

# 유방암세포주에서 고농도 5-fluorouracil의 세포주기 조절효과

<sup>1</sup>경상대학교 의과대학 내과학교실 및 건강과학연구소, <sup>2</sup>한양대학교 의과대학 내과학교실, <sup>3</sup>국립암센터

장정순<sup>1</sup> · 양중일<sup>1</sup> · 장세호<sup>1</sup> · 이원섭<sup>1</sup> · 이종석<sup>1</sup> · 안명주<sup>2</sup> · 박병규<sup>3</sup>

## The Cell Cycle Regulatory Effects of High Dose 5-fluorouracil on Breast Cancer Cell Line

Joung Soon Jang<sup>1</sup>, Jung Ill Yang<sup>1</sup>, Seho Chang<sup>1</sup>, Won Sup Lee<sup>1</sup>, Jong Seok Lee<sup>1</sup>, Myung-Ju Ahn<sup>2</sup> and Byung-Kiu Park<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine and Gyeong Sang Institute of Health Science, Gyeong Sang National University College of Medicine and <sup>2</sup>Department of Internal Medicine, Hanyang University College of Medicine, <sup>3</sup>National Cancer Center

### ABSTRACT

**Background:** Chemotherapy with 5-fluorouracil (5-FU) has been one of the mainstay in breast cancer treatment. The effects of high dose 5-FU on cell cycle regulation were studied in breast cancer cells. **Methods:** A breast cancer cell line MCF-7 was used. Protein expressions of G1/S cyclins, p21<sup>Waf1/Cip1</sup>, cdk2, E2F1 and retinoblastoma were tested by western blot analysis. Immunoprecipitation and immune complex kinase assay were done for the assessment of E2F1/RB interaction and the activity of cdk2 respectively. **Results:** p21<sup>Waf1/Cip1</sup> expression was barely detectable in control cells. With addition of 5-FU level of p21<sup>Waf1/Cip1</sup> were induced and cyclin D3 level was decreased as cell growth decreases. In accordance with increased expression of p21<sup>Waf1/Cip1</sup>, cyclin E-associated cdk2 kinase activity was reduced. Retinoblastoma protein (RB) became dephosphorylated and E2F-1 binding activity with RB was increased. **Conclusion:** In this situation of high concentration of 5-FU breast cancer cells tend to be G1/S cell cycle arrested. Overexpression of p21<sup>Waf1/Cip1</sup> and dephosphorylation of RB may mediate the effects of 5-FU by inhibiting E2F-1 activity, which contributes to G1/S cell cycle arrest. These results could be an indicating landmark for further study of high dose chemotherapy with 5-FU. (Immune Network 2002;2(1):60-64)

**Key Words:** 5-FU, breast cancer, cell cycle regulation

### 서론

유방암은 세계적으로 여성에서 가장 유병률이 높은 암 중의 하나이고 우리 나라에서도 여성 암발생률 3위를 점하는 흔한 악성종양의 하나이다(1). 최근 유방암의 조기진단수기의 발전에 의하여 수술 및 방사선치료 등 치료성적이 향상되고 있다. 이러한 치료방안 중에 중요한

것이 항암화학요법제를 이용한 전신치료이다. 유방암은 임상적으로 항암화학요법에 비교적 반응을 잘하는 종양으로 알려져 있고 수술 후의 보조요법과 근치가 불가능한 경우 고식적 치료방안으로 화학요법제가 많이 쓰이고 있다. 유방암에 많이 쓰이는 제제로는 cyclophosphamide 등의 고전적 alkylating제, 5-fluorouracil (5-FU)와 methotrexate 등의 항대사제와 doxorubicin 등의 항종양항생제 및 Taxane계 약물 등이 단일제제로는 유효하다고 알려져 있다(2). 5-FU의 항종양효과는 주로는 thymidylate synthase와 복합체 형성을 하여 그 효소 기능을 억제하여 DNA합성에 필요한 전구체인 deoxythymidine triphosphate (dTTP)의 결핍을 초래하여 종양세포 DNA합성

책임저자 : 장정순, 경상대학교병원 혈액종양내과

☎ 660-702, 경남 진주시 칠암동 90

Tel: 055-750-8054, Fax: 055-758-9122

E-mail: jsjang@nongae.gsnu.ac.kr

본 연구는 2001년도 한국과학재단 목적기초연구(2001-00151)의 지원으로 수행되었음.

을 저해하는 것이고 이외에 5-FU의 대사물이 RNA나 DNA에 혼입되어 이들의 생산을 저해하는 것 등이 알려진 항암 기작들이다(3). 5-FU의 정상세포 및 암세포에 대한 세포독성효과는 주로는 S기의 분열기에 있는 세포들에 억제 효과가 있는 것이 알려져 있고 고농도에서는 dose-response 효과가 비례하지 않으며 또한 약제의 반감기가 짧은 이유로 종양세포의 약제에의 노출시간을 증가시키는 지속정주 요법이 고형종양 치료에 널리 쓰여져 왔다(4-6). 최근 들어 유방암에서 고용량 항암화학요법 후 조혈모세포이식에 의하여 골수부전을 극복하는 치료법이 시도되고 있는데 각 항암약제의 고농도에서의 작용기전은 일반적인 농도에 비하여 차이를 보일 것으로 추정되나 5-FU의 고농도 투여 시 세포주기 내 효과는 잘 알려져 있지 않다(7-9). 본 연구에서는 유방암치료를 많이 쓰여지고 있는 5-FU를 유방암세포주에 고농도로 처리하여 세포주기 관련 단백질들의 변화를 조사하여 세포주기 조절효과를 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

**유방암세포주 배양 및 관찰.** 유방암세포주 MCF-7 (ATCC, Rockville, MD, USA)을 RPMI-1640 배지에서 10% fetal bovine serum, penicillin & streptomycin (Biofluids, Gaithersburg, MD, USA)를 가하여 배양하였다. 5-fluorouracil은 Sigma Biochemicals (St. Louis, Mo, USA)에서 구하여 1 mM씩 배지에 가하여 48시간 동안 배양하였다. 5-FU 처리 후 매 12시간마다 각각의 투여하지 않은 세포들과 비교하여 Trypan blue dye exclusion법에 의하여 세포 성장 경향을 관찰하였다.

**Western Blot Analysis and Immunoprecipitation.** 배양된 세포들은 phosphate-buffered saline에 2회 수세 후 EBC lysis buffer [40 mM Tris-HCl (PH 8.0), 120 mM NaCl, 0.5% NP-40, 2µg/ml aprotinin, 2µg/ml pepstatin, 2µg/ml leupeptin, 100µg/ml phenylmethylsulfonylfluoride]에 0°C, 20분간 녹인 후 cell lysate를 12,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 상층액을 취하여 단백 정량분석을 시행하였다. Western Blotting을 위해서는 동일한 양의 단백질을 SDS polyacrylamide gel로 분리한 후 nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Keene, NH, USA)에 transfer한 후 membrane을 실온에서 5% nonfat milk용액으로 blocking한 후 각각 일차항체를 가하여 1시간 동안 incubation하였다. 일차항체로 처리된 membrane은 TNE washing buffer [10 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA]로 수세 후 5% nonfat milk용액으로 재차 blocking한 후 2차 항체-항mouse IgG, peroxidase-linked항체(Amersham Corp, Arlington Heights, IL, USA) 혹은 항rabbit IgG, peroxidase-linked항체(Amersham Corp, Arlington Heights, IL, USA)를 각기 일차항체에 맞추어 가하여 1시간 동안 incubation

후 TNE buffer로 수세 후 enhanced chemiluminescence system (Amersham Corp, Arlington Heights, IL, USA)으로 발색시켜 단백질 발현을 관찰하였다. Immunoprecipitation을 위해서는 동일한 양의 단백질이 들어 있는 상층액을 취하여 특정항체 1µg을 넣고 4°C에서 1시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 단백질 항체 복합체는 protein A-Sepharose bead (Sigma)로 침강 수집하여 EBC buffer로 5회 수세 후 SDS sample buffer [62.5 mM Tris-HCl (PH 6.8), 10% glycerol, 2.3% SDS, 0.001% bromophenol blue, 5% β-mercaptoethanol]를 가한 후 SDS polyacrylamide gel로 분리한 후 Western blot 시와 동일한 방법으로 관찰하였다. cyclin D1, D3, E2F1, retinoblastoma단백질, cdk2에 대한 각각의 polyclonal 항rabbit항체와 cyclin E에 대한 monoclonal 항mouse항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구하였다.

**Immune complex kinase assay.** Cell lysate는 immunoprecipitation과 동일하게 처리하고 다만 EBC buffer로 수세 후 reaction mixture [20 mM Tris-HCl (PH 7.5), 4 mM MgCl<sub>2</sub>]로 3회 추가 세척하였다. 여기에 2×reaction buffer에 3µCi [<sup>32</sup>P] ATP (ICN), 2µg histone H1 (Gibco BRL)을 substrate로 넣어 kinase assay mixture를 만들어 넣어 37°C에서 45분간 반응시킨 후 2×SDS sample buffer를 넣어 반응을 정지시켰다. 단백질은 SDS polyacrylamide gel로 분리한 후 건조시켜 autoradiography로 관찰하였다.

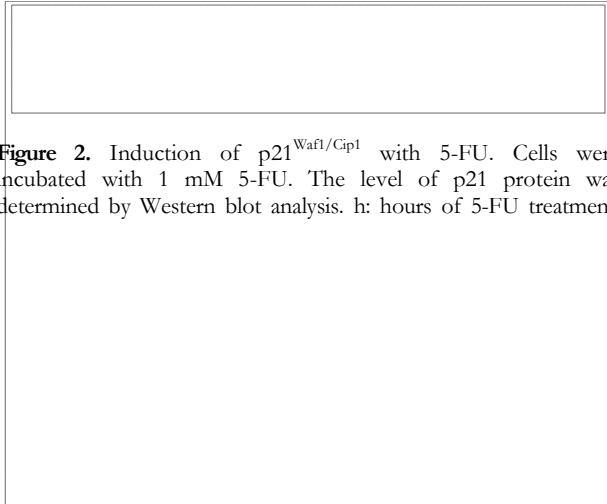
## 결과

**5-FU 투여에 따른 유방암세포의 성장억제.** 유방암세포주 MCF-7에서 1 mM 5-FU를 배지에 첨가 후 처리 24시간까지는 성장 증가 추세가 계속되었으나 36시간째부터 각 세포의 성장 감소세가 관찰되어 5-FU의 유방암세포주에 대한 성장억제 효과가 확인되었다.

**G1 및 G1/S기 세포주기 조절 단백질의 동태.** 세포주기 중 세포주기 이행에 중요한 G1 및 G1-S 이행기에 이르는 세포주기 조절 단백질의 단백질 수준의 변화를 Western blot analysis를 통하여 조사하였다. 대표적인 G1기 cyclin인 cyclin D1은 약제처리에 따라 단백질표현의 변화가 없었던 반면 G1 cyclin 중 역할이 비교적 잘 알려지지 않은 cyclin D3의 단백질수준이 감소하였다. G1/S기를 관장하는 cyclin E 및 S기의 cyclin A는 단백질수준의 변화가 없었다. cdk4 및 cdk2역시 단백질수준의 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 1A, B).

**p21<sup>Waf1/Cip1</sup> 단백질 발현유도.** 세포주기 중 cdk 억제제인 p21의 단백질 발현 수준을 Western blot analysis로 관찰하였는데 5-FU 48시간 처리 후 암세포 성장 감소와 아울러 단백질 수준이 증가하여 암세포의 성장 억제에 p21단백질의 유도가 관련이 있음을 시사하였다(Fig. 2).

**Retinoblastoma단백과 E2F1의 동향.** 본 실험 조건에서



**Figure 2.** Induction of p21<sup>Waf1/Cip1</sup> with 5-FU. Cells were incubated with 1 mM 5-FU. The level of p21 protein was determined by Western blot analysis. h: hours of 5-FU treatment.

**Figure 1.** A. Protein levels of cyclin D3 determined by western blot analysis. B. Protein levels of cyclin E, A and cdk 2, 4 determined by Western blot analysis. Cells were treated with 1 mM 5-FU. h: hours of 5-FU treatment.

retinoblastoma 단백질(이하 RB)은 48시간까지 5-FU의 처리에 의하여 Western blot analysis에서 전체 단백질 발현량은 감소하였으며 상대적으로 인산화형의 RB가 주로 감소된 양상을 보였다. 같은 조건에서 coimmunoprecipitation analysis에 의한 관찰에 의하면 RB의 탈인산화와 함께 E2F1과의 결합이 증가됨을 관찰할 수가 있었다. 이 결과는 RB는 E2F family 중 E2F1과 결합한다는 기존의 보고들과 일치하는데(18) 5-FU가 본 유방암세포주에서 RB의 탈인산화를 유도하고 이로 인해 활성화된 RB가 전사인자 E2F1와의 결합을 통하여 세포성장 억제에 참여하고 있음을 보여 주고 있다(Fig. 3A, B).

**cdk2의 활성감소.** G1-S기 세포분열 진행의 견인차인 cdk2의 인산화 활성을 histone H1을 substrate로 한 kinase assay를 통해 조사하였는데 cyclin E 단백질 발현량은 변화가 없으나 항cyclin E 항체에 의하여 면역 침강된 cdk2의 인산화 활성은 감소되어 cyclin E/cdk2 복합체의 활성이 5-FU처리에 의하여 저하됨을 나타내고 있다(Fig. 4). 반면 항cyclin A 항체에 의하여 면역 침강된 cdk2의 인산화 활성과 항cdk4 항체에 의하여 면역 침강된 cdk4의 인산화 활성은 5-FU처리에 의하여 변화가 없었다.

## 고 찰

세포주기 중 G1 및 G1/S기는 세포주기 이행을 결정하는 중요한 시기이다. 이 시기까지는 외부환경에 세포주기가 영향을 받아 외부인자에 의한 조절이 가능하다(10). 본 연구에서는 고농도 5-FU처리에 의하여 G1/S기 고착 효과가 있는 결과를 얻었는데 광범위 cdk 억제제로 G1-S기에 주로 작용하는 p21<sup>Waf1/Cip1</sup>이 5-FU처리에 의하



**Figure 4.** Decreased cdk2 kinase activity with 5-FU. Cell lysates were immunoprecipitated with polyclonal anti-cdk2 antibody. Immune complexes were incubated with [ $\gamma$ -32P] ATP and histone H1. Phosphorylation of histone H1 was determined by autoradiography.

**Figure 3.** A. Dephosphorylation of RB with 5-FU. Cells were treated with 5-FU and the level of RB was determined by western blot analysis. B. Increased binding between RB and E2F1 in the presence of 5-FU (36 h). Cell extracts were immunoprecipitated with polyclonal anti-E2F1 antibody and protein level of RB was determined by Western blot analysis. h: hours of 5-FU treatment, IP: immunoprecipitation, RB: retinoblastoma protein.

여 유도되고 RB는 탈인산화되면서 활성형이 되어 E2F1과의 결합이 증가되었는데 이러한 결과들이 G1/S기 고착의 기작으로 사료된다. RB는 G1기에서 Restriction Point를 지나 S기로의 진행에 중요한 역할을 하고 이는 전사인자인 E2F들과의 결합을 통하여 세포분열조절기능이 이루어진다고 알려져 있다(11). 이는 p21<sup>Waf1/Cip1</sup>의 과발현이 일부 조건에서 E2F1의 인산화 억제를 유도하고 항암약제에 대한 감수성을 증가시킨다는 보고(12) 등으로 보아 5-FU의 항암기작의 하나로 추정된다. 이러한 단백질수준의 변화의 기작으로는 5-FU에 의하여 유도된 단백질분해 기작이 역할을 할 것으로 추정된다. Cyclin들, p21, p27, RB, p107 등 대부분의 세포주기 관련 단백질들이 단백질분해에 의하여 세포주기 조절에 관여하고 있는 것이 많이 보고되어 있다(7,13). D-type cyclin은 G1기에 중요한 역할을 하는 cdk의 substrate로서 세포성장억제 환경에서 단백질 발현의 감소가 많이 보고되어 있는데 cyclin D1 및 D3는 각각의 조건에 따라 발현 감소 패턴이 다르다(14,15). 본 연구에서는 cyclin D3는 감소된 반면 D1은 변화가 없어 아마도 cyclin D1보다는 D3가 세포성장억제에 관여를 하는 것으로 보인다. 대부분의 세포에서 세포주기 조절자의 작용은 세포주기 중 G1 및 G1/S기에 집중되어 있다. 이 시기는 p53 및 RB로 대표되는 tumor suppressor에 의하여 check point로서 조절되는데 폐암 등 많은 중앙세포에서 이 부분을 관장하는 이들 유전자에 변이가 있음이 알려져 있다(16,17). 본 연구의 결과는 G1 및 G1/S의 통제점의 기능이 유효한 상태에서 얻은 결과이므로 향후 상기한 tumor suppressor들의 기능이 결여된 암세포에서는 G1/S기에의 세포주기 고착효과와는 다른 효과가 기대되는데 이 점도 추가연구를 통하여 구명하여야 할 사안이다. 5-FU 등의 항대사제는 doxorubicin 등의 anthracycline계의 약제와는 달리 dose-response효과가 항상 비례하지 않는데 본 연구 결과는 고

농도 화학요법 시 응용할 기초 연구의 하나로 생각된다. 본 연구결과에서 시사하는 것처럼 5-FU 고용량치료 시 세포주기억제가 주로 일어나는 경우 치료 실패의 원인으로 작용할 수 있어 단일제제로 관해 유도를 시도하는 경우보다는 복합요법에 따른 다른 약제와의 병용을 모색하는 것이 유리할 것이다. 다만 5-FU와 paclitaxel의 경우처럼 서로의 효과를 상쇄할 가능성도 있으므로(19) 약제의 선택에 신중함이 요구되는데 5-FU는 임상적으로 대장암에서 leucovorin, levamisole, interferon 등과 세포독성에 상승효과가 보고되어 있고 유방암에서도 5-FU 단일제제에 비하여 전통적으로 cyclophosphamide, doxorubicin 등과 병합 시 상승효과가 보고되어 있어(20,21) 우선 이들 제제들과의 상호작용에 의한 세포주기변화도 향후 연구에서 추구할 사안으로 생각된다. 이러한 결과들은 향후 고농도 화학요법에서 암세포의 세포주기변화를 관찰하는 지침의 하나가 될 것이다.

## 참 고 문 헌

- Harras A, Edwards BK, Blot WJ, Gloeckler Ries LA, eds: Cancer: Rates and Risks. 4th ed. Bethesda, NIH/NCI, 1996
- Haskell CM: Systemic treatment of metastatic breast cancer. In: Haskell CM: Cancer Treatment. 354-368 Philadelphia Saunders, 1995
- Allegra CJ, Grem JL: Antimetabolite. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. Cancer: principles and practice of oncology, 437-441 Philadelphia Lippincott, 1997
- Grem JL: Current therapeutic strategies to enhance 5-fluorouracil activity. J Infusional Chemotherapy 2;138-142, 1992
- Lokich J: Infusional 5-FU: historical evolution, rationale, and clinical experience. Oncology (Huntingt) 12;19-22, 1998
- Leichman CG: Prolonged infusion of fluorinated pyrimidines in gastrointestinal malignancies: a review of recent clinical trials. Cancer Invest 12; 166-175, 1994
- Jang JS, Lee SJ, Choi YH, Nguyen PM, Wu M, Takano E, Maki M, Henkart PA, Trepel JB: Posttranslational regulation of the retinoblastoma gene family member p107 by calpain protease. Oncogene 18;1789-1796, 1999
- Parr AL, Drake JC, Gress RE, Schwarz G, Steinberg SM, Allegra CJ: 5-fluorouracil-mediated thymidylate synthase induction in malignant and nonmalignant human cells. Biochem Pharm 56; 231-235, 1998
- Lilling G, Hacohen H, Nordenberg J, Livnat T, Rotter V, Sidi Y: Differential sensitivity of MCF-7 and LCC2 cells, to multiple growth inhibitory agents: possible relation to high bcl-2/bax ratio. Cancer Lett 161;27-34, 2000
- Sherr CJ: Cancer cell cycles. Science 274;1672-1677, 1996
- Whyte P: The retinoblastoma protein and its relatives. Semin Cancer Biol 6;83-90, 1995
- Li WW Fan J, Hochhauser D, Bertino JR: Overexpression of p21waf1 leads to increased inhibition of E2F-1 phosphorylation and sensitivity to anticancer drugs in retinoblastoma-negative human sarcoma cells. Cancer Res 1;2193-2199, 1997
- Hopkin K: Regulating cellular processes: The power of protein degradation. J NIH Res 9;36-42, 1997
- Carson B, Lahusen T, Singh S, Loaiza-Perez A, Pestell R, Sausville EA, Senderowicz AM: Down-regulation of cyclin D1 by transcriptional repression in MCF-7 human breast carcinoma cells induced by flavopiridol. Cancer Res 15;4634-4641, 1999
- Russell A, Hendley J, Germain D: Inhibitory effect of p21 in MCF-7 cells is overcome by its coordinated stabilization with D-type cyclins. Oncogene 11;6454-6459, 1999
- Brambilla E, Brambilla C: p53 and lung cancer. Pathol Biol 45;852-863, 1997
- Sellers WR, Kaelin WG: Role of the retinoblastoma protein in the pathogenesis of human cancer. J Clin Oncol 15;3301-3312, 1997
- Beijersbergen RL, Bernards R: Cell cycle regulation by the retinoblastoma family of growth inhibitory proteins. Biochim Biophys Acta 1287;103-120, 1996
- Johnson KR, Wang L, Miller MC, Willingham MC, Fan W: 5-fluorouracil interferes with paclitaxel cytotoxicity against human solid tumor cells. Clin Cancer Res 3;1739-1745, 1997
- Ardalan B, Luis R, Jaime M, Franceschi D: Bio-modulation of Fluorouracil in colorectal cancer. Cancer Invest 16(4); 237-251, 1998

21. O'Byrne KJ, Koukourakis MI, Saunders MP, Salisbury AJ, Isaacs R, Varcoe S, Taylor M, Ganesan TS, Harris AL, Talbot DC: Cyclophosphamide, methotrexate and infusional 5-fluorouracil (infusional CMF) in metastatic breast cancer. *Br J Cancer* 77;1950-1956, 1998