

항암제에 내성인 생쥐의 백혈병세포 L1210의 세포막 단백질의 변화

영남대학교 의과대학 생화학교실

김성용 · 손성권 · 김재룡 · 김정희

서 론

항암제에 대한 암세포의 내성생성은 내성세포에 항암제 축적의 장애를 받거나 세포내로 항암제 유출의 감소 및 세포밖으로의 배출의 증가 등의 여러 경우^{1,2)}를 들 수 있다.

복합약제내성(multidrug resistance : MDR)은 pleiotropic drug resistance 라고 하며 한 약제에 대하여 내성이 생성된 암세포는 그 작용기전이 전혀 다른 약제에 대해서도 쉽게 내성이 생길 수 있다는 것을 의미한다.^{3,5)} 이런 현상은 anthracycline antibiotics나 vinca alkaloids같은 자연계에서 얻은 항암제에서 특히 잘 나타난다⁶⁾고 한다.

항암제 사용시 내성이 생기는 기전으로 세포내의 변화로는 특정효소의 활동도에 주로 변화를 초래하여 내성을 생기게 하는 경우⁷⁾와 세포막의 변화로 세포내로 항암제가 들어가는 투과성장벽(permeability barrier)의 문제로 항암제 유입의 장애를 일으키거나 다른 기전으로 세포내로 들어온 항암제의 배출을 증가시키는 경우를 들 수 있으며⁸⁻¹⁰⁾ 이는 비특이적이라 할 수 있다.

암세포의 약제 감수성세포와 내성세포의 세포막 단백질을 비교해 볼 때 감수성세포에는 나타나지 않는 당단백질(p-glycoprotein)을 들 수 있으며 특히 복합내성시의 약제 배출증가에 중요한 역할을 한다는 보고들^{11,12)}이 있다.

Beck 등¹³⁾은 백혈병 림프아세포를 vinblastine

내성세포로 배양하였을 때 내성세포의 세포막에 분자량 170,000-190,000 dalton의 고분자 당단백질이 존재함을 확인하였으며 이것의 과다생성으로 인한 세포막변화가 약제내성과 관련이 있음을 보고하였다.

그러나 세포막의 당단백질이 비특이적이라 반드시 나타나는 것은 아니며 아직 정확한 기능은 알려져 있지 않다. 복합내성시의 세포변화로 약제 축적의 감소는 배출기능의 증가와 당단백질의 과잉생성이 관련이 있다고 한다.¹⁴⁾ 당단백질은 분자량 150,000-180,000의 분자량을 가진 막표면 인산당단백질(phosphoglycoprotein)^{15,16)}로 알려져 있다.

이와 관련하여 염색체 유전자의 이상 증식으로 double minute chromosomes(DMs)이나 homogeneously staining regions(HSR) 같은 염색체가 보고^{17,18)} 되었으며 당단백질과 관련 시사하였으나 아직 증명된 것은 없다.

p-당단백질과 관련된 유전자로 *mdr* gene이 보고 되어 있다. 사람의 암세포에서 두 종류의 *mdr* 1¹⁹⁾과 *mdr* 3^{20,21)}가 알려져 있다. 그러나 adriamycin 내성인 HL60 세포에서는 *mdr* 1이 과잉생성 되지도 않았고 p-당단백질의 측정도 되지 않았다²²⁾고 한다.

본 연구는 adriamycin 과 vincristine 각각에 내성인 생쥐의 림프아세포성 백혈병세포 L1210을 이용하여 내성생성 기전을 알아보기 위하여 내성

생성 특징을 관찰하고 내성과 관계되는 세포막 표면단백질의 변화를 비교 관찰 하였다.

재료 및 방법

실험재료로 생쥐의 림프아세포성 백혈병 세포 L1210은 ATCC(American Type Cultural Collection)로 부터 구입하였으며 MTT(3-[4,5-dimethyl-1-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide : thiazolyl blue), colcemid, trypsin, phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), sodium dodecyl sulfate (SDS), dimethylsulfoxide(DMSO)는 Sigma사, Fischer's medium은 Gibco, iron supplemented bovine serum은 Hyclone사 제품을 사용하였고, 항암제로서 adriamycin, vincristine은 국내 제약회사에서 판매되는 제품을 사용하였다. Chloroglycoluril(Iodogen[®])은 Pierce사, Na¹²⁵I는 Amersham사 제품을 사용하였으며 그의 일반 시약은 시판 특급을 사용하였다.

세포배양 및 항암제 내성세포의 유도는 10% iron supplemented bovine serum과 50μg/ml의 gentamicin이 첨가된 Fischer's medium을 배양액으로 37°C의 5% 이산화탄소 배양기에서 배양하였다. 항암제 내성 세포의 유도는 5×10⁴cells/ml 정도의 세포농도에 adriamycin 및 vincristine을 각각 1 nM씩 넣고 2주정도 배양한 후 항암제 농도를 계속 증가시켜 세포가 잘 자랄 때 까지 배양하였다. 항암제 내성세포는 항암제 농도가 adriamycin 1μM (1×10⁻⁶M)에 내성인 세포를 L1210-AdR₆로 10μM (1×10⁻⁵M)에 내성인 세포를 L1210-AdR₈라 하였다. Vincristine은 0.1μM에 내성인 경우를 L1210-VcR₇, 1μM에 내성인 경우를 L1210-VcR₆라 하였다. 대조군으로는 L1210 세포를 사용하였다.

각 세포들의 성장곡선은 1.5×10⁴cells/ml의 세포 농도로 0.2ml씩 96 well plates에 분주하여 5일간 배양한 후 MTT assay을 하여 성장곡선을 관찰하였고 각 세포들의 doubling time은 다음식에서 구하였다.²⁾

$$\text{Doubling time} = 96\text{hrs} / (\log_2[\text{Abs at 96 hrs}] - \log_2[\text{Abs at 0 time}])$$

Abs : absorbance hrs : hours

세포의 생존도를 측정하기 위한 MTT assay는 MTT를 phosphate buffered saline(PBS : 150mM NaCl, 5mM Na₂HPO₄, pH8.0)에 2mg/ml 농도로 녹여 여과한 용액을 사용하였다. 96 well plates에 4일간 키운 세포에 well당 0.2ml가 든 세포 용액에 MTT를 50μl씩 첨가하여 4시간 배양 후 220μl의 상청액을 제거하고 침전된 MTT formazan을 250μl의 DMSO를 첨가하여 녹였다.

Spectrophotometer(Gilford 2600)로 파장 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

항암제의 내성도 관찰은 L1210, L1210-AdR₆ 및 -VcR₆을 냉각 PBS용액으로 3번 세척 후 Fischer's medium에 희석하여 96 well plates에 well당 3000 cells/200μl되게 분주하였다. 각 항암제들은 0.15M NaCl에 녹인 후 적절한 농도별로 첨가하고 37°C의 5% 이산화탄소 배양기에서 4일간 배양한 후 MTT assay를 하여 흡광도 값을 얻었다. 대조군으로는 동일 plate에 약제를 첨가하지 않고 각 세포를 분주하여 세포 생존도 검사를 실시하였다.

세포막 단백질의 분리 : L1210, L1210-AdR₆, -AdR₈, -VcR₇ 및 -VcR₆세포를 각각 배양하여 모은 다음 냉각된 PBS용액으로 3회 세척하고 0.01M Tris/HCl(pH 7.5)-0.01M NaCl-1mM MgCl₂-1 mM PMSF 용액에 세포를 1×10⁶cells/ml 정도로 넣은 후 얼음속에서 15분간 방치하였다. Glass-Teflon Potter Elvehjem 분쇄기로 세포를 균질화한 다음 17ml의 초원심 분리관에 6ml의 32% sucrose-0.02 M Tris/HCl(pH 7.5)-0.145M NaCl-1.5mM MgCl₂용액을 넣고 그 위에 7ml의 10% sucrose-0.02M Tris/HCl(pH 7.5)-0.145M NaCl-1.5mM MgCl₂용액을 조심스레 없어서 두 용액층이 섞이지 않게 하였다.

이 용액 위에 세포용액을 얹고 Sorvall OTD75B 초원심분리기의 AH627 rotor를 사용하여 4°C의 74,400g 에서 1시간 동안 원심분리 하였다. 10% sucrose와 32% sucrose용액 사이에 있는 세포막

단백질 분획을 회수하여 TSM(0.02M Tris/HCl, pH 7.5, 0.145M NaCl, 1.5mM MgCl₂)용액 10ml로 희석한 후 T875 rotor로 4°C에서 101,800g로 35분간 초원심하여 상청액을 제거하였다. 침전물은 다시 TSM 용액 50 μ l에 부유시켰다.

세포막 단백질의 SDS polyacrylamide gel 전기영동: 5-20%의 gradient가 되게 SDS가 첨가된 polyacrylamide slab gel(16 \times 18 \times 0.5 cm)을 만들어 Weber 및 Osborn의 방법²⁴⁾으로 전기영동하였다. 세포막 단백질용액에 동일한 양의 2 \times sample loading buffer(0.12M Tris, pH 7.2, 20% glycerol, 4% SDS, 10% mercaptoethanol)를 넣고 잘 섞은 후 95°C에서 2분간 처리하여 slab gel에 적용하였다. LKB2001의 수직전기영동기를 사용하여 5V/cm의 일정전압을 유지시키면서 5시간 동안 전기영동 하였다. 끝난 gel은 coomassie brilliant blue 염색용액에 gel을 3시간 이상 염색하여 methanol과 acetic acid가 혼합된 탈색용액에 24시간 이상 탈색시켰다.

Iodo-Gen에 의한 세포막 표면단백질의 요드표지법: 각 세포들을 10⁶세포들 이상의 농도로 배양하여 모은 세포를 PBS로 5번 씻은 후 chloroglycoluril이 도포된 유리 vial에 옮긴 다음 1ml의 PBS에 녹인 Na¹²⁵I 100 μ Ci를 가하여 4°C에서 10분간 가볍게 흔든 후 5mM NaI가 든 찬 PBS 용액으로 3번 씻은 후 100 μ l의 lysis buffer(0.01M Tris, pH 7.8 1% triton X-100, 0.14M NaCl, 1mM PMSF)를 가하여 4°C에서 4시간 섞은 후 2,500g에서 원심분리하였다. 각 과정에서 방사능은 ANSR의 γ -counter로 측정하였다. 상청액에 ¹²⁵I 이 표기된 세포막 표면단백질을 정량하여 7.5% SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 하였다. 전기영동이 끝난 후 gel을 말려서 X-ray film에 부착하여 자가방사선상을 시행하였다. 노출은 -20°C에서 30시간 내지 72시간까지 노출시킨 다음 현상하였다.

전기영동에 적용하기 위하여 단백질의 정량은 Biorad의 coomassie brilliant blue G250을 이용한 Bradford의 방법²⁵⁾에 따라 실시하였다.

성 적

그림1은 감수성세포 L1210와 내성세포 L1210-AdR_s 및 -VcR_s에 대한 세포성장곡선을 나타내었다. 세포의 생존도는 사립체의 탈수소효소를 측정하여 흡광도 값으로 나타내었고 L1210는 3일간 계속 성장을 보였고 doubling time이 29.7시간이었으며 L1210-AdR_s와 -VcR_s는 4일간 계속적인 상승을 보였으며 doubling time은 68.7과 58.2 시간을 나타내었다.

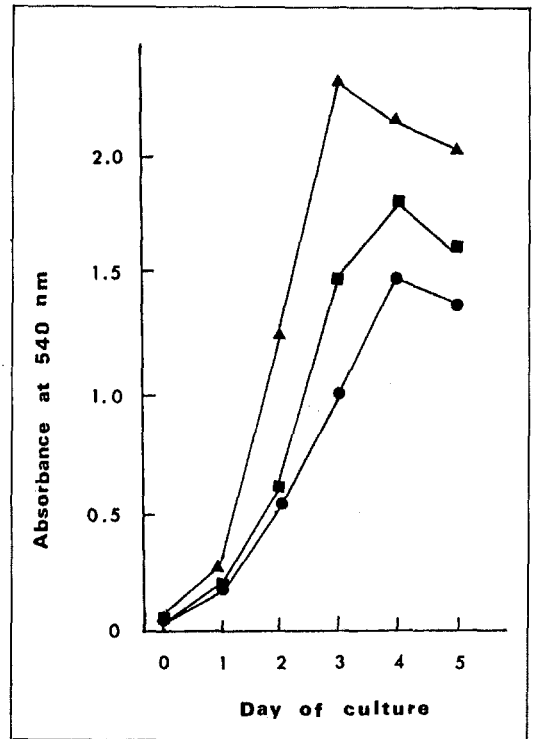


Fig. 1. Growth profile for L1210, L1210-AdR_s and L1210-VcR_s cells by MTT assay. The starting number of cells was 1.5 \times 10⁴ cells/ml. The marks on the curve represents L1210(▲-▲), L1210-AdR_s(●-●), and L1210-VcR_s(■-■) respectively.

두 내성세포들의 내성정도를 서로 비교하기 위하여 L1210, L1210-AdR_s 및 -VcR_s세포의 adriamycin 및 vincristine에 대한 교차내성정도를 비교

하여 그림2에 나타내었다.

항암제의 농도에 따라 생존세포의 정도를 대조군과 비교하여 백분율로 나타내고 생존율 50% 일 때의 약제내성정도(IC₅₀)를 측정하여 두 약제의 복합내성정도를 구하였다.

Adriamycin에 대한 IC₅₀은 L1210가 10±0.03nM, L1210-AdR₅가 2750±40nM, -VcR₆가 2510±28nM

이었으며 내성배수는 -AdR₅가 275배, -VcR₆가 251배였다. Vincristine에 대한 IC₅₀은 L1210세포가 3.6±0.06nM, L1210-AdR₅가 275±4.0 nM, -VcR₆가 355±8.2nM였으며 내성배수로는 -AdR₅는 76.4배, -VcR₆는 98.6배로 두 약제 모두에게 비슷한 정도의 교차내성이 나타났다.

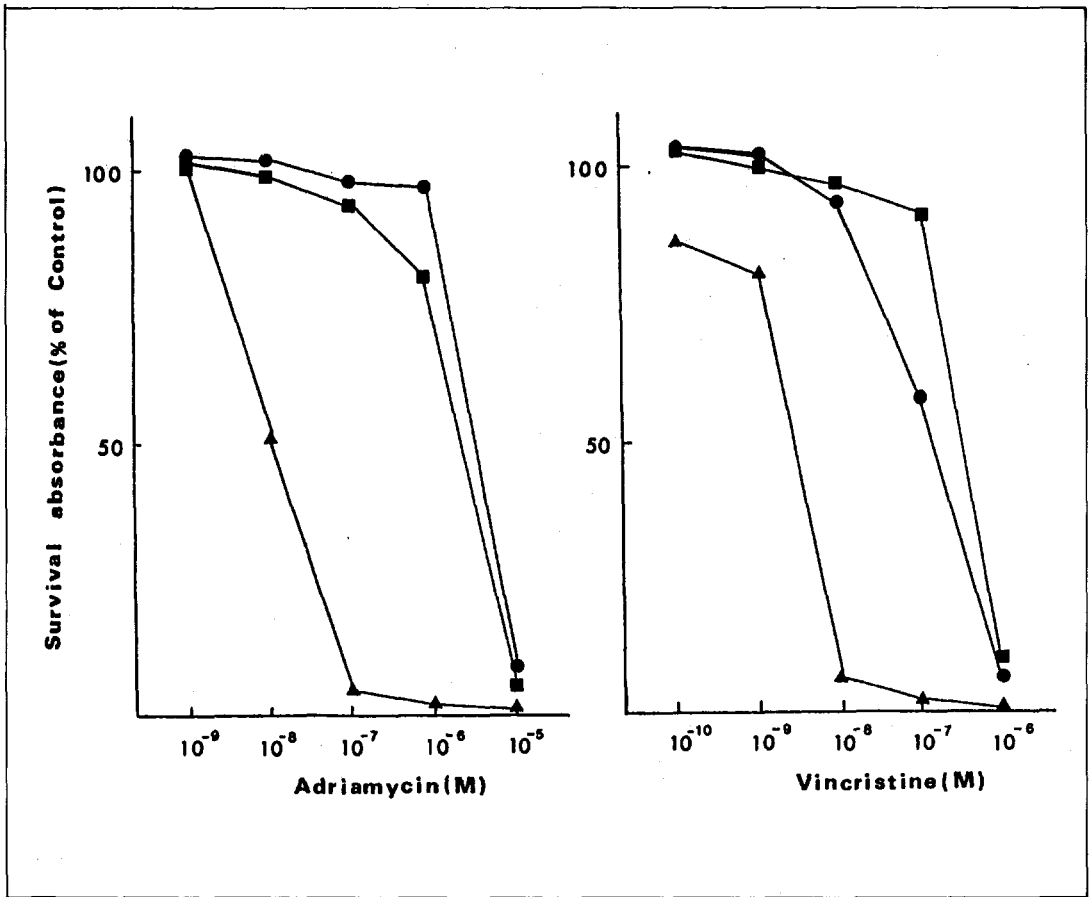


Fig. 2. Survival curves according to the concentration of adriamycin and vincristine of L1210(▲-▲), L1210-AdR₅(■-■), and L1210-VcR₆(●-●) cells by MTT assay.

감수성 세포와 내성세포로부터 분리한 세포막 단백질을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동하여 단백질의 형태 및 분자량을 비교하였다. 그림3은 L1210의 adriamycin 내성세포 -AdR₅ 및 -AdR₆와 감수성 세포를 비교한 것이며 L1210와 L1210-AdR₆

에서는 80Kdal(Kd)과 61Kd이 보였으나 L1210-AdR₅에서는 나타나지 않았으며 L1210-AdR₆에서는 88Kd의 단백질이 L1210에는 없으나 나타났고 L1210-AdR₅에서는 분자량 220, 158 및 88Kd의 단백질이 내성 관계 단백질로 확인되었다.

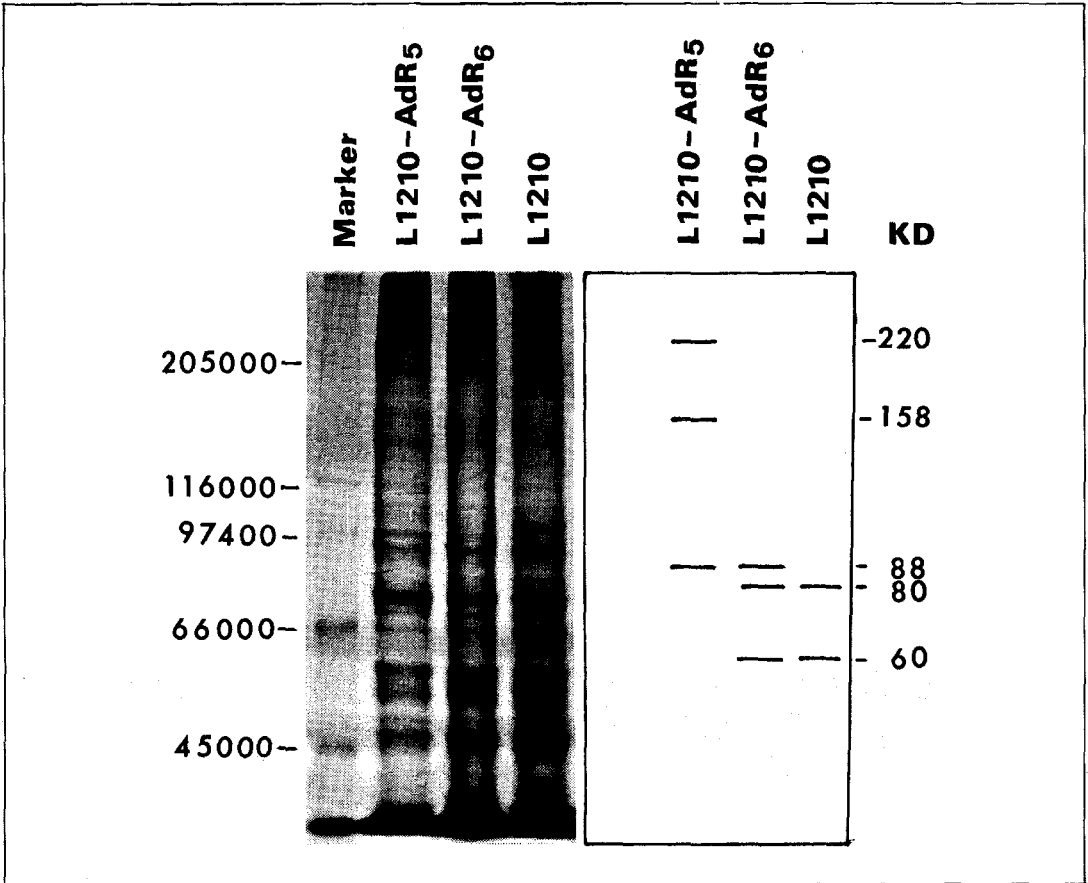


Fig. 3. 5-20% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis pattern and its schematic representation(right side diagram) from cell membrane proteins of L1210, L1210-Adr₅ and -Adr₆ cells. For size comparison, marker proteins are shown in left lane. KD represents kilodalton.

그림4는 vincristine에 내성인 L1210-VcR₆과 -VcR₆의 세포막 표면단백질로 L1210에서는 나타나지 않는 단백질로 L1210-VcR₆에서는 분자량 140 Kd과 88Kd이 나타났고 L1210-VcR₆에서는 분자량이 158, 140 및 88Kd의 내성관계 단백질이 나타났다.

감수성 세포 L1210과 내성세포 L1210-Adr₅ 및 -VcR₆의 막표면의 주단백질에 ¹²⁵I 을 결합시켜 ¹²⁵I 을 결합정도를 표1에 도시하였으며 단백질을 분리하여 SDS-polyacrylamide gel 전기영동 후 자가방사선상에서 비교분석하여 그림5에 나타내었다.

표1에서 각 세포들이 총 ¹²⁵I 의 cpm값을 100%로

하였을 때 결합과정에서 3번 세척하였으며 각 단계마다 결합정도를 도시하였고 세포막 표면단백질에 ¹²⁵I 이 결합된 정도는 L1210에 0.95%, L1210-Adr₅에 5.4%, L1210-VcR₆에 1.7%가 결합되었다.

그림5는 세포막 표면의 단백질을 나타낸 것으로 A는 6-10%의 gradient gel이고 B는 7.5%의 gel에서 전기영동한 것으로서 adriamycin 내성세포 L1210-Adr₅에서는 감수성세포 L1210에서는 나타나지 않은 분자량 158, 72.8 및 42.4Kd의 세개의 단백질이 관찰되었으며 vincristine에 내성인 L1210-VcR₆에서는 분자량 300, 158, 72.8 및 42.4 Kd인 4개의 단백질이 내성관계 막표면단백질로 관찰되었다.

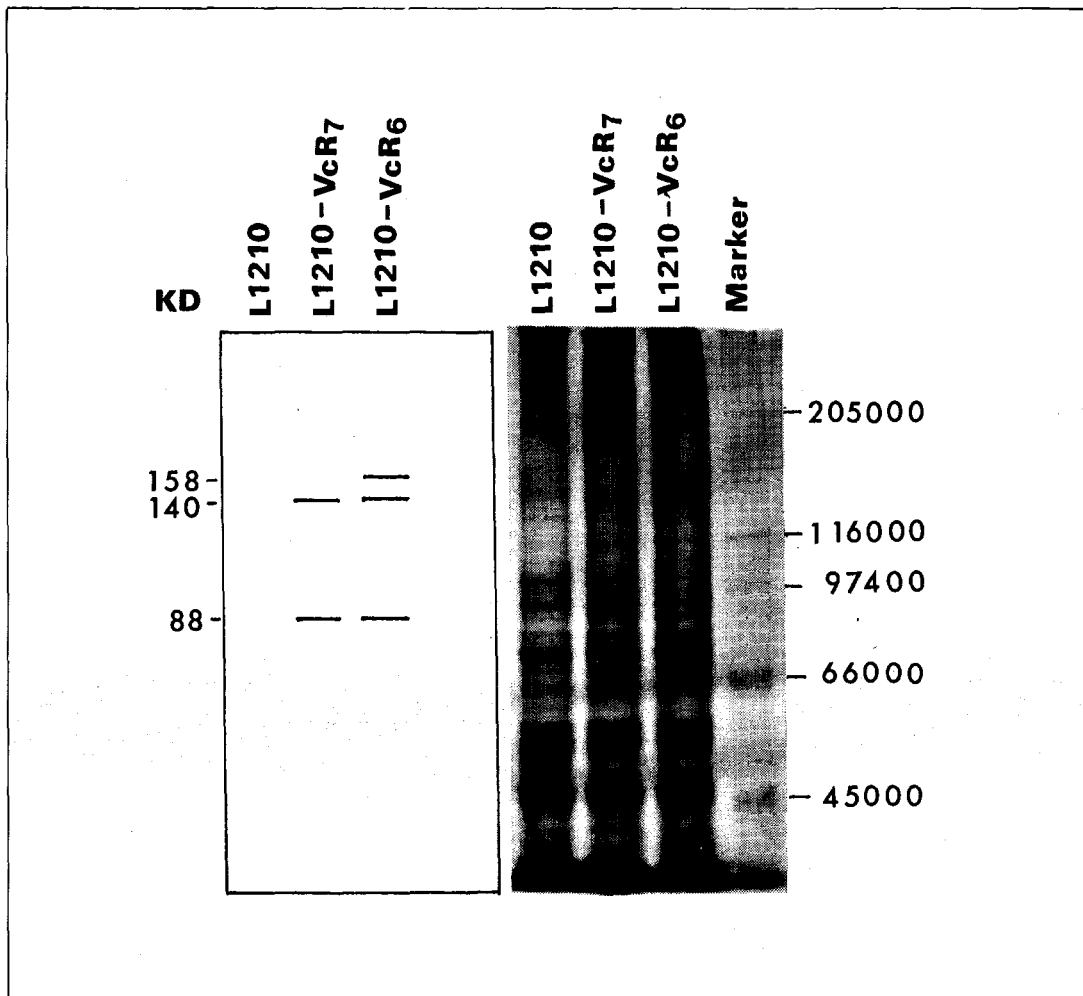


Fig. 4. 5-20% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis pattern and its schematic representation (left side diagram) from cell membrane proteins of L1210, L1210-VcR₆ and -VcR₇ cells. For comparison, marker proteins are shown in right lane. KD represents kilodalton.

Table 1. ¹²⁵I labelling on surface membrane proteins of L1210, -AdR₅ and -VcR₆

Binding process	L1210		L1210-AdR ₅		L1210-VcR ₆	
	cpm(×10 ⁶)	%	cpm(×10 ⁶)	%	cpm(×10 ⁶)	%
Total	115	100	100	100	175	100
Washing-1	78	68	90	90	96	54.9
Washing-2	50	4.3	11	11	13	7.4
Washing-3	3.3	3.7	6.9	6.9	7.5	4.3
¹²⁵ I-surface protein	1.1	0.95	5.4	5.4	2.9	1.7

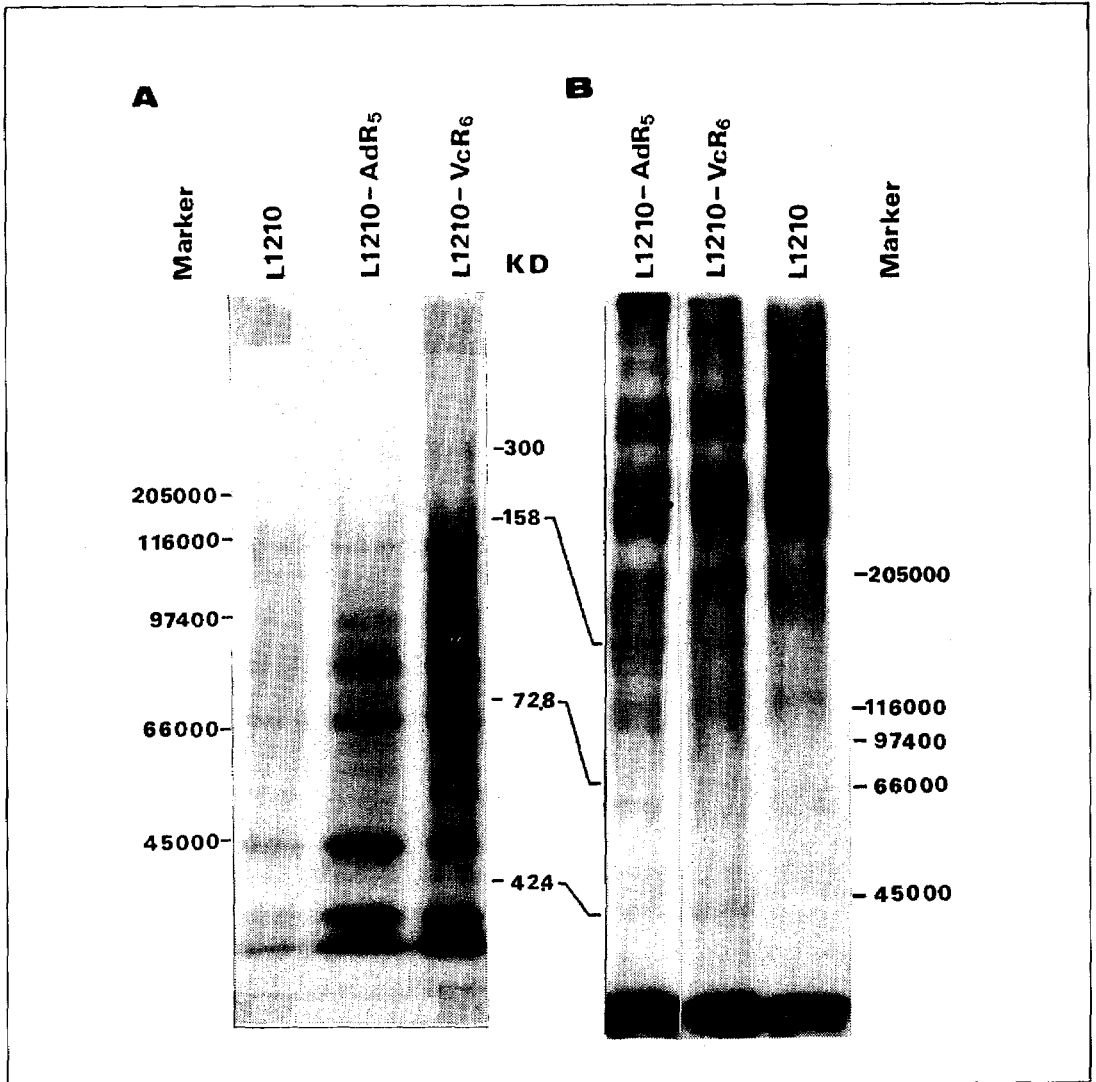


Fig. 5. Autoradiogram of ¹²⁵I-labeled cell surface proteins from L1210, L1210-AdR₅ and L1210-VcR₆ cells. Electrophoresis was performed on 7.5% (A : autoradiographic exposure 30hr) acrylamide slab gel with SDS and 6-10% (B : exposure 72hr) gradient gel.

고찰

항암제에 감수성인 세포는 항암제를 세포질에 축적시키며 내성인 세포는 세포질로부터 항암제를 배출시킨다고 하며 이는 ATP에 의존성이 있고

세포질내에 고농도의 항암제 축적을 방해하므로서 복합내성을 유발한다고 한다.^{3-5,26)} 이는 세포막 단백질의 변화로 항암제가 세포막의 단백질과 결합하여 약제의 축적을 억제한다고 하나 아직 정확한 기전은 잘 알려져 있지 않다.

본 연구에서 생쥐의 림프아세포성 백혈병세포 L1210으로부터 adriamycin과 vincristine에 내성인

각 세포의 성장속도를 나타낸 doubling time은 L1210이 29.7시간, L1210-AdR₅가 68.7시간 -VcR₇이 58.2시간으로 감수성세포보다는 내성세포의 성장속도가 감소되는 것을 관찰하였다. 세포의 생존도 및 약제감수성검사를 위해 생존세포의 사립체 탈수소효소의 활성으로 형성된 MTT formazan 결정에서 흡광도를 측정하는 MTT assay법을 실시하였다.

생성된 약제내성세포의 약제 감수성변화정도는 곧 복합약제내성 정도를 의미한다. Adriamycin과 vincristine 두 약의 각각 복합약제 내성정도를 내성배수로 표기하였으며 L1210-AdR₅세포는 vincristine에 76.4배, L1210-VcR₇는 adriamycin에 대해 98.6배의 내성생성이 나타났으며 두 약제는 서로 복합내성생성약제라 할 수 있다.

내성생성시의 가장 중요한 변화의 하나로 P-당단백질의 과다생성을 들 수 있다. P-당단백질은 세포막을 12회 관통하는 단백질로 중심부에는 세포내로 영양소, 약물, 이온과 대사산물 등의 운반하는 통로가 있다고 한다. 최근 in vitro에서의 복합약제내성에 대한 세포막 변화의 특징을 시사해왔으며 생화학적변화로는 고분자의 세포막당단백질의 과잉발현에 기인된 것이며 Chinese hamster, mouse, human MDR 세포등에서 알려지게 되었다.²⁷⁻³⁰⁾

P-당단백질의 분자량이나 면역학적교차반응은 여러 다른 내성세포에서 유사하게 나타났다. P-당단백질의 발현이 약제내성의 정도와 관계된다는 것 등도 당단백질이 약제와 결합하므로써 세포내의 약제 축적을 감소시킨다²⁹⁾고 한다.

Cornwell 등³²⁾은 방사성물질이 표지된 vinblastine으로 광친화성 표지화 실험에서 Vinblastine과 직접 결합하는 분자량 150,000-180,000인 막단백질을 설명하고 있다.

Yamaguchi 등³³⁾도 인체백혈병세포 K562와 daunorubicin에 내성인 세포막의 단백질을 요드표지법과 SDS-polyacrylamide gel 전기 영동으로 감수성세포에는 없는 5개 단백질의 과잉발현을 시사하고 분자량이 50,000과 210,000 사이에 있다고 하였다. 당단백질과 관련하여 cDNA clone인 vector

pcDR1.3을 사용하여 4.5 Kilobase인 mRNA의 과잉발현을 설명하였으며 *mdr 1 gene*이 encode하는것으로 P-당단백질이 *mdr 1 gene*의 생성물로 간주하였다.^{34,35)}

많은 다른 연구자들^{10,36,37)}은 Ca⁺⁺Channel blocker가 P-당단백질에 결합하여 MDR을 회복할 것이라고 하였다. 이미 인체 위암세포 SNU-1/cisplatin 내성세포나 L1210세포의 adriamycin내성세포 등에 대한 Ca⁺⁺channel blocking인 verapamil을 사용하여 내성극복약제 및 정도등을 관찰보고^{38,39)}하였다.

본 실험에서도 SDS-PA gel 전기영동에서 세포막 단백질의 관찰은 adriamycin에 내성인 L1210세포에서 내성생성이 10⁻⁶M에서는(L1210-AdR₅)감수성 세포와 같이 분자량 60과 80Kd이 나타나나 10⁻⁸M 내성인 AdR₅에서는 없어지는 것을 볼 수 있었으며 AdR₅에서는 220Kd, 158Kd, 88Kd의 3개의 막 단백질이 관찰되었다. Vincristine에 내성인 L1210-VcR₇에서는 140Kd과 88Kd인 두개의 단백질이 -VcR₇에서는 158Kd이 더 관찰되었다. 이는 내성정도가 증가함에 따라 새로운 막 단백질의 생성을 관찰할 수 있다. 이와 관련하여 우리가 이미 발표한³⁹⁾염색체 유전자의 형태를 관찰하였을 때 역시 DMs나 HSR이 AdR₅에서는 선명하지 않았고 AdR₅에서는 많이 나타난 것 등도 내성정도의 증가에 기인된다고 할 수 있다.

세포표면단백질을 ¹²⁵I 와 세포막 표면주단백질과 결합한 것을 전기영동하여 자기방사기록법으로 관찰되는 세포막 표면단백질의 변화로 내성 L1210-AdR₅에서는 158Kd, 72.8Kd, 42.4Kd의 세개의 단백질과 VcR₇에서는 300, 158, 72.8, 42.4Kd의 4개의 내성관계 막표면단백질을 관찰하였다. 세포막 표면단백질은 세포표면의 수용체로 단백질의 끝에 글리코젠이 붙어서 존재하는 것이 많고 이것과 당단백질과 연관지을 수 있다. 세포막의 이러한 변화와 연관지어 내성시의 세포막 단백질의 작용이 곧 세포내 약제농도에 변화를 주고 세포내 항암제의 머물음을 방해하는 결과를 초래한다고 할 수 있다.

내성관계 막표면단백질의 변화 외에도 내성과

관계되는 기전으로 free radical의 장애, glutathione transferase의 과발현,⁴⁰⁾ topoisomerase II와 구조변화,⁴¹⁾ 약제의 분해정도의 증가 등⁴²⁾이 내성생성의 기전으로 들고 있으나 세포내의 약제배출이나 세포내 소기관에 약제의 분포정도에 대해서는 아직 잘 모르고 있다.

Hindenberg 등⁴³⁾의 관찰에서 anthracycline 내성세포(HL-60/AR)에서 세포내 doxorubicin의 분포는 골지체에 먼저 가고 용해소체와 사립체로 퍼져 나간다고 하였다.

이상의 결과를 바탕으로 내성세포막의 단백질과 항암제의 축적내지는 배출기전에 대한 더욱 상세한 연구로 단백질의 성질이나 sequence, 유전자 등을 밝혀 항암제내성을 극복할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

Adriamycin과 vincristine 각각에 내성인 생쥐의 림프아세포성 백혈병세포 L1210세포의 특성과 내성관계 단백질을 찾아내고 항암제의 세포내 분포를 관찰하였다.

항암제의 내성생성은 adriamycin이 $10^{-5}M$ 과 $10^{-6}M$ 에서 자란 세포를 L1210-AdR₅와 -AdR₆로 하고 vincristine은 $10^{-6}M$ 과 $10^{-7}M$ 에서 자란 세포를 L1210-VcR₆와 -VcR₇로 하였다. 감수성세포는 L1210으로 하였다.

내성세포의 성장속도는 감수성세포에 비해 느렸으며 doubling time은 L1210가 29.7시간, L1210-AdR₅가 68.7시간 -VcR₆가 58.2시간이었다.

복합내성은 내성인자로 표기되었고 L1210-AdR₅는 vincristine에 대해 76.4배, -VcR₆는 adriamycin에 대해 98.6배로 나타났다.

감수성세포와 내성세포의 세포막 단백질을 비교한 결과 L1210-AdR₅에서는 220, 158, 88 Kd의 내성관계단백질이 나타났고 -VcR₆에서는 158, 140 및 88Kd의 내성관계단백질이 관찰되었다.

세포막 표면단백질을 ¹²⁵I로 결합시켜 자가방사선상으로 분석하였다. 세포막 표면단백질에 결합

되는 ¹²⁵I의 정도는 L1210에 0.95% L1210-AdR₅에 5.4%, -VcR₆에 1.7% 였다.

세포막표면단백질은 L1210-AdR₅에서는 158, 72.8 및 42.4 Kd의 단백질, -VcR₆에서는 300, 158, 72.8 및 42.4 Kd의 단백질이 관찰되었다.

참고 문헌

1. Fojo A, Hamilton TC, Young RC, Ozols RF : Multidrug resistance in ovarian cancer. *Cancer* 60 : 2075-2080, 1987.
2. Kartner N, Ling V : Multirug resistance in cancer. *Sci Am* 3 : 26-33, 1989.
3. Tsuruo T, Iida H, Kawabata H : High calcium content of pleiotropic drug-resistant P388 and K562 leukemia and Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 44 : 5095-099, 1984.
4. Dano K : Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochem Biophys Acta* 323 : 466-483, 1973.
5. Skovsgaard T : Mechanism of cross resistance between vincristine and daunorubicin in Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Res* 38 : 4722-4727, 1978.
6. Arrick BA, Nathan CF : Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy. *Cancer Res* 44 : 4224-4232, 1984.
7. Martinsson T, Levan G : Localization of the multidrug resistance associated 170 KDa P-glycoprotein gene to mouse chromosome 5 and to homogeneously staining regions in multidrug resistant cells by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 45 : 99-101, 1987.
8. Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y : Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res* 41 : 1967-1972, 1981.

9. Biedler JL, Peterson RHF : Altered plasma membrane glyco conjugates of Chinese hamster cells with acquired resistance to actinomycin D, daunorubicin and vincristine. In Sartorrelli AC, Lab JS, Bertino JR : Molecular actions and targets for cancer chemotherapeutic agents. Academic Press, NY, 1981, p453-482.
10. Sweet P, Chan PK, Slater LM : Cyclosporin A and verapamil enhancement of daunorubicin-produced nucleolar protein B23 translocation in daunorubicin-resistant and sensitive human and murine tumor cells. *Cancer Res* 49 : 677-680, 1989.
11. Hamada H, Tsuruo T : Functional role for 170-to 180-Kda glycoprotein specific to drug-resistant tumor cells as revealed by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci* 83 : 7785-7789, 1986.
12. Danks MK, Metzger DW, Ashmun RA, Beck WT : Monoclonal antibodies to glycoproteins of vinca alkaloid resistant human leukemic cells. *Cancer Res* 45 : 3220-3224, 1985.
13. Beck T, Miller TJ, Tanzer LR : Altered surface membrane glycoproteins in vinca alkaloid-resistant human leukemia lymphoblasts. *Cancer Res* 39 : 2070-2076, 1979.
14. Juliano RL, Ling V : A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochem Biophys Acta* 455 : 152-162, 1976.
15. Peterson RHF, Biedler JL : Plasma membrane proteins and glycoproteins in Chinese hamster cells sensitive and resistant to actinomycin D. *J Supramol Struct* 9 : 289-298, 1978.
16. Garman D, Center MS : Alteration in cell surface membrane in Chinese hamster lung cells resistant to Adriamycin. *Biochem Biophys Res Commun* 105 : 157-163, 1982.
17. Tsuruo T, Iida-Saito H, Kawabata H, Ohhara T, Hamada H, Utagoiji T : Characteristics of resistance to adriamycin in human myelogenous leukemia K562 resistant to adriamycin and in isolated clones. *Jpn J Cancer Res*, 77 : 682-692, 1986.
18. Sen S, Teeter LD, Kuo R : Specific gene amplification associated with consistent chromosomal abnormality in independently established multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells. *Chromosoma* 95 : 117-125, 1987.
19. Chen C, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB : Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 47 : 381-389, 1986.
20. DeBruijn ML, Van der Blik AM, Biedler JL, Borst P : Differential amplification and disproportionate expression of five genes in three multidrug-resistant Chinese hamster lung cell lines. *Mol Cell Biol* 6 : 4717-4722, 1986.
21. Van der Blik Am, Bass F, Teu Haute de Lange T, Kooiman PM, Van der Velde-Koerts T, Borst P : The human *mdr3* gene encodes a novel P-glycoprotein homologue and gives rise to alternatively spliced mRNAs in liver. *EMBO J* 6 : 3325-3331, 1987.
22. McGrath T, Latoud C, Arnold ST, Safa AR, Felsted RI, Center MS : Mechanisms of multidrug resistance in HL60 cells : Analysis of resistance associated membrane proteins and levels of *mdr* gene expression. *Biochem Pharmacol* 38 : 3611-3619, 1989.
23. Carmicheal JD, Degraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB : Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay : Assessment of chemosensitivity testing.

- Cancer Res 47 : 936-942, 1987.
24. Weber K, Osborn M : The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 244 : 4406-4412, 1969.
 25. Bradford MM : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 49 : 248-254, 1976.
 26. Marquardt D, Mccrone S, Melvin S : Mechanisms of multidrug resistance in HL60 cells : detection of resistance-associated proteins with antibodies against synthetic peptides that correspond to thd deduced sequence of P-glycoprotein. *Cancer Res* 50 : 1426-1430, 1990.
 27. Richert N, Akiyama S, Shen DW, Gottesman MM, Pastan I : Direct cloning of human ovarian carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci* 82 : 2330-2334, 1985.
 28. Bell DR, Gerlach JH, Kartner N, Buick RN, Ling V : Detection of P-glycoprotein in ovarian cancer : a molecular marker associated with multidrug resistance. *J Clin Oncol* 3 : 311-315, 1985.
 29. Deuchars KL, Du RP, Naik M, Evernden-porelle D, Kartner N, Vand Der Bliet AM, Ling V : Expression of hamster P-glycoprotein and multidrug resistance in DNA-mediated transformants of mouse LTA cells. *Mol Cellular Biol* 2 : 718-724, 1987.
 30. Keizer HG, Schuurhuis GJ, Broxterman HJ, Lankelma J, Schoonen WGJ, Van Rijn J, Pinedo HM, Joenje H : Correlation of multidrug resistance with decreased drug accumulation altered subcellular drug distribution and increased P-glycoprotein expression in cultured SW-1573 human lung tumor cells. *Cancer Res* 49 : 2988-2993, 1989.
 31. Cornwell MM, Tsuruo T, Gottesman MM, Pastan I : ATP-binding properties of P-glycoprotein from multidrug-resistant KB cells. *FASEB J* 1 : 51-54, 1987.
 32. Cornwell MM, Safa AR, Felsted RL, Gottesman MM, Pastan I : Membrane vesicles from multidrug-resistant human cancer cells contain a specific 150- to 170-KD protein detected by photoaffinity labeling. *Proc Natl Acad Sci* 83 : 3847-3850, 1986.
 33. Yamaguchi T, Ikezaki K, Kishiye T : Potentiation of anticancer agents by new synthetic isoprenoids II. Inhibition of the growth of transplantable murine tumors. *J Natl Cancer Inst* 73 : 903-912, 1984.
 34. Shen DW, Fojo A, Roninson IB, Chin JE, Soffir R, Pastan I, Gottesman MM : Multidrug resistance in DNA mediated transformants is linked to transfer of the human mdr 1 gene. *Mol Cell Biol* 6 : 4039-4045, 1986.
 35. Ueda K, Cardarell C, Gottesman MM, Pastan I : Expression of a full-length cDNA for the human mdr 1 (P-glycoprotein) gene confers multidrug-resistance. *Proc Natl Acad Sci* 84 : 3004-3008, 1987.
 36. Sweet P, Chan PK, Slater LM : Cyclosporin A and verapamil enhancement of daunorubicin-produced nucleolar protein B23 translocation in daunorubicin-resistant and-sensitive human and murine tumor cells. *Cancer Res* 49 : 677-680, 1989.
 37. Cano-Gauci DF, Riordan JR : Action of calcium antagonists on multidrug resistant cells. *Biochem Pharmacol* 36 : 2115-2123, 1987.
 38. 손성권, 김정희 : Cisplatin 내성인 사람 위암 세포주 SNU-1의 복합약제내성 및 verapamil의 효과. *영남의대학술지* 9(1) : 75-89, 1992.
 39. 이광열 : 생쥐의 백혈병세포 L1210의 adriamycin에 대한 내성유발 및 그 특성. 박사학위논문집, 영남대학교 대학원, 1991, pp 163-

- 194.
40. Batist G, Tulpule A, Sinha BK, Katki AG, Myers CE, Cowen KH : Overexpression of a novel glutathione transferase in multidrug-resistant human breast cancer cells. *J Biol Chem* 261 : 1544-1549, 1986.
41. Ross WE, Sullivan DM, Chow KC : Altered function of DNA topoisomerases as a basis for antineoplastic drug action. In Devita V, Hellman S, Rosenberg S : Important advances in oncology. JB Lippincott Philadelphia, 1988, pp.65-91.
42. Vasanthakumar G, Ahmed NK : Contribution of drug transport and reductases to daunorubicin-resistance in human myelocytic cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 18 : 105-110, 1986.
43. Hindenburg AA, Gervasoni JE, Krishna S, Stewart VJ, Rosado M, Lutzky J, Bhalla K, Baker MA, Taub RN : Intracellular distribution and pharmacokinetics of daunorubicin in anthracycline-sensitive and -resistant HL-60 cells. *Cancer Res* 49 : 4607-4614, 1989.

- Abstract -

Membrane Protein Alterations Associated with
Anticancer Drug Resistance in Mouse
Lymphoblastic Leukemia L1210 Cells

Seong Yong Kim, Sung Kweon Son, Jae Ryong Kim,
Jung Hye Kim

*Department of Biochemistry
College of Medicine, Yeungnam University
Taegu, Korea*

Multidrug resistance(MDR) phenotype is frequently observed in animal and human cancer cell lines selected for in vitro resistance to a single chemotherapeutic agent. It is characterized by the diminished drug accumulation and is related to the drug efflux mechanism in resistant cells.

In the present study, adriamycin resistant cells(L1210-AdR₆ : 10⁻⁶M adriamycin, -AdR₅ : 10⁻⁵M) and vincristine resistant cells (L1210-VcR₇ : 10⁻⁷M vincristine, -VcR₆ : 10⁻⁶M) were produced from mouse lymphoblastic leukemia cell line L1210.

Growth profiles of survived cells were observed for 5 days with MTT(thiazolyl blue) assay and resistance was compared with IC₅₀(drug concentration of 50% survival reduction in absorbance).

Resistant cells proliferated more slowly than sensitive cell.

Doubling times were 29.7hr in L1210, 68.7hr in L1210-AdR₅ and 58.2hr in -VcR₆.

MDRs expressed as resistance factor were as follows, L1210-AdR₅ was 76.4 times for vincristine, L1210-VcR₆ was 96.4 times for adriamycin.

The cell membrane proteins with three different M.W. were recognized to be related resistance, 220, 158, and 88 kd in L1210-AdR₅, 158, 140 and 88 kd in L1210-VcR₆ by SDS-PAGE electrophoresis.

Cell surface membrane proteins were identified by radio-iodination and autoradiogram. their molecular weights were 158, 72.8, and 42.4 Kd in L1210-VcR₆.

Key Words : MDR, MTT, Cell surface membrane protein