

□ 원 저 □

NCI-H1299 폐암 세포주에서 Caspase-3 Protease 활성을 통한 Sodium Salicylate(NaSaL)의 세포고사[†]

원광대학교 의과대학 내과학교실

심 혁, 양세훈*, 박상면, 정은택

=Abstract=

Sodium Salicylate(NaSaL) Induces Apoptosis of NCI-H1299 Lung Carcinoma Cells via Activation Caspase-3 Protease

Hyeok Shim, M.D., Sei Hoon Yang, M.D.,
Sang Myeon Bak, M.D., Eun Taik Jeong, M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Wonkwang University, Iksan, Korea

Background : Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are useful in the chemoprevention of colon cancers. Continuous NSAID use results in a 40% to 50% reduction in the relative risk of colorectal cancer. The precise mechanism by which NSAIDs prevent and /or cause the regression of colorectal tumors is not known. Some investigators have reported that certain NSAIDs induce apoptosis and alter the expression of the cell cycle regulatory genes in some carcinoma cells when administered at a relatively high concentration. However, the possibility of NSAIDs application as chemopreventive agents in lung cancers remains to be elucidated. To address this question, the human lung cancer cell line NCI-H1299 was used to investigate whether or not NSAIDs might induce the apoptotic death of NCI-H1299 cells.

Method : A viability test was carried out using a MTT assay. Apoptosis was measured by flow cytometric analysis and nuclear staining(DAPI). The catalytic activity of the caspase family was measured by the fluorogenic cleavage of biosubstrates. To define the mechanical basis of apoptosis, western blot was performed to analyze the expression of the cleavage of the death substrates(PARP and ICAD).

[†]본 연구는 2001년도 원광대학교 교내 연구비 지원에 의해 이루어짐

Address for correspondence :

Sei-hoon Yang, M.D.

Department of Internal Medicine, Wonkwang University Hospital,
344-2 Shinyong-dong, Iksan, Jeonbuk, 570-711, Korea.

Phone : 063-850-1078 Fax : 063-855-2025 E-mail : yshpul@wonkwang.ac.kr

Results: NaSaL significantly decreased the viability of the NCI-H1299 cells, which was revealed as apoptosis characterized by an increase in the subG₀/G₁ population and nuclear fragmentation. The catalytic activity of caspase-3 protease began to increase after 24 Hr and reached a peak 30 Hr after treatment with 10 mM NaSaL. In contrast, caspase-6, 8, and 9 proteases did not have a significantly altered enzymatic activity. Consistent with activation of caspase-3 protease, NaSaL induced the cleavage of the protease biosubstrate.

Conclusion: NaSaL induces the apoptotic death of NCI-H1299 human lung cancer cells via the activation of caspase-3 protease. (*Tuberculosis and Respiratory Diseases* 2002, 53:485-496)

Key words : NCI-H1299, NaSaL, Apoptosis, Caspase-3 protease.

서 론

비스테로이드 항염제(nonsteroidal anti-inflammatory drugs 이하 NSAIDs)는 진통, 해열, 소염 작용 등의 약리 작용을 가지고 있어 널리 사용되어 왔으며, 주로 prostaglandin (PG) 합성을 억제하는 것에 기인하는 것으로 알려져 있다¹. 최근에는 이 약제들이 암세포를 억제한다는 동물 실험, 임상 및 역학적 연구 결과가 보고되고 있다²⁻¹². 역학적 연구에서는 NSAIDs가 대장암¹³, 유방암¹⁴, 폐암¹⁵에서 암화학예방 효과가 있다고 알려져 있고, 대장암¹⁶ 및 유방암 세포주¹⁷, 생쥐 폐 선종¹⁸에서도 암 예방효과가 있다고 알려져 있다. 또한 NSAIDs를 지속적으로 경구 복용할 때 대장암에 걸릴 위험도가 40-50% 감소하였다고 2001년 미국 임상 암학회에서 보고 한 바 있다. NSAIDs의 암 예방 효과는 주로 대장암 세포주에서 연구되었으며, 주로 cyclooxygenase(COX) 억제가 대표적으로 관계하는 것으로 알려져 있으나¹⁹⁻²¹, 그 외에도 암세포 성장의 억제²²와 세포고사 유도²³⁻²⁴로 인해 암 예방 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

세포사멸의 유형은 세포괴사(necrosis)와 세포고사(programmed cell death, apoptosis)로 분류할 수 있으며, 이 중 세포고사는 최근에 매우 활발히 연구 보고되는 분야로서 각종 유전자의 발현과 발현

산물인 단백질의 활성화가 동반되며, calcium-dependent endonuclease에 의하여 180-200 bp의 분절체가 나타나는 DNA의 사다리형 분절(ladder-pattern fragmentation)을 특징적으로 나타낸다²⁵⁻²⁶. 세포고사가 진행되고 있는 세포는 세포 위축, 세포막 blebbing, 염색질 응축 및 DNA 분절의 형태학적이고 생화학적인 변화의 특징을 나타낸다. 이러한 세포 고사가 불충분할 때 변형된 세포가 생존하여 암의 발생이나 진행을 가져오는 것으로 알려져 있으며, 항암화학요법이나 방사선 조사 등의 암치료의 발달은 최근 표적 세포에서 세포고사의 유도를 통해 많은 연구가 진행되고 있다. 최근에는 정상세포보다는 암세포에 더욱 민감하게 작용하는 약제 개발에 중점을 두고 있으며, 이런 약제에 의한 암세포의 사멸이 일부는 세포고사에 의하여 매개됨이 밝혀지면서, 이에 대한 생화학적 그리고 분자생물학적인 접근이 활발하게 이루어지고 있으나 아직도 명확히 규명되지 않고 있다.

Salicylate에 의한 세포고사의 유도기전은 정확히 알려져 있지 않지만 몇몇 연구에서 mitogen-activated protein kinase(MAPK) 신호전달경로 억제²⁷, nuclear factor-kappa B(NF- κ B) 활성 억제²⁸, activator protein-1(AP-1) 활성을 억제²⁹ 한다는 일부 보고가 있다.

폐암은 전 세계적으로 흔하고, 예후가 나쁜 암으

로 알려져 있다. 특히 우리 나라에서도 암 발생률은 2위, 암 사망률은 1위를 차지할 정도로 심각한 질환이다.

폐암은 조기에 발견하기가 어렵고 치료에 있어서도 비소세포폐암은 근치적 절제술 외에 완치의 가능성이 희박하고 소세포 폐암은 복합항암요법에 잘 반응하지만 빈번한 재발 등으로 예후가 불량하여 예방이 중요한 위치를 차지하고 있으며, 또한 치료에 있어서도 기존의 치료 외에 암의 생물학적인 특성을 이용하여 암세포에만 영향을 줄 수 있는 치료 방법의 개발이 필요하다.

이에 저자들은 대장암에서 NSAIDs가 암 예방 효과가 있는 것을 바탕으로 하여 폐암세포주에서는 sodium salicylate가 세포의 성장에 어떤 영향을 미치고, 세포고사가 일어나는지, 일어나면 어떤 기전을 통하여 일어나는지 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

1) 세포주

NCI-H1299 세포는 사람 폐암 조직에서 얻은 대세포 폐암주로서 한국 세포주 은행(KNCC, 서울대학교)에서 분양 받아 계대배양 하면서 실험을 실시하였다.

2) 시 약

실험에 필요한 RPMI 1640, 항생제, trypsin 및 우태아 혈청(fetal bovine serum: FBS) 등 세포배양에 필요한 성분은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, U.S.A)에서 구입하였으며, 배양용기(24-well plate, 6cm, 10cm dish)는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, U.S.A)에서 구입하여 사용하였다. Sodium Salicylate, Methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl, tetrazolium bromide (MTT), propidium iodide(PI), bicinchoninic acid(BCA), dime-

thyl sulfoxide(DMSA)는 Sigma사(St. Louis, Missouri) 제품을 사용하였다.

4,6-diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI)는 Boehringer Mannheim사(Mannheim, Germany)에서 구입하였다. Caspase-3 protease의 기질인 Ac-DEVD-7-amino-4-methylcoumarin(AMC), caspase-6 protease의 기질인 Ac-DEVD-AMC, caspase-8 protease의 기질인 Ac-IETD-7-amino-4-tri-fluoromethylcoumarin (AFC), caspase-9 protease의 기질인 Ac-LEHD-AFC는 Calbiochem사(San Diego, CA, U.S.A)로부터 구입하였으며, poly(ADP-ribose) polymerase(PARP), inhibitor of caspase-3-activated DNase (ICAD)에 대한 항체는 Santa Cruz사(Santa Cruz, CA, U.S.A)에서 구입하였고 anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase와 enhanced chemiluminescence kit (ECL kit)는 Amersham사(Buckinghamshire, England) 제품을 사용하였다.

3) NCI-H1299 세포 배양

대세포 폐암세포주 H1299세포는 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 10% 우태아 혈청이 포함된 RPMI 1640 (GIBCO BRL, England) 배양액으로 배양하였으며, 24시간 간격으로 배양액을 교체하여 log phase에 있는 세포에 sodium salicylate를 농도별 또는 시간별로 처리한 뒤 세포 성장 억제, 세포고사 현상 및 이에 연관된 생화학 및 분자생물학적 실험을 수행하였다.

2. 방 법

1) 세포 생존율 측정

세포(1×10^5 세포수/mL)는 세포 배양판(24-well plate)에 1 mL씩 분주하여 12시간 이상 CO₂ 세포 배양기 안에서 안정시킨 후, sodium salicylate를 농도별로 처리 후에 시간에 맞추어, MTT 용액(5

mg/mL in PBS)을 배양액 최종부피의 1/10이 되게 첨가하였다. 4시간 후 살아 있는 세포에 의해 생성된 보라색 formazan의 검출은 MTT가 들어있는 배양액을 모두 버리고 DMSO를 500 μ l을 넣고 충분히 녹인 후 96 well plate에 100 μ l을 넣고 분광광도계(ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA)를 이용하여 595 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

2) Flow cytometry 분석

세포고사 현상을 조사하기 위해서 propidium iodide(PI)로 DNA를 염색한 후 FACS Vantage (Becton-Dickinson FACSCaliber) flow cytometer를 이용하여 형광의 세기를 측정하였다. NCI-H1299 폐암세포를 6cm 배양판에 1×10^5 개의 세포수가 되도록 분주한 후 sodium salicylate를 농도별로 처리한 후 48시간 배양하였다. cell scraper를 사용하여 분리한 세포를 배양액과 모은 후 1200 rpm에서 5분간 원심분리를 하여 세포를 침전시키고 PBS 1 ml을 넣어 다시 부유시킨 후 1200 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 침전된 세포에 70% ethanol 2 ml을 첨가하여 4 °C에서 4시간 동안 고정시킨 후 phosphate-citrate buffer(0.2 M Na_2HPO_4 , 0.1 M citrate)와 실온에서 30분 반응시켰다. 그리고 RNase(0.1 mg/ml)을 첨가한 후 37 °C에서 30분간 반응시킨 후 세포는 PI(50 μ g/ml)와 37 °C 암실에서 반응시켰다. FACS Vantage flow cytometer를 이용하여 형광의 세기를 측정하였으며, 그 정보의 분석은 CELLQUEST software (Becton-Dickinson)를 이용하였다. Sub-G₁ DNA content부분은 세포고사를 나타낸다.

3) DAPI 염색

세포핵의 형태학적 변화를 알아보기 위하여 DAPI 염색을 시행하였다. Sodium salicylate를 처리한 세포는 4% 포름알데히드(formaldehyde) 용액에서

10분 고정시킨 후 PBS (pH 7.4)로 2회 세척하고 DAPI (Boehringer Mannheim, Germany) 염색약을 생리식염수에 최종농도가 2 mg/ml가 되도록 희석하여 1시간 염색한 후 다시 생리식염수에서 세척하여 형광현미경(Leica, MPS 60, Germany)으로 관찰하였다.

4) Caspase계 cystein protease 활성도 측정

Sodium salicylate 처리 후 포집된 NCI-H1299세포 (1×10^6)는 4 °C에서 20분 lysis buffer (1% Triton X-100, 0.32 M sucrose, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol [DTT], 1 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin)로 용해하고 12,000 rpm으로 20분동안 원심 분리하였다. 원심 분리하여 얻은 세포파쇄액은 bicincholinic acid (BCA, Sigma Co. Missouri)법으로 단백질을 정량하고, 세포파쇄액을 분석 완충용액(100 mM HEPES, pH 7.5, 10% sucrose, 0.1% Chaps, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin)에 희석된 형광기질과 37 °C에서 30분 반응시킨 후 fluorometer(Molecular Devices CO, U.S.A.)로 측정하였다. 먼저 caspase-3 protease의 효소 활성의 측정은 형광기질인 Ac-DEVD-7-amino-4-methylcoumarin(AMC) 50 μ M을 이용하였고, caspase-6 protease의 효소 활성 측정은 Ac-DEVD-AMC 50 μ M을 이용하였으며, 이들 형광기질의 proteolytic cleavage를 측정하여 caspase 활성을 결정하였다. 이때의 파장은 excitation wavelength(380 nm)와 emission wavelength(460 nm)를 사용하였다. Caspase-8 protease의 효소적 활성은 Ac-IETD-7-amino-4-trifluoro-methylcoumarin (AFC) 50 μ M을 기질로 사용하였으며, 이들의 proteolytic cleavage를 400 nm (excitation wavelength)와 505 nm (emission wavelength)의 파장에서 측정하였다. Caspase-9 protease 효소적 활성은 Ac-LEHD-AFC (Calbi-

ochem) 50 μ M을 기질로 사용하여 이들의 pro-teolytic cleavage를 400 nm (excitation wavelength)와 505 nm (emission wavelength)의 파장 하에서 측정하였다.

5) ICAD와 PARP에 대한 Western blotting
배양된 세포에 sodium salicylate를 농도별, 시간별로 처리한 후에 포집하여 냉 Hank's balanced salt(HBSS) 용액으로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 세포파쇄용액 RIPA용액(50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin)과 4 $^{\circ}$ C에서 30분 반응시켰다. 세포파쇄액은 13,000 rpm에서 20분 동안 원심 분리한 후 세포파쇄액은 BCA 용액을 이용하여 단백질을 정량 하였다. 동량의 세포파쇄액(단백질: 200 μ g)은 2 \times sample buffer와 혼합하여 100 $^{\circ}$ C에서 5분간 끓인 후에 12.5% sodium dodeylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS- PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 semi-dry방법으로 실온에서 단위면적당 0.8 mA 전하를 2시간 걸어주어 nitro-cellulose membrane 상에 이동시켰다. nitrocellulose membrane은 blocking buffer (5% skim milk)와 상온에서 2시간 반응시켜 비특이적 항체 결합을 억제시켰다. PARP와 ICAD에 대한 항체는 0.01%(v/v)의 Tween-20이 포함된 3% skim milk/TBS에 1:1000으로 희석하여 상온에서 3시간 반응 후 이차항체 anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase와 상온에서 1시간 반응시킨 후 Nitrocellulose membrane은 TBS로 3번 세척 후 ECL kit를 사용하여 ECL 필름에 노출시켰다.

3. 결과 산출 방법

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이며 이들의 평균(mean)과 표준편차(standard deviation,

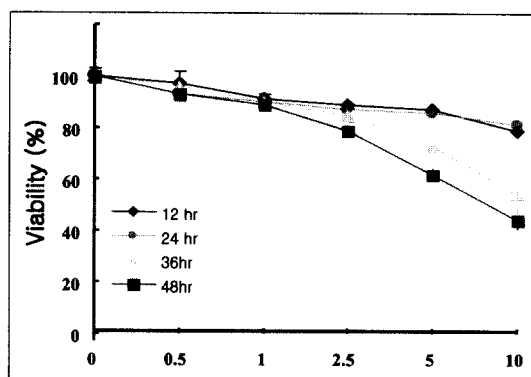


Fig. 1. Sodium salicylate decreased the viability of NCI-H1299 human lung cancer cells in a time- and dose-dependent manner. The cell viability was determined by a MTT assay. The percentage survival was calculated as a ratio of the A_{550} of the NaSaL-treated cells and the control cells. The results are represented as a mean \pm S.D. of three independent experiments.

S.D.)를 산출하여 표시하였다.

결 과

1. Sodium salicylate처리 후 NCI-H1299 폐암 세포주의 생존율 변화

NCI-H1299 폐암세포주에서 sodium salicylate의 농도와 시간의 변화에 의한 생존율의 변화를 알아보기 위하여 0.5, 1, 2.5, 5, 10 mM의 농도로 처리한 후 12, 24, 36, 48시간에 따른 생존율을 처리하지 않은 세포 군을 대조 군으로 하여 MTT 분석을 하였다. 생존율의 결과는 12시간에서 0.5 mM은 97%, 1 mM 91%, 2.5 mM 89%, 5 mM 87%, 10 mM 79% 였다. 24시간에서는 0.5 mM은 93%, 1 mM 90%, 2.5 mM 87%, 5 mM 86%, 10 mM 81% 였고, 36시간에서는 0.5 mM은 96%, 1 mM 90%,

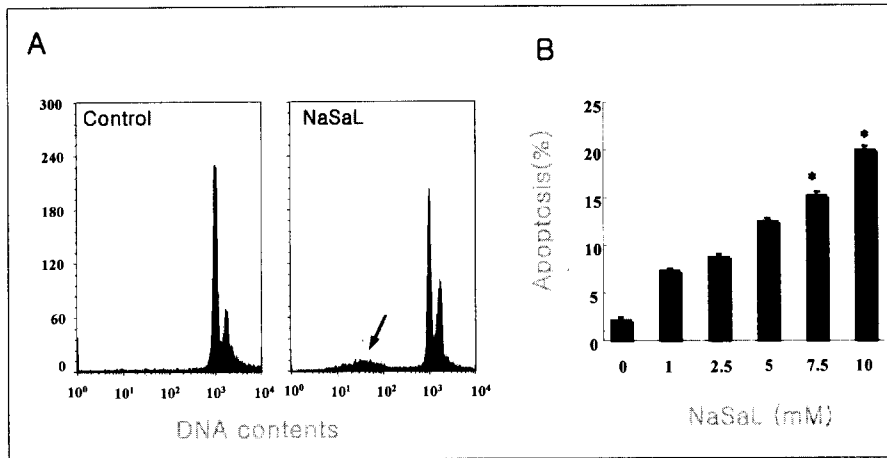


Fig. 2. Sodium salicylate induce apoptosis in NCI-H1299 cells.

(A) Flow cytometric analysis of NaSaL-treated NCI-H1299 cells. The cells were incubated for 48 Hr with 10 mM NaSaL. The number of cells in the sub- G_1 phase (arrow) was increased after NaSaL treatment.

(B) The dose-response relationship of NaSaL-induced apoptosis. The NCI-H1299 cells were treated with the indicated NaSaL concentrations. After 48 Hr PI staining and FACS analysis was performed (* $p < 0.01$).

2.5 mM 85%, 5 mM 73%, 10 mM 54%였다. 48시간에서는 0.5 mM은 93%, 1 mM 89%, 2.5 mM 79%, 5 mM 62%, 10 mM 44%로 생존율이 현저히 감소하였다(Fig. 1). 이상의 결과는 sodium salicylate가 NCI-H1299세포의 생존율을 농도와 시간에 의존적으로 감소시킴을 의미하였다. 이러한 결과를 토대로 salicylate에 의한 세포 독성 형태를 규명하려고 추후 실험들에서의 농도는 50%이상 감소한 48시간, 10 mM에서 다음 실험을 진행하였다.

2. Sodium salicylate에 의한 세포 고사의 Flow cytometry 분석

Sodium salicylate 10 mM로 처리한 세포 군에서 48시간 후에 대조 군에 비해 세포 주기 중 G_1 peak는 감소하고, 세포 고사가 일어난 세포들의 낮은 분자량을 가진 DNA의 단편들이 세포막의 변화로 이동하여 G_1 주기 전에 나타나는 “sub- G_1 ”

peak가 나타난 소견을 보여주고 있다(Fig. 2A). 또한 sodium salicylate을 1, 2.5, 5, 7.5, 10 mM 농도별로 처리하고 48시간 후에 세포고사를 flow cytometry 상 “sub- G_1 ” peak로 관찰하였을 때 1 mM은 8.66%, 2.5 mM 10.37%, 5 mM 14.73%, 7.5 mM 17.93%, 10 mM 23.62%로 농도에 의존적으로 세포고사가 증가함을 관찰하였다(Fig. 2B).

3. Sodium salicylate처리 후 NCI-H1299 폐암 세포주의 핵산 염색

세포고사의 형태학적 특징 중의 하나인 세포핵의 변화를 관찰하기 위해 10 mM의 NaSaL를 NCI-H1299세포에 처리하고 48시간 후 DNA에 특이적으로 결합하는 형광 염색액인 DAPI를 사용하여 DNA를 염색하고 형광현미경으로 관찰시 대조군 NCI-H1299세포핵은 타원형의 온전한 형태로 균질한 형광염색을 나타낸 반면, 10 mM NaSaL 처리

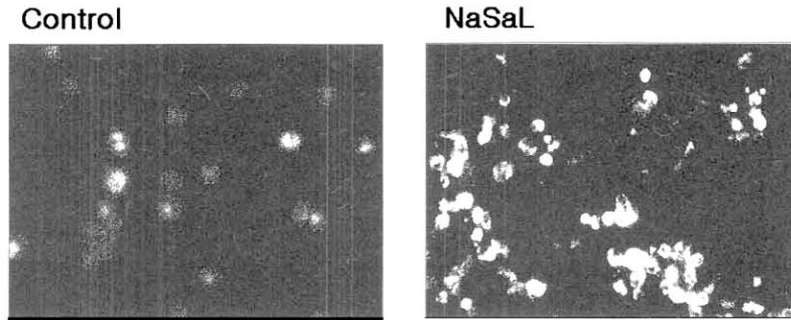


Fig. 3. Nuclear fragmentation induced by sodium salicylate in the NCI-H1299 human lung cancer cells.

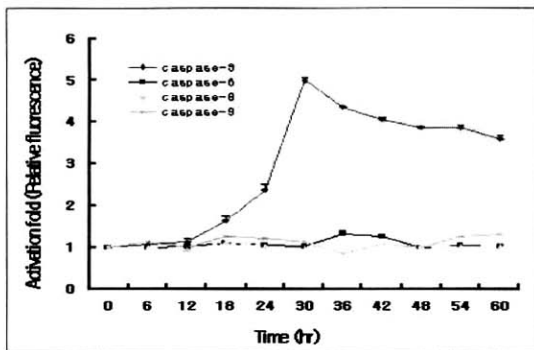


Fig. 4. Caspase activation induced by sodium salicylate in the NCI-H1299 human lung cancer cells.

군은 48시간 후 핵들의 chromatin이 응축되면서 작아지고 여러 조각으로 분절된 형광절편 (apoptotic bodies)을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

4. NaSaL이 NCI-H1299세포의 Caspase 활성화에 미치는 영향

NaSaL에 의한 NCI-H1299세포의 세포고사가 caspase의 활성화에 의한 것인지를 알아보기 위하여 caspase계 cysteine proteases 중에서 CPP32-like cysteine protease라고 알려진 caspase-3 protease (DEVD-specific cysteine protease), caspase-6 protease, FLICE라고 알려진 caspase-8 protease

그리고 caspase-9 protease의 효소적 활성을 형광 기질을 이용하여 조사하였다.

Caspase-3 protease는 대조 군에 비하여 10 mM의 NaSaL처리 후 24시간부터 효소적 활성이 증가하여 30시간 후에는 5배로 최고 활성화를 보인 후 36시간째부터 효소 활성이 감소하는 경향이였다 (Fig. 4). 그러나 caspase-6, 8, 9 protease 효소적 활성은 시간에 따른 의미 있는 변화는 관찰 할 수 없었다. 또한 활성화된 caspase-3 protease의 기질인 inhibitor of caspase-3-activated dBASE (ICAD/DFF45)와 poly (ADP-ribosyl) polymerase (PARP) cleavage 정도를 western blotting을 통하여 확인하였다. Caspase-3 protease의 세포내 기질 단백질의 하나인 ICAD는 핵 안에 존재하면서 caspase-3에 의해 ICAD가 잘리면 CAD가 활성화되어 손상된 DNA 잘라 절편을 만들고 세포고사가 일어나는데 caspase-3 protease에 의해 45 kDa 크기의 단백질이 절단되어 12.5 kDa의 단편으로 절단되게 된다. PARP도 caspase-3 protease의 기질로 핵 안에 존재하면서 손상된 DNA 복구에 관련된 단백질로서 세포고사가 일어나면 caspase-3 protease에 의해 116 kDa 크기의 단백질이 절단되어 85 kDa의 단편으로 절단되게 된다. ICAD와 PARP 분절은 NaSaL을 농도별로 처리한 후 36, 48시간에 관찰하였을 때 농도와 시간에 의존적으

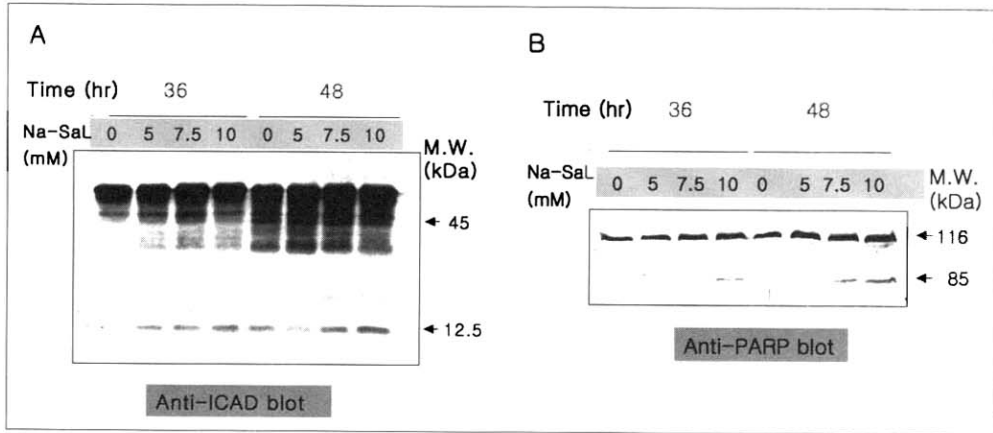


Fig. 5. Induction of apoptosis by sodium salicylate on the NCI-H1299 cells.
(A) Effect of NaSaL of ICAD cleavage.
(B) Effect of NaSaL on PARP cleavage.

로 분절이 증가함을 관찰하였다(Fig. 5A, B).

고 찰

NSAIDs는 진통, 해열, 항염증의 약리 작용을 가지고 있어 류마티스양 관절염을 비롯한 염증성 질환 치료에 사용되고 있으며 최근에는 COX의 활성을 억제하여 암세포의 증식을 억제하고 또한 세포고사 유도, 혈관생성 억제, 발암 물질 활성의 감소, 면역 감시체계를 자극하는 것으로 알려지고 있다. COX는 arachidonate를 prostglandin(PG)으로 산화시키고 이 PG가 세포의 성장 및 혈관형성에 관여하는 것으로 알려져 있어 특히 COX-2를 억제하는 약물, NSAIDs 등이 암세포의 성장을 억제하는 것으로 알려지고 있고, COX-2 억제제의 개발에 최근 많은 연구가 이루어지고 있다.

대장암 세포에서 COX-2의 활성이 증가되어 있고 COX 억제제를 투여한 경우 암세포의 증식을 억제할 수 있다는 실험적 증거가 제시되었다. 이런 연구 결과를 토대로 sulindac을 familial adenomatous polyposis(이하 FAP)환자에게 투여하는 연

구가 이루어졌는데, Waddell 등은 1983년 대장 절제술을 받은 FAP 환자 세 명과 가드너 증후군을 가진 환자 한 명에게 1년간 sulindac을 투여하여 용종의 완전한 소멸을 보고하였다. COX 억제제인 NSAIDs가 암 발생을 억제함을 시사하는 강력한 증거는 대장암을 대상으로 한 코호트 연구에서 나왔다. 많은 전향적 혹은 후향적 연구가 있었는데 대부분의 연구에서 아스피린 혹은 다른 종류의 NSAIDs를 먹는 사람이 대조 군에 비해 대장암에 걸릴 상대 위험도가 낮았다¹¹⁻¹². Lim 등³⁰은 전립선 암세포 주에서도 sulindac 대사물이 세포 성장을 억제하고 세포고사를 유도한다고 보고하였으며, Sotiriou 등³¹도 유방암세포주에서 aspirin과 대사물질인 salicylate가 세포 성장을 억제한다고 보고하였으며, 2000년에 Rioux N 등³²은 acetylsalicylic acid를 경구로 지속적으로 투여하였을 때 생쥐 폐암 모델에서 tumorigenesis 억제하고 세포고사를 가져온다고 보고하였다.

세포고사는 세포나 장기의 항상성(homeostasis)유지를 위해 중요한 기전으로서 1980년대 후반기부터 세포생물학 영역에 도입되면서 생명과학의

많은 분야에 발전을 가져 왔으며, 특히 신경계와 면역계에서 세포의 생성, 분화 및 기능 발현 등에 작용하는 역할이 밝혀졌다. 세포고사 기전의 이상은 암 발생, 항암치료에 대한 내성 발현, 자가면역 질환의 발생, 퇴행성 질환 및 후천성 인 면역결핍 바이러스에 의한 병리현상에 중요한 역할을 수행함이 보고되었다³³⁻³⁴.

임상적으로 암환자에 많이 적용하고 있는 항암 화학요법은 항암제가 정상세포보다는 암세포에 더욱 민감하게 작용하는 특성을 이용하고 있으며, 항암제에 의한 암세포 사멸이 일부는 세포고사에 의하여 매개됨이 밝혀지면서, 이에 대한 생화학적 그리고 분자생물학적인 접근이 활발하게 이루어지고 있으나 아직도 명확히 규명되지는 않고 있다.

본 연구에서 저자들은 NCI-H1299 폐암세포에서 sodium salicylate를 처리하였을 때 5 mM, 10 mM에서 유의하게 세포독성이 일어나는 것을 확인 할 수 있었다. 이 세포독성의 원인으로 세포고사가 일어나는데 여러 가지 실험 방법을 이용하여 세포고사를 확인 할 수 있었다. Salicylate는 다른 NSAIDs와 비교 할 때 COX1, COX2의 억제 작용이 상대적으로 미약하므로, 세포고사에 COX의 역할은 미미할 것으로 생각되어 세포고사를 가져오는 다른 기전에 대하여 알아보고자 하였다.

최근에 COX와는 독립적으로 세포고사와 관련된 실험이 몇몇 암세포 주에서 제한적으로 보고되었다. 1999년에 Klampfer 등³⁵은 골수성 백혈병세포에서 sodium salicylate가 caspase를 활성화시켜 세포고사를 일으킨다고 보고하였고, Bellosillo 등³⁶은 만성 림프구성 백혈병세포에서 aspirin과 salicylate가 세포고사를 유도하는데 COX와 독립적으로 caspase를 활성화 시켜 일어난다고 보고하였다. 또한 McDade 등³⁷은 췌장암 세포에서는 NF- κ B활성을 억제하는 기전으로 하여 TNF- α 유도 세포고사를 강화함을 보고하였다.

폐암 세포에서는 NSAID가 COX2와 NF- κ B의 억제를 결과로 폐암 유발인자로 알려진 NNK

(4-[methylnitrosamine]-1-[3-pyridyl]-1-butanone)에 의해 억제된 면역기능의 회복에 기여할 것이라는 가설이 mouse model에서 제시되었고¹⁸, 박 등³⁸은 사람 폐암 세포주에서 NSAIDs의 세포고사가 caspase-3와 p53의 발현을 통하여 일어날 것으로 보고하였으나, 아직까지 확실히 정립된 바는 없다. 본 연구에서는 사람 폐암세포주인 NCI-H1299세포에서 NaSaL에 의해 세포고사가 유도되는지를 DAPI 염색을 통하여 chromatin의 응축, apoptotic bodies 등의 관찰로 확인할 수 있었고, 유세포 분석으로 NaSaL의 농도에 의존적으로 세포 고사가 증가됨을 알 수 있었다. Salicylate에 의한 세포고사의 유도기전은 정확히 알려져 있지 않지만 몇몇 연구에서 mitogen-activated protein kinase(MAPK) 신호전달 경로 억제, NF- κ B 활성 억제, activator protein-1(AP-1) 활동성 억제가 관여하는 것으로 보고되어, 본 연구에서는 세포 고사의 기전을 caspase pathway에 대하여 알아보았다.

위의 결과에서 보듯이 caspase pathway는 caspase-3의 활성을 통하여 caspase-3의 기질인 PARP와 ICAD을 분절시켜 세포고사가 일어남을 확인할 수 있었다.

항암제 유도 세포고사는 암세포의 저항성이 치료의 장애가 되고 있는 점을 고려한다면 앞으로 암 예방 측면에서의 연구가 더욱 강조되어야 할 것으로 사료된다. 또한 현재 시점에서의 연구는 암세포의 세포 고사를 유도하면서, 암세포가 생존하는데 필요한 인자에 대한 많은 연구를 통하여 생존인자를 억제함으로써 암세포의 사멸을 유도하는 많은 약제개발이 필요하리라 생각된다.

요 약

연구 배경 :

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)는 대장암의 항암 예방약제로 사용되고 있다. 지속적으로 NSAIDs를 복용하면 대장암에 걸릴 위험도

가 40-50% 감소되는 것으로 알려져 있다. NSAIDs가 대장암에서 종양의 크기를 감소시키는 것에 대한 정확한 기전은 알려져 있지 않으나, 일부 연구자들은 NSAIDs를 고농도로 투여하였을 때 세포 주기를 조절하는 유전자 발현의 변형과 세포 고사의 유도로 설명하고 있다. 그러나 폐암에서 NSAIDs의 암 예방효과에 대해 확립된 바 없어, 저자들은 NCI-H1299 세포주에서 NSAIDs가 세포고사를 유도하는지 알아보고자 하였다.

방 법 :

세포 독성은 MTT 방법으로 측정하였고, 세포고사를 알아보기 위해 유세포 분석과 핵산 염색을 시행하였다. 세포고사의 기전을 알아보기 위해 caspase family의 활성을 측정하였고, 세포고사의 마지막 단계인 PARP와 ICAD의 분절을 western blot으로 확인하였다.

결 과 :

NCI-H1299 세포에서 NaSaL 처리 시 생존율이 농도와 시간에 의존적으로 유의하게 감소하였고, 생존율의 감소는 세포주기에서 subG₀/G₁의 증가와 핵산 염색시 핵의 분절의 관찰로서 세포고사가 일어남을 관찰하였다. 10 mM NaSaL 처리 후 caspase-3 protease의 활성은 24시간에 증가하여 30시간에 최고에 이르고 감소하였으나 caspase-6, 8, 9 proteases의 활성은 의미 있는 증가가 없었다. PARP와 ICAD의 분절은 농도와 시간 의존적으로 증가하였다.

결 론 :

NCI-H1299 폐암 세포주에서 NaSaL은 caspase-3 protease의 활성을 통하여 유도되었다.

참 고 문 헌

1. Insel PA. Analgesic-antipyretic and anti-inflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. The pharmacological basis of therapeutics. 9th ed. New York: McGraw-Hill, Inc. : 1996. p. 617-22.
2. Sykes JA, Maddox IS. Prostaglandin production by experimental tumours and effects of anti-inflammatory compounds. *Nat New Biol* 1972;237:59-61.
3. Lombardino JG, Wiseman EH. Piroxicam and other anti-inflammatory oxicams. *Med Res Rev* 1982;2:127-52.
4. Ferreira SH, Vane JR. New aspects of the mode of action of non-steroid anti-inflammatory drugs. *Annu Rev Pharmacol* 1974;14: 57-73.
5. Reddy BS, Maruyama H, Kelloff G. Dose-related inhibition of colon carcinogenesis by dietary piroxicam, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, during different stages of rat colon tumor development. *Cancer Res* 1987; 47:5340-6.
6. Hial V, Horakova Z, Shaff FE, Beaven MA. Alteration of tumor growth by aspirin and indomethacin: studies with two transplantable tumors in mouse. *Eur J Pharmacol* 1976;37: 367-76.
7. Ross DS, Bitzer D, Roy T, Murphy JE. Piroxicam inhibits the growth of an adenocarcinoma isograft in Fischer rats. *J Surg Res* 1988;45:249-53.
8. Waddell WR, Loughry RW. Sulindac for polyposis of the colon. *J Surg Oncol* 1983; 24:83-7.
9. Waddell WR, Ganer GF, Cerise EJ, Loughry RW. Sulindac for polyposis of the colon. *Am J Surg* 1989;157:175-9.
10. Nugent KP, Farmer KC, Spigelman AD, Williams CB, Philips RK. Randomized con-

- trolled trial of the effect of sulindac on duodenal and rectal polyposis and cell proliferation in patients with familial adenomatous polyposis. *Br J Surg* 1993;80:1618-9.
11. Paganini-Hill A, Chao A, Ross RK, Henderson BE. Aspirin use and chronic diseases: a cohort study of the elderly. *BMJ* 1989; 299:1247-50.
 12. Gann PH, Manson JE, Glynn RJ, Buring JE, Hennekens CH. Low-dose aspirin and incidence of colorectal tumors in a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:1220-4.
 13. Thun MJ, Namboodiri NM, Heath CW Jr. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Engl J med* 1991;325:1593-6.
 14. Harris RE, Namboodiri KK, Farrar WB. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and breast cancer. *Epidemiology* 1996;7:203-5.
 15. Scheinmachers DM, Everson RB. Aspirin use and lung, colon, and breast cancer incidence in a prospective study. *Epidemiology* 1994;5:138-46.
 16. Hanif R, Pittas A, Feng Y, Koutsos MI, Qiao L, Staiano-Coico L, et al. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin -independent pathway. *Biochem Pharmacol* 1996;52:237-45.
 17. Han EK, Arber N, Yamamoto H, Lim JT, Delohery T, Pamukcu R, et al. Effects of sulindac and its metabolites on growth and apoptosis in human mammary epithelial and breast carcinoma cell lines. *Breast cancer lines. Breast Cancer Res Treat* 1998;48: 195-203.
 18. Castonguay A, Rioux N, Duperron C, Jalbert G. Inhibition of lung tumorigenesis by NSAIDS: a working hypothesis. *Exp Lung Res* 1998;24:605-15.
 19. Subbaramaiah K, Zakim D, Weksler BB, Dannenberg AJ. Inhibition of cyclooxygenase: A novel approach to cancer prevention. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997;216:201-7.
 20. Smalley WE, Dubois RN. Colorectal cancer and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Adv Pharmacol* 1997;39:1-20.
 21. Dannenberg AJ, Zakim D. Chemoprevention of colon-rectal cancer through inhibition of cyclooxygenase-2. *Semin Oncol* 1999;26:499-504.
 22. Shiff SJ, Qiao L, Tsai LL, Rigas B. Sulindac sulfide, an aspirin-like compound, inhibits proliferation, causes cell cycle quiescence, and induces apoptosis in HT-29 colon adenocarcinoma cells. *J Clin Invest* 1995;96: 491-503.
 23. Chan TA, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mechanisms underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:681-6.
 24. Klampfer L, Cammenga J, Wisniewski HG, Nimer SD. Sodium salicylate activates caspases and induces apoptosis of myeloid leukemia cell lines. *Blood* 1999;93:2386-94.
 25. White E. Death-defying acts : a meeting review on apoptosis. *Genes Dev* 1993;7:2277-84.
 26. Steller H. Mechanism and genes of cellular suicide. *Science* 1995;267:1445-9.
 27. Schwenger P, Bellosta P, Viator I, Basilico C, Skolnik EY, Vilcek J. Sodium salicylate induces apoptosis via p38 mitogen-activated

- protein kinase but inhibit tumor necrosis factor-induced c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2869-73.
28. Kopp E, Ghosh S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 1994;265:956-9.
29. Huang C, Ma WY, Hanenberger D, Cleary MP, Bowden GT, Dong Z. Inhibition of ultraviolet B-induced activator protein-1 (AP-1) activity by aspirin in AP-1-luciferase transgenic mice. *J Biol Chem* 1997;272:26325-31.
30. Lim JT, Piazza GA, Han EK, Delohery TM, Li H, Finn TS, et al. Sulindac derivatives inhibit growth and induce apoptosis in human prostate cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 1999;58(7):1097-107.
31. Sotiriou C, Lacroix M, Lagneaux L, Berchem G, Body JJ. The aspirin metabolite salicylate inhibits breast cancer cells growth and their synthesis of the osteolytic cytokines Interleukins-6 and-11. *Anticancer Research* 1999; 19:2997-3006.
32. Yao R, Rioux N, Castonguay A, You M. Inhibition of COX-2 and induction of apoptosis : two determinants of nonsteroidal anti-inflammatory drugs' chemopreventive efficacies in mouse lung tumorigenesis. *Exp Lung Res* 2000;26(8):731-42.
33. Williams GT. Apoptosis in the immune system. *J Pathol* 1994;173:1-4.
34. Cohen JJ. Apoptosis : the physiologic pathway of cell death. *Hosp Pract* 1993; 28:35-43.
35. Klampfer L, Cammenga J, Wisniewski HG, Nimer SD. Sodium salicylate activates caspase and induces apoptosis of myeloid leukemia cell lines. *Blood* 1999;93:2386-94.
36. Bellosillo B, Pique M, Barragan M, Castano E, Villamor N, Colomer D, Montserrat E, Pons G, Gil J. Aspirin and salicylate induce lymphocytic leukemia cells. *Blood* 1998;92: 1406-14.
37. McDade TP, Perugini RA, Vittimberga FJ Jr, Carrigan RC, Callery MP. Salicylates inhibit NF-kB activation and enhance TNF- α -induced apoptosis in human pancreatic cancer cells. *J Surg Res* 1999;83:56-61.
38. Park YH, Seol JI, Kim HI, Kim MJ, Lee HJ, Kim SA et al. Salicylate induced apoptosis in A549 cells. *J Korean Cancer Assoc* 2000; 32(4):734-41.