

## 난소암의 2차 항암제 내성 아세포주에서 다약물 내성을 억제시키는 Cyclosporine A의 역할

제주대학교 의과대학 산부인과학교실  
안 춘 산 · 김 성 엽 · 박 철 민

**목적** : 1차 항암제로 Cisplatin 제제를 사용한 저항성, 재발성 난소암 환자에서는 2차 항암제에 대한 반응을 역시 낮고 재발률 또한 높다. 그러므로 악성 종양 환자의 항암 치료에 있어서 항암제에 대한 내성은 계속되는 걸림돌이라 할 수 있다. 그 중에서도 저항성 난소암 조직에서 흔히 나타나는 다약물 내성 유전자인 MDR1은 대표적인 내성 기전의 하나로 잘 알려져 있다. 본 연구에서는 MDR1이 과발현된 2차 항암제 내성 아세포주에서 다약물 내성 억제제인 Cyclosporine A (CsA)를 사용하였을 때 다른 2차 항암제들에 대한 감수성을 관찰하고자 한다.

**연구 방법** : 2차 항암제 내성 아세포주에서 RT-PCR과 western blot 방법으로 다약물 내성 유전자와 단백질의 발현을 확인하고 MTT assay로 CsA 투여 전후의 5-Fluorouracil (5-FU), Doxorubicin, Paclitaxel에 대한 감수성을 측정하였다.

**결과** : 2차 항암제 내성 아세포주에서 다약물 내성 유전자와 단백질인 MDR1과 P-gp이 과발현된 것을 관찰할 수 있었고, CsA를 처리하여 MDR1/P-gp을 억제한 후 다른 항암제에 대한 감수성을 측정한 결과 Paclitaxel에 대한 감수성 변화가 가장 크게 나타났다.

**결론** : CsA는 다약물 내성을 억제하는 기전으로 내성 세포에서 항암제의 감수성을 높이는 역할을 한다. CsA를 처리한 후 Paclitaxel의 감수성이 제일 높아진 것을 볼 때 저항성, 재발성 난소암 환자에게 CsA와 같은 다약물 내성 억제제를 2차 항암제와 적절히 사용함으로써 치료에 상당한 도움을 줄 것으로 생각된다.

**중심단어** : 난소암, 다약물 내성, MDR1/P-gp, Cyclosporine A

## 서 론

난소암은 한국의 여성 생식기암 가운데 자궁 경부암 다음으로 발생빈도가 높은 암으로서 부인암 중에서 가장 높은 사망률을 나타내는 암으로 잘 알려져 있다.<sup>1</sup> 난소암 치료법 중 가장 중요한 부분은 바로 항암 화학요법이며 항암제에 대한 반응도를 예견하는 가장 중요한 요소 중의 하나가 바로 내성이라고 할 수 있다. 난소암의 항암제 치료에 있어서 20-30%는 1차 항암제 치료에 저항성을 보이는데 이는 항암제에 대한 내성의 출현 때문

이다. 즉 항암제에 대한 치료 성공 여부는 항암제에 대한 내성에 따라 좌우된다고 하여도 과언이 아니다. 현재 1차 항암제 치료 후 재발된 난소암에 대하여 다양한 2차 항암제가 사용되고 있으나 표준화된 치료법이 아직 없고 치료 성과도 크게 만족스럽지 못한 상황이다. 또한 2차 항암제 치료에 대한 내성 기전에 대해서도 알려진 것이 매우 적다. 그러므로 1, 2차 항암제를 포함한 여러 약물에 대한 내성 즉, 다약물 내성(multi-drug resistance; MDR)은 난소암 환자에 대한 항암 치료에서 계속되는 걸림돌이라 할 수 있겠다.

난소암의 내성 기전으로 여러 가지가 제기되고 있지만, 그 중에서도 저항성 난소암 조직에서 흔히 나타나는 다약물 내성 유전자인 MDR1은 대표적인 내성 기전의 하나로 잘 알려져 있다. MDR1은 핵 유전자로서 이 유전자의 발현으로 세포 내로부터 다른 화학적 물질을 밖으로 발산시키는 역할을 하는 막 단백질(transmembrane

논문접수일 : 2006년 8월 26일 채택일 : 2006년 11월 22일

교신저자 : 박철민, 690-716 제주도 제주시 삼도2동 154

제주대학교병원 산부인과학교실

전화 : 064) 754-1122 · 전송 : 064) 754-1109

E-mail : obgynd@yahoo.co.kr

이 논문은 2006년도 제주대학교 학술연구지원사업에 의하여 연구되었음.

protein)인 P-glycoprotein (P-gp)을 과발현시킨다.<sup>2</sup> 즉 MDR1의 표현형 단백질인 170KD의 P-gp는 암세포의 형질막에 존재하면서 ATP-dependent transporter로 작용하여 세포 내 항암 약물을 세포 밖으로 배출시키는 역할을 함으로써 다약물 내성에 기여한다고 할 수 있다.<sup>3-7</sup>

지금까지 다약물 내성을 억제시키고자 하는 많은 시도 가운데 바로 이 MDR1/P-gp이라는 다약물 내성 유전자와 단백질의 억제제에 관한 연구가 현재 가장 활발히 되어지고 있다.<sup>8</sup> 그 중에서도 Cyclosporine A (CsA)는 P-gp에 작용하여 항암제를 세포 밖으로 배출하는 것을 억제함으로써 세포 내 항암제 축적을 높여 항암제에 대한 감수성을 높여 주는 작용을 하는 것으로 잘 알려져 있고, 이미 여러 임상적 시도에서 좋은 효능을 보였고 약물독성도 보이지 않았다.<sup>9-13</sup>

본 연구에서는 1차 항암제인 Cisplatin 제제에 내성이 있는 난소암 세포주인 SNU-8/WT (wild type)으로부터 2차 항암제 5-fluorouracil (5-FU)에 대한 내성을 획득시킨 아세포주를 수립한 후 이 아세포주에서 MDR1과 P-gp가 과발현되는 정도를 측정하고, 또 여기에 MDR1/P-gp 억제제인 CsA를 사용하였을 때 각각 다른 항암제에 대한 감수성을 관찰하고자 한다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. 세포배양

Cisplatin 제제 치료를 받은 사람의 난소암으로부터 유도된 세포주 SNU-8/WT은 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하여 이것으로부터 2차 항암제 5-FU (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA)에 대하여 내성을 획득시켜서 2차 항암제 내성 아세포주를 수립하였고 저자들은 이를 SNU-8/F<sub>ac</sub>이라 명명하기로 하였다. 이를 수립하기 위해서 먼저 세포주 SNU-8/WT을 5-FU의 세포독성 농도 (IC<sub>50</sub>: 세포의 성장을 50%까지 억제할 수 있는 농도)를 함유한 배양액에서 3일간 배양하였다. 한 농도에서 약물을 투여 후 내성 표현형의 발현을 돕기 위해 약물을 제거하여 수일 또는 수주간 배양 후 약물을 다시 투여하는 방법으로 선별하여 약물이 존재하는 배지에서 잘 자라는 내성 아세포주 SNU-8/F<sub>ac</sub>을 수립한 후 안정될 때까지 일주일에 두 번씩 최소 6개월 이상 계대 배양 후 실험에 사용하였다.<sup>15</sup> 이렇게 만들어진 아세포주 SNU-8/F<sub>ac</sub>을

37°C, 5% CO<sub>2</sub>와 습윤화된 배양기(Sanyo<sup>®</sup> Electric Biomedical Co., Ltd., Osaka, Japan) 내에서 배양하였다. 배양액은 56°C에서 30분간 열처리된 fetal bovine serum (FBS, GibcoBRL<sup>®</sup> Grand Island, NY) 10%, 항생제(antibiotic-antimycotic, GibcoBRL)와 2µg/ml의 5-FU가 함유된 RPMI 1640 (RPMI medium 1640, GibcoBRL)배지를 사용하였다. 배양액은 2-3일마다 교환하여 세포 배양을 하였다.

### 2. 세포 독성실험

항암제의 세포 독성실험은 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay를<sup>14</sup> 사용하였다. 96 well microplate를 이용하였으며 3개 well에서 실험하였고 3번 반복실험하였다. 세포독성실험에 사용한 약물은 Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA)의 것을 사용하였다.<sup>16</sup>

### 3. RNA 추출과 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay

TRIzol Reagent (Invitrogen Carlsbad, CA)을 이용하여 총 RNA를 분리 추출하였다. RNA 추출과 Polypropylene tube에 5×10<sup>6</sup>개의 세포를 침전시킨 후 TRIzol 1 ml을 넣고 5분 동안 25°C에서 incubation 후 200µl chloroform을 넣고 15초 동안 손으로 가볍게 섞어주고 2-3분 동안 25°C에서 incubation시켰다. 4°C에서 14,000 rpm으로 15분 동안 원심분리 후 상층액을 tube에 옮겼다. Tube에 옮긴 상층액에 500µl isopropyl alcohol 넣고 잘 섞은 다음 10분 동안 25°C에서 incubation시켰다. 4°C에서 14,000 rpm으로 15분 동안 원심 분리하여 상층액을 버리고 75% 에탄올을 RNA pellet에 넣고 vortexing하고 4°C에서 14,000 rpm으로 5분 동안 원심분리하였다. 그 다음 실온에서 pellet을 건조시킨 후 0.1% DEPC water에 다시 녹였다. RNA 농도(1 A260 unit of single-stranded RNA=40µg/ml)는 260 nm에서 측정하였고(DUR 650 spectrophotometer, Beckman), RNA 순도는 A260 (260 nm에서의 흡광도)/A280 (280 nm에서의 흡광도) 비로, RNA 보존도는 5µg RNA를 전기영동하여 확인하였다. 이상에서 사용된 모든 용액은 제조한 후 하룻밤 동안 37°C에 방치 후 121°C에서 20분 동안 고압 증기 멸균한 0.1% DEPC 용액으로 만들었다.

RT-PCR assay는 First strand cDNA를 1U/μl RNasin (Promega, Madison, WI, USA), oligo (dT) 450 ng, 40 mM Tris-HCl (pH 8.4), 100 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM each dNTP, 10 mM DTT (Gibco)와 MMLV reverse transcriptase (Gibco) 200 U가 함유된 20μl의 용액에서 총 RNA 1μg으로부터 합성하였다.

PCR은 25 ng의 RNA로부터 합성된 cDNA에 1×PCR 완충액(10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 100μg/ml gelatin, 0.05% triton X-100), primers 10 pmole, 50μM dNTP, taq DNA polymerase (Invitrogen) 2.5 unit를 첨가하여 25μl 반응액에서 시행하였다. PCR반응에 사용한 MDR1 primer은 295bp로서 sense 5'-CTGGT-TGATGTGCACGATGTTGG-3'와 antisense 3'-TGCCAA-GACCTCTTCAGCTACTG-3'이며 94°C, 12분; 94°C, 30 초; 52°C 30초; 72°C, 1분으로 33 cycle로 하였고 β-actin primer은 501 bp로서 sense 5'-GACTATGACTTAGTTGC-GTTA와 antisense 5'-GTTGAACTCTCTACATACTCCG 이며 94°C, 12분; 94°C, 30 sec; 56°C, 30 sec; 72°C, 1분으로 28 cycle로 하였다. PCR기기는 Gene Amp PCR system 2400 (Perkin Elmer)을 사용하였다. PCR 산물 25μl로부터 MDR1과 β-actin 5μl를 1.5% agarose gels에서 15분 동안 전기영동하였다. 0.5μg/ml ethidium bromide용액에서 10 min 동안 염색하고 3차 증류수에 15분 동안 탈색한 후 자외선 광에서 관찰하였다.

#### 4. Western blot analysis

Drug-sensitive한 SNU-8/WT 세포와 drug-resistant한 SNU-8/F<sub>ac</sub> 세포 2×10<sup>5</sup>개를 100 mm 배양접시에 분주하여 배양액을 첨가하여 배양하였다. 60-70% 정도 배양되면 trypsin (Gibco)을 처리하여 세포를 수집하였다. 차가운 PBS buffer (Gibco)로 3번 씻은 다음 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 10 mg/ml aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (sigma)를 250μl 넣고 잘 혼합한 후 초음파분쇄기(ultra-sonicator)로 각 sample당 20초씩 vortexing하였다. 그리고 나서 원심분리로 4°C에서 14,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하였다. 상층액만 새로운 tube에 옮기고 bicinchoninic assay (BCA)로 단백질 정량하고 같은 양의 loading buffer (0.2 mM Tris-HCl (pH 6.8), 3% (w/v) SDS, 30% (v/v) glycerol, 15% (v/v) mercaptoethanol와 0.01%

(w/v) bromophenol blue를 넣고 95°C에서 5분 동안 끓였다. 그 다음 7%와 12% SDS-PAGE gel (polyacrylamide gels)에 50μg loading하여 1시간 30분 전기영동하였다. 전기영동 후 nitrocellulose membranes (Millipore, Immobilon™-P, USA)에 80 V의 전압에서 3시간 동안 electrotransfer를 하였다. Electrotransfer한 후 5% skim milk에 1시간 blocking하고 membranes를 anti P-gp antibody (Calbiochem MA, USA)(1 : 1,000)에 1시간 반응시켰다. TBS-T용액으로 membranes를 10분씩 4번 세척한 후 2차 항체 rabbit-antimouse IgG (diluted 1 : 5000, Sigma)에서 1시간 반응시켰다. TBS-T 용액으로 membrane을 10분씩 4번 세척한 후 과산화수소와 발색제를 함유한 반응액(ECL-solution)(Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA)을 처리하고 X-ray필름에 노출시킨 다음 현상하였다.

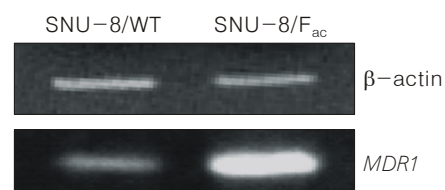
## 결 과

### 1. SNU-8에서 항암제에 대한 감수성 측정

사람의 난소암 세포주인 SNU-8/WT에서 항암제의 감수성을 측정한 결과 cyclophosphamide, cisplatin에 낮은 감수성을 보이는 반면 5-FU, Doxorubicin (DX)와 Paclitaxel에는 높은 감수성을 보이는 것을 관찰할 수 있었다. 그래서 실험에 이 세 가지를 2차 항암제로 선택하였다.

### 2. RT-PCR assay와 Western blot에서 다약물 내성 유전자와 단백질의 발현 측정

저자들은 SNU-8/WT으로부터 SNU-8/F<sub>ac</sub>를 수립하였고, 여기에 mRNA 수준과 단백질 수준에서 MDR1과 P-gp이 과발현되는지 여부를 알기 위하여 RT-PCR assay

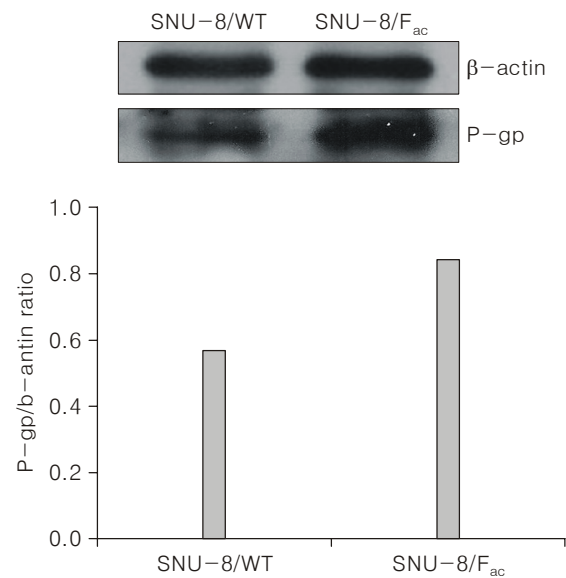


**Fig. 1.** The expression of multi-drug resistance genes (MDR1) in SNU-8/WT and SNU-8/F<sub>ac</sub>. Gene expression was determined by using a RT-PCR assay. The β-actin was used as a control.

**Table 1. The ratio of MDR1 to  $\beta$ -actin amount in SNU-8/WT and SNU-8/F<sub>ac</sub>**

Cell line	MDR1/ $\beta$ -actin (fold*)
SNU-8/WT	0.07
SNU-8/F <sub>ac</sub>	0.15 (2.14)

\*fold; the ratio of relative MDR1 amounts of SNU-8/F<sub>ac</sub> to SNU-8/WT

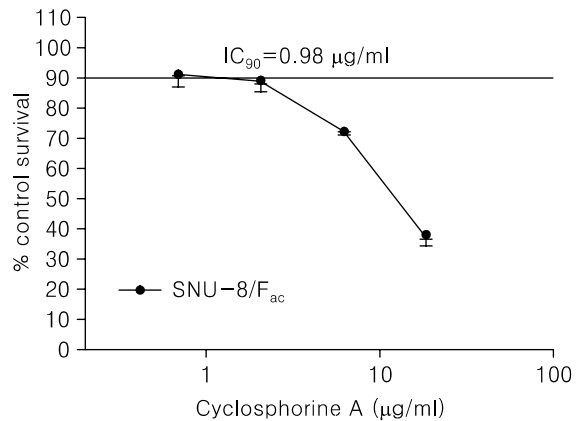


**Fig. 2. The comparison of P-gp levels between SNU-8/F<sub>ac</sub> and SNU-8/WT by western blot analysis.**

와 Western blot analysis로 확인하였다.  $\beta$ -actin을 조절 군 (control group)으로 했을 때 MDR1 mRNA의 상대적 양은 SNU-8/WT에서는 0.07, SNU-8/F<sub>ac</sub>에서는 0.15이었다. 이 두 세포주를 비교했을 때에는 SNU-8/WT보다 SNU-8/F<sub>ac</sub>에서 MDR1 mRNA가 약 2.14배 더 과발현된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1, Table 1). 그리고 P-gp은 SNU-8/WT보다 SNU-8/F<sub>ac</sub>에서 약 1.7배 과발현된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

### 3. SNU-8/F<sub>ac</sub>에서 CsA의 세포독성 측정

2차 내성 아세포주 SNU-8/F<sub>ac</sub>에서 CsA에 대한 세포독성 실험으로 세포독성을 측정하였다. 측정결과 SNU-8/F<sub>ac</sub>에서 10% 정도의 세포를 사멸시키는 약물 농도인 IC<sub>90</sub>은 0.98 $\mu$ g/ml이었다(Fig. 3). IC<sub>90</sub>은 CsA가 암세포를 거의 사멸시키지 않으면서 다만 다약물 내성만을 억제



**Fig. 3. The cytotoxicity of CsA in the SNU-8/F<sub>ac</sub>. The cytotoxicity was determined by MTT assay. The experiments were carried out in triplicate (IC<sub>90</sub> ( $\mu$ g/ml); drug concentration that can kill the 10% of cancer cells and make MDR1/P-gp suppress).**

시키는 농도로써, CsA와 다른 항암제를 투여한 후에 암 세포의 항암제에 대한 내성 정도와 반응도를 평가하고자 할 때 사용된다.<sup>17</sup>

### 4. CsA의 병합 사용에서 항암제 감수성 관찰

SNU-8/F<sub>ac</sub>에서 CsA의 IC<sub>90</sub>값 약 1 $\mu$ g/ml의 농도로 처리하여 다약물 내성을 억제시킨 다음 5-FU, Doxorubicin (DX), Paclitaxel의 항암제를 사용하였을 때 이들 항암제에 대한 감수성을 각각 측정하였다. 50%의 세포를 사멸시키는 항암제의 농도 즉, 효과적인 항암제의 농도를 의미하는 IC<sub>50</sub>를 CsA 사용 전후에 각각 측정하였는데 5-FU의 CsA 사용 전후 IC<sub>50</sub> 값은 21.02/15.74 $\mu$ g/ml, DX는 0.145/0.111 $\mu$ g/ml으로 큰 차이를 보이지 않았다. 하지만 Paclitaxel에서는 IC<sub>50</sub> 값이 CsA 사용 전에는 >200 $\mu$ g/ml 인데 비해 사용 후 1.97 $\mu$ g/ml로 1/100 이상 줄어들었다. 다시 말해서 Paclitaxel에 대한 감수성이 CsA사용 후 100배 이상 증가하였음을 알 수 있었다(Fig. 4, Table 2).<sup>16</sup>

## 고 찰

1차 항암 요법으로 Cisplatin 등의 백금제제를 사용한 저항성, 재발성 난소암 환자는 2차 항암제 반응률이 10% 내외이고 평균 생존율이 6-7개월 정도인 것으로 알려져 있다.<sup>18</sup> 1차 항암제에 대한 내성기전은 여러 가지 보고가 있으나, 2차 항암 치료에 대한 내성 기전에 대해

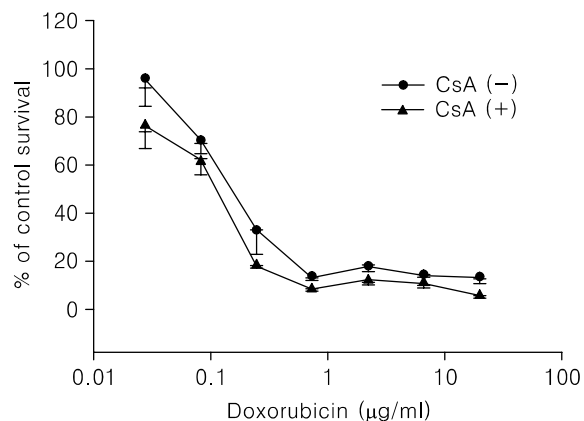
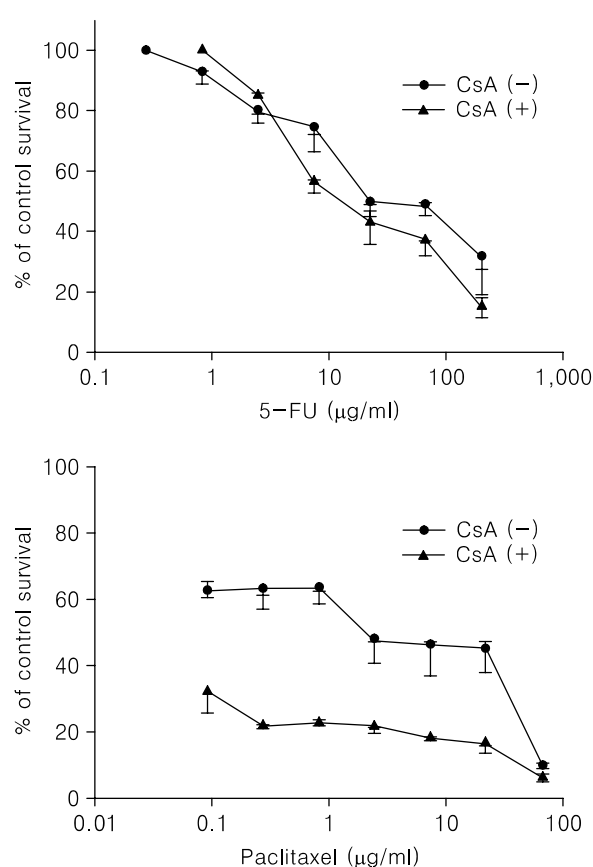


Fig. 4. The effect of CsA on cytotoxicity of anticancer drugs in the SNU-8/F<sub>ac</sub>. The cytotoxicity was determined by MTT assay. The experiments were carried out in triplicate (CsA (-); without Cyclosporine A, CsA (+); with Cyclosporine A).

Table 2. The relative sensitivity of SNU-8/F<sub>ac</sub> to 3 anticancer drugs with or without CsA

Drugs	IC <sub>50</sub> * (μg/ml)		Relative sensitivity (fold) <sup>†</sup>
	CsA (-)	CsA (+)	
5-FU	21.02	15.74	1.34
Doxorubicin	0.145	0.111	1.31
Paclitaxel	>200	1.97	>100

\*IC<sub>50</sub> (μg/ml); drug concentration that can kill the 50% of cancer cells

<sup>†</sup> relative sensitivity (fold); the IC<sub>50</sub> ratio of CsA(-) to CsA(+) in (CsA(-); without Cyclosporine A, CsA(+); with Cyclosporine A)

서도 알려진 것은 매우 적다. 보통 한 항암제에 내성이 획득되면 전혀 사용해 보지 않은 다른 항암제에도 내성이 형성되는 것으로 알려져 있고 또한 교차 내성과 여러 가지 기전의 다약물 내성이 형성되는 것으로 알려져 있

다.<sup>19-21</sup> 지금까지 알려진 다약물 내성의 기전으로는 여러 가지가 있는데, 특히 대표적인 내성 기전이라 할 수 있는 다약물 내성 유전자인 MDR1은 세포 내로부터 다른 화학적 물질을 세포 밖으로 발산시키는 역할을 하는 막 단백질(P-gp)을 활성화시키는 작용을 한다.<sup>3-7</sup> 다시 말해서 다약물 내성 단백질인 P-gp는 암세포의 세포막에 존재하는 efflux pumps protein으로서 MDR1유전자의 증폭으로 과발현된다.<sup>21</sup> 최근 난소암의 면역조직화학적 연구에서 다약물 내성의 기전으로 MDR1/P-gp의 과발현 현상이 많이 보고되고 있으며,<sup>23-25</sup> 백금제제 내성 암세포에서도 과발현된다는 많은 보고가 있다.<sup>26,27</sup> 하지만 일부에서는 MDR1/P-gp이 Cisplatin의 항암치료에서 일반적인 기전은 아니라는 보고도 있으며,<sup>28</sup> 반대로 5-FU을 처리한 대장암 세포주에서 MDR1/P-gp이 과발현되었다는 보고도 있다.<sup>29</sup> 본 실험에서는 cisplatin에 내성이 획득된 세포주(SNU-8/WT)와 5-FU에 내성이 획득된 아세포주(SNU-8/F<sub>ac</sub>) 모두에서 MDR1/P-gp이 과발현되는 것을 관찰할 수 있었고, 이것을 볼 때 간접적으로 MDR1/P-gp이

난소암 환자의 항암제 내성 기전에서 중요한 역할을 할 것이라는 것을 다시 한 번 확인하였다.

현재 다약물 내성을 억제하고자 하는 많은 시도 가운데 MDR1/P-gp 억제제에 관한 연구가 많이 되어지고 있다. 과거 Verapamil과 PSC 833과 같은 제1세대 P-gp 억제제는 인체 내에서 낮은 농도에서는 효과적이지 않았고, 또 약물독성으로 인해 환자의 치료에 실패하게 되어 사용이 불가능하였다.<sup>30</sup> 하지만 장기이식 후에 주로 사용되는 일차성 면역 억제제 중 하나인 Cyclosporine A (CsA)는 임상적으로 P-gp의 매우 유력한 억제제로 보고되고 있다.<sup>31</sup> 이미 CsA는 골수성 림프종(myelomic lymphoma), 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia) 등의 임상적 시도에서 좋은 효능을 보였고 약물독성도 보이지 않았다.<sup>9-13</sup> CsA는 P-gp와 특이하게 상호 작용하여 다약물 내성 세포에서 항암제의 감수성을 높이는 역할을 한다. 다시 말해서 CsA가 P-gp에 작용하여 항암제를 세포 밖으로 배출하는 것을 억제함으로써 세포 내 항암제 축적을 높여 항암제에 대한 감수성을 높여 주는 작용을 하게 되는 것이다. 이러한 CsA의 MDR1/P-gp 억제 기능을 이용해 기존의 다른 항암제를 병합하여 사용하는 연구가 최근 활발히 진행되어지고 있다.<sup>32</sup> 그래서 본 연구에서는 2차 항암제 내성 아세포주에 CsA를 사용하여 MDR1/P-gp를 억제시킨 후 다른 2차 항암제들의 감수성을 측정하여 보았다. SNU-8/WT에서 cyclophosphamide, cisplatin에 대해 높은 내성을 보였으나 5-FU, DX, Paclitaxel에서는 높은 감수성을 보였다. 이것은 난소암 치료에서 2차 항암제로 5-FU, DX를 잘 사용하지 않았지만 cisplatin이 포함된 1차 항암제 치료에서 내성이 획득된 환자에게 2차 항암제 선택에 있어서 이러한 약물도 고려할 수 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서는 높은 감수성을 보인 2차 항암제 중에서 5-FU를 선택하여 이 약물에 대한 내성을 획득시킨 내성 아세포주인 SNU-8/F<sub>ac</sub>를 수립하여 보았다. 그리고 나서 CsA의 IC<sub>90</sub> 값을 SNU-8/F<sub>ac</sub>에 처리하여 MDR1/P-gp에 의한 다약물 내성을 억제시킨 다음 다시 5-FU, DX, Paclitaxel에 대한 세포 독성을 각각 측정하였다. 그 결과 5-FU와 DX에 대한 감수성은 CsA 사용 전후 큰 차이가 있는 것은 아니었지만 Paclitaxel에서는 CsA를 사용하고 나서 감수성이 100배 이상 증가함을 관찰할 수 있었다. 이와 같이 5-FU와 DX의 경우처럼 CsA처리 전후의 감수성 차이가 거의 없는 것을

볼 때 2차 항암제 내성 아세포주에서 MDR1/P-gp 이외에 다른 내성 기전도 관여하고 있을 것이라는 알 수 있었고, 반대로 Paclitaxel처럼 CsA 사용 전에는 높은 내성을 보였으나 CsA를 병합 사용하였을 때 감수성이 매우 높아진 것을 볼 때 MDR1/P-gp이 Paclitaxel의 다약물 내성기전에 중요한 역할을 할 것이라는 것을 알 수 있었다. 지금까지 기존의 연구에서는 한 종류의 항암제에 대한 내성 세포로만 항암제 내성관련 기전을 연구하여 왔지만, 본 연구는 2가지 항암제에 대한 내성을 획득시킨 세포주에서의 결과로서 한 가지 항암제에만 내성이 형성된 세포주에서 보고된 기존의 연구와는 달리 MDR1/P-gp 이외에도 다른 복합적인 여러 내성 기전이 작용하였을 것으로 생각된다.

본 연구 결과가 비록 직접 중앙조직을 대상으로 한 것이 아니고 세포 배양에서 얻어진 결과로서의 한계는 있지만 백금 제제 항암제와 2차 항암제 내성 아세포주에서 MDR1/P-gp 유전자가 모두 과발현되는 것을 알 수 있었고, 또 2차 항암제 내성 아세포주에 다른 2차 항암제와 더불어 CsA와 같은 MDR1/P-gp 억제제를 병합 사용하였을 때 감수성이 높아지는 Paclitaxel과 같은 2차 항암제의 존재도 확인할 수 있었다. 이에 저자들은 이와 같은 다약물 내성 억제제를 여러 2차 항암제와 적절히 병합하여 사용함으로써 1차 항암제에 내성이 있는 난소암 환자의 치료에 상당한 도움을 줄 것으로 생각되고 이에 대한 기전은 앞으로 더욱더 활발히 연구되어야 할 것으로 생각되는 바이다.

## 참고문헌

1. Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics. CA Cancer J Clin 1996; 46; 5-27.
2. Riordan JR, Deuchars K, Kartner N, Alon N, Trent J, Ling V. Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. Nature 1985; 16; 817-9.
3. Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, et al. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistance human cells. Cell 1986; 47: 381-9.
4. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. Biochim Biophys Acta 1976; 455: 152-62.
5. Riordan JR, Deuchars K, Kartner N, Alon N, Trent J, Ling V. Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. Nature 1985; 316; 817-9.
6. Brangi M, Litman T, Ciotti M, Nishiyama K, Kohlhagen G,

- Takimoto C, et al. Camptothecin resistance: Role of the ATP-binding cassette (ABC), mitoxantrone-resistance half-transporter (MXR), and potential for glucuronidation in MXR-expressing cells. *Cancer Res* 1999; 59: 5938-46.
7. Kim KT, Nah DS, Hwang YY, Park MH, Lee YY, Lee SW. Multivariable analysis of glutathione S-transferase- $\pi$ , P-glycoprotein and metallothionein as indicator of resistance to chemotherapy in epithelial ovarian tumor. *KSGOC* 1996; 7: 135-44.
  8. Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res* 1981; 4: 1967-72.
  9. Nooter K, Sonneveld P, Oostrum R, Herweijer H, Hagenbeek T, Valerio D. Overexpression of the *mdr 1* gene in blast cells from patients with acute myelocytic leukemia is associated with decreased anthracycline accumulation that can be restored by cyclosporine-A. *Int J Cancer* 1990; 45: 263-8.
  10. Coley HM, Twentyman PR, Workman P. Improved cellular accumulation is characteristic of anthracyclines which retain high activity in multidrug resistant cell lines, alone or in combination with verapamil or cyclosporine A. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 4467-75.
  11. Naito M, Tsuge H, Kuroko C, Koyama T, Tomida A, Tatsuta T, et al. Enhancement of cellular accumulation of cyclosporine by anti-P-glycoprotein monoclonal antibody MRK-16 and synergistic modulation of multidrug resistance. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 311-6.
  12. List AF, Kopeccky KJ, Willman CL, Head DR, Persons DL, Slovak ML, et al. Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: A Southwest Oncology Group study. *Blood* 2001; 98: 3212-20.
  13. Smeets M, Raymakers R, Muus P, Vierwinden G, Linssen P, Masereeuw R, et al. Cyclosporine increases cellular idarubicin and idarubicinol concentrations in relapsed or refractory AML mainly due to reduced systemic clearance. *Leukemia* 2001; 15: 80-8.
  14. Pieters R, Huismans DR, Leyva A, Veerman AJ. Adaptation of the rapid automated tetrazolium dye based (MTT) assay for chemosensitivity testing in childhood leukemia. *Cancer Lett* 1988; 41: 323-32.
  15. Choi CH, Bark H, Chung JM, Park EK, Kim SH. Elevated reactive oxygen species but not glutathione regulate mercury resistance to AML-2/DX100 cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2006; 28: 545-55.
  16. Choi CH. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell Int* 2004; 5: 30.
  17. Uchiyama-Kokubu N, Watanabe T, Nakajima M. A bioassay for the activity of PSC 833 in human serum for modulation of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *AntiCancer Drugs* 2000; 11: 583-90.
  18. Poveda A. Remarks and conclusions on ovarian cancer treatment. *Int J Gynecol Cancer* 2001; 11: 77-81.
  19. Mano MS, Awada A, Minisini A, Atalay G, Lago CD, Cardoso F, et al. Remaining controversies in the upfront management of advanced ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2004; 14: 707-20.
  20. McGuire WP, Ozols RF. Chemotherapy of advanced ovarian cancer. *Semin Oncol* 1998; 25: 340-8.
  21. Conte PF, Cianci C, Gadducci A. Up date in the management of advanced ovarian carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 1999; 32: 49-58.
  22. Riordan JR, Ling V. Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicines permeability. *J Biol Chem* 1979; 254: 12701-5.
  23. Baekelandt MM, Holm R, Nesland JM, Trope CG, Kristensen GB. P-glycoprotein expression is a marker for chemotherapy resistance and prognosis in advanced ovarian cancer. *Anticancer Res* 2000; 20: 1061-7.
  24. Goff BA, Paley PJ, Greer BE, Gown AM. Evaluation of chemoresistance markers in women with epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2001; 81: 18-24.
  25. Brinkhuis M, Izquierdo MA, Baak JP, van Diest PJ, Kenemans P, Scheffer GL, et al. Expression of multidrug resistance-associated markers, their relation to quantitative pathologic tumour characteristics and prognosis in advanced ovarian cancer. *Anal Cell Pathol* 2002; 24: 17-23.
  26. Barrand MA, Heppell-Parton AC, Wright KA, Rabbitts PH, Twentyman PR. A 190-kDa protein overexpressed in non-P-glycoprotein containing multidrug-resistant cells and its relationship to the MRP gene. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 110-7.
  27. Choi CH, Cha YJ, An CS, Kim KJ, Kim KC, Moon SP, et al. Molecular mechanisms of heptaplatin effective against cisplatin-resistant cancer cell lines: Less involvement of metallothionein. *Cancer Cell Int* 2004; 4: 6.
  28. Nakayama K, Kanzaki A, Ogawa K, Miyazaki K, Neamati N, Takebayashi Y. Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) as a cisplatin based chemoresistance marker in ovarian carcinoma: Comparative analysis with expression of MDR1, MRP1, MRP2, LRP AND BCRP. *Int J Cancer* 2002; 101: 488-95.
  29. Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992; 258: 1650-4.
  30. Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci* 2000; 11: 265-83.
  31. Theis JG, Liau-Chu M, Chan HS, Doyle J, Greenberg ML, Koren G. Anaphylactoid reactions in children receiving high-dose intravenous cyclosporine for reversal of tumor resistance: The causative role of improper dissolution of Cremophor EL. *J Clin Oncol* 1995; 13: 2508-16.
  32. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 15665-70.

## A role of Cyclosporine A that suppresses multi-drug resistance (MDR) in the secondary chemotherapy drug resistant cell line of ovarian cancer

Chun San An, Sung Yob Kim, Chul Min Park

*Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Cheju National University, Jeju, Korea*

---

**Objective :** Resistant, recurrent ovarian cancer patients who had first chemotherapy with Cisplatin have showed low reactivity and high recurrence in the secondary chemotherapy. Therefore, multi-drug resistance (MDR) to chemotherapy is a major obstacle in attempts to improve the clinical outcome of ovarian cancer patients. The aim of our study is to analyze the sensitivity of some chemotherapy drugs when we co-use Cyclosporine A (CsA), which suppresses MDR, in the secondary drug resistant cell line.

**Methods :** After establishing the secondary drug resistant cell line, drug sensitivity was measured by MTT assay. MDR gene and protein were analyzed by RT-PCR and western blotting assay.

**Results :** MDR gene (MDR1) and protein (P-gp) were overexpressed in the secondary drug resistant cell line. When we measured the sensitivity of some chemotherapy drug after using the amounts of CsA that can suppress MDR1/P-gp, the sensitivity of Paclitaxel was highest.

**Conclusion :** CsA has a role that makes the sensitivity of chemotherapy drug higher in the secondary drug resistant cell line by suppression of multi-drug resistance. Therefore, we could expect that the proper use of MDR suppresser like CsA with secondary chemotherapy drug would help to cure resistant, recurrent ovarian cancer patients.

**Key Words :** Ovarian cancer, Multi-drug resistance, MDR1/P-gp, Cyclosporine A

---