

다제 내성 암세포에서의 Polyamine 특성

권혁영 · 이종호¹ · 이등권*

성균관대학교 생물학과¹, 약학대학

Polyamines in Multi-drug Resistant Cancer Cells

Hyog Young KWON, Jong Ho LEE¹ and Dong Kwon RHEE

Department of Biology¹, and College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, SuWon 440-746, Korea

(Received August 14, 1997; accepted September 19, 1997)

Abstract - Since the advent of chemotherapy, certain types of cancer have been particularly resistant to chemotherapeutic treatment. One of the most well-studied types of resistance is resistance to multiple structurally dissimilar hydrophobic chemotherapeutic agents, or multidrug resistance (MDR). We found that MDR cells (KBV20C, KB7D) being highly resistant to colchicine, etoposide, and vincristine were found to have very low level of putrescine and low level of spermidine than the drug sensitive parental cells (KB) but they had almost same level of spermine as the drug sensitive cells. Although both MDR and drug sensitive cells had almost same rate of polyamine uptake, MDR cells were much more sensitive to an inhibitor of polyamine synthesis, methylglyoxal-bis guanylhydrazone (MGBG), suggesting that MDR cells might be defective in polyamine synthesis. These results also suggest that MGBG can be used for treatment of MDR *in vivo*.

Keywords □ multi-drug resistance, polyamine, methylglyoxal -bis-guanylhydrazone.

현재 암 치료하는 방법으로 이용되고 있는 화학 요법은 주로 암세포의 빠른 성장을 억제하기 위한 약물이 많이 사용되고 있으나 이러한 약물에 대해서 암이 내성을 나타내는 경우가 현저히 증가하고 있다. 그 중에서 구조적으로 전혀 다른 친지성인 약물에 대해서 내성을 나타내는 현상을 다제내성(multidrug resistance, MDR) 이라고 한다. 다제내성의 기전은 세포막 성분인 P-glycoprotein이 약물을 세포 밖으로 배출시켜서 세포 내에 약물이 축적되는 것을 억제함으로써 세포내 약물의 농도를 감소시키기 때문이다 (Gottesman과 Pastan, 1988). 이 P-glycoprotein 단백질은 *mdr* 유전자에 의해 발현되며 이런 내성현상을 Pgp-MDR 이라고 한다. *mdr* 유전자는 종사이에 많은 유사성이 있는 것으로 밝혀져 있으며 인간에서는 두 *mdr* 유전자(*mdr* 1과 *mdr* 2)가 있으나(Callen 등, 1987) *mdr* 1만이 다제내성에 관여하고 있다(Ueda 등, 1987).

MDR 1은 약 1,280개의 아미노산으로 구성되어 있으며 12개의 transmembrane domain과 2개의 ATP binding domain을 갖고 있다(Chen 등, 1990). 다제내성에서 주된 역할을 하는 Pgp-MDR을 억제하는 약물이 현재 많이 연구되고 있으며 지금까지 밝혀진 것으로는 anthracycline 유도체, 항

생제, 항고혈압제, 항말라리아제, 면역억제제 등이 알려져 있다(Ozols, 1991). 이와 같이 Pgp-MDR을 억제하는 약물을 Pgp-MDR 억제제라고 하며 주로 p-glycoprotein의 발현이나 작용을 억제하여 약물이 세포 밖으로 배출되는 것을 억제함으로써 세포내 약물 농도를 증가시킨다. 현재 다제내성은 암을 치료하는데 있어서 가장 문제가 되는 것 중의 하나이며 따라서 Pgp-MDR을 억제하기 위해 많은 연구가 이루어지고 있다. 그러나 지금까지 알려진 Pgp-MDR 억제제의 문제점은 P-glycoprotein을 억제하는데 필요로 하는 혈중 농도에서는 그 자체에 의한 독성 때문에 임상적으로 사용할 수 없는 경우가 대부분이므로 새로운 다제내성 억제제의 개발이 시급히 요청되고 있다.

그러나 최근 p-glycoprotein이 관련되지 않는 다른 형태의 다제내성이 발견되었다. 즉 doxorubicin 내성에 대해서 내성을 나타내는 폐암세포주(Cole 등, 1991)에서 6.5 kb 크기의 mRNA가 많이 증가되는 것이 관찰되었으며 이 세포주에서는 p-glycoprotein의 발현은 증가되지 않았다. 이 6.5 kb의 mRNA는 1,531개의 아미노산으로 구성되어 있으며 190 kd의 glycosylation된 단백질을 만든다. 이 단백질을 MRP (multidrug resistance associated protein)라고 하며 (Cole 등, 1991; Cole과 Deeley, 1993) 아미노산 서열상으로 ABC transmembrane transporter superfamily(ABC는 ATP binding cas-

* To whom correspondence should be addressed.

sette의 약자로서 ATP를 가수 분해 하여 여러 가지 작은 물질을 이동시키는데 관여하는 세포막 상에 있는 일종의 단백질 group)의 일종으로 확인되었으며 P-glycoprotein과는 대략 15%의 유사성을 갖고 있다.

암세포는 성장속도가 빠르므로 증식을 위해서 많은 양의 polyamine을 필요로 한다(Janne 등, 1978; Moulinoux 등, 1991). Polyamine은 amine 기를 2개 이상 갖고 있는 것으로서 putrescine, spermidine, spermine 등이 있으며 정상세포에서도 다량 함유되어 있다(Pegg, 1988; Tabor와 Tabor, 1984). Polyamine은 생리학적 pH에서 양전하를 나타내기 때문에 살아 있는 세포에서 음전하를 갖고있는 성분과 강하게 반응한다. 따라서 세포 전체, 세포 소기관, 또는 핵산 등과 반응하여 여러가지 대사 반응에 영향을 준다. 약물학적으로는 polyamine 중에서 특히 spermidine과 spermine은 유독하기 때문에 신장 독성, 저체온증등을 나타내며 DNA, RNA, protein 합성 등과 같은 많은 생물학적 반응에 관계된다고 알려져 있으나 아직까지 정확한 분자생물학적 기능은 알려져 있지 않다(Tabor와 Tabor, 1984).

Polyamine 생합성에서 속도제한 단계에 작용하는 효소는 ornithine decarboxylase(ODC)이며 이 효소는 포유동물 효소중에서 매우 특이하게 작용한다. 보통의 포유동물 효소는 반감기가 수일인데 비해서 ODC는 반감기가 30분 이하이며(Russel과 Snyder, 1969) 세포 전체 가용성 단백질의 3 ppm 정도 함유되어 있으며 유도 가능한 효소이다. Hydroxyurea에 저항성을 갖는 암세포 주에서는 ODC 유전자와 인접한 ribonucleotide reductase의 catalytic subunit(M2) 유전자와 ODC 유전자가 더불어 증폭되어 있으며(Srinivasan 등, 1987) human tumor에서는 ODC 유전자와 인접한 N-myc oncogene이 ODC 유전자와 함께 증폭되는 경우가 많다(Tonin 등, 1989). ODC의 활성은 정상 조직보다 간암조직에서 더 높았으며(Tamori 등, 1994) ODC 억제제인 difluoromethylornithine(DFMO)의 투여로 전립선암의 억제 효과가 관찰되었다(Kadmon, 1992). 또한 polyamine 생합성 효소 S-adenosylmethionine decarboxylase(SAMDC) 억제제인 methylglyoxal-bis-guanylhydrazone(MGBG)도 암의 치료에 유용한 효과를 나타내어(Regnass 등, 1992) polyamine 억제제가 암의 치료에 효과적인 것을 나타내고 있다.

본 연구에서는 다제내성 세포도 암세포와 같은 수준의 polyamine 농도를 갖고 있는지 또한 polyamine의 흡수에서는 어떤 차이가 있는지를 규명하고 이를 이용한 다제내성 세포의 성장을 억제할수 있는 치료방법에 응용하고자 하였다.

실험방법

실험재료

[¹⁴C] putrescine은 Amersham(England)으로 부터 구입하

여 사용하였으며 Trypsin-EDTA는 Gibco BRL (USA), benzoyl chloride는 Yakuri pure chemicals(Japan) 등의 제품을 사용하였으며 언급하지 않은 기타 시약은 Sigma Chemicals (St Louis, MO)로 부터 구입하여 사용하였다. Phosphate-buffered saline(PBS)는 NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ 1.44 g, KH₂PO₄ 0.24 g을 탈이온수 800 ml에 넣고 완전히 녹인 다음 1 M HCl 로 pH 를 7.4로 맞추고 최종 부피가 1 L가 되도록 탈이온수를 가한 다음 0.22 μ m filter로 여과 멸균하여 사용하였다.

배지

RPMI 1640 배지에 소태자 혈청(fetal bovine serum: Gibco BRL, USA)을 5% 되도록 가하고 50 mg/ml의 kanamycin sulfate 를 최종 100 μ g/ml 농도가 되도록 가하였다.

암세포주

인간 상피암세포 KB는 American Type Culture Collection(Rockville, MD)에서 구입하여 사용하였다. KB V20C 세포는 KB 세포에 vincristine의 농도를 단계적으로 증가시켜 주면서 vincristine 에 저항성인 것을 선별하여 최종적으로 20 nM의 vincristine에 저항성을 나타낸 것을 사용하였다. KB V20C 세포는 다제내성을 나타내며 Pgp170을 다량 발현하고 있음이 Western blot으로 확인되었다(Chen 등, 1993). KB7D 세포는 KB 세포에 etoposide 농도를 단계적으로 증가시켜 주면서 선별한 다제내성을 나타내는 세포로서 Multidrug Resistance associated Protein(MRP)을 다량 발현하고 있으며(Gaj 등, 1995) 미국 예일대학교로부터 공여 받았다.

세포 배양 조건

KB 세포는 5%의 소태자혈청과 kanamycin sulfate 100 μ g/ml 를 함유하는 RPMI 1640 배지로 5% CO₂를 함유하는 습윤한 공기 조성 하에서 37°C에서 배양하였다. KB V20C 세포와 KB7D 세포는 5% 소태자혈청과 kanamycin sulfate 100 μ g/ml 를 함유하는 RPMI 1640 배지에 각각 vincristine 20 nM과 etoposide 7 μ M을 가하여 5% CO₂를 함유하는 습윤한 공기 조성하에서 37°C에서 배양하였다(Gaj 등, 1995).

세포의 생존도 측정

Culture flask에서 배양하여 monolayer를 형성한 세포를 96 well microtiter plate에 1×10^4 cells 이 되도록 접종하고 37°C의 CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양한후 각 well에 적정 농도의 약물을 가하고 다시 37°C의 CO₂ 배양기에서 48 시간 동안 배양하였다. Plate를 뒤집어서 배지를 제거하고 0.5% methylene blue(Graeme 등, 1984) 를 100 μ l씩 각 well에 가하여 실온에서 30분 방치 한 다음 충분한 양의 물로 plate를 헹구어 낸다. 상온에서 완전히 건조시키고 각 well에 1% sarkosyl 용액을 200 μ l 가한 후 4시간 동안 orbital shaker에서 흔들여 주어 세포가 완전히 용해되었을때 650 nM에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

세포의 성장을 측정 (Khan 등, 1994)

세포(2×10^6 세포/ flask)를 조직배양용 flask에 가한 다음 12, 24, 48, 72시간 동안 배양하였다. $1 \times$ Trypsin-EDTA로 cell을 처리하여 flask로부터 분리시킨후 배지를 가하여 현탁상태로 만들고 이 세포현탁액 0.1 ml에 0.4% trypan blue 용액 0.1 ml을 가한 후 pipeting 한다. 5분후에 $100 \mu\text{l}$ 를 취하여 hcmocytometer에서 현미경을 통해서 염색되지 않은 살아 있는 세포 숫자만을 세었다.

IC₅₀ 값의 측정

IC₅₀ 값을 측정하기에 위해 예비실험을 실시하여 IC₅₀ 값에 유사한 실험치를 확보한후 본 실험을 실시하여 세포의 성장을 50% 억제하는 IC₅₀ 값(50% inhibition dose)을 측정하였다.

단백질의 정량

단백질의 정량은 Bradford 방법 (1976)을 이용하였다.

[¹⁴C] putrescine uptake 측정

Khan 등 (1990, 1994)의 방법을 이용하였다. 즉 2×10^6 세포를 25 Cm^2 조직배양용 flask에 가한 다음 8-10시간 배양한후 PBS 10 ml로 씻어 낸다. 20 nmol의 [¹⁴C] putrescine을 함유한 PBS(pH 7.4)를 2 ml 가한후 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 10분 동안 배양한다. PBS로 두번 씻어낸 다음 $1 \times$ trypsin-EDTA로 처리하고 1000 g로 10분 동안 원심 분리한다. 침전물에 0.3 M HClO₄를 가한 다음 60초 동안 sonication 한후 현탁액 일부를 취해 Bradford 방법으로 단백질을 정량 한다. 현탁액 1 ml에 10 ml의 aqueous counting scintillant(5.5 g PPO, 0.1 g POPOP, 667 ml Toluenc, 333 ml Triton X-100/1 l)을 가한 다음 방사능을 측정하였다.

Polyamine의 벤조일화 반응

Polyamine을 정량하기 위해 Redmond와 Tseng(1979)의 방법을 이용하여 다음과 같이 benzoyl화 반응을 시켰다. 세포를 confluent 할 때까지 배양한후 $1 \times$ Trypsin-EDTA로 처리한후 1000 g로 10분 원심 분리하여 세포를 모은다. 0°C로 식힌 HClO₄를 4.9% 되게 가한후 60초 동안 sonication한 다음 Bradford 방법으로 단백질을 정량하였다. 0°C에서 30분 동안 방치한 후 15000 rpm으로 4°C에서 30분 원심분리하고 얻어진 상등액 1 ml에 2 N NaOH 1 ml, 1,6-diaminohexane 25 nmol, benzoyl chloride 5 μl 를 가하여 혼합한 다음 상온에서 20분 방치한다. 포화된 NaCl 용액 2 ml을 가하고 2 ml의 diethylether로 추출한 다음 aspirator로 ether를 휘발시켰다. Pellet을 methanol 100 μl 에 녹인 다음 20 μl 를 HPLC 에 loading 하였다.

HPLC에 의한 polyamine 측정

HPLC(Tosoh, Japan)를 이용한 polyamine의 정량 조건은 다음과 같다. Column(Novapak C18 [3.9×150 mm, 4 m, 60 Å])을 사용하여 flow rate은 1.0 ml/min로 elution 하였으며 solvent A로 H₂O, solvent B로 methanol를 사용하여 grad-

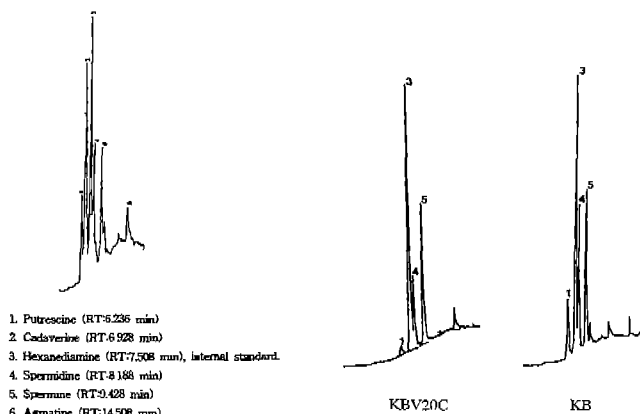


Fig. 1. Chromatogram of benzoylated polyamine in multidrug resistant KB cells.

ient elution(0-7 분까지 35-65% B, 7-13분까지 65-80% B, 13-18분까지 80% B, 18-24분까지 80-100% B, 24-34분까지 100% B, 34-39분까지 100-35% B, 39-49분까지 35% B)을 하였다. 벤조일화된 polyamine은 UV detector를 사용하여 254 nm에서 검출하였으며 표준품을 사용한 chromatogram은 Fig. 1과 같다.

통계적 유의성 검정

유의 수준 α 를 0.05로 채택했으며 통계 처리는 one-way ANOVA와 paired T-test를 사용하였다.

결 과

다제내성 세포의 항암제에 대한 내성

다제내성세포로 알려진 KBV20C와 KB7D 세포가 KB와 비교하여 세대시간에서 차이가 있는지 또한 항암제에 대해서는 어느정도 내성을 갖고 있는지를 측정하였다. KB, KBV20C, KB7D 세포의 세대시간은 각각 20 hr, 24 hr, 16 hr이었으며 다제내성을 나타내는 KBV20C는 모세포인 KB 보다 생장이 느리지만 KB7D는 오히려 더 빨리 성장하였다. 이들 세포들의 여러 항암제에 대한 감수성 실험치로부터 IC₅₀ 값을 측정한 결과 vincristine에 대한 내성에서는 Pgp-MDR 세포인 KBV20C는 KB(IC₅₀: 2.97 nM/ml)의 160.9배, MRP-MDR 세포인 KB7D는 25.3배 높은 IC₅₀ 값을 갖고 있었다(Table I). 또한 etoposide에 대한 내성에서는 KB(IC₅₀: 0.97 $\mu\text{M}/\text{ml}$)에 비해서 KBV20C는 7.3배, KB7D는 12.4배가 높았다. Colchicine에 대한 내성에서는 KB(IC₅₀: 7.0 nM/ml)에 비해서 KBV20C는 51.9배, KB7D는 12.1배 높은 IC₅₀ 값을 나타내어 KBV20C와 KB7D 세포 모두 높은 약제 내성을 나타냄을 확인하였다.

다제내성 세포에서의 Polyamine 함량 측정

다제내성을 나타내는 세포의 성장율이 모세포인 KB와 차이가 있고 성장에는 polyamine이 다량 요구되므로 이들

Table I. IC₅₀ values of multidrug resistant cells on various drugs

Chemical	Cell line	KB	KB7D	KBV20C
Vincristine, nM/ml		2.97 (1) ^a	75.0 (25.3)	477.9 (160.9)
Etoposide, μM/ml		6.9 (1)	85.7 (12.4)	50.6 (7.3)
Colchicine, μM/ml		7.0 (1)	84.8 (12.1)	363.1 (51.9)

^anumbers represent mean concentration (-fold) values as compared to KB.

세포들간에 polyamine 함량에 차이가 있는지를 측정하였다. KB, KBV20C, KB7D에서는 spermine의 함량에서는 큰 차이가 나타나지 않았으나 spermidine 함량에서는 다제내성을 나타내는 KBV20C와 KB7D에서는 각각 KB세포의 spermidine 수준치의 59% 및 57% 수준을 나타내었다. 그러나 putrescine 함량에서는 다제내성세포에서 현저히 낮은 수준을 나타내어 KBV20C는 KB의 5.1%, KB7D는 23.3%의 매우 낮은 수준이 검출되었다(Table II).

[¹⁴C]-putrescine uptake 측정

Spermidine과 putrescine의 함량이 낮은 것이 putrescine uptake의 결함때문 인지 또는 생합성과정에서 결함이 있는지를 규명하기 위해 먼저 putrescine uptake 실험을 실시하였다. 그러나 KB, KBV20C, KB7D 세포에서 ¹⁴C-putrescine uptake는 각각 mg protein 당 482.6±91.45, 515.9±53, 502.6±36 pmol으로 큰 차이가 없었다(data not shown).

Polyamine 합성억제제에 의한 다제내성세포의 성장억제

다제내성 세포에서 polyamine함량이 KB에 함유된 spermidine 량의 57-59% 정도였고 putrescine 함량은 KBV20C에서는 KB의 5.1%, KB7D에서는 KB의 23.3%의 낮은 수준을 나타내었지만 polyamine의 uptake에서는 차이가 없었으므로 polyamine 합성과정에 결함이 있는 것으로 추정되었다. 따라서 spermine을 합성하는 두 경로(Fig. 4) 중에서의 한 경로에 결함이 있을 때에 다른 합성경로를 차단함으로써 성장을 보다 효과적으로 차단할수 있을것이다. Polyamine 생합성과정에서 속도제한 단계로 작용하는 ODC와 SAMDC 효소 활성을 억제하는 diaminopropane(DAP)와 MGBG를 이용하여 다제내성세포의 성장억제 정도를 측정

Table II. Polyamine concentration in multidrug resistant cancer cells (단위: nmol/mg protein)

Cell line	Polyamine	Putrescine	Spermidine	Spermine
KB		31.3 (1) ^a	30.6 (1)	31.9 (1)
KBV20C		1.6±0.5 (0.05)	18±4.6 (0.59)	32.3±7.0 (1.01)
KB7D		7.3±3.88 (0.23)	17.4±6.8 (0.57)	26.5±12.3 (0.83)

The results were mean±S.D of 4 experiments. ^anumbers represent mean concentration (-fold) values as compared to KB.

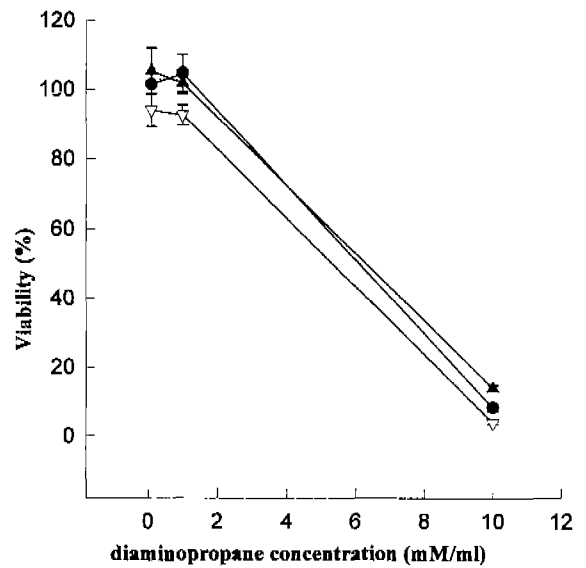


Fig. 2. The resistance levels of several cancer cell lines on diaminopropane. Viability was determined by methylene blue cell staining method. The vertical bar represents mean±S.D of 4 experiments. ● KB, ▽ KBV20C, ▲ KB7D.

하였다. KB 세포는 DAP에 대해 IC₅₀ 값이 6.1 mM/ml이었으나 KBV20C는 KB 세포보다 0.87배 낮았으며, KB7D는 KB 세포와 거의 같은 값을 나타내었다. 그러나 MGBG에 대해서는 KB(IC₅₀: 79.9 μM/ml)에 비해서 다제내성을 나타내는 세포가 오히려 더 민감하여 KBV20C는 KB 세포의 0.69배, KB7D는 0.61배 낮은 IC₅₀ 값을 나타내었다(Fig. 3). 즉 다제내성세포는 DAP 보다는 MGBG에 의해 더 민감하

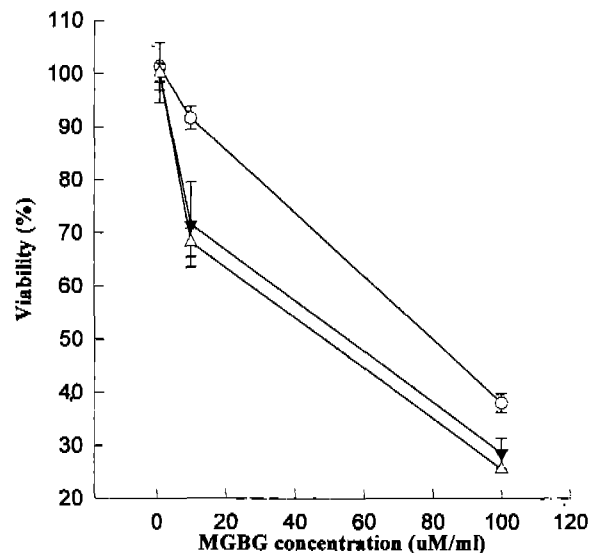


Fig. 3. The resistance levels of several cancer cell lines on MGBG. Viability was determined by methylene blue cell staining method. The vertical bar represents mean±S.D of 4 experiments. ○ KB, △ KB7D, ▼ KBV20C.

계 성장이 억제되었다.

고 찰

본 실험은 항암제에 민감한 세포와 내성을 갖는 암세포 주에서 polyamine의 함량과 그 대사활성에 관한 특성을 측정하여 다제내성을 억제 할 수 있는 방법을 찾고자 하였다.

본 실험 결과 다제내성을 나타내는 세포간에 성장속도에 차이가 있었으며 Pgp-MDR을 나타내는 KBV20C는 모세포인 KB와 유사한 성장 속도를 나타내는데 비해 MRP-MDR을 나타내는 KB7D는 매우 빠른 성장 속도를 나타내고 있었다. 또한 이들세포의 유래과정에서 예상할수 있듯이 Pgp-MDR cell은 vincristine과 colchicine에 매우 높은 내성을 갖고 있었고 MRP-MDR cell line은 etoposide에 대해서 높은 내성을 나타내었다. 이들 다제내성세포는 Pgp와 MRP에 대해서 직접적인 기질로 사용되는 물질이 아닌 항암제에 대해서도 높은 내성을 나타내었다. 즉 KBV20C는 etoposide에 대해서, KB7D는 vincristine과 colchicine에 대해서 KB 보다 높은 내성을 나타내었다.

Polyamine은 생체내에서 고농도로 존재하고 있지만 polyamine 대사중간체인 putrescine, spermidine 및 최종산물인 spermine이 어떤 역할을 하는지는 아직도 규명되지 않고 있다. Polyamine uptake 실험에서 putrescine과 spermidine이 주로 사용되고 있으나 spermine이 사용되지 않는 이유는 spermine이 너무 강한(+) charge를 갖고 있어서 (-) charge를 갖고 있는 막(Membrane) 구조물과 강하게 부착되어 있기 때문이다. 또한 인간 백혈병 암세포 K562에서 putrescine과 spermidine의 uptake는 큰 차이가 없었으므로 (Khan등, 1994) 본 실험에서도 putrescine의 uptake만을 측정하였다. Putrescine uptake는 다제내성을 나타내지 않는 세포나 다제내성을 나타내는 세포 모두에서 같은 수준이었으며 이것은 다제내성세포에서 polyamine transporter 기능이 모세포인 KB와 같음을 시사하고 있다.

다제내성 세포에서 putrescine 및 spermidine 함량이 약제내성을 나타내지 않는 모세포보다 낮았으나 putrescine uptake 되는 양은 다제내성을 나타내는 세포나 모세포 모두에서 비슷한 수준이었으므로 다제내성세포에서 putrescine과 spermidine 수준이 낮은 것은 polyamine 합성과정에 결함이 있기 때문인 것으로 추정된다. 왜냐하면 다제내성을 나타내는 인간 백혈병세포(K 562)에서 spermine의 함량은 다제내성을 나타내지 않는 모세포와 같았지만 putrescine 함량은 낮았으며 [¹⁴C] putrescine이 [¹⁴C] spermidine 및 [¹⁴C] spermine으로 전환되는 속도도 매우 낮았기 때문이다. 특히 다제내성을 나타내지 않는 세포에서는 [¹⁴C] spermidine이 4시간 후 spermine으로 전환되었지만 다제내성세포에서는 16시간 이후에 전환되었기 때문이다(Khan 등, 1994).

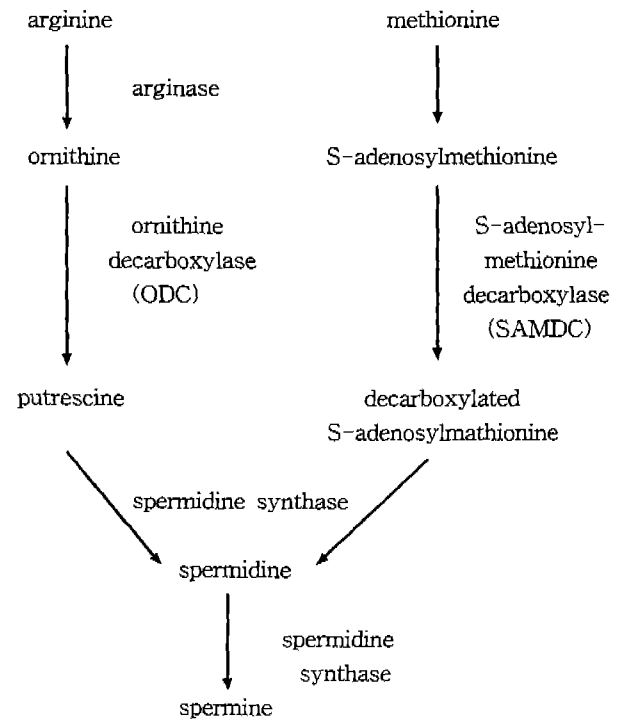


Fig. 4. The pathway of polyamine biosynthesis (Janne과 Williams-Ashman, 1971).

Polyamine은 2가지 경로를 통해 합성되고 있다(Fig. 4). 첫째 경로는 Arginine으로부터 ornithine, putrescine을 거쳐 합성되는 경로이며 이 경로에서는 ODC가 속도제한 단계로 작용하고 ODC는 DAP에 의해 억제된다. 최근 다제내성 세포에서 ODC 활성이 증가하여 다제내성을 측정하는 척도로 이용되고 있으나(Assaraf 등, 1994) ODC 활성의 증가가 putrescine 및 spermidine의 증가를 증가시키지는 밝혀지지 않았다. 다제내성세포에서 ODC 활성이 높음에도 불구하고 putrescine의 함량이 낮은 것은 일단 생성된 putrescine이 다른 대사산물로 전환되거나 분비되기 때문으로 추정된다. 둘째 경로는 Methionine으로부터 S-adenosyl methionine, decarboxylated S-adenosyl methionine을 거쳐 합성되는 경로이며 이 경로에서는 SAMDC가 속도제한 단계로 작용하고 있으며 이 SAMDC 효소는 MGBG에 의해 억제된다(Tabor와 Tabor, 1984). ODC 활성 억제제인 DAP 그 자체에 대해서는 KB, KBV20C, KB7D 모두에서 큰 차이를 나타내지 않았으나 SAMDC 억제제인 MGBG는 다제내성 세포에 더 감수성이 높았다. 즉 다제내성 세포의 spermine 함량은 모세포의 spermine 함량과 같았지만 모세포인 KB 세포는 putrescine의 함량이 높기 때문에 MGBG에 의해서 성장이 크게 억제되지 않았으나 다제내성세포는 putrescine의 양이 매우 적기 때문에 spermidine의 생성을 억제하는 MGBG에 의해 더욱 더 민감하게 된 것으로 사료된다. 이런 실험결과는 대사중간체들이 생체활성을 유지하는데 매우

중요한 역할을 하고 있음을 의미하고 있으며 polyamine 억제제인 MGBG가 다제내성세포의 성장을 억제하는데 선택적으로 사용될수 있음을 시사하고 있다. 그러나 MGBG 자체는 매우 독성이 강하기 때문에 일부 암에서만 제한적으로 사용되고 있으므로 앞으로의 연구는 *in vivo*에서 세포 독성을 최소화하면서 다제내성을 극복할수 있는 MGBG의 농도를 결정하여야 할 것이다.

결론

1. 다제내성세포 KBV20C와 KB7D에서 putrescine 함량은 약제내성을 나타내지 않는 세포(KB)에 존재하는 putrescine양의 5.1%와 23.3%를 함유하고 있었다.

2. 다제내성세포와 약제내성을 나타내지 않는 세포에서 [¹⁴C]-putrescine의 uptake 차이는 유의성 있는 변화를 나타내지 않았다.

3. Polyamine 합성 억제제인 DAP에 의한 생장억제는 다제내성세포와 약제내성을 나타내지 않는 세포간에 큰 차이점을 나타내지 않았으나 MGBG는 약제내성을 나타내지 않는 세포보다 다제내성세포의 성장을 더 억제하였다.

감사의 말씀

본 연구는 교육부 기초과학연구비(BSRI-95-4417)의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고 문헌

Assaraf, Y. G., Drori, S., Bachrach, U. and Shaugan-Labay, V. (1994). Determination of multidrug resistance in cultured mammalian cells using ornithine decarboxylase activity. *Anal. Biochem.* **216**, 97-109.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Callen, D. F., Baker, E., Simmers, R. N., Seshardri, R. and Roninson, I. B. (1987). Localization of the human multiple drug resistance gene, MDR, to 7q21.1. *Hum. Genet.* **77**, 142-144.

Chen, C., Clark, D., Ueda, K., Pastan, I., Gottesman, M. M. and Roninson, I. B. (1990). Genomic organization of the human multidrug resistance (MDR1) gene and origin of P-glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **265**, 506-514.

Chen, H. X., Uwe, B., Armin, H., Xin, G. and Cheng, Y. C. (1993). BIBW 22, a dipyrindamole analogue, acts as a bifunctional modulator on tumor cells by influencing both P-glycoprotein and nucleoside transport. *Cancer Res.* **53**, 1974-1977.

Cole, S. P. C., Chanda, E. R., Dicke, F. P., Gerlach, J. H. and Miski, S. E. L. (1991). Non-P-glycoprotein-mediated mul-

tidrug resistance in a small cell lung cancer cell line: evidence for decreased susceptibility to drug-induced DNA damage and reduced levels of topoisomerase II. *Cancer Res.* **51**, 3345-3352.

Cole, S. P. C. and Deeley, R. G. (1993). Multidrug resistance-associated protein: sequence correction. *Science* (Washington DC), **260**, 879.

Gaj, C. L., Anyanwutaku, I. O., Cole, S. C., Chang Y, Cheng Y. C. (1995). Reversal of multidrug resistance associated protein mediated multidrug resistance in a human carcinoma cell line by the V-enantiomer of verapamil. Proceedings of the American Association for Cancer Research. **36**, 346.

Gottesman, M. M. and Pastan, I. (1988). The multidrug transporter: a double edged sword. *J. Biol. Chem.* **263**, 12163-12166.

Janne, J., Poso, H. and Raina, A. (1978). Polyamines in rapid growth and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **473**, 241-293.

Janne, J., Williams-Ashman, H. G. (1971). On the purification of L-ornithine decarboxylase from rat prostate and thiol compounds on the enzyme. *J. Biol. Chem.* **246**, 1725-1732.

Kadmon, D. (1992). Chemoprevention in prostate cancer: the role of difluoro methylornithine (DFMO). *J. Cell. Biochem. Suppl.* **16H**, 122-127.

Khan, N. A., Quemener, V., Seiler, N. and Moulinoux, J. P. (1990). Mechanism of spermidine uptake in cultured mammalian cells and its inhibition by some polyamine analogues. *Pathobiol.* **58**, 172-178.

Khan, N. A., Olivier, F., Rene, H., Renee, F. and Jacoues, P. M. (1994). The transport and metabolism of polyamines in wild and multidrug resistant human leukemia (K 562) cells. *Leukemia Res.* **18**, 283-291.

Moulinoux, J. Ph., Quemener, V., and Khan, N. A. (1991). Biological significance of circulating polyamines in oncology. *Cell. Molec. Biol.* **37**, 773.

Ozols, R. F. (1991). Molecular and clinical Advances in Anticancer Drug Resistance. Kluwer Academic Publishers, 37-56, 151-170.

Pegg, A. E. (1988). Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy. *Cancer Res.* **48**, 759-774.

Redmond, J. W. and Tseng, A. (1979). High-pressure liquid chromatographic determination of putrescine, cadaverine, spermidine, and spermine. *J. Chromatogr.* **170**, 479-481.

Regnass, U., Caravatti, G., Mett, H., Schneider, P., Muller, M., Matter, A., Vertino, P. and Porter, C. W. (1992). New S-adenosylmethionine decarboxylase inhibitors with potent antitumor activity. *Cancer Res.* **52**, 4712-4718.

Russel, D. H. and Snyder, S. H. (1969). Amine synthesis in regenerating rat liver: extremely rapid turnover of ornithine decarboxylase. *Mol. Pharmacol.* **5**, 253-262.

Srinivasan, P. R., Tonin, P. N., Wensing, E. J., Lewis, W. H. (1987). The gene for ornithine decarboxylase is co-amplified in hydroxyurea-resistant hamster cells. *J. Biol. Chem.* **262**, 12871-12878.

Tabor, C. W. and Tabor, H. (1984). Polyamines. *Ann. Rev. Biochem.* **53**, 749-790.

- Tamori, A., Nishiguchi, S., Kuroki, T., Seki, S., Kobayashi, K., Kinoshita, H. and Otani, S. (1994). Relationship of ornithine decarboxylase activity and histological findings in human hepatocellular carcinoma. *Hepatol.* **20**, 1179-1186.
- Tonin, P. N., Yeger, H., Stallings, R. L., Srinivasan, P. R. and Lewis, W. H. (1989). Amplification of N-myc and ornithine decarboxylase genes in human neuroblastoma and hydroxyurea-resistant hamster cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1117-1121.
- Ueda, K., Cardarelli, C., Gottesman, M. M. and Pastan, I. (1987). Expression of a full-length cDNA for the human *mdr1* gene confers resistance to colchicine, doxorubicin and vinblastine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1595-1599.