

항암제 내성 L1210세포의 Glutathione 대사 관련효소 유전자의 발현 양상

영남대학교 의과대학 생화학교실

김성용 · 김재룡 · 김정희

서 론

암을 치료하기 위해서는 외과적 방법, 화학요법, 방사선요법, 면역요법 등이 이용되고 있다. 그중 화학요법은 암의 치료에서 보편적이며, 단독으로 또는 다른 치료법과 병행하여 시행된다. 그러나 화학요법 시술의 어려움은 여러 가지 부작용 외에 암세포가 항암제에 대해 내성을 획득함으로 치료에 실패하는 것이다. 암세포가 항암제에 내성을 가지게 되는 기전에는, 암세포가 원래부터 특정 항암제에 대해 내성을 가지고 있는 선천성 내성과 항암제에 노출됨으로 그 항암제에 대해 내성을 갖는 획득내성을 들 수 있다. 특히, 획득내성은 특정 항암제에 노출된 암세포에서 그 항암제의 표적이 되는 유전자의 증폭 및 과발현이 유도되어 생긴다고 한다. 또 내성 생성은 세포 독성 물질을 세포바깥으로 내보내는 역할을 하는 원형질막의 p-당단백질의 과다 발현에 의해 생기기도 하며, 동시에 여러 약제에 대해 내성이 생기는 것을 암세포의 다제내성(MDR)이라고 하며, 이 다제내성은 화학요법의 중대한 장애 요소 중의 하나이다.¹⁾ 그리고 세포 독성 물질의 해독에 중요한 역할을 하는 것으로

알려져 있는 glutathione이 증가하거나 항암제와 glutathione의 결합이 촉진됨으로써 항암제의 효과를 떨어뜨리고 대사를 활성화시키는 여러 효소들의 증가 등에 의해서도 생길 수 있다.

Glutathione은 모든 진핵세포내에 존재하며 세포내에 가장 많은 양을 차지하는 비단백 thiol로서 γ -Glu-Cys-Gly의 tripeptide 구조의 화합물이다.²⁾

Glutathione의 대사는 L-glutamate와 L-cysteine이 γ -glutamylcysteine synthetase(GCS)에 의해 γ -glutamylcysteine이 된 후, glycine이 glutathione synthetase에 의해 축합되어 glutathione이 만들어 지는데 각 과정에서 1분자씩의 ATP가 소모된다. 이렇게 합성된 glutathione은 γ -glutamyl transpeptidase(GGT)에 의해 분해되며, 분해 산물들은 다시 glutathione의 합성에 이용될 수 있다. 세포내에서 glutathione은 glutathione peroxidase의 촉매로 세포내의 산화물들과 반응하여 환원시키고 자신은 산화형의 glutathione(GSSG)으로 되고, glutathione reductase에 의해 다시 환원되어 세포내 산화물을 제거하는 역할을 한다. 또 glutathione이 직접 혹은 glutathione S-transferase (GST)에 의해 세포 독성 물질과 결합하여 세포 독성 물

질의 대사를 촉진시키거나, 작용을 떨어뜨려 세포를 보호하는 기능을 한다.^{3,4)} 이러한 glutathione의 기능은 산화환경에 노출되어 받은 손상으로부터 세포를 보호하며, 방사선, 자외선, 고체온 등으로 부터, 또 melphalan, cyclophosphamide, nitrosoureas, 6-thiopurine, adriamycin, daunorubicin 등 여러가지 항암제 및 독극물로부터 세포를 보호하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.⁵⁾ 따라서 세포내의 glutathione의 농도는 결국 다양한 유해환경으로부터 세포를 보호하는데 매우 중요하며, glutathione 합성의 첫과정을 촉매하는 GCS와 분해에 관여하는 GGT, 그리고 세포 독성 물질과 glutathione의 축합을 촉매하는 GST의 활성화도 및 이들 유전자의 발현에 의해 조절된다고 할 수 있다.^{6,8)}

암세포에서 glutathione의 역할은 항암제의 암세포에 대한 독작용을 방해하는 작용, 즉 항암제에 대한 내성과 밀접한 관계가 있다. Bump 등⁹⁾은 암의 방사선 치료에서 사용되는 hypoxic cell radiosensitizer인 misonidazole의 암세포에 대한 독성이 glutathione을 같이 투여하였을 때 감소한다고 하였다. 이러한 사실은 세포 독성 물질이나 항암제 등의 작용이 암세포에서 glutathione에 의해 억제될 수 있음을 시사한다. 또 항암제에 저항성을 가지는 사람의 난소암세포¹⁰⁾ 및 쥐의 결장 선암종 세포주¹¹⁾ 등에서 glutathione의 양이 모세포에 비하여 증가해 있으며, GCS억제제인 buthionine sulfoxamine(BSO)을 투여하여 세포내의 glutathione 양을 감소시키면, 다시 항암제에 대한 감수성이 나타난다는 보고들이 있으며, TNF(tumor necrotizing factor)- α 에 내성인 사람의 신장암 및 난소암세포에 BSO를 같이 투여하면 TNF- α 의 세포독작용이 다시 나타나는 것으로 보고되고 있다.¹²⁾ Alkylating agent와 cisplatin 등과 같은 항암제에 대한 내성을 가진 암세포들에

서도 세포내 glutathione농도가 증가되어 있는 것으로 보고 되고 있다.¹³⁻¹⁵⁾ 특히 L-phenylalanine mustard에 저항성이 생긴 사람의 전립선암세포 DU-145에서 세포내의 glutathione양의 증가와 함께 GCS의 활성화도가 증가되어 있다는 보고¹⁶⁾가 있는데 이것은 glutathione의 증가가 GCS활성 증가에 기인 한다고 할 수 있으며, 내성에 GCS가 관여함을 알 수 있다.

Glutathione의 분해효소인 GGT도 tumor promoters, carcinogens, steroid hormone 등에 영향을 받으며, 전구암과 암세포의 세포내 glutathione 합성을 상향조절(upregulation)하여 암세포의 항암제에 대한 저항성을 나타내는데 관여한다고 한다.^{17,18)}

세포 독성 물질들과 glutathione의 축합을 촉매하는 GST는 사람의 난소암,¹⁹⁾ 폐암,²⁰⁾ 전립선암,²¹⁾ 및 유방암²²⁾ 등에서 유전자의 과발현이 보고되고 있으며, 특히 다제내성을 가진 위암 및 대장암세포에서 MDR gene의 발현이 미약한 경우 GST isoenzyme들중 GST- π 의 활성화와 발현이 높게 나타난다는 보고²³⁾도 있다.

이와같이 암세포에서 glutathione이 항암제 내성에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 많은 연구들에서 보고되었지만, glutathione대사에서 어떤 효소들이 내성세포내 glutathione농도의 조절에 중요한 역할을 하는지, 또 이들이 항암제 내성과 어떤 관련이 있는지에 관한 연구는 드문 실정이다.

본 연구에서는 생쥐의 백혈병 세포 L1210세포와 adriamycin, vincristine, cisplatin에 각각 내성을 갖는 내성세포들을 대상으로 glutathione의 세포내 농도와 glutathione대사에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 GCS, GGT, GST의 활성화도 및 유전자 발현을 관찰함으로써 각기 다른 항암제에 내성인 암세포에서 glutathione농도의 차이 및

GCS, GGT, GST의 세포소중 어떤 효소가 내성 세포내의 glutathione 조절에 중요한 역할을 하는지를 관찰하였다.

재료 및 방법

실험재료

생쥐의 백혈병세포 L1210은 American Type Cultural Collection(ATCC)사로 부터 구입하였으며, 내성 세포는 김 등²⁴⁾ 과 김 등²⁵⁾에 의해 이미 내성이 유도되어 그 특성이 밝혀진 항암제 내성 세포 L1210AdR, L1210VcR, 및 L1210Cis를 사용하였다.

배양 및 유지 : 항암제내성 L1210변이주 등과 L1210은 10% iron supplemented bovine serum (Hyclone사)와 50 μ g/ml gentamycin이 첨가된 Fischer 배양액(Gibco사)으로 37 $^{\circ}$ C, 5% 이산화탄소 배양기에서 배양하였다. 내성변이주 L1210AdR, L1210VcR, 및 L1210Cis 세포는 동일한 배양액에 각각 10 μ M adriamycin, 1 μ M vincristine, 및 10 μ M cisplatin를 첨가하여 배양하였다.

실험방법

Glutathione 정량 및 효소활성도 측정 : 시료 준비는 먼저 midlog phase로 배양한 L1210, L1210AdR, L1210VcR 및 L1210Cis 세포들을 50ml 원심분리관에 옮긴 후, 1,500 \times g에서 10분간 원심분리하였다. 상청액을 버리고 10ml의 PBS(8g NaCl, 0.2g KCl, 1.44g Na₂HPO₄, 0.24g KH₂PO₄/L, pH 7.4)를 가한 후 세포를 잘 분산시키고, 세포수를 측정 한 다음 1,500 \times g에서 10분간 원심분리하였다. 세포수가 1 \times 10⁷cells/ml가 되도록 냉각증류수를 넣은 후 세포를 분산시켜 액체질소로 급격히 얼렸다가 다시 녹여 10초간의 sonication하여 세포를 분쇄시켰다. 4 $^{\circ}$ C, 15,000 \times

g 에서 10분간 원심분리하여 그 상청액을 시료로 사용하였다.

Glutathione 정량은 Akerboom과 Sies의 방법²⁶⁾을 이용하였다. Glutathione 정량을 위한 시료로는 효소활성도를 위한 상기 시료 1ml에 0.25ml의 25% perchloric acid를 넣어 단백질을 변성시킨 후, 2N KOH로 중화시키고 15,000 \times g에서 5분간 원침하여 상청액을 사용하였다. 1ml의 0.1M sodium phosphate 완충액(pH7.0), 20 μ l의 1.5mg/ml 5',5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, 50 μ l의 4mg/ml의 NADPH, glutathione reductase의 혼합액을 25 $^{\circ}$ C에 5분간 반응시켰다. 시료 0.1ml을 넣어 412nm 파장에서 흡광도의 변화를 3분간 측정하였다. 시료대신 표준 glutathione(GSSG)용액을 넣어 위와 같은 방법으로 반응시켜 3분간 측정 한 흡광도를 기준으로 시료용액의 glutathione을 단백질 1mg에 대한 양으로 구하였다.

GCS의 활성도 측정은 Nardi 등의 방법²⁷⁾에 따라 100mM Tris/Cl(pH 8.2), 50mM KCl, 6mM DTT, 20mM MgCl₂, 3mM cysteine, 15mM glutamate, 및 6mM ATP의 조성을 가진 반응액 0.3ml를 시험관에 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켜 thiol을 완전히 환원시킨 후 시료 50 μ l를 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 반응시켰다. 반응 시작 후 5분, 15분, 25분에 반응액 45 μ l씩을 취하여 50mM N-ethylmorpholine 50 μ l와 5mM monobromobimane 20 μ l가 들어있는 미세원심분리관에 넣어 25 $^{\circ}$ C, 암실에서 15분동안 반응시켜 monobromobimane의 유도물질을 만들었다. 여기에 80 μ l의 10% sulfosalicylic acid를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 0.5ml가 되도록 증류수를 넣어 15,000 \times g에서 2분간 원침하여 그 상청액을 high performance liquid chromatography(HPLC)하였다. 이동상으로 15% methanol: 85% acetic acid(0.25%, pH 3.6)을 사용하고, excitation은 370nm, emission은 485nm

의 과정에서 검출하였다.

GGT의 활성도 측정은 γ -glutamyl-p-nitroanilide가 들어있는 기질용액 0.5ml를 시험관에 넣고 약 5분간 37℃에 방치하였다. 시료 50 μ l를 넣고 정확히 30분간 반응시킨 후 정색시약(p-dimethylaminocinnamaldehyde)과 반응정지액(0.36N HCl)이 2:1 비율로 섞인 용액을 1.5ml를 넣어 565nm에서 흡광도를 측정하였다.

GST 활성도 측정은 Habig 등의 방법²⁸⁾으로 0.1M potassium phosphate 완충액(pH 6.5) 0.7ml에 25 μ l의 0.04M reduced glutathione과 시료 0.1ml를 넣고 25℃에 5분간 방치한 후, 10 μ l의 0.12M 2,4-dinitrochlorobenzene을 넣어 반응을 시작시켰다. 정확히 2분뒤 20% trichloroacetic acid 165 μ l을 첨가하여 반응을 정지시키고, 15,000 \times g에서 5분간 원심한 후, 상청액을 412nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

DNA와 RNA의 정제 : DNA의 정제는 midlog phase로 배양한 L1210, L1210AdR, L1210VcR 및 L1210Cis 세포들을 50ml 시험관에 옮긴 후 1,500 \times g에서 10분간 원심분리하였다. 상청액을 버리고 10ml의 TBS(8g NaCl, 0.2g KCl, 3g Tris base, pH 7.4)를 가한 후 세포를 잘 분산시키고, 세포수를 측정한 다음 1,500 \times g에서 다시 10분간 원심분리하였다. 세포수가 $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ cells/ml가 되도록 TBS를 넣은 후 세포를 분산시키고 1.5ml 미세원심분리관에 1ml씩 세포를 넣고 1,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. 상청액을 버리고 남은 용액에 세포를 분산시킨 후 1ml의 추출완충액(10mM Tris/Cl(pH 8.0), 0.1M EDTA(pH 8.0), 0.5% SDS, 20 μ g/ml pancreatic RNAase)을 넣고 혼합한 다음 37℃에서 1시간 반응시켰다. Proteinase K를 100 μ g/ml의 농도로 넣어 50℃에서 3시간 동안 반응시켰다. 0.5ml씩 다른 시험관에 나누어 후 같은 양의 tris-saturated phenol로

추출한 후, tris-saturated phenol : chloroform(1:1) 혼합용액으로 추출하고, chloroform-isoamyl alcohol 용액으로 다시 추출하였다. 수용액층을 다른 시험관에 옮기고 10M ammonium acetate, pH 5.4를 0.2배 용량을 넣고, -20℃로 냉각한 에탄올을 2배 용량으로 넣어 잘 혼든 후 15,000 rpm에서 5분간 DNA를 침전시켰다. 70% 에탄올로 DNA를 세척한 후 TE(10mM Tris/HCl, pH 8.0, 1mM EDTA)용액에 녹였다.

RNA의 정제는 Chomczynski 및 Sacchi의 acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform 추출법²⁹⁾을 이용하였다. 세포들을 1×10^7 cells/ml 되게 한 후 1.5ml 미세원심분리관에 옮긴 다음 15,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. 상청액을 버리고 남은 용액에 세포를 분산시킨 후 변성용액(4M guanidium thiocyanate, 25mM sodium citrate, pH 7.0, 0.5% sarcosyl, 0.1M 2-mercaptoethanol) 0.5ml와 2M sodium acetate(pH 4.2) 50 μ l 및 water-saturated phenol 0.5ml를 넣고 섞은 후 0.1ml의 chloroform을 가하여 30초간 진탕시켰다. 얼음속에 15분간 방치한 후 4℃의 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 수용액층을 조심스럽게 다른 시험관에 옮기고 동량의 isopropyl alcohol을 넣고 -20℃에 45분간 방치한 후 다시 원심분리하여 침전물을 70% 에탄올로 세척하고 DEPC처리한 증류수로 RNA를 녹였다.

RT-PCR : L1210세포의 RT-PCR(Reverse transcription-polimerase chain reaction)을 위한 GCS와 GGT의 primer들은 쥐와 사람의 cDNA 염기서열로부터 상동성이 가장 많은 부분을 선택하여 제작하였으며, 각각의 primer들의 염기서열은 다음과 같다.

γ -glutamylcysteine synthetase

5' primer(5'- TACATGGATGCCATGGGATT-3')

3' primer(5'- CCAGCGACAATCAATGTCTG-3')

γ -glutamyl transpeptidase

5' primer(5'- CATCAACCTCTACTTTGGCT-3')

3' primer(5'- AACCAACCATCCGAACCTTGC-3')

RT-PCR은 10×PCR 완충액 1 μ l, 25mM MgCl₂ 2 μ l, 10mM dNTP 혼합액 4 μ l, 20U/ μ l RNAase inhibitor 0.5 μ l, 50U/ μ l MuLV RTase 0.5 μ l, 3' primer를 0.75 μ M 되도록, 그리고 RNA 1 μ g을 넣은 후 DEPC처리한 증류수로 전체량이 10 μ l 되도록 하였다. 실온에서 10분정도 방치하고 40℃에서 30분 반응시켰다. 여기에 다시 10× PCR 완충액 4 μ l, 25mM MgCl₂ 2 μ l, 4U/ μ l Ampli Taq 0.25 μ l, 5' primer를 0.75 μ M 되도록 넣은 후 증류수로 40 μ l 되도록 하였다. 처음 94℃에서 2분간 변성시킨 후, 94℃에서 1분, 50℃에서 1분, 72℃에서 1분의 반응주기를 40회 반복하고 마지막으로 72℃에서 10분간 반응시켰다.

탐식자 제작 : 탐식자는 Rigby 등의 nick translation방법³⁰⁾을 이용하여 α -³²P-dATP를 표지하여 제작하였고, 탐식자 제작에는 pGST- π , pCHP1, GAPDH를 제한효소로 반응시켜 plasmid로 부터 분리한 것과 또 agarose gel에서 용출한 GCS 및 GGT DNA를 이용하였다. dNTP(dATP제외) 혼합 용액 3 μ l, 10× 완충액 2 μ l, 효소 혼합액 2 μ l, α -³²P-dATP 20 μ Ci를 넣고 DNA를 100ng넣는다. 전체가 20 μ l되게 증류수를 넣은 후 15℃에서 35분간 반응시켰다. Sephadex G50으로 gel filtration하여 유리 동위원소와 탐식자를 분리한 후 hybridization에 사용하였다.

RNA 및 DNA blot과 hybridization : DNA slot blot은 Bio Rad사(USA)의 Bio dot SF microfiltration 장치를 이용하여 DNA를 Hybond N⁺membrane위에 점적하였다. 결합시킨 Hybond N⁺membrane을 hybridization 용액(5×SSC, 50% formamide, 5×Denhardt's solution, 0.1% SDS, 200 μ g/ml salmon sperm DNA)에 담근 후 42℃ 수

조에서 밤동안 prehybridization 시켰다. ³²P가 표지된 GCS, GGT, GST- π 탐식자를 변성시킨 후 hybridization 용액과 섞고 42℃ 수조에서 밤동안 hybridization 시켰다. Hybridization 시킨 막을 60℃ 1×SSC, 0.1% SDS용액에 15분간 씻고 0.1×SSC, 0.1% SDS 용액에 15분씩 2번 세척한 후 X-ray 필름에 감광시켰다.

Northern blot은 내성세포들과 모세포에서 분리한 RNA 30 μ g을 0.8% formaldehyde agarose gel에서 전기영동하였다. 전기영동 후 gel을 증류수에 15분 간격으로 4번, 10× SSC에 45분 담가둔 후 20× SSC(1.5M NaCl, 0.15M sodium citrate) 용액으로 capillary transfer 법을 이용하여 RNA를 nitrocellulose membrane으로 옮겼다. RNA가 옮겨진 membrane을 80℃에서 2시간 구운 후, 상기와 같이 hybridization시키고 X-ray 필름에 감광시켜 관찰하였다.

모세포와 내성세포들 사이의 효소활성도에 대한 유의성 검정은 Student's t-test로 하였다.

성 적

생쥐의 백혈병 세포주 L1210세포와 항암제 내성 변이주 L1210AdR, L1210VcR 및 L1210Cis 세포들의 세포내 glutathione농도와 GCS, GGT, 및 GST의 활성도를 표 1에 나타내었다.

Glutathione농도(μ M/mg protein)는 L1210이 0.41±0.003 이었으며, 내성 암세포들에서는 L1210AdR가 0.73±0.006으로 1.78배, L1210VcR은 1.16±0.060으로 2.83배, 그리고 L1210Cis가 2.19±0.282로 모세포에 비하여 5.34배로 매우 유의한 증가를 보였다. GCS의 특이적 억제제인 BSO를 1 μ M 농도로 첨가하여 12시간 배양한 세포들에서의 glutathione 농도는 L1210이 0.05±0.025로 88%, L1210AdR

Table 1. Concentration of glutathione and activities of γ -glutamylcysteine synthetase(GCS), γ -glutamyl transpeptidase(GGT), and glutathione S-transferase(GST) in the L1210 cell line and resistant sublines

Groups	Glutathione [#] (μ M/mg protein)		GCS Activity (nM/mg protein/min)		GGT Activity [§] (nM/mg protein/min)		GST Activity [#] (nM/mg protein/min)	
	None	1 μ M BSO	None	1 μ M BSO	None	1 μ M BSO	None	1 μ M BSO
L1210	0.41 \pm 0.003	0.05 \pm 0.025	104	9.95	2.15 \pm 0.531	2.66 \pm 0.172	16.70 \pm 4.798	12.83 \pm 4.709
L1210AdR	0.73 \pm 0.006**	0.11 \pm 0.000	128	12.5	2.80 \pm 0.498*	2.39 \pm 0.409	14.51 \pm 3.402	12.94 \pm 5.614
L1210VcR	1.16 \pm 0.060**	0.13 \pm 0.009	227	26.2	2.42 \pm 0.389	2.49 \pm 0.476	19.52 \pm 4.255	24.38 \pm 3.866
L1210Cis	2.19 \pm 0.282**	0.46 \pm 0.000	212	6.8	2.98 \pm 0.623*	1.95 \pm 0.366	17.77 \pm 4.495	16.37 \pm 3.419

Mean \pm SD, 5(# and 7(\$)) experimental results

* p<0.05 and ** p<0.01 vs. L1210

가 0.11 \pm 0.000으로 85%, L1210VcR이 0.13 \pm 0.009로 89%, L1210Cis는 0.46 \pm 0.000으로 79%의 감소를 보였다.

GCS의 활성도(nM/mg protein/min)는 L1210이 104이었고, L1210AdR은 128, L1210VcR은 227, 및 L1210Cis는 212로, 내성세포들에서 각각 23%, 118%, 및 104% 증가하였으며, BSO를 12시간 처치한 경우 L1210이 9.95, L1210AdR가 12.5, L1210VcR이 26.2 및 L1210Cis가 6.8로 처치 전에 비하여 L1210이 90%, L1210AdR은 90%, L1210VcR은 88%, L1210Cis는 97%의 감소를 보였다.

GGT의 활성도(nM/mg protein/min)는 L1210이 2.15 \pm 0.531 이었고, L1210AdR은 2.80 \pm 0.498, L1210VcR은 2.42 \pm 0.389, 및 L1210Cis 2.98 \pm 0.623으로 내성세포인 L1210AdR과 L1210Cis가 L1210에 비해 각각 30%, 39%로 유의한 증가를 보였으며, L1210VcR은 13%의 증가를 보였으나 유의성은 없었다. BSO를 12시간 처치한 경우의 GGT 활성도는 L1210이 2.66 \pm 0.172, L1210AdR가 2.39 \pm 0.409, L1210VcR이 2.49 \pm 0.476, 및 L1210Cis가 1.95 \pm 0.366으로 L1210AdR과 L1210Cis가 각각 15%와 35%의 활성도 감소를 보인 반면

L1210과 L1210VcR은 활성도가 BSO 첨가 전보다 24%와 3%가 오히려 증가하였다.

GST 활성도(nM/mg protein/min)는 L1210이 16.70 \pm 4.798 이었고, L1210AdR은 14.51 \pm 3.402, L1210VcR은 19.52 \pm 4.255 및 L1210Cis는 17.77 \pm 4.495로, L1210VcR이 17%, L1210Cis가 6%의 증가를 보였으며, L1210AdR은 13%의 감소를 보였으나 통계적 의의는 없었다. BSO를 12시간 처치한 경우 L1210이 12.83 \pm 4.709, L1210AdR가 12.94 \pm 5.614, L1210VcR이 24.38 \pm 3.866, L1210Cis가 16.37 \pm 3.419로 L1210, L1210AdR과 L1210Cis는 활성도가 각각 23%, 11%, 8% 감소를 보인 반면 L1210VcR은 오히려 25% 증가를 보였다.

GCS와 GGT의 발현 정도를 비교하기 위하여 RT-PCR을 시행하였다. RNA를 정제하여 GCS와 GGT의 각 primer를 이용하여 RT-PCR한 생성물을 1% agarose gel에서 전기영동하여 ethidium bromide로 염색한 결과 GCS의 경우 183bp의 크기, GGT는 211bp 크기의 증폭된 band를 확인할 수 있었으나 감수성세포와 내성세포간의 유전자의 발현 차이는 알 수 없었다(그림 1). PCR로 얻은 생성물을 0.8% low-melting agarose gel에 전기영동하여 각 DNA band를 오려낸 후, phenol:

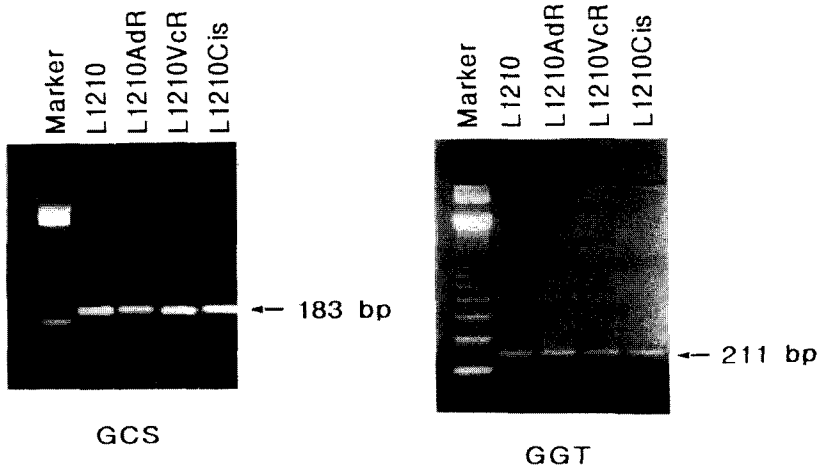


Fig. 1. Electrophorograms of PCR products for γ -glutamylcysteine synthetase(GCS) and γ -glutamyltranspeptidase (GGT) RNAs extracted from L1210, L1210AdR, L1210VcR and L1210Cis in 1% agarose gel.

chloroform법으로 DNA를 용출하여 탐식자 제작에 사용하였다.

각 세포로부터 분리한 DNA를 slot blot하여 GCS, GGT, GST- π 유전자 탐식자를 이용하여 모세포와 내성세포들 사이에서 DNA의 변화를 그

림 2에 나타내었다. DNA의 경우는 L1210과 비교하여 내성인 세포들의 GCS, GGT, GST- π 의 유전자 변화를 관찰할 수 없었다.

Northern hybridization한 결과에서 GCS 탐식자로 약 4.5kb 크기의 band를 확인할 수 있었으며,

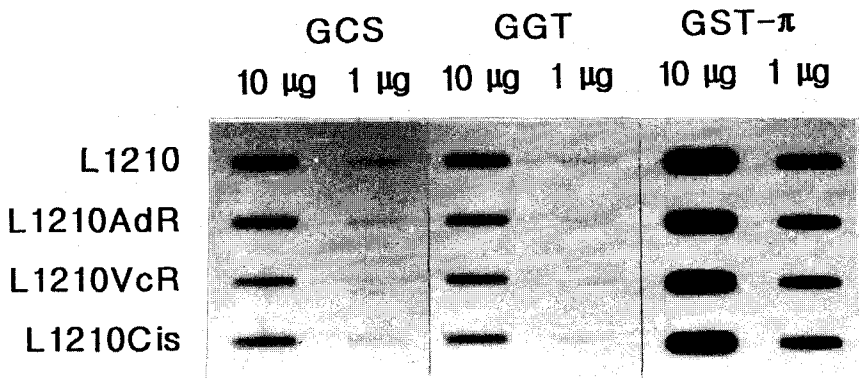


Fig. 2. Slot blot analyses of γ -glutamylcysteine synthetase(GCS), γ -glutamyl transpeptidase(GGT), and glutathione S-transferase(GST) genes in the DNSs extracted from L1210, L1210AdR, L1210VcR and L1210Cis.

RNA발현은 모세포에 비하여 내성세포에서 증가하였으며 특히 L1210VcR가 강하게 발현되었다. GST- π 탐식자로 northern hybridization한 결과에서 GST- π 의 RNA 크기가 약 1.05kb인것을 관찰하였으며, 모세포에 비하여 내성세포들에서 발현 증가를 확인할 수 있었다(그림 3).

GGT의 경우는 GGT의 RNA들로 추정되는 크기가 다른 6개의 band가 보였으며 특히 11.5 kb 크기의 band에서 내성세포에서 발현이 증가되었다. 또 L1210에서 1.95kb 크기의 band가 L1210AdR과 L1210Cis에서는 나타나지만 L1210VcR에서는 2.2kb로 크기가 변하였다. *mdr1* gene의 발현을 확인하기 위한 northern hybridization한 결과는 L1210AdR과 L1210VcR에서 *mdr1* 유전자의 과발현을 보여주는 6.3kb와 11.9kb 크기의 band가 진하게 나타났다. 그러나 L1210Cis에서는 L1210과 비교하여 *mdr1* 유전자의 발현에는 차이가 없음

을 확인할 수 있었다(그림 4).

고 찰

내성 암세포 중에서 *mdr* 유전자의 과발현이 많이 알려져 있으며 또 이 유전자를 분리하여 탐식자로 사용함으로 유전자 발현의 확인이 가능해 졌다. 그러나 어떤 내성 암세포에서는 *mdr* 유전자의 과발현이 없이도 항암제에 대한 내성이 발생한다는 사실이 밝혀지면서, 정상세포내에서 세포 독성 물질들을 해독하는 glutathione의 작용이 연구의 대상이 되어왔으며, 암세포의 항암제에 대한 내성에 glutathione이 관여함을 알게 되었다. 또 이것은 암세포내에서 glutathione이 항암제의 DNA에 대한 작용을 억제하여 암세포의 생존이 가능케 하는 것으로 여겨진다.

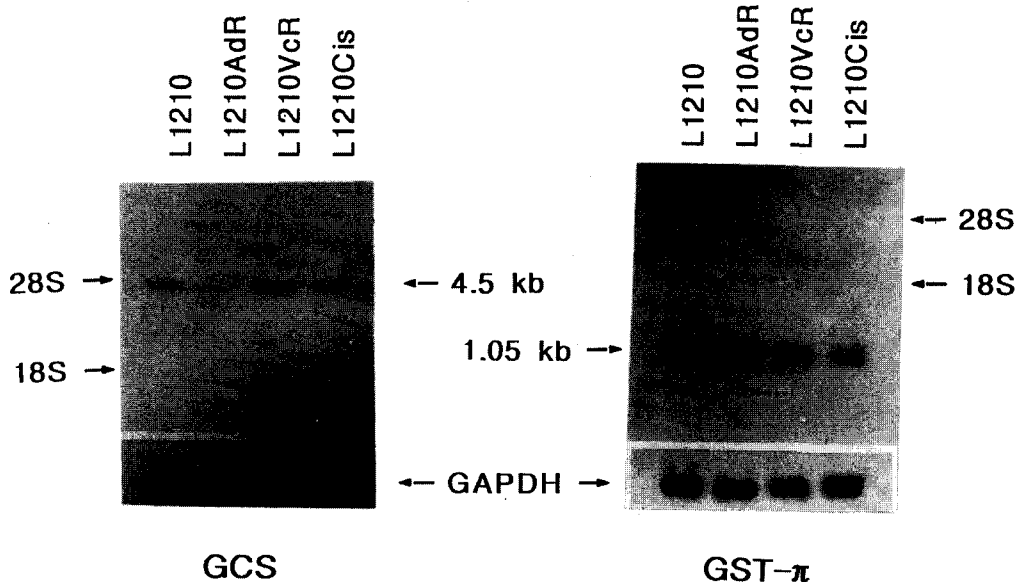


Fig. 3. Northern hybridization of γ -glutamylcysteine synthetase(GCS) and glutathione S-transferase(GST) genes in the RNAs extracted from L1210, L1210AdR, L1210VcR and L1210Cis. GAPDH probe for internal standard was used.

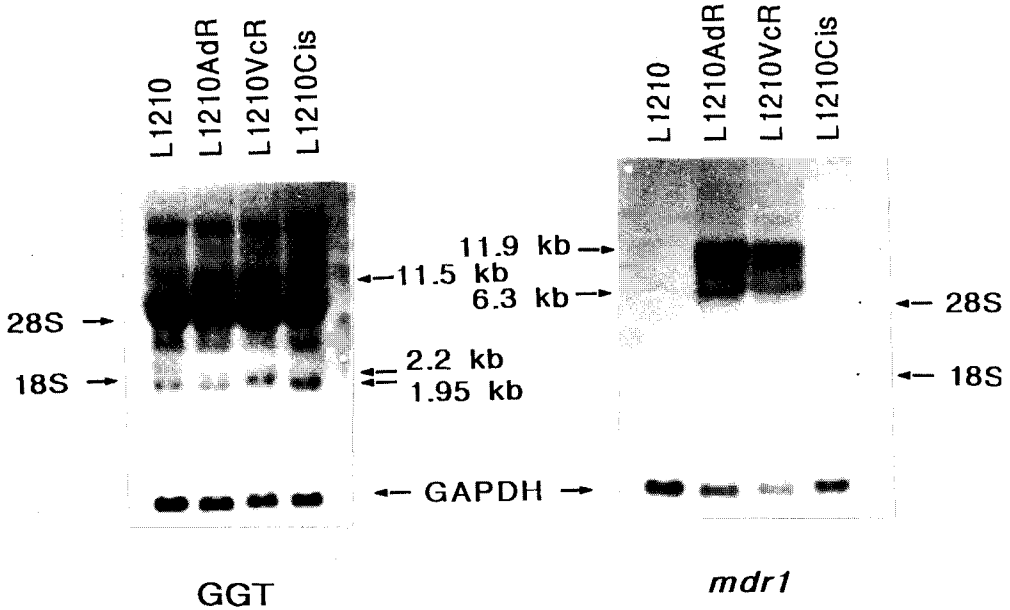


Fig. 4. Northern hybridization of γ -glutamyl transpeptidase(GGT) and *mdr1* genes in the RNAs extracted from L1210, L1210AdR, L1210VcR and L1210Cis. GAPDH probe for internal standard was used.

Arrick과 Nathan⁹⁾이 여러 가지 약제나 항암제의 해독, 방사선이나 고열 및 반응성 산화물에 의한 세포 손상의 회복에 glutathione이 중요한 역할을 한다고 밝혔다. Hamaguchi 등¹³⁾은 사람의 난소암 세포주에서 cisplatin에 대한 내성을 유발시켜서 모세포에 비하여 4배에서 50배 정도의 세포내 glutathione농도의 증가를 확인하였다. 또 Ishikawa와 Ali-Osman¹⁴⁾이 L1210세포에서 glutathione이 직접 cisplatin과 결합하여 복합체를 이루고, 이 복합체들이 세포 밖으로 배출되는 것을 관찰하여 glutathione의 직접적인 작용을 알 수 있게 하였다.

본 연구에서는 내성세포에서 glutathione의 농도가 모세포에 비하여 1.8배에서 5.3배정도 증가하여, 모세포에 비해 많은 양의 항암제를 배출하거나 해독할 수 있으며, 이러한 현상은 내성 세포에서 항암제에 대한 내성으로 나타난다고

생각된다. 특히 cisplatin에 내성인 L1210Cis에서 가장 많은 양의 glutathione이 증가하여 adriamycin에 내성인 L1210AdR과 vincristine에 내성인 L1210VcR보다 내성 생성에 glutathione이 더 많이 관여하는 것으로 생각된다. BSO첨가시는 glutathione의 세포내 농도가 모세포뿐 아니라 내성세포에서도 거의 고갈되는 것을 볼 때 BSO로 glutathione의 농도를 감소시키면 내성을 줄일 수 있을 것으로 생각된다.

세포내의 glutathione농도의 조절은 몇 가지의 기전을 생각해 볼 수 있다. 먼저 GCS에 의한 합성의 조절이 있으며, 두 번째로 dipeptide transport의 조절로 이 과정에 glutathione의 분해 효소인 GGT가 관여한다. 그 외에 GST에 의한 glutathione의 소모에 의한 조절과 세포 안과 밖으로의 glutathione 이동, 또는 전구물이 되는 아미노산들의 이동^v등에 의한 glutathione의 농도

조절이 가능하다.

Bailey 등¹⁶⁾은 L-phenylalanine mustard에 저항성이 생긴 사람의 전립선암세포 DU-145에서 세포내의 glutathione양의 증가와 함께 glutathione의 합성에 관여하는 GCS의 활성도가 증가되어 있다고 하였으며, Griffith와 Meister²⁰⁾는 BSO에 의해 GCS가 특이적으로 억제된다고 하였다. Yao 등²¹⁾이 RT-PCR법을 이용하여 BSO 처치에 따른 glutathione의 감소를 보상하기 위해 GCS mRNA가 발현된다고 하였으며, Godwin 등²²⁾은 cisplatin에 높은 정도의 내성을 가진 사람의 난소암에서 GST의 활성도는 영향을 받지 않으나 GCS와 GGT의 mRNA 발현이 증가한다고 하였다. 또 Gipp 등²³⁾은 사람의 간에서 2.6kb 크기의 GCS full-length cDNA를 cloning하였고, 사람과 쥐의 신장에서 northern hybridization분석으로 사람의 GCS mRNA크기가 4.0kb 이며, 쥐에서는 3.7kb로 크기가 더 작다고 하였다.

본 연구에서 내성세포들 중 L1210AdR에서는 모세포에 비하여 GCS의 활성도 증가가 많지 않았으나 L1210VcR과 L1210Cis에서는 glutathione의 농도증가와 함께 GCS의 활성도 증가가 뚜렷하였으며, BSO첨가시 GCS의 활성도가 현저히 감소하면서 세포내 glutathione이 급격히 감소한 것은 다른 보고들과 마찬가지로 BSO가 GCS를 특이적으로 억제하므로 glutathione의 합성이 감소한 것이라고 할 수 있다. 이것은 세포내의 glutathione합성에 GCS가 가장 중요한 조절인자인 것을 시사하며, 내성세포들에서 glutathione의 증가가 GCS의 활성증가에 기인함을 보여 준다. 유전자의 northern hybridization 분석에서도 약 4.5kb 크기의 GCS mRNA가 모세포에 비하여 내성인 세포들에서 발현이 증가하였다. 이러한 활성도 및 glutathione의 증가에 부합하는 유전자 발현의 증가는 내성세포의 glutathione 대사중에서

glutathione 농도의 증가와 GCS의 증가가 가장 중요함을 알 수 있다.

한편 glutathione의 합성과 분해에 직접적으로 관여하는 GCS와 GGT의 유전자 변화를 관찰하기 위해 RNA를 정제하여 RT-PCR한 결과에서 GCS는 183bp, GGT는 211bp 크기의 DNA band를 확인하였으며, L1210 모세포와 내성세포들 사이에서 GCS와 GGT의 RNA발현차이는 RT-PCR방법으로는 알 수 없었다.

GGT는 γ -glutamyl 부분을 적당한 아미노산에 옮겨 저장하거나 저장된 γ -glutamate를 cysteinylglycine과 함께 glutathione의 합성에 재이용할 수 있도록 하는 효소로 Goodspeed 등²⁴⁾이 쥐신장의 GGT cDNA를 이용하여 사람의 간암세포와 신장에서 2.3 kb 크기의 full-length cDNA를 분리하였다. 또 이것으로 사람과 쥐의 간암세포와 신장의 RNA를 분석한 결과는 사람의 GGT가 같은 장기의 쥐에 비해 mRNA의 길이가 길고, 간암세포가 신장에 비해 길다고 하였다.

본 연구에서 생쥐의 GGT는 isozyme으로 추정되는 1.03kb 에서 26 kb 사이의 각각 6개 크기의 RNA band가 보였으며 특히 11.5 kb크기의 band에서 L1210AdR, L1210VcR 및 L1210Cis의 유전자 발현 증가가 확인되며, GGT isozyme의 변화로 생각되는 1.95kb 크기의 band가 L1210VcR에서 사라지고 2.2kb 크기의 band가 나타났다. 이러한 유전자 크기의 변화와 다양한 크기의 유전자 발현이 어떠한 결과에 의한 것인지를 명확히 하기 위해서는 이 유전자의 cloning과 염기서열 분석이 뒤따라야 할 것이다. GGT의 활성도는 모세포에 비해 L1210AdR가 30%, L1210VcR이 13%, L1210Cis가 39% 증가하였다. 내성인 암세포들에서 모세포에 비하여 GGT의 발현이 증가하고 활성도가 증가함은 glutathione의 합성에 GCS과 함께 작용을 하지만, BSO첨가시 GGT 활

성도의 감소가 적은데도 glutathione이 대량 감소하는 것은 GGT보다는 glutathione의 합성에 GCS가 더욱 중요하다고 할 수 있다.

GST는 45-50kDa 크기의 단백질로 α , μ , π , 및 θ 의 isoenzyme들이 존재한다.^{36,37)} 암의 내성과 GST의 관계에 관해서는 Peters와 Roelofs³⁸⁾가 mitoxantron과 adriamycin에 대한 저항성을 가진 대장암 세포주 Sw1116과 Caco-2세포에서 glutathione의 농도는 큰 차이는 보이지 않으며, GST- π 의 차이가 매우 유의하다고 하였다. Bolton 등³⁹⁾은 nitrogen mustard에 대해 내성을 획득한 세포에서 class α GST isozyme의 값이 증가한다고 하였고, 또 Ripple 등²⁰⁾은 melphalan에 내성을 가진 사람 전립선암 세포주의 세포내의 glutathione농도는 모세포에 비하여 1.7에서 2.8배 증가하지만 GST의 활성도는 변화가 없다고 하였다. Batis 등⁴⁰⁾과 Moscow 등⁴¹⁾은 adriamycin에 내성인 MCF7 세포에서 GST- π 의 활성도 증가시 GST- π 유전자의 과발현은 보이지만 유전자 증폭은 보이지 않는다고 하였으며, Petes 등의 보고⁴²⁾에서는 유방암 환자에서 항암제 치료 전, 후의 GST 유전자의 발현이 치료 효과나 완치 여부의 기준이 되지 못한다고 한 반면, Hida 등²⁰⁾은 non-small cell 폐암에서 GST- π 가 alkylating 제제에 대한 내성에 중요한 역할을 하므로 GST- π 가 tumor marker로 중요하다고 하였다.

본 연구에서 GST- π 의 mRNA는 약 1.05kb 크기였으며 항암제 내성인 세포들에서 유전자 발현이 증가하였다. 그러나 GST- π 의 발현 증가에도 불구하고 유의한 GST활성도의 변화가 없는 것은 GST는 여러가지 isozyme이 존재하고 각 isozyme의 변화가 다양하기 때문이며, 본 연구에서도 GST- π 가 다른 isozyme에 비하여 항암제 내성에 관여한다고 할 수 있다.

내성세포들에서 다제내성관련 대표적 유전자

인 *mdr1*의 발현은 L1210AdR이나 L1210VcR 세포에서는 *mdr1*의 발현이 내성과 밀접한 관계가 있으나 cisplatin에 내성인 L1210Cis의 내성생성기전은 *mdr1*과 무관하며, 세포내 glutathione의 농도는 L1210AdR과 L1210VcR에 비하여 L1210Cis에서 저명하게 증가하여 L1210Cis의 내성에는 glutathione이 더 크게 관여함을 시사한다.

Glutathione대사에 관여하는 GCS, GGT 및 GST등의 활성도 및 유전자의 발현이 내성세포들에서 증가하였으며, 특히 GCS는 내성세포내의 glutathione의 합성에 가장 중요한 인자로 작용한다.

요 약

생쥐의 백혈병세포 L1210과 항암제에 대하여 내성이 유도된 L1210AdR, L1210VcR과 L1210Cis에서 glutathione의 농도와 glutathione의 합성 조절에 관여하는 γ -glutamylcysteine synthetase(GCS)와 γ -glutamyl transpeptidase (GGT), 세포 이물질을 축합하는데 촉매하는 glutathione S-transferase (GST)의 효소 활성도와 유전자의 발현 여부를 관찰하였다.

세포내 glutathione농도(μ M/mg protein)는 L1210이 0.41 ± 0.003 , L1210AdR가 0.73 ± 0.006 , L1210VcR은 1.16 ± 0.060 , L1210Cis가 2.19 ± 0.282 으로 모세포에 비하여 내성세포에서 통계적으로 유의한 증가를 관찰하였다. Buthionine sulfoxamine(BSO)를 1μ M농도로 첨가하여 12시간 배양한 세포들에서의 glutathione농도는 L1210이 88%, L1210AdR가 85%, L1210VcR이 89%, 그리고 L1210Cis는 79%의 감소를 보였다.

GCS의 활성도(nM/mg protein/min)는 L1210이 104인데 비하여 L1210AdR가 128, L1210VcR은

227, 및 L1210Cis는 212로 증가하였다.

GGT의 활성도(nM/mg protein/min)는 L1210이 2.15 ± 0.531 이었고, L1210AdR은 2.80 ± 0.498 , L1210VcR은 2.42 ± 0.389 , 그리고 L1210Cis는 2.98 ± 0.623 으로 내성인 세포들에서 증가하였으며 L1210AdR과 L1210Cis에서 유의하였다.

GST활성도(nM/mg protein/min)는 L1210이 16.70 ± 4.798 이었고, L1210AdR은 14.51 ± 3.402 , L1210VcR은 19.52 ± 4.255 , L1210Cis 17.77 ± 4.495 로 L1210VcR과 L1210Cis가 약간의 증가를 보였으며, L1210AdR은 오히려 감소를 보였다.

DNA의 slot blot에서 GCS, GGT, GST 유전자의 모세포와 내성세포간에 별다른 차이를 보이지 않았다.

Northern hybridization에서 GCS는 약 4.5kb 크기의 band, GST- π 는 약 1.05kb 크기의 band를 보였으며 내성세포 모두에서 발현 증가가 관찰되었다. GGT의 경우 크기가 다른 6개의 band가 보였으며 특히 11.5 kb크기의 band에서 L1210AdR과 L1210VcR의 발현이 증가하였으며, L1210VcR에서는 L1210과 다른 내성세포에서 보이는 1.95kb 크기의 band가 보이지 않고 2.2kb 크기의 다른 band가 관찰되었다.

이상에서 L1210AdR과 L1210VcR의 내성에는 *mdr1* 유전자가 관여하고, L1210Cis의 내성에는 특히 glutathione이 중요하다. GCS, GGT 및 GST 등의 활성도 및 유전자의 발현도 내성세포들에서 증가하였으며 이중 GCS는 내성세포내의 glutathione 합성에 가장 중요한 조절인자라 할 수 있다.

참고 문헌

1. Kartner N, Ling V : Multidrug resistance in

cancer. *Scientific Am* : 26-33, 1989.

2. Deneke SM, Faubug BL : Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol* 257(Lung Cell Mol Physiol 1) : L163-L173, 1989.
3. Bompert GJ, Prvot DS, Bascauds JL : Rapid automated analysis of glutathione reductase, peroxidase, and S-transferase activity : Application to cisplatin-induced toxicity. *Clin Biochem* 23 : 501-504, 1990.
4. Ford JM, Yang J-M, Hait WN : Effect of Buthionine sulfoximine on toxicity of Verapamil and Doxorubicin to multidrug resistant cells and mice. *Cancer Res* 51 : 67-72, 1991.
5. Arrick BA, Nathan CF : Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy : A review. *Cancer Res* 44 : 4224-4232, 1984.
6. Meister A : On the cycles of glutathione metabolism and transport. In Meister A : Current topics in cellular regulation. Academic, New York, 1982, pp 21-58.
7. Meister A, Anderson M : Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52 : 711-760, 1983.
8. Richman PG, Meister A : Regulation of γ -glutamylcysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J Biol Chem* 259 : 1422-1426, 1975.
9. Bump EA, Taylor YC, Brown JM : Role of glutathione in the hypoxic cell cytotoxicity of misonidazole. *Cancer Res* 43 : 997-1002, 1983.
10. Ozols RF, O'Dwyer PJ, Hamiton TC : Clinical reversal of drug resistance in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 51 : 90-96, 1993.
11. Oldenburg J, Begg AC, van Vugt MJH, Ruevekamp M, Pinedo JHM, Los G : Characterization of resistance mechanism to cis-

- Diamminedichloroplatinum(II) in three sublines of the CC531 colon adenocarcinoma cell line in vitro. *Cancer Res* 54 : 487-493, 1994.
12. Mizutani Y, Yoshida O : Overcoming tumor necrosis factor- α resistance of human renal and ovarian carcinoma cells by combination treatment with buthione sulfoximine and tumor necrosis factor- α . *Cancer* 73 : 730-737, 1994.
 13. Hamacuchi K, Godwin AK, Yakushiji M, O'Dwyer PJ, Ozols RF, Hamiton TC : Cross resistance to diverse drugs is associated with primary cisplatin resistance in ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* 53 : 5225-5232, 1993.
 14. Ishikawa T, Ali-Osman F : Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. *J Biol Chem* 268 : 20116-20125, 1993.
 15. Meijer C, Mulder NH, Timmer-Bosscha H, Sluiter WJ, Meersma GJ, de Vries EG : Relationship of cellular glutathione to cytotoxicity and resistance of seven platinum compounds. *Cancer Res* 52 : 6885-6889, 1992.
 16. Bailey HH, Gipp JJ, Ripple M, Wilding G, Mulcahi RT : Increase in γ -glutamylcysteine synthetase activity and steady-state messenger RNA levels in melphalan resistant DU-145 human prostate carcinoma cells expressing elevated glutathione levels. *Cancer Res* 52 : 5115-5118, 1992.
 17. Vanderlaan M, Phares W : Gamma-glutamyl transpeptidase : a tumour marker with a pharmacological function. *Histochem J* 13 : 865-877, 1981.
 18. Tsao M, Batist G : Induction of gamma-glutamyl transpeptidase activity by all-trans retinoic acid in cultured rat liver epithelial cells. *Biochem Biophys Res Comm* 157 : 1039-1045, 1988.
 19. Hamada SI, Kamada M, Furumoto H, Hirao T, Aono T : Expression of glutathione S-transferase- π in human ovarian cancer as an indicator of resistance to chemotherapy. *Gynecol oncol* 52 : 313-319, 1994.
 20. Hida T, Kuwabara M, Ariyoshi Y, Takahashi T, Sugiura T, Hosoda K, Niitsu Y, Ueda R : Serum glutathione S-transferase- π level as a tumor marker for non-small cell lung cancer. *Cancer* 73 : 1377-1382, 1993.
 21. Ripple M, Mulcahi RT, Wilding G : Characteristics of the glutathione/glutathione S-transferase detoxification system in melphalan resistant human prostate cancer cells. *J Urol* 150 : 209-214, 1993.
 22. Moore M, Wang X, Lu Y-F, Wormke M, Crig A, Gerlach JH, Burghardt R, Barhoumi R, Safe S : Benzo[*a*]pyrene-resistant MCF-7 human breast cancer cell. *J Biol Chem* 269 : 11751-11759, 1994.
 23. Sato T, Isobe K, Yamauchi M, Nakashima I, Takagi H : Expression of MDR1 and glutathione S-transferase- π genes and chemosensitivities in human gastrointestinal cancer. *Cancer* 67 : 941-946, 1992.
 24. Kim JH, Kim JR and Lee KY : Induction of multidrug resistance in vincristine-resistant colon cancer cell line SNU-C1. *Korean J Biochem* 22 : 139-146, 1990.
 25. Kim JR and Kim JH : A Vincristine-resistant L1210 sublines shows cross resistance, *mdr*

- gene amplification and overexpression. *Korean J Biochem* 26 : 67-76, 1994.
26. Akerboom TP, Sies H : Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 77 : 158-169, 1967.
 27. Nardi G, Cipollaro M, Loguercio C : Assay of γ -glutamylcysteine synthetase and glutathione synthetase in erythrocytes by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J chromatogr* 530 : 122-128, 1990.
 28. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB : Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formed. *J Biol Chem* 249 : 7130-7139, 1974.
 29. Chomczynski P, Sacchi N : Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162 : 156-159, 1987.
 30. Rigbi PWJ, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P : Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 113 : 237-251, 1977.
 31. Griffith OW, Meister A : Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine(s-n-butyl homocysteine sulfoximine). *J Biol Chem* 254 : 7558-7560, 1979.
 32. Yao KS, Godwin AK, Ozols RF, Hamiton TC, O'Dwyer PJ : Variable baseline γ -glutamylcysteine synthetase messenger RNA expression in peripheral mononuclear cells of cancer patients, and its induction by buthionine sulfoximine treatment. *Cancer Res* 53 : 3662-3666, 1993.
 33. Godwin AK, Meister A, O'Dwyer PJ, Huang CS, Hamiton TC, Anderson ME : High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 3070-3074, 1992.
 34. Gipp JJ, Chang C, Mulcahy T : Cloning and nucleotide sequence of a full-length cDNA for human liver γ -glutamylcysteine synthetase. *Biochem Biophys Res Comm* 185 : 29-35, 1992.
 35. Goodspeed DC, Dunn TJ, Miller CD, Pitot HC : Human γ -glutamyl transpeptidase cDNA : comparison of hepatoma and kidney mRNA in the human and rat. *Gene* 76 : 1-9, 1989.
 36. Mannervik B, Alin P, Guthenberg C, Jansson H, Tahir MK, Warholm M, Jrnvall H : Identification of three classes of cytosolic glutathione transferases common to several mammalian species : correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 : 7202-7206, 1985.
 37. Meyer DJ, Coles B, Pemble SE, Gilmore KS, Fraser GM, Ketterer B : Theta a new class of glutathione transferases purified from rat and man. *Biochem J* 274 : 409-414, 1991.
 38. Peters WHM, Roelofs HMJ : Biochemical characterization of resistance to mitoxantrone and adriamycin in Caco-2 human colon adenocarcinoma cells : A possible role for glutathione S-transferases. *Cancer Research* 52 : 1886-1890, 1992.
 39. Bolton MG, Colvin OM, Hilton J : Specificity of isozyme of murine hepatic glutathione S-transferase for the conjugation of glutathione with L-phenylalanine mustard. *Cancer Res* 51 : 2410-2415, 1991.

40. Batis G, Tulpule A, Sinha BK, Katki AG, Meyers CE, Cowan KH : Overexpression of a novel anionic glutathione transferase in multidrug-resistant human breast cancer cells. *J Biol Chem* 21 : 15544-15549, 1986.
41. Moscow JA, Townsend AT, Goldsmith ME, Wang-peng J, Vickers PJ, Poisson R, Legauet-Poisson S, Meyers CE, Cowan KH : Isolation of the human anionic glutathione S-transferase cDNA and the relation of its gene expression to estrogen-receptor content in primary breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 : 6518-6522, 1988.
42. Peter WHM, Roelofs HMJ, van Putten WLJ, Jansen JBMJ, Klijn JGM, Foekens JA : Response to adjuvant chemotherapy in primary breast cancer : no correlation with expression of glutathione S-transferases. *Br J Cancer* 68 : 86-92, 1993.

-Abstract-

Gene Expression of Enzymes Related to Glutathione Metabolism in
Anticancer Drug-resistant L1210 Sublines

Seong Yong Kim, Jae Ryong Kim, Jung Hye Kim

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

Glutathione(GSH) has a very important role in detoxification of cells and is closely related to antitumor drug-resistance of cancer cells.

In order to evaluate the importance of glutathione metabolism in the drug-resistant cancer cells, the concentration of cellular GSH and activities of γ -glutamylcysteine synthetase(GCS), γ -glutamyl transpeptidase (GGT) and glutathione S-transferases(GST) in the adriamycin, vincristine, or cisplatin resistant L1210 (L1210AdR, L1210VcR, or L1210Cis) sublines were measured. Expression and amplification of GCS, GGT, and GST- π genes were also observed in the parent L1210 and the drug-resistant L1210 sublines.

The concentration of GSH was increased 5.34 fold in L1210Cis, 2.83 fold in L1210VcR, and 1.78 fold in L1210AdR, compared to L1210. The activities of GCS and GGT were increased in drug-resistant L1210 sublines. The GST activity was increased in L1210VcR and L1210Cis but decreased in L1210AdR compared to L1210. Expression of GCS, GGT, and GST- π genes were increased in the resistant L1210 sublines compared to the parent L1210 in northern blot analyses.

Overexpression of GCS, GGT, and GST- π were observed in the resistant sublines, and the increases of the concentration of glutathione and the activities of GCS and GGT in the resistant sublines may be involved in a part of the drug-resistance in the resistant sublines.

Key Words : Drug resistance, Glutathione(GSH), Gamma-glutamylcysteine synthetase(GCS), Gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), Glutathione S-transferases(GST)