocytometer로 측정하였고, 그렇게 측정된 세포 수를 양군 간에 비교하여 암세포 증식 억제효과의 가역성 여부를 관찰하였다.

5. lovastatin과 5-FU가 AGS 세포의 증식에 미치는 상호작용

lovastatin과 5-FU가 AGS 세포의 증식에 미치는 상호작용을 알기 위해서 증식기에 있는 AGS 세포를 PBS로 세척한 후 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심분리한 후, 집적된 암세포를 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 6 well plate에 10×10^4 cells/well 농도로 분주하여 하룻밤 배양하였다. 암세포가 plate에 부착되었음을 확인한 후, 10% FBS가 있는 배지에 대조군, lovastatin 0.1 μ mol/L, lovastatin 0.2 μ mol/L, 5-FU 0.1 μ g/ml, 5-FU 0.3 μ g/ml, 5-FU 0.1 μ g/ml + lovastatin 0.1 μ mol/L, 5-FU 0.1 μ g/ml + lovastatin 0.1 μ mol/L, 5-FU 0.3 μ g/ml + lovastatin 0.2 μ mol/L 의 8군으로 나누어 3 well에 첨가하고(triplicate), 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 부착세포는 시료처리한 날로부터 4일 후에, 증식된 세포를 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 분리하였다. 그렇게 하여 분리된 세포들의 수를 hemocytometer로 측정하여 대조군과 비교하여 각 군의 암세포 증식 억제효과를 관찰하였다.

6. Flow cytometry를 이용한 세포주기 분석

lovastatin가 AGS 세포에 있어서 cell cycle의 어느 단계를 지연시키는지 flow cytometry를 이용하여 2회 시행, 분석하였다. lovastatin 0.8 μ mol/L를 첨가한 배지에서 4일간 배양된 세포를 PBS용액으로 수세한 후, 4°C에서 30분간 70% ethanol로 고정하였다. 고정 후 RNase A(Sigma, USA)를 넣어서 RNA를 처리하

고 DNA intercalating dye인 propidium iodide(Sigma, USA)로 DNA를 염색하여 Becton Dickinson FACStar Flow Cytometer 및 Becton Dickinson Cell Fit Software를 이용하여 세포주기를 비교 분석하였다.

7. 통계학적 분석

실험 결과에 대한 분석은 일원분산분석(ANOVA) 중의 Duncan's multiple range test를 이용하였으며, p값이 0.05 미만일 때 의미있는 것으로 간주하였다.

결과

1. Lovastatin의 AGS 세포 증식억제 효과

lovastatin 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 의 첨가 후 1일째의 AGS 세포 수는 $(44.3 \pm 12.7)(\times 10^4)$ 였고, 0.4% DMSO만 가한 대조군의 AGS 세포 수는 $(49.7 \pm 7.8)(\times 10^4)$ 로서 lovastatin 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 첨가군에서 대조군에 비하여 증식이 약간 억제 되었으나(10.9%) 통계적인 유의성은 없었다. 그리고 이러한 경향은 3일째의 성적에서도 나타나서 lovastatin 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 을 첨가한 군의 AGS 세포 수는 $(61.7 \pm 7.6)(\times 10^4)$ 로서 대조군의 $(71.7 \pm 0.6)(\times 10^4)$ 과 비하여 큰 차이가 없었다. 그러나 첨가된 lovastatin 농도가 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 인 경우 약물 첨가 후 1일째의 AGS 세포 수는 $(27.3 \pm 3.5)(\times 10^4)$ 로서 대조군의 $(49.7 \pm 7.4)(\times 10^4)$ 보다 AGS 세포 수가 훨씬 적음으로써($p < 0.05$) 약물 첨가 후 1일째부터 AGS 세포의 증식이 현저하게 억제되었고(45.1%), 약물 첨가 후 3일째도 약물첨가군의 세포 수는 $(49.7 \pm 7.4)(\times 10^4)$ 로서 대조군의 $(71.7 \pm 0.6)(\times 10^4)$ 보다 유의하게 그 증식이 억제되었다($p < 0.05$).

이러한 lovastatin의 AGS 세포 증식억제효과는 농도에 비례하여 저명해 저서, 그 농도를 0.8 $\mu\text{mol/L}$, 1.6 $\mu\text{mol/L}$, 3.2 $\mu\text{mol/L}$ 로 증가시킴에 따라 1일째와 3일째 모두 농도에 비례하여 증식이 점점 더 많이 억제되었다. 즉, 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 의 경우 1일째와 3일째의 AGS 세포수가 각각 $(21.7 \pm 7.5, 32.0 \pm 4.6) \times 10^4$, 1.6 $\mu\text{mol/L}$ 의 경우 $(19.3 \pm 2.1, 19.7 \pm 3.5) \times 10^4$, 3.2 $\mu\text{mol/L}$ 의 경우 $(15.7 \pm 2.5, 15.0 \pm 1.0) \times 10^4$ 로서 대조군의 $(49.7 \pm 7.8, 71.7 \pm 0.6) \times 10^4$ 에 비하여 lovastatin의 농도에 비례해서 유의하게 그 증식이 억제됨을 보여

주었다($p < 0.05$). 특히 lovastatin 3.2 $\mu\text{mol/L}$ 을 첨가한 후 3일째의 AGS 세포 수가 $(15.0 \pm 1.0) \times 10^4$ 로서 대조군의 $(71.7 \pm 0.6)(\times 10^4)$ 에 비하여 79.1%의 증식억제를 보였고, 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 농도에서는 대조군에 비해 55%의 증식억제를 보였다(Table 1, Fig. 1).

Table 1. Effects of lovastatin on 1 day and 3 days treatment of AGS cells.

$\mu\text{mol/L}$	cell number $\times 10^4$	
	1 day	3 days
0	49.7 ± 7.8^b	71.7 ± 0.6^a
0.2	44.3 ± 12.7^b	61.7 ± 7.6^a
0.4	27.3 ± 3.5^{cd}	49.7 ± 7.4^b
0.8	21.7 ± 7.5^{de}	32.0 ± 4.6^c
1.6	19.3 ± 2.1^{de}	19.7 ± 3.5^{de}
3.2	15.7 ± 2.5^e	15.0 ± 1.0^e

^{a-e} Means with the different letters in the same column are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

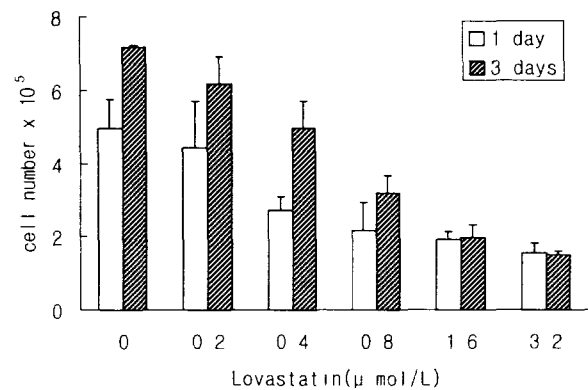


Fig. 1. Effects of lovastatin on 1 day and 3 days treatment of AGS cells.

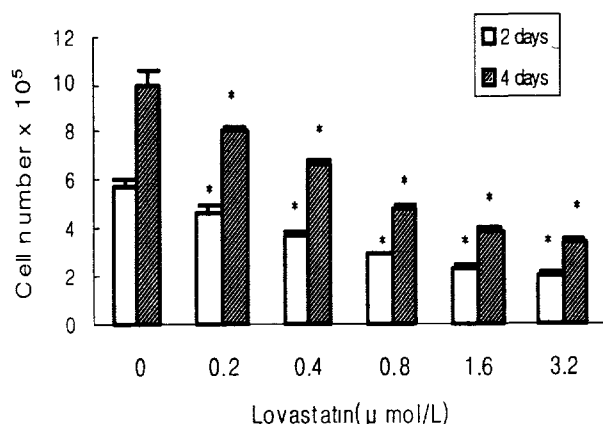
* $p < 0.05$ vs. control

그리고 이러한 경향은 lovastatin을 첨가한 후 2일 및 4일째에 세포 수를 조사했던 결과에서도 동일한 경향을 보였으며, 특히 2일 및 4일째에는 lovastatin 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 을 첨가한 군에서도 그 세포수가 각각 $(45.7 \pm 2.5) \times 10^4$ 및 $(80.7 \pm 2.1) \times 10^4$ 로서 대조군의 $(57.7 \pm 2.1) \times 10^4$ 및 $(98.3 \pm 7.5) \times 10^4$ 보다 유의하게 낮았다($p < 0.05$)(Table 2, Fig. 2).

Table 2. Effects of lovastatin on 2 days and 4 days treatment of AGS cells.

$\mu\text{mol/L}$	cell number $\times 10^4$	
	2 days	4 days
0	57.7 ± 2.1^a	98.3 ± 7.6^a
0.2	45.7 ± 2.5^e	80.7 ± 2.1^b
0.4	37.3 ± 1.2^{fg}	66.7 ± 2.5^c
0.8	28.3 ± 1.5^h	48.0 ± 2.6^e
1.6	24.0 ± 1.0^{hi}	39.0 ± 1.0^f
3.2	20.3 ± 1.5^i	33.6 ± 1.2^g

^{a~i} Means with the different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

Fig 2. Effects of lovastatin on 2 days and 4 days treatment of AGS cells. * $p < 0.05$ vs. control

2. Lovastatin의 AGS 세포 증식억제 효과의 가역성

lovastatin의 증식억제작용의 가역성을 보고자 한 실험에서, lovastatin 첨가군에서 lovastatin을 제거한 지 1일후의 세포 수는 $(25.0 \pm 4.6) \times 10^4$ 로서 대조군의 세포 수 $(44.9 \pm 9) \times 10^4$ 보다 훨씬 적었지만($p < 0.05$), 제거후 3, 5, 7일째의 세포 수는 lovastatin 첨가군에서는 각각 $(45.7 \pm 18.3) \times 10^4$, $(96.7 \pm 9.5) \times 10^4$, $(104.7 \pm 2.1) \times 10^4$ 였고 대조군에서는 $(57.3 \pm 4.2) \times 10^4$, $(111.7 \pm 6.1) \times 10^4$, $(115.0 \pm 10.4) \times 10^4$ 으로서 양군사이에 큰 차이를 보이지 않았다(Table 3 및 Fig. 3).

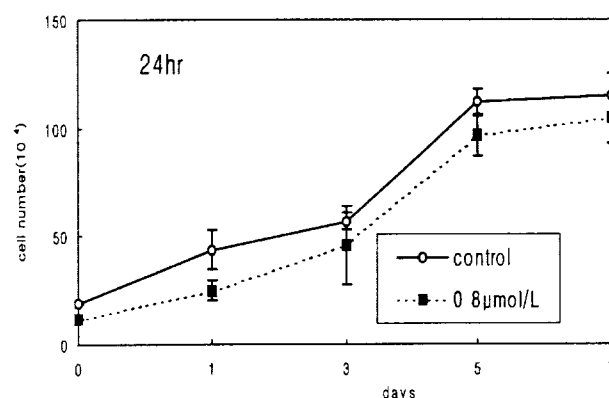
Table 3. Reversibility of the effects of lovastatin($0.8 \mu\text{mol/L}$) on the growth of AGS cells.

	Cell number $\times 10^4$				
	0day	1days	3days	5days	7days
Control	18.3 ± 0.6^e	43.7 ± 9.1^c	57.3 ± 4.2^b	111.7 ± 6.1^{ab}	115.0 ± 10.4^a
Lovastatin removed ¹⁾		$2.4^{1)}$	1.3	1.9	1.0
Lovastatin	13.3 ± 1.2^f	25.0 ± 4.6^d	45.7 ± 18.3^c	96.7 ± 9.5^b	104.7 ± 2.1^{ab}
removed ¹⁾		1.9	1.8	1.5	1.1

⁺ lovastatin treatment for 24 hours followed by replacement with lovastatin-free medium.

^{a~f} Means with the different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

¹⁾ growth ratio

Fig 3. Reversibility of effects of lovastatin($0.8 \mu\text{mol/L}$) on the growth of AGS cells. Open circles; control group, closed squares; lovastatin treatment for 24 hr followed by replacement with lovastatin-free medium.

이러한 경향은 lovastatin $0.8 \mu\text{mol/L}$ 를 첨가해서 48시간 동안 배양시킨 후에 동일한 조건으로 AGS 세포의 증식을 관찰한 성적에서도 비슷한 경향을 보였다. 즉 48시간 동안 lovastatin $0.8 \mu\text{mol/L}$ 를 첨가한 후에 이를 제거한 군과 대조군의 1, 3, 5, 7일째의 세포 수는 각각 $(22.0 \pm 1.4) \times 10^4$, $(67.0 \pm 3.0) \times 10^4$, $(136.3 \pm 1.2) \times 10^4$, $(145.0 \pm 6.9) \times 10^4$ 및 $(48.0 \pm 2.8) \times 10^4$, $(84.7 \pm 12.7) \times 10^4$, $(160.0 \pm 13.9) \times 10^4$, $(177.0 \pm 8.7) \times 10^4$ 로서 양군 사이에 세포증식에 있어서 큰 차이가 없었으므로, lovastatin의 증식 억제 작용이 가역적임을 분명히 나타내었다. 또한 lovastatin 첨가군에서 lovastatin을 제거한 날(0일)과 제거한 후 1일사이의

증식비율은 1.9로서 대조군의 2.4보다 낮았으나, 제거한지 1일과 3일사이의 증식비율은 1.8로서 대조군의 1.3보다 더 높았으며, 이러한 경향은 lovastatin 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 를 첨가해서 48시간 동안 배양시킨 후에 동일한 조건으로 AGS 세포의 증식을 관찰한 성적에서는 lovastatin을 제거한 후 1일과 3일사이에서 양군의 증식율의 차이가 더 현저한 경향을 보임으로써, lovastatin의 증식 억제 작용이 가역적임을 더욱 분명히 나타내었다(Table 4, Fig. 4).

Table 4. Reversibility of the effects of lovastatin(0.8 $\mu\text{mol/L}$) on the growth of AGS cells

	Cell number $\times 10^4$				
	0day	1days	3days	5days	7days
Control	263 $\pm$ 1.5 ^e	480 $\pm$ 2.8 ^e	847 $\pm$ 12.7 ^e	1600 $\pm$ 13.9 ^{ab}	1770 $\pm$ 8.7 ^a
		1.8 ¹⁾	1.8	1.9	1.1
Lovastatin	123 $\pm$ 0.6 ^f	220 $\pm$ 1.4 ^f	67.0 $\pm$ 3.0 ^{cd}	136.3 $\pm$ 1.2 ^b	145.0 $\pm$ 6.9 ^{ab}
removed ⁺		1.8	3.0	2.0	1.1

⁺ lovastatin treatment for 48 hours followed by replacement with lovastatin-free medium.

^{a~f} Means with the different letters in the same column are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

¹⁾ growth ratio

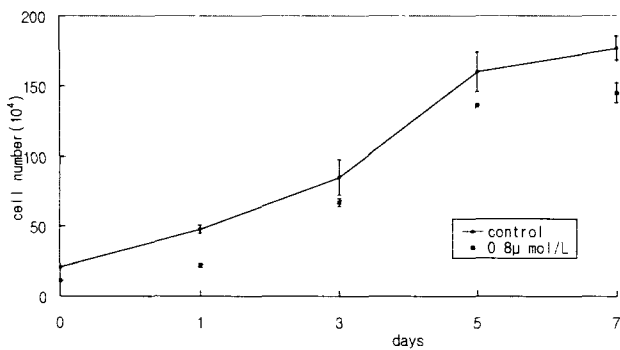


Fig 4. Reversibility of effects of lovastatin(0.8 $\mu\text{mol/L}$) on the growth of AGS cells. Open circles; control group, closed squares; lovastatin treatment for 48 h followed by replacement with lovastatin-free medium.

3. Lovastatin과 5-FU가 AGS 세포의 증식에 미치는 상호작용

배양 4일째의 대조군의 AGS 세포 수는 (126 $\pm$ 7.4) $\times 10^4$

였고, 5-FU를 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 를 첨가한 군의 AGS 세포 수는 (95 $\pm$ 2.9) $\times 10^4$ 였으며, lovastatin 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 를 첨가한 군의 세포 수는 (113 $\pm$ 8.7) $\times 10^4$ 로서 양군 모두 대조군보다 유의하게 세포의 증식이 억제되었으며, 이러한 경향은 나머지 나머지 여섯 군에서도 더욱 뚜렷하여져서 대조군에 비하여 모두 유의하게 세포의 증식이 억제되었다($p < 0.05$). 그리고 5-FU 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 첨가군의 AGS 세포 수는 (95 $\pm$ 2.9) $\times 10^4$ 이었고, lovastatin 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 첨가군의 세포 수는 (93 $\pm$ 1.0) $\times 10^4$ 로서 5-FU 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 과 lovastatin 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 의 증식 억제 효과가 비슷함을 나타내었다 (Table 5).

Table 5. Effects of lovastatin($\mu\text{mol/L}$) and/or 5-fluorouracil ($\mu\text{g/ml}$) on 4 days treatment of AGS cells.

	cell number $\times 10^4$	inhibition rate ¹⁾
Control	126 $\pm$ 7.4 ^a	
5-FU 0.1	95 $\pm$ 2.9 ^e	24.6
5-FU 0.3	84 $\pm$ 1.0 ^d	33.3
Lova 0.1	113 $\pm$ 8.7 ^b	10.3
Lova 0.2	93 $\pm$ 1.0 ^{cd}	26.2
5-FU 0.1 + Lova 0.1	89 $\pm$ 4.5 ^{cd}	29.4
5-FU 0.3 + Lova 0.1	71 $\pm$ 5.3 ^e	43.7
5-FU 0.3 + Lova 0.2	59 $\pm$ 6.5 ^f	53.2

^{a~f} Means with the different letters are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

¹⁾ growth ratio

그리고 5-FU의 증식억제 작용에 미치는 lovastatin의 영향을 살펴보면, 5-FU 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 과 lovastatin 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 를 같이 첨가한 군의 AGS 세포 수는 (89 $\pm$ 4.5) $\times 10^4$ 으로서 5-FU 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 만을 첨가한 군의 (95 $\pm$ 2.9) $\times 10^4$ 과는 큰 차이가 없었으나, lovastatin 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 을 단독 첨가군의 (113 $\pm$ 8.7) $\times 10^4$ 에 비하여는 세포 수가 현저히 적었다($p < 0.05$). 이로써 lovastatin 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 의 첨가는 5-FU 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 단독첨가에 의한 AGS 세포에 대한 증식억제효과에 큰 영향을 미치지 못하였으나, lovastatin 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 의 증식억제 효과에는 5-FU 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 의 첨가가 상당한 영향을 미침을 알 수 있었다(Fig. 5).

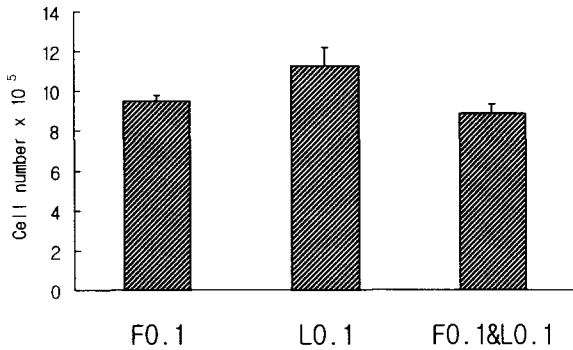


Fig 5. Effects of lovastatin ($\mu\text{mol/L}$) and/or 5-FU ($\mu\text{g/ml}$) on 4 days treatment of AGS cells. * $p < 0.05$
F: treatment with 5-FU
L: treatment with lovastatin
F & L: treatment with 5-FU & lovastatin

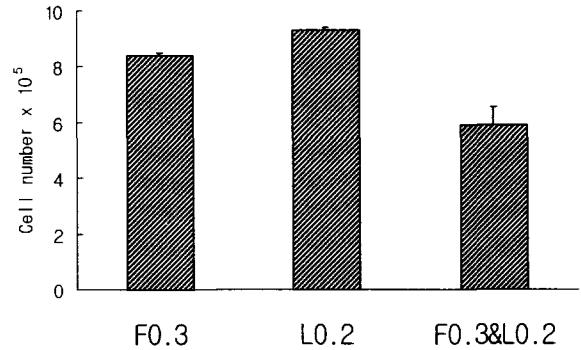


Fig 7. Effects of lovastatin ($\mu\text{mol/L}$) and/or 5-FU ($\mu\text{g/ml}$) on 4 days treatment of AGS cells. * $p < 0.05$
F: treatment with 5-FU
L: treatment with lovastatin
F & L: treatment with 5-FU & lovastatin

한편 5-FU 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 과 lovastatin 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 의 병용첨가군의 세포 수는 $(71 \pm 5.3) \times 10^4$ 로서 5-FU 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 만을 첨가한 군의 $(84 \pm 1.0) \times 10^4$ 이나 lovastatin 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 단독 첨가군의 $(113 \pm 8.7) \times 10^4$ 에 비하여 세포 수가 유의하게 적었다($p < 0.05$)(Fig. 6). 그리고 이러한 경향은 lovastatin의 농도를 높여 5-FU 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 과 lovastatin 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 을 병용 첨가했을 때에 더 뚜렷해져서 그 세포 수가 $(59 \pm 6.5) \times 10^4$ 으로서, 5-FU 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 단독첨가군의 세포 수 $(84 \pm 1.0) \times 10^4$ 나 lovastatin 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 단독첨가군의 $(93 \pm 1.0) \times 10^4$ 보다 현저하게 낮음을 볼 수 있었다($p < 0.05$)(Fig. 7).

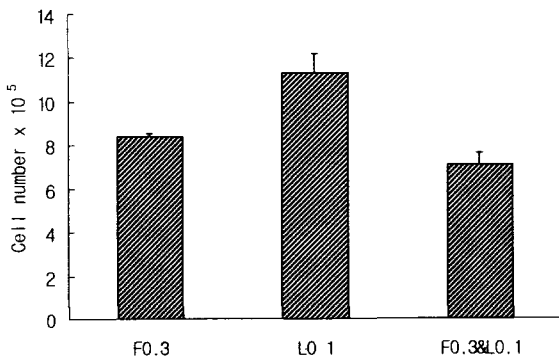


Fig 6. Effects of lovastatin ($\mu\text{mol/L}$) and/or 5-FU ($\mu\text{g/ml}$) on 4 days treatment of AGS cells. * $p < 0.05$
F: treatment with 5-FU
L: treatment with lovastatin
F & L: treatment with 5-FU & lovastatin

그리고 5-FU 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 과 lovastatin 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 을 병용 첨가한 군에서는 대조군에 비해서 29.4%의 증식억제율을 보여, 5-FU 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 단독 첨가군과 lovastatin 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 단독첨가군의 증식억제율을 합한 율($24.6 + 10.3 = 34.9\%$)과 유사한 정도를 나타냄으로, 두 약물이 상가작용을 가지고 있음을 시사하였다. 이러한 경향은 5-FU 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 과 lovastatin 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 의 병용 첨가군에서 대조군에 비해 43.7%의 증식억제율을 보여, 5-FU 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 단독 첨가군과 lovastatin 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 단독 첨가군의 증식억제율을 합한 율($33.3 + 10.3 = 43.6\%$)과 유사한 정도를 나타낸 성적과, 5-FU 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 과 lovastatin 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 의 병용 첨가군에서 대조군에 비해서 53.2%의 증식억제율을 보여, 5-FU 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 단독 첨가군과 lovastatin 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 단독 첨가군의 증식억제율을 합한 율($33.3 + 26.2 = 59.5\%$)과 유사한 정도를 나타낸 성적에서도 더욱 확실하게 드러남으로써, 두 약물의 상가작용의 가능성을 보여 주었다(Fig. 8).

4. Flow cytometry를 이용한 세포주기 분석

lovastatin 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 를 첨가한 배지에서 4일간 배양시킨 군과 lovastatin을 첨가하지않고 배양시킨 대조군의 위암세포를 이용하여 세포주기 측정을 하였는데, 대조군의 경우 그리고 세포증식이 대조군의 56%로 억제되었던 lovastatin 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 을 첨가한 배지에서 4일 째의 세포들에서 측정한 세포주기분석

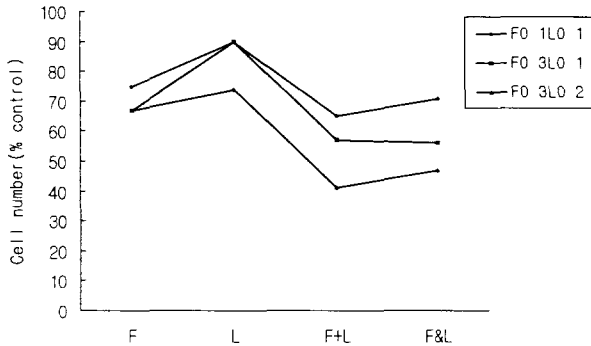


Fig 8. Effects of lovastatin(mol/L) and/or 5-FU(g/ml) on 4 days treatment of AGS cells suggesting additive effect of the two.

결과, 대조군의 경우 G0-G1기가 51.5%, S기는 31.5%, G2-M기는 17.0%였고, lovastatin 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 첨가군에서는 G0-G1기가 50.6%, S기는 32.6%, G2-M기는 16.7%로서 양군 사이에 큰 차이가 없었다(Table 6).

Table 6. Effects of lovastatin on cell cycle distribution in AGS cells after 4 days of incubation at 37°C

Sample($\mu\text{mol/L}$)	% of cells		
	G0/G1	S	G2/M
Control	51.5	31.5	17.0
Lovastatin(0.8)	50.6	32.6	16.7

고찰

경구투여에 의해서 위장관으로 불완전하게 흡수되는 lovastatin은 간을 거치면서 대부분이 대사되는데 cholesterol을 낮추는 작용은 간에서 대부분 이루어지며, 80%이상이 담즙으로 배설된다. 하루 일회 20~80 mg의 투여로 2~3일 후에는 일회 용량투여로 도달하는 농도의 1.5배의 농도에 달하며, 인체에서 최대 권장량(80 mg/일)으로 장기 복용할 때에 도달할 수 있는 혈청 농도는 0.15~0.30 $\mu\text{mol/L}$ 로 알려져 있다.^{2,20,21)}

본 연구에서 lovastatin을 투여한 군에서 대조군에 비하여 AGS 세포의 증식이 유의하게 억제되었으며 ($p<0.05$), 이러한 억제효과는 lovastatin의 용량이 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 일 때부터 확실히 관찰되어 3.2 $\mu\text{mol/L}$ 까지 농도를 단계적으로 증가시켰을 때에 그 증식억제효

과도 농도에 비례함을 보여 주었고, 이러한 경향은 lovastatin을 첨가한 후 1, 3일 및 2, 4일로 날짜를 달리하여 증식정도를 조사하였을 때에도 동일하게 관찰되었다. 본 연구에서 관찰된 이러한 결과는 췌장암,¹⁶⁾ 대장암¹⁸⁾ 등 다른 종류의 인체 소화기암에 있어서 lovastatin이 위암세포에 대한 증식억제 작용도 가지고 있음을 최초로 실험실에서 밝힌 것으로서 위암 환자의 치료에 lovastatin이 유용하게 쓰여 질 수 있는 가능성을 강력히 시사하였다.

더욱이 여기서 중요한 사실은 인체췌장암세포,¹⁶⁾ 인체대장암세포¹⁸⁾의 경우에는 암세포를 억제했던 lovastatin의 농도가 각각 6~20 $\mu\text{mol/L}$ 및 10~30 $\mu\text{mol/L}$ 로서 본 연구에 적용된 lovastatin의 농도(0.2~3.2 $\mu\text{mol/L}$)보다 훨씬 더 높았던 것과는 달리, 본 연구에 적용된 lovastatin의 농도(0.2~3.2 $\mu\text{mol/L}$)는 신경암²²⁾이나 방광암¹⁷⁾에서 처럼, 인체에서 최대 권장량(80 mg/일)으로 도달할 수 있는 혈청 농도(0.15~0.30 $\mu\text{mol/L}$)범위²¹⁾와 거의 일치함으로써 실제 위암환자의 치료에 lovastatin이 직접 투여 될 수 있음을 나타내었다. 또한 이러한 결과로서 lovastatin에 대한 암세포의 감수성이 암의 종류에 따라 다를 수 있다는 것도 알 수 있었다.¹⁷⁾

본 연구에서 lovastatin을 첨가한 군에서 lovastatin을 제거하였을 때에 대조군과 그 증식정도에 큰 차이가 없음으로써 lovastatin이 AGS세포에 미치는 증식억제 작용이 가역성임을 보여 주었는데, 이는 방광암세포에서 lovastatin의 농도가 2~10 $\mu\text{mol/L}$ 의 저농도에서는 가역성이었으나, 50 $\mu\text{mol/L}$ 정도의 농도에서는 비가역적이었던 보고¹⁷⁾와 상통하였다. 한편 Sumi등¹⁶⁾은 췌장암세포에서 6 $\mu\text{mol/L}$ 정도의 농도에서 24시간동안 노출시켰을 때는 가역성이었으나, 48시간 노출시켰을 때는 비가역성이었다고 보고하였는데, 본 연구에서는 24시간이나 48시간 모두 가역성이었으며, 이는 본 연구에서의 lovastatin농도가 Sumi등¹⁶⁾의 보고에서 보다 더 낮기 때문으로 생각되었으며, 본 연구에서와 같이 낮은 농도에서 lovastatin을 48시간 동안 처리했던 방광암세포¹⁷⁾에서의 경우에도 본 연구의 결과처럼 증식억제작용에 있어서 가역성을 보였다.

본 연구에서 5-FU와 lovastatin의 병용 투여는 AGS세포의 성장을 상가적으로 억제하는 경향을 보였는데, 이러한 상가작용은 인체대장암세포에서의 연

구¹⁸⁾에서 처음 알려졌으며, 그 보고¹⁸⁾에서는 5-FU와 lovastatin의 농도가 각각 20~75 $\mu\text{g/ml}$ 및 5~30 $\mu\text{mol/L}$ 로서 본 연구에서의 1~3 $\mu\text{g/ml}$ 및 0.2~3.2 $\mu\text{mol/L}$ 보다 현저히 높음으로써 차이가 있었다. lovastatin이 위암의 항암치료제로 가장 효과가 좋은 5-FU와 이러한 상가작용을 보이는 것은 실제로 임상에서 두 가지 약물을 병용 치료함으로써 5-FU의 항암작용을 증강시킬 수 있는 가능성을 제시하였으며, 따라서 본 연구에 적용된 lovastatin의 농도(0.2~3.2 $\mu\text{mol/L}$)가 인체에서 최대 권장량(80 mg/일)으로 도달할 수 있는 혈청 농도(0.15~0.30 $\mu\text{mol/L}$)범위와 거의 일치함을 감안할 때에 동물실험과 임상연구를 통해서 임상에서의 실제적인 적용을 시도해 볼 수 있다고 생각되었고, 또한 simvastatin²³⁾ lovastatin보다 더 작용이 강한 유사체의 사용도 검토할 수 있을 것으로 생각되었다.

이러한 lovastatin의 암세포에 대한 증식억제작용의 기전은 일반적으로 mevalonate 합성을 억제함으로써 isoprenoid 합성의 억제를 야기시키고, 그에 따라서 isoprenoid(farnesyl)와 결합함으로써 활성화되는 Ras 단백질의 작용을 저해하는 것이라고 알려져 있다.⁵⁻⁷⁾

Ras 단백질은 생물학적으로 불활성화 상태인 세포질내의 propeptide(Pro-Ras)형태로 생산되어서 C-terminus 부분에 콜레스테롤 합성의 중간 산물인 farnesyl을 비롯한 몇 가지 물질을 부착시켜 흡수성(hydrophobicity)을 증가시킨 후에 세포막내에 부착함으로써 활성화된다.²⁴⁾ 이 과정에서 중요한 역할을 담당하는 물질로서는 mevalonate 및 이의 합성을 촉진시키는 효소인 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA(HMG-CoA)와 farnesyl 및 이를 Ras 단백질에 부착시키는 역할을 하는 farnesyl transferase(FTase)를 들 수 있으며, 따라서 이러한 효소를 억제하는 약물들인 HRI(HMG-CoA reductase inhibitors¹⁸⁾나 FTI(farnesyl transferase inhibitors²⁴⁾)는 모두 항암작용을 나타 낼 수 있다.

그리고 이러한 Ras 단백질의 작용이 세포신호전달 체계의 초기에 작용하여 세포주기가 G0-G1기에서 S기로 진행하는데 중요한 역할을 담당함으로써, Ras 단백질의 작용을 억제하는 lovastatin이 세포주기가 G0-G1기에서 S기로 진행하는 것을 막는다는 것¹⁷⁾이 알려져 있다. 본 연구에서도 세포주기의 변화를 조사하였지만 lovastatin 첨가군과 대조군 사이에 큰 차이가 없었으며, 이는 다른 보고들^{17,25)}의 결과와

상이하였는데, 이러한 이유로서는 본 연구에 사용된 lovastatin의 농도가 다른 보고들^{17,25)}에 비해서 낮았던 것이 한 원인일 수도 있을 것으로 생각되었다. 근래 Dricu²⁶⁾은 악성 흑색종세포를 대상으로 한 연구에서 lovastatin이 3 $\mu\text{mol/L}$ 의 농도에서 IGF-1 수용체의 세포막에서의 발현을 억제함으로써 세포의 증식을 억제함을 관찰하고, mevalonate를 거쳐 합성되는 farnesyl protein의 하나인 dolichyl phosphate 합성이 억제됨으로써 IGF-1수용체의 활성화에 중요한 N-glycosylation이 저해되어 결과적으로 IGF-1수용체의 작용이 약화되고 세포증식도 억제될 수 있는 것으로 보고하였다. 이러한 사실로 미루어 볼 때 lovastatin의 작용기전은 그 농도에 따라 다를 가능성이 있으며, 앞으로 이에 대해서 더 깊은 연구가 필요할 것으로 생각되었다.

결론

Lovastatin이 농도에 비례하여 인체 위암세포의 증식을 억제하였고, 그 증식억제 효과가 가역성이었기 때문에 lovastatin이 AGS세포에 대해서 비특이적인 세포독이 아니고 일정한 작용 기전을 가진 약물임을 알 수 있었다. 본 연구에 적용된 lovastatin의 농도(0.2~3.2 $\mu\text{mol/L}$)는 인체에서 최대 권장량(80 mg/일)으로 도달할 수 있는 혈청 농도(0.15~0.30 $\mu\text{mol/L}$)범위와 거의 일치함으로써 실제 위암환자의 치료에 lovastatin이 유용하게 쓰여 질 수 있는 가능성을 강력히 시사하였다. 그리고 lovastatin과 기존의 항암제인 5-FU를 병용 투여하였을 경우 lovastatin이나 5-FU 단독 투여군에 비하여 현저한 증식억제를 보였으며 농도에 비례하여 상가효과가 있음을 시사하였다. 이로써 본 연구에서 처음으로 lovastatin이 단독 혹은 5-FU와 같이 위암의 치료제로서 사용될 수 있음을 보여 주었으며, 앞으로 동물 실험 및 임상 연구를 통해서 lovastatin이 효과가 좋으면서 다른 항암제와 같이 위암의 치료에 쓰여 질 수 있는 약제로서의 가능성에 대해서 더 연구해야 할 것으로 생각되었다.

참고문헌

1. Yamada T: Textbook of gastroenterology 3rd ed, Philadelphia,

- Lippincott williams & Wilkins, 1999, 1500-1520
2. Alberts AW, Chen J, Kuron G, Hunt V, Huff J, Hiffman C, Rothrock J, Lopez M, Joshua H, Harris E, Patchett A, Monaghan R, Currie S, Stapley E, Albers-Schonberg G, Hensens O, Hirshfield J, Hoogsteen K, Liesch J, Springer J: Mevinolin: a high potent competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase as a cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:3957-3961, 1980
3. Fumagalli R, Grossi E, Paoletti P, Paoletti R: studies on lipids in brain tumors. I. Occurance and significance of sterol precursors of cholesterol in brain tumors. *J Neurochem* 11:561-565, 1964
4. Maltese WA: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in human brain tumors *Neurology* 33:1294-1299, 1983
5. Maltese: posttranslational modification of proteins by isoprenoids in mammalian cells. *FASEB J* 4:3319-3328, 1990
6. Goldstein JL, Brown MS: Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343: 425-430, 1990
7. Girgert R, Marini P, Jacessa A, Bruchelt G, Treuner J, Schweizer P: Inhibition of the membrane localization of P21 ras proteins by lovastatin in tumor cells possessing a mutant N-ras gene. *Oncology* 51:320-322, 1994
8. Quesney-Huneus V, Wiley MH, Siperstein MD: Essential roles for mevalonate synthesis in DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:5056-5060, 1979
9. Habenicht AJR, Glomset JA, Ross R: Relation of cholesterol and mevalonic acid to the cell cycle in smooth muscle and Swiss 3T3 cells stimulated to divide by platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* 255:5134-5140, 1980
10. Farebanks KP, White LD, Goodman DS: Relationship between mevalonate and mitogenesis in human fibroblasts stimulated with platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* 259:1546-1551, 1980
11. Jones Kd, Couldwell WT, Hinton DR, Su Y, He S, Anker L, Law RE: Lovastatin induces growth inhibition and apoptosis in human malignant glioma cells. *Biochem biophys res commun* 250:681-687, 1994
12. Padayatty SH, Marcelli M, Shao TC, Cunningham GR: Lovastatin induced apoptosis in prostate stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1434-1499, 1997
13. Perez-sala D, Mollinedo F: Inhibition of isoprenoid synthesis induces apoptosis in prostate stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1434-1499, 1997
14. Maltese WA, Defendini R, Green RA, Seridan KM, Donley DK: Suppression of murine neuroblastoma growth in vivo by mevinolin, a competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J Clin Invest* 76:1748-1754, 1986
15. Littman ML, Taguchi T, Mosbach EH: Effect of cholesterol-free, fat-free diet and hypocholesterolemic agents on growth of transplantable animal tumors. *Can Chem Rep* 50:25-45, 1966
16. Sumi S, Beauchamp RD, Courtney CM, Uchida T, Murakami M, Rajaraman S, Ishizuka J, Thompson JC: Inhibition of pancreatic adenocarcinoma cell growth by lovastatin. *Gastroenterol* 103:982-989, 1992
17. Jakovisiak M, Bruno S, Skierski JS, Darzynkiewicz Z: Cell cycle-specific effects of lovastatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:3628-3632, 1991
18. Agarwal B, Bhendwal S, Halmos B, Moss SF, Ramey WG, Holt PR: Lovastatin augment apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 5:2223-2229, 1999
19. Dimitroulakos J, Nohynek D, Badkwa KL, Hedley DW, Yeger H, Freedman MH, Minden MD, Penn LZ: Increased sensitivity of acute myeloid leukemia to lovastatin-induced apoptosis: a potential therapeutic approach. *Blood* 93:1308-1318, 1993
20. Tibault A, Samid D, Tompkins AC, Figg WD, Cooper MR, Hohl RJ, Trepel J, Bertrand L, Patronal N, Venzon DJ, Reed E, Myers CE: Phase I study of lovastatin, an inhibitor of the mevalonate pathway, in patients with cancer. *Clin Cancer Res* 2:483-491, 1996
21. Freishman WH, Rapier RC: Lovastatin. *Med Clin North Am* 73:439-448, 1989
22. Prasanna P, Thibault A, Liu L, Samid D: Lipid metabolism as a target for brain cancer therapy: synergistic activity of lovastatin and phenylacetate against glioma cells. *J Neurochem* 66:710-716, 1996
23. Soma MR, Baetta R, de Renzis RM, Mazzini G, Devegna C, Magrassi L, Butti G, Pessota S, Paoletti R, Fumagalli R: In vivo enhanced antitumor activity of carmustine by simvastatin. *Cancer res* 55:597-602, 1995
24. Rowinsky EK, Windle FF, Von Hoff DD: Ras protein farnesyltransferase: a strategic target for anticancer therapeutic development. *J clin oncol* 17:3631-3652, 1999
25. Rao S, Lowe M, Herliczek TW, Keyomarsi K: Lovastatin mediated G1 arrest in normal and tumor breast cells is through inhibition of CDK2 activity and redistribution of p21 and p27, independent of p53. *Oncogene* 17:2393-2402, 1998
26. Dricu A, Wang M, Hjertman M, Malec M, Blegen H, Wejde J, Carlberg M, Larsson O: Mevalonate mechanisms in cell growth control: role of dolichyl phosphate in expression of the insulin-like growth factor-1 receptor(IGF-1R) in comparison to Ras prenylation and expression of c-myc. *Glycobiology* 5:625-633, 1997