

Combination Therapy of Bortezomib (PS-341) and SAHA (Vorinostat) in Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines

Purpose: The recent introduction of targeted therapy for non-small cell lung cancer (NSCLC) has changed the paradigm of lung cancer chemotherapy. However, only a small portion of NSCLC patients received the benefit of these new drugs. A proteasome inhibitor (bortezomib) and a histone deacetylase inhibitor (SAHA) were approved for clinical use for treating some hematologic malignancies. In this study, we investigated the combination treatment of bortezomib and SAHA in NSCLC cell lines. **Materials and Methods:** The combined effects of bortezomib and SAHA on lung cancer cell lines were measured by Calculusyn software. Induction of apoptosis was examined by performing an Annexin V assay. Generation of reactive oxygen species (ROS) and protection by N-acetylcysteine were measured by flow cytometry after staining with DCFH-DA. The effect of the combination of drugs on apoptosis and autophagy was investigated by Western blot assay. **Results:** Strong synergism was found for the combination of bortezomib and SAHA. The synergistic interaction was mediated by strong apoptosis. Increased ROS generation was partly responsible for the induction of apoptosis, and this was suppressed by the ROS scavenger N-acetylcysteine. Combined treatment induced the strong activation of caspase-3 and the breakdown of the antiapoptotic molecule Bcl-2. Furthermore, increased breakdown of beclin-1, which is known to be an autophagic molecule, was also found. **Conclusion:** Combination therapy with bortezomib and SAHA showed a strong synergistic antitumor effect on human lung cancer cell lines. Enhanced induction of apoptosis was a responsible mechanism, and this was partly mediated by ROS generation. Further studies are warranted for determining the role of apoptosis and autophagy for this combination therapy. (*J Lung Cancer* 2010;9(2):77-84)

Key Words: Lung neoplasms, Bortezomib, Histone deacetylase inhibitor, Apoptosis, Reactive oxygen species

Mi-Young Park, M.S.¹
Dal Rae Kim, M.S.¹
Jong-Sun Park, M.D.^{1,2}
Young-Jae Cho, M.D.^{1,2}
Sei-Won Lee, M.D.^{1,2}
Ho-Il Yoon, M.D., Ph.D.^{1,2}
Jae Ho Lee, M.D., Ph.D.^{1,2} and
Choon-Taek Lee, M.D., Ph.D.^{1,2}

¹Department of Internal Medicine and Respiratory Center, Seoul National University Bundang Hospital, Seoul National University College of Medicine, Seongnam, ²Division of Pulmonology and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine and Lung Institute, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Received: September 27, 2010

Revised: November 8, 2010

Accepted: November 15, 2010

Address for correspondence

Choon-Taek Lee, M.D., Ph.D.
Department of Internal Medicine,
Seoul National University Bundang
Hospital, Seoul National University
College of Medicine, 300, Gumi-dong,
Bundang-gu, Seongnam 463-707,
Korea
Tel: 82-31-787-7002
Fax: 82-31-787-4052
E-mail: ctlee@snu.ac.kr

This study is supported by grant from Seoul National University Bundang Hospital (02-2008-012).

서 론

폐암은 현재 한국 남성의 암 사망률 1위의 암으로 조기발견이 어렵고 수술, 항암요법, 방사선요법이 주된 치료법이 되고 있다. 최근 폐암을 포함한 여러 암에서 새로운 개념의 항암약물이 개발되어 적용되고 있는데 이를 총칭하여 표적항암제라 부르고 있다. 표적항암제에는 growth factor recep-

tor tyrosine kinase inhibitor, growth factor receptor antibody, tumor specific apoptosis inducing agent, proteasome inhibitor, histone deacetylase inhibitor 등이 연구되고 일부의 암에서 신약으로 각광을 받고 있다.

현재 폐암에는 상피세포 성장인자의 tyrosine kinase 억제제(epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI)인 gefitinib, erlotinib이 2차약으로 인정을 받아 임상에 사용 중이며, 일부 암(여성, 비흡연자, 선암, 동양인)

에서 다소 뛰어난 효과를 보이거나 전반적으로 생존율이나 기간을 향상시키지 못하고 있다.

Proteasome inhibitor는 암세포 내의 다양한 degradation product를 대사하여 제거하는 역할을 하는 proteasome의 catalytic 20S core를 억제하여 proteasome의 고유기능을 억제하는 약제이다. 즉, ubiquitin-proteasome pathway를 억제하여 대사작용이 빠른 암세포에 정상세포에 비해 선택적으로 작용하여 apoptosis를 유도한다(1).

현재 PS-341 (bortezomib, velcade)은 다발성 골수종(multiple myeloma), mantle cell lymphoma에 치료약으로 허가를 받은 최초의 proteasome inhibitor로 기존 치료약제를 능가하는 효과를 보여 표준요법으로 자리잡고 있다(2). Bortezomib은 비소세포폐암, 소세포폐암 세포주 모두에서 강력한 항암효과를 보이며 현재 기존의 항암제와 병행한 임상연구가 보고되고 있으나 아직 기존 항암치료법을 확실히 능가하지는 못하고 있다.

Fanucchi 등(3)의 보고에 의하면 비소세포폐암 환자에서 bortezomib 단독 투여군과 bortezomib과 docetaxel 복합 투여군을 비교한 2상 연구에서 반응률은 각각 8%, 9%이며 disease control rate는 각각 29%, 54%로 보고하여 bortezomib이 비소세포폐암 환자에서 중등도의 효과를 보임을 보고하였다.

Histone deacetylase inhibitor (HDAC inhibitor)는 histone의 deacetylation을 억제하는, 즉 acetylation을 촉진하는 약제로 chromatin의 uncoiling을 촉진하고 differentiation을 포함한 여러 세포대사과정에 관여하는 유전자의 transcription을 촉진한다. 또한 암세포 특히 백혈병세포에서 p21을 유도하고 reactive oxygen species (ROS)를 생산하여 apoptosis에 빠지게 한다(4).

현재 SAHA (Vorinostat, Zolinza)는 lymphoma 등의 혈액종양에 임상적으로 의미있는 효과를 보여 HDAC inhibitor 중 최초로 cutaneous T cell lymphoma의 치료제로 공인을 받았다(5). SAHA를 포함한 여러 HDAC inhibitor를 폐암치료에 사용하려는 연구는 많이 보고되었다. Komatsu 등(6)에 의하면 SAHA를 폐암세포주에 투여한 결과 apoptosis에 의한 세포사멸이 유도되고 IC50가 약 $2 \mu\text{M}$ 이 됨을 보고하였다.

Bortezomib에 의해 암세포에 일어나는 변화 중 세포를 보호하는 antiapoptosis 성질을 가진 NF- κ B 활성화가 억제된다는 사실은 잘 알려져 있다. Imre 등(7)은 폐암세포주에 HDAC inhibitor를 투여하면 항암제나 TNF에 의한 NF- κ B의 활성화가 억제됨을 보고하였다. 즉, 두 약제 모두 세포의 대표적인 외부 stress에 대항하여 세포를 지키는 antiapoptosis 역할의 주된 기전인 NF- κ B의 활성화를 억제함을 알 수

있어 두 약제를 병용할 경우 상승작용을 보이리라 기대할 수 있다.

현재까지 bortezomib과 SAHA의 복합치료를 보고한 연구는 Yu 등(8)이 leukemia를 대상으로 한 연구와 Emanuelle 등(9)이 간암세포주, Heider 등(10)이 mantle cell lymphoma, Zhang 등(11)이 T-leukemia/lymphoma를 대상으로 한 연구 등이 있다. 이들의 연구 모두에서 두 약제의 병합 투여는 암세포에 상승적으로 apoptosis, ROS의 생성 증가 및 NF- κ B의 활성억제를 보임을 보고하였다.

본 연구에서는 bortezomib과 SAHA를 폐암세포주에 적용하여 그 상호작용 및 기전을 관찰하고자 하였다.

대상 및 방법

1) 연구재료

폐암세포주로는 A549 (폐선암세포주) 및 NCI H460 (폐대세포암세포주)를 사용하였고 세포주는 American Tissue Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며, RPMI1640과 10% fetal bovine serum을 혼합한 배양액으로 배양하였다. HDAC inhibitor인 SAHA (Vorinostat)는 Merck사(Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, NJ, USA)로부터 제공받았고 proteasome inhibitor인 PS-341 (bortezomib)은 Millenium사(Millennium Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA)로부터 제공받았다. Caspase-3, Bcl-2, 및 beclin-1에 대한 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)로부터 구입하였다.

2) SAHA 및 bortezomib 단독 및 복합투여를 통한 약제 상호 작용검증

폐암세포주를 96 well plate에 3×10^3 cells/well로 분주하여 24시간 배양한 후 SAHA는 0, 0.01, 0.1, 1, 2, 5 및 $10 \mu\text{M}$, bortezomib은 0, 0.1, 0.3, 1 및 $3 \mu\text{M}$ 의 농도로 단독 또는 가능 조합으로 복합 투여하여 72시간 경과 후 MTS assay (CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay; Promega Co., Madison, WI, USA)를 이용하여 세포의 생존율을 검증하였다. IC50을 이용한 Chou-Talalay median effect 원리에 근거한 Biosoft 사(Ferguson, MO, USA)의 Calcsyn software를 이용하여 두 약제간의 상호작용을 검증하였다.

3) SAHA 단독, bortezomib 단독 및 SAHA와 bortezomib의 복합 투여에 의한 폐암세포주의 apoptosis의 변화 검증(Annexin V assay)

폐암세포주(NCI H460)에 SAHA (0 및 $1 \mu\text{M}$) 및 borte-

zomib (0, 0.03 및 0.1 μ M)을 단독 또는 복합 투여하고 48시간 경과 후 Annexin V-FITC assay kit (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA)를 이용하여 FITC 및 propidium iodide로 이중 염색하고 FACSscan을 이용하여 apoptosis를 보이는 세포비율의 변화를 관찰하였다. 또한 ROS가 apoptosis에 미치는 영향을 관찰하기 위해 ROS scavenger인 N-Acetylcysteine (NAC) (15 mM; Sigma, St Louis, MO, USA)로 3시간 전 처리 한 다음 SAHA (1 μ M) 및 bortezomib (0.03 μ M)을 동시에 처리하고 48시간 후 Annexin V assay를 이용하여 NAC의 전 처리 여부가 폐암세포주의 apoptosis에 미치는 영향을 확인하였다. FACS를 이용한 실험은 각각 3차례 반복하여 결과를 얻었다.

4) SAHA 단독, bortezomib 단독 및 SAHA와 bortezomib의 복합 투여 후 폐암세포주의 세포 내 ROS의 변화

SAHA 및 bortezomib에 의한 세포 내 ROS의 변화를 fluorophore DCFH-DA를 이용하여 분석하였다. 폐암세포주 (A549 및 NCI H460)를 6 well plate에 2×10^5 세포를 분주 후 SAHA 및 bortezomib을 동시에 처리한 다음 48시간 배양하였다. Phosphate buffered saline (PBS; Dulbecco's Formula Modified; ICN Biochemicals, Thame, UK)에 녹인 10 μ M의 DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate; Sigma)로(대조군은 PBS) 30분 염색한 후 trypsin으로 세포를 떼어 낸 후 FITC로 염색하여 FACSscan을 이용하여 분석하였다. 또한 ROS scavenger인 N-acetylcysteine (15 mM)를 SAHA, bortezomib 투여 3시간 전에 전 처리한 후 SAHA, bortezomib을 복합 투여하고 48시간 경과 후 세포 내에서 생성되는 ROS에 미치는 영향을 관찰하였다.

5) SAHA 단독, bortezomib 단독 및 SAHA와 bortezomib의 복합 투여에 따른 apoptosis 및 autophagy에 미치는 영향 확인

SAHA 및 bortezomib의 단독 및 복합투여에 따른 apoptosis 및 autophagy pathway에 미치는 영향을 확인하기 위해 SAHA (1, 2 μ M)과 bortezomib (0.03, 0.1 μ M)을 단독 및 복합 투여하여 48시간 후 apoptotic pathway의 caspase 3, Bcl-2, autophagic pathway에 관여하는 beclin 1에 대해 Western blot assay를 시행하였다.

결 과

1) 폐암세포주에서 SAHA 및 bortezomib의 복합 투여에 의한 상승적인 항암효과

2종의 폐암세포주(A549, NCI H460)에서 SAHA 및 bortezomib의 복합 투여는 단독 투여 보다 강한 상승적 항암작용을 보임을 Calcsyn software 분석을 통해 확인할 수 있었다 (Fig. 1).

2) SAHA와 bortezomib의 복합 투여에 따른 apoptosis의 증가

폐암세포주(NCI H460)에서 bortezomib (0.03, 0.1 μ M) 및 SAHA (1 μ M)를 단독 또는 복합으로 투여한 결과, 조기의 apoptosis를 보이는 세포(lower right quadrant)가 bortezomib 단독으로 0.03 mM에서는 4.02%, 0.1 μ M에서는 6.6%이었으며, SAHA (1 μ M)를 단독으로 투여한 세포에서는 2.6%이었다. 그러나 bortezomib (0.03 μ M)과 SAHA (1 μ M)를 복합 투여한 세포에서는 8.14%로 증가하였으며 특히 bortezomib (0.1 μ M)과 SAHA (1 μ M)를 복합 투여한 세포에서는 조기 apoptosis를 보이는 세포가 24.96%로 급증하여 두 약제의 상승적인 항암효과가 apoptosis 유도에 기인함을 알 수 있었다 (Fig. 2A). 이 실험은 2차례 더 시행하여 같은 경향을 확인하였다(Fig. 2B).

3) ROS scavenger인 NAc에 의한 bortezomib과 SAHA의 apoptosis의 억제

A549 및 NCI H460 폐암세포주에서 bortezomib (30 nM)과 SAHA (1 μ M)를 복합투여한 후 apoptosis assay (Annexin V assay)를 한 결과 조기의 apoptosis를 보이는 세포는 각각 12.58%, 7.18%였으나 NAc로 전 처리한 결과 각각 6.36%, 5.02%로 감소하여 bortezomib, SAHA의 복합투여에 의한 apoptosis에 ROS가 역할을 함을 확인하였다(Fig. 3A). 이는 2차례의 추가실험에서도 같은 경향을 보였다(Fig. 3B).

4) Bortezomib 및 SAHA의 복합 투여에 의한 ROS의 증가 및 NAc에 의한 ROS의 억제

ROS scavenger인 NAc에 의한 apoptosis의 감소가 ROS 생성 억제에 의한 현상인가를 다시 확인하기 위해 DCFH-DA를 이용하여 세포 내 ROS를 염색하여 분석한 결과 A549, NCI H460 세포에서 bortezomib과 SAHA의 복합 투여는 단독 투여보다 세포 내 ROS의 생성이 증가하였으며 이는 NAc의 전 처리에 의해 감소하는 현상을 확인하였다(Fig. 4).

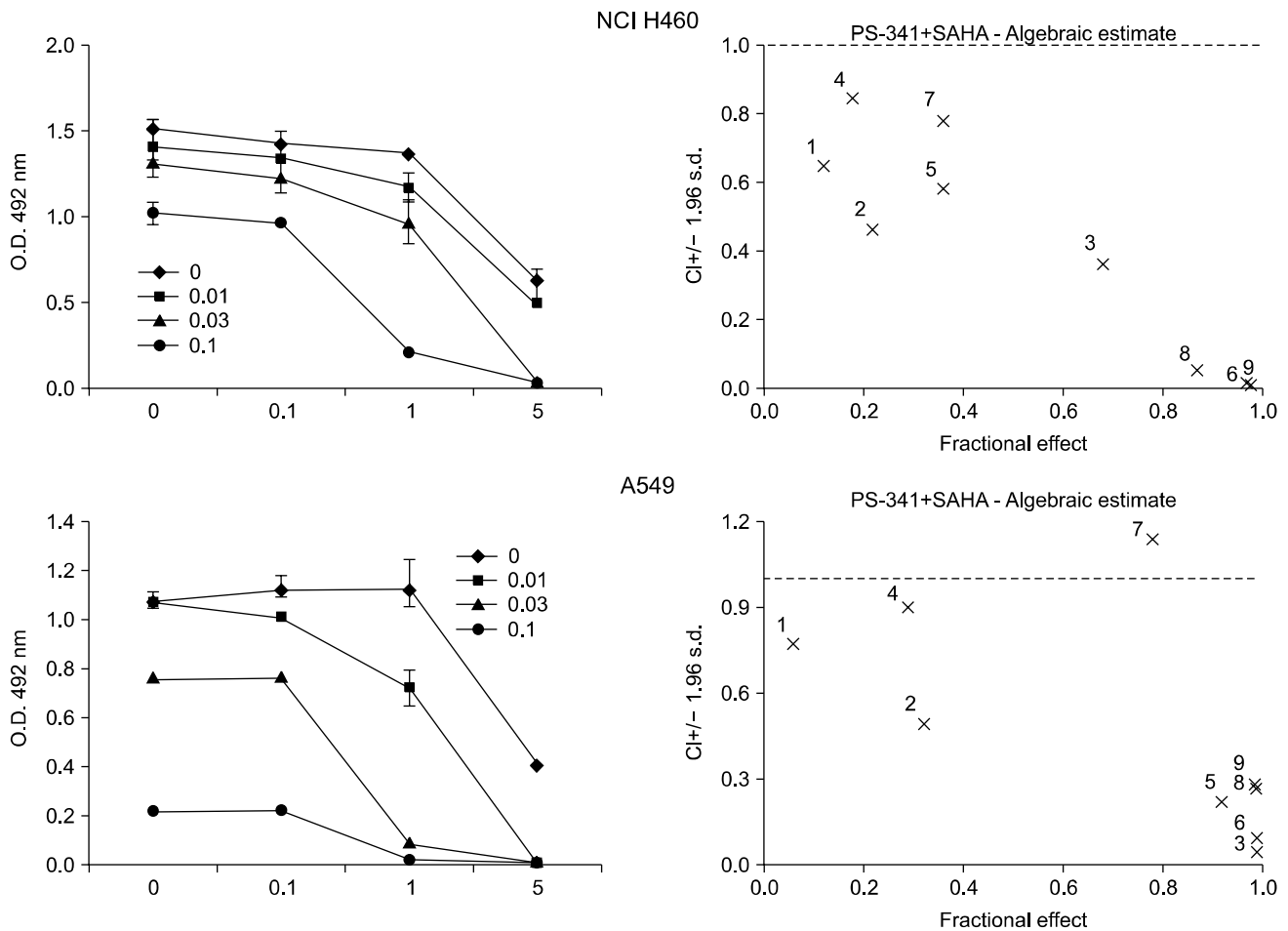


Fig. 1. Analysis of the drug interaction (SAHA and bortezomib) in the lung cancer cell lines. Calcsyn analysis (right column) demonstrated that SAHA and bortezomib showed strong synergistic cytotoxicity in two lung cancer cell lines (the combination indices for most drug combinations were below 0.7).

이 결과로 bortezomib과 SAHA의 복합 투여 효과의 일부는 ROS 생성의 증가에 기인함을 확인할 수 있었다.

5) SAHA 및 bortezomib 투여에 의한 apoptosis 및 autophagy pathway에 미치는 영향

SAHA (1, 2 μ M) 및 bortezomib (0.03, 0.1 μ M)를 단독 및 복합 투여한 후 apoptosis pathway와 autophagy pathway에 미치는 영향을 Western blot으로 확인하였다. Apoptosis에 관여하는 물질로 caspase 3의 cleavage를 확인한 결과 SAHA를 단독으로 투여한 세포나 bortezomib을 단독으로 투여한 세포에서는 뚜렷한 caspase 3의 cleavage를 확인할 수 없었으나 복합 투여한 세포에서는 caspase 3의 cleavage가 뚜렷하게 관찰되었다. 또한 antiapoptosis를 보이는 물질인 Bcl-2를 확인한 결과 SAHA, bortezomib의 단독 투여보다 복합 투여에서 확연한 감소현상을 보였다. 이 두 변화로 SAHA,

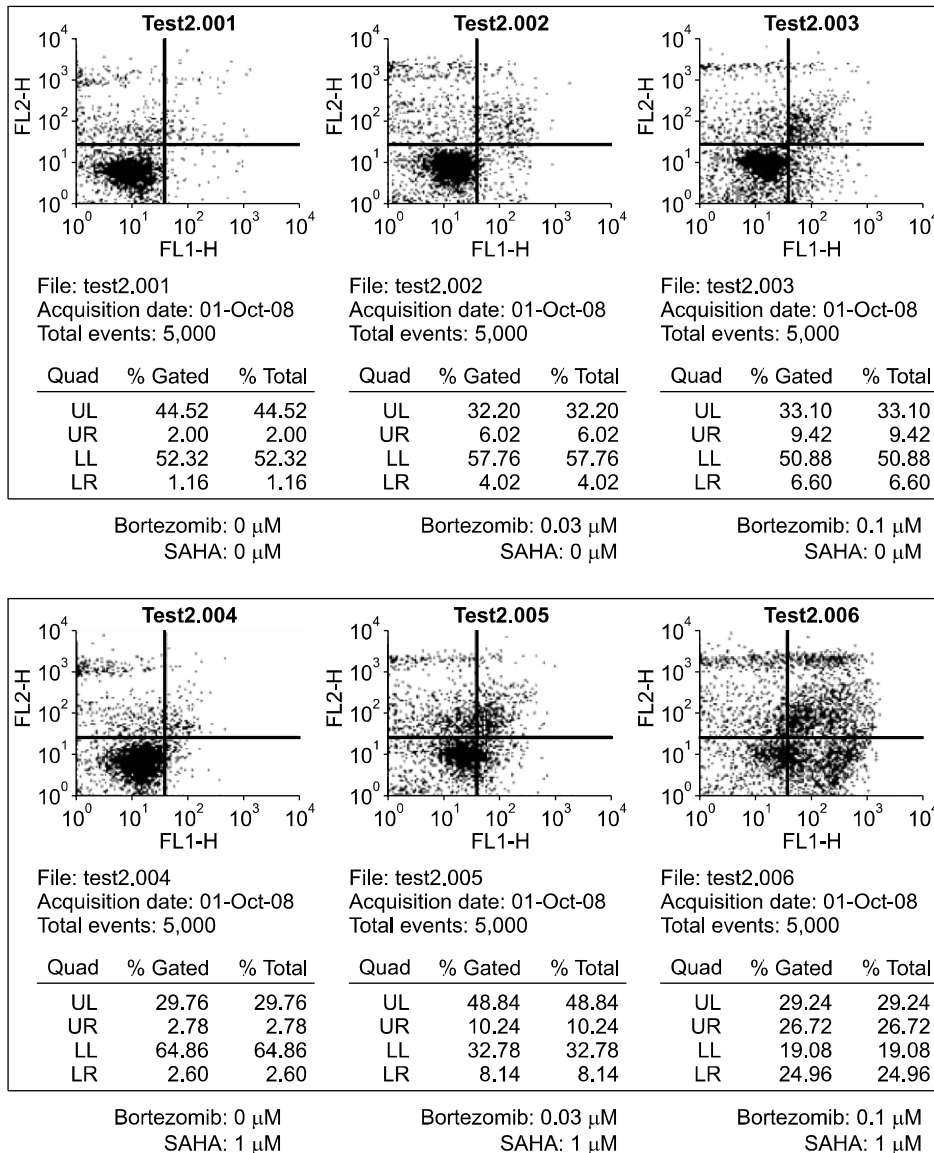
bortezomib의 복합 투여는 단독 투여보다 강력한 apoptosis를 유도함을 확인할 수 있었다.

또한 autophagy의 중요 매개체인 beclin-1도 단독 투여에 비해 복합 투여에서 뚜렷한 감소현상을 보여 autophagy의 변화도 복합 투여에 중요한 역할을 함을 확인할 수 있었다 (Fig. 5).

고안 및 결론

폐암의 표준항암치료는 cisplatin을 포함한 2제의 항암제를 포함하는 치료로 10년 이상 큰 변화 없이 유지되어 오고 있었다. 최근 선암에서 EGFR 변이의 중요성이 확인되고 이 변이를 가진 환자에서는 EGFR-TKI (gefitinib, erlotinib)이 표준요법으로 자리잡기 시작하였으며 Alk gene의 translocation을 보이는 일부의 폐암에서 Alk-TKI가 효과가 있음이

A



B

B/S (μ M)	0/0	0.03/0	0.1/0	0/1	0.03/1	0.1/1
1 st exp	1.16	4.02	6.60	2.60	8.14	24.96
2 nd exp	1.48	6.90	8.06	4.46	9.26	16.78
3 rd exp	3.30	6.28	10.70	9.28	12.62	28.48

Fig. 2. Increased apoptosis by combining SAHA and bortezomib in a lung cancer cell line. (A) NCI H460 cells were treated with SAHA (0, 1 μ M) and bortezomib (0, 0.03, and 0.1 μ M) for 48 hours and Annexin V assay was performed to measure the cell apoptosis. The cells treated with SAHA (1 μ M) and bortezomib (0.1 μ M) showed a high proportion of early apoptotic cells (24.96%) compared with the cells treated with SAHA (1 μ M) alone (2.6%) and the cells treated with bortezomib (0.1 μ M) alone (6.6%). (B) Data of the proportions of cells showing early apoptosis (lower right quadrant, LR) in three independent experiments (B, bortezomib; S, SAHA). All the experiments showed the same tendency of increased apoptosis by a combination of SAHA and bortezomib.

기초연구 및 임상연구에서 증명되고 있다.

이런 약제의 화려한 등장에도 불구하고 아직은 일부 폐암 환자에게만 혜택이 가고 있다. 이를 극복하기 위해 기존의 항암제(cisplatin 계열, taxol 계열, gemcitabine, pemetrexed)와 복합 투여가 가능한 새로운 항암효과 약제의 사용 가능성이 연구되고 있다. 새로운 계열의 항암제로 각광받는 약제가 서론에서 서술한 HDAC inhibitor와 proteasome

inhibitor이다. 본 연구에 사용된 HDAC inhibitor인 SAHA는 cutaneous T cell lymphoma에 사용이 허가된 최초의 HDAC inhibitor (5)이며 bortezomib은 이미 multiple myeloma의 표준 치료로 자리 잡은 약제이다(2).

이전 연구에서 SAHA와 bortezomib의 복합연구는 여러 암에서 보고되어 있다. Yu 등(8)은 Gleevec (STI571)에 내성을 보이는 leukemia 세포에 SAHA와 bortezomib을 복합 투여

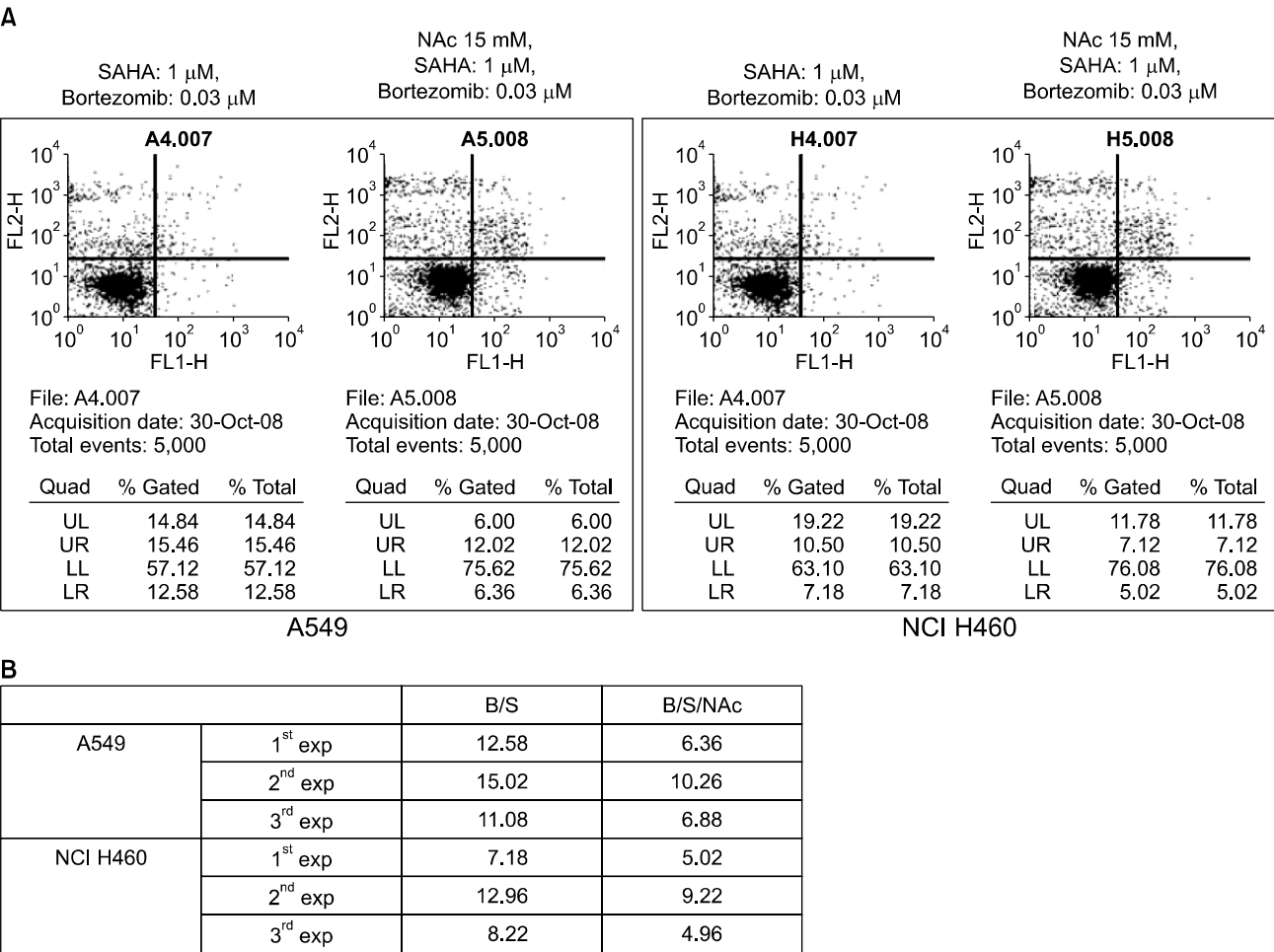


Fig. 3. The apoptosis induced by SAHA and bortezomib was suppressed by N-acetylcysteine (NAc), which is a reactive oxygen species (ROS) scavenger. Pretreatment of lung cancer cells (A549 and NCI H460) with NAc (15 mM).

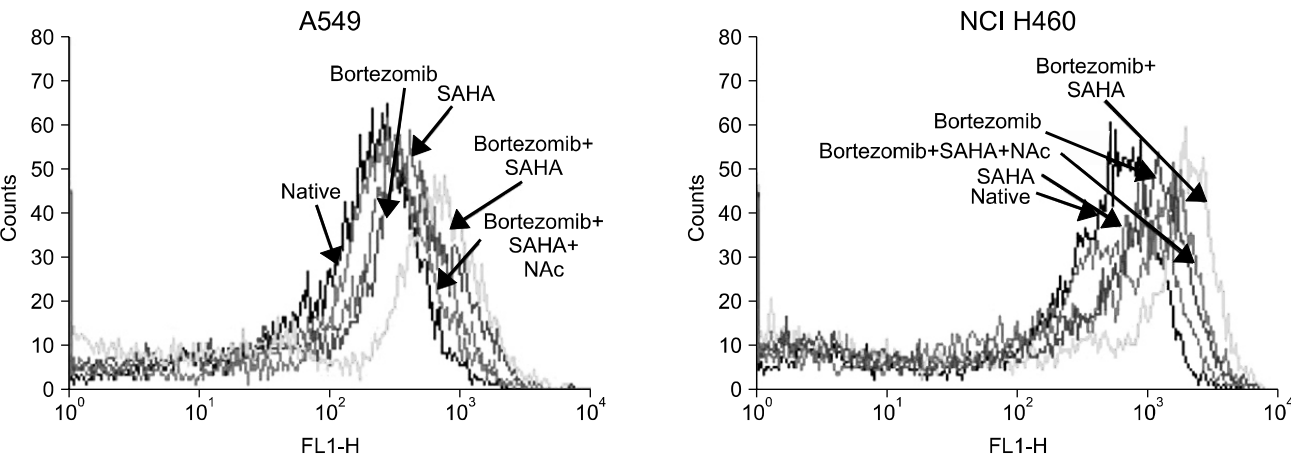


Fig. 4. Increased reactive oxygen species (ROS) formation by combination of SAHA and bortezomib and reduced ROS formation by N-acetylcysteine (NAc). ROS was stained with DCFH-DA and ROS value was measured by flow cytometry. Three hour-pretreatment with NAc significantly reduced intracellular ROS formation induced by SAHA and bortezomib. Mean values of ROS in A549: 224.3 (native), 393.5 (bortezomib: 0.03 μ M), 325.5 (SAHA: 1 μ M), 459.5 (bortezomib+SAHA) and 274.5 (bortezomib +SAHA+NAC). Mean values of ROS in NCI H460: 502.6 (native), 727.4 (bortezomib: 0.03 μ M), 535.1 (SAHA: 1 μ M), 1042.1 (bortezomib+SAHA) and 745.8 (bortezomib+SAHA+NAC).

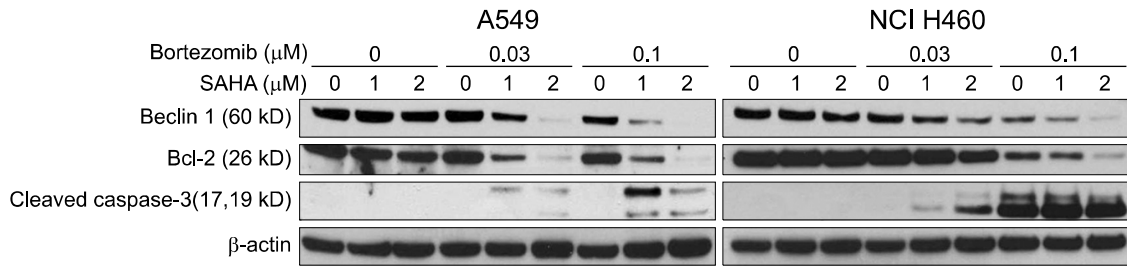


Fig. 5. Analysis of apoptotic and autophagic pathway of lung cancer cells (A549 and NCI H460) treated with bortezomib and SAHA. Compared with single treatment of bortezomib or SAHA, combined treatment of bortezomib and SAHA induced enhanced cleavage of caspase 3 and breakdown of antiapoptotic molecule, Bcl-2. Furthermore, combined treatment of bortezomib and SAHA induced breakdown of beclin-1 known as autophagic molecule. Details are described in the text.

하여 ROS의 생성을 증강시키고 NF κ B의 활성화를 억제하여 apoptosis를 유도함을 보고하였다. 이 현상은 간암세포에서도 확인되어 SAHA와 bortezomib을 복합 투여하여 c-Jun, phosphor-c-Jun, FasL 및 Bcl-Xs의 발현을 증가시키고 Bid, caspase-8 및 caspase-3를 활성화시켜 apoptosis를 유도함이 보고되어 있다(9).

Heider 등(10)은 mantle cell lymphoma에서 SAHA와 bortezomib의 복합투여에서 약제의 상호작용은 본 연구의 기본원리와 같은 Chou-Talalay median effect 방법으로 연구하여 combination index가 1 이하로 synergism이 있음을 보고하였고 ROS 생성의 증가에 기인하고 NAc로 억제됨을 보고하였다. Zhang 등(11)은 T-leukemia/lymphoma에서 SAHA와 bortezomib을 복합 투여하여 mitochondria 손상과 NF κ B 등의 cyto-protective signaling pathway를 억제하여 상승적으로 apoptosis를 유도함을 증명하였다.

본 연구에서는 A549, NCI H460의 비소세포폐암주를 대상으로 SAHA와 bortezomib을 복합 투여하여 항암효과의 상호작용을 Calcsyn software로 분석한 결과 combination index가 1 이하로 synergism이 있으며 대부분의 조합이 0.7 이하로 강한 synergism을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 또한 suboptimal dose인 SAHA (1 μM)와 bortezomib (0.03, 0.1 μM)을 폐암세포에 복합 투여한 경우 조기 apoptosis를 보이는 세포가 단독 투여에 비해 현저히 증가하여 두 약제의 복합 효과가 apoptosis가 증가하여 일어남을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

또한 이전의 보고된 바와 같이(10,12) 세포 내 ROS의 생성이 apoptosis의 유도에 미치는 영향을 ROS scavenger인 NAc를 투여함으로 간접적으로 측정하였다. Fig. 3의 결과처럼 SAHA 및 bortezomib의 복합 투여 전에 NAc로 전 처치한 결과 apoptosis의 유도가 감소함을 확인할 수 있었으며 NAc의 투여로 세포 내 ROS의 생성이 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 즉, 폐암세포주에서도 이전의 보고와 같이

SAHA와 bortezomib의 복합투여는 ROS의 생성을 증가시켰고 이는 apoptosis의 여러 기전 중 하나임을 확인할 수 있었다.

특히 본 연구에서는 SAHA와 bortezomib의 복합 투여 후 apoptotic pathway와 autophagic pathway의 변화를 검증하였다. Suboptimal dose의 SAHA와 bortezomib을 복합 투여한 결과 이전 보고와 일치하게 caspase-3의 activation에 의한 cleavage가 증가하였으며 antiapoptotic molecule인 Bcl-2의 breakdown이 증가되었다.

본 연구의 특이한 발견은 SAHA 및 bortezomib의 복합 투여에 따른 autophagy의 marker인 beclin-1의 소실이다. Autophagy는 type II cell death라고도 하며 autophagosome의 형성이 특징적이다. Autophagy는 이중적인 성격을 가지고 있어 외부의 영향이 부족한 경우 세포 내 단백질 및 organelle을 스스로 파괴시켜가며 세포의 생존을 유지하는 기능이 있는가 하면 non-apoptotic cell death의 기전으로, 즉 self degradation의 방법으로 massive cell destruction을 유도하기도 한다(13-15). Li 등(16)의 보고에 의하면 SAHA는 Jurkat T-leukemia 세포에서 beclin-1의 발현을 증가시키고 autophagosome 형성을 유도하여 autophagy에 의한 cell death를 유도한다고 보고하였다. 또한 proteasome inhibitor도 암세포에서 autophagy를 유도한다고 알려져 있다(17,18). 그러나 본 연구에서는 SAHA와 bortezomib의 복합투여가 각 약제의 단독 투여에 비해 autophagy 형성에 필요물질인 beclin-1이 감소하여 autophagy pathway에 변화가 동반됨을 확인할 수 있었다. 이는 caspase activation에 따른 2차적인 변화인지 또는 autophagy 현상이 억제되는 1차적인 반응인지는 확인할 수 없다. Caspase와 autophagy의 연관성은 많이 연구되어 있다(19). Martin와 Baehrecke (20)은 drosophila에서 autophagic cell death가 caspase에 의한 steroid activation에 의해 조절되어 caspase가 apoptotic cell death 이외에도 autophagic cell death의 조절에도 관여함을 보고하였다. Cho 등(21)은 TRAIL

에 의한 apoptosis 유도에 따른 caspase activation으로 ATG6/beclin-1의 cleavage가 일어난다고 보고하고 있으며 이는 apoptosis와 autophagy의 연결고리가 되리라 추정하였다.

본 연구에서 관찰된 SAHA 및 bortezomib의 복합 투여에 의한 beclin-1의 감소가 직접 autophagy와 어떤 연관성을 가지고 있는지는 알 수 없다. 즉, autophagy 현상을 확인할 수 있는 전자현미경을 이용한 autophagosome 등의 검사가 부족하여 SAHA와 bortezomib이 autophagy에 어떤 영향을 미치는가는 추후 연구가 필요하리라 생각된다.

결론적으로 비소세포암세포주에서 SAHA와 bortezomib의 복합투여는 상승적인 항암효과를 보였으며 ROS 생성 증가에 의한 apoptosis의 증가가 항암효과 상승의 일부 기전으로 생각된다. 이는 추후 폐암환자에서 기존 항암치료와 의 복합치료의 효과를 기대할 수 있는 중요 자료가 되리라 생각된다.

REFERENCES

- Ludwig H, Khayat D, Giaccone G, et al. Proteasome inhibition and its clinical prospects in the treatment of hematologic and solid malignancies. *Cancer* 2005;104:1794-1807.
- Genin E, Reboud-Ravaux M, Vidal J. Proteasome inhibitors: recent advances and new perspectives in medicinal chemistry. *Curr Top Med Chem* 2010;10:232-256.
- Fanucchi MP, Fossella FV, Belt R, et al. Randomized phase II study of bortezomib alone and bortezomib in combination with docetaxel in previously treated advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:5025-5033.
- Somech R, Izraeli S, J Simon A. Histone deacetylase inhibitors--a new tool to treat cancer. *Cancer Treat Rev* 2004;30:461-472.
- Duvic M, Talpur R, Ni X, et al. Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood* 2007;109:31-39.
- Komatsu N, Kawamata N, Takeuchi S, et al. SAHA, a HDAC inhibitor, has profound anti-growth activity against non-small cell lung cancer cells. *Oncol Rep* 2006;15:187-191.
- Imre G, Gekeler V, Leja A, et al. Histone deacetylase inhibitors suppress the inducibility of nuclear factor-kappaB by tumor necrosis factor-alpha receptor-1 down-regulation. *Cancer Res* 2006;66:5409-5418.
- Yu C, Rahmani M, Conrad D, et al. The proteasome inhibitor bortezomib interacts synergistically with histone deacetylase inhibitors to induce apoptosis in Bcr/Abl+ cells sensitive and resistant to STI571. *Blood* 2003;102:3765-3774.
- Emanuele S, Lauricella M, Carlisi D, et al. SAHA induces apoptosis in hepatoma cells and synergistically interacts with the proteasome inhibitor Bortezomib. *Apoptosis* 2007;12:1327-1338.
- Heider U, von Metzler I, Kaiser M, et al. Synergistic interaction of the histone deacetylase inhibitor SAHA with the proteasome inhibitor bortezomib in mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol* 2008;80:133-142.
- Zhang QL, Wang L, Zhang YW, et al. The proteasome inhibitor bortezomib interacts synergistically with the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid to induce T-leukemia/lymphoma cells apoptosis. *Leukemia* 2009;23:1507-1514.
- Heider U, Rademacher J, Lamottke B, et al. Synergistic interaction of the histone deacetylase inhibitor SAHA with the proteasome inhibitor bortezomib in cutaneous T cell lymphoma. *Eur J Haematol* 2009;82:440-449.
- Alva AS, Gultekin SH, Baehrecke EH. Autophagy in human tumors: cell survival or death? *Cell Death Differ* 2004;11:1046-1048.
- Baehrecke EH. Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:505-510.
- Debnath J, Baehrecke EH, Kroemer G. Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy* 2005;1:66-74.
- Li J, Liu R, Lei Y, et al. Proteomic analysis revealed association of aberrant ROS signaling with suberoylanilide hydroxamic acid-induced autophagy in Jurkat T-leukemia cells. *Autophagy* 2010;6:711-7124.
- Belloni D, Veschini L, Foglieni C, et al. Bortezomib induces autophagic death in proliferating human endothelial cells. *Exp Cell Res* 2010;316:1010-1018.
- Zhu K, Dunner K Jr, McConkey DJ. Proteasome inhibitors activate autophagy as a cytoprotective response in human prostate cancer cells. *Oncogene* 2010;29:451-462.
- Yu L, Lenardo MJ, Baehrecke EH. Autophagy and caspases: a new cell death program. *Cell Cycle* 2004;3:1124-1126.
- Martin DN, Baehrecke EH. Caspases function in autophagic programmed cell death in Drosophila. *Development* 2004;131:275-284.
- Cho DH, Jo YK, Hwang JJ, et al. Caspase-mediated cleavage of ATG6/Beclin-1 links apoptosis to autophagy in HeLa cells. *Cancer Lett* 2009;274:95-100.