

고형암 세포주에서 항암약제 투여 순서에 따른 항암 효능 연구: peroxiredoxin 단백질과의 관계

경상대학교 의과대학 내과학교실¹, 임상의학연구소², 중앙대학교 의과대학 내과학교실³

조희영¹ · 이경원¹ · 강정훈¹ · 하영술² · 장정순³

목적 : 자궁암 세포주에서 탁솔 및 독소루비신 항암 약제를 병용 투여 시에 투여순서에 따른 효능의 차이를 스크리닝 하고 효능 차이에서 페록시레독신 효소(prx)의 역할을 규명하고자 하였다.

연구 방법 : 탁솔 및 독소루비신을 순서를 서로 바꾸어 자궁암 세포주(원형세포주 혹은 페록시레독신 과발현 세포주)에 처리하고 MTT검사, FACS검사 및 western blot을 시행하였다.

결과 : 투여순서에 따른 세포 독성의 차이가 있었다. prx 과발현 세포주에서는 탁솔 투여 후에 독소루비신을 투여 하는 경우(T→D)에 반대 순서(D→T)에 비하여 세포 독성의 감소가 관찰되었다. T→D 투여순서에서는 반대 순서에 비하여, PARP 단백질 수준은 활성형의 감소가 있었고 cyclin D1은 발현 감소가 적었다. 원형 세포주에서는 이 상의 결과들이 투여 순서에 따른 차이가 없었다.

결론 : 자궁암세포에서 페록시레독신 효소가 과발현 되는 경우는 탁솔 및 독소루비신을 병용 투여하는 경우 투여 순서에 따른 효능의 차이가 있었고 독소루비신 투여 후에 탁솔을 투여하는 것이 항암 효능의 저하를 막을 수 있는 투여 순서로 보인다.

중심단어 : 자궁암, 투여순서, 탁솔, 독소루비신, 페록시레독신

서 론

고형암에서 항암 화학요법 시 일반적으로 단일 약제 투여보다는 두 가지 이상의 복합요법이 효과가 우수하다고 알려져 있다. 최근에는 폐암 등에서 두 가지 약제의 복합 투여요법이 세 가지이상의 약제를 투여하였을 때와 비교하여 효능에 차이가 없으면서 부작용이 적은 것이 알려져서 항암약제 두 가지 약제 복합 요법이 대부분의 고형암에서 표준 모델이 되었다.¹ 항암 복합요법 시 대부분 작용기전이 다른 약제를 투여하여 각 약제간의 상승효과(synergy)를 도모하는데 투여순서에 의하여 항암 효과가 영향을 받을 수 있음을 예상할 수 있다. 이에

따라 투여순서의 조절도 항암약제 투여 시에 고려할 점의 하나이다. 위암에서 가장 많이 쓰이는 5-fluorouracil (5-FU)/cisplatin 2제 복합요법에서 cisplatin→5-fluorouracil의 투여순서가 5-fluorouracil→cisplatin의 투여순서보다 임상적인 항암효능이 우월함이 단편적으로 소개된 바 있고, in-vitro 연구이기는 하지만 위암 세포주에서 oxaliplatin과 5-FU병합 처리시에 처리 순서가 항암 세포 독성에 영향을 미쳐서 oxaliplatin→5-FU의 처리순서가 반대의 순서에 의한 처리보다 항암 효능이 우수하다는 것이 보고된 바 있고 유방암 세포주에서도 항암약제들의 투여 순서에 의하여 효과의 감소 및 부작용 발현의 변화가 있음이 보고되었다.^{2,3} 유방암에서도 doxorubicin 등의 anthracycline 제제는 taxane계 약물에 선행하여 쓰는 것이 효과가 우수함이 알려져서 임상적으로 투여 순서를 지켜서 사용하고 있다. 이러한 항암약제 투여순서의 문제는 자궁암을 비롯한 대부분의 암 환자 치료에서 흔하게 부딪치는 문제이나 아직까지는 특별한 선행 연구

논문접수일 : 2007년 10월 11일 채택일 : 2007년 11월 2일

교신저자 : 장정순, 156-755 서울시 동작구 흑석동 224-1

중앙대학교병원 혈액종양내과

전화 : (02) 6299-1427 · 전송 : (02) 825-7571

E-mail : alsaba@hanmail.net

이 논문은 2005년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임.

없이 경험적으로 결정되어 왔다.

Peroxiredoxin (prx) 단백질은 원래 oxygen free radical에 반응하는 단백질로 알려져 있었으나 최근에는 단백질 보존에 관여하는 chaperon 단백질의 역할도 있음이 보고된 바 있다.⁴ 체내에서는 폐암 조직 등 암 세포에서 발현이 증가되어 있는 경우들이 보고되고 있고⁵ 유방암 세포주에서는 H₂O₂에 의한 암 세포 살해에 저항하는 것에 관여한다고 한다.⁶ 이러한 연구결과들은 prx 단백질이 항암 화학요법에 의한 암 세포 살해를 방해 하여 항암 치료 실패의 원인인자가 될 가능성이 있음을 시사하고 있다. 본 연구에서는 고형암 세포주에서 임상에서 많이 쓰이는 항암약제들(doxorubicin 및 taxol)을 투여순서를 바꾸어 처리하고 투여 순서 차이에 따른 항암 효능의 차이를 분석하고 본 항암 효능 발현에 prx 단백질이 영향을 미치는지 확인 하고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 세포주

HeLa 세포주는 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, Carlsbad CA, USA)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)배지에서 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였고 매 3-4일 간격으로 배양액을 교체 하였다.

2. 인형 peroxiredoxin II (*hPrxII*) DNA 조각의 이입 (transfection) 및 stable Transformant 수립

배양된 HeLa세포는 trypsin처리 후 serum-free DMEM에 4×10^6 cells/ml의 세포 농도로 부유한 후 20 μ g의 pcDNA3.1 vector (Invitrogen)에 ligation된 *hPrxII* genes과 250 μ l의 HeLa세포 부유액을 electroporation chamber에서 single pulse를 가하여 transient transfection을 시키고 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen)이 함유된 DMEM배지에 다시 옮겨 부유하였다. transfection 후 24시간 경과 후에 *hPrxII* protein이 발현되는 세포들을 선택하기 위하여 배양배지에 geneticin (G-418, Amersham corp, Arlington Heights IL, USA)을 0.2 mg/ml의 농도로 첨가하여 계대 배양하였고 *hPrxII*를 발현 하면서 G-418에 내성을 보이는 단일 세포 콜로니 3개를 취하여 G-418 존재 하에 계대 배양 하였다.

3. MTT검사법

실험 대상 세포주의 단세포 현탁액을 만들어 hemocytometer에서 세포수를 계산한 뒤, 96 well flat-bottomed microtiter plate에 적정농도의 세포를 넣는다.

대조군 및 약제 처리 세포들을 넣고 37°C 5% CO₂-95% air 항온항습기에서 4일간 배양한 후, MTT 용액(2 mg/ml)을 50 μ l씩 각 well에 첨가한다. 다시 4시간 동안 항온항습기에서 배양한 후, 각 well에 30 μ l정도의 배양액이 남도록 흡입한다. 이때 well 바닥에 닿지 않도록 주의한다. 부유세포주의 경우에는 배양액 흡입 전에 450 x g에서 5분간 원심분리 한다. Dimethyl sulfoxide (DM-SO) 150 μ l를 각 well에 첨가한 후, plate shaker로 15분간 진탕시킨 다음에 즉시 scanning multiwell spectrophotometer (ELISA reader)로 540 nm에서 absorbance (optical density)를 측정한다.

4. Flow cytometry

HeLa세포들은 10 cm 배양접시에 3×10^5 개의 농도로 부유하여 배양한 후 taxol 및 doxorubicin을 12시간씩 각각 순서를 바꾸어 처리하고 총 24시간 후 부유(floating) 세포 및 trypsin처리한 부착(adherent) 세포들을 거두어 분석을 하였다. 수집된 세포들은 phosphate-buffered saline (PBS)에 녹인 70% 에탄올에 부유하여 얼음속에서 30분간 두어 고정하였다. 고정된 세포들은 원심분리하여 에탄올을 제거하고 ice-cold PBS로 수세 후 45 μ g/ml의 propidium iodide (PI) 및 500 μ g/ml의 ribonuclease A (Sigma, St louis, Missouri, USA)가 함유된 PBS에 부유하여 ice에서 차광하여 30분간 배양한 후 Becton Dickinson FACSCalibur flow cytometer(Becton Dickinson, San Jose CA, USA)을 이용하여 세포주기 분석을 하였다.

5. 약제의 처리

실험에 사용된 항암약제는 paclitaxel (30 ng/ml) 및 doxorubicin (500 ng/ml)으로 각각 세포배양 배지에 각 12시간씩 순서를 바꾸어 처리하였다. 1차 처리 후 12시간이 지나면 배양액을 새로 교환하고 새로운 배양액에 2차 처리시약을 교대로 동일하게 12시간씩 처리 후 총 24시간 경과 후 배양액을 버리고 세포를 수집하였다. 즉 doxorubicin 12 시간 처리 후 paclitaxel 12시간 처리 (D→T) 혹은 paclitaxel 12시간 처리 후 doxorubicin 12시간 처

리 (T→D) 하여 결과를 상호 비교 하였다. 사용된 각 시약은 Sigma사에서 구하였다.

6. Western blot

배양된 세포들은 PBS에 2회 수세 후 EBC lysis buffer [40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 120 mM NaCl, 0.5% NP-40, 2 μ g/ml aprotinin, 2 μ g/ml pepstatin, 2 μ g/ml leupeptin, 100 μ g/ml PMSF]에 0°C, 20분간 녹인 후에 cell lysate를 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리 후에 상층액을 취하여 Bradford법으로 단백질 정량분석을 하였다. Western blotting을 위하여 동일한 양의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel로 분리한 후 nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Keen, NH, USA)에 transfer한 후 membrane을 실온에서 5% nonfat milk로 blocking 한 후 각각 일차 항체를 가하여 1시간 동안 incubation하였다. 일차항체로 처리된 membrane은 TNE washing buffer [10 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA]로 세척 한 후 5% nonfat milk로 다시 blocking 한 후 각각 항mouse IgG- 혹은 항rabbit IgG-peroxidase linked 항체를 2차 항체로 하여 가하여 1시간 동안 incubation한 후에 TNE buffer로 다시 세척 후 Enhanced chemoluminescence system (Amersham)으로 발색시켜 단백질 발현 경향을 관찰하였다. 사용된 각 일차 항체들은 Santa Cruz

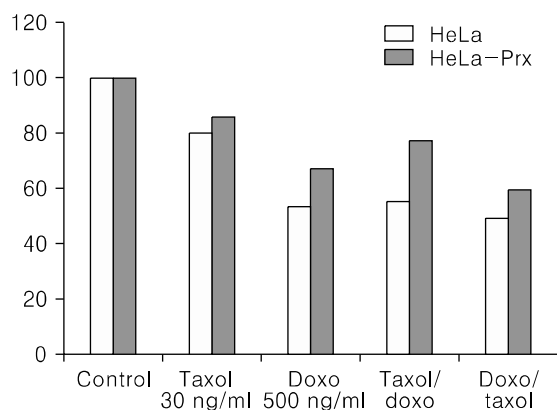


Fig. 1. Cytotoxicity assessed by MTT assay. Cells treated with single drug were incubated for 24 hrs and cells with 2 drugs were simultaneously incubated for 24 hrs comprising 12 hrs of incubation of each drugs. For 2 drug treatment media was replaced with new one in accordance with new drug. HeLa; parental HeLa cells, HeLa-prx; peroxiredoxin II stably transfected cells, Doxo-taxol; doxorubicin followed by taxol, Taxol-doxo; taxol followed by doxorubicin.

technology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구하였다.

결 과

1. 암 세포 성장 경향

MTT법으로 조사한 암 세포 생존 경향은 Fig. 1에 요약 되어 있다. Paclitaxel 및 doxorubicin복합 처리 시 투여 순서에 따라(taxol → doxorubicin 혹은 doxorubicin → taxol) peroxiredoxin II가 과발현되는 세포들(HeLa-prx)과 원래의 세포들(parent HeLa)사이에 암 세포 살해능력에 차이를 보이고 있다. HeLa-prx세포들에서는 taxol 처리 후 doxorubicin처리군(T→D: taxol → doxorubicin)에서는 반대의 순서에 비하여 항암제에 세포살해에 저항하는 경향을 보여주었다. 반면 parent HeLa세포들에서는 투여 순서에 따른 유의한 차이는 보이지 않았다. 이것은 taxol 을 먼저 처리하는 경우는 peroxiredoxin이 과 발현 되는 암 세포에서는 doxorubicin과의 synergy효과를 기대할 수 없음을 의미한다.

2. FACS에 의한 세포주기 변화

HeLa-prx세포들에서 투여 순서에 따른 결과는 Fig. 2에

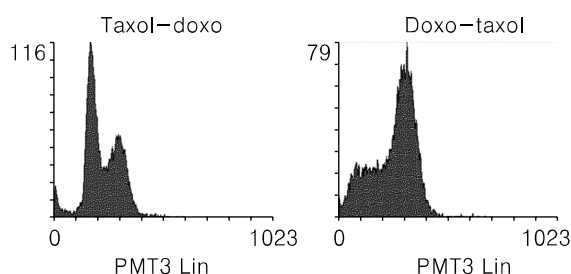


Fig. 2. Flow cytometric analysis. T→D; taxol followed by doxorubicin, D→T; doxorubicin followed by taxol, Doxo-taxol; doxorubicin followed by taxol, Taxol-doxo; taxol followed by doxorubicin.

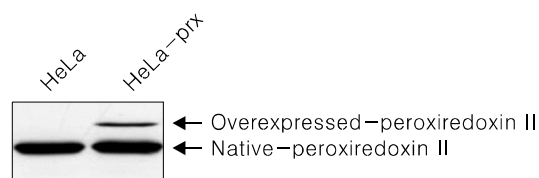


Fig. 3. Over-Expression of peroxiredoxin II in HeLa-prx cells. Overexpressed peroxiredoxin II was detected as upper band. Endogenous peroxiredoxin II was detected as lower baseline bands. HeLa; parental HeLa cells, HeLa-prx; peroxiredoxin II stably transfected cells.

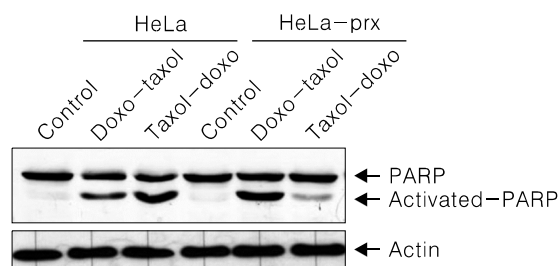


Fig. 4. Protein levels of PARP. HeLa; parental HeLa cells, HeLa-prx; peroxiredoxin II stably transfected cells, Doxo-taxol; doxorubicin followed by taxol, Taxol-doxo; taxol followed by doxorubicin.

요약되어 있다. D->T군에서는 T->D군에 비하여 sub-G1 분획이 증가하였음을 볼 수 있다.

3. 관련된 단백질들의 동향

Fig. 3에서는 peroxiredoxin II 단백질이 stable transfectant (HeLa-prx) 세포에서 성공적으로 과발현 되었음을 보여주고 있다. 이러한 암 세포 살해 차이의 원인을 규명하기 위하여 관련된 단백질들의 변화를 조사하였다. PARP는 apoptosis에 중요한 단백질로서 항암약제에 의한 암세포 살해에 중요한 역할을 한다. parent HeLa 세포들에서는 PARP의 활성화형 조각(activated-fragment)이 각 투여군에서 차이 없이 나타나고 있었으나 HeLa-prx 세포에서는 taxol을 doxorubicin보다 먼저 처리하는 경우(T->D)는 PARP의 활성화형 조각발현이 현저히 감소됨을 관찰할 수 있어 apoptosis가 적게 일어나고 있음을 시사 하고 있다 (Fig. 4).

Cyclin D1은 G1/S이행기에 세포주기 진행에 매우 중요한 역할을 하는 oncoprotein으로 암 세포 생존에 필수적이다. parent HeLa 세포들에서는 투여 순서에 따른 유의한 차이 없이 발현이 현저히 감소되어 있어 암 세포 성장 억제 경향과 일치하는 소견을 보였다. 반면 HeLa-prx 세포에서는 taxol을 doxorubicin보다 먼저 처리하는 경우(T->D) cyclin D1의 발현 감소는 투여순서가 반대인 경우(D->T)나 parent HeLa 세포에 비하여 유의하게 억제되어 있다. cyclin D1이 기질로서 역할을 하는 효소로서 CDK4는 어떠한 경우에도 단백질 발현에는 차이가 없었다(Fig. 5).

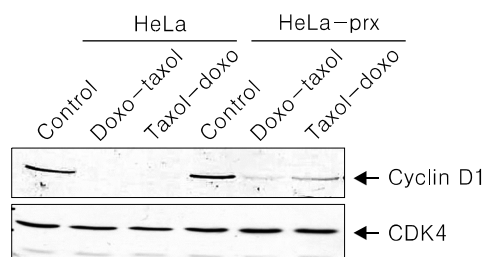


Fig. 5. Protein levels of Cyclin D1 and CDK4. HeLa; parental HeLa cells, HeLa-prx; peroxiredoxin II stably transfected cells, Doxo-taxol; doxorubicin followed by taxol, Taxol-doxo; taxol followed by doxorubicin.

고 찰

항암치료 시 거의 모든 요법에서 2제이상의 약제를 복합하여 사용하는데 투여순서의 치료 효과에 대한 영향에 대한 연구는 거의 없었다. 유방암, 위암 등 여러 암종에서 투여 순서에 따른 항암 효과의 차이는 경험적으로 인정되어 실제 환자 투여에 활용되고 있다. 본 연구에서는 복합항암화학요법에서 많이 선택되는 taxol 및 doxorubicin의 복합 투여 시 투여 순서를 서로 바꾸어 in-vitro에서의 암 세포 살해 능력을 검증 하였다. 본 연구에서는 보이지는 않았으나 peroxiredoxin이 과 발현 되지 않는 parental HeLa 세포들에서는 본 약제들의 투여 순서에 의하여 항암 활성에 서로 차이를 보이지는 않았다. 그러나 peroxiredoxin이 과 발현된 stable transfectant 세포들에서는 암 세포 살해 경향에 차이를 보였고 이것은 PARP의 활성화형의 발현 차이로도 명백해졌다. 본 연구결과는 in vitro에서의 자료이므로 체내에서 그대로 구현된다는 보장은 없으나 체내에서 작동될 여러 기작 중에서 peroxiredoxin계 항산화 효소가 항암 활성 조절에 역할을 할 수 있음을 보여주고 있다.

원래 heat shock protein으로 대표되는 chaperon 단백질은 스트레스하에서 생존에 필요한 주요 단백질들의 단백질 변성을 막아서 세포를 보호하는 역할을 한다.⁷ 여러 종류의 chaperon 단백질들이 암세포 생존에 영향을 미치고 있다는 연구결과들을 바탕으로 최근에는 중요한 항암제 개발의 표적으로 등장하고 있다.⁸ Peroxiredoxin II는 2-Cys peroxiredoxin의 한 종류로서 항산화효소로 알려져 있었으나 그 외에 더욱 중요한 기능들이 알려지면서 최근에 많은 주목을 받아왔다. 즉 2-Cys peroxiredoxin들은 peroxidase로서의 기능 이외에, mitogen-activated

protein kinase 의 활성을 조절하고⁹ 전사인자 NFκ-B의 활성을 조절하는데 이런 사실들은 세포 증식, 면역반응 및 성장 과정에 관여 하는 peroxide-mediated signaling cascades를 조절할 수 있음을 시사한다.¹⁰ 또 이런 과정을 통하여 apoptosis의 억제에도 관여함이 보고 되어 있고⁶ 일부 암종에서 2-Cys Prx 들이 과 발현되어 있음이 알려졌다.^{11,12} 실험적으로는 암 세포에서는 2-Cys Prx들이 과 발현되면 방사선 처리 혹은 일부 실험약제에 의하여 유도되는 apoptosis에 저항하는 하는 것이 알려져 있으나 항산화효소계로서의 역할로는 설명이 되지 않고 있었다.¹²

암 세포들도 항암약제의 공격으로부터 살아남기 위하여 여러 가지 기작을 사용하고 있는데 chaperon단백질의 발현증가도 항암치료 시 암 세포가 살아남는 방편의 하나가 될 수 있다. 본 연구에서 다룬 peroxiredoxin II는 2-Cys Prx들의 여러개의 아형 중에서 기존에 알려진 oxygen free radical scavenger로서는 역할이 미미하고 chaperon 단백질로서의 역할을 중요함³이 최근에 알려졌음을 고려하면 본 연구조건에서는 prx II 단백질은 항산화효소로서의 역할보다는 chaperon 단백질로서의 역할에 주안을 두어야 할 것이다.

이에 따라 본 연구에서는 과 발현된 peroxiredoxin II 단백질이 chaperon 단백질로서 특정 단백질들의 발현에 영향을 미치는지 조사하였다. cyclin D1은 세포주기 중 G1에서 S기로 이행하는데 필수적인 proto-oncogene 단백질로서 ubiquitin-proteasome계에 의하여 단백질 분해되어 조절되고 있음을 고려하면^{13,14} peroxiredon II 단백질은 chaperon으로서 cyclin D1의 단백질 분해를 억제하고 있을 가능성이 있다. 본 연구 결과에 의하면 peroxiredoxin II 과 발현되지 않은 parental 세포에서는 약제 투여에 의하여 cyclin D1의 단백질수준은 현저히 감소된 반면 과 발현된 세포들에서는 특정약제 처리 순서(T→D)에서는 cyclin D1 단백질 수준 감소가 둔화되었다. 이렇게 분해되지 않고 남아있는 cyclin D1단백질은 peroxiredon II의 도움으로 단백질 분해를 모면하였으며 본 조건에서는 암 세포 생존에 기여한다고 추정해 볼 수 있고 이 결과는 약제 처리 순서에 따른 암 세포 성장 곡선의 차이를 설명 할 수 있는 자료의 하나로 추정할 수 있다. 본 연구결과에 보이지는 않았으나 peroxiredon II 단백질이 과 발현 되는 세포들에서는 전반적으로는

ubiquination이 적게 일어나는 것을 관찰한바 있어 세포 생존에 필요한 단백질들이 ubiquitin-proteasome단백질 분해계의 영향을 적게 받을 가능성이 있고 이것은 각각의 단백질에 대한 단백질 반감기 조사를 통하여 확인 할 수 있을 것이다. 약물 처리 순서에 의한 암세포 살해 기작을 추론하면 taxol을 먼저 처리할 때는 taxol에 의하여 암 세포에서 G2/M arrest가 먼저 일어나서 apoptosis로 가는 것을 모면하고 peroxiredoxin같은 chaperon단백질들의 보호를 통하여 살아남을 수 있으나, doxorubicin이 먼저 처리되는 경우는 cell cycle arrest없이 바로 apoptosis를 일으키고 이 경우에 chaperon단백질의 rescue를 받지 못할 가능성을 추론 할 수 있다.

본 연구는 최근 많이 시행되고 있는 복합 화학요법의 투여 순서에 대한 경각심을 알려주는 연구인데 peroxiredon II 단백질은 암 조직에서는 잘 연구되지는 않았으나 폐암, 유방암 세포조직에서 발현이 되고 예후와 관련이 있음이 보고 된바 있어 chaperon단백질로서 새로운 약제내성 관련 단백질로서 주목할만한 가치가 있다. taxol 및 doxorubicin은 암 환자의 항암 화학요법에서 많이 사용되는 약제들 중에 하나들이고 이 두 약제의 복합요법도 여러 암종에서 시도되고 있다. 본 연구결과들로 보면 taxol/doxorubicin복합요법 시에는 peroxiredoxin단백질이 과 발현되는 경우에는 sequence-dependent한 항암 효능의 차이를 보일 수 있으므로 투여 순서에 주의를 요한다고 할 수 있고 향후 임상 연구를 통하여 체내 대사 등을 밝혀야 할 것이다.

결 론

본 연구에서는 항암약제 투여순서에 따른 항암 효능 차이를 세포주 수준에서 모의하여 기작을 밝히고자 하였는데 taxol과 doxorubicin을 복합하는 경우에 peroxiredoxin II 단백질이 과 발현되지 않는 경우는 투여 순서에 상관없이 항암 효능은 차이가 없었으나, 과 발현되는 경우는 doxorubicin을 taxol보다 먼저 처리하는 경우에 항암 효능이 더 높았다. 따라서 자궁암 조직에서 peroxiredoxin II 단백질이 과 발현되는 경우는 taxol/doxorubicin 복합요법 시 투여순서에 주의를 요하며 향후 본 단백질의 조직 내 발현과 항암약제 내성간의 관계를 밝히는 연구가 필요할 것이다.

참고문헌

1. Pfister DG, Johnson DH, Azzoli CG, Sause W, Smith TJ, Baker S Jr, et al. American Society of Clinical Oncology treatment of unresectable non-small-cell lung cancer guideline: update 2003. *J Clin Oncol* 2004; 22: 330-5.
2. Qin B, Tanaka R, Shibata Y, Arita S, Ariyama H, Kusaba H, et al. In-vitro schedule-dependent interaction between oxaliplatin and 5-fluorouracil in human gastric cancer cell lines. *Anticancer Drugs* 2006; 17: 445-53.
3. Davis JH, Desoto JA, Fryar EB, Southerland WM, Bowen D. Sequential combination chemotherapy in human breast cancer: a basis for increased antineoplastic activity and bone marrow protection. *Cell Mol Biol* 2007; 3: 18-26.
4. Jang HH, Lee KO, Chi YH, Jung BG, Park SK, Park JH, et al. Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell* 2004; 117: 625-35.
5. Chang JW, Jeon HB, Lee JH, Chun JS, Kim JH, Yoo YJ. Augmented expression of peroxiredoxin I in lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289: 507-12.
6. Bae JY, Ahn SJ, Han W, Noh DY. Peroxiredoxin I and II inhibit H₂O₂-induced cell death in MCF-7 cell lines. *J Cell Biochem* 2007; 101: 1038-45.
7. Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci* 2006; 31: 164-72.
8. Soti C, Nagy E, Giricz Z, Vigh L, Csermely P, Ferdinandy P. Heat shock proteins as emerging therapeutic targets. *Br J Pharmacol* 2005; 146: 769-80.
9. Veal EA, Findlay VI, Day AM, Bozonet SM, Evans JM, Quinn J, et al. A 2-Cys peroxiredoxin regulates peroxide-induced oxidation and activation of a stress-activated MAP kinase. *Mol Cell* 2004; 15: 129-36.
10. Barford D. The role of cysteine residues as redox-sensitive regulatory switches. *Curr Opin Struct Biol* 2004; 14: 679-86.
11. Kinnula VL, Lehtonen S, Kaarteenaho-wilk R, Kang SW, Rhee SG, Soini Y. Overexpression of peroxiredoxins I, II, III, V, and VI in malignant mesothelioma. *J Pathol* 2002; 196: 316-32.
12. Chen WC, McBride WH, Iwamoto KS, Barber CL, Wang CC, Oh YT, et al. Induction of radioprotective peroxiredoxin-I by ionizing irradiation. *J Neurosci Res* 2002; 70: 794-8.
13. Niwa M, Walter P. Pausing to decide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 12396-7.
14. Luo H, Zhang J, Dastvan F, Yanagawa B, Reidy MA, Wilson JE, et al. Ubiquitin-dependent proteolysis of cyclin D1 is associated with coxsackievirus -induced cell growth arrest. *J Virol* 2003; 77: 1-9.

Differential antitumor effects of sequence-dependent model in tumor cell line: association with peroxiredoxin

Hee-Young Cho¹, Gyeongwon Lee¹, Junghun Kang¹, Young-Sool Hah², Joung Soon Jang³

Department of Internal Medicine¹, Clinical Research Institute², GyeongSang National University Hospital, Jinju, Department of Internal Medicine, Chung-Ang University College of Medicine³, Seoul, Korea

Objective : The efficacy of two-drug combination treatment may be schedule-dependent. We investigated a simulated in-vitro interaction between taxol and doxorubicin in a Cervical cancer cell line HeLa and the role of peroxiredoxin in cytotoxicity.

Methods : Two contradicting schedules of two drugs (taxol followed by doxorubicin or vice versa) were compared each other in terms of cytotoxicity in parental HeLa cell line and the peroxiredoxin (prx)-overexpressing variant. Cytotoxic activity was determined by MTT assay. Cell cycle perturbation was evaluated by flow cytometric analysis. Protein levels were determined by western blot.

Results : The sequential treatment of taxol followed by doxorubicin (T→D) yielded less cytotoxicity measured by MTT assay in prx-overexpressing HeLa cells than the reverse sequenced treatment did. In contrast, in parental HeLa cells, no cytotoxic difference was noted in accordance with sequences. In prx-overexpressing HeLa cells, apoptotic change was more prominent in the the sequence of doxorubicin followed by taxol (D→T). This sequence dependency was further validated by the change in PARP activation which was prominent in D→T sequence but barely observed in T→D sequence. In parental cells, prominent PARP activations were evenly observed in both sequences. Protein level of cyclin D1, a proto-oncogen, was less decreased in the sequence of T→D in prx-overexpressing cells compared with the reverse sequence of D→T in which cyclin D1 was markedly decreased.

Conclusion : The cytotoxicity of taxol and doxorubicin combination is sequence-dependent in prx-overexpressing cells. These findings suggest that, in prx-overexpressing situation, it is worthy to concern about the treatment sequence when taxol and doxorubicin are supposed to employ to treat cancer of the uterine cervix.

Key Words : Cervix cancer, Sequence-dependent, Taxol, Doxorubicin, Peroxiredoxin
