

Effects of Amifostine on Apoptosis, Cell Cycle and Cytoprotection of Human Colon Cancer Cell Lines

Eun Ju Lee^{†,*}

Department of Clinical Laboratory Science, Daejeon Health Institute of Technology, Daejeon 34504, Korea

Amifostine was developed to protect cells, but it is known to induce cytotoxicity and apoptosis, and the exact mechanism is unknown. In this study, we investigated how the DNA mismatch repair (MMR) system interacts with p53 to prevent apoptosis, cell cycle arrest, and cytoprotective effects induced by amifostine. HCT116 colon cancer cells sublines HCT116/p53+, HCT116/p53-, HCT116/E6 and HCT116+ch3/E6 cells were used for evaluation. Amifostine induced G1 arrest and increased toxicity two-fold in p53- cells regardless of MMR expression. Both G1 cell cycle arrest and induction of p53 protein peaked at 24 h after the start of amifostine exposure. Both G1 cell cycle arrest and induction of p53 protein peaked at 24 h after the start of amifostine exposure. Amifostine induced the expression of p21 protein in both p53+ and p53- cells. As for apoptosis, compared to p53- cells, p53+ cells showed 3.5~4.2 times resistance to amifostine-induced apoptosis. HCT116+E6 with both p53 and MMR loss showed maximum apoptosis at 48 h, and HCT116+ch3/E6 with p53 loss showed maximum apoptosis at 24 h. As a result, it was confirmed through *in vitro* experiments that amifostine-induced G1 cell cycle arrest and apoptosis are mediated through a pathway dependent on MMR and p53 protein.

Key Words: Amifostine, MMR, p53, p21, Cell cycle, Apoptosis, G1 cell cycle arrest

서 론

유전성 비용종성 결장암(hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC)과 다양한 종류의 암에서 DNA mismatch repair(불일치 복구, MMR) 결함이 원인으로 밝혀졌다(Fink et al., 1998; Fishel and Kolodner, 1995; Jin et al., 2017; Salem et al., 2020). MMR은 DNA 중합효소에 의해 잘못 짝지어진 뉴클레오티드와 복제 또는 재조합 동안 반복되는 염기서열의 slippage에 의한 불일치를 보정한다(Fishel and Kolodner, 1995; Sunitha and Mats, 2003). MMR 시스템의 결함은 돌연변이 발생률을 급격히 증가시켜 발암과정을 촉

진시키고(Sunitha and Mats, 2003; Jin et al., 2017; Salem et al., 2020), hMLH1과 hMSH2의 생식 세포 돌연변이는 전체 HNPCC 환자의 약 절반을 차지한다(Fishel and Kolodner, 1995; Salem et al., 2020)고 알려져 있다. DNA 불일치 복구(MMR) 단백질은 DNA 중합효소 오류로 인한 불일치 보정 외에도 유사분열과 감수분열 재조합(Fishel and Kolodner, 1995; Sunitha and Mats, 2003) 및 전사 결함 복구의 조절에 참여하는 것으로 알려져 있다(Hickman and Samson, 1999; Lin et al., 2001; Chakraborty et al., 2016). DNA 불일치를 수정하지 못하면 돌연변이 비율이 증가하며, MSH2 또는 MLH1의 돌연변이로 인한 MMR 손실은 대부분의 유전성 비용종성 결장암의 원인이 되며(Fishel et al., 1993;

Received: September 25, 2023 / Revised: November 8, 2023 / Accepted: November 9, 2023

*Professor.

[†]Corresponding author: Eun Ju Lee. Department of Clinical Laboratory Science, Daejeon Health Institute of Technology, 21 Chungjeong St., Dong-Gu, Daejeon 34504, Korea.

Tel: +82-42-670-9163, Fax: +82-42-670-9160, e-mail: e16lee@hit.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Papadopoulos et al., 1994; Salem et al., 2020) 자궁내막암, 난소암, 유방암, 진립선암, 폐암 및 췌장암 등의 원인이 되기도 한다(Fishel and Kolodner, 1995; Munakata et al., 2023). 돌연변이 비율을 증가시키는 것 외에도, MMR의 손실은 항암약물 내성을 증가시킨다. 환자에게 사용하는 항암 농도에서, 항암제는 세포사멸을 유발한다. 세포사멸을 촉진하려면 세포가 DNA 손상의 존재를 인식할 수 있어야 하나, MMR의 손실로 인해 감지 능력이 손상되거나 복구 시도가 부족하여 세포사멸 촉진 신호가 감소하게 된다(Kat et al., 1995; Jiang et al., 2021). p53의 경우 세포 DNA에 손상이 발생하였을 때 손상이 다 수선되기 전에 세포분열이 진행되지 못하도록 하며 수선이 어려울 경우 세포가 스스로 사멸하도록 한다. p53 기능이 결여된 세포는 유전적으로 불안정하고 총체적인 유전자 변경에 취약하게 된다(Jiang et al., 2021). p53 기능 장애는 p53 녹아웃 마우스(knockout mice)에서 증가된 종양 형성과 관련이 있으며(Carder et al., 1993), p53은 인간 암의 매우 많은 부분에서 돌연변이 된다(Bhattacharyya et al., 1994; Fink et al., 1998; Hollstein et al., 1991; Jiang et al., 2021)고 알려져 있다.

WR-2721로 명명된 amifostine은 1950년대 월터 리드 육군 연구소에서 핵 방사선으로부터 군인을 보호하기 위해 합성되었다(Shaw et al., 1988; Capizzi and Oster, 2000). 전구약물인 amifostine과 활성 대사산물인 WR-1065는 악성 조직과 비악성 조직에 차등적인 영향을 미치는 것으로 보고되었다(Capizzi, 1999; Taylor et al., 1997). 예를 들어, amifostine은 이온화 방사선 및 화학요법제의 독성 효과로부터 정상 조직을 보호하지만, 종양에는 효과가 없거나 항종양 효과를 향상시킨다. Amifostine이 정상 세포를 보호하는 메커니즘은 잘 알려져 있지 않고, amifostine에 의한 정상 조직의 선택적 보호는 p53 의존성 경로의 활성화와 관련이 있으며, amifostine은 p53 단백질에 결합하고 하향 유전자의 전사활성화를 향상시키는 것으로 보고되었다(Falcicchio et al., 2020; Lee et al., 2003).

본 연구에서는 amifostine에 의해 유발된 세포사멸 및 세포 주기 진행에 대한 p53 단백질 및 p21 단백질의 역할을 조사하기 위해 MMR+, MMR-, p53+ 및 p53- 세포에서 amifostine이 p53 단백질 및 p21 단백질의 발현에 미치는 영향을 알아보고자 한다.

재료 및 방법

Cell lines

결장암 세포주인 HCT116 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, CCL 247)에서 구매하여 사용하였다. HCT116/p53- 세포주는 표적 상동 재조합(homologous recombination)에 의해 두 p53 대립 유전자가 모두 결실된 세포이다(Boyer et al., 1995). HCT116+ch3으로 명명된 세포주는 3번 염색체가 보완된 세포로 DNA 불일치 복구 능력이 있는 세포이다(Koi et al., 1994). HCT116/E6와 HCT116+ch3/E6 세포주는 유비퀴틴 의존 경로를 통해 p53 단백질의 분해를 자극하는 높은 수준의 인간 유두종 바이러스 유형-16 E6 단백질을 발현하는 세포주이다(Davis et al., 1998; Bunz et al., 1999). 모든 세포주는 100 mM L-글루타민 및 10% 열 불활성화 태아 소 혈청(FBS, Fetal Bovine Serum)이 보충된 Iscove의 변형된 돌베코 배지(DMEM, Dulbecco Modified Eagle Medium, Irvine Scientific, Irvine, CA, USA)에서 유지되었다. 염색체 보완 라인인 400 µg/mL-1 제네티신(geneticin, GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA)이 보충된 배지에서 성장시켰다. HCT116/p53+ 및 HCT116/p53- 세포는 100 mM L-글루타민 및 10% 열 불활성화 태아 소 혈청이 보충된 McCoy's 배지(Irvine Scientific, Irvine, CA, USA)에 넣어 37°C의 온도를 유지하면서 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포는 70~80% 자라면 분주하여 계대 배양한 세포를 실험에 이용하였다. 모든 세포주는 UCSD Cancer Center의 Dr Howell로부터 얻어 사용하였다.

Reagents

Amifostine은 US Bioscience Corporation에서 구입했다. 50 mg/mL의 원액을 0.9% NaCl에 용해하고 4°C에 보관하였다.

Clonogenic assay

콜로니 형성을 보기 위하여, 다양한 농도의 amifostine을 24시간 동안 처리한 후 세포를 PBS로 세척하였다. 새로운 배지를 첨가한 후 37°C의 온도를 유지하면서 5% CO₂ 배양기에서 10~14일 동안 배양한 후 세포를 PBS로 세척하고 메탄올로 고정하여 0.1% Crystal Violet으로 염색하였다. 50개 이상의 세포가 모인 세포 클러스터는 콜로니로 점수를 매겼다. 실험은 각 약물 농도에 대해 최소

3회 이상 수행되었다. IC50 값은 대수 선형 보간법(log-linear interpolation)을 사용하여 계산하였다.

세포주기 측정(cell cycle analysis)

Amifostine을 24시간 동안 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 세포에 처리한 후, amifostine 처리 시작 후 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6일째에 세포를 채취하여 빙냉 PBS로 2회 세척하고, 빙냉 100% 에탄올에 고정하였다. 10^6 개 세포를 계수하여 원심분리하고, 차가운 PBS 500 μ L에 재현탁하여 0.1 mg/mL RNAse A (Sigma Chemical Co.)로 37°C에서 30분 동안 처리하였다. 50 mg/mL 농도의 Propidium iodide (Molecular Probes, Eugene, OR)를 세포 현탁액에 첨가했다. 얼음 위에서 30분 동안 보관한 후, FACScan 유세포 분석기(Becton-Dickinson, San Jose, CA)를 사용하여 세포를 분석했다. Multicycle AV Cell Cycle 소프트웨어(Phoenix Flow Systems, San Diego, CA)를 사용하여 세포 주기의 각 단계에서 세포 비율을 계산했다(Lee et al., 2003).

세포사멸 측정(apoptosis analysis)

Amifostine 처리 시작 후 24시간, 48시간, 72시간에 부유 세포와 부착된 세포를 채취하여 원심분리하고 PBS 100 μ L에 재현탁하고 acridine orange와 ethidium bromide 로 염색하였다. 그 후, 세포는 형광 현미경에 의해 세포사멸 형태에 대해 평가되었다. 세포는 형태학적 기준(McGahon et al., 1995)에 따라 세포사멸로 점수를 매겼다.

Western blot analysis

다양한 농도의 amifostine을 처리한 후 다양한 시점에서 0.15 M NaCl, 5 mM EDTA 1%, Triton X-100, 10 mM TRIS (pH 7.4), 5 mM DTT, 0.1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride 및 5 mM epsilon-aminocaproic acid를 함유하는 완충액에서 단백질을 추출하였다. 단백질은 7.5% 및 15% 폴리아크릴아미드 겔(Precast Acrylamide Gels, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 전기영동으로 정량 및 분획화 하였다. 단백질을 polyvinylidene difluoride 막(Immobilon, Millipore, Bedford, MA, USA)으로 옮겼다. 막을 5% 무지방 우유, 0.05% Tween으로 1시간 동안 차단하고 0.05% Tween으로 세척한 다음 4°C에서 밤새 1차 항체에 노출시켰다. 마우스 단일 클론 anti-p21 (sc-817) 및 anti-p53 (sc-126) 항체는 미국 캘리포니아주 산타크루즈의 Santa Cruz Biotechnology 에서 구입했다. 1차 항체는 5~10% 무지방 우유에 1:400 으로 희석하였다. 세척 후, 1:3,000의 희석 비율로 horse-

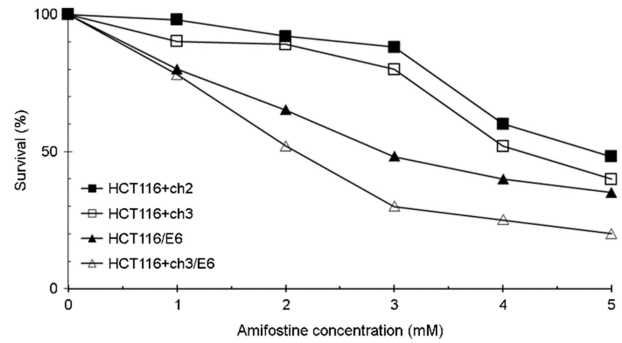


Fig. 1. Effect of p53 and MMR on amifostine sensitivity. HCT116 cells were exposed for 24 h, and dose-response curves were generated by clonogenic assay. Each data point represents the mean of at least 3 independent experiments performed with triplicate culture.

radish peroxidase-conjugated anti-mouse antibodies (Amersham Life Science, Inc., Arlington Heights, IL, USA)에 노출시키고, 복합체를 화학발광으로 가시화하였다.

통계처리

모든 실험들은 3회씩 반복 진행하였으며, 이에 대한 결과는 평균 \pm 표준오차(mean \pm sd)로 계산하였다. Amifostine 미처리군(대조군)과 amifostine 처리군 간의 차이에 따른 유의성은 two sided *t*-test 방법을 이용하였다. 각 분석의 통계적 유의수준은 95% 신뢰수준(유의도 0.05, $P < 0.05$)로 검증하였다.

결 과

Amifostine의 독성에 대한 p53과 MMR의 효과

Amifostine에 대한 HCT116 결장암 세포의 민감도에 대한 p53, MM의 영향을 결정하기 위해 clonogenic assay를 사용했다(Fig. 1). 세포를 부착시킨 후, 다양한 농도의 amifostine에 24시간 동안 노출시키고, 10~14일 후에 콜로니 수를 평가하였다. HCT116 세포에서 p53 유전자의 결실은 IC50 값의 비율로 정량화(Table 1)한 바와 같이 amifostine 민감도를 2.1 \pm 0.2배 증가시켰다(평균 \pm sd, $n=3$, $P < 0.05$ -양면 *t*-검정). 유사하게, E6에 의한 p53 단백질의 분해는 amifostine 민감도를 1.9 \pm 0.2배 증가시켰다(평균 \pm sd, $n=3$, $P < 0.05$, 양측 *t*-검정). 불일치 복구 능력이 있는 HCT116+ch3 세포에서 E6에 의한 p53 단백질의 분해는 amifostine에 대한 민감도를 1.89 \pm 0.2배 증가시켰다(평균 \pm sd, $n=3$, 양면 *t*-테스트에 의한 $P < 0.05$). Amifostine에 대한 HCT116

Table 1. IC50 Values for HCT116 sublines*

Cell lines	Phenotype		Amifostine IC50 (mM)
	MMR	p53	
HCT116+ch2	-	+	4.87±0.5
HCT116+ch3	+	+	4.3±0.3
HCT116/E6	-	-	2.57±0.7
HCT116+ch3/E6	+	-	2.25±0.5

*Each values represents mean ± sd of 3 independent experiments each performed with triplicate cultures for each drug concentraion

Table 2. Magnitude change in amifostine sensitivity expressed as IC50 ratios

Cell lines	Effect of loss p53		Effect of loss MMR	
	In MMR+ cells	In MMR- cells	In p53+ cells	In p53- cells
Fold	1.91	1.89	0.88	0.86
P-value	0.081	0.0012	>0.05	>0.05

을 결장암 세포의 민감도에 대한 p53, MMR 단백질의 영향은 p53 단백질이 상실된 경우 더 크게 영향을 주었다 (Table 2).

Amifostine이 유도한 세포사멸에 대한 p53과 MMR 단백질의 효과

형광 현미경 검사법을 사용하여 세포사멸 세포를 정량화했다(Fig. 2). HCT116/p53+, HCT116/p53-, HCT116/E6 및 HCT116+ch3/E6 세포를 HCT116/p53+ 세포의 IC50에 해당하는 4.8 mM amifostine에 24시간 동안 노출시켰다. apoptotic 세포의 분획은 amifostine에 노출되기 시작한 후 24, 48 그리고 72시간에 측정하였다. HCT116 세포에서 표적 재조합에 의한 p53 유전자의 결실은 amifostine에 노출된 후 24시간에 각각 3.5±1.2배 및 4.2±0.7배로(Table 3) amifostine 유도된 세포사멸을 증가시켰다(평균 ± s.d., n=3, P<0.05, MMR+ 대 MMR- 세포의 비교를 위한 양측 t-검정). 유사하게, E6에 의한 p53 단백질의 분해는 amifostine에 노출되기 시작한 후 24, 48 및 72시간에 각각 2.1±0.2배 및 4.3±0.8배까지 amifostine에 의한 세포사멸을 증가시켰다(평균 ± s.d., n=3, p53+ 대 p53- 세포의 비교를 위한 양면 t-검정에 의한 P<0.05). 불일치 복구 능력이 있는 HCT116+ch3 세포에서 p53 단백질의 E6 매개 분해는 amifostine 유도 세포사멸을 72시간 및 96시간에 각각 4.2

Table 3. Magnitude of change in amifostine-induced apoptosis as a result of p53, MMR, or both functions expressed as apoptosis ratios*

Effect of loss of p53		Effect of loss of MMR	
in MMR+ cells	in MMR- cells	in p53+ cells	in p53- cells
3.5±1.2(a)	4.2±0.7(b)	1.3±0.2(c)	2.1±0.9(d)

*Ratio of the apoptosis value in the functionally deficient to proficient cells determined from acridine orange and ethidium bromide and this value was compared untreated with amifostine treated cells. Each value is mean ± sd.

- (a) P=0.02: comparison between the MMR+/p53- and the MMR+/p53+ cells
- (b) P=0.002: comparison between the MMR-/p53- and MMR-/p53+ cells
- (c) P>0.05: comparison between the MMR-/p53+ and the MMR+/p53+ cells
- (d) P=0.02: comparison between the MMR-/p53- and the MMR+/p53- cells

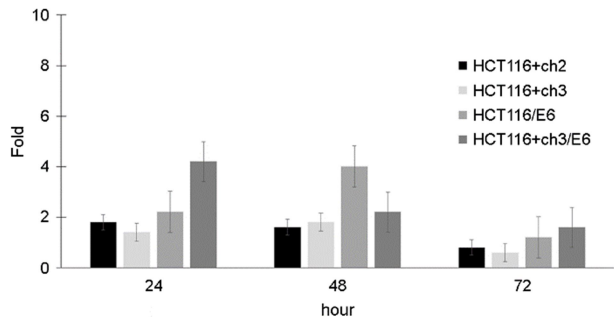


Fig. 2. Effect of p53 and MMR on amifostine-induced apoptosis. HCT 116 sublines were exposed to amifostine for 24 h. The percent of cells in apoptosis was determined by supravital fluorescence microscopy at 24, 48 and 72 h. Data points represent mean ± sd of 3 different experiment each performed with triplicate cultures.

±0.4 및 2.0±0.2로 증가시켰다(평균 ± s.d., n=3, p53+ 대 p53- 세포의 비교를 위한 양면 t-검정에 의한 P<0.05).

Amifostine에 의해 유도된 세포 주기 정지와 p53과 MMR 단백질의 관련성

HCT116/p53+, HCT116/p53-, HCT116/E6 및 HCT116+ch3/E6 세포를 HCT116/p53+ 세포의 IC50에 해당하는 4.8 mM amifostine에 24시간 동안 노출시켰다. p53이 발현되는 HCT116/p53+ 및 HCT116+ch3 세포에서 amifostin을 처리하면 G1 정지가 발생하여 24 h에 최고조에 달했다(Fig. 3). 그러나, p53- 및 MMR 결핍된 HCT116+ch2와 HCT116+ch3/E6 세포에서 amifostine은 G1 정지를 일으키지 못했으

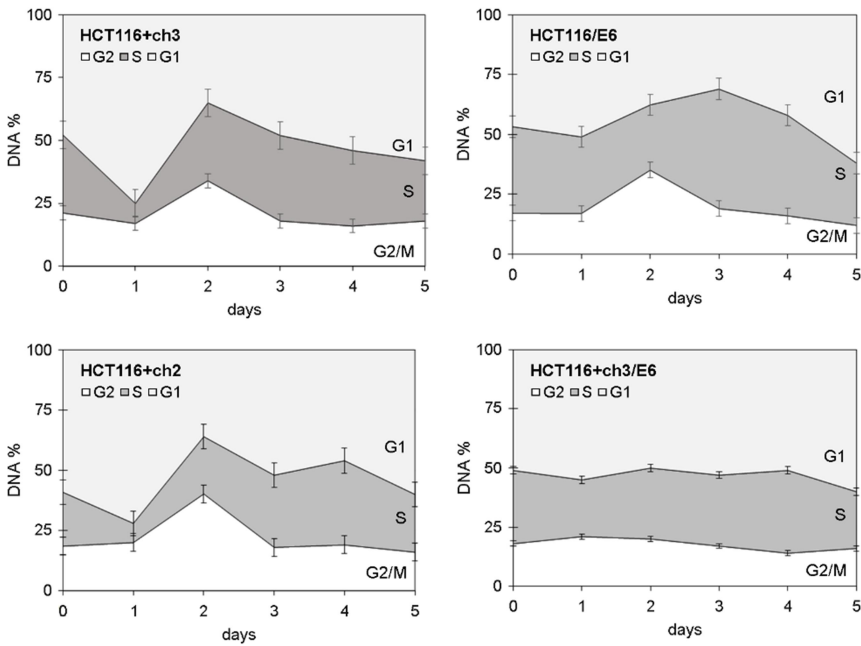


Fig. 3. Effect of p53 and MMR on amifostine-induced cell cycle arrest. HCT116 sublines were exposed to 4.8 mM amifostine for 24 h. Cells were harvested at 1, 2, 3, 4, and 5 days after the beginning of amifostine exposure. The percent of cells in G2/M, S and G1 phase was determined by flowcytometry. Data points represent mean \pm SD of 3 different experiments. d0 mean amifostine untreated cells. D1 mean 24 h after the beginning of amifostine exposure.

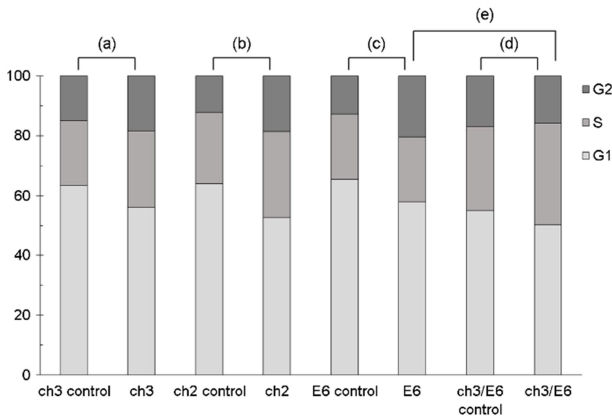


Fig. 4. Effect of p53 and MMR on amifostine-induced G2/M cell cycle arrest. Magnitude of change in a amifostine-induced G2/M arrest as a result of p53, MMR or both functions expressed as the under the curve of fraction of cells. HCT116 sublines were exposed to 4.8 mM amifostine for 24 h. The percent of cells in G2/M phase was determined by flowcytometry. Columns represent mean \pm SD of 3 different experiments. (a) $P=0.0035$: comparison the amifostine untreated MMR+/p53+ and the amifostine treated MMR+/p53+ cells (b) $P=0.0038$: comparison between the amifostine untreated MMR-/p53+ and the amifostine treated MMR-/p53+ cells (c) $P=0.01$: comparison between the amifostine untreated MMR-/p53- and the amifostine treated MMR-/p53- cells (d) $P=0.045$: comparison between the amifostine untreated MMR+/p53- and the amifostine treated MMR+/p53- cells (e) $P=0.008$: The G2/M phase was 2.5 fold larger in amifostine-treated HCT116/E6 cells relative to amifostine-treated HCT116+ch3/E6 cells.

며, 이는 amifostine에 의해 유도된 G1 정지가 p53 단백질에 의존적임을 나타낸다. Amifostine은 또한 p53-와 MMR 결핍된 HCT116+ch3/E6 세포를 제외한 세포 모두에서 발생하는 G2/M 정지를 유발하여 G2/M 정지가 p53과 MMR 단백질과 독립적인 경로를 통해 매개됨을 나타낸다(Fig. 4).

Effect of amifostine on the expression of p53 protein and p21 protein

Amifostine에 의해 유발된 세포사멸 및 세포 주기 진행에 대한 p53 단백질 및 p21 단백질의 역할을 추가로 조사하기 위해 MMR+, MMR-, p53+ 및 p53- 세포에서 amifostine이 p53 단백질 및 p21 단백질의 발현에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 5). HCT116/p53+, HCT116/p53-, HCT116/E6 및 HCT116+ch3/E6 세포를 HCT116/p53+ 세포의 IC50에 해당하는 4.8 mM amifostine에 24시간 동안 노출시켰다. p53+ 세포에서 amifostine은 amifostine 유도 G1 정지와 마찬가지로 p53 단백질의 빠른 유도를 유발했으며, 이는 24시간에 최고조에 달했다. 또한, amifostine은 p21 단백질의 빠른 유도를 일으켰다. p21 단백질의 유도는 HCT116/p53+, HCT116/p53-, HCT116/E6 및 HCT116+ch3/E6 세포 모두에서 발생했으며, 이는 amifostine에 대한 반응으로 p21 단백질의 유도가 p53 및 MMR 단백질과 독립적임을 나타낸다. MMR-/p53- 세포에서 amifostine은 G1 정지를 일으키지 않고 p21 단백질의 발현을 유도했다

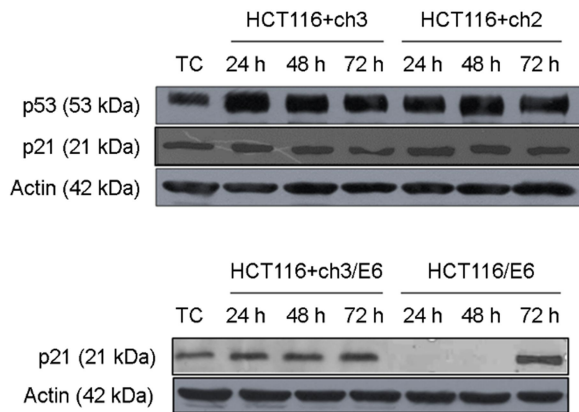


Fig. 5. Effect of amifostine on the expression of p53 protein and p21 protein. Cells were exposed to amifostine for 24 h and cellular proteins were analysed by Western blotting at 24, 48, 72 h after the beginning of exposure to amifostine. Amifostine induced the expression of p53 protein in p53-proficient cells and the expression of p21 protein in p53-proficient and -deficient cells.

데, 이는 amifostine에 대한 반응으로 p21 단백질의 과발현이 세포 주기의 G1 단계에서 세포를 정지시키기에 충분하지 않다는 것을 나타낸다.

고 찰

암이 갖는 공통된 특성은 유전적 불안정성이다. 대부분의 암에서 DNA 손상 반응의 어떤 결함에 의해 암세포가 형성되고 발달하는지는 정확히 알려 지지 않았지만, DNA 손상 반응의 결함과 암 사이에는 분명한 연관 관계가 있다. 예를 들어, 15%의 산발성 대장 종양(sporadic colorectal tumour)은 비정상적으로 짧거나 긴 dinucleotide 반복서열을 가지고 있다. 이러한 DNA 돌연변이는 microsatellite instability라고 하는데, 불일치 복구(MMR)가 제 기능을 못하여 축적된 DNA 복제 오류(replication error) 때문에 생기는 것으로 추측된다(Fink et al., 1998; Fishel and Kolodner, 1995). Microsatellite instability는 산발성 직장 종양뿐만 아니라 유전성 비용종성 대장암(hereditary non polyposis colorectal cancer)에서도 나타난다. 유전성 비용종성 대장암은 MSH2와 MLH1과 같은 불일치 복구(MMR) 유전자의 기능상실변이(loss of function mutation)와 연관되어 있는 것으로 보고되었다(Lord and Ashworth, 2012). 불일치 보정 외에도 MMR 단백질은 특정 DNA 영역에 결합할 수 있으며 이 결합은 p53 및 세포사멸 유도와 관련이 있는 것으로 보고되었지만(Fishel et al., 1993; Kat et al., 1993;

Papadopoulos et al., 1994; Parsons et al., 1993) DNA 손상 유도 후 p53 유도 및 세포사멸에서 MMR 단백질의 역할은 아직 이해되지 않았다. 본 연구에서는 p53 및 MMR 발현 상태가 다른 HCT116 세포주를 이용하여 amifostine의 세포 약리학에 대한 p53과 MMR 단백질의 효과에 대해 알아보았다. Amifostine은 paclitaxel의 세포독성으로부터 HCT116/p53+ 세포를 선택적으로 보호하는 결과에서 정상 조직은 p53이 풍부하기 때문에 amifostine이 이온화 방사선 및 화학요법제의 독성 효과로부터 정상 조직을 보호하지만, p53이 결핍된 악성 조직을 보호하지 못함을 설명할 수 있었다. 즉 많은 고형 종양은 p53 단백질 자체 또는 p53 단백질의 하류 경로에 결함 형태가 발현됨이 많은 연구에서 발표되었다(Falciocchio et al., 2020; Roser et al., 2021; Jiang et al., 2021; Munakata et al., 2023). 또한, amifostine은 paclitaxel 유도 세포독성으로부터 MRC-5 인간 폐 섬유아세포를 보호하고 A427 폐암 세포에서 paclitaxel 세포독성이 증가되는 것으로 나타났다(Taylor et al., 1997). A427 세포는 p53 단백질을 발현하지만(Li et al., 2021), p53 단백질의 결함으로 인해 p53 경로가 비활성화되어 DNA 손상 반응으로(Strobeck et al., 2001; John et al., 2007) 진행된다. Amifostine 처리된 A427 세포에서 paclitaxel의 민감성 증가는 DNA 파손의 증가와 관련이 있다고(Taylor et al., 1997) 발표되었다. 치료를 위한 화학요법제 사용과 관련하여 MMR 활성이 상실되면 게놈(genome) 전체의 돌연변이 비율을 증가시켜, 약물 내성이 발생하여 DNA를 검출하는 세포의 능력을 직접적으로 손상시킴으로써 세포사멸을 증가시킨다. MMR 단백질은 세포 주기의 활성화 중재에 관여하여 DNA 손상에 대한 반응으로 세포 주기 체크포인트와 세포사멸이 일어나게 되고, MMR이 결핍된 세포는 내성을 갖는 것으로 보고되었다(Davis et al., 1998). MMR이 세포독성을 어떻게 매개하는지는 정확히 설명할 수 없지만, 6-thioguanine과 cisplatin 등에 의해 생성된 DNA 병변은 모두 돌연변이를 유발하므로 MMR 때문에 세포가 죽지 않을 것이라고 예상되고, MMR이 비활성화되면 DNA 중합효소 오류를 복구하지 못하기 때문에 돌연변이율이 매우 높을 뿐만 아니라 DNA에 부가물이 지속되기 때문이다. 객관적인 약물 내성 발달 속도와 관련하여 종양에서 MMR 결핍 세포의 중요성에 대한 연구가 현재 시급히 필요하다고 사료된다.

Amifostine이 처리된 세포에서 p53 단백질은 세포 주기를 조절하는데 중요한 역할을 한다. Amifostine은 p53이 있는 세포와 결핍된 세포 모두에서 G2 정지를 일으켰으

며, 이는 amifostine에 의해 유도된 G2 정지가 p53과 무관함을 나타낸다. Amifostine은 또한 p53-독립적 경로를 통해 p21 단백질의 과발현을 유도했는데, amifostine에 의해 유도된 G2 정지가 p21 단백질과 관련 있는 것으로서, 실제로 p21 단백질은 Cdc2의 인산화를 억제하고 G2 정지를 시행하는 것으로 보고되었다(Shapiro and Harper, 1999; Smits et al., 2000). MMR 발현 세포에서 MNNG 처리 후 G2 세포 주기 정지 및 세포사멸을 촉진하고(Davis et al., 1998), 유사하게, 6-thioguanine 처리 후 MMR 발현 세포에서 G2 정지가 보고되었다(Davis et al., 1998). 이에 반해, 동일한 노출에 6-thioguanine은 G2 정지를 유도하지 않고 오히려 MMR 부족 세포에서 G1 정지를 유도했다. 세포 주기의 G2 정지 체크포인트는 세포가 DNA 불일치의 복구를 시도하고 돌연변이 된 DNA의 복제를 방지하도록 허용할 수 있다. DNA 손상에 대한 반응으로 p53과 p21에 의해 중재된 G1-S 단계에 머무르게 된다. 최근에는 MLH1이 결핍된 인간 종양 세포주도 cisplatin 처리가 G2 세포 주기 정지에 관여하지 못하는 것으로 보고되었다(Davis et al., 1998). MMR이 DNA 불일치뿐만 아니라 DNA 손상이 감지될 때 세포 복제를 제한하는 과정에도 관여함을 의미한다.

본 연구 결과 amifostine은 p53+ 세포에서 G1 정지를 일으켰으며, 이는 G1 정지가 p53 단백질과 관련 있음을 나타낸다. p53+ 세포에서, G1 정지와 p53 단백질의 유도는 모두 amifostine 노출 시작 후 24시간에 최고조에 달했으며, 이는 amifostine에 의해 유도된 G1 정지가 p53 의존성 경로 관련성에 대한 증거이다. p53-인 MMR+와 MMR-세포의 경우 HCT116 E6의 경우 약간의 G1 정지와 G2/M을 유도한 반면 HCT16+ch3/E6의 경우는 세포 주기 정지가 관찰되지 않았다.

Amifostine은 MMR과 상관없이 p53+ 세포와 p53- 세포 모두에서 p21 단백질의 발현을 유도했지만 p53+ 세포에서만 G1 정지를 일으켰기 때문에, p21 단백질의 발현만으로는 amifostine에 의한 G1 정지를 설명하기에 충분하지 않았다. p21 유전자의 전사를 조절하는 것 외에도, p53 단백질은 p27Kip1 및 p57Kip2와 같은 Cip/Kip 패밀리의 하향 단백질을 코딩 하는 유전자의 전사를 조절하는 것으로 발표되었다(Feng et al., 2012; Shapiro and Harper, 1999; Smits et al., 2000). p21 단백질과 마찬가지로 p27Kip1 단백질과 p57Kip2 단백질은 사이클린 E-CDK2와 복합체를 형성하고 CDK2 억제 및 G1 정지를 촉진하는 것으로 설명되었다(Feng et al., 2012; Shen et al., 2001). 따라서, p21 단백

질의 과발현이 amifostine 처리된 세포에서 G1 정체를 유지하기에 충분하지 않다는 것은 amifostine이 p53 단백질의 하류에서 하나 이상의 다른 세포 주기 억제제의 발현을 유도했음을 시사한다.

세포 보호제인 amifostine은 HCT116 세포에서 세포사멸을 유도할 가능성이 있다. p53 단백질의 존재 하에서 HCT116 세포는 amifostine에 대해 낮은 수준의 내성을 나타내어, amifostine에 의해 유도된 세포사멸로부터 세포를 보호한다. Amifostine에 대한 내성은 1.5~2배의 범위로 완만했고, p53 단백질에 의해 부여된 상대적으로 작은 내성 정도의 생물학적 관련성은 현재 명확하지 않지만, 임상 연구(Feng et al., 2012; Smits et al., 2000)에서 달성된 혈장 농도보다 약간 높은 농도에서 세포사멸을 유발하여 임상적 관련성이 있음을 나타낸다.

종합하면, 본 연구 결과는 p53 단백질이 amifostine에 대한 세포 반응을 조절하는 데 중요한 역할을 하고, p53 단백질이 amifostine에 의해 유도된 세포사멸에 대한 저항성 기전과 amifostine에 의해 유도된 G1 정지 및 세포 보호의 기전으로 확인된다는 것을 나타낸다.

ACKNOWLEDGEMENT

This paper was supported by Daejeon Health Institute of Technology in 2023.

CONFLICT OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

REFERENCES

- Bhattacharyya NP, Skandalis A, Ganesh A, et al. Mutator phenotypes in human colorectal carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994. 91: 6319-6323.
- Boyer JC, Umar A, Risinger JI, et al. Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and genetic defects in human cancer cell lines. *Cancer Res*. 1995. 55: 6063-6070.
- Bunz F, Hwang PM, Torrance C, et al. Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J Clin Invest*. 1999. 104: 263-269.
- Capizzi RL. Clinical status and optimal use of amifostine. *Oncology*. 1999. 13: 47-59.
- Capizzi RL, Oster W. Chemoprotective and radioprotective effects of amifostine: an update of clinical trials. *Int J Hematol*. 2000.

- 72: 425-435.
- Carder P, Wyllie AH, Purdie CA, et al. Stabilized p53 facilitates aneuploid clonal divergence in colorectal cancer. *Oncogene*. 1993. 8: 1397-1401.
- Chakraborty U, Alani E, et al. Understanding how mismatch repair proteins participate in the repair/anti-recombination decision. *FEMS Yeast Res*. 2016. 16: fow071.
- Davis TW, Wilson-Van PC, Meyers M, et al. Defective expression of the DNA mismatch repair protein, MLH1, alters G2-M cell cycle checkpoint arrest following ionizing radiation. *Cancer Res*. 1998. 58: 767-778.
- Falcicchio M, Ward JA, Macip S, et al. Regulation of p53 by the 14-3-3 protein interaction network: new opportunities for drug discovery in cancer. *Cell Death Discov*. 2020. 6: 126. <http://doi.org/10.1038/s41420-020-00362-3>.
- Feng M, Smith DE, Normolle DP, et al. A phase I clinical and pharmacology study using amifostine as a radioprotector in dose-escalated whole liver radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012. 83: 1441-1447. <http://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2011.10.020>.
- Fink D, Nebel S, Norris PA, et al. The effect of different chemotherapeutic agents on the enrichment of DNA mismatch repair-deficient tumor cells. *Br J Cancer*. 1998. 77: 703-708.
- Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary non-polyposis colon cancer. *Cell*. 1993. 75: 1027-1038.
- Fishel R, Kolodner RD. Identification of mismatch repair genes and their role in the development of cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 1995. 5: 382-395.
- Hickman MJ, Samson RD. Role of DNA mismatch repair and p53 in signaling induction of apoptosis by alkylating agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999. 96: 10764-10769. doi: 10.1073/pnas.96.19.10764.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al. p53 mutations in human cancers. *Science (Washington DC)*. 1991. 253: 49-53.
- Jiang M, Jia K, Wang L, et al. Alterations of DNA damage response pathway: Biomarker and therapeutic strategy for cancer immunotherapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2021. 11: 2983-2994. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.01.003>
- Jin P, Wang D, Lyu C, et al. Mismatch Repair Protein hMLH1, but not hMSH2, Enhances Estrogen-Induced Apoptosis of Colon Cancer Cells. *Journal of Cancer*. 2017. 8: 3232-3241. doi: 10.7150/jca.20833
- John RK, Vassilis EK, Lampros JV. Amifostine: The First Selective-Target and Broad-Spectrum Radioprotector. *The Oncologist*. 2007. 12: 738-747. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.12-6-738>
- Kat A, Thilly WG, Fang WH, et al. An alkylation-tolerant, mutator human cell line is deficient in strand-specific mismatch repair. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993. 90: 6424-6428. doi: 10.1073/pnas.90.14.6424.
- Koi M, Umar A, Chauhan DP, Cherian SP, et al. Human chromosome 3 corrects mismatch repair deficiency and microsatellite instability and reduces N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine tolerance in colon tumour cells with homozygous hMLH1 mutation. *Cancer Res*. 1994. 54: 4308-4312.
- Lee EJ, Gerhold M, Palmer MW, et al. p53 protein regulates the effects of amifostine on apoptosis, cell cycle progression, and cytoprotection. *British J Cancer*. 2003. 88: 754-759.
- Lin X, Ramamurthi K, Mishima M, et al. p53 Modulates the Effect of Loss of DNA Mismatch Repair on the Sensitivity of Human Colon Cancer Cells to the Cytotoxic and Mutagenic Effects of Cisplatin *Cancer Res*. 2001. 61: 1508-1516.
- Li P, Liu X, Zhao T, et al. Comparable radiation sensitivity in p53 wild-type and p53 deficient tumor cells associated with different cell death modalities. *Cell Death Discov*. 2021. 20: 184. <http://doi.org/10.1038/s41420-021-00570-5>.
- Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*. 2012. 481: 287-294. doi: 10.1038/nature10760.
- McGahon AJ, Martin SM, Sissonnette RP, et al. The end of the cell line: Methods for the study of apoptosis. In *Cell Death*. 1995. 46: 153-174. [http://doi.org/10.1016/s0091-679x\(08\)61929-9](http://doi.org/10.1016/s0091-679x(08)61929-9).
- Munakata S, Ito T, Asano T, et al. Tumor-Infiltrating CD8-Positive T-Cells Associated with MMR and p53 Protein Expression Can Stratify Endometrial Carcinoma for Prognosis. *Diagnostics* 2023. 13: 1985. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13121985>
- Papadopoulos N, Nicolaidis NC, Wei YF. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science (Washington DC)*. 1994. 263: 1625-1629.
- Parsons R, Li GM, Longley MJ, et al. Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell*. 1993. 75: 1227-1236.
- Roser C, Tóth C, Renner M, et al. Expression of apoptosis repressor with caspase recruitment domain (ARC) in familial adenomatous polyposis (FAP) adenomas and its correlation with DNA mismatch repair proteins, p53, Bcl-2, COX-2 and beta-catenin. *Cell Commun Signal*. 2021. 19: 15. doi: 10.1186/s12964-020-00702-x.
- Salem ME, Bodor JN, Puccini A, et al. Relationship between MLH1, PMS2, MSH2 and MSH6 genespecific alterations

- and tumor mutational burden in 1057 microsatellite instability-high solid tumors. *Int J Cancer*. 2020. 147: 2948-2956. doi: 10.1002/ijc.33115
- Shapiro GI, Harper JW. Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control. *J Clin Invest*. 1999. 104: 1645-1653. <http://doi.org/10.1172/JCI9054>.
- Shaw LM, Glover D, Turrisi A, et al. Pharmacokinetics of WR-2721. *Pharmacol Ther*. 1988. 39: 195-201. [http://doi.org/10.1016/0163-7258\(88\)90061-7](http://doi.org/10.1016/0163-7258(88)90061-7).
- Shen H, Chen ZJ, Zilfou JT, et al. Binding of the aminothiol WR-1065 to transcription factors influences cellular response to anticancer drugs. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001. 297: 1067-1073.
- Smits VA, Klompmaker R, Vallenius T, et al. p21 inhibits Thr161 phosphorylation of Cdc2 to enforce the G2 DNA damage checkpoint. *J Biol Chem*. 2000. 275: 30638-30643. <http://doi.org/10.1074/jbc.M005437200>.
- Strobeck MW, Reisman DN, Gunawardena RW, et al. Compensation of BRG-1 function by Brm: Insight into the role of the core SWI/SNF subunits in RB-signaling. *J Biol Chem*. 2001. 276: 21. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109532200>. Epub 2001 Nov 21.
- Sunitha Y, Mats L. Potential Role of MLH1 in the Induction of p53 and Apoptosis by Blocking Transcription on Damaged DNA Templates. *Mol Cancer Res*. 2003. 1: 747-754.
- Taylor CW, Wang LM, List AF, et al. Amifostine protects normal tissues from paclitaxel toxicity while cytotoxicity against tumour cells is maintained. *Eur J Cancer*. 1997. 33: 1693-1698. [http://doi.org/10.1016/s0959-8049\(97\)00221-9](http://doi.org/10.1016/s0959-8049(97)00221-9).

<https://doi.org/10.15616/BSL.2023.29.4.287>

Cite this article as: Lee EJ. Effects of Amifostine on Apoptosis, Cell Cycle and Cytoprotection of Human Colon Cancer Cell Lines. *Biomedical Science Letters*. 2023. 29: 287-295.