

인체대장암 세포에서 후성적 유전자 불활성화 저해제와 5-Fluorouracil의 병용효과분석

김미영 · 손정규 · 이숙경 · 구효정[#]

가톨릭대학교 의과대학 생명의과학과

(Received November 7, 2005; Revised December 6, 2005)

Combinatorial Effect of 5-FU and Epigenetic Silencing Repressors in Human Colorectal Cancer Cells

Mi-Young Kim, Jung-Kyu Son, Suk-Kyeong Lee and Hyo-Jeong Kuh[#]

Dept. of Biomedical Sciences, College of Medicine, The Catholic Univ. of Korea, Seoul 137-701, Korea

Abstract — Low sensitivity to anticancer drugs such as 5-fluorouracil (5-FU) has been associated with decreased expression of genes involved in cell proliferation, apoptosis and metastasis. Recently, it has been shown that the expression levels of some of these genes are reduced by transcription inhibition due to epigenetic silencing on CpG islands. Therefore, epigenetic therapy has been proposed, where epigenetic silencing is repressed with DNA methyltransferase (DNMT) inhibitors and histone deacetylase (HDAC) inhibitors alone or in combination with other chemotherapeutic agents. The aim of our study was to evaluate the combination effect of 5-FU and its association with the status of epigenetic silencing using methylation-specific PCR of p14^{ARF} when given with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC), a DNMT inhibitor and depsipeptide, an HDAC inhibitor in DLD-1 human colorectal cancer cells. The combination of 5-aza-dC with depsipeptide showed a synergism and induced unmethylation of p14^{ARF}. However, triplet combination of 5-aza-dC/depsipeptide and 5-FU resulted in antagonistic effects and abrogated unmethylation of p14^{ARF}. These results suggest that unfavorable interaction of 5-aza-dC/depsipeptide with 5-FU in DLD-1 cells may be related with the failure in repression of epigenetic silencing, which warrants further investigation.

Keywords □ 5-fluorouracil, 5-aza-2'-deoxycytidine, depsipeptide, MS-PCR, p14^{ARF}, combination

고형암에서 가장 널리 쓰여 온 항암제 중 하나인 5-fluorouracil (5-FU)는 위암, 결직장암 및 췌장암에서 20~35%의 반응률을 보이며 다른 항암제와의 병용(예, cisplatin, mitomycin C, DTIC, methotrexate, doxorubicin) 투여 시에도 단독 투여 시 보다 뚜렷한 효능의 차이를 보이지 않는다고 알려져 있다.^{1,2)} 이렇게 5-FU에 대한 반응률이 낮은 원인에 대해 많은 연구가 진행되었으며, 표적효소 thymidylate synthase(TS)의 과발현³⁾과 약물의 대사 관련효소인 dihydropyrimidine dehydrogenase(DPD)의 과발현⁴⁾ 뿐만 아니라 DNA 손상복구와 관련된 hMLH1의 결핍⁵⁾과 세포주기 조절(p53, p21, cyclin E, cyclin D)^{6,7)} 및 세포사멸(Bcl-2, Bcl-XL, Bax, Death receptor)에 관련된 인자들의 변화⁶⁾ 등이

감수성 저하와 관련된 것으로 보고되었다. 또한 대장암세포에서 5-FU에 대한 내성유도에는 세포골격의 구조와 재배열, 세포 유착, 세포와 세포 접촉 및 세포와 기질상호작용 등과 연관된 인자들의 발현 감소가 역할을 한다고 보고되었다.⁸⁾ 한편 이렇게 발현이 감소된 인자들 중 일부(S100A4, BNIP3)는 후성적 유전자 불활성화(epigenetic gene silencing)에 의해 유발된다고 보고되었다.^{9,10)}

후성적 유전자 불활성화는 유전자의 구조적 변화(결손 또는 변이)를 동반하지 않은 전사 불활성화(transcriptional inactivation)에 의한 유전자 발현 저하를 말한다.¹¹⁾ 이러한 유전자 불활성화는 DNA의 메틸화(methylation)와 히스톤의 탈아세틸화(deacetylation)가 전사개시의 초기단계를 억제하여 유도되는 것으로 알려져 있다.¹²⁾ DNA의 메틸화는 DNA methyltransferase에 의한 CpG island의 메틸화를 통해 일어나고 히스톤의 탈아세틸화는 histone deacetylase가 히스톤의 아미노 말단 라이신 잔기

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-590-2422 (팩스) 02-592-2421
(E-mail) hkuh@catholic.ac.kr

(lysine residues)의 탈아세틸화를 유발함으로써 일어난다.¹³⁾

후성적 유전자 불활성화가 종양의 발생 및 성장에 연관된 세포주기 관련 인자(p16^{Ink4a}, p14^{ARF}), 세포흡착 관련인자(E-cadherin), 세포사멸 관련인자(death-associated protein kinase, caspase-8)들의 유전자에 빈발하는 것으로 알려지면서 이 과정을 억제하는 약물들이 항암제로 개발되고 있으며 기존의 세포독성 항암제와의 병용효과 또한 크게 기대되고 있다. Proapoptotic member인 BNIP3와 침습 및 전이와 연관된 S1004도 대장암세포의 5-FU에 대한 내성과 관련되어 있다고 보고된 바 있는데^{8,14)} 이 두 유전자들은 DLD-1 세포주에서 후성적 유전자 불활성화에 의해 발현이 저하되어 있고 5-aza-2'-deoxycytidine(DAC, decitabine, 5-aza-dC) 등과 같은 메틸화 저해제에 의해 유전자 불활성화가 해소되어 유전자 발현이 회복된다고 보고되었다.^{9,10)}

따라서, 본 연구에서는 인체 대장암세포주인 DLD-1에서 5-FU의 항증식 효과에 미치는 유전자 불활성화 해소(탈메틸화+탈아세틸화 저해)의 영향을 평가해보았다. 우선 탈메틸화제로서 5-aza-dC와 탈아세틸화 저해제로서 depsipeptide의 병용에 의한 항증식 효과 및 유전자 불활성화 해소 효과를 알아보았으며, 이 두 약물을 5-FU와 병용 시 유도되는 항증식 효과의 상호 작용 및 이와 유전자 불활성화 해소 탈메틸화와의 상관성을 평가하였다. 후성적 유전자 불활성화 해소의 표지자(마커)로서 DLD-1 세포에서 메틸화되어 있다고 알려진 세포주기 조절 단백질 p14^{ARF} 유전자의 탈메틸화를 메틸화 특이적 중합효소 연쇄반응(methylation-specific PCR, MSP)을 이용하여 측정하였다.

실험 방법

시약 및 재료

5-Aza-dC과 5-fluorouracil(5-FU)은 Sigma Chemical(St. Louis, MO)에서 구입하였고 depsipeptide(FR901228)은 미국 오하이오 주립대학교의 Dr. Kenneth K. Chan에게서 제공 받았다. 5-Aza-dC은 아세트산과 증류수 1:1(v/v)로 용해시키고, 5-FU와 depsipeptide는 DMSO에 용해시킨 후, 배지로 적절히 희석하여 사용하였다. 세포배양에 사용된 FBS(fetal bovine serum)는 JBI(Welgene Inc., Sugar land, TX)에서 구입하였다. Methanethiosulfonate(MTS)는 Promega(Madison, WI)로부터 구입하였고, 기타 시약은 Sigma Chemical(St. Louis, MO) 또는 Amresco (Solon, OH)에서 구입하여 사용하였다.

세포 배양

인체 대장암세포주 DLD-1은 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받았다. DLD-1 세포주는 10% FBS, HEPES (4.776 g/l), sodium pyruvate(0.11 g/l), penicillin G(0.06 g/l),

NaHCO₃(2 g/l), streptomycin sulfate(0.1 g/l)이 함유된 RPMI1640으로 배양하였다. 배양기에는 5% CO₂와 95% 공기를 공급하였고, 온도 37°C, 습도 95%가 유지되도록 하였다. 세포의 성장이 합류상태(confluence)에 이르면 trypsin-EDTA (0.25% w/v)을 사용하여 계대배양 해주었다.

항증식 효과 측정

DLD-1 세포를 96-well plate에 500 cells/well의 밀도로 접종하여 24시간 배양 후, 약물을 포함한 배지에 48시간 또는 96시간 동안 노출시켰다. 약물 처리 시, DMSO 농도는 세포의 성장에 영향을 미치지 않는 0.2% 이하로 유지시켰다. 약물 노출 직후 MTS(333 µg/ml) 및 phenazine methosulfate(PMS)(25 µM)이 포함된 배지에 4시간 동안 반응시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하여 세포성장율을 결정하였다.

Bisulfite 처리와 메틸화 특이적 중합효소 연쇄반응¹⁵⁾

메틸화 특이적 중합효소 연쇄반응을 위한 primer는 문헌에 보고된 것을 이용하였는데 인체의 p14^{ARF} 유전자(GeneBank sequence number L41934)의 promoter 부위 중 일부를 증폭하도록 설계한 것을 사용하였다.¹⁶⁾ Primer는 bisulfite modification 후 메틸화 DNA와 탈메틸화 DNA에 각각 선택적으로 결합할 수 있는 primer의 염기 서열은 다음과 같았다. 탈메틸화된 사이토신(cytosine)을 구별하기 위한 primer 쌍은 p14-U(sense: 5'-TTTTTGGTGTAAAGGGTGGTGTAGT-3' antisense: 5'-CACAAAAA CCCTCACTCACAAACAA-3')이며 증폭되는 생성물의 크기는 132 bp이고, 메틸화된 사이토신을 구별하기 위한 primer 쌍은 p14-M(sense: 5'-GTGTTA AAGGGCGGCGTAG-3' antisense: 5'-AAAACCCTCACTCGCGACGA-3')를 사용하며 증폭되는 생성물의 크기는 122 bp이 되도록 하였다. EZ DNA methylation kit(ZYMO Research, CA)를 사용한 DNA의 bisulfite 처리과정을 간략히 서술하면 다음과 같다. M-dilution buffer로 희석한 후 CT conversion reagent로 16시간 동안 50°C에서 반응시켰다. 그 후, M-binding buffer와 M-desulphonation buffer를 첨가, 10분 동안 반응시킨 후 컬럼을 통해 DNA를 정제하였다. 이렇게 준비된 DNA를 I-master mix PCR kit(Intron biotechnology, Sungnam, Korea)을 이용하여 26 µl의 1× PCR buffer(dNTP 250 mM씩, primer 5 pM씩, modified DNA 50 ng, 1.5 mM MgCl₂, Taq polymerase 2.5 U)로 중합효소 연쇄반응(Takara, Otsu, Japan)을 수행하였다. 반응 조건은 탈메틸화 밴드 증폭 시 94°C에서 5분 동안 초기 변성시킨 후, 94°C 1분, 63°C 1분, 72°C 1분 주기로 40회 시행하였으며, 72°C에서 10분 최종 연장 반응시켰다. 메틸화 밴드 증폭 시 94°C에서 4분 동안 초기 변성시킨 후, 94°C 30초, 67°C 30초, 72°C 30초를 반응시키고 이 과정을 28회 반복, 그 후 72°C에서 7분간 최종 반응시켜 중

결하였다. 탈메틸화 밴드의 양성대조군으로서 HL60 세포로부터 DNA를 추출하여 이용하였다. 이렇게 반응시켜 얻은 결과물은 2% agarose(Seakem LE Agarose) gel에서 전기영동한 후, ethidium bromide로 염색하여 bp(122~132)를 확인하였다.

데이터 분석

세포성장 억제율은 Eq. 1을 이용하여 구하였으며 이 결과에 Emax 모델(Eq. 2)를 적용하여 각 약물의 항증식 효과에 대한 IC₅₀ 및 저항분율 등의 파라미터를 산출하였다.

$$\% \text{ Growth} = \left(\frac{\text{mean absorbance of treated cells}}{\text{mean absorbance of control cells}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\% \text{ Growth} = (100 - R) \times \left(1 - \frac{[D]^m}{K_d^m + [D]^m} \right) + R \quad (\text{Eq. 2})$$

여기에서 [D]는 약물 농도, K_d는 세포증식을 대조군의 50%로 감소시키는 약물 농도(i.e. IC₅₀), m은 Hill-type coefficient 및 R은 저항 분율(residual unaffected fraction, the resistance fraction)이며 모델 파라미터는 SigmaPlot(SYSTAT software Inc, Richmond, CA)을 이용하여 산출하였다.

두 약물의 병용효과는 병용지수(combination index, CIx) 파라미터를(예, CI₅₀ at 50% 저해율) 산출하며 평가하였다(Eq. 3). CI가 0.8 이하일 경우 상승효과(synergism), 1.2 이상일 경우 길항 효과(antagonism), 0.8과 1.2 사이일 경우 상가효과(additive effect)로 구분하였다.

$$CI_x = \frac{(D)_A}{(D_x)_A} + \frac{(D)_B}{(D_x)_B} + \alpha \frac{(D)_A(D)_B}{(D_x)_A(D_x)_B} \quad (\text{Eq. 3})$$

여기에서 x는 특정수준의 항증식 효과(예, 50% 또는 80% 저해율), (D_x)_A과 (D_x)_B는 A 또는 B약물의 단독투여 시 x% 효과를 가져오는 A 또는 B의 약물농도, (D)_A와 (D)_B는 병용 시 x% 효과를 가져오는 A 또는 B 각각의 약물농도이며 α는 두 약물 간 배타적 관계일 경우 0, 비배타적 관계일 경우 1로 계산한다.¹⁷⁾ 본 연구에서는 배타적 관계로 계산하였다.

결 과

5-Aza-dC, depsipeptide, 5-FU의 단독 투여 시 항증식 효과

대장암세포주인 DLD-1에서 5-aza-dC, depsipeptide, 5-FU 각각의 항증식 활성을 측정하였다(Fig. 1). 5-aza-dC 25 μM 이상 노출 시 배지 내 용해보조제로 사용된 아세트산의 비율이 높아져 세포증식에 영향을 미치므로 그 이상의 농도에서는 활성을 측정하지 않았다. 5-aza-dC 25 μM에 48시간 및 96시간 노출시킨 경우 대조군에 비해 증식률은 각각 77.7%와 36.5%로 관찰되었

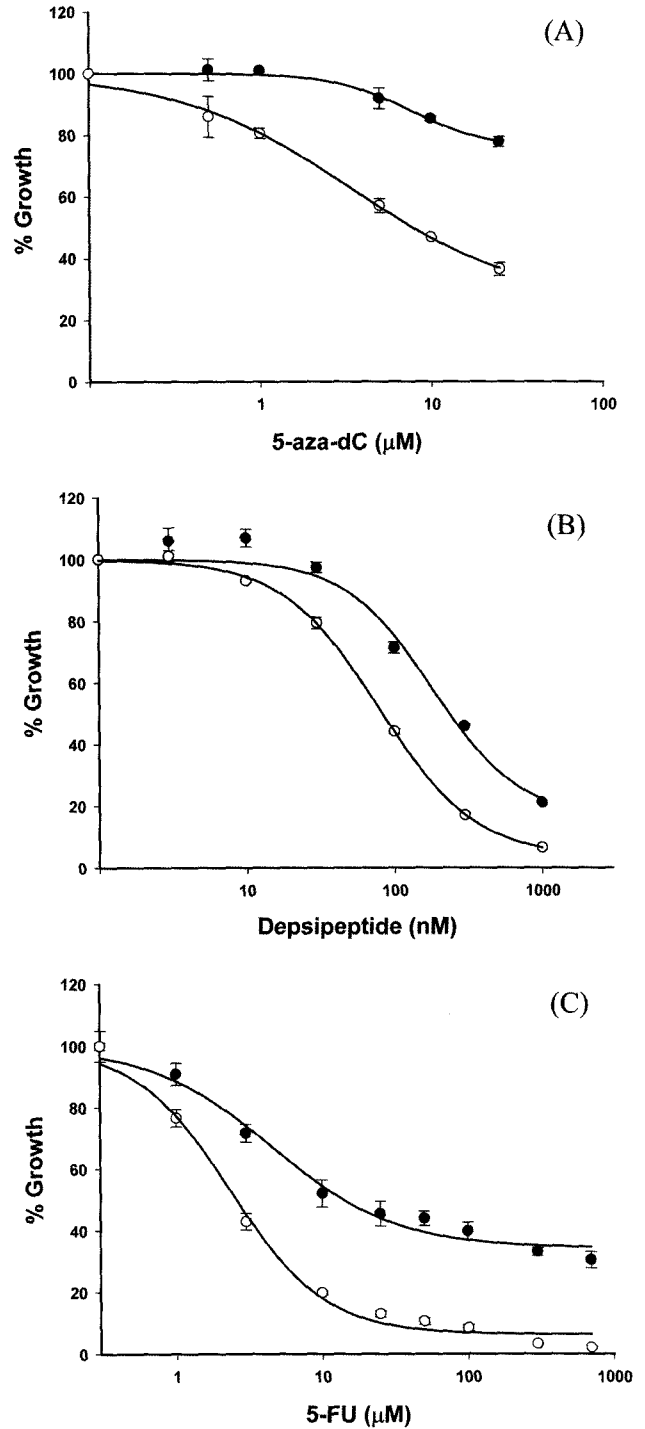


Fig. 1 - Representative dose-response curves of 5-aza-dC (A), depsipeptide (B) and 5-FU (C) in DLD-1 cells. Cells were exposed to each agent for 48 hr (●) and 96 hr (○) and relative cell growth was determined using MTS assay.

다. 따라서 5-aza-dC 단독 투여 시 48시간 노출 시의 IC₅₀은 구할 수 없었고(Fig. 1A), 96시간 노출 경우의 IC₅₀은 7.8 μM로 산

출되었다. Depsipeptide는 48시간과 96시간 노출의 IC₅₀이 각각 234 nM과 83.3 nM로 나타나 노출시간 2배 연장에 따라 IC₅₀이 2.8배 감소되었다(Fig. 1B). 5-FU의 항증식 효과는 48시간 및 96 시간 노출 경우 각각 14.1 μM과 2.6 μM의 IC₅₀을 나타내어 투여 시간 2배 연장에 따라 IC₅₀은 5.4배 감소하였으며 48시간 노출 시 약물농도가 700 μM까지 증가되어도 반응하지 않는 저항 분율 34.3%가 96시간 노출 시 6.3%로 감소되어 노출시간 증가에 따라 항증식 활성이 크게 증가됨을 관찰하였다(Fig. 1C).

5-Aza-dC와 depsipeptide의 병용항암효과

5-aza-dC와 depsipeptide의 농도를 각각 10 μM와 100 nM까지 증가시키면서 이들 약물간의 병용효과를 살펴보았다. 5-aza-dC

와 depsipeptide를 48시간 병용 투여하였을 경우에는 최고농도 (10 μM과 100 nM)까지의 범위에서 50% 이하의 성장 억제율을 나타내어 CI₅₀(combination index at 50%)을 구할 수 없었다(Fig. 2A). 두 약물을 병용하여 96시간 투여 경우에는 상승적 항증식 효과(synergism)를 관찰할 수 있었다. 즉, 5-aza-dC 1 μM과 depsipeptide 30 nM 병용 투여 시 54.4%의 성장률이 관찰되었으며(Fig. 2B) 단독 투여 시 동일 성장률을 나타내는 5-aza-dC와 depsipeptide의 IC₅₀은 각각 9.0 μM과 83.3 nM이었으므로 병용 지수는 약 0.54로 산출되어 두 약물의 항증식 효과간의 상승효과를 확인하였다(Fig. 2B).

5-Aza-dC/Depsideptide와 5-FU의 병용항암효과

상승적 항증식 효과가 관찰된 5-aza-dC/depsipeptide를 5-FU

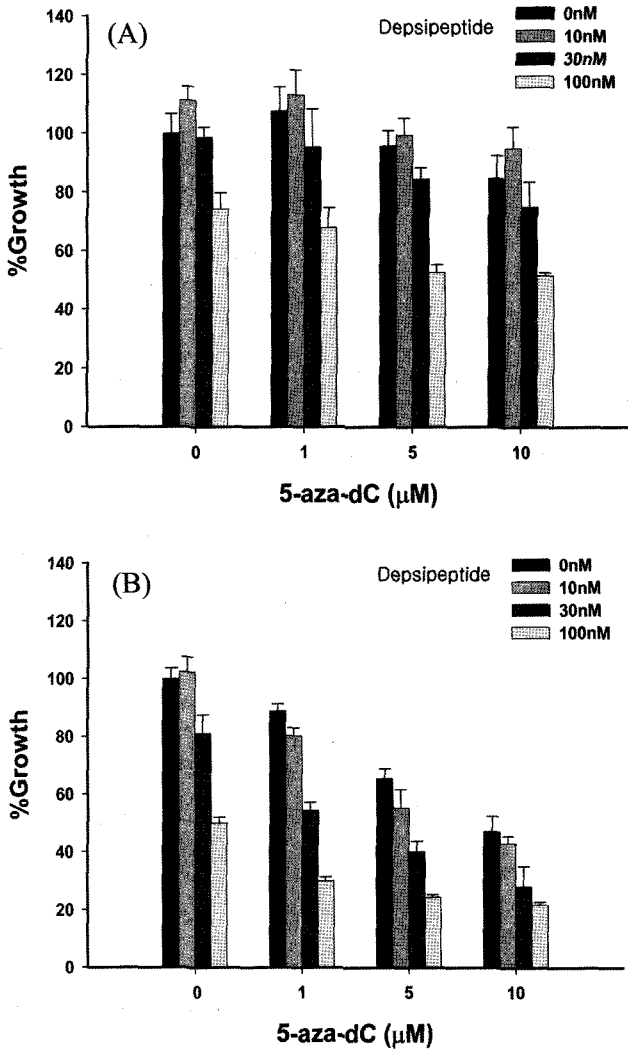


Fig. 2 – Combinatorial effects of 5-aza-dC and depsipeptide in DLD-1 cells. Cells were simultaneously exposed to 5-aza-dC and depsipeptide for 48 hr (A) and 96 hr (B). 5-aza-dC was added every 24 hr. Relative cell growth was determined by MTS assay.

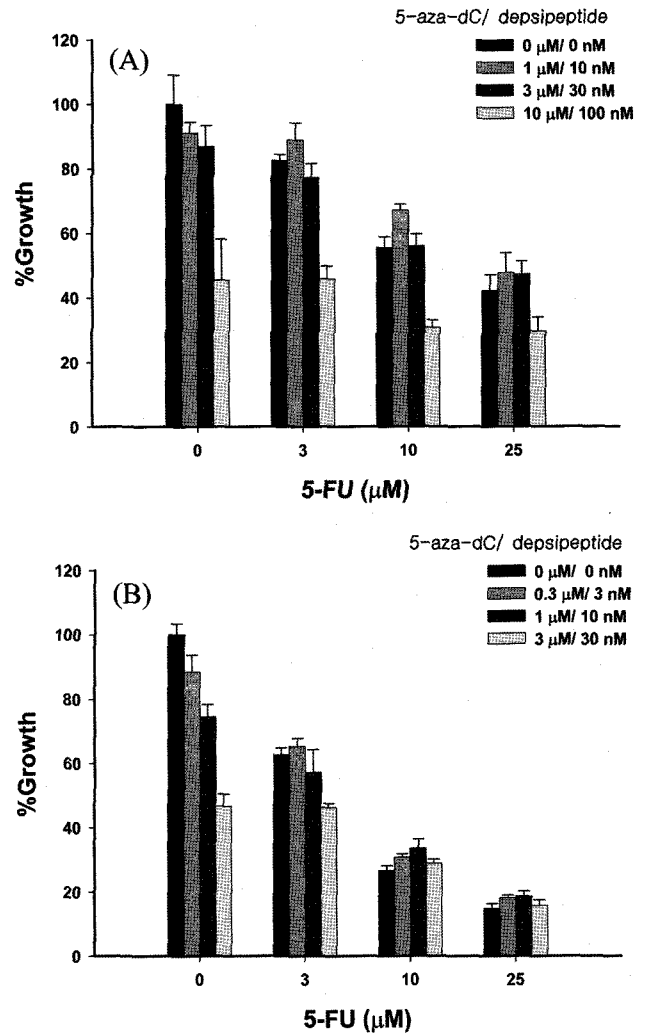


Fig. 3 – Combinatorial effects of 5-FU and 5-aza-dC/depsipeptide. Cells were exposed to each combination for 48 hr (A) and 96 hr (B). 5-aza-dC was added every 24 hr. Relative cell growth was determined by MTS assay.

와 동시 투여하여 항증식 효과의 변화를 살펴보았다. 48시간 노출의 경우에는 상가적 효과(additive effect)가 확인되었다(Fig. 3A). 즉, 5-aza-dC/depsipeptide(1 : 10) 병용의 IC₅₀은 9.0 μM/90 nM, 5-FU의 IC₅₀은 13.4 μM로 관찰되었는데, 세 약물 병용 경우의 IC₅₀은 5-aza-dC/depsipeptide(1 : 10)는 5.9 μM/59.0 nM로, 5-FU는 5.9 μM로 산출되었고, 이로부터 CI₅₀은 1.1로 계산되었다. 한편 96시간 노출의 경우에는 5-aza-dC/depsipeptide(1 : 10)의 IC₅₀은 2.7 μM/27 nM, 5-FU의 IC₅₀은 4.4 μM로 관찰되었는데, 오히려 세 약물을 병용한 경우에 IC₅₀은 5-aza-dC/ depsipeptide (1 : 10)가 2.5 μM/25 nM로, 5-FU는 2.5 μM로서 CI₅₀이 1.5로 산출되어 길항적 작용(antagonism)이 확인되었다(Fig. 3B).

p14^{ARF} 유전자 탈메틸화

후성적 유전자 불활성화 저해의 표지자로서 DLD-1 세포에서 메틸화된 p14^{ARF} 유전자의 탈메틸화 정도를 메틸화 특이적 증합 효소 연쇄반응을 이용하여 확인하였다. 약물을 투여하지 않은 DLD-1 세포의 p14^{ARF} 메틸화 밴드를 확인하였고, 5-FU를 단독으로 처리했을 경우 탈메틸화는 일어나지 않아 5-FU가 p14^{ARF}의 메틸화상태에는 영향을 주지 않는 것으로 관찰되었다(Fig. 4A). 5-aza-dC 5 μM에 96시간 동안 노출 시킨 경우에 p14^{ARF}의 탈메틸화 밴드가 관찰되었고 또한, 5-aza-dC 5 μM에 depsipeptide 50 nM를 부가한 경우에 p14^{ARF}의 탈메틸화 밴드가 관찰되어 depsipeptide가 탈메틸화에 영향을 미치지 않음을 확인하였다(Fig.

4B). 그러나 5-aza-dC 5 μM, depsipeptide 50 nM와 함께 5-FU 10 μM를 병용 투여한 경우에는 p14^{ARF} 탈메틸화 밴드가 소실되어 5-FU에 의해 p14^{ARF}의 탈메틸화가 저해되었음을 확인하였다 (Fig. 4B).

고 찰

5-FU는 널리 쓰이는 항암제 중 하나로 TS(thymidylate synthase) 효소를 저해시키고 세포내 뉴클레오타이드 생합성을 방해한다.¹⁸⁾ 고형암에서 5-FU에 대한 감수성이 감소되는 원인 중 하나는 유전자 발현 저하에 의해 일어나며, 또한 이 일부는 후성적 유전자 불활성화에 의해 유발되어진다.^{8,14)} 5-aza-dC는 DNA methyltransferase에 의한 CpG island의 메틸화를 억제하는 DNA 탈메틸화 약물로서 여러 세포주들에서 특정 유전자들의 발현을 활성화시키는 것으로 보고되었다.¹³⁾ Depsipeptide는 히스톤 탈아세틸화 저해제로서 DNA를 감싸는 chromatin을 구성하는 히스톤에서 아세틸기가 제거되는 것을 억제하여 유전자 불활성화를 저해한다.¹³⁾ 따라서 5-FU 감수성 저하를 극복하기 위한 방법의 하나로 탈메틸화제 또는 탈아세틸화 저해제 등을 이용한 유전자 불활성화 저해가 연구되고 있으며,¹⁹⁾ 본 연구에서는 인체 대장암 세포주인 DLD-1에서 5-aza-dC, depsipeptide 그리고 5-FU를 병용하였을 때 이들 약물의 항암(항증식) 활성 간의 상호 작용을 평가하였다.

5-Aza-dC, depsipeptide의 단독으로 96시간 투여 시 IC₅₀은 각각 7.8 μM, 83.4 nM로 관찰되었는데(Fig. 1), 인체 위암 세포주인 SNU-638에서는 5-aza-dC와 depsipeptide 각각의 IC₅₀ 값이 8.7배와 46.3배 낮은 0.9 μM, 1.8 nM으로 관찰되어(테이타 미세 시), DLD-1 세포가 이들 약물에 대해 상대적으로 낮은 감수성을 가짐을 알 수 있었다. 이전 연구보고에 따르면 5-aza-dC에 대한 약물 감수성 저하는 deoxycytidine kinase 발현 감소나 5-aza-dC 유도체를 비활성화 시키는 효소인 cytidine deaminase의 활성의 증가에 의해 발생한다고 보고되었다.²⁰⁾ DLD-1 또는 SNU-638에서 이러한 효소의 상대적 활성도에 대해 보고된 바가 없으므로, 이러한 감수성의 차이 규명을 위해서는 두 효소의 발현 정도와 활성을 확인하는 실험이 필요 할 것이라 생각된다. 한편 depsipeptide에 대해서도 DLD-1 세포는 SNU-638에 비해 46.3 배 낮은 감수성을 나타내었는데, 이러한 낮은 감수성은 P-glycoprotein의 발현저하와 연관되어 있을 가능성이 있다.²¹⁾ Depsipeptide가 P-glycoprotein의 기질이며 P-glycoprotein 발현 증가가 depsipeptide 내성 유도의 주된 원인이라는 보고 된 바 있고,²¹⁾ 급성 림프구아구성 백혈병 세포주들(acute lymphoblastic leukemic cell lines)에서보다 P-glycoprotein가 과발현 되어있는 정상 조혈모세포(hematopoietic progenitor cell)에서 depsipeptide에 의한 항증식 효과가 낮다고 보고되었다.²²⁾ SNU-638 세포내

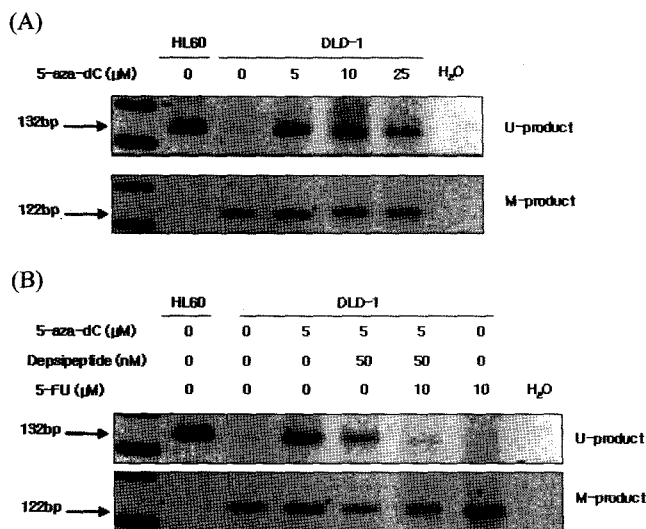


Fig. 4 – Methylation specific PCR analysis of the promoter region of p14^{ARF} in DLD-1 cells treated with 5-aza-dC alone (A) and its combination with depsipeptide and/or 5-FU (B) for 96 hr. The presence of a visible PCR product in the upper panel (U-product) and the lower panel (M-product) indicates the unmethylated and methylated promoter of p14^{ARF}, respectively. HL60 cells were used as a positive control for unmethylated p14^{ARF} promoter. Water controls for PCR reactions are also shown.

P-glycoprotein의 발현에 대해서는 보고된 바 없지만 DLD-1에서는 P-glycoprotein이 과발현²³⁾되어 있다는 보고가 있으므로 DLD-1과 SNU-638에서의 P-glycoprotein 발현 정도의 비교하고, P-glycoprotein 저해제에 의해 DLD-1 세포의 depsipeptide에 대한 감수성이 회복될 수 있는지에 대한 연구도 필요할 것이다.

인체 대장암세포주인 DLD-1에서 5-aza-dC와 depsipeptide의 96시간 병용 노출 시 병용지수 CI_{50} 은 0.5의 값으로서 뚜렷한 상승적 항증식 효과를 나타내었다(Fig. 2B). 다른 연구 결과에서도 유사한 상호 작용이 보고되었는데 즉, 유방암세포주인 MDA-MB-231와 MDA-MB-435에서 5-aza-dC와 depsipeptide를 병용 투여한 경우 상승적 항증식 효과가 관찰되었고,²⁴⁾ 이러한 상승적 약효 상호작용이 메틸화되어 있는 E-cadherin, 14-3-3 σ , tissue inhibitor of metalloproteinase 3(TIMP3)의 발현 유도과 상관성을 보인다고 보고되었다.²⁵⁾

본 연구에서는 p14^{ARF}의 탈메틸화를 측정하였는데 p14^{ARF}는 인체 대장암 환자에서 약 28% 정도 과메틸화 되어 있고, 또한 DLD-1 세포주에서 과메틸화 되어 있다고 보고된 바 있다.¹⁶⁾ 96시간 처리 시 5-aza-dC 5 μ M에서 p14^{ARF}가 탈메틸화 되는 것을 관찰할 수 있었고(Fig. 4A), 이전 연구 보고와 마찬가지로 메틸화 밴드의 소실 없이 탈메틸화 밴드가 유지됨으로써 부분적인 탈메틸화가 일어남을 본 실험에서도 확인할 수 있었다.¹⁶⁾ p14^{ARF}의 탈메틸화 밴드는 5-aza-dC와 함께 depsipeptide를 약물 병용한 경우에도 유지됨을 관찰하였으나, 5-aza-dC와 depsipeptide의 병용 투여가 p14^{ARF}의 탈메틸화를 증강시키지는 확인하지 않았다(Fig. 4B).

5-Aza-dC와 5-FU의 병용 투여 시 간암 및 췌장암 세포주에서 5-FU 단독 투여보다 세포 생존능력을 감소시키며 세포사멸을 유도하고¹⁹⁾ 대장암 세포주인 HCT116에서는 집락형성 억제효과를 증가시키는 등 상승적 항증식 효과를 보인다고 보고되었다.²⁶⁾ CCL-227과 HCT116의 5-FU-내성 유도 세포주에서는 각각 전이와 침습에 관여하는 칼슘결합 단백질인 S100A4와 저산소 유도 세포사멸을 촉진하는 유전자인 BNIP3의 발현이 저하되어 있다고 보고되었다.^{8,14)} 한편 DLD-1 세포에서 이 두 유전자의 탈메틸화를 해소함으로써 발현이 회복되고 결과적으로 전이 억제 활성 및 세포사멸이 증가되었음이 보고되었다. 반면, 본 연구에서는 DLD-1 세포에서 5-aza-dC/depsipeptide와 5-FU를 병용 투여하였을 때 길항적 항증식 효과(antagonism)가 관찰되었고(Fig. 3B), 동시에 p14^{ARF}의 탈메틸화가 5-FU에 의해 억제된 것이 관찰되었다(Fig. 4B). 따라서 항증식 효과상의 길항 작용과 탈메틸화 저해가 연관이 있을 것으로 생각되며, 이 결과가 depsipeptide와 5-FU의 상호길항작용에 관련된 것인지와 5-FU의 병용이 p14^{ARF} 이외의 다른 유전자들의 탈메틸화에 어떠한 영향을 미치는지에 대해서는 추가적인 연구를 통해 확인되어야 할 것이다.

본 연구는 대장암 세포주인 DLD-1에서 5-FU의 항증식 효과

가 유전자 불활성화 저해요법(탈메틸화제+탈아세틸화저해제)에 의해 증가 될 수 있는지 평가하였고, 이와 함께 유전자 불활성화 해소를 p14^{ARF}의 탈메틸화 여부로 평가하였다. 5-aza-dC와 depsipeptide의 병용 시 상승적 항증식 효과를 나타낸 것을 확인 하였으나, 이 두 약물과 5-FU를 병용한 경우에는 길항적 효과가 관찰되었으며, 5-aza-dC 단독 및 5-aza-dC/depsipeptide 병용 처리 시 관찰되었던 p14^{ARF}의 탈메틸화가 억제됨을 관찰하였다. 따라서 이러한 길항적 상호작용은 유전자 불활성화 해소와 연관된 것으로 사료되며 보다 구체적인 기전을 규명하는 연구가 필요하리라 생각된다.

감사의 말씀

본 연구는 가톨릭 암센터, 보건복지부(A010147) 및 과학기술부(M10414030001-05N1403-00111)의 지원으로 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Icli, F. and Arican, A. : Phase II study of cisplatin and dacarbazine for metastatic colorectal carcinoma resistant 5-fluorouracil. *Oncology* **5694**, 297 (1999).
- Kessinger, M. A., Foley, J. F and Lemon, H. M. : Adriamycin, mitomycin C, and 5-fluorouracil in combination for advanced colorectal adenocarcinoma previously treated with 5-fluorouracil. *Cancer Clin. Trials* **2**, 317 (1979).
- Saga, Y., Suzuki, M., Mizukami, H., Kohno, T., Takei, Y., Fukushima, M. and Ozawa, K. : Overexpression of thymidylate synthase mediates desensitization for 5-fluorouracil of tumor cells. *Int. J. Cancer* **106**, 324 (2003).
- Yoshinare, K., Kubota, T., Watanabe, M., Wada, N., Nishibori, H., Hasegawa, H., Kitajima, M., Takechi, T. and Fukushima, M. : Gene expression in colorectal cancer and *in vitro* chemosensitivity to 5-fluorouracil: a study of 88 surgical specimens. *Cancer Sci.* **94**, 633 (2003).
- Meyers, M., Wagner, M. W., Hwang, H. S., Kinsella, T. J. and Boothman, D. A. : Role of the hMLH1 DNA mismatch repair protein in fluoropyrimidine-mediated cell death and cell cycle responses. *Cancer Res.* **61**, 5193 (2001).
- Violette, S., Poulain, L., Dussaux, E., Pepin, D., Faussat, A. M., Chambaz, J., Lacorte, J. M., Staedel, C. and Lesuffleur, T. : Resistance of colon cancer cells to long-term 5-fluorouracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and Bcl-X(L) in addition to Bax and p53 status. *Int. J. Cancer* **98**, 498 (2002).
- Li, M. H., Ito, D., Sanada, M., Odani, T., Hatori, M., Iwase, M. and Nagumo, M. : Effect of 5-fluorouracil on G1 phase cell

- cycle regulation in oral cancer cell lines. *Oral Oncol.* **40**, 63 (2004).
- 8) Wolfgang, M. Schmidt and Maria Kalipcian : Dissecting progressive stages of 5-Fluorouracil resistance *in vitro* using RNA expression profiling. *Int. J. Cancer* **112**, 200 (2004).
 - 9) Nakamura, N. and Takenaga, K. : Hypomethylation of the metastasis-associated S100A4 gene correlates with gene activation in human colon adenocarcinoma cell lines. *Clin. Exp. Metastasis* **16**, 471 (1998).
 - 10) Murai, M., Toyota, M., Suzuki, H., Satoh, A., Sasaki, Y., Akino, K., Ueno, M., Takahashi, F., Kusano, M., Mita, H., Yanagihara, K., Endo, T., Hinoda, Y., Tokino, T. and Imai, K. : Aberrant methylation and silencing of the BNP3 gene in colorectal and gastric cancer. *Clinical Cancer Res.* **11**, 1021 (2005).
 - 11) Kopelovich, L., Crowell, J. A. and Fay, J. R. : The epigenome as a target for cancer chemoprevention. *J. Natl. Cancer Inst.* **95**, 1747 (2003).
 - 12) Zhu, W. G. and Otterson, G. A. : The interaction of histone deacetylase inhibitors and DNA methyltransferase inhibitors in the treatment of human cancer cells. *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents* **3**, 187 (2003).
 - 13) Rice, J. C. and Allis, C. D. : Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**, 263 (2001).
 - 14) de Angelis, P. M., Fjell, B., Kravik, K. L., Haug, T., Tunheim, S. H., Reichelt, W., Beigi, M., Clausen, O. P., Galteland, E. and Stokke, T. : Molecular characterizations of derivatives of HCT116 colorectal cancer cells that are resistant to the chemotherapeutic agent 5-fluorouracil. *Int. J. Oncol.* **24**, 1279 (2004).
 - 15) Herman, J. G., Graff, J. R., Myohanen, S., Nelkin, B. D. and Baylin, S. B. : Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9821 (1996).
 - 16) Esteller, M., Tortola, S., Toyota, M., Capella, G., Peinado, M. A., Baylin, S. B. and Herman, J. G. : Hypermethylation-associated inactivation of p14^{ARF} is independent of p16^{INK4a} methylation and p53 mutational status. *Cancer Res.* **60**, 129 (2000).
 - 17) Chou, T.-C. and Talalay, P. : Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.* **22**, 27 (1984).
 - 18) Longley, D. B., Harkin, D. P. and Johnston, P. G. : 5-fluorouracil: mechanism of action and clinical strategies. *Nature* **3**, 330 (2003).
 - 19) Kanda, T., Tada, M., Imazeki, F., Yokosuka, O., Nagao, K. and Saisho, H. : 5-aza-2'-deoxycytidine sensitizes hepatoma and pancreatic cancer cell lines. *Oncol. Rep.* **14**, 975 (2005).
 - 20) Momparler, R. L. : Pharmacology of 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) *Semin. Hematol.* **42**, 9 (2005).
 - 21) Xiao, J. J., Foraker, A. B., Swaan, P. W., Liu, S., Huang, Y., Dai, Z., Chen, J., Sadee, W., Byrd, J., Marcucci, G. and Chan, K. K. : Efflux of depsipeptide FK228 (FR901228, NSC-630176) is mediated by P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **313**, 268 (2005).
 - 22) Murata, M., Towatari, M., Kosugi, H., Tanimoto, M., Ueda, R., Saito, H. and Naoe, T. : Apoptotic cytotoxic effects of a histone deacetylase inhibitor, FK228, on malignant lymphoid cells. *Jpn. J. Cancer Res.* **91**, 1154 (2000).
 - 23) Nakamura, T., Sakaeda, T., Ohmoto, N., Moriya, Y., Komoto, C., Shirakawa, T., Gotoh, A., Matsuo, M. and Okamura, K. : Gene expression profiles of ABC transporters and cytochrome P450 3A in Caco-2 and human colorectal cancer cell lines. *Pharm. Res.* **20**, 324 (2003).
 - 24) Primeau, M., Gagnon, J. and Momparler, R. L. : Synergistic antineoplastic action of DNA methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine and histone deacetylase inhibitor depsipeptide on human breast carcinoma cells. *Int. J. Cancer* **103**, 177 (2003).
 - 25) Gagnon, J., Shake, S., Primeau, M., Hurtubise, A. and Momparler, R. L. : Interaction of 5-aza-2'-deoxycytidine and depsipeptide on antineoplastic activity and activation of 14-3-3sigma, E-cadherin and tissue inhibitor of metalloproteinase 3 expression in human breast carcinoma cells. *Anticancer Drugs* **14**, 193 (2003).
 - 26) Arnold, C. N., Goel, A. and Boland, C. R. : Role of hMLH1 promoter hypermethylation in drug resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines. *Int. J. Cancer* **106**, 66 (2003).