

Triptolide와 Cisplatin 병용이 두경부 종양 세포주 세포자멸사에 미치는 효과

계명대학교 의과대학 이비인후과학교실,¹ 면역학교실²

남영진¹ · 송달원¹ · 여창기¹ · 김동은¹ · 김민선¹ · 박종욱²

Effect of Triptolide and Cisplatin Combination on Apoptosis in AMC-HN4 Cells

Young Jin Nam, MD¹, Dal Won Song, MD¹, Chang Ki Yeo, MD¹,
Dong Eun Kim, MD¹, Min Sun Kim, MD¹ and Jong Wook Park, MD²

¹Department of Otolaryngology; ²Immunology, Keimyung University School of Medicine, Daegu, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : Cisplatin (CP) is a widely used agent for chemotherapy of head and neck squamous cell carcinoma but some tumor cell shows resistance to CP. Accordingly, it is necessary to seek a method to increase the sensitivity of tumor cell to CP. This study was conducted to investigate whether Triptolide (TP) is effective in the inhibition of proliferating head and neck cancer cell and sensitizes cancer cells to CP. **Materials and Method** : To assess how the combination of TP and CP influence apoptosis of head and neck cancer cell, AMC-HN4 cells were treated with different concentrations of TP and/or CP. Then, their growth was analyzed by XTT assay and the degree of apoptosis was analyzed by flow cytometry. **Results** : The combination of TP and CP increased suppression of the growth of tumor cells more significantly and enhanced apoptosis more than that of TP or CP alone, and suppressed expression of anti-apoptotic protein. **Conclusion** : This study showed that TP alone had antitumor activity in AMC-HN4 cells, and the combination of TP or CP also might sensitize head and neck cancer cell to CP by suppressing the expression of antiapoptotic protein. (Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2008;51:894-902)

KEY WORDS : Head and neck cancer · Triptolide · Cisplatin · Apoptosis.

서 론

Triptolide(TP) (Fig. 1)는 Tripterygium wilfordii에서 분리한 물질로서, T lymphocyte 활성화 억제와 apoptosis 유도성이 있어 rheumatoid arthritis나 SLE 등과 같은 자가면역질환 또는 GVHD 억제제로서 연구되어 왔다.¹⁾ 그러나 최근에는 이런 면역억제성과 더불어 종양세포에 작용해 caspase,^{2,3)} nitric oxide,^{4,5)} TRAIL^{6,7)} 등 다양한 작용을 통해 세포자멸을 유발하는 것으로 보고되고 있어 항암 후보 물질로서 많은 관심을 끌고 있다.

두경부 편평세포 암종은 한국 중앙암 등록 사업 연례보고서에 따르면 2002년 전체 악성 종양 99,025명 중 2,735

명으로 2.8%를 차지한다.⁸⁾ 두경부 편평세포 암종의 대부분이 구강 편평세포 암종, 인두 편평세포 암종, 후두 편평세포 암종이며, 비교적 불량한 예후를 보이고 심각한 기능적 이상을 초래하는 경우가 많다.⁹⁾

두경부 악성 종양의 치료에는 암종의 임상병기와 환자의 건강상태를 고려하여 수술, 방사선 요법, 항암 화학 요법들이 이용되고 있다. 항암 화학 요법은 종양전이감소, 생존율 증가 및 장기 기능 보존 등의 장점이 있으나,¹⁰⁾ 환자에 따라 반응률에 차이가 나타나는 경향이 있다.⁹⁾ Cisplatin(CP)은 두경부 종양치료에 사용되는 대표적인 항암제로서 종양 세포 DNA의 손상을 유도하여 세포독성을 나타내게 된다.¹¹⁾ 그러나 일부 종양세포는 CP에 의한 DNA 손상을 극복함으로써 약제내성을 나타내게 되어 CP의 활용성을 감소시킨다. 따라서 CP에 대한 내성출현을 억제하고, CP의 부작용을 최소화하기 위해 종양세포의 CP에 대한 감수성을 증가시키는 여러 시도들이 연구되고 있다.¹²⁾

이 연구에서는 최근 항암제로서 관심을 끌고 있는 TP가

논문접수일 : 2008년 4월 7일 / 심사완료일 : 2008년 7월 15일
교신저자 : 송달원, 700-712 대구광역시 중구 동산동 194
계명대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (053) 250-7715 · 전송 : (053) 256-0325
E-mail : dwsong@dsmc.or.kr

두경부 종양세포주에 항암효과가 있는지를 규명하고, 이 물질을 CP에 병용 사용시 항암효과의 변화와 그 기전을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

재 료

항암제는 CP(동아제약, Korea) 및 TP(Alexis, Switzerland) (Fig. 1)를 사용하였으며, 항암제에 의한 세포자멸사 기전을 분석하기 위해 caspase inhibitor인 z-VAD-fmk (Calbiochem, Germany)를 사용하였다. 또 TP 단독 및 TP와 CP 병용에 의한 세포자멸사 관련 단백질 발현 변화를 분석하기 위해 caspase 3(Santa Cruz, California, USA), PLC- γ 1(Santa Cruz, California, USA), PARP(Cell signaling, Denver, USA), XIAP(BD transduction, New Jersey, USA), CIAP 2(Santa Cruz, California, USA), Mcl-1(Santa Cruz, California, USA) 및 HSP70(Santa Cruz, California, USA)에 대한 항체를 western blotting 실험에 사용하였다.

세포배양

두경부 종양세포주인 AMC-HN4 및 AMC-HN7 cell을 서울아산병원에서 분양 받아 사용하였다.¹³⁾ 종양세포주를 10% heat-inactivated fetal bovine serum(Welgene Inc, Korea) 및 1X antibiotic-antimycotic(Gibco, USA)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(Welgene inc, Korea)에 넣어 5% CO₂ incubator를 이용해 배양하였다.

세포증식성 검사

2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-

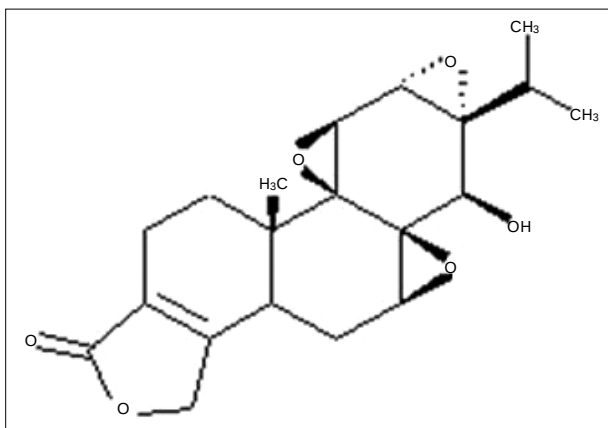


Fig. 1. The structure of triptolide.

tetrazolium-5-carboxanilide inner salt (XTT) assay를 통해 세포증식성을 측정하였다. 두경부 종양 세포주를 배지에 3×10^3 cells/100 μ L 농도로 부유시킨 후 96-Well plates(Nunc, USA)에 100 μ L씩 분주하였다. 24시간 배양하여 세포를 안정화시킨 후 TP를 첨가하여 72시간 배양하였다. 배양 후 XTT Reagent(Welgene inc, Korea) 1 mL와 phenazine methosulfate(Welgene inc, Korea) 시약 20 μ L를 혼합하여 세포가 들어있는 각각의 well에 20 μ L씩 첨가한 후 4시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 반응시키고 450 nm의 파장에서 spectrophotometer (Shmadzu사, Japan)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 세포생존율(cell viability, %)은 다음의 공식을 이용해 구하였으며, 3회 반복하여 평균과 표준편차를 구하였다.

Drug 처리한 군의 흡광도/대조군의 흡광도 $\times 100$

세포자멸사 분석

항암제가 함유된 배지에서 배양된 세포를 2.5 X trypsin-EDTA(Gibco, USA)로 떼어내어 세포를 수거한 후 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척하였다. PBS 100 μ L를 첨가하여 세포를 부유한 다음 여기에 100% ethanol을 200 μ L 첨가하여 4°C에서 1시간 이상 세포를 고정하였다. 세포를 원심하여 상층을 제거한 후 PBS 100 μ L를 첨가하여 세포를 부유시켰다. 여기에 50 μ g/mL RNase A (Sigma, USA)를 250 μ L 넣고 37°C에서 30분간 incubation한 후 50 μ g/mL propidium iodide(Sigma, USA)를 동량 첨가하고 빛을 차광하여 37°C에서 20분간 반응시켰다. FACS Calibur-A flow cytometer(BD, USA)를 사용하여 세포주기와 apoptosis 세포비율을 측정하였으며, 3회 반복하여 평균과 표준편차를 구하였다.

4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI) 염색

AMC-HN4 세포(5×10^4 cell)를 chamber slide에 분주하여 drug을 첨가한 후 12시간 배양하였다. 상층액을 제거한 후 1% paraformaldehyde 용액을 첨가하여 세포를 10분간 고정시켰다. PBS로 세포를 3회 세척한 후 300 nM 농도의 DAPI(Molecular probes, USA) 염색약을 첨가하여 5분간 염색하고, PBS로 염색된 세포를 세척한 후 형광 현미경으로 관찰하였다.

DNA fragmentation 관찰

TP를 첨가하여 12시간 배양한 AMC-HN4 세포에 5 mM Tris(pH7.4), 20 mM EDTA, 0.5% triton $\times 100$ 이 함유된 cytosolic DNA extraction buffer를 500 μ L 첨가

하고, phenylmethylsulfonyl fluoride (Amresco, USA)를 1 mM 농도로 첨가한 후 얼음에 30분간 두면서 이때 10 분 간격으로 진탕혼합하였다. 세포용해액을 12,000 rpm으로 4°C에서 20분간 원심한 후 상층 500 μ L를 취하여 새 시험관에 옮기고 동량의 tris-saturated phenol을 첨가하여 진탕혼합하였다. 실온에서 12,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 새 시험관에 상층 400 μ L를 옮기고 동량의 chloroform을 첨가하여 진탕혼합한 후 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상층을 다시 새 시험관에 옮기고 동량의 chloroform을 첨가하여 진탕혼합한 후 12,000 rpm으로 10 분간 원심분리하는 과정을 2회 반복하였다. 최종 상층 200 μ L를 취하여 새 시험관으로 옮기고, 3 M sodium acetate 20 μ L, 100% ethanol 1 mL를 첨가한 후 4°C에서 12,000 rpm으로 20분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 70% ethanol을 첨가하여 pellet을 세척한 후 4°C에서 12,000 rpm으로 15분간 원심분리하였다. 상층을 제거하고 침전 물을 건조시킨 후 멸균증류수 10 μ L를 첨가하여 침전물을 녹이고, RNase(10 mg/mL) 용액 2 μ L를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이 용액에 gel loading buffer를 첨가한 후 2% agarose gel에 점종하고 50V 전압하에서 1시간 전기영동한 후 DNA를 UV-transilluminator를 이용하여 관찰하였다.

Western blot

항암제가 함유된 배지에 배양한 세포를 수거한 후 0.8×10^6 개의 세포를 lysis buffer(137 mM NaCl, 1 mM EGTA, 0.1 mM sodium orthovanadate, 15 mM $MgCl_2$, 0.1% Triton X-100, 25 mM MOPS, 100 μ M phenylmethylsulfonyl fluoride, 20 μ M leupeptin, pH 7.2) 50–100 μ L에 부유시켜 세포를 용해하였다. 용해된 세포를 12,000 rpm으로 30분간 원심하여 상층을 수거하였다. Protein assay reagent kit(Pierce, USA)로 단백질 농도를 측정하고 정량한 후 동일량을 polyacrylamide gel에 점종하여 전기영동하였다. 영동 후 Immobilon-P membranes(Millipore corporation, USA)에 단백질을 옮긴 후 caspase 3, PLC-r1, PARP, cIAP2, Mcl-1 및 HSP70에 대한 항체와 결합시킨 다음 ECL western blotting kit(Millipore corporation, USA)을 이용하여 특이적인 단백질을 검출하였다.

결 과

TP의 두경부 종양세포 증식 억제 효과

TP가 두경부 종양세포 증식에 미치는 영향을 알아보기

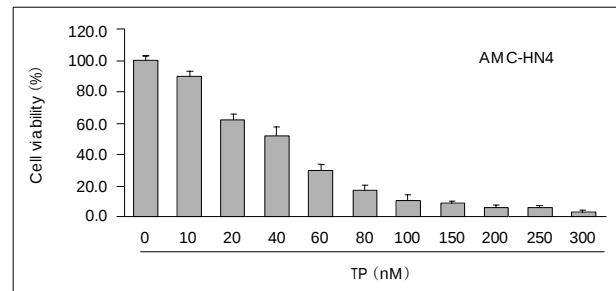


Fig. 2. TP suppresses the growth of AMC-HN4 cells in a dose-dependent manner. AMC-HN4 cells were treated for 72 hours with the indicated concentrations of TP, and their growth was measured by XTT assay. Data are mean values obtained from three independent experiments and bars represent standard deviation.

위하여 AMC-HN4에 다양한 농도의 TP를 첨가하여 배양하였다. 배양 72시간 후 세포증식의 정도를 분석하기 위해 XTT assay를 실시하고 % 생존율을 측정하였다. AMC-HN4 세포주에서 TP의 농도가 증가할수록 세포의 생존율이 감소하였으며, TP의 IC₅₀은 약 40 nM이었다(Fig. 2).

TP가 두경부 종양 세포의 세포자멸사에 미치는 영향

TP에 의한 두경부 세포의 증식 억제가 sub-G1 fraction 세포증가와 관계가 있는지를 알아보기 위하여 AMC-HN4 세포주에 TP를 여러 농도로 처리한 후 24시간 배양하였으며, TP로 처리하지 않은 대조군과 같이 세포주기를 분석하여 sub-G1 fraction에 있는 세포수의 비율(%)을 구하였다. TP에서 저농도(1 nM – 20 nM)의 TP는 sub-G1기 세포수를 증가시키지 못하였으나 30 nM에서 8.17%, 40 nM에서 22.7%, 50 nM에서는 47.2%로 첨가량의 증가에 따라 sub-G1기의 세포수가 현저히 증가하였다(Fig. 3).

TP에 의해 AMC-HN4 세포주에 세포자멸사가 일어났는지 알아보기 위하여 TP를 50 nM 농도로 첨가하여 24시간 배양한 후 대조군과 함께 DAPI stain을 한 다음 형광현미경으로 관찰하였다. 대조군에 비해 TP로 처리한 군에서 일반적인 핵의 형태를 소실하고 apoptotic body 양상을 보이는 세포가 현저히 증가하였다(Fig. 4A). 또 AMC-HN4 세포에 TP를 여러 농도로 처리하고 24시간 배양한 뒤 DNA를 추출하여 전기영동한 결과 처리한 TP의 농도가 증가할수록 DNA ladder가 뚜렷하게 관찰되었다(Fig. 4B). TP를 여러 농도로 처리한 세포에서 단백질을 분리한 후 HSP 70, 비활성형 caspase 3 및 caspase 3의 기질인 PARP의 변화를 western blotting법으로 관찰하였다. 그 결과 TP는 농도 의존적으로 비활성형 caspase 3를 감소시켰으며, 이와는 반대로 caspase 3의 기질인 PARP의 절단형은 증가하였다(Fig. 4C).

TP와 CP 단독 및 병용이 두경부 종양세포 증식에 미치는 영향

TP와 CP 단독 또는 병용이 두경부 종양세포 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 두 세포주에 TP(30, 40 nM) 및 CP(5, 10 μ M)를 각각 단독 또는 병용하여 처리하고, 72시간 배양한 후 대조군과 더불어 XTT assay를 실시하

여 세포생존율(%)을 구하였다. CP를 5 μ M 및 10 μ M 농도로 단독 처리한 군의 생존율은 각각 56.7% 및 40.7%였으며, TP를 30 nM 및 40 nM로 단독 처리한 군의 세포생존율은 각각 70.1% 및 58.0%로 나타나 용량 증가에 따라 세포 증식에 억제효과가 있음을 확인하였다. 두 약제를 병용한 경우 세포생존율은 현저히 감소하였다. CP 10 μ M

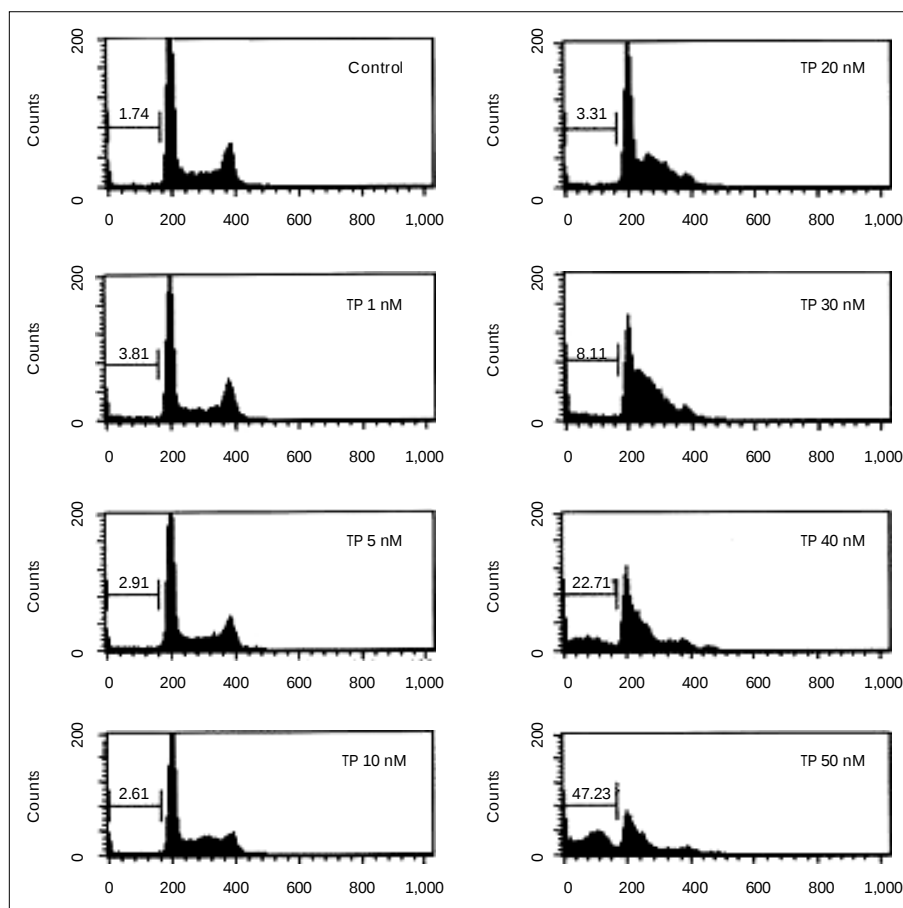


Fig. 3. TP increased sub G1 cells in a dose-dependent manner. AMC-HN4 cells were treated for 24 hours with the indicated concentrations of TP, and their DNA content was measured after propidium iodide staining by flow cytometric analysis.

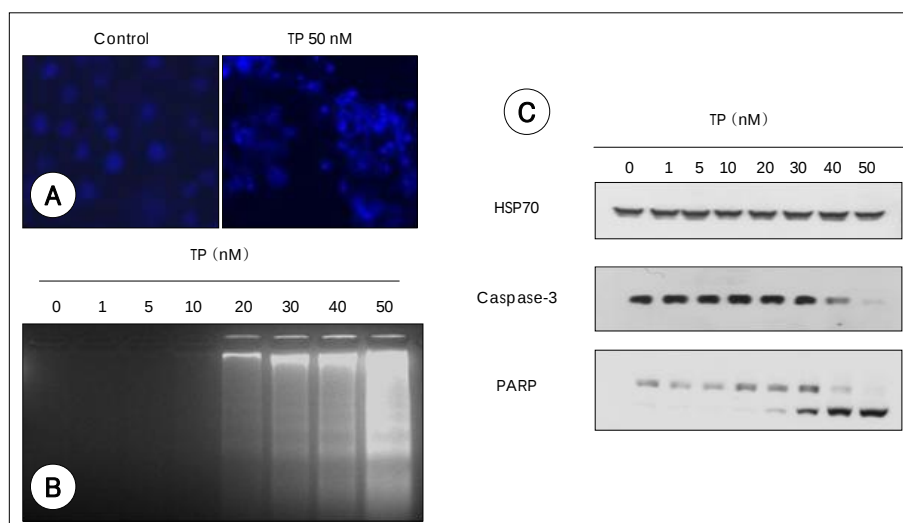


Fig. 4. TP induces apoptosis of AMC-HN4 in a dose-dependent manner. AMC-HN4 cells treated for 24 hours with the indicated concentrations of TP, and cell morphology in DAPI stain (A) and DNA ladder formation were analysed (B). The cell lysate (40 μ g) were subjected to electrophoresis and analyzed by Western blot for HSP 70, caspase-3 and PARP (C).

과 TP 40 nM로 병용한 경우 생존율은 9.4%, CP 10 μ M과 TP 30 nM에서 17.1%, CP 5 μ M과 TP 40 nM은 20.2%, CP 5 μ M과 TP 30 nM은 28.7%의 생존율을 보였다(Fig. 5).

TP와 CP 단독 및 병용이 두경부 종양세포 사멸에 미치는 영향

TP와 CP 단독 및 병용이 두경부 종양세포의 사멸을 증가시키는지 알아보기 위하여 AMC-HN4 및 AMC-HN7 세포주에 TP와 CP를 각각 단독 또는 병용하여 처리하고 대조군과 더불어 24시간 배양한 후 유세포 분석기를 이용하여 세포주기를 분석하고 sub-G1 fraction의 세포비율(%)을 측정하였다. AMC-HN4의 경우 TP와 CP를 각각 단독으로 처리할 시 sub-G1기 세포비율이 CP 5 μ M에서는 6.7%로 나타났으며, TP는 20 nM, 30 nM 및 40 nM에서 각각 3.5%, 9.4% 및 17.0%로 나타났다. 그러나 CP 5 μ M와 TP 20 nM을 병용한 경우 16.0%, TP 30 nM과 병용한 경우 51.0%, TP 40 nM과 병용한 경우는 70.2%

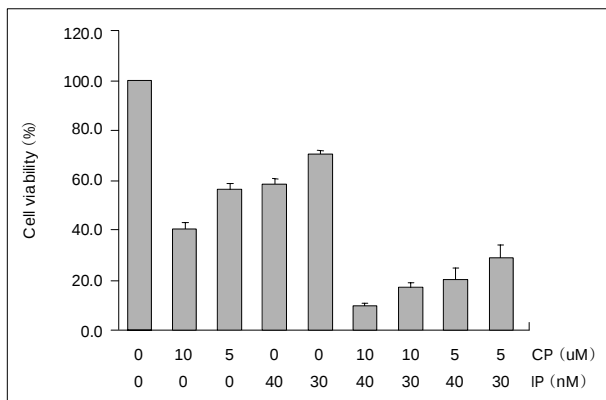


Fig. 5. Combination of TP and CP significantly suppresses the growth of AMC-HN4 cells. AMC-HN4 cells treated for 72 hours with the indicated concentrations of TP and/or CP and their growth was measured by XTT assay. Data are mean values obtained from three independent experiments and bars represent standard deviation.

로 두 약제를 병용하였을 때 sub-G1기의 세포수가 현저히 증가하였다. AMC-HN7 세포를 대상으로 동일한 실험을 반복한 결과에서도 AMC-HN4와 유사하게 두 약제를 병용한 경우에 sub-G1기의 세포수가 현저히 증가하였다(Fig. 6).

TP와 CP 병용에 의한 세포사멸이 caspase 의존적인지를 알아보기 위하여 AMC-HN4 세포주에 TP와 CP 및 z-VAD-fmk를 Fig. 7에 표시한 것과 같이 처리하고 대조군과 더불어 24시간 배양한 후 유세포 분석기로 세포주기를 분석하고 sub-G1 fraction 세포비율(%)을 측정하였다. Fig. 6에서와 마찬가지로 CP와 TP를 각각 처리한 경우 sub-G1기 세포비율은 각각 3.4% 및 4.5%였으나 두 약제를 병용시 22.2%로 증가하였다. 그러나 두 약제를 병용하여 처리하고 z-VAD-fmk를 추가로 처리한 경우 sub-G1기 세포비율은 1.5%로 대조군(1.8%)과 별 차이가 없었다(Fig. 7).

TP 및 CP에 의해 발현이 변화되는 세포자멸사 관련 단백질 분석

TP와 CP 병용에 의한 세포자멸사 상승효과의 기전을 규명하기 위하여 AMC HN-4 세포주에 TP와 CP를 Fig. 8과 같이 각각 또는 병용 처리한 후 24시간 동안 배양하였으며, 대조군과 더불어 단백질을 추출하여 western blot을 실시하였다. 대조군, CP 단독처리군, TP 단독 처리군에 비해 CP와 TP를 병용한 군에서 caspase 활성화와 PLC-r의 분절이 증가하였으며, XIAP 및 Mcl-1의 경우 두 약제를 각각 처리한 군에 비해 병용 처리한 군에서 단백질 발현이 현저히 감소하였다(Fig. 8).

고 찰

두경부 종양의 치료에는 수술과 방사선 치료가 주로 시행되고 있으나 최근 음성이나 연하 등의 기능을 보존할 수

Fig. 6. Combination of TP and CP increased sub G1 cells of AMC-HN4 and AMC-HN7 cells. AMC-HN4 and AMC-HN7 cells were treated for 24 hours with the indicated concentrations of TP and/or CP and their DNA content was measured after propidium iodide staining by flow cytometric analysis. Data are mean values of percent of sub G1 cell obtained from three independent experiments and bars represent standard deviation.

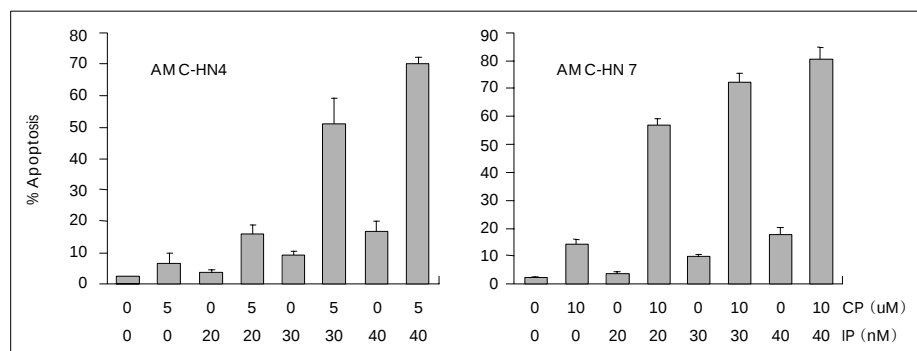


Fig. 7. Caspase inhibitor blocked the increase of sub G1 cells by combination of TP and CP. AMC-NH4 cells were treated for 24 hours with the indicated concentrations of drugs and/or z-VAD-fmk, and their DNA content was measured after propidium iodide staining by flow cytometric analysis

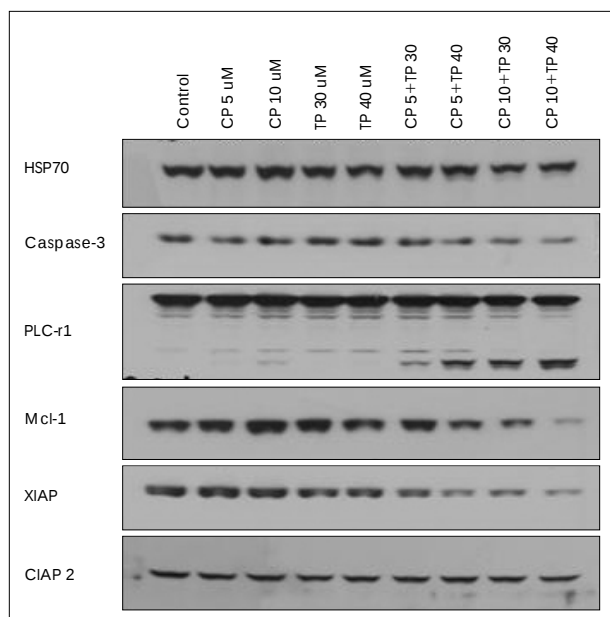
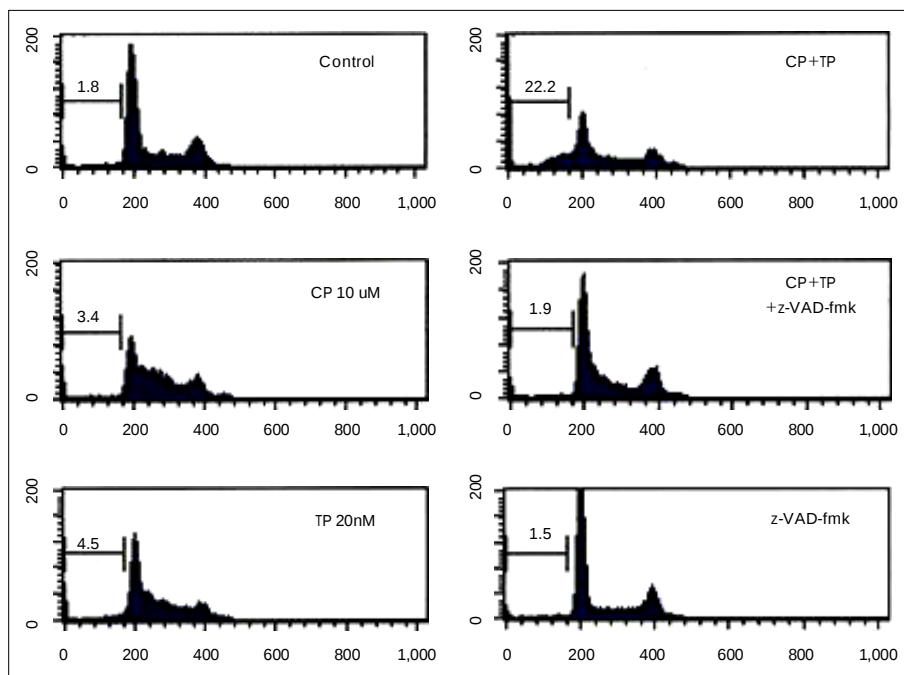


Fig. 8. Combination of TP and CP induces apoptosis with caspase-dependent manner, and decreases anti-apoptotic protein, XIAP and Mcl-1. AMC-NH4 cells treated for 24 hours with the indicated concentrations of TP and/or CP, and cell lysate (40 ug) were subjected to electrophoresis and analyzed by Western blot.

있는 치료에 대한 관심이 높아지면서 가능한 적은 범위의 수술을 시행하고 방사선 치료와 항암 화학 요법을 사용하는 빈도가 높아지고 있고, 특히 cisplatin, doxorubicin, 5-fluorouracil 등을 이용한 복합 화학 요법, 보조적 항암 화학 요법 및 방사선과 항암 화학 요법의 동시 치료에 대한

여러 연구가 진행 중이며 비교적 양호한 치료 성적이 보고되고 있다.¹⁴⁾

두경부 악성 종양의 치료에 쓰이는 CP는 종양 세포의 DNA 손상을 통해 항암효과를 나타내지만 신 독성, 이 독성, 골수 억제 등의 부작용을 동반할 수 있다.¹⁵⁾ 일부 종양 세포는 CP에 의한 DNA 손상을 극복함으로써 CP에 대해 내성을 나타낼 수 있어 단점으로 지적되고 있으나 아직 정확한 내성 기전은 밝혀지지 않고 있다. 최근의 연구에서 CP에 내성이 있는 종양 세포주와 CP에 효과적으로 반응하는 종양 세포주 사이에 유전자 발현의 차이가 있다는 것이 알려져 앞으로 이에 대한 더 많은 연구가 필요한 상태이다.¹²⁾ 이 연구에서는 과용량 사용에 의한 CP의 부작용을 개선하고 또 CP 내성의 출현을 억제하는 방법으로써, CP와 병용 사용하여 항암효과를 상승적으로 증가시킬 수 있는 물질을 확인하고자 하였다.

TP는 유방암, 방광암, 위암, 흑색종, 담관암 등에서 광범위하게 항암효과가 있다고 보고되고 있으며,^{1,16-18)} MDR1의 영향을 받지 않는 것으로 알려져 있다. MDR1은 ATP의 존 작용을 통하여 약제를 세포질 밖으로 내보내는 작용을 하는 transmembrane protein으로 약제 내성에 관여하는데, 이는 MDR1의 과발현에 의해 CP를 비롯한 다른 약제에 내성을 보이는 종양 세포주에서도 TP가 항암효과를 보일 수 있는 중요한 이유가 되며, 다른 항암제와 병용의 근거가 될 수 있다. 그리고 다른 항암제에 비해 비교적 높은 효능을 보인다고 알려져 있으며, 저용량을 사용하

라도 높은 효과가 나타난다고 보고되어 있다.¹⁹⁾ 이 연구결과에서도 AMC-HN4 세포에 대해 TP는 용량에 비례하여 효과가 증가되었으며, TP의 IC50은 약 40 nM으로 매우 낮은 농도에서도 두경부 종양세포의 증식을 억제할 수 있었으며, 또 50 nM 농도에서 AMC-HN4세포의 sub-G1기의 세포비율을 47%에 이르게 하였다. TP는 광범위하고 효과적인 항암효과의 장점이 있는 반면 위장관 장애, 무월경, 신장 기능 이상, 백혈구 감소증, 혈소판 감소증, 재생 불량성 빈혈 등의 부작용이 보고되어 있다.⁶⁾ 또한, 다른 항암제에 비해 소량으로도 항암효과를 나타낼 수 있어 부작용의 발생 빈도를 극소화할 수 있다고 보여지나 자료가 아직 충분하지 못하므로 앞으로 이러한 문제점을 극복하기 위한 연구에 관심을 기울여야 할 것으로 생각된다.

이미 항암효과가 증명되어 있는 항암제에 새로운 항암제를 병용함으로써 기존 항암제를 단독으로 사용하는 것보다 더 우수한 효과를 나타낼 수 있다면 이러한 병용 요법은 치료효과를 높이고 또 약제의 부작용을 줄일 수도 있게 되어 임상적으로 많은 도움을 얻을 수 있다. TP는 대장암의 쥐 실험 모델에서 5-FU와의 병용 사용으로 각각 단독 사용시 보다 상승효과가 있었다는 보고가 있으나²⁰⁾ 이러한 상승효과의 기전은 밝혀지지 않았으며, 두경부 종양에 대한 TP의 병용 사용에 대한 연구는 아직 보고된 바가 없는 실정이다. 이 연구에서는 CP를 이용한 두경부 종양 치료에 TP를 병용하여 상승적인 항암효과가 있는지 알아보기 위하여 AMC-HN4 세포주에 두 약제를 각각 또는 병용 처리하고 세포증식성을 조사한 결과 두 약제를 각각 단독 처리한 군에 비해 병용 처리한 군에서 세포증식을 현저하게 억제하였다. 또 세포주기 분석을 통해 조사한 결과에서도 단독 처리한 군에 비해 병용 처리한 군에서 sub-G1기 세포비율이 현저히 증가하여 뚜렷한 상승작용이 있음을 확인할 수 있었다.

세포자멸사는 생체 항상성 유지에 필수적인 과정의 하나로, 이상이 있을 경우 종양 형성이나 항암제 등의 약제에 대한 내성의 원인이 될 수 있다.^{21,22)} 세포자멸사 과정은 세포표면에 death ligand가 전달이 되어 cystein protease인 caspase의 활성화가 일어나면서 시작된다. Caspase는 DNA molecule의 분절과 PARP, PLC-r1 등의 단백 분절을 유도하여 세포자멸을 일으키는 중요한 효소이다.²³⁾ 또한 세포 내의 미토콘드리아에서 분비되는 cytochrome c도 Apaf-1, dATP, procaspase-9과 함께 caspase activating complex를 형성하여 caspase를 활성화하여 apoptosis를 유도하는 역할을 한다.²⁴⁻²⁶⁾ Mcl-1은 Bcl-2 family 중에서 anti-apoptosis 기능을 지닌 protein으로 미토

콘드리아 막의 투과성과 이온 채널 형성에 영향을 주어 cytochrome c와 apoptosis-inducing factor의 분비를 억제하는 역할을 하며,²⁷⁾ XIAP, cIAP 등의 inhibitors of apoptosis protein은 세포 내에서 활성화된 caspase에 직접 억제작용을 하는 anti-apoptosis 기능을 갖고 있다.²⁸⁾ 이 연구에서 TP가 두경부 종양 세포주에 매우 우수한 항암효과를 나타내었으므로, 기전을 규명하기 위하여 TP로 처리한 두경부 종양 세포주를 DAPI 염색법으로 관찰하였고, DNA를 추출하여 DNA ladder가 나타나는 지를 살펴본 결과 apoptosis body와 분절된 DNA를 확인하였으며, 또 western blot 검사에서도 TP 처리에 의해 caspase의 활성화와 caspase 기질인 PARP 분절화가 나타나 TP의 항암효과는 세포자멸사를 유도하여 이로 인해 일어난 것임을 알 수 있었다.

TP와 CP를 병용 처리하였을 때 두경부 종양 세포에 나타난 상승효과가 세포자멸사와 관련이 있는지 알아보기 위해 두 약제를 각각 또는 병용 처리한 군과 또 두 약제를 병용하고 caspase inhibitor를 처리한 군의 sub-G1 세포비율을 비교하였다. 두 약제를 단독으로 처리한 군에 비해 병용 처리한 군에서 sub-G1 세포비율은 현저히 증가하였으나, 두 약제를 병용하고 caspase inhibitor를 처리한 군에서는 sub-G1 세포비율이 대조군 수준으로 감소하였으며, 또 western blot 결과에서 두 약제 병용에 의해 caspase 활성화와 caspase 기질인 PLC-r1의 분절화가 현저히 증가되었다. 따라서 TP는 단독으로 사용한 경우와 마찬가지로 CP와 병용시에도 나타나는 항암작용은 caspase 의존성 세포자멸사와 관련이 있음을 알 수 있었다.

TP와 CP 병용에 의한 상승적 세포자멸사 유도효과의 기전을 알아보기 위하여 세포자멸사 조절 단백질을 western blot법으로 조사한 결과 두 약제 병용에 의해 anti-apoptotic protein인 XIAP 및 Mcl-1의 발현이 현저히 감소함을 관찰하였다. 따라서 Mcl-1, XIAP의 저활성화로 인한 caspase의 활성화가 이러한 상승효과의 기전과 관련이 있을 것으로 생각된다. 그러나 TP 및 CP를 단독으로 처리하여 유도한 apoptosis에서도 caspase의 활성화 및 anti-apoptotic Bcl-2 family, XIAP의 저 활성화가 확인되었으며^{2,29)} XIAP나 Mcl-1이 caspase에 의해 파괴될 수도 있기에 이 연구의 결과만으로 두 약제 병용에 의한 상승효과의 기전이라고 단정할 수는 없다고 보여진다. 이외에도 연구에 사용된 두경부 종양 세포주에의 세포자멸 과정에 중요하게 작용하며, 실제 종양 세포에서 변이가 흔히 일어나는 p53의 발현 여부에 관한 검사들이 추가적으로 이루어져야 더 확실한 뒷받침이 될 수 있으리라 여겨지

로 실제 생체에서는 이와 비슷한 효과를 나타낼 수 있을지에 대한 연구가 지속되어야 할 것이다. 이 연구를 통하여 저자는 TP가 단독으로 두경부 중앙 세포에 세포자멸사를 유발할 수 있으며, 또 TP를 CP와 병용시 caspase 의존적 세포자멸사를 상승적으로 증가시켜 중앙 세포의 CP에 대한 감수성을 증가시킴을 확인하였다. 향후 TP에 의한 세포자멸사 유도기전을 보다 명확히 검토하고 더 나아가 동물 실험을 거쳐 TP처치에 의한 CP 감수성 증가를 조사함으로써 TP의 임상적 효용성이 규명될 것으로 생각된다.

결 론

TP는 두경부 중앙 세포주에 대해 증식을 억제하고, caspase 활성화를 유발하여 DNA 분절화와 세포자멸사를 유발하였다. 또 TP와 CP의 병용 사용시 각각을 단독으로 사용하였을 때 보다 중앙 세포 증식 억제와 caspase 의존적 세포자멸사를 현저히 증가시켰으며, caspase를 억제시키는 antiapoptotic protein인 XIAP 및 Mcl-1의 발현을 억제하였다.

이상으로 TP는 두경부 중앙에 항암효과가 있으며, CP와 같은 기존항암제와 병용하여 세포독성을 증가시키는 보조제로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

중심 단어 : 두경부 중앙 · Triptolide · Cisplatin · 세포자멸사.

A dissertation submitted to the Committee of the Graduate School of Keimyung University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Medical Science, June, 2007.

REFERENCES

- Jiang XH, Wong BC, Lin MC, Zhu GH, Kung HF, Jiang SH, et al. Functional p53 is required for triptolide-induced apoptosis and AP-1 and nuclear factor-kappaB activation in gastric cancer cells. *Oncogene* 2001;20 (55):8009-18.
- Carter BZ, Mak DH, Schober WD, McQueen T, Harris D, Estrov Z, et al. Triptolide induces caspase-dependent cell death mediated via the mitochondrial pathway in leukemic cells. *Blood* 2006;108 (2):630-7.
- Wang X, Matta R, Shen G, Nelin LD, Pei D, Liu Y. Mechanism of triptolide-induced apoptosis: Effect on caspase activation and Bid cleavage and essentiality of the hydroxyl group of triptolide. *J Mol Med* 2006;84 (5):405-15.
- Wang B, Ma L, Tao X, Lipsky PE. Triptolide, an active component of the Chinese herbal remedy *Tripterygium wilfordii* Hook F, inhibits production of nitric oxide by decreasing inducible nitric oxide synthase gene transcription. *Arthritis Rheum* 2004;50 (9):2995-3003.
- Kim YH, Lee SH, Lee JY, Choi SW, Park JW, Kwon TK. Triptolide inhibits murine-inducible nitric oxide synthase expression by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of nuclear factor-kappa B and c-Jun NH2-terminal kinase. *Eur J Pharmacol* 2004;494 (1):1-9.
- Panichakul T, Intachote P, Wongkajorsilp A, Sripan B, Sirisinha S. Triptolide sensitizes resistant cholangiocarcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis. *Anticancer Res* 2006;26 (1A):259-65.
- Lee KY, Park JS, Jee YK, Rosen GD. Triptolide sensitizes lung cancer cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by inhibition of NF-kappaB activation. *Exp Mol Med* 2002;34 (6):462-8.
- Shin HR, Jung KW, Won YJ, Park JG. 2002 annual report of the Korea central cancer registry: Based on registered data from 139 hospitals. *Can res treat* 2004;36 (2):103-14.
- Harrison LB, Sessions RB, Hong WK. *Head and Neck Cancer: A Multidisciplinary Approach*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia:1999. p.253-352.
- 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* 2000;355 (9208):949-55.
- Plooy AC, van Dijk M, Lohman PH. Induction and repair of DNA-cross-links in Chinese hamster ovary cells treated with various platinum coordination compounds in relation to platinum binding to DNA, cytotoxicity, mutagenicity, and antitumor activity. *Cancer Res* 1984;44 (5):2043-51.
- 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* 2006;6:224.
- Kim SY, Chu KC, Lee HR, Lee KS, Carey TE. Establishment and characterization of nine new head and neck cancer cell lines. *Acta Otolaryngol* 1997;117 (5):775-84.
- Katori H, Tsukuda M. Comparison of induction chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil (TPF) followed by radiation vs concurrent chemoradiotherapy with TPF in patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2005;17 (3):148-52.
- Ramesh G, Kimball SR, Jefferson LS, Reeves WB. Endotoxin and cisplatin synergistically stimulate TNF-alpha production by renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;292 (2):F812-9.
- Chang WT, Kang JJ, Lee KY, Wei K, Anderson E, Gotmare S, et al. Triptolide and chemotherapy cooperate in tumor cell apoptosis: A role for the p53 pathway. *J Biol Chem* 2001;276 (3):2221-7.
- Shamon LA, Pezzuto JM, Graves JM, Mehta RR, Wangcharoentrakul S, Sangsuwan R, et al. Evaluation of the mutagenic, cytotoxic, and antitumor potential of triptolide, a highly oxygenated diterpene isolated from *Tripterygium wilfordii*. *Cancer Lett* 1997;112 (1):113-7.
- Tengchaisri T, Chawengkirtikul R, Rachaphaew N, Reutrakul V, Sangsuwan R, Sirisinha S. Antitumor activity of triptolide against cholangiocarcinoma growth in vitro and in hamsters. *Cancer Lett* 1998;133 (2):169-75.
- Yang S, Chen J, Guo Z, Xu XM, Wang L, Pei XF, et al. Triptolide inhibits the growth and metastasis of solid tumors. *Mol Cancer Ther* 2003;2 (1):65-72.
- Tang XY, Zhu YQ, Tao WH, Wei B, Lin XL. Synergistic effect of triptolide combined with 5-fluorouracil on colon carcinoma. *Postgrad Med J* 2007;83 (979):338-43.
- Wyllie AH. Apoptosis. *Br J Cancer* 1993;67 (2):205-8.
- Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281 (5381):1308-12.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies within. *Science* 1998;281 (5381):1312-16.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemerson R, Wang X. Induction of apo-

- ptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c. Cell* 1996;86 (1):147-57.
- 25) Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91 (4):479-89.
 - 26) Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997;90 (3):405-13.
 - 27) Virkajärvi N, Pääkkö P, Soini Y. Apoptotic index and apoptosis influencing proteins bcl-2, mcl-1, bax and caspases 3, 6 and 8 in pancreatic carcinoma. *Histopathology* 1998;33 (5):432-9.
 - 28) Liston P, Young SS, Mackenzie AE, Korneluk RG. Life and death decisions: The role of the IAPs in modulating programmed cell death. *Apoptosis* 1997;2 (5):423-41.
 - 29) Takaoka S, Iwase M, Uchida M, Yoshida S, Kondo G, Watanabe H, et al. Effect of combining epidermal growth factor receptor inhibitors and cisplatin on proliferation and apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol* 2007;30 (6):1469-76.