

항암제를 투여한 HeLa와 OVCAR-3 세포주에서 Cytokeratin 18-Asp³⁹⁶ (M30) 항체를 이용한 항암제 감수성의 측정

안양 샘병원¹, 가톨릭대학교 성모병원 임상의학연구소²,
가톨릭대학교 의과대학 산부인과학교실³

송민경¹ · 박상호² · 곽현성³ · 류기성³ · 한구택³

Detection of chemosensitivity using K18-Asp³⁹⁶ (M30) antibody in HeLa and OVCAR-3 cell lines treated with anticancer agents

Min Kyung Song, M.D., Ph.D.¹, Sang Ho Park,² Hyun Sung Kwack, M.D.³,
Ki Sung Ryu, M.D., Ph.D.³, Ku Taek Han, M.D., Ph.D.³

¹Saem Hospital, Anyang-si, Gyeonggi-do;

²Clinical Research Laboratory, St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea, Seoul;

³Department of Obstetrics and Gynecology, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Objective: The aim of this study was to detect the levels of M30-antigens as a biomarker of apoptosis in cells and their culture media after treatments with anticancer drugs as a preclinical study.

Methods: After HeLa and OVCAR-3 cells were treated respectively with paclitaxel, cisplatin, and camptothecin, the harvested cells were stained sequentially with M30 monoclonal antibodies and propidium iodide (PI). Afterwards, they were analyzed using a FACScan flow cytometer and observed under an immunofluorescence microscope for M30-FITC immunofluorescences. Levels of M30 antigens were also detected in their culture media using M30-Apoptosense ELISA kit.

Results: The levels of M30-FITC immunofluorescences were elevated in both cell lines after each drug treatments compared with those of control cells. The levels of M30 antigens detected by ELISA in media culturing each cell line treated with each of drugs were elevated compared with those of control cells.

Conclusion: This study suggests that M30-antigens representing chemotherapy induced apoptosis may be a useful biomarker for predicting and monitoring the response of neoadjuvant chemotherapy in patients with gynecologic cancers.

Key Words: Apoptosis, Cytokeratin 18-Asp³⁹⁶ (M30), Flow cytometry, ELISA, HeLa, OVCAR-3

서 론

악성 부인종양의 치료법으로 도입된 신보조화학요법 (neoadjuvant chemotherapy)은 진행된 난소암에서 최적의 세포축소 수술 (cytoreductive surgery)을 가능하게 하고, 진행되었거나 재발 또는 전이된 자궁경부암의 용적을 감소시켜 수술적 절제 가능성과 방사선 치료의 효과를 증진시키는 것으로 알려져 있다.¹ 그러나 흔히 경험하는 치료

접 수 일 : 2009. 6. 17.
채 택 일 : 2009. 12. 9.
교신저자 : 한구택
E-mail : nowonhkt@catholic.ac.kr

의 실패는 종양세포들의 고유한 이질성으로부터 기인되므로 치료에 대한 반응을 조기에 알아낼 수 있는 이상적인 항암제 감수성 검사법이 절실히 요구되고 있다.²

세포고사를 포함한 세포의 사망과 증식은 많은 신호전달 인자들의 정밀한 조절에 의해 체내의 항상성이 유지된다.³ 세포고사 (apoptosis)가 진행되는 동안에 상피세포의 구조 단백질인 cytokeratin 18 (CK18)은 활성화된 caspase들에 의한 분해로 M30 단편을 발생시키며, 이에 노출된 신항원 결정기와 M30 단클론 항체가 특이적으로 결합한다.⁴ M30 항원은 세포막이 완전한 고사세포 내에서는 존속되지만 세포막의 완전한 상태가 소실되는 과사가 발생하면 세포내로부터 유출되어 순환 혈액 또는 배양액 내로 유출된다.⁵ 따라서 상피로부터 발생된 종양에서 항암화학요법제를 투여하기 전과 후에 채취한 종양조직 세포들과 혈액에서 M30 항체를 이용한 세포고사의 측정은 신보조화학요법에서 항암제 감수성의 표지자로서 이용 가능성을 암시하는 것이다.⁶ 또한 세포내 신호전달 인자들의 정밀한 조절로 이루어지는 세포고사와 세포주기의 변화는 항암화학요법과 관련된 이론 및 기전과 관련되므로 신속하고 민감성이 높으며 다변수분석이 가능한 유세포 분석법이 이 분야의 연구에 매우 유용한 것으로 알려져 있다.⁷

본 연구에서는 배양한 자궁경부암 세포주인 HeLa와 난소암 세포주인 OVCAR-3 세포들에서 악성 부인종양의 치료에 흔히 사용되는 cisplatin, paclitaxel 및 camptothecin을 투여한 후 세포고사가 가장 높게 발현되는 24시간 후에⁸ 세포주기의 변화와 M30 항체에 의한 세포고사의 발현 정도를 유세포분석과 함께 형광현미경하에 비교 관찰하고, 동시에 배양액내에서 M30 항체에 의한 세포고사의 정도를 ELISA법으로 측정하는 전임상 연구를 실시하였다. 이 실험을 통하여 본 연구자들은 악성 부인종양의 신보조화학요법에서 감수성과 내성을 보이는 약제들의 조기 분별에 의해 치료의 효율성을 높일 수 있어 불필요한 부작용과 경제적 손실을 피할 수 있는 계기를 마련할 수 있을 것으로 생각하였다.

연구 대상 및 방법

1. 세포주의 배양

실험에 사용할 HeLa와 OVCAR-3 세포주는 American

Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)으로부터 구입하였다. 세포들을 37°C와 95%의 습도를 유지한 5% CO₂ 배양기 내에서 배양하였다. 배양액 내에는 100 unit/mL의 penicillin G와 100 µg/mL의 streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 15%의 우태아 혈청 (Gibco/BRL, Grand Island, N.Y., USA) 및 20 µM glutamine이 포함된 RPMI 1640으로 T-75 flask 내에서 배양하였다. 실험 시작 3일 전에 HBSS, 0.25% trypsin (Flow Laboratories, Irvine, Scotland, UK) 및 2 mM EDTA (J. T. Baker, Deventer, Netherland)의 혼합 용액으로 세포들을 분리 수확하였으며, 분리 수확한 세포 부유액을 250×G에서 5분간 원심분리한 후 상청액을 버리고 5 mL의 배양액이 들어 있는 각각의 세포주에 4개씩 준비된 T-25 flask의 각각에 1×10⁴ cells/mL의 세포들을 분주하고 다시 배양을 시작하였다. 계대 배양 시에는 2~3일마다 새로운 배양액으로 교체하였다. HeLa와 OVCAR-3 세포주의 배양에 사용된 T-25 flask들 중 하나는 비투여 대조군으로 사용하였으며 나머지 3개는 각각 cisplatin, paclitaxel 및 camptothecin의 투여군으로 사용하였다.

2. 항암화학요법제의 투여

항암화학요법제인 cisplatin, paclitaxel 및 camptothecin은 모두 Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 약제들의 투여는 5 mL의 배양액과 함께 배양한 HeLa와 OVCAR-3 세포들이 지수적으로 증식 성장 (약 2×10⁵ cells/mL)할 때 각 세포주의 비투여 대조군 flask 2개를 제외한 다른 6개의 T-25 flask들에 각각 Gibb들⁹과 Goosens들¹⁰의 보고들을 참고로 1,000 nM의 paclitaxel, 250 µg/mL의 cisplatin과 30 µM의 camptothecin을 투여하고 2시간 동안 배양하였다. 이후 새로운 배양액으로 교환한 후 24시간 동안 더 배양하였다. 배양이 완료된 후 원심분리로 세포들을 모두 수확하였으며, 세포침전물에 10 mL의 배양액을 가하여 부유시킨 후 20 µL의 세포부유액과 20 µL의 trypan blue (Sigma-Aldrich Chemical Company, St. Louis, MO, USA) 용액을 혼합 염색하여 hemocytometer로 세포수를 산정하였다. 분리 수확된 세포들은 M30 항체에 의한 M30 항원의 측정과 propidium iodide (Sigma-Aldrich Chemical

Company, St. Louis, MO, USA)에 의한 세포주기 측정을 위한 유세포분석에 사용하였고, 일부의 세포들은 면역형광 현미경에 의한 관찰을 위해 면역형광 염색을 실시하였다. 배양액은 따로 모아 실험 시까지 냉장 보관하였다.

3. M30와 DNA의 동시 염색과 유세포 분석

M30 항원에 대한 단클론 항체 (Clone M30, M30 CytoDeathTM)는 ALEXIS[®] Biochemicals (Lausen, Switzerland)사로부터 구입하였다. FACS의 설정에 사용된 항-cytokeratin (CK) 항체 (CAM 5.2, MNF116)들은 Becton Dickinson사 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)와 DAKO사 (Glostrup, Denmark)로부터 각각 구입하였으며, phycoerythrin (PE) 또는 fluorescein isothiocyanate (FITC)와 공유 결합된 goat anti-mouse immunoglobulin IgG (GAM IgG) 이차 항체들은 Southern Biotechnology Association (Birmingham, AL, USA)으로부터 각각 구입하였다. 수확한 세포들을 필요한 수의 시험관에 각각 1 mL당 약 10⁶개의 세포 농도로 나누어 가하였다. 형광 염색은 Corver들¹¹과 Han들¹²의 방법에 따라 각각의 세포군을 1% paraformaldehyde 용액과 100% methanol 용액으로 고정과 투과시킨 후 간접방법으로 면역형광염색을 실시하였다. 먼저 10 µL의 M30 항체를 가하고 방치한 후 PBS/BSA (1%) 용액으로 3회 세척하였으며, 다음에 GAM IgG-FITC 이차항체를 가하고 방치하였다. FACS의 설정을 위한 음성 및 양성 대조군의 염색은 일차 항체로 CAM 5.2와 MNF116을 사용하였고, 이차항체는 각각 GAM IgG-FITC와 GAM IgG-PE를 사용하였다. 면역형광염색이 끝난 후 이어서 모든 시험관에 1 mL의 PBS/BSA (1%), 250 µL의 0.1% RNase (Sigma, Diagnostics, St. Louis, MO, USA)와 50 µg의 propidium iodide (Sigma, Diagnostics, St. Louis, MO, USA)를 가하고 37°C의 항온조에서 30분간 방치하여 DNA 염색을 실시하였으며, 즉시 분석하거나 암소에 냉장 보관한 후 최소 2~3일 내에 분석에 사용하였다. 유세포 분석에 의한 M30-FITC 형광도와 세포주기 분석은 488 nm의 레이저가 장착된 표준 FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)를 이용하였고, FACScan에 설치된 CellQuest program을 사용하여 1×10⁴

개의 세포들에 대한 자료들을 획득하였다. 중복 세포들은 FL3-A와 FL3-W의 주상도상에서 제외하였다. 얻어진 모든 결과들은 WinList 6.0과 ModFit LT 3.0 software program (Verity Software House, Topsham, ME, USA)으로 분석하였다.

4. 면역형광도의 관찰

대조군과 투여군으로부터 수확한 각각의 세포들로부터 200 µL를 취하여 Shandon Cytospin 2 cytocentrifuge (Thermo Electron Corp., Cheshire, UK)를 이용하여 1,000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 세포 침전물을 현미경 슬라이드 (Fisher Scientific Co., Pittsburgh, USA)들에 부착시킨 후 100% methanol 용액을 가한 후 -20°C에서 30분간 방치하였다. 다음에 PBS/BSA (1%) 용액을 가하여 5분간씩 3회 반복해서 세척하였다. M30 항체와 PBS/BSA를 가하고 30분 후에 PBS/BSA 용액으로 5분간씩 3회 반복해서 세척한 후 FITC가 공유 결합된 2차 항체를 PBS/BSA와 함께 2.5~5 µg/mL의 최종 농도가 되도록 가하였다. 다음에 30분간 4°C의 암소에 방치한 후, PBS/BSA를 1 mL씩 각각 가하고 250×G에서 5분간 3회 세척하였다. 염색 과정이 끝난 세포들의 M30-FITC 형광도를 형광현미경 (Olympus AX70; Olympus, Tokyo, Japan) 하에 관찰하였다.

5. ELISA에 의한 M30 항원의 측정

냉장 보관한 각각의 배양액내에서 M30 항원의 측정을 위해서는 M30-Apoptosense[®] ELISA Kit (Alexis Biochemicals, Lausen, Switzerland)에 의한 solid phase와 2-site immunosorbent assay를 이용하여 측정하였다. 모든 실험은 실온에서 실시하였으며, 시약들을 잘 혼합한 후 사용하였다. Catcher인 생쥐 단클론항체로 피복된 96 well ELISA plate의 well들에 표준 표본, 비투여 대조군 및 투여군 표본을 각각 25 µL씩 분주한 후 완충용액으로 희석시켜 잘 혼합시킨 75 µL의 M30 HRP 공유결합체용액을 가하였다. Sandwich가 형성된 plate를 테이프로 밀봉한 후 25°C의 교반기에서 4시간 동안 600 rpm으로 교반시킨 후에 250 µL의 희석된 세척용액으로 5회 세척하였

다. 다시 200 μ L의 TMB 기질용액을 첨가하여 실온의 암소에 20분간 방치하였다. 이 후 50 μ L의 정지 용액을 가하고 5~10초 동안 잘 혼합시킨 후 5분간 방치하여 반응을 정지시켰다. 이 과정이 완료된 후에는 ELISA plate 판독기 (BioTek Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 450 nm에서 30분 내에 흡광도를 측정하였다. 이미 알고 있는 농도와 측정된 흡광도로부터 도표상에 표준곡선을 표시함으로써 표본내의 M30 항원의 양을 산정하였으며, M30 항원의 농도는 제조사의 지시에 따라 U/L로 표시하였으며, 1단위는 M30 인식 motif를 포함하는 합성 peptide의 1.24 pmole에 해당된다.

6. 통계 분석

세포주기에 따른 대조군과 투여군의 차이와 투여군에서 세포주기에 따른 차이는 Kruskal-Wallis 분석법과 Wilcoxon Rank Sum (Mann-Whitney) 분석법으로 비교하였으며, 투여 약제에 따른 HeLa와 OVCAR-3 세포주간의 차이는 Wilcoxon Two-Sample법으로 비교하였다. 세포주기상에서 측정된 G₀G₁하 세포고사 분획과 M30-FITC에 의해 측

정된 세포고사 사이의 전체적인 상관관계 분석은 Spearman Rank Correlation Coefficient에 의하였으며, 이들의 평균간의 차이는 Wilcoxon Rank Sum법으로 비교하였다. 또한 배양액내에서 측정된 M30 항원의 측정 결과들은 이원배치분석법 (2-Way ANOVA Test), Scedge의 다중비교법과 Unpaired *T*-분석법으로 비교하였다. 모든 경우들에서 유의성 검정은 $P<0.05$ 에 의해 판정하였다.

결 과

1. 세포주기 변화의 분석

G₀G₁ 분획은 HeLa와 OVCAR-3 세포주에서 1,000 nM의 paclitaxel을 투여하였을 때 모두에서 대조군에 비해 유의한 감소 ($P<0.05$)를 나타내었으며, 250 μ g/mL의 cisplatin을 투여하였을 때는 모두에서 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다. 그러나 30 μ M의 camptothecin을 투여한 경우에는 HeLa 세포주에서는 대조군에 비해 유의한 증가 ($P<0.05$)를 나타내었으나 OVCAR-3 세포주에서는 유의한 차이가 없었다 (Table 1, Fig. 1).

Table 1. The percentages of cell cycle phases and the detected levels of sub-G₀G₁ phase fractions and positive M30-FITC immunofluorescences representing apoptosis in HeLa and OVCAR-3 cell lines after treatments with paclitaxel, cisplatin and camptothecin, respectively.

Cell Line	Anti-Cancer Agents	Fractions of Cell Cycle Phase			Apoptosis	
		G ₀ G ₁	S	G ₂ M	Sub-G ₀ G ₁	M30-FITC
HeLa	Control	73.5 \pm 1.0	18.4 \pm 1.2	8.1 \pm 0.8	10.0 \pm 6.0	6.5 \pm 1.2
	Paclitaxel	25.0 \pm 13.6*	29.8 \pm 3.0*	45.0 \pm 10.3*	20.8 \pm 11.6	30.9 \pm 16.5*
	Cisplatin	70.8 \pm 9.4	28.3 \pm 10.1	0.9 \pm 0.9*	25.9 \pm 18.1	20.9 \pm 12.8*
	Camptothecin	80.4 \pm 2.4*	10.1 \pm 10.0	9.5 \pm 8.6	33.4 \pm 10.1*	30.4 \pm 13.0*
OVCAR-3	Control	67.6 \pm 7.0	24.0 \pm 4.8	8.5 \pm 3.0	5.6 \pm 5.6	7.0 \pm 2.5
	Paclitaxel	38.6 \pm 14.7*	25.9 \pm 1.4	35.5 \pm 14.8*	14.6 \pm 7.7	27.2 \pm 8.6*
	Cisplatin	71.4 \pm 4.9	26.2 \pm 4.5	2.8 \pm 1.4	52.3 \pm 6.2*	64.5 \pm 14.4*
	Camptothecin	70.4 \pm 6.2	26.8 \pm 4.9	2.9 \pm 1.4	26.0 \pm 11.8*	22.0 \pm 4.2*

The HeLa and OVCAR-3 cells were treated with 1,000 nM of paclitaxel, 250 μ g/mL of cisplatin, and 30 μ M of camptothecin, respectively. The decreases or increases of fractions of G₀G₁, S and G₂M phases of cell cycles from control were compared by the Wilcoxon Rank Sum Test (* $P<0.05$). The decreases or increases of fractions of sub-G₀G₁ and M30-FITC reflecting apoptosis were also compared from control by the Wilcoxon Rank Sum Test (* $P<0.05$). There were positive correlations between the values of sub-G₀G₁ fractions of cell cycles and M30-FITC immunofluorescences when they were analyzed by the Spearman's Correlation (correlation coefficient=0.59848, $P=0.0003$). There were no significant differences between the levels of sub-G₀G₁ fractions of cell cycles and M30-FITC immunofluorescences representing apoptosis observed after treatments, when they were compared by Wilcoxon Rank Sum Test.

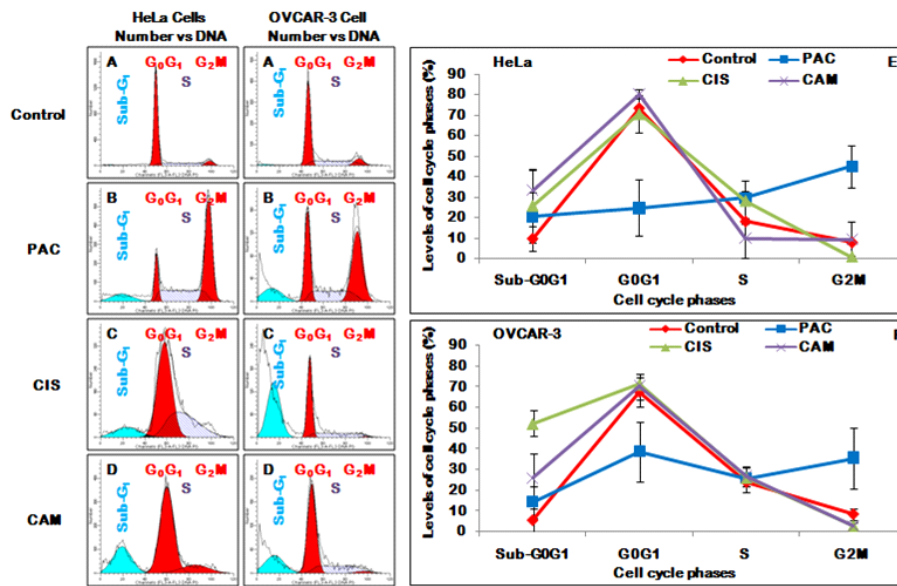


Fig. 1. DNA histograms (left) and linear diagrams (right) showing the changes of cell cycle phases and apoptotic populations (sub-G1 peaks) stained with propidium iodide (PI) and measured by FACScan flow cytometer in HeLa and OVCAR-3 cells. The blue peaks represent apoptotic populations (sub-G₀G₁ peaks). The first red peaks represent the G₀G₁ phases of the cell cycles. The second red peaks represent G₂M phases of cell cycles. The mid portions between two red peaks with diagonal lines represents S phases of cell cycles. (A) Untreated control cells, (B) cells treated with 1,000 nM of paclitaxel, (C) cells treated with 250 ng/mL of cisplatin, and (D) cells treated with 30 nM camptothecin. (E) and (F) The linear diagrams showing distributions of cell cycle phases and apoptotic sub-G₀G₁ peaks in HeLa and OVCAR-3 cells treated with 1,000 nM of paclitaxel, 250 ng/mL of cisplatin, and 30 nM of camptothecin.

S 분획은 paclitaxel을 투여한 경우에 HeLa 세포주에서는 대조군에 비해 유의한 증가 ($P<0.05$)를 나타내었으나 OVCAR-3 세포주에서는 유의한 차이가 없었다. Cisplatin과 camptothecin을 투여하였을 때에는 HeLa와 OVCAR-3 세포주 모두에서 대조군에 비해 유의한 차이를 나타내지 않았다 (Table 1, Fig. 1).

G₂M 분획은 paclitaxel을 투여한 경우에 HeLa와 OVCAR-3 세포주에서 모두 대조군에 비해 유의한 증가 ($P<0.05$)를 나타내었으며, cisplatin을 투여한 경우에는 HeLa 세포주에서는 대조군에 비해 유의한 감소 ($P<0.05$)를 나타내었으나 OVCAR-3 세포주에서는 감소하였으나 유의하지는 않았다. Camptothecin을 투여한 경우에는 HeLa와 OVCAR-3 세포주 모두에서 대조군에 비해 유의한 차이를 나타내지 않았으나 OVCAR-3 세포주에서는 감소된 경향을 관찰할 수 있었다 (Table 1, Fig. 1).

2. G₀G₁하 분획 (Sub-G₀G₁ fraction)과 M30-FITC에 의한 세포고사의 측정

세포고사의 분획인 G₀G₁하 분획은 paclitaxel을 투여한 경우에는 HeLa와 OVCAR-3 세포주에서 모두 대조군에 비해 유의한 차이가 없었다. Cisplatin을 투여한 경우에는 HeLa 세포주에서는 대조군에 비해 차이를 나타내지 않았으나 OVCAR-3 세포주에서는 유의한 증가 ($P<0.05$)를 나타내었다. 한편 camptothecin을 투여한 경우에는 HeLa와 OVCAR-3 세포주 모두에서 대조군에 비해 유의한 증가 ($P<0.05$)를 나타내었다. 그러나 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않은 경우에도 모든 세포군에서 대조군에 비해 증가된 경향들을 관찰할 수 있었다 (Table 1, Fig. 1). M30-FITC에 의한 세포고사의 측정은 paclitaxel, cisplatin과 camptothecin을 투여한 HeLa와 OVCAR-3 세포주 모두에서 대조군에 비해 유의한 증가 ($P<0.05$)를 나타내었다 (Table 1, Fig. 2). 따라서 M30-FITC에 의한 세포고사의 측정이 G₀G₁하 침봉의 분획에 의한 세포고사의 측정에 비해 더 정확한 측정법으로 판단되었다.

한편 HeLa와 OVCAR-3 세포주에서 G₀G₁하 분획에 의한 세포고사의 측정과 M30-FITC에 의한 세포고사의 측정

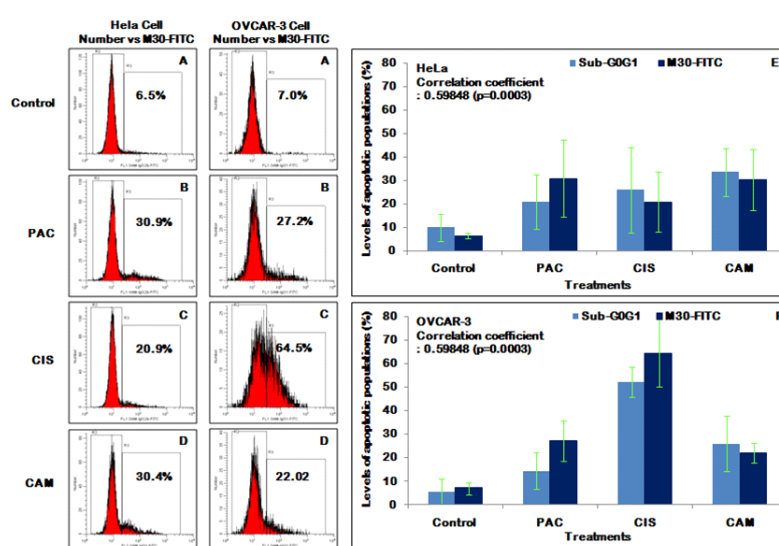


Fig. 2. The histograms are showing the levels of M30-FITC immunofluorescences (Number vs M30-FITC immunofluorescence) detected by flow cytometer in HeLa and OVCAR-3 cells treated with anti-cancer agents and the comparisons between sub-G₀G₁ phase fractions and positive M30-FITC immunofluorescences. The populations in gate R2 indicate negative M30-FITC immunofluorescences and those in gate R3 indicate the apoptotic populations with positive M30-FITC immunofluorescences. (A) Untreated control cells, (B) cells treated with 1,000 nM of paclitaxel, (C) cells treated with 250 ng/mL of cisplatin, and (D) cells treated with 30 nM of camptothecin. (E) and (F) The correlation between the detected levels of sub-G₀G₁ fractions and M30-FITC immunofluorescences were evaluated by Spearman's Methods (correlation coefficient=0.59848, $P=0.0003$). There were no significant differences between them when compared by Wilcoxon Rank Sum Test.

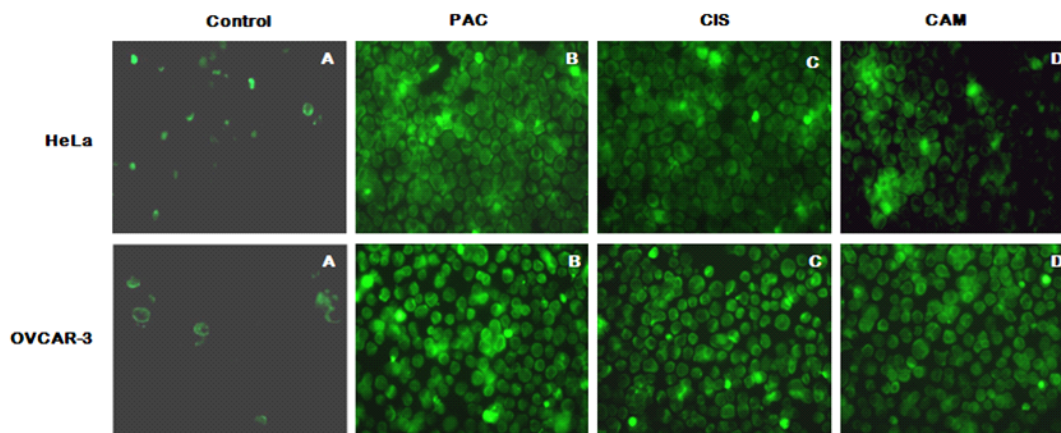


Fig. 3. The M30-FITC immunofluorescences observed under the immunofluorescence microscopy. (A) Untreated control HeLa and OVCAR-3 cells. There can be seen some positive cells with scanty intracytoplasmic M30-FITC immunofluorescences compared to the treated cells. (B~D) Cells treated with 1,000 nM of paclitaxel, 250 ug/mL of cisplatin, and 30 uM of camptothecin in order. There can be seen many cells with strong intracytoplasmic immunofluorescences in all of the treated cells, PAC: paclitaxel, CIS: cisplatin, CAM: camptothecin.

의 사이에 중등도의 양성 상관관계 (Spearman correlation coefficient; 0.59848, $P=0.0003$)를 가지는 것으로 분석되었으며, HeLa와 OVCAR-3 세포주에서 paclitaxel,

cisplatin과 camptothecin을 투여하였을 때 투여군에 따라 G₀G₁ 분획의 증가 수준과 M30-FITC의 발현의 정도의 사이에 유의한 차이를 나타내지 않은 것으로 보아 G₀G₁

Table 2. Levels of apoptosis detected by ELISA using M30 (CK18-Asp³⁹⁶) antibody in the culture media after treatments with 1,000 nM of paclitaxel, 250 ug/mL of cisplatin, and 30 uM camptothecin in HeLa and OVCAR-3 cell lines.

Cell line	Treatment	M30 concentration (U/L)
HeLa	Control	25.9±4.4 [*]
	Paclitaxel	70.6±9.3 ^{*,†}
	Cisplatin	65.9±6.2 ^{*,†}
	Camptothecin	39.7±5.3 ^{*,†}
OVCAR-3	Control	33.4±3.5 [*]
	Paclitaxel	71.6±4.4 ^{*,†}
	Cisplatin	66.6±1.8 ^{*,†}
	Camptothecin	46.3±0.4 ^{*,†}

The differences among anti-cancer agents including controls were significant statistically when were evaluated by 2-Way ANOVA Test (^{*} $P<0.0001$). The detected levels of M30-antigens were not different significantly between HeLa and OVCAR-3 two cell lines. The levels of M30-antigens detected after treatments with three agents were different from those of controls when were evaluated by unpaired *T*-Test ([†] $P<0.05$). The detected levels of M30-antigens were much higher in both of cell lines treated with paclitaxel and cisplatin than in those treated with camptothecin when compared to controls, when were evaluated by Schffe's Test. But there were no significant differences between paclitaxel and cisplatin.

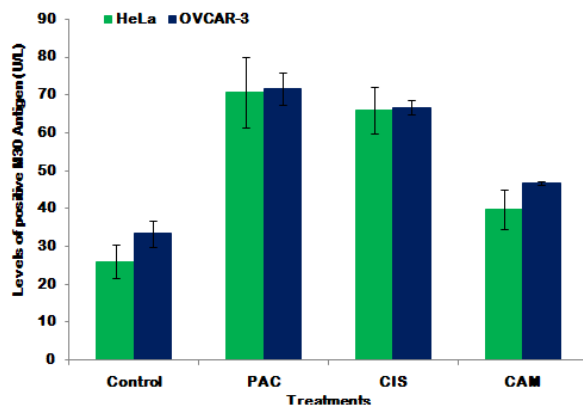


Fig. 4. The levels of M30 antigen in each cell line groups. This figure showing the comparison between the levels of CK18-Asp³⁹⁶ (M30) antigen detected by ELISA in the culture media of untreated controls and HeLa and OVCAR-3 cell lines treated with 1,000 nM of paclitaxel, 250 ng/mL of cisplatin, and 30 uM of camptothecin. PAC: paclitaxel, CIS: cisplatin, CAM: camptothecin.

하 분획의 측정과 M30-FITC의 발현의 측정법이 모두 세포고사의 측정에 유효함을 나타내는 것으로 생각된다 (Table 1, Fig. 2).

3. M30-FITC 면역형광도의 관찰

형광현미경하에 M30-FITC 형광도를 관찰한 결과는

HeLa와 OVCAR-3 세포주 모두에서 대조군에 비해 투여군에서 현저히 증가된 세포질내 형광도를 관찰할 수 있었다 (Fig. 3).

4. 배양액내 M30 항원의 측정

Paclitaxel, cisplatin과 camptothecin을 HeLa와 OVCAR-3 세포들에 각각 투여하여 배양한 세포들을 분리한 후에 따로 모은 배양액에서 ELISA법에 의해 측정된 M30의 항원값은 HeLa와 OVCAR-3 세포주의 사이에 차이가 관찰되지 않았으며, 투여한 약제들 사이에는 유의한 차이 ($P<0.0001$)를 나타내었다. 또한 두 가지 세포주에서 각각의 약제들의 투여에 의한 M30-항원값은 대조군에 비해 모두 유의하게 증가되었다 ($P<0.05$). 대조군과 투여군간에 M30 항원의 발현 정도의 차이를 Scheffe의 다중분석법으로 분석한 결과는 paclitaxel과 cisplatin이 대조군에 비해 가장 높았으며, camptothecin이 그 다음으로 증가됨을 나타내었다. Paclitaxel은 cisplatin에 비해 다소 높은 수준을 나타내었으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다 (Table 2, Fig. 4).

고 찰

악성 부인종양에서 생존율을 증가시키기 위한 치료 전

략으로 신보조화학요법이 도입되었으나,^{1,13} 이를 적용하기 위해서는 항암제 감수성 검사가 절실히 필요하다.^{2,14} 그러나 그 역할이 확실히 증명된 이상적인 항암제 감수성 측정법은 현재까지 찾아보기 어렵다.

세포들에서 발생하는 고사는 외부로부터 받은 자극들에 의해 내인성 경로와 외인성 경로를 통한 상류와 하류의 caspase들이 활성화되어 유발된다.¹⁵ 특히 상피세포들의 세포골격을 구성하는 기질 단백질인 CK18은^{4,8} 세포고사가 진행되는 동안에 caspase들에 의해 Asp²³⁸과 Asp³⁹⁶의 잔기에서 분해되어 CK18-Asp³⁹⁶ 단편 (M30 항원)들을 발생시킨다.^{4,16} 이때 노출된 M30 단편의 신항원 결정기에 M30 단클론 항체가 특이적으로 결합하며, 정상적인 CK18이나 괴사세포 및 생존세포들과는 반응하지 않는다.⁴ M30 항원은 괴사세포 내에 존재하지만 온전한 세포막의 상태가 소실되는 이차적인 괴사가 일어나면 세포밖으로 유출되어 순환 혈액 또는 배양액 내로 유출된다.^{4,5} 이러한 세포고사는 세포주기의 진행과 밀접하게 관련되어 있으며, 관련된 인자들의 정밀한 조절로 체내의 항상성이 유지된다.³ 따라서 다변수 분석이 가능하며 신속하고 민감성이 높은 유세포 분석법은 이 분야의 연구에 매우 유용한 것으로 알려져 있다.⁷ 또한 최근에는 세포고사를 항암제 감수성 평가의 표지물로서 이용해 보려는 연구들이 진행되고 있다.^{4,5,9}

Paclitaxel은 저농도인 10~100 nM을 세포들에 투여하면 미세소관과 유사분열 방추체들의 형성을 억제하지만 전체적인 구조에는 영향을 미치지 않으며, 세포주기의 진행의 가속화로 G₂M 정지를 촉진한다.¹⁶ G₂M 분기에 정지된 세포들은 특징적으로 p34^{cdc2}의 활성화와 Bcl-2의 인산화로 세포고사를 유발시키며, 정지를 지속하지 못한 세포들은 유사분열로부터 탈출하여 다핵 세포들을 발생시킨다. 이 다핵 세포들은 p53에 의해서 세포주기가 정지되거나 주기를 반복한 후 정지되어 결국 세포고사를 수행한다.^{17,18} 반면 고농도의 paclitaxel은 광범위한 미세소관 손상을 일으키며, JNK/SAPK와 p34^{cdc2}의 활성화, Bak, Bax와 TNF- α 들의 조절에 의해 세포고사를 촉진시킨다. 따라서 고농도의 paclitaxel에 의해 유발된 세포고사는 유사분열 정지를 필요로하지 않으며, 어떤 세포주기 분기의 세포들에서도 세포고사를 유발한다.¹⁸ 본연구에서는 1,000 nM의 paclitaxel을 투여하였으며, HeLa와 OVCAR-3 세포주 모두에서 대조군에 비해 G₀G₁은 유의한 감소를 나타내고

G₂M 분기 분획은 유의한 증가를 나타내었다. 그러나, S 분기 분획은 HeLa 세포주에서는 대조군에 비해 유의한 증가를 보였으나 OVCAR-3 세포주에서는 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다. Paclitaxel을 투여한 경우에는 G₀G₁하 첨봉에 의해 측정된 세포고사의 정도는 HeLa와 OVCAR-3 세포주 모두에서 대조군에 비해 증가되는 경향을 보일 뿐 유의한 차이는 나타내지 않았다. 1,000 nM의 paclitaxel을 투여한 후 얻은 이러한 결과들은 저농도와 고농도의 paclitaxel에 의한 세포주기 효과가 모두 반영된 세포고사를 나타낸 것으로 판단되었다.

Cisplatin이 DNA와 결합되면 G₁ 분기의 CDK들이 p16^{INK4A}에 의해 억제되며, p53, p73 및 p38과 인산화된 CDC2의 증가로 세포주기를 G₂M에 정지시키고 cisplatin과 DNA의 복합체들이 제거되므로 cisplatin의 세포독성으로부터 세포들을 생존시킨다. 그러나, DNA의 손상이 광범위하면 완전히 복구되지 못하고 세포고사에 이르게 된다.¹⁹ 본 연구에서는 광범위한 DNA 손상을 유발할 수 있는 250 μ g/mL의 cisplatin을 투여하였으며, 대조군에 비해 S 분기가 유의하지는 않았지만 증가된 경향이 관찰되었고 G₂M 분기가 HeLa와 OVCAR-3 세포주 모두에서 감소된 것은 높은 농도의 cisplatin에 의한 광범위한 DNA의 손상으로 세포주기의 정지 기전이 붕괴된 후에 이를 완전히 복구하지 못하고 세포고사로 진입된 것으로 생각되었다.

Camptothecin은 DNA topoisomerase I의 억제로 DNA 파괴를 유발하며, S와 G₂ 분기에서 염색본체의 이상을 유발하지만 G₁ 분기에는 영향을 주지 않으며, 따라서 camptothecin은 DNA를 복제하는 S 분기의 세포들에서 선택적인 사망을 유발한다.^{20,21} Camptothecin은 1 nM 이하의 매우 낮은 농도에서는 세포의 생존과 세포주기에 대한 효과를 거의 나타내지 않으나 3~60 nM의 camptothecin은 DNA 복제와 세포증식을 억제하므로 S 분기를 통한 세포의 진행 속도를 감소시킨다. 또한 60 nM 이상의 camptothecin은 초기에 세포고사를 유발시키지만 10 μ M 이상의 매우 높은 농도하에서는 topoisomerase I의 함량이나 분열 가능한 복합체들의 존재와 관련없이 괴사를 일으키는 것으로 알려져 있다.²⁰ 30 μ M의 camptothecin을 투여한 본 연구에서 G₂M 분기 분획의 감소 경향을 제외하고는 대조군에 비해 큰 차이를 관찰할 수 없었던 것은 사용한 camptothecin의 용량이 매우 높았기 때문에 세포고사의

과정을 거치지 않고 짧은 시간 동안에 괴사를 일으켰을 것으로 생각되며, 괴사로부터 생존한 일부의 세포들만이 주기를 진행하여 세포괴사의 과정을 거친 것으로 생각되었다.

Paclitaxel, cisplatin과 camptothecin의 투여 후 HeLa와 OVCAR-3 세포주 모두에서 대조군에 비해 M30-FITC 형광도가 유의하게 증가된 것은 이상에서 기술된 세포괴사 또는 괴사의 기전을 통하여 유발되었을 것으로 생각되었다. 이는 형광현미경하에서 대조군에 비해 모든 투여군에서 증가된 세포질내 M30-FITC의 형광도의 관찰과 G₀G₁ 하 첨봉에 의해 측정된 세포괴사의 정도와 M30-FITC 형광도에 의해 측정된 세포괴사의 정도와의 사이의 양성 상관관계 (상관계수 0.59848, $P=0.0003$)에 의해서도 증명되었다.

최근에 M30-ELISA 측정법²²을 이용하여 폐암²³과 유방암²² 환자의 혈액 내에서 M30 항원의 증가를 확인한 바 있

으나 악성 부인종양을 가진 환자의 혈액 내에서 M30 항원을 이용한 연구는 아직 보고된 바 없다. 이에 본 연구자는 전임상 연구로서 HeLa와 OVCAR-3 세포주에서 약제를 투여한 후 배양액내에서 M30-ELISA 측정법에 의해 세포괴사의 정도를 측정하였으며, HeLa와 OVCAR-3 세포주에서 모두 대조군에 비해 높은 정도의 세포괴사를 관찰하였다. 이는 향후 악성 부인 종양 환자들의 혈액내에서 M30-ELISA 측정법에 의해 세포괴사를 측정할 수 있다는 가능성을 암시하는 것으로 생각된다.

결론적으로 HeLa와OVCAR-3 세포주에서 항암요법제를 투여한 후에 세포괴사를 나타내는 M30 항원의 측정은 악성 부인종양의 신보조화학요법에 대한 감수성의 측정 가능성을 암시하는 것이며, 이의 측정은 효과적인 약제의 선택으로 치료의 효율성을 높이고 불필요한 시간 낭비와 경제적 손실을 피할 수 있는 기회를 제공할 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Ayhan A, Celik H, Dursun P, Salman MC, Yuce K. Neoadjuvant chemotherapy in gynecological cancers. *Eur J Gynaecol Oncol* 2006; 27: 11-5.
2. Richardson ME, Siemann DW. Tumor cell heterogeneity: impact on mechanisms of therapeutic drug resistance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; 39: 789-95.
3. Maddika S, Ande SR, Panigrahi S, Paranjothy T, Weglarczyk K, Zuse A et al. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. *Drug Resist Updat* 2007; 10: 13-29.
4. Ueno T, Toi M, Linder S. Detection of epithelial cell death in the body by cytokeratin 18 measurement. *Biomed Pharmacother* 2005; 59 Suppl 2: S359-62.
5. Kramer G, Erdal H, Mertens HJ, Nap M, Mauermann J, Steiner G, et al. Differentiation between cell death modes using measurements of different soluble forms of extracellular cytokeratin 18. *Cancer Res* 2004; 64: 1751-6.
6. Tiezzi DG, De Andrade JM, Cândido dos Reis FJ, Marana HR, Ribeiro-Silva A, Tiezzi MG, et al. Apoptosis induced by neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Pathology* 2006; 38: 21-7.
7. Ormerod MG. Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry. *J Immunol Methods* 2002; 265: 73-80.
8. Linder S. Cytokeratin Markers Come of Age. *Tumor Biol* 2007; 28: 189-95.
9. Gibb RK, Taylor DD, Wan T, O'Connor DM, Doering DL, Gerçel-Taylor C. Apoptosis as a measure of chemosensitivity to cisplatin and taxol therapy in ovarian cancer cell lines. *Gynecol Oncol* 1997; 65: 13-22.
10. Goossens JF, Hénichart JP, Dassonneville L, Facompré M, Bailly C. Relation between intracellular acidification and camptothecin- induced apoptosis in leukemia cells. *Eur J Pharm Sci* 2000; 10: 125-31.
11. Corver WE, Cornelisse CJ, Fleuren GJ. Simultaneous measurement of two cellular antigens and DNA using fluorescein- isothiocyanate, phycoerythrin and propidium iodide on a standard FACScan. *Cytometry* 1994; 15: 117-28.
12. Han KT, Ryu KS, Han SH, In K, Song JM, Kim JH, et al. Multiparametric flow cytometry in breast cancer cell line (MCF-7) stained with fluorescein isothiocyanate, phycoerythrin, and propidium iodide. *J Korean Cancer Assoc* 1999; 31: 1129-39.
13. Napolitano U, Imperato F, Mossa B, Framarino ML, Marziani R, Marzetti L. The role of neoadjuvant chemotherapy for squamous cell cervical cancer (Ib-IIIb): a long-term randomized trial. *Eur J Gynaecol Oncol* 2003; 24: 51-9.
14. Untch M, Ditsch N, Langer E, Kurbacher C, Crohns C, Konecny G, et al. Chemosensitivity testing in gynecologic oncology--dream or reality? *Recent Results Cancer Res* 2003; 161: 146-58.
15. Ricci MS, Zong WX. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *Oncologist* 2006; 11: 342-57.
16. Leers MP, Kölgen W, Björklund V, Bergman T, Tribbick G, Persson B, et al. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J Pathol* 1999; 187: 567-72.
17. Woods CM, Zhu J, McQueney PA, Bollag D, Lazarides E. Taxol-induced mitotic block triggers rapid onset of a p53-independent apoptotic pathway. *Mol Med* 1995; 1: 506-26.
18. Wang TH, Wang HS, Soong YK. Paclitaxel- induced cell death : Where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer* 2000; 88: 2619-28.
19. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 307-20.
20. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Traganos F. The cell cycle effects of camptothecin. *Ann NY Acad Sci* 1996; 803: 93-100.

21. Mosesso P, Pichierrri P, Franchitto A, Palitti F. Evidence that camptothecin-induced aberrations in the G2 phase of cell cycle of Chinese hamster ovary (CHO) cell lines is associated with transcription. *Mutat Res* 2000; 452: 189-95.
22. Ueno T, Toi M, Bivén K, Bando H, Ogawa T, Linder S. Measurement of an apoptotic product in the sera of breast cancer patients. *Eur J Cancer* 2003; 39: 769-74.
23. Ulukaya E, Yilmaztepe A, Akgöz S, Linder S, Karadag M. The levels of caspase-cleaved cytokeratin 18 are elevated in serum from patients with lung cancer and helpful to predict the survival. *Lung Cancer* 2007; 56: 399-404.

= 국문초록 =

목적: 항암화학요법제의 투여로 유발되는 세포고사의 과정에서 cytokeratin 18의 분해 산물인 cytokeratin 18-Asp³⁹⁶ (M30) 단편의 노출된 신항원 결정기와 특이적으로 결합하는 M30 단클론항체를 이용한 세포고사 측정이 자궁경부암과 난소암에서 신보조 화학요법의 감수성을 평가하기 위한 표지자로서의 사용가능성을 알아보기 위해 본 실험을 실시하였다.

연구 방법: 1,000 nM의 paclitaxel, 250 µg/mL의 cisplatin과 30 µM의 camptothecin의 투여와 함께 배양한 HeLa와 OVCAR-3 세포 주들에서 M30 단클론항체를 이용한 면역형광염색 실시 후, 유세포분석에 의해 세포주기의 변화와 세포고사의 정도를 측정하였으며, 또한 이들의 배양액에서 M30 단클론항체를 이용한 ELISA법으로 세포고사의 정도를 측정했다.

결과: Paclitaxel 투여군에서 HeLa와 OVCAR-3 세포주 모두에서 대조군에 비해 G₀G₁이 감소되었고, G₂M 분기 분획은 증가하였다. Cisplatin 투여군에서 두 세포주에서 G₀G₁과 S 분획이 대조군과 차이가 없었으며, HeLa 세포주에서는 G₂M 분기 분획이 감소되고 OVCAR-3 세포주에서는 감소되는 경향이 관찰되었다. Camptothecin 투여군에서 S와 G₂M 분기 분획이 두 세포주 모두에서 대조군과 차이가 없었으며, HeLa 세포주에서는 G₀G₁ 분기 분획이 유의한 증가를 나타냈고, OVCAR-3 세포주에서는 G₂M 분기 분획이 감소된 경향을 보였다. G₀G₁하 첨봉 (Sub-G₀G₁ peak)에 의해 측정된 세포고사의 정도는 paclitaxel 투여군에서 HeLa와 OVCAR-3 세포주 모두에서 차이가 없었으나, cisplatin 투여군에서 OVCAR-3 세포주에서 유의하게 증가되었으며, camptothecin 투여군에서는 두 세포주 모두에서 유의하게 증가되었다. M30-FITC 형광도와 배양액 내에서 ELISA법으로 측정된 M30에 의한 세포고사의 정도는 모든 투여군에서 대조군보다 증가되었다.

결론: HeLa와 OVCAR-3 세포주들에서 paclitaxel, cisplatin과 camptothecin을 투여 후 다변수 유세포분석, 면역형광염색 및 ELISA 법에 의해 세포주기 변화와 G₀G₁하 첨봉 및 M30 항원을 측정한 결과 세포고사의 유의한 증가가 확인됐으며, M30 항원의 측정이 좀 더 유의한 반응을 보였다.

중심단어: 고사, Cytokeratin 18-Asp³⁹⁶ (M30), Flow cytometry, ELISA, HeLa, OVCAR-3