ORIGINAL ARTICLE
Korean J Obstet Gynecol 2011;54(2):86-92
doi: 10.5468/KJOG.2011.54.2.86
pISSN 2233-5188 · eISSN 2233-5196

KOREAN JOURNAL OF OBSTETRICS & GYNECOLOGY

APOPTOTIC EFFECT OF NV-196, AN ISOFLAVONE DERIVATIVE, IN EPITHELIAL OVARIAN CANCER CELLS

Dong Soo Suh, MD[1], Jong Kil Joo, MD[1], Seung Chul Kim, MD[1], Dong Hyung Lee, MD[1], Woo Hee Yi, MD[2], Man Soo Yoon, MD[1], Ki Hyung Kim, MD[1]

[1]Department of Obstetrics and Gynecology, Pusan National University School of Medicine; [2]Department of Obstetrics and Gynecology, Busan St. Mary's Medical Center, Busan, Korea

Objective
The objectives of this study were to determine the efficacy of NV-196, a synthetic isoflavone derivative, as a chemosensitizer in chemoresistant CP70 and R182 epithelial ovarian cancer (EOC) cells and to characterize the mechanism behind its sensitizing effect.

Methods
EOC cells were treated with tenfold dilutions of NV-196 (0.1 to 10 μg/mL) for 24 and 48 hours. Cell viability was determined by the CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. Apoptosis was assessed by Caspase-Glo assays and apoptotic cascade X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), caspase-2 and Bid were characterized by Western blot analyses.

Results
As a monotherapy, NV-196 showed decreased cell viability in a time- and dose-dependent manner in both CP70 and R182 cells. A significant increase in caspase-3 activity was observed in both cells. Caspase-8 and -9 activation were also observed. Western blots demonstrated Bid and caspase-2 activation and cleavage of XIAP. NV-196 enhances the cytotoxic effects of carboplatin and paclitaxel.

Conclusion
NV-196 induces cell death through the induction of apoptosis. Pretreatment with NV-196 may sensitize the ovarian cancer cells to carboplatin or paclitaxel. NV-196 may act as a chemosensitizing agent in epithelial ovarian cancer cells.

Keywords: Epithelial ovarian cancer, Isoflavone, NV-196, Paclitaxel, Carboplatin

상피성 난소암은 2008년 국가암등록 통계에 따르면 우리나라에서 자궁경부암 다음으로 흔한 부인암이다[1]. 상피성 난소암 치료 시 문제점 중의 하나는 항암제에 대한 내성의 출현이다. 80–90%의 환자에서 일차 항암제에 양호한 반응을 보이나 많은 수에서 재발하여 최종적으로 10–15%만이 완전관해에 이르며, 진행된 병기에서 적극적인 치료 후에도 5년 생존율은 30–40% 정도로 불량하다[2]. 난소암의 표준 치료법은 병기설정 수술과 함께 종양감축술을 시행하고 파클리탁셀과 카보플라틴을 병합하는 항암화학요법을 시행하는 것이다[3].

난소암은 최근 20여년 동안 수술기법과 항암제의 진보로 무진행 생존율(progression free survival)과 전반적인 생존율의 향상이 있어 왔으나 여전히 높은 사망률을 보이고 있어 새로운 약제개발이 필요하다. 향후 난소암 치료의 성공은 항암제 내성의 분자기전을 규명하고 또 여러 세포 내 신호전달 과정을 표적으로 하는 약제의 개발에 달려 있다.

세포고사의 유도는 카보플라틴이나 파클리탁셀과 같은 항암제가 세포사를 일으키는 주된 기전으로 알려져 있다[4]. 세포고사는 세포 위축(cell shrinkage), 막의 수포형성(membrane blebbing), 염색질의 압축

Received: 2010.11.22. Revised: 2011. 1.20. Accepted: 2011. 1.31.
Corresponding author: Ki Hyung Kim, MD
Department of Obstetrics and Gynecology, Pusan National University School of Medicine, 305 Gudeok-ro, Seo-gu, Busan 602-739, Korea
Tel: +82-51-240-7287 Fax: +82-51-248-2384
E-mail: ghkim@pusan.ac.kr

*This study was supported by a grant of the Korea Healthcare technology R&D Project, Ministry for Health, Welfare & Family Affairs, Republic of Korea (A091177).

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2011. Korean Society of Obstetrics and Gynecology

(chromatin condensation), 핵의 단편화(nuclear fragmentation) 등을 특징으로 한다. 항암제가 세포고사를 야기하는 기전에는 수용체 의존성(외인성) 경로와 미토콘드리아(내인성) 경로가 있다. 이러한 경로가 활성화되면 caspase를 순차적으로 활성화시키게 된다. 개시자(initiator) caspase로는 수용체 의존성 경로에서는 caspase-8, 미토콘드리아 경로에서는 caspase-9이 역할을 하고, 실행자(effector) caspase로는 caspase-3, -6, -7 등이 역할을 한다. 최근 이 두 경로는 각각이 독립적인 경로라기보다 서로 연관되어 있는 경로로 이해되고 있다[5].

플라보노이드(flavonoid), 이 중 특히 이소플라본(isoflavone)은 콩 등의 식물성 단백질에 있는 자연성분으로 여러 종류의 암세포에서 증식억제효과를 가진다. 천연 플라보노이드로는 epigallocatechin-3-gallate, genistein, flavopiridol 등이 있고, 합성 플라보노이드로는 phenoxodiol (NV-6), triphendiol (NV-196) 등이 보고 되었다. Phenoxodiol 같은 합성 플라보노이드는 genistein 유도체로 genestein 보다 5-20배 정도 강한 효과를 나타낸다[6]. Triphendiol은 phenoxodiol의 유도체이며, 이에 대한 연구가 진행 중이다. 또한 이소플라본 유도체는 세포독성 항암제의 효과를 증강시키는 효과가 있는데, 이중 특히 phenoxodiol은 상피성 난소암세포에서 카보플라틴, 파클리탁셀, 도세탁셀, 겜시타빈, 토포테칸 등의 항암효과를 효과적으로 증강시킨다고 보고되었다[7-9]. 이것은 caspase 의존적으로 미토콘드리아 경로를 활성화시키고 항세포고사 단백질인 X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)를 불활성화시킨다.

이 연구에서 저자들은 합성 이소플라본 유도체인 NV-196이 상피성 난소암세포의 세포고사에 미치는 영향과 작용기전을 조사하고, 항암제 내성을 보이는 난소암세포에서 NV-196을 함께 치료하였을 때 세포고사 효과의 증강이 있는지를 알아보고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 세포와 약제

실험에 이용한 세포는 예일대학의 Dr. Gil Mor로부터 제공받은 상피성 난소암세포인 carboplatin-resistant (CP70)와 paclitaxel-resistant (R182)를 이용하였다[8,10]. 모든 세포는 10% fetal bovine serum이 첨가된 RPMI-1640 배지에서 증식시켰고, 37°C에서 5% CO2 배양기에서 배양하였다. NV-196 (Novogen Co., Sydney, Australia)은 10 mM 원액을 희석하여 0.1, 1, 10 g/mL 농도로 치료하였다. 카보플라틴은 50, 100, 200 mg/mL의 농도로, 파클리탁셀은 0.2, 2, 20 μM의 농도로 치료하였다.

2. 세포생존율 분석

5×10^3개의 세포를 각 well 당 100 μL으로 96-well plate에 심었다. 세포가 70% 정도로 차게 되면 Opti-MEM medium (Gibco, Rockville, MD, USA)으로 교체하여 4시간 동안 두었다가 약물치료를 시행하였다. NV-196은 0.1, 1, 10 μg/mL 농도로 치료하였고, 각각 24, 48시간 치료한 후에 CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA)를 통해 세포생존율(cell viability)을 측정하였다. 각 샘플의 흡광도는 automatic microplate reader (Model 550; Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 490 nm에서 측정하였다. 측정값은 치료를 하지 않은 대조군과 비교하였고, 생존율의 백분율로 나타내었다.

3. Caspase 활성도 측정

Caspase-3/7 활성도는 Caspase-Glo 3/7 assay를 이용하였고, 10 μg의 단백질을 넣어 물과 함께 50 μL의 부피로 만든 다음 50 μL의 Caspase-Glo 반응액(Promega)을 혼합하였다. 실온에서 1시간 반응시킨 후에 발광도를 TD 20/20 luminometer를 이용해 측정하였다. 활성도는 치료하지 않은 대조군을 기준으로 하여 몇 배 정도 증가하는 지를 상대적으로 표시하였다. Caspase-8과 caspase-9의 경우도 같은 방법을 이용하였다.

4. Western Blot

단백질 20 μg씩을 sample buffer (2.5% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 0.15 M Tris-HCl [pH 6.8], 0.01% bromophenol blue)로 변성시킨 후 12% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동 하였다. 단백질을 100 V에서 105분 동안에 PVDF 막으로 이동시킨 후, 1시간 동안 5% milk를 포함한 phospate buffered solution (PBS)와 0.5% Tween-20 (PBS-T)으로 차단한 후 4°C에서 하룻밤 동안 1차 항체를 부착하였다. 이용한 항체로는 rabbit anti-Bid (Cell signaling Technology, Beverly, MA, USA; 1:5,000), mouse anti-XIAP (BD pharmagen, San Diego, CA, USA; 1:1,000), mouse anti-caspase-2 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA; 1:1,000), mouse anti-caspase 8 (Ab-3, Oncogene, San Diego, CA, USA; 1:1,000), mouse anti-caspase 9 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA; 1:5,000) 이었다. 다음 날 PBS-T로 3차례 세척한 후 2차 항체를 부착하여 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 마지막으로 단백질을 enhanced chemiluminescence (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA)를 이용하여 영상화하였다.

5. 통계분석

각각의 실험은 세 차례 반복시행하였으며, 결과의 통계학적 처리는 SPSS ver. 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 일반선형모델(general linear model)의 반복 측정법(repeated measures)을 사용하였고, 사후분석은 Turkey법을 사용하였으며, $P<0.05$일 때를 통계적 의의가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. NV-196 치료 후의 세포생존율

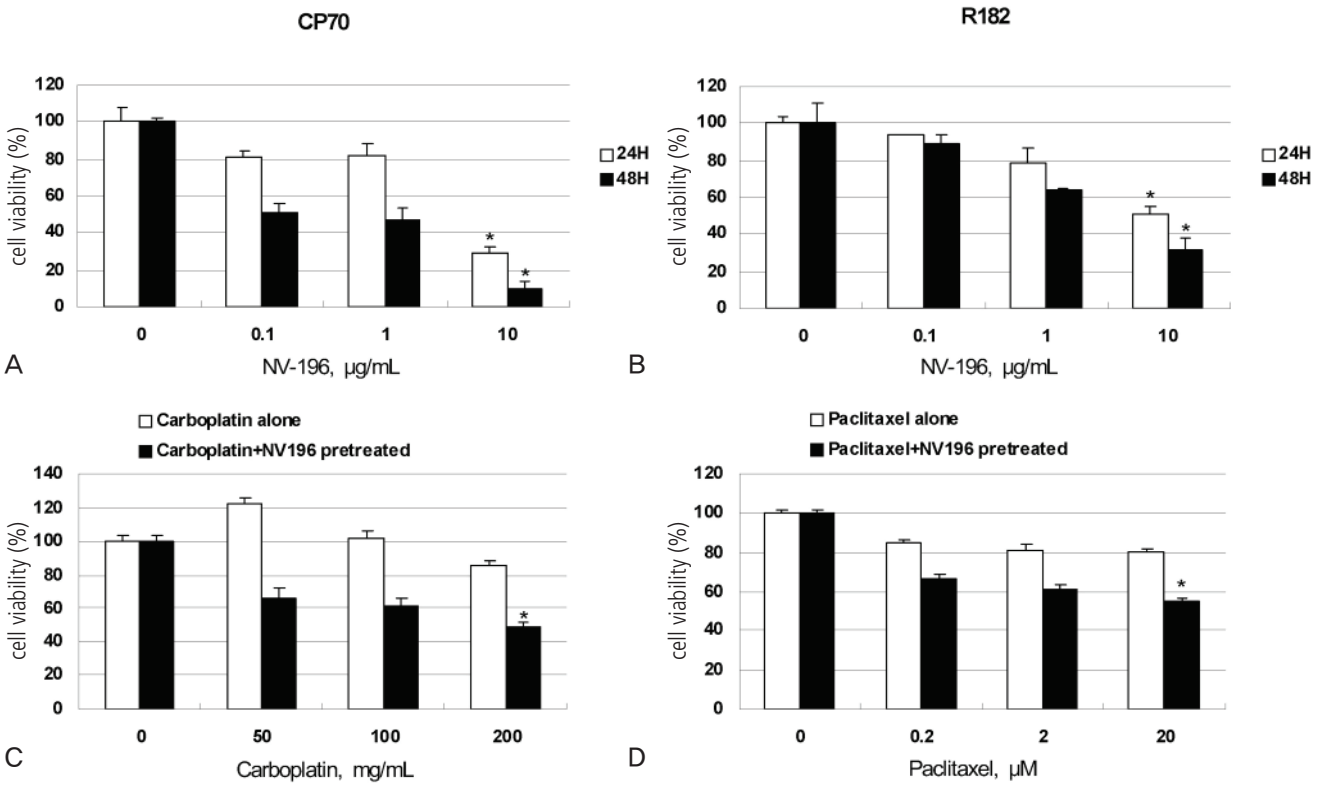

Fig. 1. (A, B) NV-196 decreases the viability of epithelial ovarian cancer (EOC) cells (CP70 and R182). The viability (in percentage, normalized to untreated cells) of EOC cells after treatment with increasing concentration of NV-196 for 24 and 48 hours. Data were compiled from at least three independent experiments, each done in triplicate (*p<0.05). (C, D) CP70 and R182 cells were pretreated with 10 μg/mL NV-196 for 8 hours and then treated with carboplatin or paclitaxel for 24 hours. Cell viability was determined by the CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (*p<0.05).

NV-196이 두 종류의 항암제 내성 난소암세포(CP70, R182)에 미치는 효과를 조사하였다. NV-196을 0.1, 1, 10 μg/mL의 농도로 각각 24시간, 48시간 동안 치료한 후에 세포생존율을 조사하였다. CP70 세포에서 24시간 치료 후 0.1, 1, 10 μg/mL 농도에서 세포생존율은81%, 82%, 30%, 48시간 후에는 51%, 46%, 10%을 나타내었다. R182 세포에서는 24시간 후에 94%, 79%, 51%, 48시간 후에 89%, 64%, 31%의 세포생존율을 보였다. NV-196은 두 세포 모두에서 치료농도와 치료시간에 비례하여 효과적으로 세포생존율을 감소시켰다(Fig. 1). 세포사의 현저한 효과는 48시간째 나타났으며(Figs. 1, 2A), IC_{50} 수치는 CP70 세포에서는 ≤1 μg/mL, R182 세포에서는 1-10 μg/mL로 R182 세포가 NV-196에 더 저항성을 보였다.

2. NV-196에 의한 세포고사 경로의 활성화

NV-196에 의한 세포생존율 감소가 세포고사 경로의 활성화와 관련이 있는 지를 알아보기 위해 NV-196 치료 후 Hoechst dye로 염색을 하였으며, DNA의 분절을 관찰할 수 있었다(Fig. 2B). 또 NV-196를 10 μg/mL의 농도로 12, 24, 36, 48시간 동안 치료 후에 caspase 활성도를 측정하였다. CP70 세포에서 24시간 후부터 caspase-3의 현저한 증가가 관찰되었고, R182 세포에서는 12시간 후부터 증가하였으며, 치료시간에 비례하여 caspase-3의 현저한 증가가 관찰되었다. R182 세포

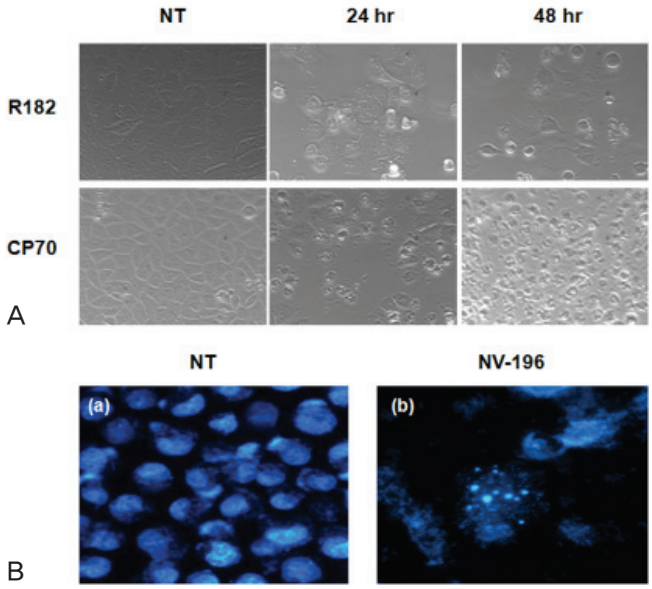

Fig. 2. (A) Phase-contrast images of NV-196 induced apoptosis in CP70 and R182 cells (×200). Both cells were treated with 10 μg/mL NV-196 for 24 and 48 hours. (B) Hoechst dye staining of apoptotic nuclei (×400), (a) non-treated control, (b) NV-196 treated CP70 cells, 10 μg/mL, 24 hours. NT: non-treated control.

에서는 시간에 비례하여 48시간째까지 지속적으로 증가하는 양상이었으나, CP70 세포에서는 48시간째에는 감소하는 양상을 보였는데, 이는 현저한 세포고사의 유도로 이미 많은 세포가 소실되었기 때문으로 이해된다(Fig. 3). 또 세포고사의 어느 경로가 활성화 되는지를 알아보기 위해 caspase-8, -9를 측정하였다. 각각의 세포에서 caspase-8, -9도 유사한 증가양상을 보였으며(Fig. 3), western blot 분석에서도 활성형의 caspase-8과 caspase-9이 나타남을 알 수 있었다(Fig. 4).

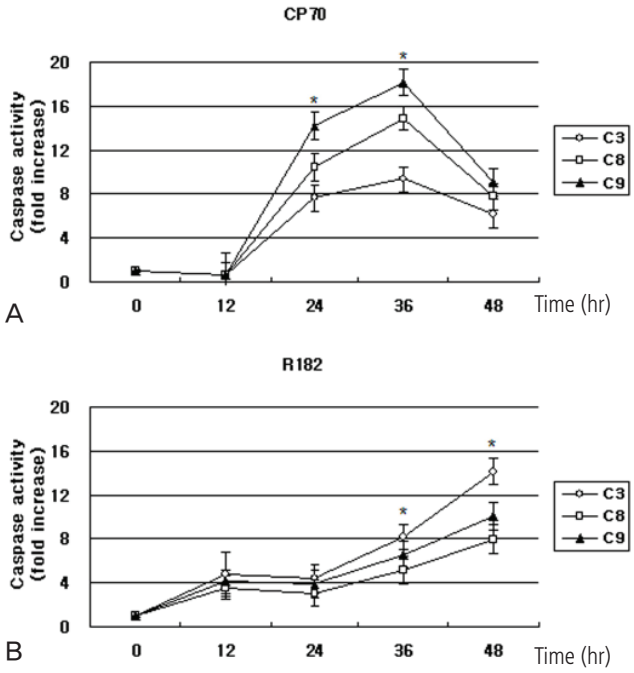

Fig. 3. Relative caspase-3, -8, -9 activity in CP70 and R182 cells. Cells were exposed to 10 μg/mL NV-196 for 12, 24, 36 and 48 hours. Caspase activity was measured by Caspase-Glo assays as described in Materials and Methods. Y axis: caspase activity fold increase from control. The data were compiled from at least three independent experiments (*p<0.05).

3. NV-196이 항세포고사 단백질에 미치는 영향

NV-196에 의한 세포고사 경로를 더 추적하기 위해 항세포고사 단백질인 XIAP의 발현 변화를 조사하였다. XIAP의 고발현은 항암제내성과 관련이 있다고 보고되었다[9]. XIAP의 기초 발현도는 R182 세포에서 보다 강하게 나타났다. NV-196 치료 후에 두 세포 모두에서 12시간 후부터 XIAP의 발현 감소가 나타났다. 또한 XIAP의 분할의 결과로 p30 절편이 새롭게 나타났는데(Fig. 4), CP70 세포에서는 24시간째부터, R182 세포에서는 12시간째부터 나타났다. p30 절편의 출현은 caspase-9, -3의 활성도 증가와 시간적으로 일치하여 나타났음을 알 수 있다(Fig. 3).

4. NV-196이 세포고사 단백질에 미치는 영향

NV-196에 의한 세포고사의 초기 단계에 어떤 단백질이 관여하는지를 알기 위해 caspase-8에 의해 활성화되는 것으로 알려진 Bid의 발현 변화를 조사하였다. CP70 세포에서 Bid는 강한 기초 발현도를 보였으나 NV-196 치료 후 12시간 후부터 감소하는 양상을 보였다. R182 세포에서도 기초 발현도는 CP70와 비교하여 다소 약하였으나 NV-196 치료 후 36시간 후부터 다소 늦게 감소하는 양상을 보였다(Fig. 4). 또한 Bid의 상부 단백으로 먼저 활성화될 수 있는 것으로 알려진 caspase-2의 변화를 관찰하였다[8]. CP70 세포와 R182 세포에서 NV-196 치료 후 12시간째부터 caspase-2 발현의 감소가 시작되었고 36시간 후부터는 현저한 감소가 나타났다(Fig. 4).

5. NV-196 전처치 후의 항암제의 세포고사 증강 효과

NV-196을 10 μg/mL의 농도로 8시간 전처치 후 CP70 세포와 R182 세포를 카보플라틴 또는 파클리탁셀로 각각을 24시간 동안 치료하였다. CP70 세포에서 카보플라틴 단독 치료군에서 50, 100, 200 mg/mL의 농도에서 세포생존율은 122%, 102%, 86%이었으나, NV-196 전처

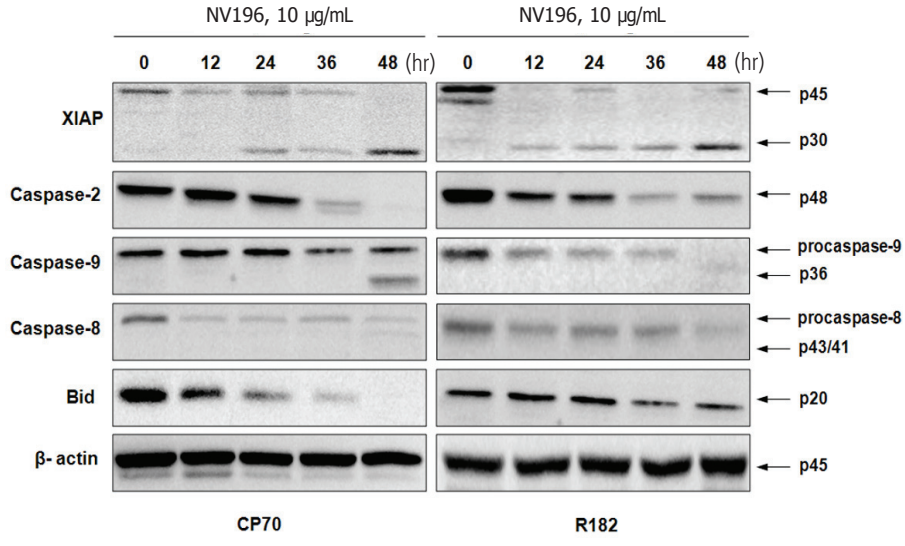

Fig. 4. Characterization of the apoptotic cascade induced by NV-196. Western blot analyses showing the activation status of anti-apoptotic protein and pro-apoptotic protein after treatment with 10 μg/mL NV-196 for 12, 24, 36, and 48 hours. Results for CP70 and R182 cells are shown.

치 후의 세포생존율은 67%, 61%, 49%를 보였다. R182 세포에서 파클리탁셀 단독 치료군에서 0.2, 2, 20 μM의 농도에서 세포생존율은 85%, 82%, 80%이었으나, NV-196 전처치 후의 세포생존율은 67%, 62%, 54%를 보였다(Fig. 1C, 1D). NV-196 전처치는 카보플라틴과 파클리탁셀의 세포고사 효과를 증강시킴을 알 수 있었다.

고 찰

항암제내성은 난소암 치료에 있어 주된 제한점이다. 대부분의 암세포는 여러 항암제에 약제 특이성 내성기전을 가지지만 공통점은 세포고사 유도의 결함을 야기한다는 것이다[11]. 역으로 항암제내성의 극복은 세포고사 경로를 다시 활성화시켜 암세포가 기존의 항암제에 감수성을 회복하도록 하여 내성 기전을 역전시키는 것이다.

저자들은 이 연구에서 합성 이소플라본 유도체인 NV-196이 상피성 난소암세포에서 세포고사에 미치는 영향과 작용기전을 조사하고, 기존 항암제에 내성을 보이는 세포에서 NV-196으로 치료하였을 때 항암제의 세포고사 효과를 증강시키는지를 조사하였다. NV-196은 상피성 난소암세포에서 효과적으로 세포고사를 야기하였고, 항암제내성을 가진 난소암세포에서 카보플라틴과 파클리탁셀의 세포고사효과를 증강시킴을 관찰하였다.

세포고사는 여러 종류의 항암제에 의해 종양세포가 사멸하는 주요기전 중의 하나이다. 잘 알려진 세포고사 경로는 수용체 의존성 경로와 미토콘드리아 경로가 있다. NV-196 치료 후 세포생존율의 뚜렷한 감소가 관찰되었는데 이는 caspase-3의 활성화로 야기된 세포고사의 결과임을 알 수 있다. 세포고사의 경로를 더 추적하기 위해 측정한 caspase-8과 caspase-9은 모두 치료시간에 비례하여 뚜렷한 증가양상을 보였다. 세포고사의 경로 간에, 즉 수용체 의존성 경로와 미토콘드리아 경로 사이에는 상당한 연관이 있다고 알려져 있다. 예로 caspase-8은 Bid를 활성화하고, 미토콘드리아에서 cytochrome c 분비를 촉진하여 caspase-9과 caspase-3를 활성화한다고 한다[12]. 미토콘드리아 경로를 더 확인하기 위해 Bid와 caspase-2의 활성화를 관찰하였다. Bid는 caspase cleavage site를 가지며 caspase-8에 의해 활성화된다고 알려져 있다[13]. CP70 세포에서 Bid는 강한 기초 발현도를 보였으나 NV-196 치료 후 감소하는 양상을 보였다. R182 세포에서도 기초 발현도는 CP70 세포와 비교하여 다소 약하나 NV-196 치료 후 역시 감소하는 양상을 보였다(Fig. 4).

Caspase 단계에서 세포고사의 불활성화는 항암제내성에 관련이 된다. Caspase는 매우 선택적인 단백질 분해효소이며 활성화된 후 내인성 세포고사 억제제의 억제를 받기가 쉽다. XIAP는 대표적인 세포고사 억제제로 미토콘드리아 경로의 하부경로를 조절하는데, 직접적으로 caspase-3, -7, -9에 부착하여 이들의 기능을 억제하고 결과적으로 세포고사를 저해한다. 반면 caspase-1, -6, -8, -10에는 영향을 미치지 않는다. XIAP의 고발현은 시스플라틴, 도세탁셀, 파클리탁셀 등의 세포독성 항암제에 의한 세포고사를 방해한다[9,14,15]. Li 등[16]은 시스플라틴이 항암제에 감수성이 있는 암세포에서는 XIAP를 하향조절하나, 항암제내성 세포에서는 억제하지 않는다고 하였다. 역으로 감수성 세포에서 XIAP 발현을 유도시켰을 때 항암제에 내성을 가짐을 보고하였다. 최근 난소암세포에서 이소플라본 유도체인 phenoxodiol이 세포고사 경로를 활성화시켜 카보플라틴, 파클리탁셀, 도세탁셀에 저항을 보인 암세포들에서 세포고사를 촉진시킨다고 보고하였는데[7,8], phenoxodiol 치료 후 유의한 XIAP 발현의 감소가 나타났다고 하였다. Sapi 등[9]은 상피성 난소암세포에서 도세탁셀의 내성기전에 XIAP가 중요한 역할을 하며, XIAP-siRNA를 통해 XIAP 발현을 감소시켰을 때 도세탁셀의 세포고사 효과가 회복됨을 보고하였다. 또한 phenoxodiol을 치료하였을 때 역시 XIAP의 발현 감소를 통해 내성기전이 역전되는 것을 관찰하여, XIAP 불활성화가 도세탁셀에 대한 감수성에 필수적인 단계임을 보고하였다. 저자들의 연구에서도 NV-196에 의한 세포고사에서 XIAP 발현의 하향조절과 p30 XIAP 절편이 관찰되어, XIAP 활성을 변화시키면 항암제의 세포고사 효과를 증강시킬 수 있음을 시사하는 결과를 얻었다.

세포고사의 조절인자를 표적으로 하는 것이 암치료의 새로운 접근법으로 제안되며, XIAP는 이러한 표적분자가 될 수 있다. Inhibitor of apoptosis protein (IAPs)는 caspase-3, -7, -9에 선택적으로 부착하여 그 기능을 저해하는 억제제들의 총칭이다. 실행자(effector) caspase를 억제하고 세포고사 경로의 후반부를 차단함으로 다양한 자극에 의한 세포사를 저해한다. 이 중에 XIAP는 구조나 생화학적 특징이 가장 많이 밝혀졌다. 치료적 표적으로 가장 주목을 받는 이유는 첫째, XIAP 과발현은 항암제내성과 관련이 있고[17], 둘째, siRNA를 통해 XIAP 발현을 억제하면 항암제에 대한 감수성이 회복되고[18], 마지막으로 XIAP 발현억제가 정상 세포에는 해가 없기 때문이다[19]. 최근 antisense oligonucleotide와 small molecule inhibitor를 통한 XIAP inhibitor를 개발하려는 노력이 있으며 임상시험 중이다[20,21]. 저자들의 연구에서 흥미로운 관찰은 XIAP의 p30 절편의 출현이다. Johnson 등[22]은 p30 XIAP는 caspase cleavage의 산물로서 XIAP의 정상 기능을 억제하는 주된 인자임을 보고하였다. Alvero 등[8]은 phenoxodiol 치료 후에 caspase-8, -9, -3의 활성화는 p30 XIAP의 출현과 잘 비례한다고 하였는데, 저자들의 연구에서도 NV-196 치료 시 p30 XIAP 출현은 CP70 세포에서는 24시간부터, R182 세포에서는 12시간부터 나타났는데, caspase-8, -9, -3의 증가가 나타나는 시점과 시간적으로 잘 일치함을 알 수 있었다(Figs. 3, 4).

항암제에 의한 세포고사는 미토콘드리아 경로에 의한 세포고사가 흔하다. Caspase-2는 DNA 손상에 대한 반응으로 Bid를 활성화하는 것으로 제안된 바 있다[23,24]. Alvero 등[8]은 phenoxodiol을 난소암세포에 치료하였을 때 western blot 분석을 통해 미토콘드리아 경로의 caspase-2와 Bid가 초기에 활성화되어 발현이 감소함을 관찰하였다. Caspase-2 억제제를 처리하였을 때는 Bid의 활성화가 나타나지 않고 caspase-8, -9, -3의 활성화도 억제되어 phenoxodiol의 작용에는 caspase-2의 활성화가 선행단계임을 밝혔다. 저자들의 연구에서 CP70 세포와 R182 세포에서 NV-196 치료 후 12시간째부터 caspase-2 활성도의 감소가 시작되었고 36시간 후부터는 현저한 감소가 나타나 미토콘드리아 경로의 활성화를 알 수 있었다(Fig. 4).

항암제내성을 가진 난소암세포에서 이소플라본 제제를 전처치한 후 항암제를 사용하면 유의한 세포생존율의 감소를 보인다고 한다. Sapi 등[9]은 도세탁셀에 저항성을 가진 난소암세포에서 phenoxodiol로 전처치한 다음 도세탁셀을 치료하였을 때 세포생존율이 75%에서 40%로 감소하는 것을 보고하였다. 저자들의 연구에서도 CP70 세포에서 카보플라틴 단독 치료군(200 mg/mL)에서 세포생존율은 86%이었으나 NV-196 전처치 후의 49%를, R182 세포에서 파클리탁셀 단독 치료군(20 μM)에서 세포생존율은 80%이었으나, NV-196 전처치 후 54%를 보였다(Fig. 1). 이러한 결과는 NV-196 전처치가 항세포고사 단백질인 XIAP의 불활성화로 항암제 내성을 가진 CP70 세포와 R182 세포에서 각각 카보플라틴과 파클리탁셀에 감수성을 가지도록 하였음을 시사한다.

저자들은 이 연구를 통해 NV-196이 미토콘드리아 경로의 세포고사 단백질인 Bid와 caspase-2를 초기에 활성화시키고, 항세포고사 단백질인 XIAP를 하향 조절하여 caspase-3과 caspase-9를 활성화하여 세포고사를 유도함을 알 수 있었다. 이소플라본 유도체인 NV-196은 체외배양 조건에서 상피성 난소암세포의 세포고사를 유도하고, NV-196의 전처치는 난소암세포를 카보플라틴이나 파클리탁셀에 민감하게 만들어주어(sensitization) 항암제내성을 개선할 수 있을 것으로 기대된다.

References

1. National Cancer Control Institute (KR). 2008 national cancer statistics. Goyang: National Cancer Center; 2010.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. CA Cancer J Clin 2008;58:71-96.
3. Aletti GD, Gallenberg MM, Cliby WA, Jatoi A, Hartmann LC. Current management strategies for ovarian cancer. Mayo Clin Proc 2007;82:751-70.
4. Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. Exp Cell Res 2000;256:42-9.
5. Gross SA, Newton JM, Hughes FM Jr. Decreased intracellular potassium levels underlie increased progesterone synthesis during ovarian follicular atresia. Biol Reprod 2001;64:1755-60.
6. Saif MW, Tytler E, Lansigan F, Brown DM, Husband AJ. Flavonoids, phenoxodiol, and a novel agent, triphendiol, for the treatment of pancreaticobiliary cancers. Expert Opin Investig Drugs 2009;18:469-79.
7. Alvero AB, Brown D, Montagna M, Matthews M, Mor G. Phenoxodiol-Topotecan co-administration exhibit significant anti-tumor activity without major adverse side effects. Cancer Biol Ther 2007;6:612-7.
8. Alvero AB, O'Malley D, Brown D, Kelly G, Garg M, Chen W, et al. Molecular mechanism of phenoxodiol-induced apoptosis in ovarian carcinoma cells. Cancer 2006;106:599-608.
9. Sapi E, Alvero AB, Chen W, O'Malley D, Hao XY, Dwipoyono B, et al. Resistance of ovarian carcinoma cells to docetaxel is XIAP dependent and reversible by phenoxodiol. Oncol Res 2004;14:567-78.
10. Behrens BC, Hamilton TC, Masuda H, Grotzinger KR, Whang-Peng J, Louie KG, et al. Characterization of a cis-diamminedichloroplatinum(II)-resistant human ovarian cancer cell line and its use in evaluation of platinum analogues. Cancer Res 1987;47:414-8.
11. Kamsteeg M, Rutherford T, Sapi E, Hanczaruk B, Shahabi S, Flick M, et al. Phenoxodiol--an isoflavone analog--induces apoptosis in chemoresistant ovarian cancer cells. Oncogene 2003;22:2611-20.
12. Peter ME, Scaffidi C, Medema JP, Kischkel F, Krammer PH. The death receptors. Results Probl Cell Differ 1999;23:25-63.
13. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. Cell 1998;94:481-90.
14. Alvero AB, Chen W, Sartorelli AC, Schwartz P, Rutherford T, Mor G. Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone) induces apoptosis in ovarian cancer cells. J Soc Gynecol Investig 2006;13:145-52.
15. Fraser M, Leung BM, Yan X, Dan HC, Cheng JQ, Tsang BK. p53 is a determinant of X-linked inhibitor of apoptosis protein/Akt-mediated chemoresistance in human ovarian cancer cells. Cancer Res 2003;63:7081-8.
16. Li J, Sasaki H, Sheng YL, Schneiderman D, Xiao CW, Kotsuji F, et al. Apoptosis and chemoresistance in human ovarian cancer: is Xiap a determinant? Biol Signals Recept 2000;9:122-30.
17. Tong QS, Zheng LD, Wang L, Zeng FQ, Chen FM, Dong JH, et al. Downregulation of XIAP expression induces apoptosis and enhances chemotherapeutic sensitivity in human gastric cancer cells. Cancer Gene Ther 2005;12:509-14.
18. McManus DC, Lefebvre CA, Cherton-Horvat G, St-Jean M, Kandimalla ER, Agrawal S, et al. Loss of XIAP protein expression by RNAi and antisense approaches sensitizes cancer cells to functionally diverse chemotherapeutics. Oncogene 2004;23:8105-17.
19. Harlin H, Reffey SB, Duckett CS, Lindsten T, Thompson CB. Characterization of XIAP-deficient mice. Mol Cell Biol 2001;21:3604-8.
20. Dubrez-Daloz L, Dupoux A, Cartier J. IAPs: more than just inhibitors of apoptosis proteins. Cell Cycle 2008;7:1036-46.
21. Schimmer AD, Dalili S, Batey RA, Riedl SJ. Targeting XIAP for

the treatment of malignancy. Cell Death Differ 2006;13:179-88.
22. Johnson DE, Gastman BR, Wieckowski E, Wang GQ, Amoscato A, Delach SM, et al. Inhibitor of apoptosis protein hILP undergoes caspase-mediated cleavage during T lymphocyte apoptosis. Cancer Res 2000;60:1818-23.
23. Lassus P, Opitz-Araya X, Lazebnik Y. Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. Science 2002;297:1352-4.
24. Lin CF, Chen CL, Chang WT, Jan MS, Hsu LJ, Wu RH, et al. Sequential caspase-2 and caspase-8 activation upstream of mitochondria during ceramideand etoposide-induced apoptosis. J Biol Chem 2004;279:40755-61.

상피성 난소암세포에서 이소플라본 유도체 NV-196의 세포고사 유도 효과

[1]부산대학교 의학전문대학원 산부인과학교실, [2]부산성모병원 산부인과
서동수[1], 주종길[1], 김승철[1], 이동형[1], 이우희[2], 윤만수[1], 김기형[1]

목적
상피성 난소암세포(CP70, R182)에서 합성 이소플라본 유도체인 NV-196의 세포고사 유도효과를 조사하고, 이들 항암제에 내성을 보이는 난소암세포에서 NV-196을 전처치하였을 때 세포고사 효과의 증강이 있는지를 알아보고자 하였다.

연구방법
상피성 난소암세포인 CP70 세포와 R182 세포를 NV-196의 0.1, 1, 10 μg/mL의 농도로 24시간, 48시간 동안 치료하였다. 세포생존율은 CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay를 통해서, caspase 활성도는 Caspase-Glo assay를 이용하였다. 세포고사 경로의 확인을 위해 XIAP, caspase-2, Bid의 활성화는 western blot 분석을 하였다.

결과
NV-196은 CP70 세포와 R182 세포에서 모두에서 치료시간과 치료농도에 비례하여 세포생존율을 효과적으로 감소시켰다. 두 세포 모두에서 caspase-3의 유의한 상승이 관찰되어 세포고사에 의한 세포생존율의 감소임을 알 수 있었다. Caspase-8와 caspase-9도 양 세포에서 caspase-3의 증가와 유사한 양상을 보였다. Western blot 분석에서 XIAP의 불활성화와 caspase-2와 Bid의 활성화를 관찰하였다. 10 μg/mL NV-196을 8시간 동안 전처치하였을 때 CP70 세포와 R182 세포 모두에서 카보플라틴 또는 파클리탁셀로 치료하였을 때 세포생존율의 유의한 감소가 있었다.

결론
NV-196은 세포고사를 통해 유의한 세포생존율의 감소를 유도하였다. NV-196의 전처치는 난소암세포를 카보플라틴이나 파클리탁셀에 민감하게 만들어 항암제내성을 개선할 수 있을 것으로 기대된다.

중심단어: 상피성 난소암, 이소플라본, NV-196, 카보플라틴, 파클리탁셀