

HeLa 자궁경부암 세포주에서 sodium butyrate와 rapamycin의 성장억제 효과

계명대학교 의과대학 동산의료원 산부인과학교실
전용준* · 조치흠* · 신소진 · 권상훈 · 차순도

목적 : 자궁경부암 세포주에 sodium butyrate와 rapamycin을 처리한 후 증식억제 효과 및 세포자멸사 유도를 확인하고 이와 관련된 유전자의 발현에 대하여 알아보고자 하였다.

연구 방법 : 자궁경부암 세포주를 일차배양한 후 sodium butyrate와 rapamycin을 농도별로 처리하고 세포생존수로 증식억제 효과를 관찰하고 세포주기분석을 통하여 세포자멸사와의 관계를 조사하였으며 Western blot analysis 방법으로 세포주기 관련 유전자의 발현을 측정하였다.

결과 : 자궁경부암 세포주에 sodium butyrate를 농도별로 처리한 결과 24시간 후의 세포증식 억제효과는 농도가 증가할수록 증가하였으며 10 mM에서 58%까지의 억제를 보였으며, rapamycin의 경우는 100 nM에서도 23%의 억제만 보였으나 동시에 투여하여서는 상승작용으로 78%의 증식이 억제되었으며 통계적으로 의미 있는 유의성을 보였다. 이러한 증식억제 효과는 FACS 분석을 통하여 세포자멸사에 의한 것임을 확인하였으며, 기전을 알아보기 위해 세포주기 관련 유전자 발현도를 측정한 결과 p27, p21, 및 p53은 sodium butyrate와 rapamycin의 동시투여에서 농도에 비례하여 발현도가 증가하였으며, cyclin E, A, B1은 농도에 비례하여 발현의 감소를 확인하였다. Caspase pathway를 조사한 결과 caspase 3의 활성화, PARP 단백질의 분절은 동시 투여 시 증가를 보였다.

결론 : 이상으로 sodium butyrate와 rapamycin에 의한 상승작용으로 자궁경부암 세포의 증식억제가 일어나며 그 기전은 p27, p21, p53의 발현 증가와 PARP 분절 및 caspase 3의 활성화로 보아 종국에는 caspase pathway를 거쳐 세포자멸사를 유도하는 효과가 있는 것으로 생각된다.

중심단어 : 자궁경부암 세포주, Rapamycin, Sodium butyrate, 세포자멸사

서론

자궁경부암은 우리나라 여성에서 유방암, 위암, 대장암에 이어 네 번째로 높은 발생빈도를 보이는 악성종양으로서¹ 2003년 한국 중앙 암등록사업 연례보고서에 의하면 전체 여성암의 약 10.1%에 달하고 2001년도 대한 산부인과학회 부인암 등록사업 결과를 보면 연간 2,800명의 신환이 발생하고 있다.² 전 세계적으로는 여성에서 발생하는 암 중 2번째로 많이 발생하며 연간 50여만 명

의 신환이 발생하는 것으로 추정되고 있고³, 전체 환자의 약 80%정도가 아시아, 아프리카 및 남미 등지에서 발생하고 있다.

일반적으로 자궁경부암의 조기 검진이 확대된 이후로 전암 병변이나 조기암에서 발견되는 경우는 국소 치료나 수술로 완치될 수 있는 수준이다. 그러나 진행된 자궁경부암이나, 재발된 경우에는 수술이나 방사선 요법으로 완벽한 치료가 되지 못해 낮은 생존율을 보이고 있다.⁴ 이러한 경우에 좀 더 효과적인 항암화학요법제의 개발이 절실한 상태이다.

Rapamycin은 FK 506 binding 단백질 FKBP 12의 immunophilin계의 하나로 mTOR의 억제를 통해 세포의 증식억제를 유도한다. 이러한 mTOR의 억제는 S6K1과 4E-binding protein 1의 활성화와 인산화를 감소하여 RNA에서 단백질로 이행을 억제하는 역할을 한다.^{5,6} 이전의

논문접수일 : 2007년 4월 21일 채택일 : 2007년 5월 31일

교신저자 : 차순도, 700-712 대구시 중구 동산동 194번지

계명대학교 동산의료원 산부인과

전화 : 053) 250-7509 · 전송 : 053) 250-7599

E-mail : sdcha@dsmc.or.kr

이 논문은 한국과학재단 MRC 연구센터(R13-2002-028-01003-0) 지원으로 수행되었음.

*These two authors equally contributed.

발표에서 rapamycin을 이스트와 mammalian 세포에 투여하여 mTOR의 기능소실과 G1기를 통해 세포주기를 억제한다고 하였다.⁷ 그러므로 부인암에서 rapamycin의 사용가능성을 제기할 수 있겠다. Sodium butyrate는 지방산에 존재하는 것으로 n-butyric 산의 sodium salt이며 변형된 세포에서 세포자멸사를 유도하는 기능이 있다.⁸ 또한 다른 기능으로는 histone deacetylase inhibitor로 인유두종 바이러스(human papillomavirus; HPV) 양성인 암 세포에서 G1, S 주기의 억제를 보이고, p21과 p27의 상승작용을 유도하여 cyclin dependent kinase 2의 활성을 억제하여 세포자멸사로 이르게 한다.⁹ 다른 종류의 암세포에서도 세포 증식 억제 및 세포자멸사를 유도하는 것으로 알려져 있다.^{10,11} 저자는 이 두 약제를 동시 투여하여 자궁경부암에 미치는 영향에 대한 연구가 보고된 바 없어, 자궁경부암 세포에 대한 효과를 실험적으로 규명하기 위하여 HPV-18 양성인 HeLa 세포주에 sodium butyrate와 rapamycin을 처리한 후 증식억제 효과 및 세포자멸사 유도를 확인하고 이와 관련된 유전자의 발현에 대하여 관찰하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

1) 자궁경부암 세포의 배양

HPV-18 양성인 HeLa 세포주를 10% fetal bovine serum 이 든 Dulbecco's modified eagle's medium/Nutrient mixture F-12 ham 배양액에서 부유시킨 후 37°C 5% CO₂ 배양기에서 배양하고, 24-48시간 후 배양액을 교환하였다.

2) 생존세포수의 산정

자궁경부암 세포주인 HeLa 세포를 60 mm tissue culture dish에 2×10^5 cell/dish로 세포를 분주하였다. 24시간 배양시킨 후 sodium butyrate와 rapamycin (Sigma, USA)을 농도별로 처리한 후 배양시켰다. 이렇게 배양시킨 세포를 24-48시간 후 PBS 용액으로 수세 후, 1× trypsin-EDTA로 재부유시킨 뒤, 1,000 rpm 3분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 PBS용액으로 수세하여 재부유시킨 후, cell suspension 20 μ l와 동량의 trypan blue 용액을 혼합하여 1분간 방치해 두었다. Hemacyto-

meter상에서 3회 반복하여 살아있는 세포수만을 계산하였다.

2. 연구 방법

1) FACS (fluorescence-activated cell storer)에 의한 세포 주기 분석

자궁경부암 세포를 60 mm tissue culture dish에 3×10^5 cells/dish로 세포를 분주하였다. 배양기에 24시간 배양한 후 sodium butyrate와 rapamycin을 농도별로 처리하였다. 세포를 24-48시간 배양시키고 PBS로 수세 후, 1×trypsin-EDTA로 재부유시킨 뒤, 1.5 ml tube에 옮기고 1,000 rpm으로 3분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 PBS용액으로 재부유시킨 뒤 1,000 rpm으로 3분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 냉장보관된 ethanol 1 ml를 넣고 재부유시킨 후, 4°C에 1시간 이상 세포를 고정시켰다. 1,000 rpm으로 3분간 원심분리하고 상층액을 제거한 후 PBS용액으로 수세한 후, Trisodium citrate (Sigma, MO, USA) 0.1%, IGEPAL-Ca-630 (Sigma, USA) 0.1%가 함유된 용액에 RNase A 5 mg/ml, propidium iodide (Sigma, USA) 용액을 첨가하여 암실에서 1시간 동안 4°C에서 염색한 후 유세포분석기(FACS)를 이용하여 DNA 함량에 따른 histogram을 측정하였다.

2) Western Blot analysis

Sodium butyrate와 rapamycin을 농도별로 처리한 후 cyclin E, D1, B1, A 및 세포자멸사에 관계하는 p27, p53, p21, pRb, active-caspase 3, pro-caspase 9 및 PARP 유전자 단백질의 발현차이를 확인하고, 세포주기 회로에 관계하는 유전자의 발현을 보고자 Western blot을 시행하였다. 분쇄한 세포에서 Lysis Buffer (10 mM Tris-Cl (pH 7.4), 5 mM EDTA (pH 8.0), 130 mM NaCl, 1% TritonX-100), 0.2 M phenyl-methyl-sulfonyl fluoride, proteinase inhibitor cocktail을 넣고 얼음에 30분간 둔 후 원심분리 하여 상층을 취하고 Biorad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories Inc., USA)를 이용하여 단백질을 추출한 후 분광광도계 (Du® 650, Beckman Coulter Inc., USA)의 595 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질을 정량하였다. 얻어진 단백질 분획을 전기영동하고 nitrocellulose paper (Immobilin Milipore, UK)로 전기이동(electrotransfer)을 시행하였다. 전기이동된 막을 blocking용액(5% skim dry milk in

TBS-T buffer)에 넣어 cold chamber 내에서 12시간 shaking하였다. Blocking용액을 제거하고 p27, p53, p21, pRb, cyclin E, cyclin A, cyclin D1, cyclin B1, active-caspase 3, pro-caspase 9, 및 PARP (Santa Cruz, USA)에 대한 일차항체를 1 : 1,000으로 희석한 blocking 용액(실온)에 3시간 동안 반응시킨 후 1×TBS-T 용액(20 mmol/l Tris, 137 mmol/l NaCl, 0.5% Tween-20)으로 10분간 3회 세척하였다. 그리고 이차 항체인 goat polyclonal IgG (Santa Cruz, USA)를 1 : 1,000으로 희석한 blocking 용액에 nitrocellulose 막을 넣고 2시간 동안 반응시켜 항체를 결합시켰다. 1×TBS-T 용액으로 nitrocellulose 막을 10분간 3회 세척하여 비 특이적으로 결합해있는 항체를 제거하였다. 세척 후 막에 남아있는 TBS-T를 제거하고 ECL western blotting detection reagent (Amersham Biosciences, USA)로 검출하였다.

3. 통계처리

통계의 처리는 대조군과 실험군 사이의 유의성을 student-t 방법을 이용하여 검정하였으며, 최소 3번의 실험을 하여 mean±SD로 나타내었고, $p < 0.05$ 일 때 유의성이 있다고 나타내었다.

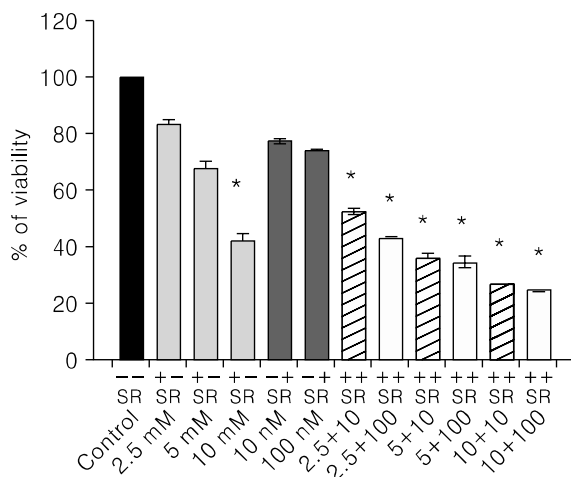


Fig. 1. Effect of sodium butyrate and rapamycin on cell growth of human cervical carcinoma cell line (HeLa). Growth inhibition in HeLa cells treated for 24 hours with various concentrations of sodium butyrate and rapamycin. Cell viability was measured using Cell Titer cell Proliferation Assay and expressed as % of control culture conditions. * $p < 0.05$, S; sodium butyrate, R; rapamycin.

결 과

1. Sodium butyrate와 rapamycin의 자궁경부암 세포에 대한 증식억제 효과

Sodium butyrate와 rapamycin에 의한 자궁경부암 세포의 증식억제 효과를 알아보기 위하여 배양된 자궁경부암 세포주인 HeLa 세포에 sodium butyrate를 농도별로 처리한 결과 24시간 후의 세포증식 억제효과는 농도가 증가할수록 증가하였으며 10 mM에서 58%까지의 억제를 보였으며, rapamycin의 경우는 100 nM에서도 23%의 억제만 보였으나 동시에 투여하여서는 상승작용으로 78%의 증식이 억제되었으며 통계적으로 의미 있는 유의성을 보였다(Fig. 1).

2. Sodium butyrate와 rapamycin이 세포주기 회로에 미치는 효과

자궁경부암 세포에 sodium butyrate와 rapamycin을 각각 혹은 동시에 농도별로 투여한 결과 대조군보다는 각각 투여도 sub G1 주기의 연장이 있었으나, 동시투여군에서 농도 의존적으로 sub G1기의 증가가 확인되어 세포자멸사의 양적 증가를 확인하였고 농도의 증가에 따

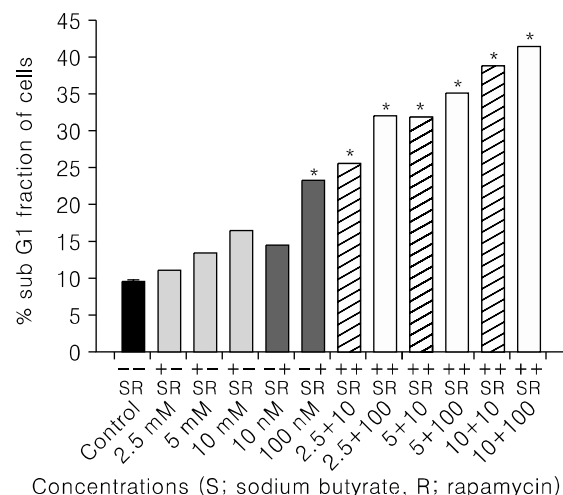


Fig. 2. Effect of sodium butyrate and rapamycin treatment on the cell cycle profile. After treatment with indicated concentrations of sodium butyrate and rapamycin for 24 hours, HeLa cells were collected, fixed, stained with PI and analyzed by flow cytometry. The values represent the number of cells in a phase of the cell cycle as a percentage of total cells. * $p < 0.05$.

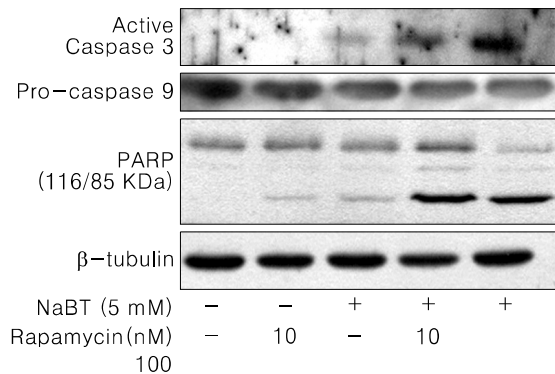


Fig. 3. Effect of the combination of sodium butyrate and rapamycin treatment on caspase activation and PARP cleavage. β -tubulin was shown as an internal control.

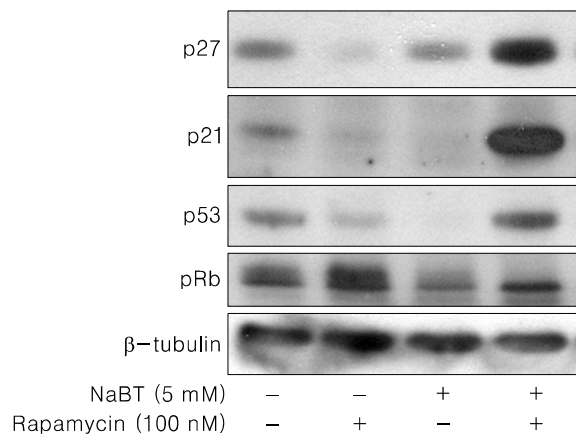


Fig. 4. Effect of the combination of sodium butyrate and rapamycin treatment on the cell cycle related gene expression. β -tubulin was shown as an internal control.

라 sub G1의 증가됨을 관찰하였다(Fig. 2).

3. Sodium butyrate와 rapamycin이 active-caspase 3, pro-caspase 9 및 PARP 유전자에 대한 효과

자궁경부암 세포에 sodium butyrate와 rapamycin을 농도별로 처리하고 24시간 후 세포자멸사의 경로를 알아보기 위하여 active-caspase 3, pro-caspase 9, PARP 유전자의 발현을 측정하고, 동시투여군에서 활성 형태의 caspase 3 단백질의 양적 증가, 비활성 형태의 caspase 9의 양적 감소 및 PARP cleavage는 동시투여군에서 발현이 증가되었다(Fig. 3).

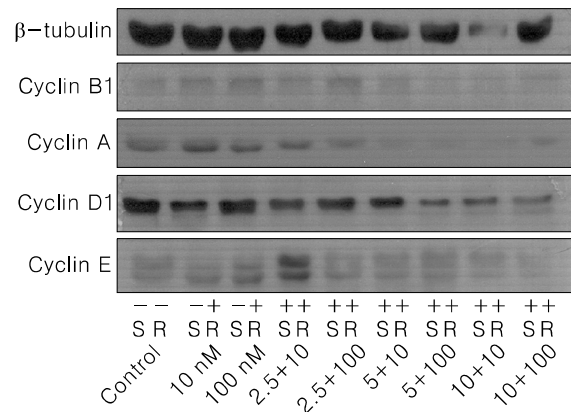


Fig. 5. Effect of the combination of sodium butyrate and rapamycin treatment on the expression of cyclin genes. β -tubulin was shown as an internal control.

4. Sodium butyrate와 rapamycin의 p27, p53, p21, pRb, cyclin A, E, B1 및 cyclin D1 유전자 발현에 대한 효과

자궁경부암 세포에 sodium butyrate와 rapamycin을 농도별로 처리하고 24시간 후 세포주기에 관계하는 유전자 발현을 관찰한 결과, p27, p21 및 p53 유전자는 동시투여 시 상승작용으로 발현이 증가하였으며, pRb의 탈인산화도 동시투여에서 증가하는 것을 관찰하였다(Fig. 4). Cyclin E의 발현은 동시투여에서도 변화가 없었으나, cyclin B1, cyclin A 및 cyclin D1은 동시투여 시 농도가 증가할수록 발현이 감소하였다(Fig. 5).

고 찰

인유두종바이러스는 자궁경부암 조직에서 발견되며 자궁경부암의 주요인으로 알려져 있다. 자궁경부암은 인유두종 바이러스(human papillomavirus; HPV)의 감염 후 p53, pRb 단백질의 분해로 인해 세포주기의 변화로 암화과정이 발생하는 경우가 대부분을 차지하고 있으며, 일부의 경우 p53 유전자의 점 돌연변이에 의한 p53 단백질의 불활성화로 인한 세포주기 변화로 발생한다.¹² 특히 80여종의 인유두종 바이러스 아형 중 HPV 16, 18의 경우 고위험 바이러스로서 이들에 감염된 세포에서 초기 발현하는 E6 단백질은 종양 억제 유전자인 p53 단백질과 결합하여 p53을 분해시키고, E7 단백질은 pRb 단백질을 인산화시켜 E2F 단백질을 방출시킴으로써 세포주

기를 변화시키고 자궁경부암을 일으키게 된다.¹³⁻¹⁵

이번 실험에 사용된 sodium butyrate는 HPV 양성인 자궁경부암세포에 효과적으로 증식을 억제한다는 것을 보여주었으나, 항암화학요법제의 치료 실패는 내성이 발생하는 세포의 변이가 일어나는 문제가 발생하여 재발이 되는 원인이 된다.^{9,16} 그러므로 이러한 내성을 극복할 수 있는 방법으로 복합치료를 통한 방법이 나오게 되었다. 최근에 자궁경부암 치료에 많이 사용하는 paclitaxel도 초기 치료에는 반응이 좋으나, 재발하는 경우에는 내성이 발생하여 더 이상 치료에 도움이 되지 않는다.¹⁷ 이러한 요인 중 하나가 Akt의 하부에 조절 받는 mTOR 유전자의 활성이 일어나기 때문이다.¹⁸ 그러므로 mTOR을 조절하는 rapamycin의 동시투여로 치료의 효과가 상승되는 것을 예상할 수 있겠다. 그러나 이 두 약제가 자궁경부암에 미치는 영향에 대한 연구는 보고된 바가 없기에 저자는 sodium butyrate와 rapamycin이 자궁경부암에 대한 치료 효과가 있을 것으로 생각하여 자궁경부암 세포의 직접적인 증식억제 효과를 조사하고 분자생물학적 기법인 세포주기분석법을 통하여 세포주기와 관련된 유전자들의 발현을 조사하였으며 이러한 증식억제 효과가 세포자멸사와 관련된 것임을 확인하고 또한 세포자멸사를 일으키는 기전에 대하여 관찰한바 유의한 결과를 얻을 수 있었다.

배양된 자궁경부암 세포에 sodium butyrate와 rapamycin을 농도별로 처리한 후 세포를 회수하여 세포수를 측정할 결과, sodium butyrate를 농도별로 처리하여 24시간 후의 세포증식 억제효과는 농도가 증가할수록 증가하였으며 10 mM에서 58%까지의 억제를 보였다. 그러나 rapamycin의 경우는 100 nM에서도 23%의 억제만 보였으나 동시에 투여하여서는 상승작용이 더해져서 78%의 증식이 억제되었으며 통계적으로 의미 있는 유의성을 보였다(Fig. 1). 이러한 결과를 볼 때 sodium butyrate 단독으로도 효과는 있었으나, rapamycin과 동시 투여 시 치료 효과가 상승하는 것을 확인하였다. 세포주기에 미치는 영향을 알아보기 위하여 유세포분석기를 이용하여 세포주기를 분석하였다. Sodium butyrate와 rapamycin을 각각 혹은 동시에 농도별로 투여한 결과 대조군보다는 각각 투여도 sub G1 주기의 연장이 있었으나, 동시 투여군에서 농도 의존적으로 sub G1기의 증가가 확인되어 세포자멸사에 의한 것이라 판단되었다. 현재까지 수많은

세포자멸사 관련 유전자가 알려져 있는데, 그 중에서도 공통적인 경로는 단백질 분해 효소의 활성화와 관련이 깊음이 알려져 있다. 특히 시스테인계 단백분해 효소인 caspase가 발견되면서 세포자멸사 기전의 중심적인 요소로 여겨지고 있다.¹⁹ Caspase들은 항상 세포자멸사를 억제하고 있는 단백질들은 분해하여 세포자멸사를 진행시키는 역할을 하며 현재까지 알려진 caspase 중 caspase-3가 다양한 세포자멸사 자극에 의하여 공통적으로 활성화 될 수 있다고 알려져 있다. 세포자멸사의 경로를 밝히고자 caspase-3의 활성화의 관계에 대하여 알아본 결과, sodium butyrate와 rapamycin 동시 투여 시 active-caspase 3 단백질의 양적 증가와 pro-caspase 9 발현감소가 관찰되었다. PARP 단백질의 양적인 감소가 관찰되어 활성화된 caspase-3에 의하여 116 kDa의 PARP가 85 kDa로 절단되는 정도가 증가하였음을 확인함으로써 DNA 회복의 실패로 인한 세포자멸사가 유도되었음을 알 수 있었다. 따라서 자궁경부암 세포에 sodium butyrate와 rapamycin 동시 투여로 caspase 9에 의한 intrinsic pathway를 활성화하여 caspase-3를 통해 PARP의 분해를 유도한다는 경로와 일치한다.²⁰

이러한 세포자멸사가 일어나는 기전을 관찰하기 위해 세포주기관련 유전자인 p53, p27, p21, pRb, cyclin A, cyclin E, cyclin D1, 및 cyclin B1에 대하여 Western blot 분석을 실시하여 G1 checkpoint에 관계하는 p53, p27, 및 p21의 발현이 증가되고 pRb의 탈인산화가 증가되어 고유의 종양억제 유전자의 기능을 하는 것을 확인하였다. 이것은 다른 연구에서도 phenylbutyrate 투여 후 p27과 p21의 활성의 증가를 보이는 것과 유사한 결과를 보였다.¹⁶ 이러한 결과로 보아 p53, p27, 및 p21의 증가는 sodium butyrate와 rapamycin 동시 투여 시 DNA에 심각한 손상을 당하였을 것으로 생각되는 자궁경부암 세포가 회복되지 못한 상태에서 세포자멸사가 유도된 것으로 생각되며 이는 p21과 p27의 생성을 유도한 결과 CDK와 결합하여 G1 phase arrest를 유도하게 되어 결국 자궁경부암 세포는 세포자멸사를 일으켜 증식이 억제되고 사멸되는 효과를 나타내는 것으로 관찰되었다. Cyclin A, D1은 p27과 p21의 down stream에 있는 것으로 농도 의존적으로 감소하는 것을 보여 주었으나, cyclin E의 변화는 보이지 않았다.

이상으로 sodium butyrate와 rapamycin의 동시투여는

자궁경부암 세포의 증식억제 효과가 있으며 이는 세포 자멸사에 이르게 하고, 세포주기상에서 subG1 phase 증가를 일으켜서 일어나며 여기에는 p27, p21 및 p53의 세포주기 관련 유전자가 관계되어 있음을 알 수 있었다. 이에 sodium butyrate와 rapamycin이 향후 자궁경부암의 치료에 있어서 효과적인 대체 보조 치료 약물의 가능성이 있다고 생각된다.

참고문헌

1. Ministry of Health and Welfare: Annual Report of the Korea Central Registry 1997 (Published in 1999)
2. Ministry of Health and Welfare: Annual Report of the Korea Central Registry 1998 (Published in 2001)
3. Parkin DM, Piasini P, Fearly J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1990; 80: 827-41.
4. Omura GA. Current status of chemotherapy for cancer of the cervix. *Oncology* 1992; 6: 27-32.
5. Sonenberg N, Gingras AC. The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 268-75.
6. Pullen N, Thomas G. The modular phosphorylation and activation of p70s6k. *FEBS Lett* 1997; 410: 78-82.
7. Chan S. Targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR): A new approach to treating cancer. *Br J Cancer* 2004; 91: 1420-4.
8. Hague A, Manning AM, Hanlon KA, Huschtscha LI, Hart D, Paraskeva C. Sodium butyrate induces apoptosis in human colonic tumour cancer lines in a p53-independent pathway: Implications for the possible role of dietary fiber in the prevention of large-bowel cancer. *Int J Cancer* 1993; 55: 498-505.
9. Finzer P, Kuntzen C, Soto U, zur Hausen H, Rosl F. Inhibitors of histone deacetylase arrest cell cycle and induce apoptosis in cervical carcinoma cells circumventing human papillomavirus oncogene expression. *Oncogene* 2001; 20: 4768-76.
10. Coradini D, Biffi A, Costa A, Pellizaro C, Pirronello E, Di Fronzo G. Effect of Sodium butyrate on human breast cancer cell lines. *Cell Prolif* 1997; 30: 149-59.
11. Mandal M, Kumar R. Bcl-2 expression regulates sodium butyrate-induced apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. *Cell Growth Differ* 1996; 7: 311-8.
12. Giaccia AJ, Kastan MB. The complexity of p53 modulation: Emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* 1998; 12: 2973-83.
13. Weber T, Dalen H, Andera L, Negre-Salvayre A, Auge N, Sticha M. p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3602-6.
14. Wang W, Wang J, Zhao D, Liu H, Zhou W, Chen K. Comparison of *Spatholobus suberectus* Dum, *Euonymus alatus* (Thunb) Sieb and *Eupolyphaga sinensis* Walker on regulation of plasma lipid. *Zhongguo Zhongguo Yao Za Zhi* 1991; 16: 299-301.
15. Lam T, Lam ML, Au TK, Ip DT, Ng TB, Fong WP, et al. A comparison of human immunodeficiency virus type-1 protease inhibition activities by the aqueous and methanol extracts of Chinese medicinal herbs. *Life Sci* 2000; 67: 2889-96.
16. Finzer P, Stohr M, Seibert F, Rosl F. Phenylbutyrate inhibits growth of cervical carcinoma cells independent of HPV type and copy number. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003; 129: 107-13.
17. McGuire WP, Blessing JA, Moore D, Lentz SS, Photopoulos G. Paclitaxel has moderate activity in squamous cervix cancer: A Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1996; 14: 792-5.
18. Faried LS, Faried A, Kanuma T, Nakazato T, Tamura T, Kuwano H, et al. Inhibition of the mammalian target of rapamycin (mTOR) by rapamycin increase chemosensitivity of CaSki cells to paclitaxel. *European J Cancer* 2006; 42: 934-7.
19. Kamesaki H. Mechanism involved in chemotherapy induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy. *Int J Hematol* 1998; 68: 29-43.
20. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 277-88.

Treatment with sodium butyrate and rapamycin inhibit growth of human cervical cancer cells

Yong Jun Jeon*, Chi Heum Cho*, So Jin Shin, Sang Hoon Kwon, Soon Do Cha

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Keimyung University, Daegu, Korea

Objective : To evaluate whether mTOR inhibition by rapamycin can enhance the inhibitory effect of sodium butyrate, a histone deacetylase (HDAC) inhibitor on human cervical cancer cell line HeLa.

Methods: Cervical cancer cells (HeLa) were treated with sodium butyrate alone or in combination with rapamycin. Cell viability was analyzed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTS) assay and flow cytometry was performed to ascertain the effects of sodium butyrate and combinations of sodium butyrate with rapamycin. Expression of cell cycle related proteins were evaluated by Western blot analysis.

Results: As proven previously rapamycin, the mTOR inhibitor was effective in reducing the cell growth of cervical cancer cell line HeLa. Rapamycin and sodium butyrate induced growth inhibition in a dose dependent manner, with 100 nM/L rapamycin and 10 mM/L sodium butyrate blocked 78% cell growth. FACS analysis data substantiated the competence of rapamycin in inducing G1 arrest of mammalian cells, and this ability was greatly enhanced by the combination of sodium butyrate and rapamycin. The percentage of sub G1 fraction of cells was remarkably increased by the combination of sodium butyrate and rapamycin. Sodium butyrate in combination with rapamycin showed the increased expression of CDK inhibitors p21, p27, and dephosphorylation of Rb whereas the expression levels of cyclin A, cyclin D1 and cyclin B1 were reduced.

Conclusion: The findings implicate that rapamycin could enhance the anti-cancer effect of sodium butyrate. Further in depth studies and in vitro studies would throw more light on the growth inhibitory mechanism and its potential use as therapeutic drugs of butyric acid and rapamycin.

Key Words : HeLa cell, Rapamycin, Sodium butyrate, Apoptosis
