

The enhancement of apoptosis by combined with proteasome inhibitor and DNA synthetic inhibitor in oral cancer

Young-Hee Lee, Ji-Eun Jung, Jung-Chang Lee, Hyun-Ju Moon, Nan-Hee Lee, Eun-Jung Jhee, and Ho-Keun Yi*

Department of Oral biochemistry, School of Dentistry and Institute of Oral-bio Science, Chonbuk National University

(Received January 11, 2008 ; Accepted March 18, 2008)

Inhibition of proteasome activity may reduce many types of cancer, so it's pathway is effective in cancer as well as in clinical fields. Here the author has carried out experiment targeting on the elevation of apoptosis in oral cancer cells by combination of proteasome inhibitor, lactacystin, and DNA replication inhibitor, etoposide. The growth of KB cells was measured by MTT methods and apoptosis was analyzed by DNA fragmentation and Hoechst nucleus staining. The proteasome activity was analyzed by fluorescent tagged peptide and cellular protein expression was detected by Western hybridization. Though lactacystin and etoposide inhibited KB cell growth alone, but low combined doses inhibited cell growth more strongly and induced apoptosis. The proteasome activity was also seriously inhibited by the combination of both chemicals. Tumor suppressor proteins and apoptosis inducing proteins were highly increased under the combination of both chemicals. From above studies we can conclude that proteasome inhibitors may be used for the treatment of oral cancer and proteasome inhibitors with DNA replication inhibitors may be effective in clinical trials of oral cancer.

Key Words: KB cells, etoposide, lactacystin, oral cancer, proteasome inhibitors

서 론

Proteasome은 여러 소단위 효소의 복합체로서 세포내 여러 단백질을 분해시켜 세포의 성장, 분화 및 apoptosis

를 조절한다. 최근 proteasome의 기능을 이용하여 세포주기와 apoptosis에 관여하는 단백질의 분해를 억제시켜 암의 치료에 응용이 가능 할 것으로 연구되고 있다. Proteasome은 20S 주 단위체와 1개 혹은 2개의 19S의 조절단위체로 구성되어 있으며, 전체적으로 크기는 2,000 kDa에 달한다(Adams, 2003). 선택된 단백질이 proteasome에 인식되어 분해되기까지는 작은 펩타이드인 ubiquitin이 단백질에 결합하게 되며, 이런 과정은 ubiquitin-activating enzyme (E1), ubiquitin-conjugating enzyme (E2), ubiquitin-protein ligase (E3)로 불리는 3개의 효소에 의해서 단백질이 분해된다. 현재 한 종류의 E1의 효소와 20종류 이상의 E2가 분리되었으며, E3는 수백종류에 달할 것으로 추측하고 있으며, 이들 효소의 조합에 의해서 선택적인 단백질의 분해가 이루어져 세포의 성장과 apoptosis의 조절이 이루어 질 것으로 예측하고 있다(Pickart, 2001). Proteasome의 활성을 억제시키면 세포주기에 관여하는 cyclin과 cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI)의 안정성이 뚜렷하게 나타난다(Shah 등, 2001). 또한 암세포의 성장과 apoptosis에 관련되는 p53과 NF-kB의 분해와 세포내 전사기능이 proteasome에 의해서 조절된다(An 등, 2000; Jeremias 등, 1998). 따라서 proteasome inhibitor에 의한 항암효과는 세포주거나 apoptosis를 조절시키는 인자의 활성을 암세포에 유지시켜 나타나게 하며, 그밖에도 proteasome inhibition은 세포의 접착인자, 혈관생성, 세포 분열 등에도 영향을 미치는 것으로 알려지고 있다(Sun, 2003).

대표적인 proteasome inhibitor인 bortezomib은 2003년에 미국의 FDA로부터 다발성골수종에 사용이 허가되어 새로운 항암제로 인식되고 있다(Bross 등, 2004). 그밖에 proteasome 저해제로는 lactacystin, MG132, NLVS 등을 비롯하여 60여종 이상이 있으며, 이들 저해제는 다양한 암세포에서 항암활성과(Adams 등, 1999), 혈액암, 췌장암, 전립선암 등의 동물 실험에서 항암활성이 보고되었다(Shah

*Corresponding author: Ho-Keun Yi, Ph.D. Department of Biochemistry, School of Dentistry, Chonbuk National University, 634-18, Geumam-dong, Deokjin-gu Jeonju, Jeonbuk, 561-712, Korea. Tel.: +82-63-270-4033; Fax.: +82-63-270-4033; E-mail: yihokn@chonbuk.ac.kr

등, 2001; Frankel 등, 2000; LeBlanc 등, 2002). 또한 대장암세포인 LoVo를 이용한 동물실험에서 lactacystin 단독보다는 DNA 합성저해제인 항암제 CPT-11과의 병합 투여가 암의 억제에 월등한 효과가 있는 것으로 보고되었다(Cusack 등, 2001). 두 약제의 병합에 관한 정확한 기전은 알 수 없지만 특이한 점은 CPT-11에 의해서는 암세포의 생존과 성장에 관여하는 NF-kB의 작용이 억제되지 않았지만, lactacystin의 병합은 NF-kB의 핵내 활성을 강하게 억제시키는 것으로 나타났다. 이러한 효과는 다발성골수암세포에 bortezomib 단독보다는 dexamethasone을 병행처리하면 세포사멸효과도 높고 세포의 약제 내성이 없어지는 것으로 보고되었다(Hideshima 등, 2001). Proteasome 저해제의 효과는 세포에 따라 다양하여 암세포와 같이 빠르게 성장하는 세포에서는 apoptosis를 유도하지만, 반면 분화된 세포나 정지세포에서는 생존력을 높이는 특성이 있다(Wojcik, 1999). 그밖에도 항암약물로서 proteasome 저해제는 혈관내피세포의 성장을 억제시키고 혈관신생유도인자의 발현을 억제시키는 작용을 보이지만, 반면소화기계 장애, 전신의 무기력증을 비롯하여 저혈소판증의 부작용이 존재한다(Roccaro 등, 2006; Lonial 등, 2005). 따라서 암의 치료에 있어서 proteasome 저해제는 단독보다는 기존의 항암약물과 함께 병행하여 부작용을 줄이고 상승작용을 높이는 것이 좋은 방법이다.

한국에서 구강암은 다발성 암에 해당되지는 않지만, 한 해 2,000여 명이 구강암에 속하는 두경부 종양으로 등록되며, 이러한 수치는 증가추세에 있다. 본 연구에서는 proteasome의 저해제인 lactacystin이 구강암세포에서 apoptosis의 유도과 항암제 etoposide와의 병합에 의한 proteasome의 활성화와 더욱 증가된 apoptosis의 유도를 검토하였다. 이 연구를 통한 구강암의 proteasome 저해를 통한 화학요법의 치료적 적용과 아울러 기존의 약제와 병합에 의한 상승적 효과의 가능성을 목적으로 하였다.

실험재료 및 방법

세포배양

사람의 구강암 세포주 KB(oral squamous cell carcinoma) 세포를 실험에 사용하였다. 세포 배양액은 RPMI(Life Technologies, Grand Island, NY, USA) 배지에 56°C에서 30분간 가열하여 비활성화시킨 우태아 혈청(FBS, Hyclone, Logan, Utah, USA)을 10%, penicillin(100 unit/ml)과 streptomycin (100 mg/ml) 및 300 mg/ml-glutamine을 첨가하여 조제하였다. 세포주는 위의 배양액을 사용하여 37°C, 95% 습도, 5% CO₂ incubator에서 배양하였고, 통상적으로 세포가 서로 융합되기 직전인 3-4일 간격으로 계대 배양을 하였으며, 실험에는 총 30 계대 이하인 세포만을 사용하였다.

세포성장(MTT assay)

세포의 증식 또는 생존의 정도를 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma, USA) 방법으로 측정하였다(Van de Loosdrecht 등, 1991). 12 well plate의 배양용기에 1×10^5 개의 세포를 배양시키고, 세포가 용기에 완전히 정착되는 6시간 후에 proteasome 저해제인 Lactacystin (Sigma, St. Louis, MO, USA)과 항암제 Etoposide (VP-16, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 10^{-5} M에서 10^{-7} M의 수준으로 처리하였다. 처리 후 1일부터 3일까지 세포성장을 처리하지 않은 군에 비교하여 산출하였다. 주어진 시간에 따라 37°C로 가온한 세포배양액으로 2회 세척 후 MTT 용액(5 mg/ml, without phenol red) 1 ml을 가하여 4시간 동안 재 배양 시켰다. 상층액을 제거시키고, 생성된 formazen 침전물에 DMSO 1 ml을 넣어 용해시키고 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

DNA 단편화와 핵의 응축

세포에 각각의 약제를 처리 후 주어진 시간에 나타나는 DNA의 단편화를 다음과 같이 실험하였다. 세포를 찬 PBS로 2회 세척하여 eppendorf tube에 옮기고 lysis 용액(10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.5% Triton X-100) 500 μ l를 첨가하여 얼음에서 30분간 용해시켰다. 용해 후 세포 찌꺼기를 13,000 rpm에서 10분간 원심분리로 제거시키고, phenol/chloroform 500 μ l를 첨가하여 천천히 섞은 후 10분간 원심분리로 기타의 단백질을 제거시켰다. 분리 DNA를 새 튜브에 옮기고, 1/10 용량의 3 M sodium acetate와 2배의 에탄올을 넣어 침전시켰다. 침전 DNA는 70% 에탄올로 세척하였으며, 건조 후 2 mg/ml RNase A가 함유된 TE용액에 녹이고, 1.5% 한천 겔에서 전기영동하여 DNA 단편화를 관찰하였다.

각각의 약제 처리 후 주어진 시간의 세포를 회수하였다. 회수 세포를 현미경 슬라이드에 메탄올과 초산이 3:1로 조성된 용액을 이용하여 고정시켰다. 고정 세포에 Hoechst 용액(0.1 mg/ml in PBS, Sigma, St. Louis, MO, USA)을 소량 엮고 10여 분간 염색시키고, PBS로 2-3회 세척시켰다. 핵은 형광현미경(365 nm)을 통하여 관찰하였다.

Proteasome 활성화

세포에 각각의 약제를 처리하고 24시간 후 세포로부터 전단백질을 분리하였다. 단백질의 분리는 먼저 세포를 차가운 PBS로 세척시키고, 1 ml(100 mM plate)의 세포용해 용액(1x PBS, 1% Triton X-100, 0.05% deoxycholate, 0.01% SDS)을 첨가하여 15분간 얼음에서 방치 후 원심분리(13,000 rpm)하여 분해되지 않는 단백질 등을 제거시켜 분리하였다. 단백질의 농도는 BSA (bovine serum albumin)을 표준화하여 Bio-Rad (Hercules, California, USA)의 단백질 정량 키트를 이용하였다. 세포내 proteasome

활성은 peptide 기질로부터 유리되는 aminomethylcoumarin의 유리정도로 비교하여 측정하였다. 기질로는 Ys peptide (Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-Amido-4-methyl-coumarin, Bachem Co.)를 사용하였으며, 이를 100 mM 농도로 DMSO에 녹여 사용하였다. 2 ml의 기질원충액(20 mM HEPES, 0.5 mM EDTA, 0.035% SDS, pH 8.0)에 2 ml의 Ys peptide를 넣고, 5 ml의 세포 단백질을 넣은 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 100 ml 10% SDS를 첨가하여 정지시키고, flurospectrophotometer (Excitation: 380 nm, Emission: 440 nm)로 측정하였다.

Western hybridization

세포를 2-3회 차가운 PBS로 세척후 100 mm 배양용기에 1 ml의 PBS-TDS(PBS, 1% Triton X-100, 0.05% sodium deoxycholate, 0.01% SDS, 0.5 mg/ml leupeptin, 1 mM EDTA, 1 mg/ml pepstatin, 0.2 mM PMSF) 용액을 첨가, 15분간 얼음 위에서 방치 후 12,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였으며, 단백질 농도는 BSA를 표준화하여 Bio-Rad 단백질 정량 키트를 사용하였다.

위의 방법으로 분리한 15 µg의 lysate를 7.5% SDS-PAGE (poly acrylamide gel electrophoresis)로 변성 분리하였고, 이를 nitrocellulose membrane (Hybond-C Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)에 60 V로 2시간동안 전기적으로 이동하였다. Membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 PBS-T (TBS, 0.1% Tween 20)용액으로 상온에서 1시간동안 실시하였다. p53(sc-6234, Santa Cruz, CA, USA), phospho-p53(#9284, Cell Signaling, Bervely, MA, USA), bax (sc-493, Santa Cruz), bak (#3814, Cell Signaling)의 단백질의 발현을 측정하기 위한 1차 항체를 1 : 1,000으로 TBS 용액에 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후 TBS로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 horse radish peroxidase (HRP)가 결합된 anti-mouse IgG 혹은 anti-rabbit

IgG (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)를 1 : 5,000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응하였다. TBS로 3회 세정 후 ECL 기질(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)과 30-60초간 반응 후 X-Ray 필름에 감광시켰다.

실험결과

Lactacystin과 Etoposide의 병합에 의한 세포 생존력의 저하

Lactacystin이 KB 세포의 생존에 미치는 영향을 검토하였다. Lactacystin을 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M의 3가지 농도로 처리하여 3일간의 세포성장을 처리하지 않는 대조세포와 비교하였다. 저 농도인 10^{-7} M의 처리 세포는 1일과 2일째에 성장의 억제가 거의 나타나지 않았으며, 3일째에 약 20% 정도의 억제 효과가 있었다. 고 농도인 10^{-5} M에서는 처리 1일째부터 성장이 억제되었으며, 배양 3일째에는 50% 이상의 세포가 성장이 억제되었다(Fig. 1A).

DNA 복제에 관여하는 효소인 topoisomerase II의 저해제인 항암제 etoposide에 의한 KB cell의 생존력을 위와 동일하게 실험하였다. Etoposide 처리는 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M의 3가지 농도로 3일간의 세포성장을 처리하지 않는 대조세포와 비교하였다. 저 농도인 10^{-7} M의 처리 세포는 성장의 억제가 3일째에 20% 정도로 낮게 나타났으며, 반면 10^{-5} M의 농도에서는 1일째에 50% 이상의 세포가 성장이 억제되었으며, 대부분의 세포가 3일째에 생존하는 세포가 없었다(Fig. 2B).

서로 다른 약리 기전을 나타내는 lactacystin과 etoposide의 병합이 미치는 세포 생존력을 검토하였다. 배양 3일째에 15% 정도의 생존력을 저하시키는 10^{-6} M의 lactacystin과 거의 같은 수준으로 배양 3일째에 20% 정도의 생존력을 저하시키는 10^{-7} M의 etoposide를 동시에 세포에 처리한 결

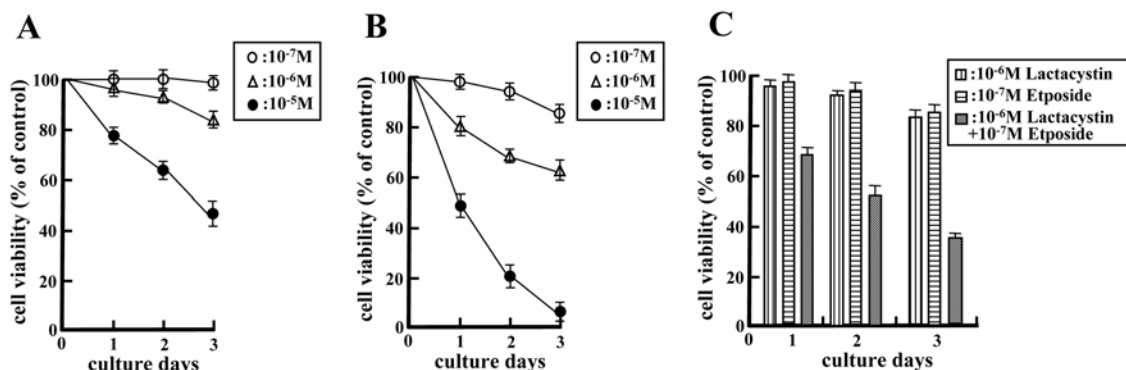


Fig. 1. Growth inhibition of KB cells treated with lactacystin (A), etoposide (B), and combination with lactacystin and etoposide (C). 1×10^5 number of cells were treated with indicated chemicals for 3 days. Proliferation was determined by MTT assay and data are presented as the means \pm SD of three independent experiments.

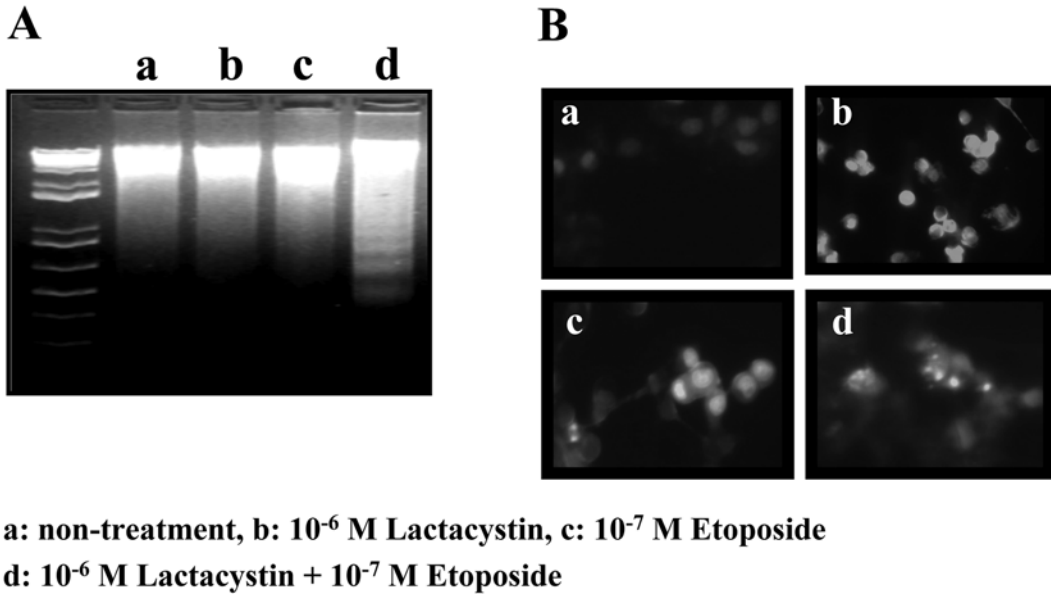


Fig. 2. Effect of combination with lactacystin and etoposide on apoptosis of KB cells. Cells were treated with indicated chemicals for 3 days and DNA were extracted and analyzed by electrophoresis in 1.5% agarose gel (A). Condensed nucleus were analyzed by Hoechst staining (B).

과 훨씬 높은 수준의 생존력의 저하가 나타났다(Fig. 1C). 두 약제를 홀로 처리한 결과 거의 생존력에 영향을 미치지 않던 배양 1일째에도 병합 처리에는 20% 이상의 생존력을 저하시켰으며, 배양 3일째에는 60% 이상의 세포가 생존력이 저하되었다.

Lactacystin과 Etoposide의 병합에 의한 apoptosis 유도

Lactacystin과 etoposide의 병합처리에 의한 세포 생존력의 저하는 DNA 단편화가 유도되는 전형적인 apoptosis로 나타났다(Fig. 2A). 10^{-6} M lactacystin과 10^{-7} M etoposide의 단독처리는 DNA 단편화가 나타나지 않았지만, 두 약제의 병합처리는 DNA 단편화가 나타났다.

Apoptosis의 유도시에 나타나는 핵의 응축을 DNA 단편화와 동일한 조건의 실험으로 검토하였다. 두 약제를 각각 처리한 세포에서는 핵의 응축 현상이 거의 나타나지 않았지만, 두 약제를 동시에 처리한 세포는 대부분의 세포가 핵의 응축이 나타났다(Fig. 2B).

Lactacystin과 Etoposide의 병합에 의한 proteasome의 활성 저하

약제의 처리에 의한 생존력의 저하 및 apoptosis의 유도를 proteasome의 활성과 연계하여 검토하였다. 대조세포로 약제를 처리하지 않은 세포의 proteasome의 활성을 기준으로 하여 두 약제의 단독과 병합 후 peptide로부터 유리되는 aminomethylcoumarin을 정량하여 활성을 비교하였다. Proteasome의 활성저해제인 lactacystin의 처리세포는 농도 의존적으로 뚜렷하게 활성이 감소하였다(Fig. 3). 저농도 수준인 10^{-7} M에서는 약 10% 활성이 감소하였지만,

10^{-5} M에서는 55% 이상의 활성이 감소하였다. 반면 etoposide는 proteasome의 활성에는 전혀 영향을 미치지 않았다(Fig. 3).

Lactacystin의 10^{-6} M과 etoposide를 10^{-7} M에서 10^{-5} M까지 동시에 투여한 결과 proteasome의 활성은 단독에 비교하여 2배에서 8배 이상 감소하였다(Fig. 3). 10^{-6} M lactacystin을 단독처리하면 20% 정도의 proteasome의 활성저하가 나타났지만, 저 농도인 etoposide의 10^{-7} M에서 50% 전후의 proteasome의 활성이 감소하였으며, etoposide의 10^{-5} M에서는 10% 이하의 proteasome의 활성만이 존재하였다. 이러한 활성의 감소는 etoposide의 농도에 비례하여 나타났다.

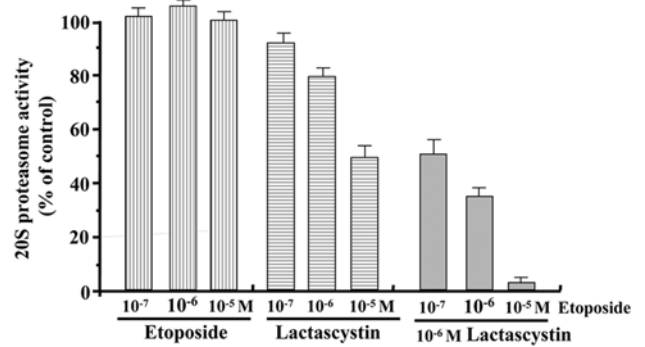


Fig. 3. Effect of combination with lactacystin and etoposide on proteasome activity of KB cells. 1×10^5 number of cells were treated with indicated chemicals for 1 days. Proteasome activity was determined with fluorescent tagged peptide substrate (Ys substrate) and data are presented as the means \pm SD of three independent experiments.

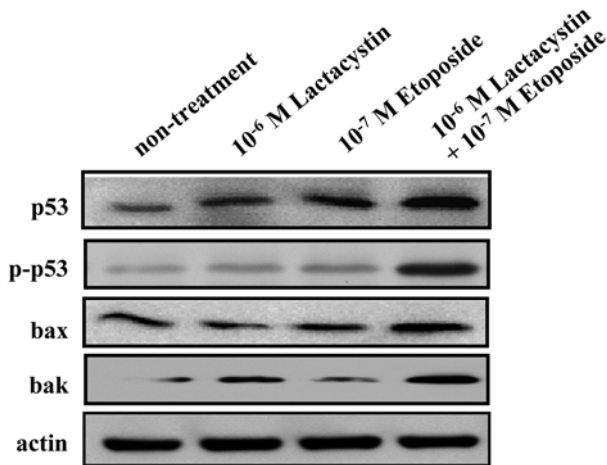


Fig. 4. Effect of combination with lactacystin and etoposide on tumor suppressor proteins of KB cells. Cells were treated with indicated chemicals for 2 days and Protein was analyzed by Western hybridization with each specific antibody.

Proteasome의 활성 저하와 암억제 유전자의 세포내 축적

Lactacystin을 비롯한 proteasome의 저해제가 나타내는 암억제 유전자들의 세포내 축적을 검토하였다. Lactacystin의 10^{-6} M을 처리한 결과 2일째에 p53, bax, bak 모두가 축적되었다(Fig. 4). 반면 etoposide를 10^{-7} M으로 투여한 결과 p53은 축적되지만, 그밖에 인산화 p53을 비롯하여 bax나 bak의 증가는 크게 나타나지 않았다. 두 약제를 동시에 투여한 결과 p53, 인산화 형의 p53, bax, bak의 세포내 축적이 lactacystin 단독에 비교하여 월등히 높게 나타났다.

고찰

구강암의 치료는 언어장애나 치아의 상실을 고려하여 선택된다. 따라서 약물치료 방법이 구강암은 물론 다른 암 치료에 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 면역요법과 더불어 향후 암정복에 크게 기여할 것으로 예견된다. 구강암의 항암화학요법은 수술이나 방사선치료 전에 약물치료를 시행하는 유도화학요법이 일반적이다(Licitra 등, 2003). 많은 임상에 적용되고 있으며 약리적 기능으로 DNA 저해와 DNA 복제에 관여하는 효소 topoisomerase II의 활성화에 영향을 미치는 항암제로 etoposide(VP-16)가 있다(Adachi 등, 2003). Etoposide는 주로 세포주기상의 합성기의 진행을 억제시켜 세포사멸을 유도시키게 되며, proteasome의 저해제는 p53을 비롯하여 CDKI의 세포내 축적을 통한 세포주기 G1의 진행을 억제시킨다. 이상의 두 상이한 기전에 의한 항암활성의 유도는 기대되며, 아직 밝혀져 있지 않은 암세포의 apoptosis 유도기전의 분자적 이해가 필요로 하다.

고등동물은 2가지의 단백질의 분해체계를 갖고 있다. 분

해체계의 하나는 lysosome으로 스트레스 등으로 인한 자극으로 형성된 세포내 단백질의 분해와 세포막 등의 단백질의 분해를 담당한다. 다른 하나는 ubiquitin proteasome pathway (UPP)로 외부적인 자극 혹은 비 자극에도 고도의 선택적인 체계를 통한 세포내 단백질의 분해를 조절한다. UPP는 세포의 핵과 세포질에 존재하면서 세포주기, 세포분화, 신호전달과정, 외부적 자극에 대한 반응, apoptosis 등을 조절하는 특징을 갖고 있다(Ciechanover, 1994). UPP의 다양한 세포의 조절기전은 암의 치료에 적용되어 proteasome 저해제의 하나인 PS-341이 혈액암 및 고형암에 임상연구가 진행되고 있다(Aghajanian 등, 2002). lactacystin (PS-341)이 혈액암을 비롯하여 대장암과 피부암에 적용 가능성이 있으며, 또한 비교적 기타의 항암제에 비교하여 낮은 독성을 갖고 있지만 여전히 독성 등의 문제점은 해결과제로 있다. 이러한 문제점의 해결과 항암제의 특성을 고려하여 lactacystin에 있어서도 기존의 항암제와 병행이 고려되고 있다(Cusack 등, 2001). 따라서, 본 연구에서는 lactacystin의 구강암에 적용여부와 다른 기전을 갖는 etoposide의 병행이 나타내는 특성을 조사하였다.

Lactacystin은 actinomycetes로부터 분리 정제된 proteasome 활성저해제이며, 초기에는 neuroblastoma 세포의 분화를 유도시키는 약물로 정제되었다(Omura 등, 1991). 이후 lactacystin은 여러 세포의 성장을 억제시키고 proteasome에 특이적인 약물로 증명되었다. 실험에 사용한 KB cell은 구강암의 다양한 연구에 이용된다. Lactacystin은 KB cell의 세포성장을 억제시켰으며, 세포독성을 나타내는 50% 정도의 수준은 10^{-5} M로 나타났다(Fig. 1A). 10^{-7} M의 lactacystin의 농도에서는 거의 세포 독성이 나타나지 않아 생존력에 영향을 미치지 않았으며, 농도에 의존적으로 생존력에 영향을 미치고 있음을 알 수 있었다. Lactacystin이 나타내는 세포성장의 억제와 생존세포수의 감소는 다른 항암제에 비교하여 낮은 수준으로 나타났으며, 이는 Fig. 1B 결과에 나타나는 Etoposide와의 비교에서도 알 수 있었다. Lactacystin에 의한 생존력의 저하는 apoptosis로 유도되었으며, etoposide와 병합에 의한 apoptosis의 유도 효과는 높게 나타났다(Fig. 2). 10^{-6} M의 lactacystin과 10^{-7} M의 etoposide의 병합처리는 각각의 단독처리에 비교하여 높은 DNA 단편화와 생존력에도 3배 이상의 저하를 유도하여 상호 보완적으로 상승효과가 뚜렷하게 나타났다. 이러한 결과는 proteasome의 저해제의 하나인 peptide MG-132를 etoposide나 doxorubicin과 혼합하면 혈액암세포에서의 세포독성이 높게 나타나는 것과 동일한 결과로 이해된다(Banerjee 등, 2001).

Lactacystin에 의한 20S proteasome 활성의 억제는 처리 후 세포내의 존재하는 활성을 측정하였다. 처리하지 않은 세포를 대조군으로 활성을 비교한 결과 lactacystin은 KB 세포의 proteasome의 활성을 농도 의존적으로 저해시켰다(Fig. 3). 이는 lactacystin이 주로 연구된 혈액암을 비롯

하여 구강암 세포의 proteasome 활성화에도 영향을 미치고 있음을 의미한다. Etoposide는 proteasome의 활성화에는 전혀 영향을 미치지 않았지만 lactacystin과 동시에 투여한 세포에서는 활성이 3배 이상 억제되었다(Fig. 3). 이로써 두 약제의 동시 투여가 세포의 성장의 억제, apoptosis의 유도 그리고 proteasome의 활성화 억제에서 모두 동일한 결과가 유도됨을 알 수 있었다. 두 약제의 동시 투여에 의한 proteasome의 활성의 억제는 궁극적으로 세포의 성장의 억제와 apoptosis를 유도시키는 것으로 이해된다. 두 약제의 동시 투여가 나타내는 상승적 효과는 이해가 되지 않지만, 정확한 기전은 밝혀져 있지 않다. 특히 Fig. 4에서 두 약제에 의한 p53의 축적과 p53의 인산화의 유도는 병합의 효과가 극대화되는 분자로 생각된다. Lactacystin과 etoposide의 단독처리는 p53의 분해가 억제되어 세포 내 존재하는 단백질의 양이 증가되지만, 인산화 p53의 증가는 없었다. 반면 두 약제의 동시 투여에서만 높은 인산화의 유도가 나타났다. p53의 인산화는 세포내의 ubiquitin-proteasome의 분해가 회피되며, 동시에 하부의 apoptosis 분자의 전사를 유도하는 기능으로 알려져 있다 (Samuels-Lev 등, 2001). p53의 인산화를 통한 apoptosis의 유도인자로는 bak와 bax가 있다. 따라서, Fig. 4에 나타난 bax와 bak의 증가가 뚜렷한 경우는 두 약제의 동시 처리 경우 나타나므로, 이는 proteasome의 활성억제 의한 두 분자의 증가와 p53의 인산화에 의한 전사의 활성으로 인한 두 분자의 증가로 이해된다. 두 약제의 처리에 나타나는 apoptosis의 유도와 proteasome의 억제에 있어서 가장 중요한 요소는 결과적으로 p53의 인산화가 작용하는 것으로 생각된다.

이상의 연구에서 단독의 proteasome 저해제의 처리보다는 기존의 항암제인 etoposide와의 병합은 구강암의 효과적인 apoptosis의 유도가 가능하였다. 이는 proteasome의 저해제가 구강암에 적용의 가능성을 시사하며 동시에 기존 항암약물과 이상적인 병합이 중요함을 나타내며, 치료적 기능성과 효과의 상승을 위한 새로운 접근으로 이해된다.

감사의 글

이 논문은 전북대학교의 2004년 신임교수 연구지원을 받아 수행된 연구임.

참고 문헌

Adachi, N., Suzuki, H., Iizumi, S., Koyama, H.: Hypersensitivity of nonhomologous DNA end-joining mutants to VP-16 and ICRF-193: implications for the repair of topoisomerase II-mediated DNA damage. *J Biol Chem.* **278**:35897-35902, 2003.

Adams, J., Palombella, V.J., Sausville, E.A., Johnson, J., Destree, A., Lazarus, D.D., Maas, J., Pien, C.S., Prakash, S., Elliott, P. J.: Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res.* **59**:2615-2622, 1999.

Adams, J.: The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treatment Rev.* **29**:3-9, 2003.

Aghajanian, C., Soignet, S., Dizon, D.S., Pien, C.S., Adams, J., Elliott, P.J., Sabbatini, P., Miller, V., Hensley, M.L., Pezzulli, S., Canales, C., Daud, A., Spriggs, D.R.: A phase I trial of the novel proteasome inhibitor PS341 in advanced solid tumor malignancies. *Clin Cancer Res.* **8**:2505-2511, 2002.

An, W. G., Hwang, S.G., Trepel, J.B., Blagosklonny, M.V.: Protease inhibitor-induced apoptosis: accumulation of wt p53, p21WAF1/CIP1, and induction of apoptosis are independent markers of proteasome inhibition. *Leukemia.* **14**: 1276-1283, 2000.

Banerjee, D., Liefshitz, A.: Potential of the proteasomal inhibitor MG-132 as an anticancer agent, alone and in combination. *Anticancer Res.* **21**:3941-3947, 2001.

Bross, P.F., Kane, R., Farrell, A.T., Abraham, S., Benson, K., Brower, M.E., Bradley, S., Gobburu, J.V., Goheer, A., Lee, S.L., Leighton, J., Liang, C.Y., Lostritto, R.T., McGuinn, W.D., Morse, D.E., Rahman, A., Rosario, L.A., Verbois, S.L., Williams, G., Wang, Y.C., Pazdur, R.: Approval summary for bortezomib for injection in the treatment of multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* **10**:3954-3964, 2004.

Ciechanover, A.: The ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* **79**:13-21, 1994.

Cusack, J. C. Jr., Liu, R., Houston, M., Abendroth, K., Elliott, P. J., Adams, J., Baldwin, A. S. Jr.: Enhanced chemosensitivity to CPT-11 with proteasome inhibitor PS-341: implications for systemic nuclear factor-kappaB inhibition. *Cancer Res.* **61**:3535-3540, 2001.

Frankel, A., Man, S., Elliott, P., Adams, J., Kerbel, R.S.: Lack of multicellular drug resistance observed in human ovarian and prostate carcinoma treated with the proteasome inhibitor PS-341. *Clin Cancer Res.* **6**:3719-3728, 2000.

Hideshima, T., Richardson, P., Chauhan, D., Palombella, V.J., Elliott, P.J., Adams, J., Anderson, K.C.: The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res.* **61**:3071-3076, 2001.

Jeremias, I., Kupatt, C., Baumann, B., Herr, I., Wirth, T., Debatin, K.M.: Inhibition of nuclear factor kappaB activation attenuates apoptosis resistance in lymphoid cells. *Blood.* **91**:4624-4631, 1998.

LeBlanc, R., Catley, L.P., Hideshima, T., Lentzsch, S., Mitsiades, C.S., Mitsiades, N., Neubergh, D., Goloubeva, O., Pien, C.S., Adams, J., Gupta, D., Richardson, P.G., Munshi, N.C., Anderson, K.C.: Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth in vivo and prolongs survival in a murine model. *Cancer Res.* **62**:4996-5000, 2002.

Licitra, L., Grandi, C., Prott, F.J., Schornagel, J.H., Bruzzi, P., Molinari, R.: Major and minor salivary glands tumours. *Crit Rev Oncol Hematol.* **45**:215-225, 2003.

Lonial, S., Waller, E. K., Richardson, P. G., Jagannath, S., Orlowski, R. Z., Giver, C. R., Jaye, D. L., Francis, D., Giusti, S., Torre, C., Barlogie, B., Berenson, J. R., Singhal, S., Schenkein, D. P.,

- Esseltine, D.L., Anderson, J., Xiao, H., Heffner, L.T., Anderson, K. C.: Risk factors and kinetics of thrombocytopenia associated with bortezomib for relapsed, refractory multiple myeloma. *Blood*. **106**:3777-3784, 2005.
- Omura, S., Matsuzakim K., Fujimoto, T., Kosuge, K., Furuya, T., Fujita, S., Nakagawa, A.: Structure of lactacystin, a new microbial metabolite which induces differentiation of neuroblastoma cells. *J Antibiot*. **44**:117-118, 1991.
- Pickart, C.M.: Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*. **70**:503-533, 2001.
- Roccaro, A. M., Hideshima, T., Raje, N., Kumar, S., Ishitsuka, K., Yasui, H., Shiraishi, N., Ribatti, D., Nico, B., Vacca, A., Dammacco, F., Richardson, P.G., Anderson, K.C.: Bortezomib mediates antiangiogenesis in multiple myeloma via direct and indirect effects on endothelial cells. *Cancer Res*. **66**:184-191, 2006.
- Samuels-Lev, Y., O'Connor, D.J., Bergamaschi, D., Trigiante, G., Hsieh, J.K., Zhong, S., Campargue, I., Naumovski, L., Crook, T., Lu, X.: ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol Cell*. **8**:781-794, 2001.
- Shah, S.A., Potter, M.W., McDade, T.P., Ricciardi, R., Perugini, R. A., Elliott, P. J., Adams, J., Callery, M. P.: 26S proteasome inhibition induces apoptosis and limits growth of human pancreatic cancer. *J Cell Biochem*. **82**:110-122, 2001.
- Sun, Y.: Targeting E3 ubiquitin ligases for cancer therapy. *Cancer Biol Ther*. **2**:623-629, 2003.
- Van de Loosdrecht, A. A., Nennie, E., Ossenkoppele, G. J., Beelen, R. H. J., Lngenhuijsen, M. M. A. C.: Cell mediated cytotoxicity against U937 cells by human monocytes and macrophages in modified colorimetric MTT assay. *J Immunol Methods*. **141**:15-22, 1991.
- Wojcik, C.: Proteasomes in apoptosis: Villains or guardians? *Cell Mol Life Sci*. **56**:908-917, 1999.