

항암제를 투여한 세포주의 배양액에서 M30을 이용한 고사의 측정

가톨릭대학교 성모병원 임상의학연구소¹, 가톨릭대학교 의과대학 산부인과학교실²

박상호¹ · 곽현성² · 류기성² · 이 영² · 한구택²

Measurement of apoptosis using M30 in culture media of cell lines treated with anti-cancer agents

Sang Ho Park, M.Sc.¹, Hyun Sung Kwack, M.D.², Ki Sung Ryu, M.D., Ph.D.²,
Young Lee, M.D., Ph.D.², Ku Taek Han, M.D., Ph.D.²

¹Clinical Research Laboratory, St. Mary's Hospital,

²Department of Obstetrics and Gynecology, The Catholic University of Korea School of Medicine, Seoul, Korea

Objective: We investigated a possible use of the induced apoptosis as a biomarker in the cells and their media treated with commonly used anti-cancer agents in gynecologic malignancies.

Methods: After treatments with low and high concentrations of paclitaxel, cisplatin, and camptothecin in HeLa and OVCAR-3 cells, the levels of M30 antigen were detected in the cells and their media by immunofluorescence staining and ELISA methods, respectively.

Results: The percentages of M30-fluorescein isothiocyanate (FITC) positive cells in HeLa and OVCAR-3 cells treated with paclitaxel, cisplatin, and camptothecin were 4.3% vs 18.1% vs 34.87% and 4.07% vs 18.6% vs 32.63%, 4.3% vs 17.87% vs 32.38% and 4.07% vs 16.83% vs 32%, and 4.3% vs 16.75% vs 31.3% and 4.07% vs 15.18% vs 29.9% in control, low dose, and high dose groups, respectively ($P<0.001$). M30 antigen levels (U/L) measured in culture media of HeLa and OVCAR-3 cells treated with paclitaxel, cisplatin, and camptothecin were 53.03 vs 101.53 vs 355.59 and 86 vs 114.41 vs 412.04, 53.03 vs 79.84 vs 327.64 and 86 vs 125.44 vs 385.09, and 53.03 vs 88.41 vs 295.005 and 86 vs 108.42 vs 263.1 in control, low dose, and high dose groups, respectively ($P<0.001$).

Conclusion: Our results obtained in this preclinical study suggests that measurement of the levels of M30 antigen may help to predict the clinical responses and to select the effective anti-cancer agents in clinical settings, rapidly and quantitatively.

Key Words: Apoptosis, M30 antigen, HeLa cells, OVCAR-3

여러 장기로부터 발생하는 고형 종양의 치료에서 생존율을 개선시키기 위한 대안으로 최근에 시도되고 있는 신보조항암화학요법 (neoadjuvant chemotherapy)은 병기가 진행되었거나 부피가 큰 부인종양들에서도 적용되고 있으나, 항암화학요법의 효율성을 증가시키기 위해서는 조기

에 반응을 예측할 수 있는 측정법이 절실히 요구되고 있다.

항암화학요법제들은 세포내에서 수많은 효과를 유발시킨다.¹ 특히 일련의 단계적인 세포내 과정들을 활성화시켜 발생하는 고사 (apoptosis)는 세포사의 가장 중요한 기전으로서,² 정상 및 악성 종양 조직에서 항암요법제의 투여 후에 유발되는 것으로 알려져 있다.³ 이러한 현상은 약제를 투여한 후에 발생한 고사의 정도를 측정함으로써 조기에 치료의 효과를 평가할 수 있다는 것을 암시하는 것이다.⁴

고사의 과정에서 상피세포내의 단백질 분해효소인

접 수 일 : 2010. 3. 5.
채 택 일 : 2010. 4. 8.
교신저자 : 한구택
E-mail : nowonhkt@catholic.ac.kr

caspase들은 세포내 기질을 구성하는 중간세사들의 중요 구성 성분 중 하나인 cytokeratin 18 (CK18)을 분열시켜 M30 항원 (CK18-Asp³⁹⁶)이라는 절편들을 발생시킨다.³ 이렇게 생성된 M30 항원의 수준은 신뢰할 만한 고사의 지표로서 종양으로부터 직접 유래되며, 세포막이 온전한 고사 세포내에 존속하지만 세포막이 소실되면 배양액 또는 혈청으로 유출된다.⁵⁻¹⁰ M30 항원은 항암화학요법제를 투여한 후 24시간 또는 48시간 후에 혈청이나 조직내에서 증가^{3,9,11}되며, 특히 24시간 후에 더 특이적이고 민감하게 증가된다.³

이상의 보고들을 바탕으로 본 연구에서는 배양한 HeLa와 OVCAR-3 세포주에 악성 부인종양의 치료에 흔히 사용되는 paclitaxel, cisplatin과 camptothecin을 투여한 후 24시간 후에 수확한 세포들과 배양액내에서 M30 항원의 면역형광 염색법과 ELISA^{3,11}를 이용하여 고사의 발현 정도를 측정하는 전임상연구를 실시하였다. 이 실험을 통하여 악성 부인종양의 신보조화학요법에서 환자들의 혈액내에서 약제들의 감수성과 내성을 조기에 판별할 수 있는 이론적 근거를 마련할 수 있을 것으로 생각되며, 치료의 효율성을 높이고 불필요한 부작용과 경제적 손실을 감소시키는 계기를 마련할 수 있을 것으로 생각된다.

연구 대상 및 방법

1. 세포주의 배양

실험에 사용할 HeLa와 OVCAR-3 세포주는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)으로부터 구입하였다. 세포들을 37℃와 95%의 습도를 유지한 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양액내에는 100 unit/mL의 penicillin G와 100 µg/mL의 streptomycin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 15%의 우태아 혈청 (Gibco/BRL, Grand Island, NY, 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 각각

에 1×10^4 cells/mL의 세포들을 분주하고 다시 배양을 시작하였다. 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 paclitaxel, cisplatin 및 camptothecin은 모두 Sigma-Aldrich로부터 구입하였다. 약제들의 투여는 5 mL의 배양액과 함께 배양한 세포들이 지수적으로 증식 성장 (약 2×10^5 cells/mL)할 때 각 세포주의 비투여 대조군 flask 2개를 제외한 다른 6개의 T-25 flask들에 각각 Wang과 Lippard¹², Wang 등¹³과 Majno 등¹⁴의 보고들을 참고로 선택한 용량인 50 nM과 500 nM의 paclitaxel, 2 µm과 20 µm의 cisplatin과 50 nM과 5000 nM의 camptothecin을 각각 투여하고 2시간 동안 배양하였다. 이후 새로운 배양액으로 교환하고 24시간 동안 더 배양한 후 원심분리로 세포들을 모두 수확하였으며, 세포침전물에 10 mL의 배양액을 가하여 부유시킨 후 20 µL의 세포부유액과 20 µL의 trypan blue (Sigma-Aldrich) 용액을 혼합 염색하여 hemocytometer로 세포수를 산정하였다. 배양액은 따로 모아 M30-ELISA 실험 시까지 냉장 보관하였으며, 분리 수확된 세포들은 면역형광 현미경에 의한 관찰을 위해 면역형광 염색을 실시하였다.

3. M30 항원의 면역형광 염색

대조군과 투여군으로부터 수확한 각각의 세포에 100% methanol 용액을 가한 후 -20℃에서 30분간 방치하였다. 다음에 PBS/BSA (1%) 용액을 가하여 5분씩 3회 반복해서 세척하였다. M30 단일클론 항체 (M30 CytoDEATHTM, Clone M30; ALEXIS[®] Biochemicals, Lausen, Switzerland)와 PBS/BSA를 가하고 30분 후에 PBS/BSA 용액으로 5분씩 3회 반복해서 세척한 후 fluorescein isothiocyanate (FITC)가 공유결합된 goat anti-mouse immunoglobulin IgG (GAM IgG) 이차 항체 (Southern Biotechnology Association, Birmingham, AL, USA)를 PBS/BSA와 함께 2.5~5 µg/mL의 최종 농도가 되도록 가

하였다. 다음에 30분간 4℃의 암소에 방치한 후, PBS/BSA를 1 mL씩 각각 가하고 250 ×G에서 5분간 3회 세척하였다. 염색 과정이 끝난 세포들에서 200 µL를 취하여 Shandon Cytospin 2 cytocentrifuge (Thermo Electron Co., Cheshire, UK)를 이용하여 1,000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 세포 침전물을 현미경 슬라이드 (Fisher Scientific Co., Pittsburgh, PA, USA)들에 부착시킨 후 M30-FITC 형광도를 형광현미경 (Olympus AX70; Olympus, Tokyo, Japan) 하에 관찰하였다. 전체 세포수는 200 배 배율의 형광현미경 관찰 시야에서 Nomarski filter (Differential Interference Contrast)를 사용하여 산정하였으며, 이들 중 M30-FITC 형광도를 나타내는 세포들의 수는 FITC filter를 사용하여 산정하였으며, 양성률은 전체 세포수에 대한 백분율로 표시하였다.

4. ELISA에 의한 M30 항원의 염색

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. M30 HRP 공유결합체를 완충용액으로 희석시켜 잘 혼합한 다음에 catcher인 생쥐 단일클론항체로 피복된 96 well ELISA plate의 well들에 표준 표본, 비투여 대조군 및 투여군 표본을 각각 25 µL씩 분주한 후 75 µL의 M30 HRP 공유결합체 용액을 가하였다. Sandwich가 형성된 plate를 테이프로 밀봉한 후 25℃의 교반기에서 4 시간 동안 600 rpm으로 교반시킨 후에 250 µL의 희석된 세척용액으로 5회 세척하였다. 다시 200 µL의 TMB 기질 용액을 첨가하여 실온의 암소에 20분간 방치하였다. 이 후 50 µL의 정지 용액을 가하고 5~10초 동안 잘 혼합한 후 5분간 방치하여 반응을 정지시켰다. 이 과정이 완료된 후에는 ELISA plate 판독기 (BioTek Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 450 nm에서 30분내에 흡광도를 측정하였다. 이미 알고 있는 농도와 측정된 흡광도로부터 산출한 도표상에 표준곡선을 표시함으로써 표본 내의 M30 항원의 양을 산정하였으며, M30 항원의 농도는 제조사의 지시에 따라 U/L로 표시하였으며, 1 단위는 M30 인식 motif를 포

함하는 합성 peptide의 1.24 pmol에 해당된다.

5. 통계 분석

세포들에서 M30 항원의 양성률과 배양액내에서 M30 항원의 측정 결과들은 Wilcoxon Rank-Sum (Mann-Whitney) Test에 의해 비교하였다. 모든 경우들에서 유의성 검정은 $P<0.05$ 에 의해 판정하였다.

결 과

1. HeLa와 OVCAR-3 세포들에서 M30 항원에 의한 고사의 측정

HeLa와 OVCAR-3 세포들에서 항암화학요법제들에 의해 유발된 고사의 정도를 M30 CytoDEATH 항체에 의해 면역염색을 실시한 후 세포들에서 나타나는 형광도를 형광현미경 하에서 관찰하였다 (Tables 1, 2). 항암화학요법제를 투여하지 않은 대조군 세포들에서는 고사를 의미하는 M30 항원과 결합된 FITC의 짙은 형광들이 매우 드물게 세포질내에서 관찰되지만 항암화학요법제를 투여한 세포들에서는 모두 세포질내에서 짙은 M30-FITC의 형광들이 관찰되고 있다 (Fig. 1). 또한 저농도의 paclitaxel, cis-platin과 camptothecin을 투여한 경우에 비해 고농도를 투여한 경우에 매우 광범위한 세포들에서 세포질내 면역형광들이 더 강하게 발현되어 있는 것이 관찰되었으며 (Fig. 1), 이들 사이의 형광염색도의 차이는 통계적으로 매우 유의하였다 ($P<0.001$) (Tables 1, 2; Fig. 2).

Paclitaxel을 투여한 경우에 HeLa와 OVCAR-3 세포들의 대조군에서 M30 형광이 양성을 나타낸 세포들 (각각 4.3%와 4.07%)에 비해 저농도를 투여 (각각 18.61%와 18.6%)했을 때와 고농도를 투여 (각각 34.87%와 32.64%)했을 때 점차적으로 양성을 나타내는 세포들이 유의하게 증가 ($P<0.001$)함을 관찰하였다. 이러한 현상은 cisplatin을 투여한 경우 (대조군의 4.3%와 4.07%, 저농도 투여군의 18.61%와 18.6%, 고농도 투여군의 34.87%와 32.64%)와 camptothecin을 투여한 경우 (대조군의 4.3%와 4.07%, 저농도 투여군의 16.75%와 15.18%, 고농도 투여군의 31.3%와 29.9%)에서도 유사함을 관찰하였다 (Table 2, Fig. 2).

Table 1. Frequency of apoptosis in HeLa and OVCAR-3 cells assessed by M30-FITC immunofluorescence reactivity

			HeLa cell count			OVCAR-3 cell count		
			Total (n)	Positive (n)	%	Total (n)	Positive (n)	%
Paclitaxel	Control	Mean±SD	997±227	42±10	4.23±0.41	916±108	38±7.9	4.14±0.41
		Median	936	44	4.30	905	37	4.07
		IQR	827-1113	33-47	4.07-4.51	866-958	34.25-38.75	3.85-4.35
	Low dose	Mean±SD	1024±206	191±41	18.60±1.39	901±96	169±18.4	18.88±2.49
		Median	927	185	18.61	911	175	18.60
		IQR	901-1087	170.25-206.5	17.72-19.84	847-936	157.5-183.25	17.35-20.61
	High dose	Mean±SD	1011±205	177±35	17.59±1.50	896±101	153±22.6	17.23±2.58
		Median	969	173	17.87	888	151	16.83
		IQR	822-1027	298.25-369.75	33.81-36.53	868-956	297-336	30.70-38.96
Cisplatin	Control	Mean±SD	997±227	42±10	4.23±0.41	916±108	38±7.9	4.14±0.41
		Median	936	44	4.30	905	37	4.07
		IQR	827-1113	33-47	4.07-4.51	866-958	34.25-38.75	3.85-4.35
	Low dose	Mean±SD	985±205	162±43	16.37±1.83	909±125	145±17.4	16.09±2.37
		Median	962	155	16.75	899	14	15.18
		IQR	865-1047	161.75-187.5	16.78-18.01	848-950	134.75-163.75	15.19-19.2
	High dose	Mean±SD	968±188	340±65	35.17±2.24	922±106	316±33.7	34.57±5.01
		Median	955	323	34.87	922	303	32.64
		IQR	897-1009	291.25-342.25	30.68-33.09	837-966	272-312	28.45-36.75
Camptothecin	Control	Mean±SD	997±227	42±10	4.23±0.41	916±108	38±7.9	4.14±0.41
		Median	936	44	4.30	905	37	4.07
		IQR	827-1113	33-47	4.07-4.51	866-958	34.25-38.75	3.85-4.35
	Low dose	Mean±SD	1000±188	324±57	32.44±2.15	899±118	289±31.6	32.53±5.03
		Median	947	309	32.38	873	280	32
		IQR	829-1030	137.5-180.25	14.58-18.05	855-955	128.25-161.75	14.41-17.91
	High dose	Mean±SD	982±180	305±69	30.90±2.65	904±93	283±30.1	31.49±3.50
		Median	917	290	31.30	924	271	29.9
		IQR	854-1043	261-323	28.98-32.23	862-938	261-315	29.1-35.03

Values are expressed as the means±standard deviations (SD), the medium and interquartile range (IQR).
FITC: fluorescein isothiocyanate.

Table 2. Frequency of apoptosis in HeLa and OVCAR-3 cells assessed by M30-FITC immunofluorescence

		HeLa		OVCAR-3		
		M30-FITC positive cells (%)		M30-FITC positive cells (%)		
		Median (IQR)	<i>P</i> -value [*]	Median (IQR)	<i>P</i> -value [*]	<i>P</i> -value [†]
Paclitaxel	Control	4.30 (4.07-4.51)		4.07 (3.85-4.35)		0.4497
	Low dose	18.61 (17.72-19.84)	<0.001	18.60 (17.35-20.61)	<0.001	1.00
	High dose	34.87 (33.81-36.53)		32.63 (30.70-38.96)		1.00
Cisplatin	Control	4.30 (4.07-4.51)		4.07 (3.85-4.35)		0.4497
	Low dose	17.87 (16.78-18.01)	<0.001	16.83 (15.19-19.2)	<0.001	1.00
	High dose	32.38 (30.68-33.09)		32.00 (28.45-36.75)		0.7624
Camptothecin	Control	4.30 (4.07-4.51)		4.07 (3.85-4.35)		0.4497
	Low dose	16.75 (14.58-18.05)	<0.001	15.18 (14.41-17.91)	<0.001	0.9397
	High dose	31.30 (28.98-32.23)		29.90 (29.1-35.03)		0.7624

Values are expressed as the median and interquartile range (IQR).

FITC: fluorescein isothiocyanate.

*Comparison between control and chemo-treated group, Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test.

†Comparison between HeLa and OVCAR-3, Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test.

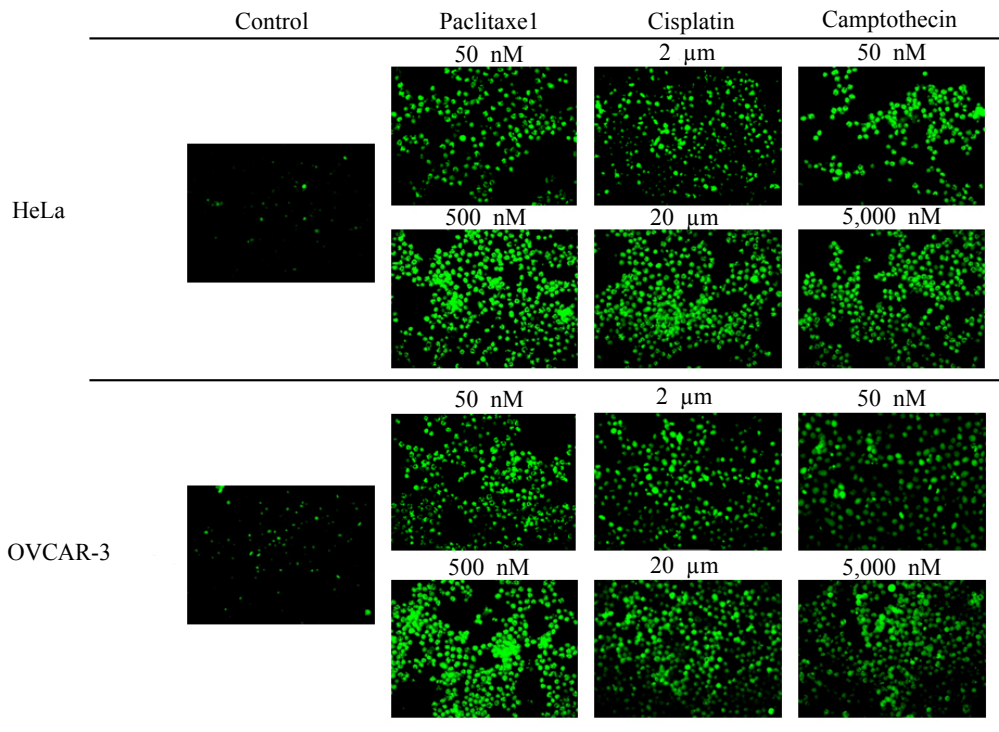


Fig. 1. Microscopic findings of M30-FITC immunofluorescence in HeLa and OVCAR-3 cells according to each of concentrations of paclitaxel, cisplatin, and camptothecin after culturing for 24 hours ($\times 200$).

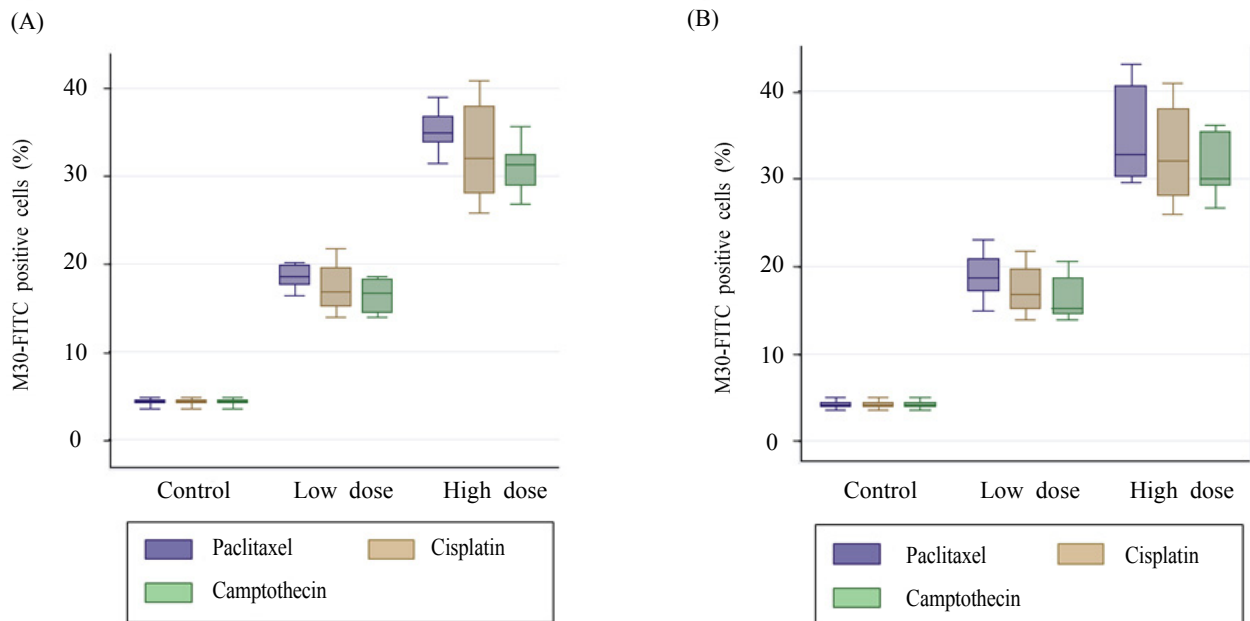


Fig. 2. Percentages of cells with positive immunofluorescence after staining by the M30-FITC monoclonal antibody in HeLa (A) and OVCAR-3 (B) cells according to each of concentrations of paclitaxel, cisplatin, and camptothecin after culturing for 24 hours. Shown are the median and interquartile range (IQR).

이와 같이 HeLa와 OVCAR-3 세포들에서 M30 항원의 증가로 표현되는 고사의 정도가 paclitaxel, cisplatin 및 camptothecin의 투여 용량이 증가함에 따라 점차 증가한 것은 투여한 약제들에 대한 반응의 증가를 나타내는 것으로 생각되었다.

2. 배양액내의 M30 항원에 의한 고사의 측정

항암화학요법제의 투여로 HeLa와 OVCAR-3 세포들로부터 배양액내로 유출된 M30 항원의 농도를 ELISA 법을 이용하여 정량적으로 측정한 결과 paclitaxel의 경우에 HeLa와 OVCAR-3의 배양액 모두에서 약제를 투여하지 않은 대조군 (각각 53.03 U/L과 86 U/L)에 비해 투여군에서 유의하게 증가함을 관찰하였으며 ($P<0.001$), 저농도 투여군 각각의 101.53 U/L과 114.41 U/L에 비해 고농도 투여군에서 각각 355.59 U/L과 412.04 U/L로 유의하게 증가 ($P<0.001$)함을 관찰하였다. 이러한 현상은 cisplatin (대조군의 53.03 U/L과 86 U/L, 저농도 투여군의 79.84 U/L과 125.44 U/L, 고농도 투여군의 327.64 U/L과 385.09 U/L)과 camptothecin (대조군의 53.03 U/L과 86U/L, 저농도 투여군의 88.41 U/L과 108.42 U/L, 고농도 투여군의 295.005 U/L와 263.1 U/L)의 경우에도 유사함을 관찰하였다 (Table 3, Fig. 3). 이러한 현상들은 paclitaxel, cisplatin 및 camptothecin의 투여 용량에 따라 HeLa와 OVCAR-3 세포들의 배양액내로 유출된 M30 항원의 증가

로 표현되는 고사의 정도가 점차 증가함을 반영하는 것으로서 이 또한 투여한 약제들에 대한 반응의 증가로서 M30 항원의 증가가 관찰된 것으로 생각된다.

고 찰

항암화학요법제들은 종양 세포들에서 증식과 성장에 관련된 다양한 변화를 유발하며, 이러한 변화들 중 한 가지 특징인 고사는 항암화학요법에 대한 반응 또는 내성을 평가할 수 있는 중요한 생물학적 지표로 알려져 있다.² 따라서 고사의 정도를 조기에 측정하는 것은 기존에 사용되고 있는 악성종양의 치료제들을 바꾸거나 강화할 수 있는 기회를 제공할 수 있는 잠재적인 가능성을 암시하는 것이다. 이러한 가능성에 따라 최근에 시도되고 있는 신보조항암화학요법에서 개별화된 치료 효과를 촉진하기 위해 고사의 조기 측정을 포함한 다양한 항암제 감수성 측정법들이 개발되고 있다.¹⁵ 그러나 그 역할이 확실히 증명된 이상적인 항암제 감수성 측정법은 아직 찾아보기 어렵다.

M30 항체는 고사세포의 분열된 CK18과 특이적으로 결합하나 괴사세포나 정상 및 생존세포들의 CK18과는 결합하지 않는다.¹⁶ 또한 고사세포의 M30 항원은 온전한 세포막의 상태가 소실되면 배양액 또는 순환 혈액으로 유출되므로 종양세포 사망의 생물학적 지표로서 이용이 가능하다고 알려져 있다.^{7,9,17} 이러한 고사의 특이적 M30 항원은 항암화학요법제의 투여 후 24시간 또는 48시간 후에 혈청이

Table 3. Measurement of apoptosis in media culturing HeLa and OVCAR-3 cells by the M30-ELISA

		HeLa		OVCAR-3		
		M30 antigen levels (U/L)		M30 antigen levels (U/L)		<i>P</i> -value [†]
		Median (IQR)	<i>P</i> -value*	Median (IQR)	<i>P</i> -value*	
Paclitaxel	Control	53.03 (49.23-60.01)		86.00 (78.95-100.44)		<0.001
	Low dose	101.53 (96.79-144.47)	<0.001	114.41 (107.035-133.57)	<0.001	0.028
	High dose	355.59 (337.02-384.46)		412.04 (399.07-439.99)		0.016
Cisplatin	Control	53.03 (65.62-85.36)		86.00 (101.62-131.02)		<0.001
	Low dose	79.84 (312.17-340.33)	<0.001	125.44 (377.89-429.42)	<0.001	<0.001
	High dose	327.64 (81.19-94.94)		385.09 (104.65-119.48)		0.019
Camptothecin	Control	53.03 (290.75-296.70)		86.00 (225.76-297.33)		<0.001
	Low dose	88.41 (49.23-60.01)	<0.001	108.42 (78.95-100.44)	<0.001	0.001
	High dose	295.01 (96.79-144.47)		263.10 (107.035-133.57)		0.34

Values are expressed as the median and interquartile range (IQR).

*Comparison between control and chemo-treated group, Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test.

†Comparison between HeLa and OVCAR-3, Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test.

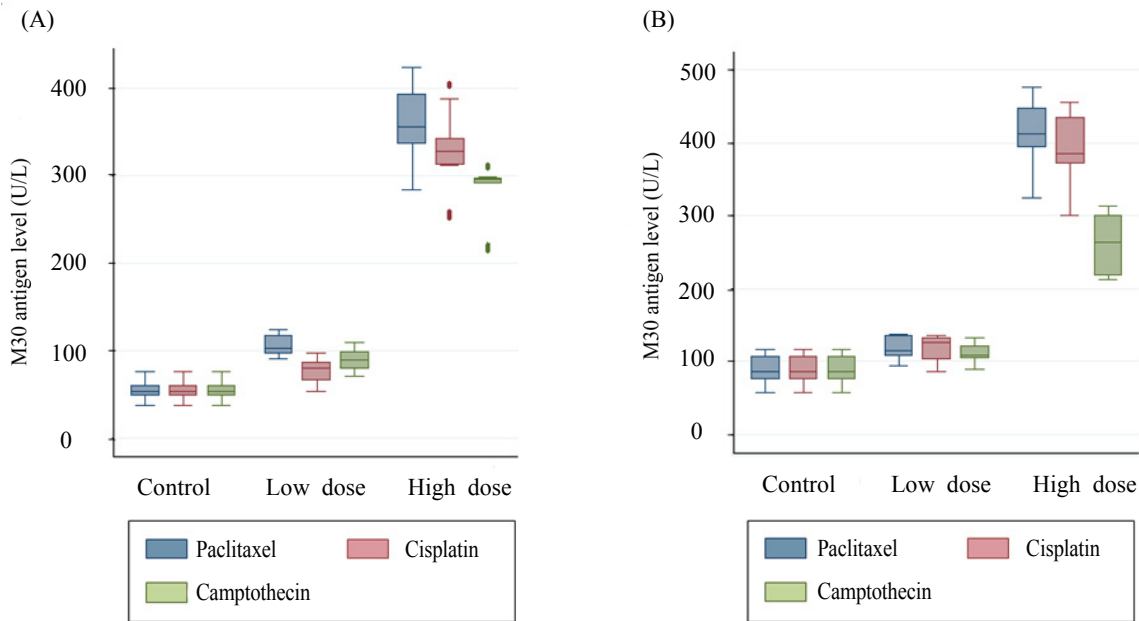


Fig. 3. Increase in the levels of M30-antigen measuring by M30 ELISA in media culturing HeLa (A) and OVCAR-3 (B) cells according to each of concentrations of paclitaxel, cisplatin, and camptothecin after culturing for 24 hours. Shown are the median and interquartile range (IQR).

나 조직내에서 증가^{3,9,11,18}하며, 이러한 증가는 24시간 후에 더 특이적이고 민감하다.³ 이는 항암화학요법제를 투여한 후 24시간 후에 혈청내 M30 항원을 측정함으로써 치료에 대한 반응을 조기에 알아낼 수 있다는 것을 암시하는 것이다.¹⁸ 실제로 최근에 유방암의 신보조항암화학요법에 치료에 대한 임상반응과 증가된 고사와의 사이에 양성 상호 관련^{3,4,8,11}과 M30-ELISA 측정법을 이용하여 유방암⁸과 폐암^{8,11} 환자의 혈액내에서 M30 항원의 증가가 확인된 바 있다. 그러나 악성 부인종양을 가진 환자의 혈액 내에서 M30 항원을 이용한 연구는 아직 보고된 바 없다. 이에 본 연구자들은 HeLa와 OVCAR-3 세포주에서 약제를 투여한 후 수확한 세포들과 배양액내에서 M30 항원에 대한 면역형광 염색법과 ELISA 측정법에 의해 세포고사의 정도를 측정하는 전임상연구를 실시하였다.

유사분열의 파괴 (mitotic catastrophe)를 유발하는 paclitaxel은 고사 또는 비고사의 기전들에 의해 세포 사멸을 촉진하는 것으로 알려져 있으며,^{1,19} 저농도인 10~100 nM의 paclitaxel은 세포들의 미세소관과 유사분열 방추체들의 형성을 억제하고 세포주기의 진행을 가속화해 세포주

기를 G₂M 분기에 정지시킨다.⁶ G₂M분기에 정지된 세포들은 p34^{cdc2}의 활성화와 Bcl-2의 인산화로 세포고사를 유발시키지만 G₂M 분기에 정지하지 못한 세포들은 유사분열로부터 탈출하여 다핵 세포들을 발생시킨다.⁶ 이러한 다핵 세포들은 p53에 의해서 세포주기가 정지하거나 주기를 반복한 후 정지하여 결국 세포고사를 수행한다.^{12,20} 반면 고농도의 paclitaxel은 유사분열이 정지하는 과정을 거치지 않고 광범위한 미세소관 손상을 유발하며, 이어지는 JNK/SAPK와 p34^{cdc2}의 활성화와 Bak, Bax와 TNF- α 와 같은 인자들의 조절을 받아 세포고사를 촉진시킨다.¹² M30 CytoDEATH 항체에 의한 면역형광 염색을 이용한 세포질 내 M30 항원의 농도와 ELISA법을 이용하여 배양액내로 유출된 M30 항원의 농도를 측정한 본 연구자들의 결과는 대조군의 HeLa와 OVCAR-3 세포들에서 양성 M30 형광을 나타낸 세포들의 수에 비해 저농도인 50 nM paclitaxel을 투여했을 때 양성 M30 형광을 나타낸 세포들의 수가 유의하게 증가하였으며, 고농도인 500 nM paclitaxel의 투여군에서는 저농도의 투여군에 비해서 양성 M30 형광을 나타낸 세포들의 수가 유의하게 증가한 것을 관찰하였다. 이

는 50 nM paclitaxel의 용량에 의해서는 G₂M 분기에 정지 과정을 경유하여 세포고사를 유발시켰을 것으로 생각되며,⁶ 500 nM paclitaxel의 용량에 의해서는 광범위한 미세 소관 손상을 유발¹²하여 결국 세포고사를 수행한 것으로 생각된다.

Cisplatin에 의한 고사의 유발은 cisplatin의 농도와 밀접한 관련을 가지고 있으며 쥐 세포에 800 µM cisplatin을 몇 시간 동안 투여하였을 때 나타나는 고사의 정도는 8 µM cisplatin을 며칠간 투여한 후 발생된 고사의 정도와 비슷한 것으로 알려져 있다.¹² Cisplatin을 투여하면 DNA와 결합하여 p16^{INK4A}의 활성화를 촉진하며, 이것이 G₁ 분기에 작용하는 CDK들의 작용을 억제하고 p53, p73 및 p38과 인산화된 CDC2를 증가시켜 세포주기를 G₂M에 정지시키는 결과를 초래한다. G₂M에 정지된 DNA는 자신의 cisplatin과의 복합체들을 제거시키며, 따라서 cisplatin에 의한 세포독성으로부터 세포들을 생존시킨다. 그러나 DNA가 광범위하게 손상을 받으면 이를 완전히 복구하지 못하므로 세포고사에 이르게 된다.¹³ Cisplatin을 투여했을 경우에 본 연구자들의 결과는 대조군에 비해 저농도의 2 µM cisplatin 투여군과 고농도의 20 µM cisplatin 투여군으로 투여 농도가 증가함에 따라 양성 세포들의 분포가 점차적으로 유의하게 증가한 것은 2 µM의 저농도와 20 µM의 고농도를 투여한 경우에는 이들의 농도에 의해 광범위한 손상을 받은 세포들이 이를 완전히 복구하지 못하여 세포고사를 유발한 것으로 생각된다.¹³

DNA topoisomerase I의 억제로 DNA 파괴를 유발시키

는 camptothecin은 세포주기의 G₁ 분기에는 영향을 미치지 않고 S와 G₂ 분기에서 염색분체 이상을 유발하여 선택적으로 S 분기 세포들의 사멸을 유발한다.^{12,21} 1 nM 이하의 매우 낮은 농도의 camptothecin은 세포의 생존과 세포주기에 대한 효과를 거의 나타내지 않으나, 3~60 nM의 camptothecin은 S 분기를 통한 세포의 진행 속도를 감소시켜 세포증식을 억제한다.¹⁴ 또한 60 nM 이상 10 µM 이하의 camptothecin은 초기에 세포고사를 유발시키지만 10 µM 이상의 매우 높은 농도에서는 항상 괴사를 일으키는 것으로 알려져 있다.¹² 50 nM과 5,000 nM의 camptothecin을 투여한 경우에도 paclitaxel과 cisplatin의 경우에서와 마찬가지로 대조군에 비해 50 nM의 저농도로부터 5,000 nM의 고농도로 투여 농도가 증가함에 따라 양성 세포들의 분포가 점차적으로 유의하게 증가함을 관찰하였다. 이는 본 연구자들이 선택한 50 nM과 5,000 nM의 투여 농도가 모두 초기에 세포고사를 발생¹³시킨 결과로 생각되었다.

결론적으로, 본 연구에서 HeLa와 OVCAR-3 세포주에서 항암요법제를 투여한 24시간 후에 수확한 세포들과 배양액내에서 세포고사를 나타내는 M30 항원의 유의한 증가가 관찰된 것은 악성 부인종양의 신보조화학요법에 대한 반응 즉, 항암요법제의 감수성을 환자의 혈액내에서 측정할 수 있음을 암시하는 것이다. 그러나 이러한 결과들을 실제 임상에 적용할 수 있으려면 향후 다양한 약제들을 투여하는 많은 환자들로부터 채취한 혈액내에서 M30 항원의 측정에 대한 광범위한 연구가 선행되어야 할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Ricci MS, Zong WX. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *Oncologist* 2006; 11: 342-57.
2. Viktorsson K, Lewensohn R, Zhivotovsky B. Apoptotic pathways and therapy resistance in human malignancies. *Adv Cancer Res* 2005; 94: 143-96.
3. Demiray M, Ulukaya EE, Arslan M, Gokgoz S, Saraydaroglu O, Ercan I, et al. Response to neo-adjuvant chemotherapy in breast cancer could be predictable by measuring a novel serum apoptosis product, caspase-cleaved cytokeratin 18: a prospective pilot study. *Cancer Invest* 2006; 24: 669-76.
4. Hägg M, Bivén K, Ueno T, Rydlander L, Björklund P, Wiman KG, et al. A novel high-throughput assay for screening of pro-apoptotic drugs. *Invest New Drugs* 2002; 20: 253-9.
5. Schutte B, Henfling M, Kölgel W, Bouman M, Meex S, Leers MP, et al. Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis. *Exp Cell Res* 2004; 297: 11-26.
6. Leers MP, Kölgel 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.
7. 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.
8. 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.
9. Kramer G, Schwarz S, Hagg M, Havelka AM, Linder S. Docetaxel induces apoptosis in hormone refractory prostate carcinomas during multiple treatment cycles. *Br J Cancer* 2006; 94: 1592-8.

10. Holubec H, Payne CM, Bernstein H, Dvorakova K, Bernstein C, Waltmire CN, et al. Assessment of apoptosis by immunohistochemical markers compared to cellular morphology *in vivo*-stressed colonic mucosa. *J Histochem Cytochem* 2005; 53: 229-35.
11. Ulukaya E, Yilmaztepe A, Akgoz 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.
12. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 307-20.
13. Wang TH, Wang HS, Soong YK. Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer* 2000; 88: 2619-28.
14. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 146: 3-15.
15. Untch M, Ditsch N, Hermelink K. Immunotherapy: new options in breast cancer treatment. *Expert Rev Anticancer Ther* 2003; 3: 403-8.
16. 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.
17. Olofsson MH, Ueno T, Pan Y, Xu R, Cai F, van der Kuip H, et al. Cytokeratin 18 is a useful serum biomarker for early determination of response of breast carcinomas to chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 3198-206.
18. Stearns V, Singh B, Tsangaris T, Crawford JG, Novielli A, Ellis MJ, et al. A prospective randomized pilot study to evaluate predictors of response in serial core biopsies to single agent neoadjuvant doxorubicin or paclitaxel for patients with locally advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 124-33.
19. Morse DL, Gray H, Payne CM, Gillies RJ. Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2005; 4: 1495-504.
20. 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.
21. Mosesso P, Pichierri 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.

= 국문초록 =

목적: 부인종양에서 실시되는 신보조항암화학요법의 효율성을 증가시키기 위해서는 약제들에 대한 반응을 조기에 예측할 수 있는 측정법이 절실히 요구되고 있다. 본 연구에서는 부인종양의 치료에 흔히 사용되는 항암화학요법제의 투여 후에 배양된 세포들과 이들의 배양액내에서 유발된 고사의 정도를 M30 항원을 이용하여 측정함으로써 약제에 대한 반응의 생화학적 지표로서 사용 가능성이 있는지를 알아보았다.

연구 방법: 배양한 HeLa와 OVCAR-3 세포주에 paclitaxel, cisplatin 및 camptothecin의 저농도와 고농도를 각각 투여한 후 수확한 세포들과 배양액내에서 면역형광염색법과 ELISA에 의해 M30 항원을 측정하였다.

결과: 세포질과 배양액내에서 M30 항원의 정도를 각각 측정한 결과는 비투여 대조군으로부터 항암요법제의 투여 농도가 저농도와 고농도로 증가됨에 따라 M30 항원의 수준이 점차적으로 유의하게 증가함을 관찰하였다. HeLa와 OVCAR-3 세포들에서 M30-fluorescein isothiocyanate (FITC)의 면역형광이 양성인 세포들은 대조군에서 각각 4.3%와 4.07%였다. 약제의 농도 (저농도 vs 고농도)에 따라 paclitaxel의 경우에는 18.61%와 18.6% vs 34.87%와 32.63%로 증가되었고, cisplatin의 경우에는 17.87%와 16.83% vs 32.38%와 32%로 증가되었으며, camptothecin의 경우에는 17.87%와 16.83% vs 32.38%와 32%로 점차 유의하게 증가하는 모습이 관찰되었다 ($P < 0.001$). 또한 HeLa와 OVCAR-3 세포들의 배양액내에서 ELISA에 의해 측정된 M30 항원의 값은 대조군에서 각각 53.03 U/L와 86 U/L이었다. 약제의 농도 (저농도 vs 고농도)에 따라 paclitaxel의 경우에는 101.53 U/L와 114 U/L vs 355.59 U/L와 412.04 U/L이었고, cisplatin의 경우에는 79.84 U/L와 125.44 U/L vs 327.64 U/L와 385.09 U/L이었으며, camptothecin의 경우에는 88.41 U/L와 108.42 U/L vs 295.005 U/L와 263.1 U/L로 증가함을 관찰하였다 ($P < 0.001$).

결론: 본 연구를 통해 HeLa와 OVCAR-3 세포주에서 paclitaxel, cisplatin과 camptothecin을 투여한 후 수확한 세포들과 배양액내에서 고사의 지표로서 측정된 M30 항원이 증가한 결과들은 암세포의 항암요법제에 대한 감수성의 조기 평가에 유용할 것으로 생각되었다.

중심단어: 고사, M30 antigen, HeLa, OVCAR-3