

담즙산 합성유도체(HS-1200)가 인체 유방암 세포주(MCF-7)에서 유도하는 방사선 감작 효과

동아대학교 의과대학 방사선종양학교실*, 내과학교실†, 해부학교실‡

이형식* · 최영민* · 권혁찬† · 송연숙‡

목적: 인체 유방암 세포주인 MCF-7에 새로운 CDCA 합성유도체인 HS-1200을 방사선과 함께 처치하여 아포토시스 유도 활성 및 방사선 감작 효과를 관찰하고자 하였다.

대상 및 방법: MCF-7 세포에 2~8 Gy의 X-ray와 16 μM 농도의 HS-1200을 처리한 세포들의 세포 생존 곡선을 clonogenic assay를 통하여 구하였다. 아포토시스 유도 확인은 8 Gy의 X-ray와 40 μM 농도의 HS-1200을 전 처치하여 구한 agarose gel 전기영동 및 Hoechst staining을 이용하였다. 면역형광법을 이용한 cytochrome c, Bax 및 AIF들의 관찰과 미토콘드리아 막전위 측정을 시행하였다. Western blotting을 통한 PARP (poly (ADP-ribose) polymerase) cleavage, Bax, Bcl-2, Bak 및 AIF들의 발현을 관찰하였다.

결과: 2~8 Gy의 X-ray를 조사한 군(R)과 HS-1200 처리 후 2~8 Gy의 X-ray를 조사 한 군(HR)의 세포 생존 곡선을 비교하니 HR 군에서 세포 감작 효과를 관찰할 수 있었다. DNA ladder는 R군에서는 72 시간째 관찰되는 반면에 HR 군에서는 24시간째 관찰되어 DNA 분절이 빠르게 진행됨을 알 수 있었고, PARP cleavage의 관찰에서도 R 군에 비해 24시간 빠르게 진행되었다. 면역 형광법을 이용한 실험에서도 HR 군이 R 군에 비하여 미토콘드리아 막전위($\Delta\psi_m$)의 급격한 감소, cytochrome의 다량 방출, Bax의 증가된 점상 변화 등이 관찰되었고, AIF의 변화는 뚜렷하지 않았다. Western blotting을 이용한 Bax, Bcl-2, Bak 및 AIF들의 발현을 관찰하였을 때 Bax 만 HR 군에서 시간대 별로 증가되는 추세를 보인 반면 Bcl-2, Bak 및 AIF들의 발현은 특이한 차이를 발견할 수 없었다.

결론: 인체 유방암 세포주(MCF-7)에서 새로운 담즙산 합성 유도체인 HS-1200은 방사선 조사에 의한 아포토시스의 유도를 감작시키는 사실을 관찰하였다. 아포토시스 유도감작 증가는 Bax/Bcl-2 분율의 상대적 증가로 기인한다고 생각한다. 상기 결과를 토대로 HS-1200의 항암 치료제로서의 역할에 관한 기초 자료로서의 유용성을 제시할 수 있었다.

핵심용어: 인체 유방암 세포주 (MCF-7), 담즙산 합성 유도체(HS-1200), 아포토시스, 방사선 감작 효과

서 론

대표적인 담즙산인 cholic acid (CA), CDCA (chenodeoxycholic acid), deoxycholic acid (DCA) 및 UDCA (ursodeoxycholic acid)들의 세포 사멸 기전에 대한 연구에서, 여러 가지 암 세포주를 이용하여 세포 증식의 억제 효과 및 아포

토시스의 유도에 관한 연구 보고들이 있다. UDCA의 Glycine methyl ester conjugate인 HS-1030은 인체 간세포암 세포주인 HepG2와 인체유방암 세포주인 MCF-7에서 아포토시스를 유도하였다.¹⁻³⁾ UDCA의 L-phenyl alanine benzyl ester conjugate인 HS-1183은 SV40 DNA replication을 초기 단계에서 억제하는 효과를 관찰하였다.⁴⁾ CDCA의 L-phenyl alanine benzyl ester conjugate인 HS-1199와 β-alanine benzyl ester conjugate인 HS-1200 및 UDCA의 L-phenyl alanine benzyl ester conjugate인 HS-1183은 인체 유방암 세포주에서 p53-independent pathway로 아포토시스를 유도하였다.⁵⁾ HS-1199와 HS-1200은 인체 백혈병 세포주에서 caspase의 활성화를 통한 아포토시스를 유도하였다.⁶⁾ 또한 최근의 연구들에서 담즙산의 합성 유도체의 개발을 통하여 암세포

이 논문은 2004년 3월 10일 접수하여 2004년 6월 14일 채택되었음.
책임저자: 이형식, 부산시 서구 동대신동 3가 1번지
동아대학교 의과대학 방사선종양학과
Tel: 051)240-5380, Fax: 061)254-5889
E-mail: hyslee@daumnet.donga.ac.kr

본 연구는 한국과학재단 기초 의학 연구센터 사업지원으로 수행되었음.

의 성장을 억제하거나 아포토시스의 유도를 통한 암 치료제로서의 가능성을 모색하는 여러 연구 결과들이 발표되었다. CDCA는 HCT-116 및 HT-29 인체 대장암 세포주에서 아포토시스를 유도한다는 보고가 있었고, protein kinase C가 CDCA의 신호매개체로 제시되기도 하였다.^{7,8)} 연구자들도 인체 대장암 세포주인 HT-29에 새로운 CDCA (chenodeoxycholic acid) 유도체인 HS-1200을 처치하여 암세포의 증식과 아포토시스 유도를 관찰하고 이에 미치는 기전을 연구하고 발표하였다.⁹⁾ 새로운 UDCA와 CDCA의 합성 유도체들이 암세포주의 아포토시스를 유발한다고 보고되고 있으나 그 기전에 대한 연구 및 방사선 조사와의 병행 시에 아포토시스 유도 활성 변화에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 본 연구는 새로운 CDCA 유도체인 HS-1200을 인체 유방암 세포주인 MCF-7에 방사선과 병행하여 처치하였을 때의 세포 사멸 효과를 관찰하고, HS-1200의 방사선 감작 효과를 관찰하고자 수행하였다.

실험 재료 및 방법

1. 세포주 배양, 방사선 및 약물 처리

인체 유방암 세포주인 MCF-7 세포는 한국 세포주 은행에서 구입하였으며, 10회 이내의 계대 배양을 거치면서 지수증식기의 세포들만 선택하여 실험에 이용하였다. 세포 배양은 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin을 함유한 RPMI-1640 배지(GIBCO, Grand Island, NY)를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 실시하였다. 방사선 조사는 6 MV X-선(Clinac 1800C, Varian, USA)을 이용하여 200~300 cGy/min의 선량율로 상온에서 2~8 Gy 조사하였다. HS-1200의 병용효과를 조사하기 위하여 배양 세포에 16 µM 또는 40 µM HS-1200을 전처리 한 후 24시간 뒤에 2~8 Gy의 X-ray를 조사하였다. 아포토시스 확인은 agarose gel 전기영동 및 Hoechst staining을 이용하였다.

2. 세포 생존 분획 분석(clonogenic assay)

37°C, 5% CO₂ 조건에서 2×10^2 - 2×10^4 의 세포를 24시간 배양 후 HS-1200 16 µM을 24시간 동안 전처리하고 새 배지로 바꾸어준 후 상온에서 방사선을 조사하였다. 37°C, 5% CO₂ 조건에서 2 주일 배양 후 methanol과 acetic acid (10 : 1) 혼합액으로 고정 후 methanol이 함유된 10% (wt/vol) crystal violet로 염색하였다. Plating efficiency는 78% 이었으며 50개 이상의 세포가 모인 콜로니들을 계수하여 세포 생존 분획을 계산하였다.

3. 아포토시스 분석

1) DNA 전기영동 분석

각 실험 조건에서의 아포토시스 유발 유무를 확인하기 위하여 아포토시스로 형성되는 세포의 DNA 절편을 agarose gel 전기 영동상에서 관찰하였다. 세포를 회수하여 2.5 ml의 NET buffer (1M Tris (pH 7.5), 0.5M EDTA, 5M NaCl, Sigma, St. Louis, MO)로 현탁시키고 proteinase K를 300 µg/ml, sodium dodecyl sulfate (SDS)를 1% 되도록 첨가하여 55°C 수조에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 포화된 NaCl을 675 µl 넣고 시료가 균일하게 되도록 15초 동안 진탕하였다. 8000 rpm으로 20분간 원심 분리하고 상층액을 따로 모아, Tris 완충액으로 포화된 phenol을 2.5 ml 넣고 1시간 동안 흔들어서 잘 섞이게 하고 3000 rpm으로 20분간 원심하여 다시 상층액을 따로 모아 2.5 ml의 phenol-chloroform-isoamyl alcohol을 넣어 15분간 처치하여 단백질을 제거하였다. 상층액에 2배 용량의 차가운 ethanol을 넣고 4°C에서 하룻밤 동안 방치하여 DNA가 침전되게 한 후 TE 완충액에 녹였다. 260 nm와 280 nm에서 OD를 측정하고 OD 값이 1.7 이상인 시료만을 RNase로 1시간 처리하여 ethidium bromide (10 mg/ml)가 첨가된 2% agarose gel에서 전기 영동하여 조각난 DNA를 UV transilluminator로 관찰하였다.

2) Hoechst 33258 핵염색

5×10^4 /ml의 세포를 원심부착 하여 4% PFA로 실온에서 30분간 고정하였다. PBS로 2회 세척한 후 20 µl의 Hoechst 33258 (4 µg/ml)을 첨가하여 37°C에서 30분간 반응하였다. PBS로 2회 세척한 후 전체 세포의 수는 위상차 현미경의 DIC 렌즈를 이용하여 계수하였고, 핵 아포토시스를 일으킨 세포는 형광현미경을 이용하여 관찰하고 계측하였다.

4. Western blotting

PARP (poly (ADP-ribose) polymerase) cleavage, Bax, Bcl-2, Bak 및 AIF (Apoptosis inducing factor) 단백질의 발현 정도를 알아보기 위하여 SDS-PAGE 후 Western blot을 실행하였다. Stacking 겔과 separating 겔은 4%와 12% polyacrylamide의 조성으로 하였다. Bovine serum albumin (BSA, Sigma, St. Louis, MO)을 표준 단백질로 하여 Coomassie brilliant blue 방법으로 측정된 단백질을 약 70 µg/ml가 되도록 조정하여 각 홈에 20 µl씩 넣고 수직형 전기 영동을 200 V에서 45분 동안 실시하였다. 단백질 분자량은 SDS molecular weight markers kit (Sigma, MW-SDS-70L)를 기준으로 정하였다. 상기방법으로 전기영동한 겔은 Mini transblot cell (BIO-RAD Mini-Protean II)를 이용하여 4°C에서 250

mA, 100 V로 1시간 동안 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 그 후 3% BSA가 포함된 25°C blotto solution (pH 7.4)에서 1시간 동안 blocking한 후 각 암유전자의 산물에 대한 항체가 들어있는 4°C 0.2% Tween-20이 포함된 PBS에서 밤새 교반하였다. 이를 alkaline phosphatase conjugated anti-rabbit immunoglobulins (Sigma, A-2306)로 25°C에서 60분간 반응시키고 세척한 후 3% 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphate p-toluidine salt (BCIP)와 0.015% p-nitroblue tetrazolium chloride (NBT)가 들어있는 carbonate buffer (0.1M NaHCO₃, 1.0 mM MgCl₂, pH 9.8)로 발색시켰다. PARP cleavage 관찰을 위해서는 1 mg/ml 농도의 anti-PARP antibody (Clone N0. C-2-10, Oncogene Research Products Cat. No. AM30)를 이용하였고, 1 : 2,000 희석된 HRP (horseradish peroxidase)-conjugated anti-mouse immunoglobulin (Amersham Co, Cat. No. NA931V)을 이차 항체로 이용하였다. Bax, Bcl-2, Bak 및 AIF의 단백질 발현 정도를 관찰하기 위해 1 mg/ml 농도의 anti-Bax, anti-Bcl-2, anti-Bak, anti-AIF antibody (Santa Cruz Biotechnology, cat. No. sc-7480, sc-492, sc-832, sc-5586)를 이용하였고 1 : 2,000 희석된 HRP-conjugated anti-rabbit immunoglobulin (Amersham Co, Cat. No. NA934V)을 이차 항체로 이용하였다. 항원의 관찰은 enhanced chemiluminescence (ECLTM, Amersham Co.)를 이용하였다.

5. 면역형광염색(Immunofluorescent staining)

5 × 10⁴/ml의 세포를 약물 처리하여 원심분리한 후 PBS

100 μl에 현탁하여 슬라이드 글라스에 원심 부착(1,000 rpm, 1 min)하였다. 원심 부착된 세포를 1시간 말린 후 4% PFA에서 10분간 고정하였다. PBS buffer로 3회 수세 후 anti-cytochrome C, anti-Bax, anti-AIF antibody를 1시간, 37°C에서 적용한 후 FITC-conjugated 이차 항체로 1시간, 37°C에서 처리하였다. 커버글라스를 덮은 후 형광현미경으로

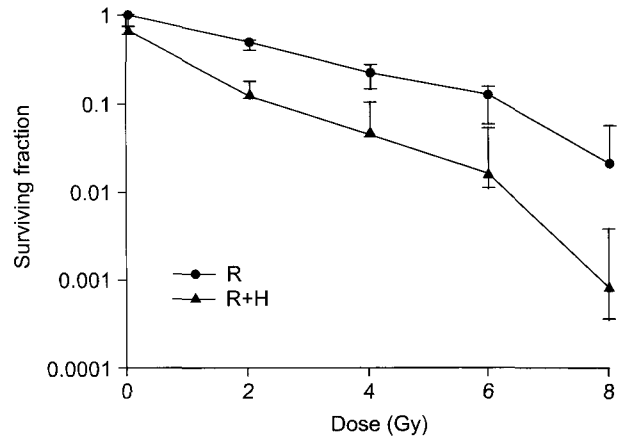


Fig. 1. Enhanced clonogenic cell death in HS-1200 plus radiation-treated MCF-7 cells. Exponentially growing MCF-7 cells were exposed to 16 μM of HS-1200 for 24 h before radiation. Following HS-1200 treatment, cells were irradiated at a dose of 0, 2, 4, 6, 8 Gy. Enhanced clonogenic cell death in HS-1200 plus radiation. ●, radiation alone (R); ▲, HS-1200 plus radiation (HR). Four independent assays were performed and data show the mean ± SD obtained from triplicates of each assays.

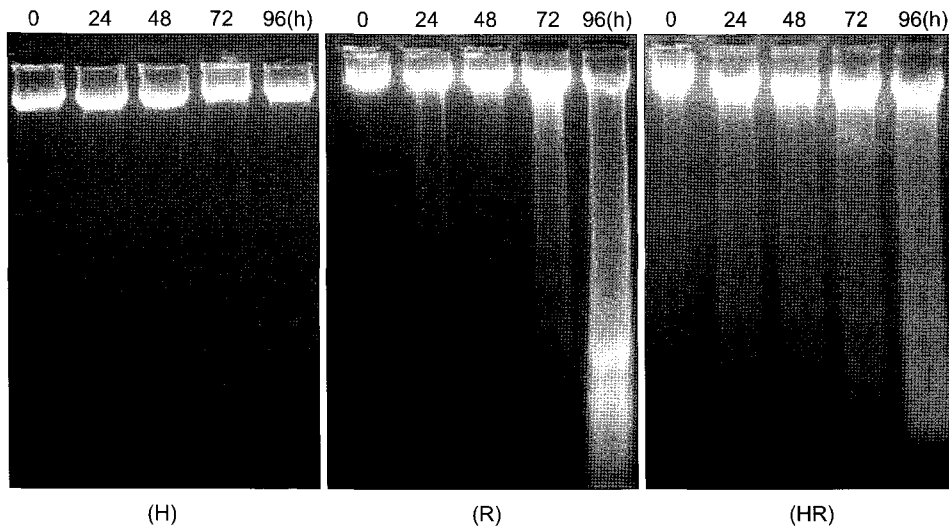


Fig. 2. Enhanced DNA fragmentation in HS-1200 plus radiation-treated MCF-7 cells. Cells were exposed to 40 μM of HS-1200 (H). Cells were exposed to radiation alone at a dose of 8 Gy (R) and to HS-1200 at 40 μM for 24h before irradiation and then irradiated at a dose of 8 Gy (HR).

관찰하였다.

6. 미토콘드리아 막 전위 실험(Assay of mitochondrial membrane potential)

24 well plate에 세포를 배양한 후 (5×10^5 cells) 약물 처리하였다. 약물 처리 시간만큼 배양한 후 배양 배지를 제거하고, 5,5', 6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazol carbocyanine iodide (JC-1) 를 최종 농도 $1 \mu\text{M}$ 이 되게 배양 배지 1 ml로 희석해서 15분간 처리하였다. 처리된 세포를 트립신 $200 \mu\text{l}$ 를 넣어 plate에서 떨어뜨린 후 원심분리하여 PBS 1 ml로 씻어주었다. PBS buffer 1 ml로 현탁하여 $20 \mu\text{l}$ 를 덜어서 세포 수를 계수하였다. 가장 적은 세포 수에 맞추어서 세포를 덜어내어 세포 수를 같게 한 후 PBS buffer 로 2 ml을 맞추었다. Fluorimetric system (Spex Edison, NJ)

에서 495 nm로 측정하였고 계산은 정상 세포 측정치에 대한 미토콘드리아 막 전위 상실($\Delta\psi_m$)로 나타내었다.

실험 결과

1. 세포 생존 분획 관찰

Fig. 1에 도시한 바와 같이 방사선 단독 조사군(R)에서 평균 D_0 는 0.64 Gy, SF_2 는 0.56으로 관찰되었으며, HS-1200 처치 후 방사선 조사군(HR)에서는 평균 D_0 는 0.59 Gy, SF_2 는 0.26으로 관찰되어 HR군에서의 세포 생존 분획의 감소를 관찰할 수 있었다. logistic 회귀분석을 이용한 통계 분석에서 HR군의 세포 생존분획의 유의한 감소를 나타내었다($p < 0.0001$, Odds ratio R; 0.328, HR 0.281).

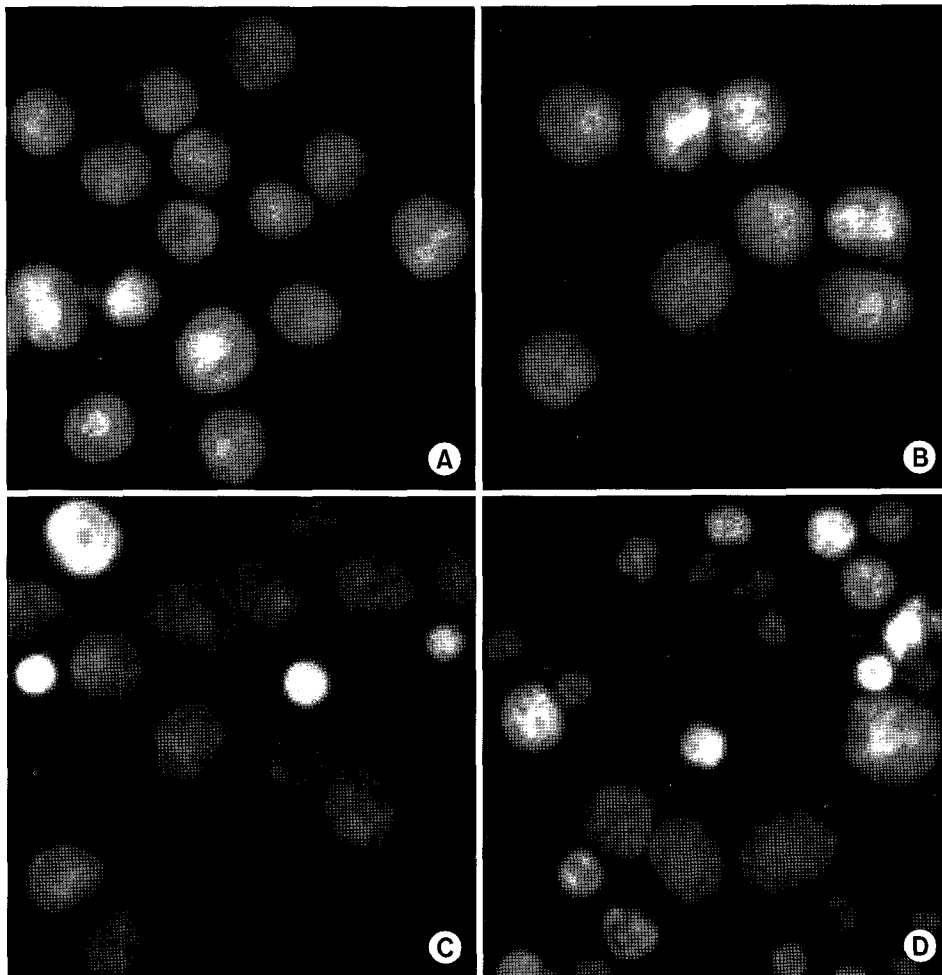


Fig. 3. Demonstration of nuclear condensation in MCF-7 cells. (A, B, C, D) Immunofluorescent micrographs after hoechst staining. ($\times 400$) (A) Control cells. (B) Cells treated with $40 \mu\text{M}$ of HS-1200 only for 24h (C) Cells were exposed to radiation alone at a dose of 8 Gy. (D) Cells treated with $40 \mu\text{M}$ of HS-1200 for 24h before irradiation and then irradiated at a dose of 8 Gy.

2. 아포토시스의 관찰

1) Agarose gel 전기 영동

대조군과 더불어 8 Gy X-선을 조사 후 24시간 간격으로 96시간까지 관찰한 전기영동 실험에서 HS-1200 단독 처리군(H)에서는 DNA ladder가 관찰되지 않았으며 방사선 조사 단독 처리한 군(R)에서는 72시간 후에 DNA ladder가 관찰되었으나, HS-1200 처리 후 방사선 조사를 한 군(HR)에서는 24시간째부터 DNA ladder가 관찰되어 DNA fragmentation이 더욱 빨리 진행함을 알 수 있었다(Fig. 2).

2) Hoechst staining

HS-1200 단독 처리군(H)에서는 세포핵의 농축 현상이 관찰되지 않았으며 방사선 조사 단독 처리한 군(R)에 비하여 HS-1200 처리 후 방사선 조사를 한 군(HR)에서는 대조 세포에 비하여 확연한 세포핵의 주변부 농축 현상을 72시간째 촬영한 사진에서 확인하였다(Fig. 3).

3. 아포토시스 기전 검증 Western blot

1) PARP cleavage

HS-1200 단독 처리군(H)에서는 PARP cleavage가 72시간이 지나서야 관찰되는 반면에 방사선 조사 단독 처리한 군(R)에서는 48시간째부터 PARP cleavage가 관찰되지만 HS-1200 처리 후 방사선 조사를 한 군(HR)에서는 24시간째부터 PARP cleavage가 관찰되었다(Fig. 4). 이러한 결과는 DNA ladder의 관찰 결과와 부합하였고 HR군에서는 PARP cleavage 또한 R군에 비하여 선행되는 결과를 관찰하였다.

2) Bax, Bcl-2, Bak 및 AIF

8 Gy X-선을 조사 후(R) 또는 HS-1200 처리 후 방사선

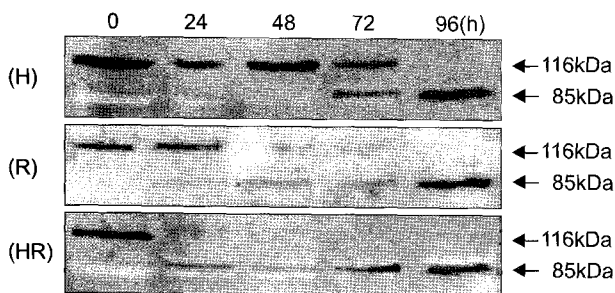


Fig. 4. Demonstration of degradation and production of cleavage products of PARP. Cells treated with 40 μM of HS-1200 only for 24 h (H), were exposed to radiation alone at a dose of 8 Gy (R) and to HS-1200 at 40 μM for 24h before irradiation and then irradiated at a dose of 8 Gy (HR). Inactivated PARP protein (116 kDa) and cleaved product (85 kDa) are indicated. Enhanced PARP cleavage is shown in HS-1200 plus radiation-treated MCF-7 cells. The data show a representative of four independent experiments.

조사를 한 군(HR)들을 24시간 간격으로 96시간까지 관찰한 Bax, Bcl-2, Bak 및 AIF의 발현은 Bax는 방사선 단독 조사군에 비하여 뚜렷한 증가 추세를 관찰할 수 있었으나 Bcl-2, Bak 및 AIF들의 발현 변화는 관찰할 수 없었다(Fig. 5). Bcl-2의 발현 변화는 관찰할 수 없었으나 확인한 Bax의 변화에 따른 Bax/Bcl-2 비의 뚜렷한 변화가 아포토시스의 유도에 뚜렷한 영향을 미치는 것으로 해석할 수 있었다.

4. 면역형광염색(Immunofluorescent staining)

1) Cytochrome c의 방출

대조군과 더불어 8 Gy X-선을 조사 후 72 시간 쯤 관찰한 결과 방사선단독 처리한 군(R)에 비하여 HS-1200 처치 후 방사선 조사군(HR)은 세포질 전반에 퍼져서 cytochrome c가 염색되는 현상이 관찰되어 다량의 cytochrome c가 미토콘드리아로부터 방출되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 6A).

2) Bax

대조군과 더불어 8 Gy X-선을 조사 후 72시간째 관찰한 결과 대조군은 산재된 분포를 보이는 데 반하여 방사선 단독 처리한 군(R)과 HS-1200 처치 후 방사선 조사군(HR)은 점상(punctate) 분포를 나타내고 그 정도는 HR군에서 더욱 뚜렷하였다(Fig. 6B).

3) AIF

대조군과 더불어 8 Gy X-선을 조사 후 72시간째 관찰한 결과 방사선 단독 처리한 군(R)에 비하여 HS-1200 처치 후

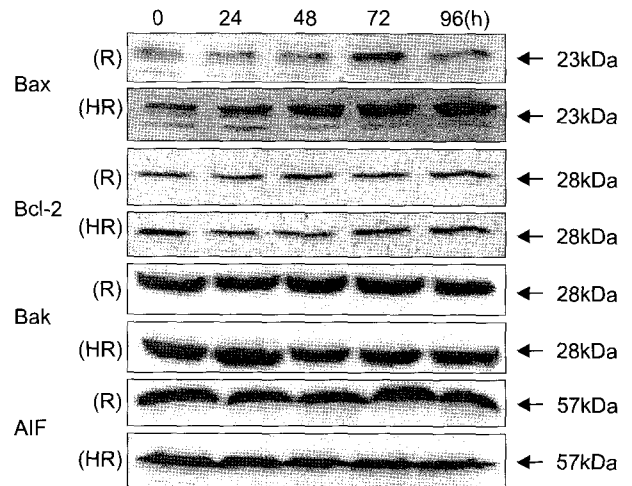


Fig. 5. Effect of combination of both HS-1200 and irradiation on the expression of Bax, Bcl-2, Bak and AIF. Cells were exposed to radiation alone at a dose of 8 Gy (R) and to HS-1200 at 40 μM for 24 h before irradiation and then irradiated at a dose of 8 Gy (HR). Enhanced Bax expression in (HR) group is shown. The data show a representative of four independent experiments.

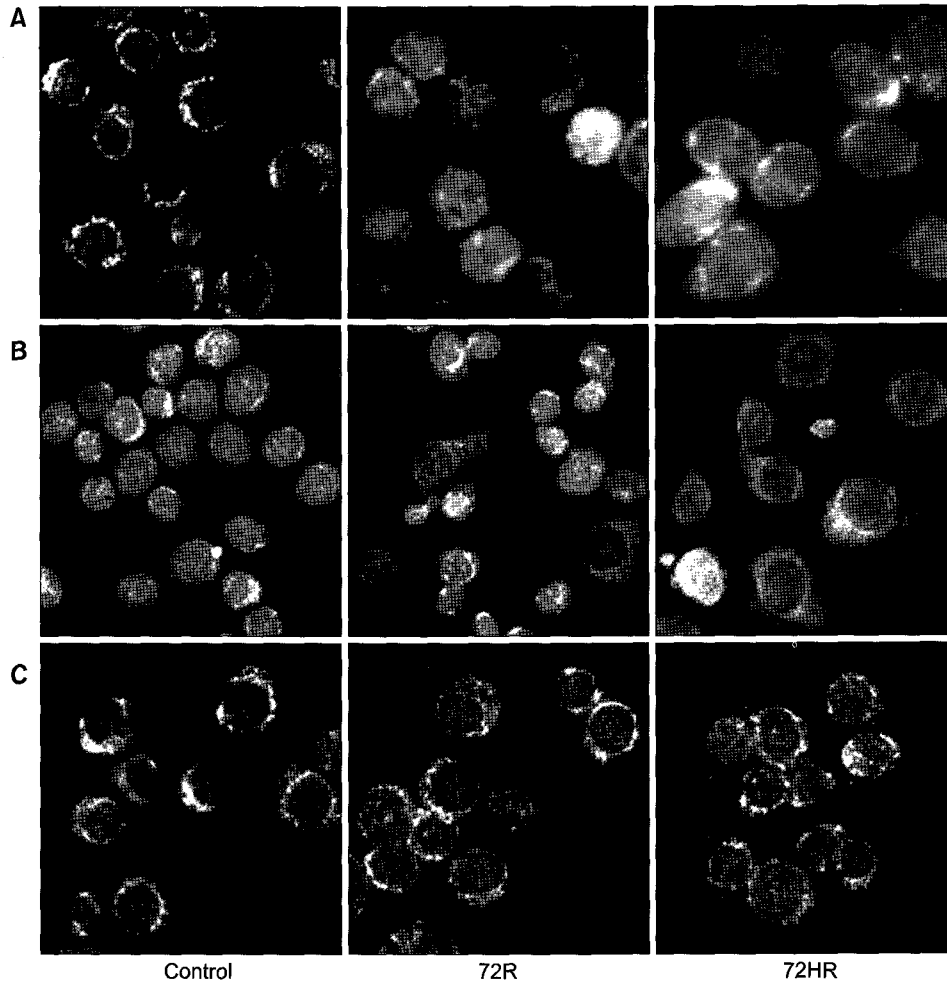


Fig. 6. Immunofluorescent micrograph showing localization of mitochondria (pro)apoptogenic factors. Cells were exposed to radiation alone at a dose of 8 Gy (R) and to HS-1200 at 40 μ M for 24h before irradiation and then irradiated at a dose of 8 Gy (HR). A: Cytochrome c. B: Bax. C: AIF ($\times 400$). The data show a representative of four independent experiments.

방사선 조사군(HR)과의 뚜렷한 차이를 발견할 수 없었다 (Fig. 6C).

5. 미토콘드리아 막전위(Mitochondrial membrane potential)

JC-1을 이용한 미토콘드리아 막전위의 탈분극화(depolarization) 현상은 green fluorescence에 대한 red fluorescence의 감소 비율로 관찰하였다. HS-1200 단독 처리군(H)에서는 미토콘드리아 막전위의 탈분극화 현상이 거의 일어나지 않는 반면, 8 Gy X-선을 조사 후 24시간째부터 24시간 간격으로 96시간까지 관찰한 결과 방사선 단독 처리한 군(R)에 비하여 HS-1200 처리 후 방사선 조사군(HR)은 미토콘드리아 막전위의 탈분극화 현상이 48시간째부터 확연히 많이 빠른 속도로 일어나는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 7).

고안 및 결론

합성 담즙산 유도체들의 세포 성장 억제제는 아포토시스가 주된 역할을 한다. 이는 다양한 암세포들의 형태학적 변화, DNA ladder의 관찰, PARP cleavage 등을 이미 관찰하여 증명되었다.⁹⁾ 합성 담즙산 유도체가 아포토시스를 유도하는 명확한 기전은 알려져 있지 않다. 그동안의 연구 결과들에 의하면 크게 세 가지 기전을 추론할 수 있다. 첫째, 자연 담즙산의 세포 사망 기전은 death receptor Fas에 의해 매개된다. 이는 GCDC (glycochenodeoxycholate)의 경우 설치류 간세포에서 Fas ligand와는 독립적으로 Fas oligomerization을 유도하고 caspase-8을 활성화하여 아포토시스를 초래한다는 보고와¹⁰⁾ PI3K의 활성을 증가시키면 Fas가

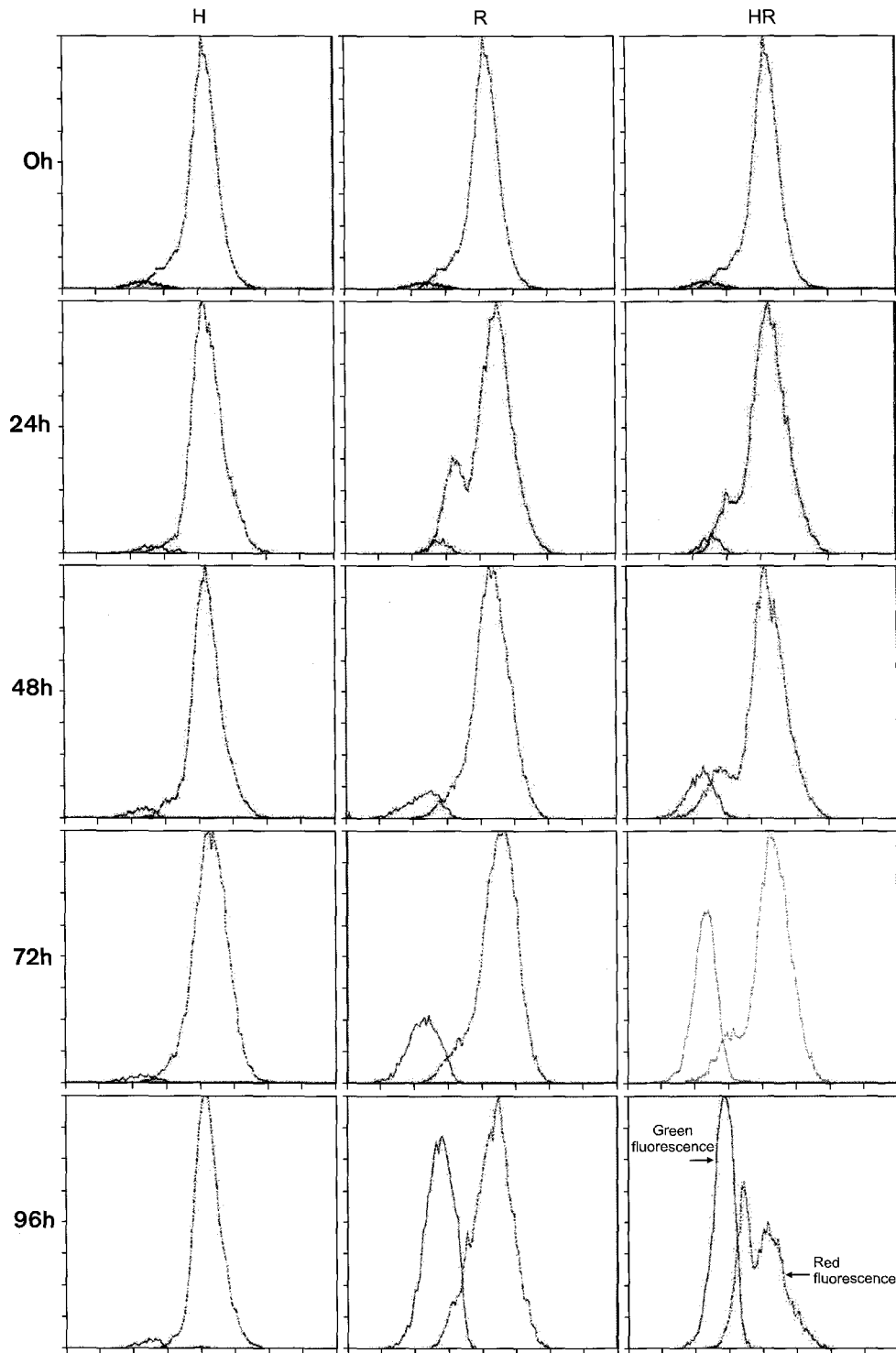


Fig. 7. Effect of combination of both HS-1200 and irradiation on loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) in MCF-7 cells. Cells treated with $40\ \mu\text{M}$ of HS-1200 only (H), were exposed to radiation alone at a dose of 8 Gy (R) and to HS-1200 at $40\ \mu\text{M}$ for 24h before irradiation and then irradiated at a dose of 8 Gy (HR). $\Delta\Psi_m$ was quantitated by measurement of J aggregate (JC-1) fluorescence in cells. The percent of control is calculated $\Delta\Psi_m$ of treated cells/ $\Delta\Psi_m$ of control cells. H: 24 h-97%, 48 h-96%, 72 h-95%, 96 h-95% R: 24 h-97%, 48 h-92%, 72 h-86%, 96 h-59%. HR: 24 h-96%, 48 h-82%, 72 h-64%, 96 h-51%. The data show a representative of four independent experiments.

매개하는 아포토시스가 억제된다는 연구결과들을 토대로 하고 있다.¹¹⁾ 담즙산에 의해 유도되는 Fas의 활성화는 kinase-dependent, antiapoptotic signaling pathway의 활성화에 의해 억제가능하며 이러한 추론은 CDCA, TCDC (tauro-sodeoxycholate)의 taurine 배합체(conjugate)들은 PI3K를 활성화 하여 GCDC의 세포 독성을 억제한다는 연구 결과가 뒷받침한다.¹²⁾ NF-kB는 TCDC가 PI3K 활성화에 필요한 하부 표적(downstream target) 중의 하나이며, NF-kB는 cIAP-1 (inhibitor of the apoptosis protein 1)과 같은 antiapoptotic proteins의 상부 조절에 의해 담즙산이 매개하는 Fas/caspase-8 활성화를 억제한다.¹³⁾ 둘째, PKC signaling pathway에 의존한다. 이 이론은 담즙산이 PKC를 phosphatidyl serine의 치환 또는 간접적인 phospholipase C의 활성화를 자극하여 직간접적으로 활성화하며, 이는 PKC 활성화에 요구되는 diacylglycerol의 생성을 증가시킨다는 연구 결과를 토대로 한다.^{7,8,14,15)} 셋째, 담즙산은 화학적 구조가 glucocorticoids와 유사하므로 세포막을 통과하여 cytosol에 직접적인 영향을 미친다. 이 이론은 FXR (orphan nuclear receptor)의 결합에 작용하며 합성 CDCA 또한 FXR과 결합하거나 관련성을 뒷받침하는 연구 결과를 토대로 하고 있다.^{16,17)}

한편 방사선에 의한 세포 사멸의 중요한 요소 중의 하나인 아포토시스에 대한 연구에서도 고전적인 이론인 DNA 손상뿐만 아니라 세포막과 기관들에 영향을 미쳐 signal transduction, gene expression, protein stability, cellular redox states 및 cell cycle regulation의 변화를 초래한다는 이론들이 최근의 방사선 생물학적 연구에서 주장되고 있다. 고전적인 이론인 방사선에 의한 세포 사망은 회복되지 않은 DNA 이중 나선 손상이 염색체 이상을 초래한다는 이론은, 최근의 연구 결과들에서는 DNA의 손상뿐만 아니라 다른 세포 구성 요소들도 세포의 아포토시스에 관여한다고 생각하며 어떤 세포들은 DNA 손상 인자들, 산화 스트레스(oxidative stress), 성장 및 생존 인자의 공급 중단(growth/survival factor withdrawal), 영양 또는 산소 결핍, 스테로이드 치료, 세포 표면 수용체의 결합(ligation of cell surface receptors), 미토콘드리아 세포막의 탈분극화 등과 같은 스트레스에 의해 아포토시스를 유도한다고 생각한다. 이러한 이론들은 ceramide signalling pathway, Fas/Fas ligand death receptor pathway, Protein Kinase A, PKC, NFkB signalling pathways 및 최근 PI-3 Kinase 유사 분자의 발견 등으로 점차 이론적인 토대를 얻고 있다.¹⁸⁻²⁵⁾ 또한 방사선은 다양한 유전자들의 전사 조절에 변화를 초래하여 p53 tumor suppressor gene 및 Bcl-2 family와의 연관성과도 밀접한 관계가 있음이 발표되었다.²⁶⁻³⁰⁾ 이상의 고찰에서 합성 담즙

산 유도체 뿐만 아니라 방사선에 의한 아포토시스의 유도에도 다양한 복수의 세포 표적 이론(multiple cellular target theory)이 존재함을 알 수 있다.

합성 담즙산 유도체와 방사선 조사 병행에서 나타나는 방사선 감각 효과를 연구자들은 clonogenic assay에서 관찰된 SF₂ 및 D₀ data를 이용하여 logistic 회귀 분석을 통한 통계처리를 통하여 분석하였지만, 보다 다양한 파라미터를 이용하고 CI (combination index) 등을 사용하여 약제의 synergism, additive effect, antagonism 등을 판명하는 것을 추천한다.³¹⁾ 그러나 본 연구는 MCF-7 세포주만을 이용한 in vitro 실험의 한계를 감안하여 약제와 방사선의 병용 시에 나타난 세포 사멸의 경향을 아포토시스의 기전 연구에 집중하여 여러 가지 분석을 실시하였다. 본 연구 결과 확연히 증가한 Bax/ Bcl-2의 비율 변화와 cytochrome c의 방출 및 미토콘드리아 막전위의 확연한 감소가 주목된다. Cytochrome c는 caspase-3 활성화 및 DNA fragmentation에 필요한 성분이며, 아포토시스 과정에서 미토콘드리아로부터 방출되며 Bcl-2 또는 Bcl-xL이 cytochrome c의 세포질로의 유입을 억제하는 것도 알려졌다. 미토콘드리아 cytochrome c는 수용성 단백질로, 양전하를 띠며 미토콘드리아 막간 공간에 느슨하게 부착되어 있다. 아포토시스 과정에서 cytochrome c가 미토콘드리아로부터 세포질로 이동하는 분자생물학적 기전은 아직도 규명되어있지 않으나 많은 경우에서 아포토시스의 초기 과정에서 미토콘드리아 막전위($\Delta\psi_m$)의 감소가 보고되었다. 일반적으로 mitochondrial permeability transition (MPT)의 유도는 아포토시스의 유도에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.³²⁻³⁵⁾ MPT의 antioxidant 또는 blockers 들은 담즙산이 유도하는 쥐 간 세포 아포토시스를 억제한다.³⁶⁾ Mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$)은 세포막이 파괴되기 직전에 방산되는데 이는 아포토시스뿐만 아니라 괴사에서도 관찰된다. 합성 담즙산 유도체의 실험에서도 인체 망막색소상피세포뿐만 아니라 HT-29 세포에서도 $\Delta\psi_m$ 의 소실이 관찰되었다.^{9,37)} 세포 사망 억제인자인 Bcl-2는 미토콘드리아 외막에 위치하며, 세포 사망 및 미토콘드리아 막 전위($\Delta\psi_m$)의 감소를 억제한다.

본 연구자료 중 무엇보다도 연구자들은 담즙산 유도체와 방사선 조사 병행에서 Bax 발현이 확연히 증가하고 시간대가 앞당겨지는 것에 주목할 가치가 있다고 해석한다. Bax 발현의 확연한 증가는 Bax/Bcl-2 비율에 영향을 미치고 이러한 결과로 방사선 감각 효과가 관찰되었다고 설명할 수 있기 때문이다. 본 연구결과 담즙산 유도체를 병용투여하면 방사선 단독 조사에 비하여 아포토시스 관련 통

로에 관여하는 여러 machinery들을 잠작시켜 아포토시스 유도효율을 증가시킴으로써 치료효과를 향진시킨다는 결과를 얻었다. 앞으로 담즙산 유도체에 의한 Bax 발현의 증가에 관여하는 상부(upstream) 통로를 구명하고 *in vivo*에서 효과를 검증하는 것이 필요하다.

참 고 문 헌

1. Im EO, Lee S, Suh H, Kim KW, Bae YT, Kim ND. A novel ursodeoxycholic acid derivative induces apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. *Pharm Pharmacol Commun* 1999;5:293-298
2. Park YH, Kim J, Baek J, et al. Induction of apoptosis in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells by a novel derivative of ursodeoxycholic acid (UDCA). *Arch Pharm Res* 1997;20:29-33
3. Baek JH, Kim J, Kang C, Lee YS and Kim KW. Induction of apoptosis by bile acids in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells. *Korean J Physiol Pharmacol* 1997;1:107-115
4. Kim DK, Lee JR, Kim A, et al. Inhibition of initiation of simian virus 40 DNA replication *in vitro* by the ursodeoxycholic acid and its derivatives. *Cancer Lett* 1999;146:147-153
5. Im EO, Choi YH, Paik KJ, et al. Novel bile acid derivatives induce apoptosis via a p53-independent pathway in human breast carcinoma cells. *Cancer Lett* 2001;163:83-93
6. Choi, YH, Im EO, Suh H, et al. Apoptotic activity of novel bile acid derivatives in human leukemic T cells through the activation of caspases. *Int J Oncol* 2001;18:979-984
7. Morgan WA, Sharma P, Kaler B, Bach PH. The modulation of protein kinase C by bile salts. *Biochem Soc Trans* 1997;25:75S
8. Ward NE, O'Brien CA. The bile acid analog fusidic acid can replace phosphatidylserine in the activation of protein kinase C by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate *in vitro*. *Carcinogenesis* 1988;9:1451-1454
9. Oh SG, Yang KM, Hur WJ, Yoo YH, Suh HS, Lee HS. A novel chenodeoxycholic derivative HS-1200 induces apoptosis in human HT-29 colon cancer cells. *J Korean Soc Ther Radiol Oncol* 2002;20(4):367-374
10. Faubion WA, Guicciardi ME, Miyoshi H, et al. Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *J Clin Invest* 1999;103:137-145
11. Di Cristofano A, Kotsi P, Peng YF, Cordon-Cardo C, Elkon KB, Pandolfi PP. Impaired Fas response and autoimmunity in *Pten*^{+/-} mice. *Science* 1999;285:2122-2125
12. Rust C, Karnitz LM, Pays CV, Moscat J, Simari RD, Gores GJ. The bile acid taurochenodeoxycholate activates a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *J Biol Chem* 2000;275:20210-20216
13. Wang H, Chen J, Hollister K, Sowers LC, Forman BM. Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol Cell* 1990;3:543-553
14. Qiao D, Chen W, Stratagoules, ED, Martinez JD. Bile acid-induced activation of activator protein-1 requires both extracellular signal-regulated kinase and protein kinase C signaling. *J Biol Chem* 2000;275:15090-15098
15. Craven PA, Pfanstiel J, Derubertis FR. Role of activation of protein kinase C in the stimulation of colonic epithelial proliferation and reactive oxygen formation by bile acids. *J Clin Invest* 1987;79:532-541
16. Song CS, Echchgadda I, Baek BS, et al. Dehydroepiandrosterone sulfotransferase gene induction by bile acid activated farnesoid x receptor. *J Biol Chem* 2001;276:42549-42556
17. Park DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, et al. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* 1999;284:1365-1368
18. Hallahan DE, Sukhatme VP, Sherman ML, et al. Protein kinase C mediates X-ray inducibility of nuclear signal transducers EGR1 and JUN. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2156-2160
19. Uckun FM, Tuel-Ahlgren L, Song CW, et al. Ionizing radiation stimulates unidentified tyrosine-specific protein kinases in human B-lymphocyte precursors, triggering apoptosis and clonogenic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:9005-9009
20. Findik D, Song Q, Hidaka H, Lavin M. Protein kinase A inhibitors enhance radiation-induced apoptosis. *J Cell Biochem* 1995;57:12-21
21. Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS, Jr. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 1996;274:784-787
22. Kim SH, Seong JS. The Fas/FasL in radiation-induced apoptosis *in vivo*. *J Korean Soc Ther Radiol Oncol* 2003;21(3):222-226
23. Reap EA, Roof K, Maynor K, et al. Radiation and stress induced apoptosis: A role for Fas/Fas ligand interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:5750-5755
24. Sheard MA, Vojtesek B, Janakova L, Kovarik J, Zaloudik J. Up-regulation of Fas(CD95) in human p53 wild-type cancer cells treated with ionizing radiation. *Int J Cancer* 1997;73:757-762
25. Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, et al. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 1995;268:1749-1753
26. Weichselbaum RR, Hallahan D, Fuks Z, Kufe D. Radiation induction of immediate early genes: effectors of the radiation stress response. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;30:229-234
27. Hockenbery D, Nunez G, Milman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990;348:334-336
28. Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 1997;3:614-620
29. Cherbonnel-Lasserre C, Gauny S and Kronenberg A. Suppression of apoptosis by Bcl-2 or Bcl-xL promotes susceptibility to mutagenesis. *Oncogene* 1996;13:1489-1497

30. Cherbonnel-Lasserre C and Dosanjh MK. Suppression of apoptosis by overexpression of Bcl-2 or Bcl-xL promotes survival and mutagenesis after oxidative damage. *Biochimie* 1997;79:613-617
31. Pauwels B, Korst AEC, Pattyn GGO et al. Cell cycle effect of gemcitabine and its role in the radiosensitizing mechanism in vitro. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;57:1075-1083
32. Yang J, Liu X, Bhalla K, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997;275:1126-1132
33. Rodrigues CM, Fan G, Ma X, Kren BT, Steer CJ. A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *J Clin Invest* 1998; 101:2790-2799
34. Zamzami N, Susin SA, Mase B, et al. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* 1995;182:367-377
35. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, et al. Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial membrane potential during apoptosis. *FEBS Lett* 1996;384:153-157
36. Yershalmi B, Dahl R, Devereaux MW, Gumprich E, Sokol RJ. Bile acid induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology* 2001;33:616-626
37. Yoon HS, Rho JH, Yoo KW, et al. Synthetic bile acid derivatives induce nonapoptotic death of human retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res* 2001;22:367-374

Abstract

A Novel Chenodeoxycholic Derivative HS-1200 Enhances Radiation-induced Apoptosis in Human MCF-7 Breast Cancer Cells

Hyung Sik Lee, M.D.*, Young Min Choi, M.D.*, Hyuk Chan Kwon, M.D.[†], Yeon Suk Song[†]

Department of *Radiation Oncology, Hemato-oncology[†] and [†]Anatomy and Cell Biology, College of Medicine, Dong A University, Busan, Korea

Purpose: To examine whether a synthetic bile acid derivatives (HS-1200) sensitizes the radiation-induced apoptosis in human breast cancer cells (MCF-7) and to investigate the underlying mechanism.

Materials and Methods: Human breast cancer cells (MCF-7) in exponential growth phase were treated with HS-1200 for 24 hours at 37°C with 5% CO₂ in air atmosphere. After removal of HS-1200, cells were irradiated with 2~8 Gy X-ray, and then cultured in drug-free media for 24~96 hours. The effect of radiation on the clonogenicity of MCF-7 cells was determined with clonogenic cell survival assay with 16 μM of HS-1200. The induction of apoptosis was determined using agarose gel electrophoresis and Hoechst staining. The expression level of apoptosis-related molecules, such as PARP, Bax, Bcl-2, Bak and AIF, were assayed by Western blotting analysis with 40 μM of HS-1200 combined with 8 Gy irradiation. To examine the cellular location of cytochrome c, bax and AIF immunofluorescent stainings were undertaken

Results: Treatment of MCF-7 cells with 40 μM of HS-1200 combined with 8 Gy irradiation showed several changes associated with enhanced apoptosis by agarose gel electrophoresis and Hoechst staining. HS-1200 combined with 8 Gy irradiation treatment also enhanced production of PARP cleavage products and increased Bax/Bcl-2 ratio by Western blotting. Loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and increased cytochrome c staining indicated that cytochrome c had been released from the mitochondria in HS-1200 treated cells.

Conclusion: We demonstrated that combination treatment with a synthetic chenodeoxycholic acid derivative HS-1200 and irradiation enhanced radiation-induced apoptosis of human breast cancer cells (MCF-7). We suggest that the increased Bax/Bcl-2 ratio in HS-1200 co-treatment group underlies the increased radiosensitivity of MCF-7 cells. Further futures studies are remained elusive.

Key Words: Synthetic bile acid, HS-1200, Apoptosis, Radiation-induced apoptosis, MCF-7