

골 육종 세포주에서 아연 복합물의  
증식 억제 효과

연세대학교 대학원

의 학 과

박 홍 준

골 육종 세포주에서 아연 복합물의  
증식 억제 효과

지도교수 한 수 봉

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2005년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

박 홍 준

# 박홍준의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_인

심사위원 \_\_\_\_\_인

심사위원 \_\_\_\_\_인

심사위원 \_\_\_\_\_인

심사위원 \_\_\_\_\_인

연세대학교 대학원

2005년 12월 일

## 감사의 글

오늘의 제가 있기까지 저에게 생명의 눈을 뜨면서부터 현재에 이르기까지 모든 것을 아낌 없이 주신 부모님께 감사를 드립니다. 이 논문이 완성되기 까지 간곡하게 지도와 격려를 해 주신 한수봉 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한, 연구 기간 내내 물심 양면으로 실험을 지도하여 주신 배석년 교수님과 심약한 저에게 용기와 희망을 주신 신규호 교수님께 심심한 감사를 드립니다. 어렵고 힘든 연구를 끝까지 할 수 있도록 끊임없이 지도해 주신 안영수, 박병우 교수님과 김미연 선생님, 그리고 박래옥, 박재민 박사님께 깊은 감사를 드립니다. 또한, 논문을 끝까지 완성 할 수 있도록 많은 도움을 주신 노영근 원장님께 감사의 말씀을 드립니다.

여러모로 부족한 저에게 아름다운 네 명의 자식을 선물한 사랑하는 아내 현경에게 진심으로 고마운 마음을 전하며, 아버지로서의 도리를 함에 있어 부족했던 나를 힘들지만 기꺼이 따라와 준 박영, 박태성, 박지성, 박영주에게 이 논문을 바치려 합니다.

저자 씀

## 차 례

그림 및 표 차례	iii
국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	6
1. 아연 복합물의 조제	6
2. 시약	6
3. 세포주의 배양	6
4. 적정 세포수의 결정	7
5. 아연-구연산 복합물의 골 육종 세포에 대한 세포 생존력 분석	8
6. 유세포 분석기를 이용한 DNA Fragmentation 분석	9
7. DNA Laddering 분석	9
8. Exclusion of PI combined with hydrolysis of FDA	10
9. Western Blot 분석	11
10. Caspase-3 activity 분석	12
III. 결과	13
1. 세포 생존력 분석	13
2. 유세포 분석기를 이용한 DNA Fragmentation 분석	15
3. DNA Laddering 분석	16
4. Exclusion of PI combined with hydrolysis of FDA	17
5. Western Blotting 분석	19
6. Caspases-3 activity의 측정	20
IV. 고찰	21
V. 결론	31
참고문헌	32
영문요약	39

## 그림 차례

- 그림 1. 시험관 내 3일간 배양된 골 육종 세포의 현미경 관찰 소견 . . . . . 13
- 그림 2. 시험관 내 배양 후 24시간 동안 아연-구연산 복합물을 처리한 후 골 육종 세포의 현미경 관찰 소견 . . . . . 14
- 그림 3. CCK-8 분석을 이용한 골 육종 세포주의 생존력 분석 . . . . . 14
- 그림 4. CCK-8 분석을 이용한 아연과 아연-구연산 복합물이 골 육종 세포와 섬유 모세포의 생존력에 미치는 영향 . . . . . 15
- 그림 5. 아연-구연산 복합물 투여 후의 유세포 분석기에 의한 골 육종 세포와 섬유 모세포의 세포 주기 분석 . . . . . 16
- 그림 6. 섬유 모세포주와 골 육종 세포주에서 아연-구연산 복합물의 처리 시간에 따른 DNA fragmentation 분석 . . . . . 17
- 그림 7. 골 육종 세포에서 아연-구연산 복합물의 농도에 따른 세포 독성의 차이 . . . . . 18

그림 8. 아연-구연산 복합물 처리 후의 pro-apoptotic과 anti-apoptotic 단백질의 발현 양상 . . . . . 19

그림 9. 아연-구연산 복합물을 처리한 골 육종 세포에서 caspase-3의 활성화도 . . . . . 20

## 국문 요약

### 골 육종 세포주에서 아연 복합물의 증식 억제 효과

골 육종 환자에서 화학 요법의 도입으로 인하여 사지 구제술이 가능하게 되었고 환자의 생존율이 높아지게 되었다. 그러나, 화학 요법에 듣지 않는 비 반응군 및 치료 후 2년 이상이 경과하여 재발하는 경우가 아직까지 문제로 남아 있다. 또한, 다중 약물 저항성이 항암제 치료 실패의 하나의 주요 원인으로 제시되기도 한다. 광물질인 아연이 임파선 암, 유방 암, 전립선 암, 난소 암, 그리고 대장 암 세포에서 세포의 성장 억제와 세포 고사 기전을 유발시켜 암세포의 자연사를 초래할 수 있음이 밝혀졌으나, 골 육종에 대한 체계적인 연구보고는 아직까지는 없다. 본 논문에서는 골 육종에 대한 아연의 효능을 알아보기 위해 정상 섬유 모세포주와 골 육종 세포주를 대상으로 아연에 대한 세포 및 분자 생물학적 반응을 연구하였다.

정상 섬유 모세포주 (CCD-1120Sk)와 골 육종 세포 (MG-63)에 대한 아연의 증식 억제 효과를 알아보기 위하여 아연 ( $ZnCl_2$ )을 단독 혹은 아연-구연산 복합물을 투여한 후 각각 다양한 농도와 시간에 따른 변화를 관찰하였다. 억제 처리에 대한 세포의 생존력을 알아보기 위하여 CCK-8 assay를 이용하였으며, 세포 성장 주기와 세포 독성에 대한 평가는 유세포 분석기와 Agarose gel electrophoresis를 사용하였다. 세포 고사의 분자



생물학적 기전은 Western blotting을 이용하여 p21<sup>WAF1</sup>, Bax, Bcl-2, procaspase-3를 측정하였으며, caspase-3 activity는 ELISA로 측정하였다.

CCK-8으로 측정한 결과 아연-구연산 복합물은 시험관 내에서 시간과 농도에 비례하여 정상 섬유 모세포에 비해 골 육종 세포에서 세포 독성을 나타내었고, 골 육종 세포를 72시간 동안 아연-구연산 복합물에 노출시켰을 때, 아연을 단독으로 사용한 것 보다 정상 섬유 모세포에 비해서 뚜렷한 세포 증식 억제 효과를 나타냈다. 고농도 (0.5mM 아연과 12.5mM 구연산)의 아연-구연산 복합물에서는 세포 괴사가 보였으나, 아연 0.3mM과 구연산 7.5mM의 농도에서는 세포 고사를 유도하였다. 세포 고사는 유세포 분석과 DNA laddering 분석을 통해 확인하였고, 분자 생물학적으로 이는 p53 비의존성 p21<sup>WAF1</sup>기전과 관계가 있었고, Bcl-2의 쇠퇴 및 Bax 단백질의 활성화에 의한 caspase-3의 활성화에 의한 것임을 증명할 수 있었다.

결론적으로, 적정 농도의 아연-구연산 복합물은 in vitro에서 농도에 따라 골 육종 세포에서 세포 괴사 및 세포 고사를 유도할 수 있는 효과가 있어 골 육종에서의 항암 치료제 및 보조제로서 사용이 가능할 것으로 사료된다. 앞으로 in vivo 및 전향적 임상 시험이 필요할 것이다.

---

핵심되는 말: 골 육종, 아연, 구연산, 생존력 분석

# 골 육종 세포주에서 아연 복합물의 증식 억제 효과

<지도교수 한 수 봉 >

연세대학교 대학원 의학과

박 홍 준

## I. 서 론

골 육종 환자에서 화학 요법의 도입으로 사지 구제술이 가능하게 되었고 환자의 생존율이 매우 높아지게 되었다. 그러나, 화학 요법에 듣지 않는 비 반응군 및 치료 후에 2년 이상이 경과하여 재발하는 경우가 아직까지 문제로 남아 있다. 또한, 다중 약물 저항성으로 항암제 치료가 실패되기도 한다. <sup>1</sup> 따라서, 현재의 항암제보다 좀 더 효과적인 항암제의 출현이 기대된다.

최근 종양 신생물의 성장을 억제하는 아연의 역할에 대해 많은 연구가 시도되고 있다. Zowczak 등<sup>2</sup> 에 의하면 이미 전이가 진행된 폐암, 유방암, 위장관 암 그리고 부인암 환자의 혈청 내에는 아연의 농도가 정상에 비해 현저하게 감소되어 있다고 하였다. 최근의 실험적 보고에 의하면 아연이 갑상선 암<sup>3</sup>, 백혈병<sup>4</sup>, 전립선 암<sup>5</sup>, 대장 암<sup>6</sup>, 난소 암<sup>7</sup> 그리고 유방암<sup>8</sup>에서 강력한 세포 독성을 유발하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 세포 독성은 세포 내

아연의 농도에 따라 세포 괴사 (necrosis) 혹은 세포 고사 (apoptosis)에 의하여 유발되는 것으로 보고되고 있다.

아연은 발암 현상에 관련된 내인성 항산화 방어 기전에 관여하는 효소들의 보조 인자로서 중요한 역할을 한다. <sup>9</sup> 아연은 일부 악성 세포주의 성장을 억제하거나 세포 고사를 유도하는데, Bcl-2와 같은 항 세포 고사 단백질을 억제하거나 종양 억제 유전자인 p53 혹은 p53과 관련 없는 p21의 활성화와 caspase-3의 활성화를 통해 악성 종양에 대한 세포 독성을 유발한다. <sup>6,8,10</sup> 또한, 아연은 암세포의 무제한적 증식에 관여하는 효소인 텔로메라아제 (telomerase)의 작용을 조절한다고 알려져 있다. <sup>11</sup>

골 육종 환자에서도 아연의 역할에 대한 연구 보고들이 있었다. 1976년 Fisher 등<sup>12</sup>은 12명의 환자를 대상으로 혈청 내 아연의 농도를 관찰한 결과에서 전이성 골 육종 환자에서는 원발성 및 사지 절단으로 치료된 환자보다 낮은 농도를 보였고, 원발성 골 육종 환자에서는 정상인 혹은 절단으로 치료 받은 환자보다도 높은 수치를 보였다고 발표하였고, 신생 혈관 생성에 중요한 구리 (copper)와 아연의 비율 (serum copper level: serum zinc level)이 높을수록 질병이 진행된 경우이며, 예후도 좋지 않았다고 하였으나, 상당히 제한된 환자 수로 인하여 좀더 많은 수집 및 연구가 필요하다.

골 육종에서 변이 p53의 축적과 P-당단백 (P-glycoprotein)의 발현이 불량한 예후와 연관이 있다는 보고가 있는가 하면, <sup>13</sup> p53 단백질의 발현이 골

육종과는 무관하다는 보고도 있다.<sup>14</sup> p21은 많이 발현될수록 화학요법에 대한 조직의 반응이 나쁜 것으로 알려져 있으며, 이는 Bcl-2 단백질의 발현과 함께 항암제 치료에 대한 내성과 관계된다고 한다.<sup>15</sup>

광물질인 아연이 유방 암, 전립선 암, 난소 암, 그리고 대장 암 같은 상피성 (epithelial) 악성 종양 세포에서 세포의 성장 억제와 세포 고사 기전을 유발시켜 암세포의 자연사를 초래할 수 있음이 밝혀졌으나, 중간엽 (mesenchyme)에서 유래된 골 육종에 대한 체계적인 연구보고는 아직까지는 없다. 본 연구에서는 골 육종에 대한 아연의 세포학적 및 분자 생물학적 효능을 연구하기 위해 정상 섬유 모세포주 (CCD-1120Sk)와 골 육종 세포주 (MG-63)를 대상으로 아연에 대한 세포 및 분자 생물학적 반응을 비교하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 아연 복합물의 조제

아연-구연산 복합물 (CIZAR<sup>®</sup>) 은 BH Biomedic Co (Seoul, Korea)에서 구입하였으며, 이는 zinc chloride (5mM) 와 citric acid anhydrous (100mM)로 구성되고, pH를 7.0으로 만든 후 15분 동안 121°C autoclave에서 가열되었다.

### 2. 시약

Dulbeco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 과 fetal bovine serum (FBS)은 Cansera (Ontario, Canada) 에서, Streptomycin, Penicillin, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-phenyltetrazolium bromide), WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt)(CCK-8), RNase A, Proteinase K, propidium iodide (PI), L-arginine 은 Sigma Chemical Co (St.Louis, MO, USA)에서, p21, p53, Bcl-2, Bax, procaspase-3,  $\beta$ -actin 에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), caspase-3 assay kit 는 BioSource (Camarillo, CA, USA) 에서 각각 구입한다.

### 3. 세포주의 배양

실험에 사용할 골 육종 세포주 (MG-63)와 정상 섬유 모세포주 (CCD-1120Sk)는 미국의 ATCC (American type culture collection)에서 분양 받았다. 실험에 사용할 정상 섬유 모세포주와 골 육종 세포주는 DMEM medium 에 10 % (v/v) heat - inactivated FBS, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 100U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml L-glutamine 을 첨가한 배지에 37°C의 배양기에서 5% carbon dioxide 와 95% air, 100% 습도의 조건으로 배양한다.

#### 4. 적정 세포수의 결정

골 육종 세포와 섬유 모세포주를 DMEM 배지 (Dulbecco' s Modified Eagle' s Medium, Gibco BRL, Gaithersberg, MD, USA)를 사용하여 75 cm<sup>2</sup> 의 flask 에서 배양하였다. 골 육종 세포가 80~90% 세포 증식에 도달하였을 때, 단층 배양세포를 trypsin-EDTA 를 이용하여 분리하였다. 분리한 세포는 배양액으로 희석하고 1,500rpm 으로 원심 분리한 후에 상층액을 제거하고 다시 세포를 배지로 부유하여 hemocytometer 로 세포수를 측정하였다. 96 well plate 의 한 well 에 200  $\mu$ l 안에 2x 10<sup>5</sup> 개의 세포가 들어가게 한 뒤 차례로 반으로 희석하여, 11 번째 well 에는 195 개의 세포가 들어가도록 하고, 최종 12 번째 well 에는 세포가 없이 배지만 넣고, 각각의 well 에는 배지가 총 100  $\mu$ l 가 되게 하여 5% CO<sub>2</sub>, 37° C 에서 4 일간 배양한 후 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-phenyltetrazolium bromide)를 이용하여

540 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도로 세포주의 성장 곡선을 구하였다. 각 세포주에서 급격하게 세포 수가 증가되는 곳을 실험하기 최적인 세포수로 정하였으며,  $1.2 \times 10^4$  개를 적정 세포수로 정하였다.

#### 5. 아연-구연산 복합물의 골 육종 세포에 대한 세포 생존력 분석

정상 섬유 모세포주 (CCD-1120Sk)와 골 육종 세포 (MG-63)에 대한 아연의 증식 억제 효과를 알아보기 위하여 아연 ( $ZnCl_2$ )을 단독 혹은 아연-구연산 복합물을 투여 후 각각 다양한 농도와 시간에 따른 변화를 관찰한다. 세포의 생존 수를 알아보기 위하여 CCK-8 assay 를 이용하며, 세포는 96-well plates 에서 각 well 당  $1.2 \times 10^4$  개의 세포가 포함되도록 하고,  $10 \mu l$  의 여러 가지 농도의 정제된 아연 ( $ZnCl_2$ )을 단독 혹은 아연-구연산 복합물을 첨가한 후에 24 시간 동안 배양한다. 이를 통해 정상 세포에는 세포 독성이 적고 골 육종 세포에는 최대의 세포 독성을 유발하는 최적의 농도를 구한다. 아연 혹은 아연-구연산 복합물의 노출 시간에 따른 세포 생존률의 변화를 알아보기 위하여 아연 혹은 아연-구연산 복합물을 최적 농도로 처리하고, 6, 12, 24, 48, 72 시간 동안 각각 노출시킨다. 그 후에  $20 \mu l$  CCK-8 solution 을 각 well 에 첨가시키고, plate 를  $37^\circ C$ 에서 4 시간 동안 배양한 후, 450nm 에서 Bio-Rad model 3550 microplate reader (Richmond, CA)를 사용하여 흡광도를 측정한다.

6. 유세포 분석기 (Flow Cytometry)를 이용한 DNA Fragmentation 분석

Telford 등<sup>16</sup>이 사용한 PI staining technique 을 이용하여 cellular DNA 의 status 를 분석한다. 섬유 모세포와 골 육종 세포 ( $2 \times 10^6$  cells)를 아연-구연산 복합물로 6, 12, 24 시간 동안 각각 처리하여 세포를 모은다. 세포를 ice-cold PBS 로 2 회 세척한 후 pellet 에 washing buffer (5mM EDTA in PBS)를 300  $\mu$ l 넣고 700  $\mu$ l 의 차가운 100% ethanol 을 천천히 떨어뜨린 후 4°C에서 24 시간 동안 방치하며 고정한다. 4°C, 3000rpm 으로 1 분간 원심 분리한 후 상층액을 제거하고, 500  $\mu$ l 의 washing buffer 와 20  $\mu$ g/ml RNase A 로 실온에서 30 분간 처리한 후, 얼음 위에서 10 분간 차갑게 보관한다. RNase solution 에 있는 세포에 PI solution (50  $\mu$ g/ml)을 첨가하여 mesh filter 로 여과시킨 후 암실에서 실온으로 1 시간 동안 세포를 방치한다. 이후에 세포를 Becton Dickinson FACS system 의 유세포 분석기를 이용하여 분석한다. DNA histogram 을 Becton Dickinson flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)로 얻는다. 15-mW air-cooled argon ion laser 와 617-long pass optical filter 를 통한 Propidium fluorescence 를 사용하고, DNA modeling 은 ModFit (Verity Software House, Topsham, Maine)을 사용한다.

## 7. DNA Laddering 분석



DNA 는 Leszczynski 등 <sup>17</sup> 이 기술한 방법을 응용하여 추출한다.  $2 \times 10^6$  개의 섬유 모세포와 골 육종 세포를 적절한 농도의 아연-구연산 복합물로 6, 12, 24, 48, 72 시간 동안 처리한 후, 부유하거나 유착된 세포를 모은 후, 세포 pellet 을 lysis buffer (0.5% sodium dodecyl sulfate(SDS), 2mM EDTA, 50mM Tris-HCL buffer (pH 8.0))로 용해 시키고 0.5M proteinase K 를 넣은 후 55°C에서 3 시간 동안 반응시킨다. DNA 는 동량의 phenol/ chloroform/ isoamyl alcohol (25: 24: 1)을 섞은 후 4°C, 12,000rpm 에서 20 분간 원심 분리 후 상층액만 취하며 이 과정을 두 번 반복한다. 상층액과 동량으로 cold absolute ethanol 을 첨가하고 0.1 volume ammonium acetate 을 취하여 -20°C에서 overnight 동안 방치한다. 12,000rpm 에서 원심 분리하여 pellet 만을 얻은 후 TE buffer (0.5M EDTA in 1 M Tris-HCL buffer, pH 8.0) 에서 용해하고, RNase A (10mg/ml) 와 함께 37°C에서 1 시간 동안 반응시킨다. 이는 1 시간 동안 100V 로 0.5  $\mu$ g/ml ethidium bromide 가 포함된 1.5% agarose gel 에서 전기 영동 시킨 후, UV transillumination 을 이용하여 관찰 한다.

#### 8. Exclusion of PI combined with hydrolysis of FDA

세포 사멸의 기전을 알아보기 위해 세포막의 상태를 평가한다. 한 개의 well 당  $1 \times 10^5$  개의 세포가 포함되도록 한 6-well plate 에서 24 시간 동안 세포를 배양한다. 아연-구연산 복합물을 각 well 에 첨가한 후에 6, 12,

24 시간 동안 각각 방치하고, PBS 로 2 회 세척한다. 약 2  $\mu$ l 의 FDA stock solution 을 각 well 에 첨가한 후 15 분간 37°C에서 배양하고, 20  $\mu$ l 의 PI stock solution 을 첨가한 후 5분간 실온에서 방치한다. 이후에 세포를 모아서 FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)에 넣고, 488nm 의 파장에서 증폭시키고, 530/20 band-pass filter 를 이용하여 분석한다. 자료는 FACSCalibur 의 CELLQuest program 을 사용하여 처리한다.

#### 9. Western Blot 분석

아연-구연산 복합물이 처리된 섬유 모세포와 골 육종 세포를 1, 3, 6, 12, 24 시간 배양한 후 세포를 모은다. 이를 4°C, 2,000rpm 에서 5 분간 원심 분리하여 추출한 세포를 100  $\mu$ l 의 lysis buffer 에서 실온에서 30 분간 반응하여 용해 시킨다. 용해된 세포액은 4°C, 12,000rpm 으로 10 분간 원심 분리하여 단백질을 추출하고, 단백질 농도는 Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Philadelphia, PA)를 이용하여 측정한다. 100g 의 단백질을 5 분간 끓인 다음 10% sodium dodecyl sulfate(SDS)/ polyacrylamide gel 에서 100V 로 2 시간 동안 전기 영동 시킨다. 그리고, nitrocellulose paper 로 100V 에서 1 시간 동안 이동시킨 후에, membrane 을 1 시간 동안 5% nonfat milk in PBS, 0.05% Tween 20 에서 block 한다. specific pro-apoptotic protein 과 anti-apoptotic protein 을 알아보기 위하여, p21<sup>WAF1</sup>, p53, Bax, Bcl-2, procaspase-3,

$\beta$ -actin 에 대한 primary antibody 를 사용하여, membrane 을 4°C에서 overnight 동안 rocker 위에 방치한다. primary antibody 는 p21<sup>WAF1</sup>, p53, Bax, Bcl-2, Procapase-3,  $\beta$ -actin 1:500 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)로 희석하며, PBS 와 0.05% Tween 20 를 이용하여 3 회 세척하며, 각각의 membrane 은 1: 5,000 으로 희석시킨 secondary antibody (Calbiochem, San Diego, CA)를 이용 1 시간 동안 실온에서 방치한 후에 membrane 을 PBS 와 0.05% Tween 20 로 3 회 세척시킨다. Specific protein bands 는 ECL Western blotting system (Amersham, Piscataway, NJ)을 이용하여 얻는다.

#### 10. Caspase-3 activity 분석

골 육종 세포 5 x 10<sup>6</sup> 개의 세포를 PBS 로 세척 후에, 차가운 lysis buffer 50  $\mu$ l 를 넣고 얼음 위에서 10 분간 방치한다. 1 분간 4°C, 12,000rpm 에서 원심 분리를 시행한 후에, 상층 액을 새로운 tube 에 옮기고, 얼음 위에서 보관한다. 단백질 정량은 Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Philadelphia, PA)를 이용하여 측정한다. Lysis buffer 50  $\mu$ l 속에 protein 100  $\mu$ g 이 들어있도록 맞춘 후 96 well 에 옮긴다. 0.1M DTT 10  $\mu$ l 을 2x reaction buffer 1ml 과 섞는다. 0.1M DTT-2x reaction buffer 50  $\mu$ l 를 sample 에 첨가한다. 4mM DEVD-pNA 5  $\mu$ l 를 첨가하고, 알루미늄 호일에 싸서, 37°C에서 2 시간 동안 방치한다. ELISA 로 405nm 에서 흡광도를 측정한다.

### III. 결 과

#### 1. 세포 생존력 분석

아연-구연산 복합물의 다양한 농도가 세포 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 골 육종 세포 (MG-63)와 정상 섬유 모세포 (CCD-1120Sk)를 사용하였으며, 아연-구연산 복합물을 처리한 후에 이를 현미경으로 관찰하였다. 세포의 증식 억제 효과를 현미경으로 쉽게 관찰할 수 있었다 (그림 1, 2). CCK-8으로 측정 한 결과 아연-구연산 복합물은 농도에 비례하여 골 육종 세포 (MG-63)에서 세포 독성을 나타내었다 (그림 3). 골 육종 세포를 72시간 동안 아연 (0.3mM)과 아연-구연산 복합물 (아연 0.3mM + 구연산 7.5mM)에 노출 시켰을 때, 정상 섬유 모세포 (CCD-1120Sk)에 비해서 뚜렷한 세포 증식 억제 효과를 보였다. 특히, 아연-구연산 복합물은 아연을 단독으로 투여했을 때보다 정상 섬유 모세포의 생존력이 골 육종 세포주 보다 훨씬 더 높았다 (그림 4).

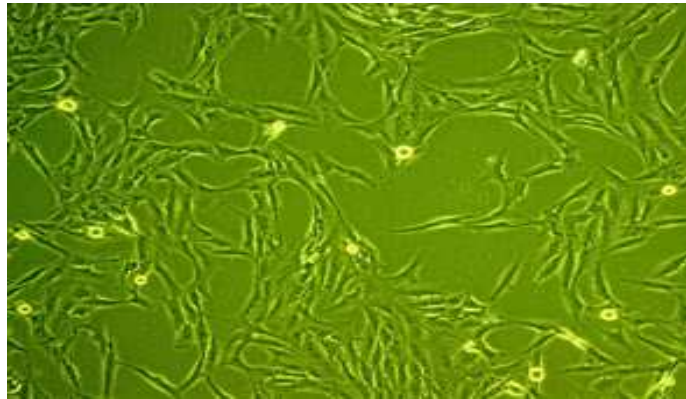


그림 1. 시험관 내 3일간 배양된 골 육종 세포 (MG-63)의 현미경 관찰 소견 (x400).

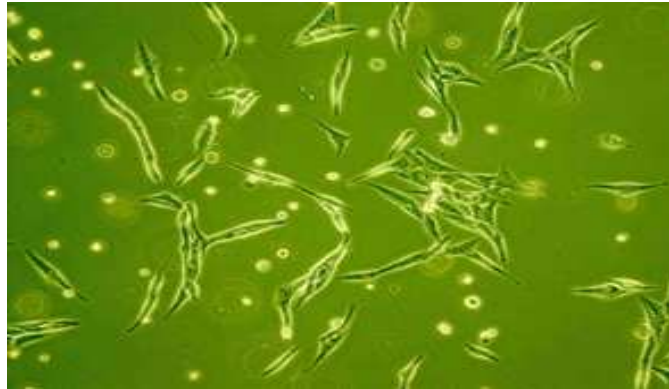


그림 2. 시험관 내 배양 후 24시간 동안 아연-구연산 복합물을 처리한 후 골 육종 세포의 현미경 관찰 소견 (x400).

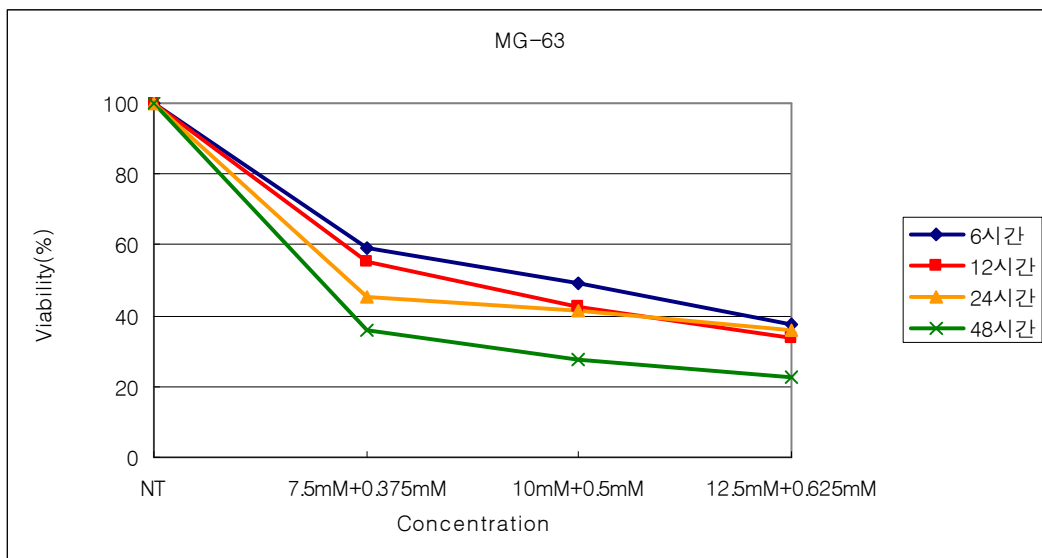


그림 3. CCK-8 분석을 이용한 골 육종 세포주 (MG-63)의 생존력 분석. 그림의 농도 좌표에서 NT는 아연-구연산 복합물을 처리하지 않은 군을 표시하며, 구연산+아연의 농도를 표시하였다. 골 육종 세포주는 아연-구연산 복합물의 처리에 대해 농도 의존성을 보이는 세포 생존력의 감소를 보였다.

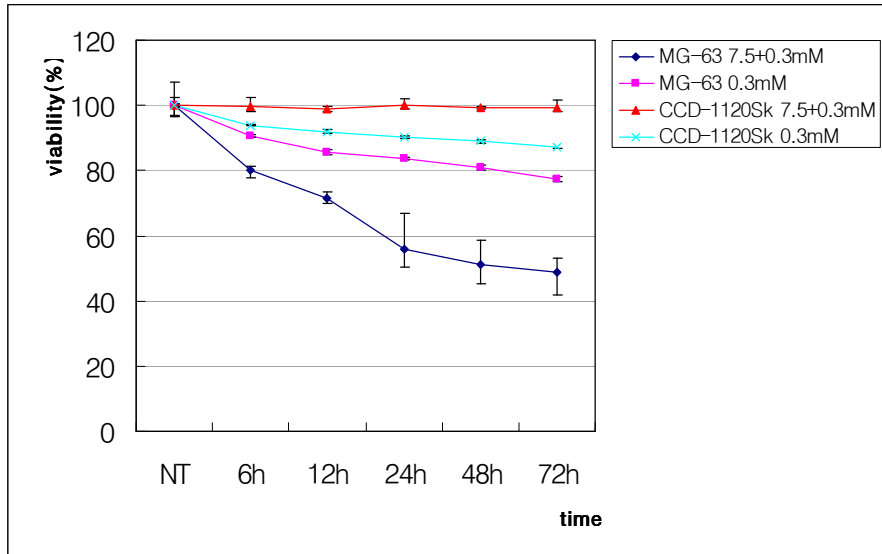
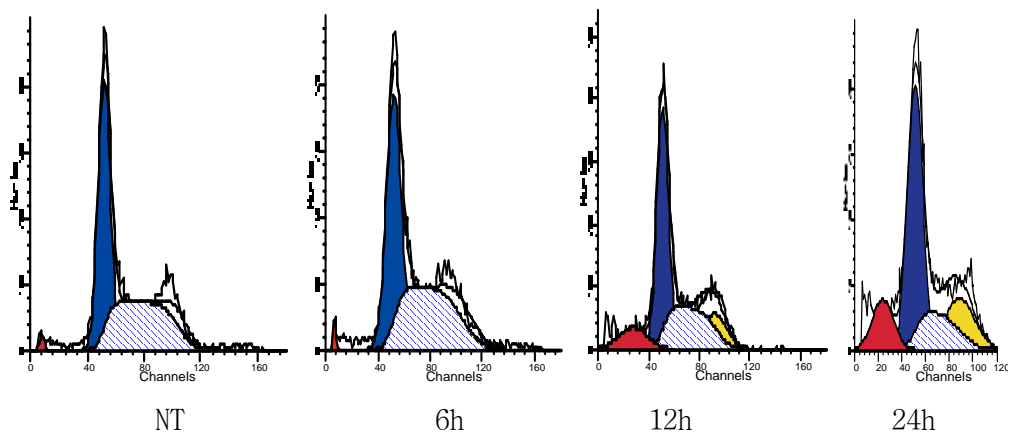


그림 4. CCK-8 분석을 이용한 아연과 아연-구연산 복합물이 골 육종 세포 (MG-63)와 섬유 모세포 (CCD-1120Sk)의 생존력에 미치는 영향. 골 육종 세포 주는 아연-구연산 복합물의 처치에 대해 시간 의존성을 보이는 세포 생존력의 감소를 보였으며, 아연 (0.3mM)을 단독으로 사용하는 것보다 아연-구연산 복합물 (0.3mM zinc and 7.5mM citrate)을 사용함으로써 정상 섬유 모세포에는 독성이 적고 골 육종 세포에는 강한 독성을 보였다. 각 실험값은 3회 반복한 값의 평균±표준 오차로 표시하였다.

## 2. 유세포 분석기 (Flow Cytometry)를 이용한 DNA Fragmentation 분석

아연-구연산 복합물의 세포 사멸 기전을 알아보기 위해 유세포 분석기를 사용하였다. DNA의 양을 histogram으로 나타내었을 때 아연-구연산 복합물에 노출된 후 12시간 후부터 세포 고사가 시작됨을 알 수 있었다 (그림 5). G2기에 세포수가 증가됨을 알 수 있었고, 시간이 경과함에 따라서 골 육종 세포의 수가 세포 고사에 의해서 점차 감소되었다.



	NT	6h	12h	24h
<b>G0-G1</b>	<b>51.21%</b>	<b>48.97%</b>	<b>52.86%</b>	<b>57.72%</b>
<b>S</b>	<b>43.69%</b>	<b>42.73%</b>	<b>32%</b>	<b>20.1%</b>
<b>G2-M</b>	<b>6.06%</b>	<b>7.34%</b>	<b>15.14%</b>	<b>22.17%</b>
<b>Sub-G1</b>	<b>0.82%</b>	<b>0.9%</b>	<b>9.84%</b>	<b>13.05%</b>

그림 5. 아연-구연산 복합물 투여 후의 유세포 분석기에 의한 골 육종 세포 (MG-63)의 세포 주기 분석.

### 3. DNA Laddering 분석

세포 사멸의 기전을 규명하기 위해 DNA laddering을 사용하였다 (그림 6). DNA fragmentation은 세포 고사에서 나타나는 현상이며, 여러 조각으로 끊어진 DNA가 전기 영동에 의해서 이동하는 형태가 ladder 모양으로 관찰되었다.

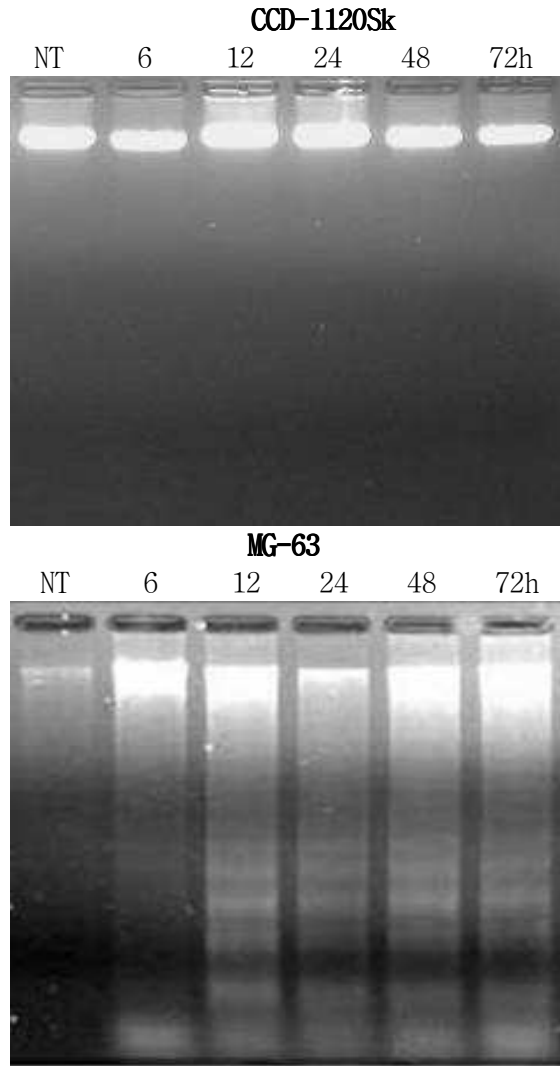


그림 6. 섬유 모세포주 (CCD-1120Sk)와 골 육종 세포주 (MG-63)에서 아연-구연산 복합물 (0.3mM 아연+7.5mM 구연산)의 처리 시간에 따른 DNA fragmentation 분석.

4. Exclusion of PI combined with hydrolysis of fluorescein diacetate (FDA)

Propidium iodide (PI)는 DNA 혹은 double stranded RNA와 결합하게



되면 적색 형광을 나타낸다. PI는 전하를 띄고 있으므로, 세포막이 온전한 세포에서는 세포막을 통과하지 못하며, 세포막이 파괴된 세포만 염색이 되게 한다. FDA는 전하가 없으며 생존하는 세포의 세포막을 통과하며, FDA가 가수분해된 전하를 띤 물질은 녹색 형광을 띄면서 세포 내에 존재하게 되지만, 괴사된 세포에서는 세포 외부에 존재하게 된다. 따라서, 생존한 정상 세포는 PI를 배제하므로 PI에 염색되지 않고 FDA에 의해 녹색으로 염색이 되지만, 괴사된 세포는 PI에 의해서 강한 적색 형광과 비교적 약한 녹색 형광을 띄게 된다. 아연-구연산 복합물이 저 농도(0.1mM 아연+2.5mM 구연산)에서는 변화가 없었고, 중등도 농도 (0.3mM 아연+7.5mM 구연산)에서는 세포 고사, 고 농도 (0.5mM 아연+12.5mM 구연산)에서는 세포 괴사가 관찰되었다 (그림 7).

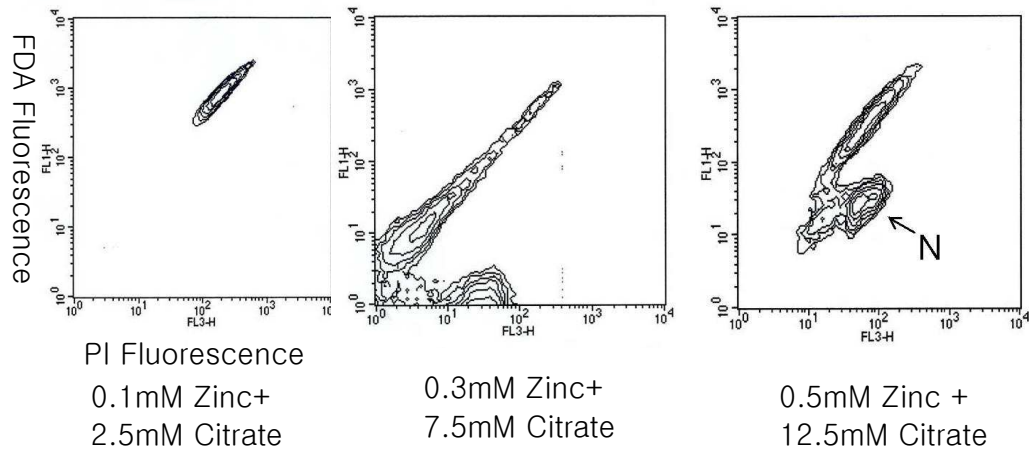


그림 7. 골 육종 세포에서 아연-구연산 복합물의 농도에 따른 세포 독성의 차이. 저 농도에서는 세포에 변화가 없었으나, 중등도 농도에서는 세포 고사를 보였으며, 고 농도에서는 세포 괴사 (N)가 관찰되었다.

## 5. Western Blotting 분석

세포 고사에 관여하는 pro-apoptotic, anti-apoptotic 단백질을 알아보기 위하여, p21<sup>WAF1</sup>, p53, Bcl, Bax, procaspase-3 그리고  $\beta$ -actin을 이용하여 Western blot을 시행하였다. 골 육종 세포주에 아연-구연산 복합물 투여 시 Bcl-2와 procaspase-3는 감소하였고, p21과 Bax는 증가하였다 (그림 8).

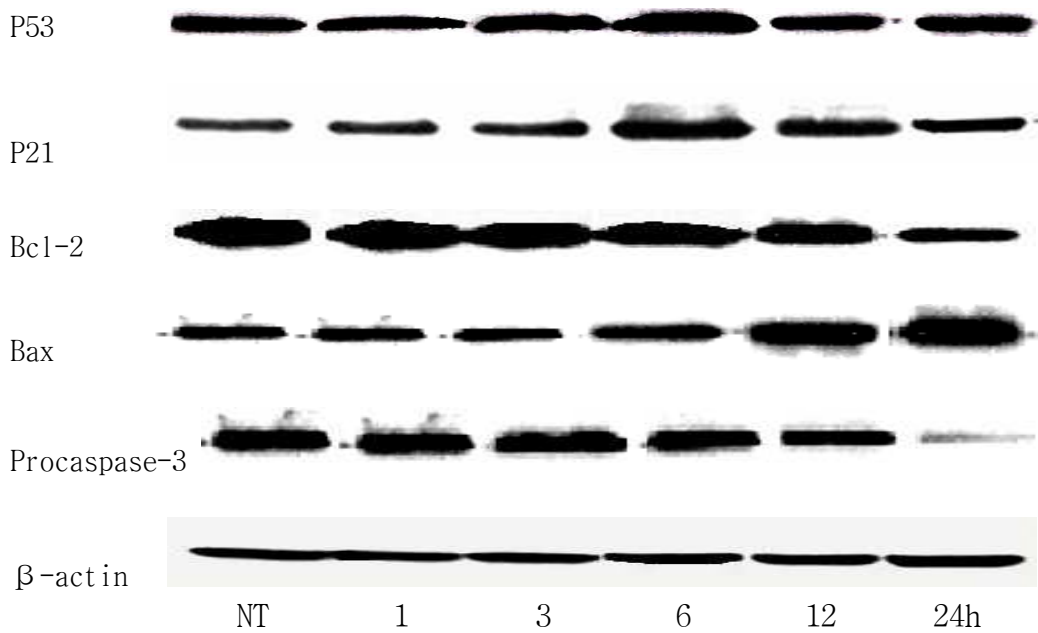


그림 8. 아연-구연산 복합물 처치 후의 pro-apoptotic과 anti-apoptotic 단백질의 발현 양상. 아연-구연산 복합물을 처치하고 1, 3, 6, 12, 24시간 경과 후에 western blot analysis을 시행하였다. Anti-apoptotic Bcl-2는 감소되고, pro-apoptotic Bax는 증가하였으며, p21은 p53와 관련 없이 증가되었으며, procaspase-3는 감소하였다.

## 6. Caspases-3 activity의 측정

세포 고사에 관여하는 최종 단백질 caspase-3의 활성도를 측정하기 위하여 caspase-3 assay kit (BioSource, Camarillo, CA)를 사용하였다. 아연-구연산 복합물에 노출되는 시간에 따라서 caspase-3의 활성도가 증가됨을 알 수 있으며, 이는 세포 고사가 진행됨을 의미한다 (그림 9).

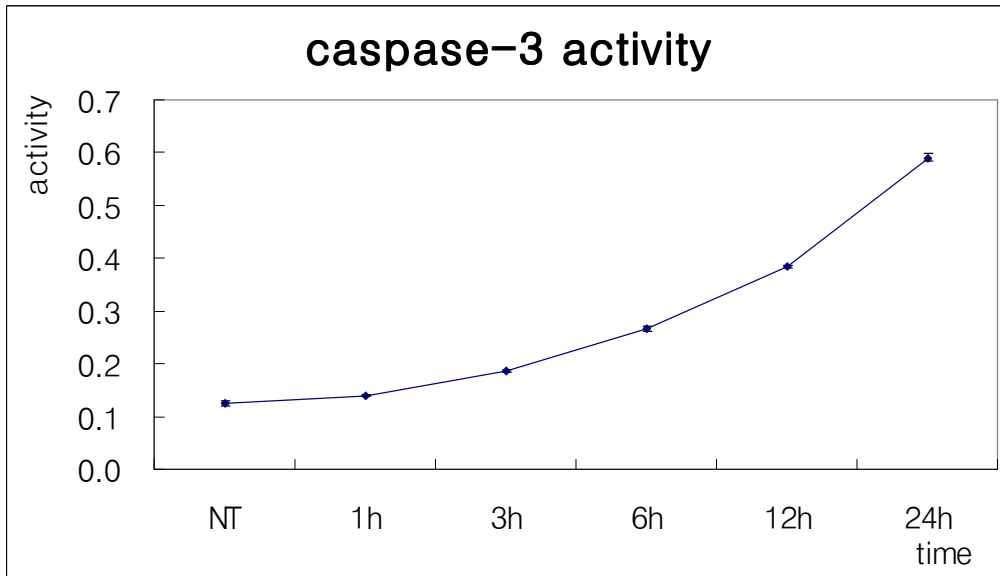


그림 9. 아연-구연산 복합물을 처리한 골 육종 세포에서 caspase-3의 활성도. 아연-구연산 복합물에 노출 시간이 경과함에 따라서 caspase-3 효소의 활성도가 증가됨.

#### IV. 고찰

골 육종의 치료는 지난 수 십 년간 비약적인 발전이 있어왔으며, 과거에 외과적 수술로만 치료하던 때의 5년 생존율은 약 20% 이하였으나, 현재는 여러 가지 화학요법의 병행으로 5년에서 8년의 추시 관찰 시에 49~76%의 무병 생존율 (disease free survival) 이 가능하게 되었으며 평균 60% 이상으로 알려져 있다.<sup>18</sup> 또한, 항암 화학 요법의 도움으로 과거의 고식적인 절단술에서 벗어나서 사지 구제술이 가능하게 되었다. 따라서, 환자의 생존율과 삶의 질이 크게 향상되었다.<sup>1</sup> 그러나, 항암제에 대한 비 반응군 및 종양의 재발 가능성이 아직도 높으며, 최신의 다각적 집약치료법 (multimodality treatment) 이나 독성이 훨씬 더 강한 이차 항암제의 사용에도 불구하고 절반 이상의 환자에서 좋지 않은 결과가 발생하게 되는데, 이는 여러 항암제의 병용에 따른 항암제의 독성에 의한 사망이나 약물에 대한 부작용이 발생하기 때문이다.

현재 60% 이상의 생존율은 두 가지 이상의 약제의 복합적 사용으로 가능하지만, 이들 약의 효능은 서로가 부가적 (additive)이지 못한데, 이는 약효가 다소 중복되기 때문이다. 또한, 약제의 복합적 사용으로 약물의 독성이 증가하게 되어, 이로 인한 투약의 중단 및 투약 cycle의 간격이 연장되고, 이에 따른 약효의 감소와 약물 저항성이 증가하게 된다. 약물의 부작용은 거의 모든 장기에서 발생하게 되는데, 소화기, 신장, 신경, 심장, 간, 호흡기,

비뇨기, 청각기 및 조혈 기관의 독성 및 탈모증 등이 발생한다. 따라서, 수술적으로 종양과 전이 병소를 절제할 뿐만 아니라 적절하고 효과적인 약물을 최소한 사용하여 최대한의 항암 효과를 얻고 부작용을 줄이며, 약물에 대한 저항성이 생기지 않도록 하는 것이 치료의 원칙일 것이다. 현재는 전형적인 골육종 (classical osteosarcoma)에 대해서는 high dose-methotrexate (HD-MTX), Adriamycin, cisplatin, ifosfamide 등이 주로 쓰여지고 있으나, 전술한 바와 같이 많은 부작용이 발생된다. 따라서, 향후에 좀더 생리적이면서도 강력하고 효과적인 약물이 개발된다면 현재 난국에 봉착한 골 육종의 치료에 있어서, 나머지 30 ~ 40%의 생존율의 증가를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

근래에 생존율을 더욱 높이기 위해서 강력한 초 강력 항암 화학 요법 (ultra-aggressive chemotherapy)이 대두가 되었지만, 과연 어느 환자에서 이러한 강력한 항암제 치료가 진정으로 필요할 지는 아직까지 밝혀진 바가 없으며, 이 요법의 부작용으로 급성 독성 효과와 장기적 합병증, 신장과 심장의 독성, 그리고 속발성 신생 종양 (secondary malignancy)의 발생 및 사망의 가능성이 있다. 또한, 다량의 여러 항암제 투여로 인해 조혈 기관에 대한 독성으로 성장 인자 (growth factor)를 투여해야 하는 경제적인 문제도 발생한다. 따라서, 항암제의 선택 시에는 이러한 위험 요소를 고려한 차별화된 단계적인 접근 방법이 필요하다. <sup>1</sup>

Rosen 등 <sup>19</sup>에 의한 술전 화학 요법 (neoadjuvant chemotherapy)의 도

입으로 약물에 대한 효과의 분석이 가능하기 때문에 수술 후에 병리 조직 검사상 약물이 효과적인 경우에는 수술 전과 동일한 약으로 투여하지만, 효과적이지 않은 경우에는 다른 항암제로 바뀌서 투여할 수 있는 장점이 있다. 반면에 기존 항암제에 효과적이지 못한 경우에는 지속적인 골 육종의 성장과 전이가 가능하고 더 많은 양의 항암제가 투여 되어야 하는 단점이 있으며, 이미 수술 전에 썼던 약물에 노출이 되었으므로 이 약물에 대한 저항성을 가지게 된다. 최근에는 영상 의학의 발달로 자기 공명 영상 (MRI)을 이용하여 수술 전 화학 요법의 평가가 수술 전에 어느 정도 가능하게 되었으며, 수술 전에 효과 있는 다른 항암제로의 교체가 가능하게 되었다. 자기 공명 영상 외에도 단순 방사선 촬영, 혈관 조영술 (angiography), Tl 201 scan이나 Tc-99m MIBI (methoxyisobutylisonitrile) 등을 이용하여 수술 전에 항암 효과를 평가할 수 있다.<sup>20</sup>

HD-MTX는 골수 억제 작용 등의 부작용이 비교적 적으므로 골 육종에서 흔히 사용되며, 수술 전 항암 화학 요법 시에 최고 혈중 농도를 1,000  $\mu$ M 이상으로 높게 유지해야 종양의 괴사율이 높다고 한다.<sup>21</sup> Doxorubicin (Adriamycin)은 현재 가장 효과적인 약으로 알려져 있으나, 총 축적량에 따른 심장 독성이 문제가 된다.<sup>1</sup> 일반적인 치료법으로 일차적으로 HD-MTX 와 Doxorubicin을 투여하고 수술 후에 결과가 안 좋으면 cisplatin과 HD-ifosfamide를 투여하며, 기존 항암제에 대한 저항성인 종양의 경우에는 좀

더 개별적인 치료 방침이 필요한데, 적극적인 추시 관찰을 통하여 재발을 조기에 발견하고, 재발 시에는 이전에 쓰지 않았던 약제를 투여함으로써 다중 약물 저항성 (multidrug resistance)의 발생을 조기에 억제할 수 있고, 나머지의 효용 가능한 약제를 복합해서 투여하게 되는데, 이때 마지막으로 골 육종에 효과적으로 사용 가능한 약제가 필요하다. 따라서, 골 육종에 효과적인 새로운 약제의 개발이 절실하다.

골 육종과 금속인 아연과의 연관성에 대한 연구는 약 20여 년 전부터 시작이 되었다. 1976년 Fisher 등<sup>12</sup>은 12명의 환자를 대상으로 혈청 내 아연의 농도를 관찰한 결과에서 전이성 골 육종 환자에서는 원발성 및 사지 절단으로 치료한 환자보다 낮은 농도를 보였고, 원발성 골 육종 환자에서는 정상인보다 높은 수치를 보였고, 신생 혈관 생성에 중요한 구리 (copper)와 아연의 비율 (SCL/SZL)이 높을수록 질병이 진행된 경우이며 예후도 좋지 않았다고 하였으나, 상당히 제한된 환자 수로 인하여 좀더 많은 수집 및 연구가 필요하다. 이후 1978년 Breiter 등<sup>22</sup>은 18명의 골 육종 환자에서 조사한 결과 구리/아연의 비율은 병의 진행과 무관하며, 아연의 혈중 농도는 정상과 차이가 없다고 발표하였다. 아연의 골 육종에서의 생체 내 항암 효과는 아직까지는 발표된 바가 없으나, 1990년 일본의 Noda<sup>23</sup>가 염화 카드뮴 (CdCl<sub>2</sub>)과 염화 아연 (ZnCl<sub>2</sub>)을 처음 실험적으로 사용하였는데, 염화 아연의 경우에 최하 5 μM에서 최고 100 μM의 농도로 쥐의 육종 세포들 (murine

sarcoma cells)에서 in vitro 실험을 하였을 때, 최고 농도인 100  $\mu$ M에서 생존하는 골 육종 세포를 확인할 수 없었다고 하였다. 그러나, in vivo 실험에서는 염화 아연은 대조군인 생리 식염수를 투여한 군과 비교해서 종양 크기의 변화에서 차이가 없었으며, 염화 카드뮴만이 “Dunn 골 육종”에서 효과적이었고, 염화 아연은 생체 내에서 항암 효과가 전혀 없었다고 발표하였다. 그런데, 이와 같은 결과는 아연의 투여량, 조직 내 아연의 축적도, 혈청 내 아연의 단백질과의 결합 속도 및 해리 상태의 차이에 기인한다고 설명하였다.<sup>23</sup>

아연은 우리 몸의 생화학적인 역할에서 가장 중요한 미량원소의 하나로서 세포의 증식과 면역, 활성 산소 (free radical)에 대한 방어, DNA 염색질 (chromatin)의 구성 요소로서 DNA의 복제 (replication)와 복구 (repair) 등에 관여하는 물질이며, 2,000개 이상의 아연 관련 transcription factor와 300개 이상의 DNA-binding protein에 필수적인 요소이다.<sup>24,25,26</sup> 또한, 아연은 항산화 (antioxidant), 항염 (anti-inflammatory), 항암 작용 (proapoptotic action)을 가지며,<sup>27</sup> 특히 전립선에서는 암의 예방 및 치료 효과가 있는 것으로 최근에 발표되고 있다.<sup>28</sup> 그리고, p53 종양 억제 인자 (tumor suppressor)의 DNA binding과 전사에 중요한 요소로 알려져 있으며,<sup>29</sup> 최근의 몇몇 연구에서는 아연의 체내 농도가 암의 발생과 연관이 있다는 보고가 있다.<sup>2, 30</sup>

동물 실험에서 아연의 식이 섭취 결핍은 식도의 과증식



(hyperplasia)을 일으키며, 종양을 유발시키지 못할 정도로 아주 적은 양의 NMBA (N-nitrosomethylbenzylamine)에 의해서도 아연 결핍 시에는 식도암을 유발한다고 하였다.<sup>31</sup> 또한, cis-platinum이나 daunorubicin과 같은 항암제에 의한 이차적인 발암 현상은 염화 아연을 투여하여 메탈로치오닌 (metallothionein)을 유도하면 억제할 수 있다는 보고들도 있다.<sup>32, 33</sup>

아연이 전립선 암에서 다른 장기보다 활발한 연구가 진행되는 이유는 전립선의 특이한 성질 때문이다. 즉, 정상 전립선 세포는 다른 조직에 비해 아연과 구연산 (citrate)의 농도가 높는데, 전립선 암 세포는 정상의 전립선 세포와 달리 아연과 구연산의 농도가 낮고 타 장기의 정상 세포 수준이다. 이는 정상 전립선 세포는 구연산을 생성 (citrate-producing)하기 때문인데, 이는 mitochondrial-aconitase (m-aconitase)가 적어서 Krebs cycle에서 구연산을 산화시키는 양이 적기 때문에 가능하다. 그러나, 전립선 암세포는 구연산을 산화 (citrate-oxidizing)시키기 때문에 그 양이 적어지는데, 이때 아연은 구연산을 cis-aconitate로 만드는데 관여하는 효소인 m-aconitase에 대해서 경쟁적인 억제자로서 작용하게 된다.<sup>34</sup> 미토콘드리아의 아연은 m-aconitase를 억제하고, 이는 구연산의 산화를 방해하게 된다. 본 실험에서 측정한 결과도 악성 골 육종 세포의 세포 내 아연 농도는 7.5  $\mu\text{mol/L}$ 로서 정상 섬유 모세포의 19.5  $\mu\text{mol/L}$ 에 비해서 아연을 축적시키는 능력이 감소 되어있어, 아연의 감소는 구연산의 산화를 가능하게 함으로써 보다 에너지 효율적인 세포가 되

었다고 볼 수 있다.

아연 (free zinc)은 그 농도 혹은 세포에 따라서 세포 고사를 억제하기도 하며 반대로 촉진시키는 역할을 하기도 한다. 1995년 Provinciali 등<sup>35</sup>은 쥐의 흉선 세포 (mouse thymocyte)에서 높은 농도 (600~75  $\mu$ M)의 아연에서는 세포 고사를 억제시킨 반면, 낮은 농도 (15~7.5  $\mu$ M)에서는 세포 고사를 증가시켰다고 발표하였으며, 2001년 Schrantz 등<sup>10</sup>은 human Burkitt lymphoma B cell에서 10~50  $\mu$ M의 낮은 농도의 아연은 caspase 3를 억제하여 세포 고사를 억제하지만, 50~100  $\mu$ M의 높은 농도에서는 caspase 3를 활성화시켜 세포 사멸을 촉진한다고 하였다. 인 망막 색소 세포 (human retinal pigment epithelial cell)에서 아연 이온 ( $Zn^{2+}$ )이 세포 내 ROS (reactive oxygen species)를 유도해서 세포를 사멸 시키며, 이는 extracellular signal regulated kinase (ERK) 1/2, JNK 1/2/3, p38 MAPKs를 활성화시키고, 이들 MAPK(mitogen-activated protein kinase)의 활성화를 통해서 100  $\mu$ M 정도의 낮은 아연 농도에서는 세포 고사를, 1mM 정도의 높은 농도에서는 이차적인 세포 괴사를 나타낸다는 보고도 있다.<sup>36</sup> 이와 같이 아연은 농도와 세포의 종류에 따라서 여러 가지 상이한 결과를 보여주고 있다. 본 실험에서는 저 농도(0.1mM 아연+2.5mM 구연산)에서는 골 육종 세포에 변화가 없었고, 중등도 농도 (0.3mM 아연+7.5mM 구연산)에서는 세포 고사, 고 농도 (0.5mM 아연 + 12.5mM 구연산)에서는 세포 괴사가 관찰되었다.

그리고, in vivo에서 아연에 의한 세포 고사의 조절은 훨씬 복잡해서 Down 증후군 환자에서는 혈중에 아연의 농도가 낮으며, 이 때에는 말초 혈액에서 immature myeloid cell 뿐만 아니라 고사된 말초 혈액 세포 (apoptotic peripheral blood cell)가 다수 관찰 되지만, 아연의 보충 시에는 세포 고사 작용으로 immature myeloid precursor cell이 소실되고, 고사된 말초 혈액 세포는 감소되는 상반된 현상이 나타나게 되므로 세포사멸에 관한 아연의 작용은 상당히 복잡한 기전이 존재함을 알 수 있다. <sup>37, 38</sup>

아연이 세포의 어느 곳에서 작용하여 세포사멸을 일으키는지에 대한 가설이 많이 있는데, 아연이 +2가의 이온으로서 중양의 신생 혈관 형성을 방해하는 endostatin과 결합하여 암 전이를 막는데 작용 한다고도 하며, <sup>39</sup> Park 등 <sup>6</sup>은 세포 외부의 아연이 ERK에 의한 p21<sup>Cip/WAF1</sup>의 활성화로 대장암의 치료가 가능하다고 하였으며, Prasad 등<sup>24</sup>은 아연이 항산화제 (antioxidant)이면서 NF- $\kappa$ B를 활성화 시키고, 이는 DNA에 작용하여 IL-2를 활성화 시켜 면역이 증강되고, ROS를 없애주는 metallothionein을 유도하므로 암의 예방에도 효과적이라고 하였다. 반면에, Kim 등<sup>40</sup>은 아연과 아연의 ionophore인 pyrithione이 시간과 농도 의존성으로 NF- $\kappa$ B의 활성화를 억제하였으며, 이를 통해서 소의 뇌 내피 세포에 세포 독성을 나타낸다고 하였다. Costello 등 <sup>28</sup>은 전립선 암 세포에서 아연이 미토콘드리아에 작용하여 cytochrome C의 유리를 통한 apoptotic cascade를 통해 세포 고사가 일어난다고 발표하였다. <sup>5, 28</sup> 백혈병 세

포주 (HL-60 cell line)에서는 아연의 ionophore인 pyrrithione (py)을 사용하여 세포 내로 아연을 이동시켜 줌으로써, P38 MAPK를 통한 caspase의 활성화에 의해서 세포사멸이 가능하였고, 낮은 농도에서는 세포 고사를 높은 농도에서는 세포 괴사가 발생하였으며, 아연의 세포 내로의 이동이 없을 시에는 세포사멸이 거의 나타나지 않았다고 보고되었다. <sup>4</sup> Jeong 등<sup>41</sup>은 MTX-LDH (methotrexate-layered double hydroxide) 혼성체를 만들어 세포 내로 메토틀렉세이트 유입을 증가 시켰다고 하였으며, 본 실험에서는 아연에 구연산을 첨가함으로써, 아연-구연산 복합물로서, 아연이 세포 내로 쉽게 진입되도록 하였다. 한편, Kim 등<sup>42</sup>은 아연과 아연의 ionophore인 pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC)는 ubiquitin-proteasome에 의한 단백질 분해를 억제하며, proteasome의 기질인 p21, p53의 반감기가 길어지며, 따라서 p21이 증가된다고 하였으며, 부분적으로 PDTC에 의한 p21의 신생 합성 (de novo synthesis)이 관찰된다고 하였다.

유방암 세포주에서는 p53의 wild 혹은 mutant type에 따라서 signal pathway가 달라지게 되는데, 에스트로겐 수용체가 있고, wild type p53인 세포주에서는 아연의 신호 전달은 p53과 p21<sup>Cip/WAF1</sup>을 통한 세포 고사로 진행되지만, 에스트로겐 수용체가 없고, p53 mutant type의 세포주에서는 Akt, cyclin D1을 통한 세포의 증식이 진행되므로, 기능하는 p53의 존재 여부가 아연에 의한 세포 생사의 역할에서 중요하다는 보고가 있다. <sup>8</sup> p53 mutant형은 실제로 인간

암의 50%이상에서 발현되며, 보통 cisplatin과 같은 약제에 저항성이므로, 이때에는 아연을 제거하는 것이 암의 치료에 도움이 될 것이다. 따라서, tachpyridine과 같은 iron & zinc chelator가 오히려 세포의 증식을 억제할 것이라는 주장도 있다.<sup>43</sup> 그러나, 본 실험에서는 p53 mutant형인 골 육종 세포에서 아연-구연산 복합물은 p53과 무관한 p21의 증가를 보였고, 결과적으로 G2기에서 세포의 분열이 정지됨을 볼 수 있었다.

Bcl-2는 세포 고사를 조절하는 중요한 단백질이다. 이는 세포 고사를 억제하며,<sup>44</sup> Bax와 함께 세포의 생사를 조절하는 중요한 역할을 한다.<sup>45</sup> Bax는 미토콘드리아의 외막에 작용하여 막공 (pore)을 형성하여 cytochrome c와 같은 세포 고사에 필요한 단백을 세포질로 방출하게 하는 세포 고사에 있어 중요한 단백질이다.<sup>46</sup> 본 실험에서는 골 육종 세포주에서 아연-구연산 복합물의 투여로 인해 Bcl-2의 쇠퇴 및 Bax 단백질의 활성화에 의한 caspase-3의 활성화에 의해 세포 고사가 발생하였다.

결론적으로, 아연-구연산 복합물은 골 육종 세포의 세포 고사를 일으키는데, 이는 p53과 관련 없는 p21의 활성화와 항 고사 인자인 Bcl-2의 쇠퇴 및 고사 인자인 Bax 단백질의 활성화에 의한 caspase-3에 의한 것이다.

## V. 결 론

아연-구연산 복합물이 골 육종 세포에서 세포 고사를 일으킴을 처음으로 발견 하였으며, 이러한 세포 고사는 세포 내의 다양한 anti-apoptotic gene과 pro-apoptotic gene을 자극해서 일어났음을 부분적으로 확인할 수 있었다. 앞으로 동물 실험을 통한 생체 내에서의 아연-구연산 복합물이 항암 효과가 있는지가 밝혀진다면 이는 향후에 사용 가능한 또 하나의 항암 치료제가 될 수 있으리라 생각된다.

## 참고 문헌

1. Bruland ØS, Pihl A. On the current management of osteosarcoma. A critical evaluation and a proposal for a modified treatment strategy. *Eur J Cancer* 1997;33:1725-1731.
2. Zowczak M, Iskra M, Torlinski L, Cofta S. Analysis of serum copper and zinc concentrations in cancer patients. *Biol Trace Elem Res* 2001;82:1-8.
3. Iitaka M, Kakinuma S, Fujimaki S, Oosuga L, Fujita T, Yamanaka K, et al. Induction of apoptosis and necrosis by zinc in human thyroid cancer cell lines. *J Endocrinol* 2001;169:417-424.
4. Kondoh M, Tasaki E, Araragi S, Takiguchi M, Higashimoto M, Watanabe Y et al. Requirement of caspase and p38MAPK activation in zinc-induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells. *Eur J Biochem* 2002;269:6204-6211.
5. Feng P, Li TL, Guan ZX, Franklin RB, Costello LC. Direct effect of zinc on mitochondrial apoptogenesis in prostate cells. *Prostate* 2002;52:311-318.
6. Park KS, Ahn Y, Kim JA, Yun MS, Seong BL, Choi KY. Extracellular zinc stimulates ERK-dependent activation of p21 (Cip/WAF1) and inhibits proliferation of colorectal cancer cells. *Br J Pharmacol* 2002;137:597-607.

7. Park LO, Yoon JH, Kim JD, Seo JT, Bae SN. Necrotic cell death of ovarian adenocarcinoma caused by seminal plasma. *Gynecol Oncol* 2004;93:671-679.
8. Ostrakhovitch EA, Cherian MG. Differential regulation of signal transduction pathways in wild type and mutated p53 breast cancer epithelial cells by copper and zinc. *Arch Biochem Biophys* 2004;423:351-361.
9. Zowczak M, Iskra M, Paszkowski J, Manczak M, Torlinski L, Wysocka E. Oxidase activity of ceruloplasmin and concentrations of copper and zinc in serum of cancer patients. *J Trace Elem Med Biol* 2001;15:193-196.
10. Schrantz N, Auffredou MT, Bourgeade MF, Besnault L, Leca G, Vazquez A. Zinc - mediated regulation of caspase activity: dose-dependent inhibition or activation of caspase-3 in the human Burkitt lymphoma B cells (Ramos). *Cell Death Differ* 2001;8:152-161.
11. Nemoto K, Kondo Y, Himeno S, Suzuki Y, Hara S, Akimoto M et al. Modulation of telomerase activity by zinc in human prostatic and renal cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2000;59:401-405.
12. Fisher GL, Byers VS, Shifrine M, Levin AS. Copper and zinc levels in serum from human patients with sarcomas. *Cancer* 1976;37:356-363.



13. Lee SH, Park Y-B, Kim HS, Kim CJ, Kim WJ, Lee HK. Immunohistochemical expression of p53 protein and P-glycoprotein and its prognostic significance in osteosarcoma. *J Korean Orthop Assoc* 1999;34:859-866.
14. Trieb K, Kotz R. Proteins expressed in osteosarcoma and serum levels as prognostic factors. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33:11-17.
15. Oh JH, Lee SH, Cho WS, Yoo KH, Kim JS, Gong HS et al. Expression of p21, p27 in osteosarcoma and its prognostic significance. *J of Korean Bone Joint Tumor Soc* 2003;9:169-177.
16. Telford WG, King LE, Fraker PJ. Rapid quantitation of apoptosis in pure and heterogeneous cell populations using flow cytometry. *J Immunol Method* 1994;172:1-16.
17. Leszczynski D, Fagerholm S, Leszczynski K. The effects of the broadband UVA radiation on myeloid leukemia cells: the possible role of protein kinase C in mediation of UVA-induced effects. *Photochem Photobiol* 1996;64:936-942.
18. Meyers PA, Heller G, Healey J, Huvos A, Lane J, Marcove R et al. Chemotherapy for nonmetastatic osteogenic sarcoma: the Memorial Sloan-Kettering experience. *J Clin Oncol* 1992;10:5-15.
19. Rosen G, Marcove RC, Caparros B, Nierenberg A, Kosloff C, Huvos AG. Primary osteogenic sarcoma: the rationale for preoperative chemotherapy and delayed surgery. *Cancer* 1979;43:2163-2177.

20. Tsuchiya H, Tomita K, Mori Y, Asada Y, Yamamoto N. Marginal excision for osteosarcoma with caffeine assisted chemotherapy. *Clin Orthop* 1999;358:27-35.
21. Son JW, Kim JD, Jung SH, Jang JH, Lee SM, Kim C et al. Tumor necrosis rate to peak serum level of MTX in the preoperative chemotherapy of osteosarcoma. *J Korean Orthop Assoc* 2003;8:372-377.
22. Breiter DN, Diasio RB, Neifeld JP, Roush ML, Rosenberg SA. Serum copper and zinc measurements in patients with osteogenic sarcoma. *Cancer* 1978;42:598-602.
23. Noda K. The effect of CdCl<sub>2</sub> and ZnCl<sub>2</sub> on Dunn osteosarcoma. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 1990;64:70-75.
24. Prasad AS, Kucuk O. Zinc in cancer prevention. *Cancer Metastasis Rev* 2002;21:291-295.
25. Ho E. Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. *J Nutr Biochem* 2004;15:572-578.
26. Wellinghausen N, Kirchner H, Rink L. The immunology of zinc. *Immunol Today* 1997;18:519-521.
27. Singh KD, Zaidi SI, Raisuddin S, Saxena AK, Murthy RC, Ray PK. Effect of zinc on immune functions and host resistance against infection and tumor challenge. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1992;14:813-840.

28. Costello LC, Feng P, Milon B, Tan M, Franklin RB. Role of zinc in the pathogenesis and treatment of prostate cancer: critical issues to resolve. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2004;7:111-117.
29. Meplan C, Richard MJ, Hainaut P. Metalloregulation of the tumor suppressor protein p53: zinc mediates the renaturation of p53 after exposure to metal chelators in vitro and in intact cells. *Oncogene* 2000;19:5227-5236.
30. Wu T, Sempos CT, Freudenheim JL, Muti P, Smit E. Serum iron, copper and zinc concentrations and risk of cancer mortality in US adults. *Ann Epidemiol* 2004;14:195-201.
31. Fong LY, Lau KM, Huebner K, Magee PN. Induction of esophageal tumors in zinc-deficient rats by single low doses of N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA): analysis of cell proliferation, and mutations in H-ras and p53 genes. *Carcinogenesis* 1997;18:1477-1484.
32. Satoh M, Kondo Y, Mita M, Nakagawa I, Naganuma A, Imura N. Prevention of carcinogenicity of anticancer drugs by metallothionein induction. *Cancer Res* 1993;53:4767-4768.
33. Ali MM, Frei E, Straub J, Breuer A, Wiessler M. Induction of metallothionein by zinc protects from daunorubicin toxicity in rats. *Toxicology* 2002;179:85-93.

34. Costello LC, Liu Y, Franklin RB, Kennedy MC. Zinc inhibition of mitochondrial aconitase and its importance in citrate metabolism of prostate epithelial cells. *J Biol Chem* 1997;272:28875-28881.
35. Provinciali M, Stefano GD, Fabris N. Dose-dependent opposite effect of zinc on apoptosis in mouse thymocytes. *Int J Immunopharm* 1995;17:735-744.
36. Song J, Lee SC, Kim SS, Koh HJ, Kwon OW, Kang JJ et al. Zn<sup>2+</sup>-induced cell death is mediated by the induction of intracellular ROS in ARPE-19 cells. *Curr Eye Res* 2004;28:195-201.
37. Trubiani O, Antonucci A, Palka G, Di Primio R. Programmed cell death of peripheral myeloid precursor cells in Down patients: effect of zinc therapy. *Ultrastruct Pathol* 1996;20:457-462.
38. Antonucci A, Di Baldassarre A, Di Giacomo F, Stuppia L, Palka G. Detection of apoptosis in peripheral blood cells of 31 subjects affected by Down syndrome before and after zinc therapy. *Ultrastruct Pathol* 1997;21:449-452.
39. Boehm T, O' Reilly MS, Keough K, Shiloach, J, Shapiro R, Folkman J. Zinc-binding of endostatin is essential for its antiangiogenic activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;252:190-194.
40. Kim CH, Kim JH, Moon SJ, Chung KC, Hsu CY, Seo JT et al. Pyritione, a zinc ionophore, inhibits NF- $\kappa$ B activation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;259:505-509.

41. Jeong J, Kang Y-K, Song H-W, Han O-J, Ok I-Y, Jung J-S et al. The inhibitory effect of methotrexate-layered double hydroxide (LDH) hybrid on osteosarcoma cell lines. *J Korean Orthop Assoc* 2004;39:56-62.
42. Kim I, Kim CH, Kim JH, Lee J, Choi JJ, Chen ZA et al. Pyrrolidine dithiocarbamate and zinc inhibit proteasome-dependent proteolysis. *Exp Cell Res* 2004;298:229-238.
43. Zhao R, Planalp RP, Ma R, Greene BT, Jones BT, Brechbiel MW et al. Role of zinc and iron chelation in apoptosis mediated by tachpyridine, an anti-cancer iron chelator. *Biochem Pharmacol* 2004;67:1677-1688.
44. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990;348:334-336.
45. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281:1322-1326.
46. Basanez G, Nechushtan A, Drozhinin O, Chanturiya A, Choe E, Tutt S et al. Bax, but not Bcl-xL, decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:5492-5497.

Abstract

**Cytotoxic effect of zinc compound on osteosarcoma cell line**

Hong Jun Park

*Department of Medicine*  
*The Graduate School, Yonsei University*  
(Directed by Professor Soo Bong Hahn)

Because of the advent of chemotherapy in osteosarcoma limb salvage procedure has become possible and the survival rate of the patients has improved. Yet, there are still problems such as drug resistance and relapse. Multi-drug resistance is one of the major causes of this treatment failure in patients with osteosarcoma. Recent studies have shown that zinc, as a mineral component, has cytotoxic and apoptotic effects on various cancer cell lines of lymphocyte, breast, prostate, ovary, and colon. However, there has been little systematic study regarding the effect of zinc on the osteosarcoma cell line. This study investigates the biological and molecular effects of zinc on the osteosarcoma cell line *in vitro* study by comparing the osteosarcoma cell with normal fibroblast cell.

Primary cultured normal fibroblast (CCD-1120Sk) and osteosarcoma cells (MG-63) were exposed to different concentrations of zinc chloride and zinc-citrate compound. Each was cultured for various time durations. Then,

the cell viability was assessed by CCK-8 assay. The cytotoxic effect on cell cycle was evaluated with flow cytometry and the apoptosis was confirmed by the DNA laddering using the agarose gel electrophoresis. I checked the activity of p21<sup>WAF1</sup>, Bax, Bcl-2, procaspase-3 using the Western blot analysis and caspase-3 activity by ELISA to check the molecular mechanism of apoptosis.

The CCK-8 assay revealed that the zinc-citrate compound rather than zinc only, *in vitro* condition, had distinguishably cytotoxic effects on osteosarcoma cell line in proportion to the dose and time comparing with the normal fibroblast. The flow cytometry and the DNA laddering analysis further showed the apoptosis of the osteosarcoma cells by the particular zinc-citrate compound (0.3mM zinc and 7.5mM citrate). The molecular mechanisms of apoptosis are associated with inactivation of Bcl-2, enhancement of Bax, and activation of caspase-3.

In conclusion, this study shows that zinc-citrate compound induces apoptosis of osteosarcoma cells. The zinc-citrate compound is expected to be a new regimen of the chemotherapy although *in vivo* investigations should follow to ascertain the clinical relevance.

---

Key Words: Osteosarcoma, Zinc, Citrate, Viability assay