사람 위암 및 대장암 세포주에서 hydroxychloroquine이 다중약제내성 극복에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의과학사업단

박 준 오

사람 위암 및 대장암 세포주에서 hydroxychloroquine이 다중약제내성 극복에 미치는 영향

지도 노 재 경 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2000년 12월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

박 준 오

박준오의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2000년 12월 일

감사의 글

미숙한 저의 논문이 완성되기까지 세심한 지도와 열성으로 이끌어 주신 노재경 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한, 본 연구 기간 중 항상 관심을 가지고 조언해 주신 김경환 교수님, 김주항 교수님, 김호근 부교수님과 김원호 부교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 모든 것이 미숙했던 제게 세포의 배양과 여러 가지 술기를 가르쳐 주셨던 유내춘 조교수님과 암연구소 김태수 선생님께도 감사를 드립니다. 바쁜 중에도 저의 어려운 점들을 항상 친절히 도와준 암연구소 박규헌 선생님, 송재진 박사님, 신성진, 김재성, 김은희, 이보영 연구원에게도 감사의 마음을 전하고 싶습니다.

항상 바쁜 아들을 이해하시고 아낌없는 사랑으로 감싸주시는 부모님, 늘 기도해주시는 장모님, 곁에서 내조를 아끼지 않는 사랑하는 아내 현진과 딸 선민에게 이 논문을 드립니다.

그리고, 제게 이 모든 것을 허락해 주신 하나님께 모든 영광을 돌립니다.

저 자 씀

차 례

그 림 차 례

표 차 례

국문요약

사람 위암 및 대장암 세포주에서 hydroxychloroquine이 다중약제내성 극복에 미치는 영향

다중약제내성은 암 치료실패의 중요한 원인이며, P-당단백의 과발현이 다중약제내성의 주요인자로 인정되고 있다. P-당단백은 170 kD의 세포막 단백질로서 약물배출펌프로 작용하며, 이의 과발현으로 인한 다중약제내성은 여러 약제에 의하여 극복될 수 있으나, 그 독성이 문제점으로 지적된 바 있다. 최근 연구에서 항말라리아 약제인 chloroquine의 투여로 P-당단백에 의한 다중약제내성 극복의 가능성을 보고한 바 있으나, 비교적 임상독성이 낮은 hydroxychloroquine에 대한 연구는 아직 없는 실정이다. 본 연구는 사람 위암 및 대장암 세포주에서 P-당단백의 발현을 조사하고, hydroxychloroquine이 P-당단백의 발현, 세포내 약물 농도, 세포내 pH 변화 및 세포독성도에 미치는 영향을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 본 연구에서 사용된 사람 위암(YCC-2,3,7) 및 대장암(HT29, HCT15) 세포주 중 YCC-2를 제외한 모든 세포주에서 *mdr1* 유전자 및 P-당단백의 발현이 관찰되었다. HT29, HCT15, YCC-3 및 YCC-7 세포주에서 P-당단백의 발현지수(expression factor)는 각각 4.62, 13.1, 5.93, 7.19로 P-당단백의 발현을 확인할 수 있었으며, YCC-2 세포주의 발현지수는 1.65로 P-당단백이 발현되지 않았다.

2. 본 연구에서 사용된 사람 위암 및 대장암 세포주는 모두 doxorubicin과 DDP (cis-diamminedichloroplatinum)에 대하여 강한 내성을 보였으며(IC_{50}=0.30 9.77 μg/ml for doxorubicin; 2.24 14.8 μg/ml for DDP), hydroxychloroquine 투여 후 doxorubicin과 DDP에 대한 약제감수성이 증가하였다. 그러나, DDP에 대한 약제감수성은 hydroxychloroquine 30 μg/ml을 투여하였을 경우에만 증가하였다. 또한, hydroxychloroquine 30 μg/ml 투여시 P-당단백이 발현되지 않은 YCC-2 세포주에서도 doxorubicin에 대한 약제감수성이 증가하는 것이 관찰되었다.

3. 각 세포주에서 hydroxychloroquine 투여 후 doxorubicin에 대한 내성극복정도는 P-당단백의 발현정도와 밀접한 상관관계를 보였으나(R^2=0.90 for hydroxychloroquine 15 μg/ml; 0.84 for hydroxychloroquine 30 μg/ml), DDP의 경우에는 관련이 없었다.

4. P-당단백이 발현된 세포주에서 hydoxychloroquine 투여 후 24시간까지 세포막 P-당단백의 발현이 27.1 82.8% 감소되었으며, hydroxychloroquine 30 μg/ml 투여시 더욱 의미있게 감소되었다.

5. Hydroxychloroquine은 세포내 doxorubicin의 농도는 증가시키고, 세포 밖으로의 배출은 억제시켰다. 세포내 doxorubicin 농도는 hydroxychloroquine 30 μg/ml을 투여하였을 때 더욱 의미있게 증가하였으며, P-당단백이 발현된 세포주에서 세포내 doxorubicin의 축적 농도는 P-당단백 발현감소와 밀접한 상관관계를 보였다(R^2=0.96 for HT29; 0.78 for HCT15; 0.64 for YCC-3; 0.71 for YCC-7).

6. Hydroxychloroquine은 세포내 pH를 상승시키는 경향을 보였으나, 세포독성도와는 관련이 없었다.

이상의 결과로 hydroxychloroquine은 P-당단백의 발현을 억제하여 다중약제내성을 극복하는 유용한 약제로 생각된다. 그러나, P-당단백이 발현되지 않거나, P-당단백에 의한 내성과 관련이 없는 약제에서도 약제감수성이 증가되는 것으로 보아 hydroxychloroquine에 의한 약제감수성 증가 기전에는 P-당단백을 억제하는 것 이외에 다른 기전이 존재할 수 있음을 시사하며, 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

핵심되는 말: 다중약제내성, P-당단백, hydroxychloroquine

사람 위암 및 대장암 세포주에서 hydroxychloroquine이 다중약제내성 극복에 미치는 영향

＜지도 노 재 경 교수＞

연세대학교 대학원 의과학사업단

박 준 오

I. 서 론

최근 급성 백혈병 및 악성 림프종, 고환암 등의 일부 고형암에서 항암화학요법에 의한 치료성적이 괄목할 만하게 향상되었으나,[1] 항암제에 대한 암세포의 내성은 여전히 암치료에 있어 중요한 장애요인으로 남아있다.[2] 암세포가 항암제에 대하여 내성을 가지게 되는 기전으로는 약동학적인 요인, 병리세포형과 생물학적 특성, 개체의 면역반응, 약제투여경로 및 세포단위에서의 약제내성 등이 제시되고 있다.[3,4] 이 중 세포단위에서의 약제내성이 가장 중요한 기전으로 생각되며, 한 가지 약제에 내성이 생긴 암세포가 화학적 구조가 전혀 다른 항암제에 대해서도 동시에 내성을 가지게 되는 경우를 다중약제내성(multidrug resistance, MDR)이라 한다.[2,5]

1960년대 말 Kessel 등은 저용량의 vinblastine에 지속적으로 노출됨으로써 vinblastine에 대한 내성을 획득한 P388 백혈병 세포주가 dactinomycin, vincristine 및 daunorubicin에 교차내성을 나타내는 것을 관찰하였고,[6] Biedler 등은 이러한 현상을 다중약제내성이라 명명하였다.[7] Ling 및 Thomson은 다중약제내성을 가진 Chinese hamster 난소암 세포의 막에서 170 kD 크기의 표면 당단백이 증가되어 있음을 발견하여 P-당단백이라 명명하였으며, 이것이 세포내 약물의 농도를 감소시키는 작용을 하여 항암제의 다중약제내성과 관련이 있음을 보고하였다.[8] P-당단백은 칼슘과 ATP를 이용하여 세포내로 들어온 항암제를 세포 밖으로 능동적으로 내보내는 펌프 역할을 하며, 따라서 세포내 항암제 농도를 낮추고 항암제의 세포독성도를 감소시킨다.[9,10] 다중약제내성에 관련되는 항암제로는 doxorubicin과 daunorubicin 등의 anthracycline계 약물, vincristine과 vinblastine 등의 vinka alkaloid계 약물, etoposide 등의 epipodophyllotoxin계 약물 및 기타 actinomycin-D, taxol 등의 항암제가 있으며, 이들 항암제 간에는 교차내성이 존재한다.[2,5,11] 이들 항암제는 소수성 약물들로서 복잡한

환구조로 이루어져 있으며, 양전하의 질소 그룹을 가지고 있고, 수동적으로 세포내로 확산된다는 공통점이 있다.[5] 1986년 Gros 등에 의하여 P-당단백 유전자에 대한 cDNA의 염기배열순서가 규명됨에 따라 다중약제내성과 관련된 *mdr1* 유전자의 존재가 밝혀지게 되었다.[12] P-당단백은 1,280개의 아미노산으로 구성되어 있으며 hemolysin B, leukotoxin, histidine 등의 수송을 담당하는 수송단백질과 구조가 유사하고, 박테리아나 효모에서도 이와 유사한 수송단백질이 존재함이 알려져 있다.[13-15] 또한, P-당단백은 암세포에서만 특이적으로 발견되는 것이 아니라, 대장 및 소장, 부신, 신장, 간 등의 정상세포에서도 발견되며, 세포내로 들어온 세포독성물질을 세포 밖으로 내보내는 일반적인 수송단백질의 일종으로 생각되고 있다.[16] 특히 P-당단백은 간세포의 담도쪽이나 신장 근위세뇨관의 내강 표면, 대장 및 소장 점막의 원주세포, 부신의 피질과 수질에 주로 분포하는 것으로 알려져 있다.[17] 그러나, 이러한 정상세포에 존재하는 P-당단백의 생리적인 기능은 아직 확실하게 규명되어 있지 않다.

각종 암에서 발견되는 P-당단백의 과발현은 치료실패의 중요한 요인으로 지적되고 있으며, 일부 암에서는 이들의 과발현이 치료성적 및 예후를 예측하는 인자로 제시된 바 있다.[18-21] 이러한 사실에 근거하여 다중약제내성 유전자의 발현을 억제하거나 P-당단백의 기능을 조절함으로써 다중약제내성을 극복하기 위한 치료법이 시도되어 왔다.[2,5,11,22,23] 즉, Tsuro 등은 감수성 암세포에 비해 다중약제내성을 보이는 암세포들의 세포막과 세포질에 더 많은 양의 칼슘이 함유되어 있다는 사실에 근거하여 칼슘통로차단제인 verapamil을 사용한 결과, 약제배출과정이 억제되고 다중약제내성을 극복할 수 있었다고 보고하였다.[24] Verapamil 이외에도 cyclosporin A (CsA), calmodulin, phenothiazine, quinine, tamoxifen 등이 다중약제내성의 극복을 위하여 현재 사용되고 있다.[4,5]

본 연구에서 사용된 hydroxychloroquine은 chloroquine과 함께 항말라리아 및 항류마티스 약제로 널리 사용되고 있으며, 비교적 독성이 적다. Hydroxychloroquine이 항류마티스약제로서 작용하는 기전은 매우 다양한데, 각종 대식세포의 항원인식을 억제하고, 염증세포에서의 사이토카인 분비를 억제하며, 염증세포의 세포사멸을 유도하는 것이 주된 기전이다. 또한, 세포내 pH를 상승시켜 단백질의 전사후수식(posttranscriptional modification)을 유발하며, 고농도에서는 RNA와 DNA 합성을 억제시키고,[25,26] 세포내에서 산성을 유지하는 기관인 lysosome, endosome 및 trans-Golgi network 등 세포내 소기관들의 pH를 상승시켜 약리작용을 나타낸다. 최근에 이러한 세포내 pH의 변화가 P-당단백에 의한 다중약제내성의 발현과 관련이 있다고 보고된 바 있어[27] hydroxychloroquine에 의한 다중약제내성 극복의 가능성을 시사하였다. 또한, chloroquine은 다중약제내성을 보이는 대장암 세포주에서 세포내 pH를 상승시킴으로써 세포막 표면에 존재하는 P-당단백의 발현에 영향을 미치고 세포내로의 항암제 유입과 축적을 증가시키는 것으로 보고된 바 있으며,[28,29] 이러한 결과는 chloroquine이 항암제의 약제감수성을 증가시켜 다중약제내성을 극복하는 한가지 기전을 설명하였다.

본 연구에서는 위암 및 대장암 세포주에서 P-당단백의 발현을 조사하고, hydroxychloroquine을 투여한 후 세포막 P-당단백의 발현정도와 기능 변화, 세포내 pH 변동 및 다중약제내성과 관련된 항암제의 세포독성도의 변화를 관찰하여 hydroxychloroquine이 다중약제내성 극복에 미치는 영향을 조사하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

가. 세포주

연세대학교 의과대학 암연구소에서 복강내 전이 위암으로부터 확립한 YCC (Yonsei Cancer Center, Seoul)-2, 3, 7 등 세 종류의 위암 세포주를 사용하였고, 대장암 세포주는 ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)에서 구입한 HT29 및 HCT15를 사용하였다. 실험에 사용한 세포주들은 56°C에서 30분 동안 가열하여 비활성화시킨 10% 우태아 혈청(GIBCO, Grand Island, NY, USA)이 함유된 RPMI-1640 배지(GIBCO, Grand Island, NY, USA)에 penicillin 100 U/ml (GIBCO, Grand Island, NY, USA)와 streptomycin 100 μg/ml (GIBCO, Grand Island, NY, USA)를 첨가하여 5% CO_2의 존재 하에 37°C 항온 항습 배양기에서 배양하였고, Fig. 1과 같이 실험을 진행하였다.

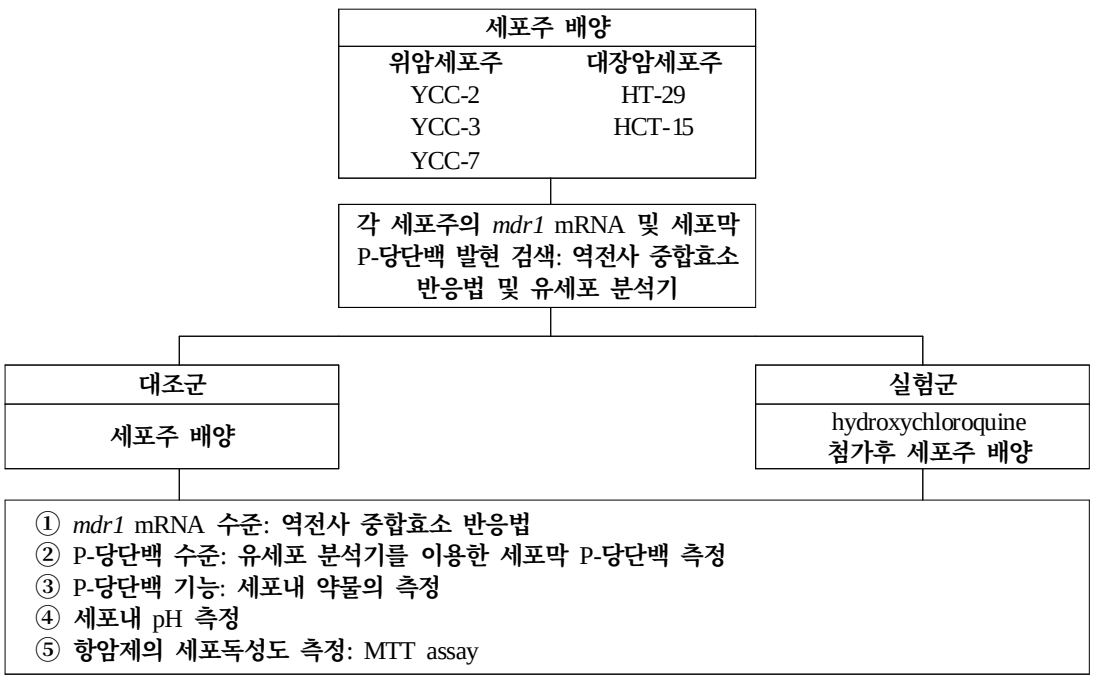


Fig. 1. Schema of the study.

나. 약제

Doxorubicin (보령제약, 서울, 대한민국)과 DDP (cis-diamminedichloroplatinum, 보령제약, 서울, 대한민국)를 항암제로 사용하였고, 기존에 알려진 50% 억제농도(IC_{50}, 50% inhibitory concentration) 값을 기준으로 배양액에 적절한 농도로 희석하여 사용하였다. Hydroxychloroquine (유한양행, 서울, 대한민국) 자체가 세포주의 성장 및 세포독성도에 미치는 영향은 미미하였는데, 15 μg/ml 농도에서 세포주의 성장이 10% 미만으로 억제되었고, 30 μg/ml 농도에서는 약 20% 억제되었다.

본 연구에서는 hydroxychloroquine을 15 및 30 μg/ml 농도로 희석한 후 각 항암제와 병용 투여하였다. Hydroxychloroquine의 대조 약제로 cyclosporin A (CsA, Novartis, East Hanover, NJ, USA)를 사용하였다.

2. 방법

가. *mdr1* 유전자 검색 및 동정: 총 RNA 분리 및 역전사 중합효소 반응법

위암 및 대장암 세포주를 배양하여 수확한 세포를 1,000×g에서 5분간 원심 분리한 후 유사한 세포농도가 되도록 조절하고, 4°C의 인산완충용액 (phosphate buffered saline, PBS)을 이용하여 2회 세척하였다. 침전된 세포에 Trizol 1 ml을 넣어 세포균질액을 만든 다음, 상온에서 10분간 방치하였다가 200 μl의 chloroform을 넣고 혼합한 후, 4°C에서 15분간 12,000×g로 원심분리하여 상층액을 얻었다. 분리한 상층액에 동량의 isopropanol을 넣고 섞어준 다음 상온에 10분간 방치하여 두었다가 4°C에서 15분간 12,000×*g*로 원심분리하여 RNA 침전물을 모았다. 추출된 RNA는 75% ethanol로 세척한 다음 다시 4°C에서 5분간 7,500×*g*로 원심분리하여 상층액을 버리고 상온에서 10분간 건조시켰다. RNA pellet은 diethylpyrocarbonate (DEPC)로 처리한 탈이온수 50 200 μl에 용해한 후 260 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 분리한 RNA는 RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction, 역전사 중합효소 반응법) kit (Perkin Elmer, Norwalk, CO, USA)를 사용하여 RT-PCR을 실시하였다. 먼저 1 μg의 RNA에 10×PCR buffer, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 U의 RNase inhibitor, 2.5 μM의 random hexamer, 2.5 U의 reverse transcriptase를 첨가하여 상온에서 10분간 반응시킨 후, reverse transcription (42°C, 15분), denaturation (99°C, 5분), cooling (5°C, 5분)을 차례로 실시하였다. 합성된 cDNA에 다시 10×PCR buffer, 2 mM $MgCl_2$, 2.5 U의 Taq DNA polymerase 및 *mdr1*과 β-actin에 대한 primer (Bioneer, 대전, 대한민국) (Table 1)를 각각 50 pmol씩 첨가하여 95°C에서 2분 동안 반응시킨 후 melting (95°C, 1분), annealing (58°C, 1분), extension (72°C, 1분)을 35 cycle 동안 실시하고, 마지막으로 72°C에서 7분간 반응시켰다. *mdr1* 유전자의 발현 정도는 2% agarose gel에 전기영동을 실시한 후 ethidium bromide 염색으로 확인하였다.

나. 세포막 표면 P-당단백의 측정

위암 및 대장암 세포주들의 세포막 표면 P-당단백을 측정하기 위하여 인체의 P-당단백 항원에 대한 생쥐 항체(JSB-1 monoclonal Ab, Alexis, San Diego, CA, USA)를 일차항체로, fluorescein isocyanate-conjugated rabbit anti-mouse IgG (FITC, Serotec, Oxford, England)를 이차항체로 사용하였고, 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 세포배양시간 및 처리약물 농도에 따라 수확한 세포를 원심분리한 후 PBS에 2회 세척하였다. 소시험관(5×40 mm)에서 1×10^6 세포/50 μl와 1 : 20으로 희석된 일차항체 50 μl를 4°C에서 40분간 작용시킨 후, Ca^{++}과 Mg^{++}이 함유되지 않은 PBS로 2회 세척하였다. 1 : 25로 희석된 이차항체 50 μl를 넣어 4°C에서 30분간 작용시키고 2회 세척한 후, flow cytometry (유세포 분석기, Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)를 이용하여 1×10^4개 세포의 형광도를 측정하였다. 각 실험은 세포주마다 세 차례 이상 반복하였다.

또한, 각 세포주에 hydroxychloroquine 15 μg/ml 및 30 μg/ml을 처리하여 24시간 배양한 후 위의 방법대로 유세포 분석기를 이용하여 세포막 P-당단백 발현의 변화를 관찰하였다.

다. 세포내 약물 농도 측정

세포내의 항암제 농도를 측정하기 위하여 다중약제내성의 기질이 되는 대표적인 항암제인 doxorubicin을 사용하였는데, doxorubicin은 자체적으로 형광을 나타낸다. 10% 우태아혈청이 함유된 RPMI-1640 배지에서 배양하던 각 세포주를 trypsin (GIBCO, Grand Island, NY, USA)으로 처리한 후, 5% 우태아혈청이 함유된 RPMI-1640 배지로 세척하고 약제가 포함된 배지에 배양하였다. 24시간이 경과한 후 새로운 배지에 1 μg/ml의 doxorubicin 및 hydroxychloroquine을 농도별로 첨가하여 5% 우태아혈청이 함유된 RPMI-1640 배지에서 37°C에 2시간 동안 배양하였다. 배양된 세포는 2회 이상 세척하여 얼음에 보관하였고, FACS를 이용하여 1×10^4개 세포의 형광도를 측정하였다. 세포내 약물의 배출정도를 조사하기 위하여 위의 방법과 동일하게 1 μg/ml의 doxorubicin 및 hydroxychloroquine을 농도별로 처리한 배지에 2시간 동안 배양한 후, 약제가 포함되지 않은 새로운 배지로 교체하여 2시간 동안 추가 배양하였다. 약물이 배출된 후의 세포내 약물농도 역시 유세포 분석기를 이용하여 측정하였다. 각 실험은 실험의 정확도를 위하여 세 차례 이상 반복하였으며, hydroxychloroquine의 효과에 대한 대조 약물로 CsA 1 μg/ml을 처리하여 같은 방법으로 세포내 doxorubicin 농도를 측정하였다.

라. 세포내 pH 측정

세포내 pH는 pH에 민감한 형광물질인 SNARF-1 (Molecular probes, Eugene, OR, USA)을 사용하였다. 1×10^6개의 세포와 SNARF-1을 최종농도가 10 μmol/L이 되도록 한 후 PBS-glucose 용액에서 2시간 동안 반응시켰다. 4°C의 PBS로 세포를 2회 세척한 후 얼음에 보

관하였고, 유세포 분석기를 이용하여 584 nm 및 644 nm 두파장에서 형광도를 측정, 아래의 공식으로 pH를 계산하였다.

$$pH = 7.38 + \log_{10}0.822 + \log_{10}[(R-0.458)/(1.928-R)]$$

R=ratio of fluorescent intensities at 584 nm and 644 nm

마. 세포독성도 검사

세포독성도는 Carmichael 등이 제시한 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 방법으로 측정하였다.[30] MTT 검사는 cytochrome b 및 c 부위에 있는 미토콘드리아의 효소인 succinate dehydrogenase가 MTT의 tetrazolium환을 분절시킴으로 황색조의 MTT salt가 나타내는 자주색을 분광흡도계로 측정함으로써 생존하는 세포의 수를 알아내는 방법이다. 실험에 이용한 방법은 다음과 같다.

각각의 배양된 암 세포주에서 성장 곡선을 그려 지수성장을 보이는 시기의 세포수를 결정한 후, 세포 성장 곡선상 지수성장기에 해당하는 세포주를 0.25%의 trypsin-EDTA로 처리하여 단일 부유 암세포로 만들었다. 이것을 10% 우태아혈청이 함유된 영양배지로 3회 이상 세척하고, trypan blue (GIBCO, Grand Island, NY, USA) 염색으로 세포 수를 계산하여 총 부피 180 μl에 필요한 세포를 부유, 96 well plate에 분주하였다. 분주된 각각의 세포주를 24시간 동안 배양한 후, 다양한 농도의 항암제를 단독 혹은 hydroxychloroquine과 병용하여 총 부피 20 μl의 배지에 용해시켜 투여하였으며, 대조 약물로 CsA 1 μg/ml을 같은 방법으로 투여하였다. 약물 투여 후 96시간 동안 추가로 각 세포주를 배양한 후 MTT 50 μl (2 mg/ml)를 첨가하였고, 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 이후 각 well plate를 450×g에서 10분간 원심분리하고, 바닥에 있는 formazan 결정이 제거되지 않도록 주의하면서 30 μl의 배양액이 남도록 상층액을 제거하였다. 150 μl의 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 각 well에 첨가한 다음, formazan 결정이 용해될 때까지 37°C에서 10분간 진탕한 후 multi-well ELISA automatic spectrometer recorder (Behring, Germany)를 이용하여 540 nm의 파장에서 흡광도(absorbance, optical density)를 측정하였다. 측정된 흡광도를 대조군의 흡광도와 비교하여 아래의 공식으로 생존율을 산출하였고, 각 세포주별로 세 차례 이상 실험을 반복하여 평균치를 구하였다.

$$\%\text{생존율} = \frac{\text{실험군의 평균 색소흡광도} - \text{기준 색소흡광도}}{\text{대조군의 평균 색소흡광도} - \text{기준 색소흡광도}} \times 100$$

각 세포주의 생존율을 50%로 감소시키는 약제의 농도를 IC_{50} (50% 억제농도)으로 정의하였다.

III. 결 과

1. *mdr1* 유전자 발현 및 세포막 P-당단백의 발현

가. 역전사 중합효소 반응법을 이용한 *mdr1* 유전자의 발현

대장암 및 위암 세포주에서 역전사 중합효소 반응법을 이용하여 *mdr1* 유전자의 발현 여부를 조사한 결과, HT29, HCT15 및 YCC-7 세포주에서 243 bp 크기의 *mdr1* 유전자 합성물이 뚜렷하게 관찰되었다(Fig. 2). YCC-3 세포주는 *mdr1* 유전자의 합성물이 약하게 관찰되었고, YCC-2 세포주에서는 합성물이 관찰되지 않았다.

나. 유세포 분석기를 이용한 세포막 P-당단백의 발현 측정

유세포분석기로 세포막 표면 P-당단백의 발현을 분석하여 그 발현정도를 발현지수(expression factor, ratio of mean fluorescence values to P-glycoprotein and irrelevant antibody)로 나타냈다. HT29, HCT15, YCC-3 및 YCC-7 세포주에서 P-당단백의 발현지수는 각각 4.62, 13.1, 5.93, 7.19로 P-당단백의 발현을 확인할 수 있었으며(Fig. 3), YCC-2 세포주의 발현지수는 1.65로 P-당단백이 발현되지 않았다.

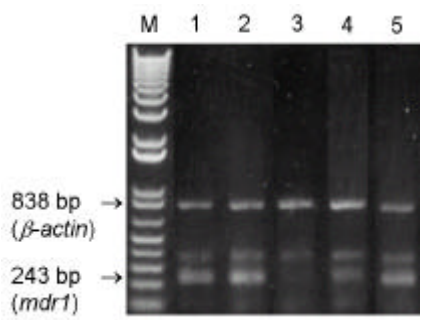
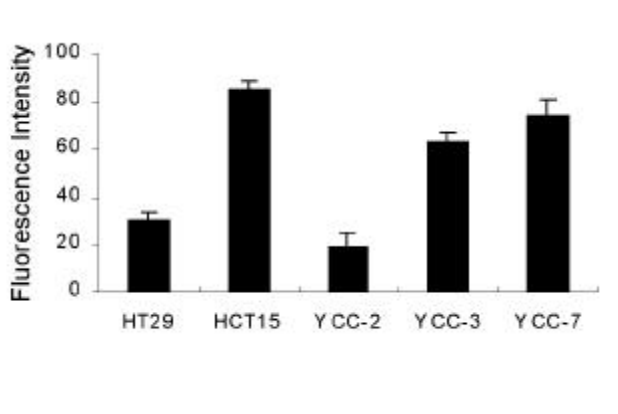


Fig. 2. Detection of *mdr1* using RT-PCR. M, DNA molecular size marker; Lane 1, HT29; 2, HCT15; 3, YCC-2; 4, YCC-3; 5, YCC-7.

A.



B.

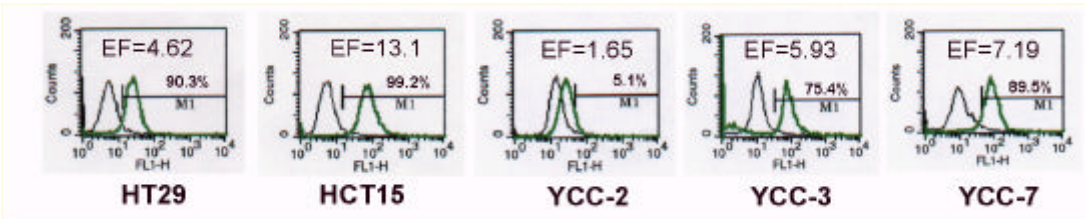


Fig. 3. Expression of P-glycoprotein in the membrane of colon and gastric cancer cell lines. Fluorescence intensity (A) and overlay histograms (B) measured by flow cytometry using monoclonal antibody, JSB-1. The degree of P-glycoprotein expression was determined by expression factor (EF, ratio of mean fluorecence values to P-glycoprotein and irrelevant antibody).

Table 1. Nucleotide sequence of primer

Primer	Nucleotide sequence of primer	Product size
mdr1		243 bp
sense	AAGCTTAGTACCAAAGAGGCTCTG	
antisense	GGCTAGAAACAATAGTGAAAACAA	
β-actin		838 bp
sense	ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG	
antisense	GTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC	

2. 세포독성도 측정 및 P-당단백의 발현과 약제감수성과의 관계

본 연구에 사용된 두 종류의 대장암 세포주와 세 종류의 위암 세포주에 대하여 MTT 검사 방법을 이용하여 doxorubicin과 DDP의 세포독성도를 측정한 결과는 Fig. 4와 같았으며, 각 세포주에 대한 IC_{50} 값은 Table 2에 나타냈다. Doxorubicin과 DDP의 임상적으로 사용할

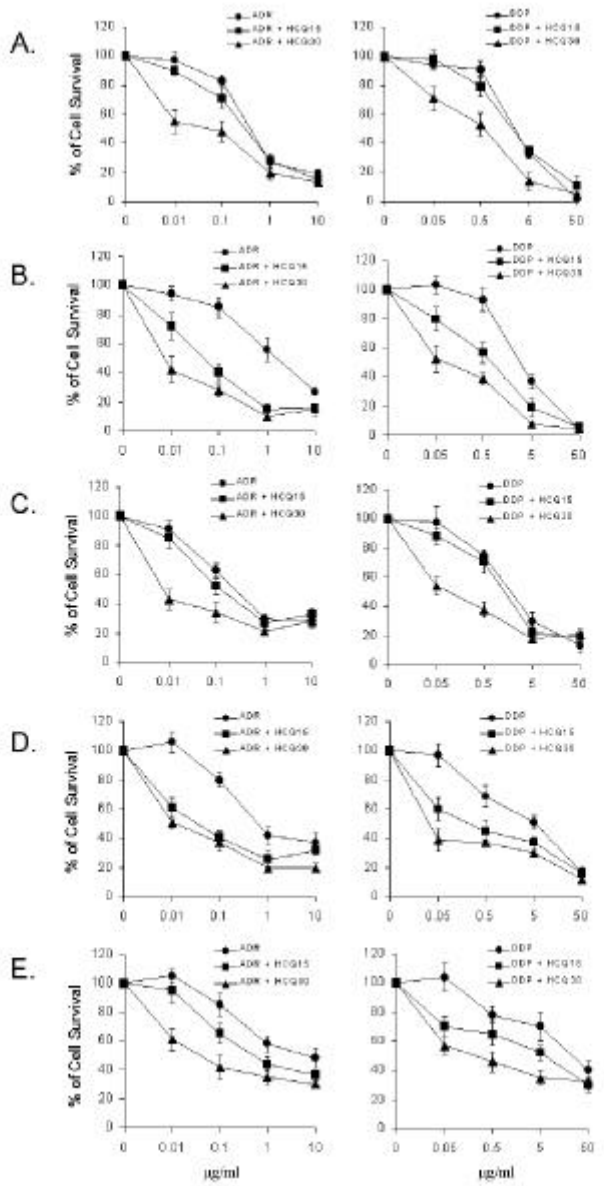


Fig. 4. Modulation of doxorubicin and DDP cytotoxicity by hydroxychloroquine in human colon and gastric cancer cell lines. All gastric and colon cancer cell lines were highly resistant to doxorubicin and DDP (IC_{50}: 0.30 9.77 μg/ml for doxorubicin; 2.24 14.8 μg/ml for DDP) on MTT assay, and hydroxychloroquine reversed the drug resistance. ADR, doxorubicin; HCQ15, hydroxychloroquine 15 μg/ml; HCQ30, hydroxychloroquine 30 μg/ml. A, HT29; B, HCT15; C, YCC-2; D, YCC-3; E, YCC-7.

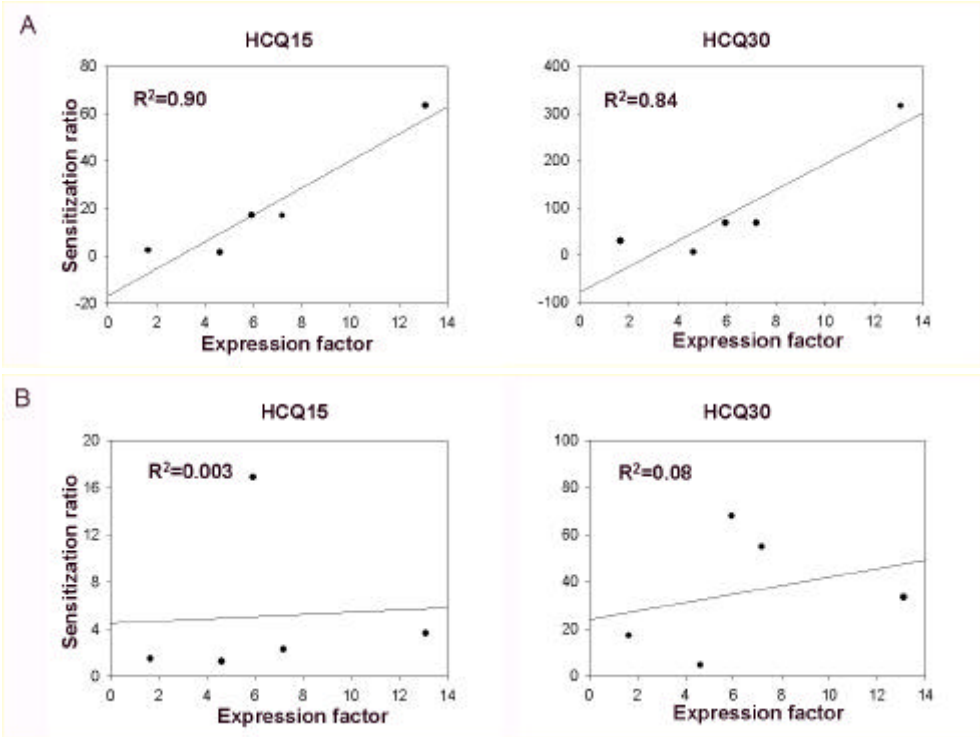
Table 2. Effect of hydroxychloroquine and cyclosporin A on IC_{50} and sensitization ratio of doxorubicin and DDP in human colon and gastric cancer cell lines

		Doxorubicin				DDP			
		Control	CsA	HCQ15	HCQ30	Control	CsA	HCQ15	HCQ30
HT-29	IC_{50}	0.55	0.35	0.4	0.09	3.03	2.68	2.36	0.64
	A-AUC	20.7	13.1	15.02	3.38	78.4	69.4	61.1	16.6
	SR		1.57	1.38	6.1*		1.13	1.28	4.73*
HCT-15	IC_{50}	3.16	0.05	0.06	0.01	3.35	3.55	0.91	0.1
	A-AUC	118.7	1.87	2.25	0.38	86.8	91.9	23.5	2.59
	SR		63.2*	52.7*	316*		0.94	3.68	33.5*
YCC-2	IC_{50}	0.30	0.27	0.13	0.01	2.24	1.89	1.50	0.13
	A-AUC	11.3	10.1	4.88	0.38	58.0	48.9	38.9	3.37
	SR		1.11	2.3	30*		1.19	1.49	17.2*
YCC-3	IC_{50}	0.68	0.05	0.04	0.01	6.11	5.98	0.36	0.09
	A-AUC	25.5	1.88	1.52	0.38	158.2	154.9	9.32	2.33
	SR		13.6*	17.0*	68*		1.02	16.9*	67.9*
YCC-7	IC_{50}	9.77	0.86	0.74	0.05	14.8	15.2	6.42	0.27
	A-AUC	366	32.3	27.8	1.88	383	393.7	166.3	6.99
	SR		11.4*	13.2*	195*		0.97	2.30	54.8*

CsA, cyclosporin A 1 μg/ml; HCQ15, hydroxychloroquine 15 μg/ml; HCQ30, hydroxychloroquine 30 μg/ml; IC_{50}, 50% inhibitory concentration; A-AUC, assayed area under curve; SR, sensitization ratio=(IC_{50} with drug)/(IC_{50} with drug+hydroxychloroquine or CsA). *Significantly different from control ($p<0.05$).

수 있는 농도(CAC, clinically achievable concentration)는 각각 0.042 0.053 μg/ml 및 0.074 μg/ml로 알려져 있는데, 본 연구에 사용된 위암 및 대장암 세포주에 대한 IC_{50} 값은 각각 0.30 9.77 μg/ml 및 2.24 14.8 μg/ml로 모두 CAC의 범위를 넘어 doxorubicin과 DDP에 강한 내성을 보였다(Table 2).

Hydroxychloroquine 투여 후 doxorubicin에 대한 IC_{50} 값은 15 μg/ml 투여시 0.06 0.74 μg/ml, 30 μg/ml 투여시 0.01 0.09 μg/ml로 대조군에 비하여 의미있게 감소하였다. 그러나, DDP에 대한 IC_{50} 값은 30 μg/ml 투여시에만 감소하였다(0.1 0.64 μg/ml). Doxorubicin과 DDP에 대한 내성의 극복정도는 sensitization ratio (SR, IC_{50} with drug/IC_{50} with drug+hydroxychloroquine or CsA)로 표시하였으며(Table 2), hydroxychloroquine 투여 후 doxorubicin에 대한 약제감수성은 15 μg/ml 농도에서 1.38 52.7배, 30 μg/ml 농도에서 64 316배 증가하였고, DDP에 대한 약제감수성은 30 μg/ml 농도에서만 4.73 67.9배 증가하였다. 항암제에 대한 내성의 극복정도는 P-당단백의 발현 정도와 밀접한 관계를 보여 P-당단백



ig. 5. Correlation between expression factor and sensitization ratio in human colon and gastric cancer cell lines. A: The resistance to doxorubicin was reversed according to the degree of P-glycoprotein expression. B: There was no correlation between the degree of P-glycoprotein expression and sensitization of resistance to DDP. HCQ15, hydroxychloroquine 15 μg/ml; HCQ30, hydroxychloroquine 30 μg/ml; R^2, correlation coefficient.

의 발현이 높은 세포주에서 약제감수성의 증가가 더욱 현저하였다(Fig. 5). 특히 30 μg/ml 의 hydroxychloroquine을 투여한 경우에는 P-당단백이 발현되지 않은 YCC-2 세포주에서나, 다중약제내성과 관련이 없는 DDP와의 병용 시에도 약제감수성이 증가되었다.

대조약제로 사용된 CsA 1 μg/ml의 효과는 hydroxychloroquine 15 μg/ml의 효과와 비슷한 결과를 보였다. 그러나, CsA는 hydroxychloroquine과는 달리 P-당단백이 발현되지 않은 YCC-2 세포주와 P-당단백에 의한 다중약제내성과 관련이 없는 DDP와의 병용시에는 약제감수성을 증가시키지 못했다.

3. 세포막 P-당단백 발현의 변화

각 세포주에서 P-당단백의 발현지수는 hydroxychloroquine 처리 후 24시간에 가장 낮았고, 이후에는 P-당단백 발현지수의 변화가 관찰되지 않았다(data not shown). Hydroxychloroquine의 농도가 증가할수록 P-당단백의 발현정도가 감소하는 경향을 보였는데, P-당단

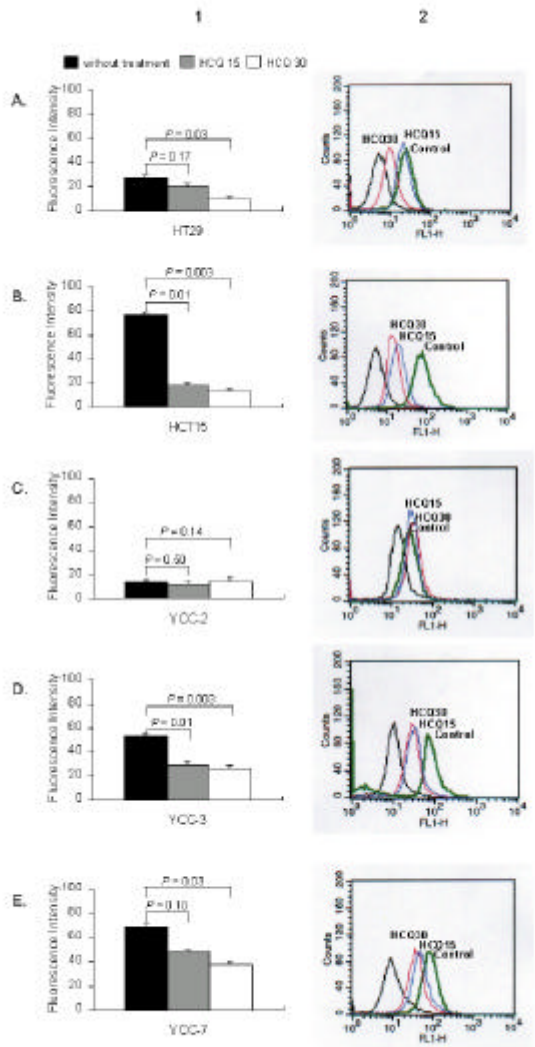


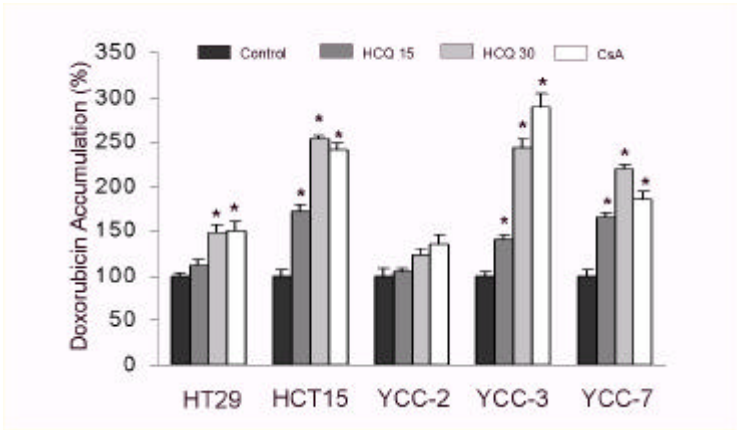
Fig. 6. Effect of hydroxychloroquine on expression of P- glycoprotein in colon and gastric cancer cell lines. 1×10^{7} cells were incubated in media without or with hydrodroxychloroquine for 24 hours, and then the expression of P-glycoprotein was determined. Changes of fluorescence intensity (1) and overlay histograms (2) measured by flow cytometry. HCQ15, hydroxychloroquine 15 μg/ml; HCQ30, hydroxychloroquine 30 μg/ml. A, HT29; B, HCT15; C, YCC-2; D, YCC-3; E, YCC-7.

백이 발현된 세포주에서 15 μg/ml 투여시 27.1 76.7%, 30 μg/ml 투여시 34.6 82.8% 감소하여 30 μg/ml 투여시 더 의미있게 감소하였다(Fig. 6).

4. P-당단백의 기능: 세포내 doxorubicin의 축적 및 배출

Doxorubicin 1 μg/ml과 CsA 및 hydroxychloroquine을 농도별로 배지에 처리한 후 각 세포

A.



B.

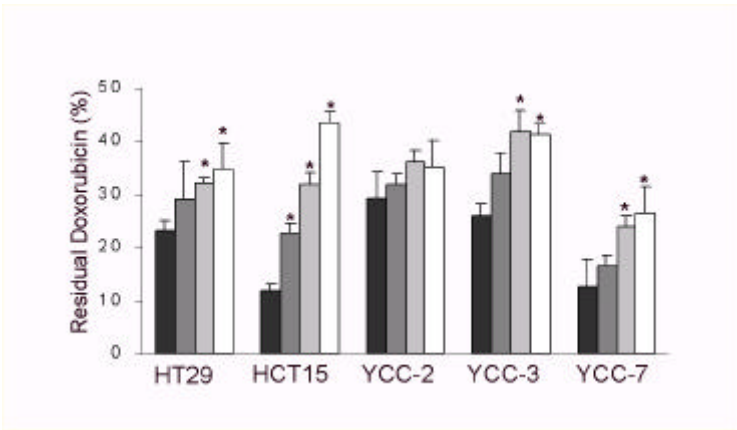


Fig. 7. Effect of hydroxychloroquine and cyclosporin A on intracellular doxorubicin accumulation (A) and residual rate (B) in colon and gastric cancer cell lines. Accumulation of the fluorescent doxorubicin and residual rate were measured as a functional index of P-glycoprotein activity. 1×10^{7} cells were incubated for 2 hours in media containing 1 μg/ml doxorubicin with hydoxychloroquine or cyclosporin A for determining the intracellular concentration, and further incubated in drug-free media for determining the residual rate of doxorubicin. Fluorescent intensity was determined by flow cytometry. *Significantly different from control ($p<0.05$). HCQ15, hydroxychloroquine 15 μg/ ml; HCQ30, hydroxychloroquine 30 μg/ml; CsA, cyclosporin A 1 μg/ml.

주를 배양하여 세포내 약물농도 및 배출농도를 측정한 결과, P-당단백이 양성인 세포주에서 hydroxychloroquine에 의해서 선택적으로 세포내 doxorubicin 농도가 증가하였고, doxorubicin의 배출이 감소하였다(Fig. 7). 대조약물로 사용된 CsA 1 μg/ml을 투여하였을 때에도 비슷한 결과를 얻었다. 세포내 doxorubicin 농도는 hydroxychloroquine 30 μg/ml을 투여하였을 때 가장 의미있게 증가하였으며, CsA 1 μg/ml을 투여한 경우와 통계적인 차이는 없었다. P-당단백 양성인 세포주에서 세포내 doxorubicin 농도의 증가는 hydroxychloroquine에 의한 P-당단백 발현의 감소 정도와 밀접한 상관관계를 보여 hydroxychloroquine이 P-당단백의 발현을 억제하여 약제감수성을 증가시킴을 간접적으로 보여주었다(Fig. 8).

5. 세포내 pH의 변화

각 세포주에서 hydroxychloroquine을 시간별로 처리한 후 형광물질을 이용하여 세포내 pH를 측정하였다. 그 결과 시간이 경과함에따라 세포내 pH가 증가하는 경향을 보였으나, 항암제에 대한 세포독성도나 세포내 약물축적농도와 상관관계를 보이지는 않았다(Fig. 9).

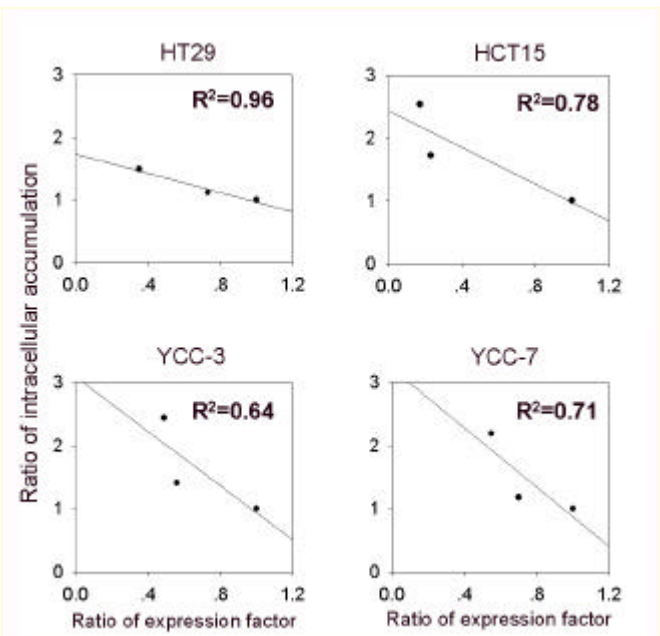


Fig. 8. Correlation between the ratio of expression factor and that of intracellular drug concentration in P-glycoprotein expressed cell lines. R^2, correlation coefficient.

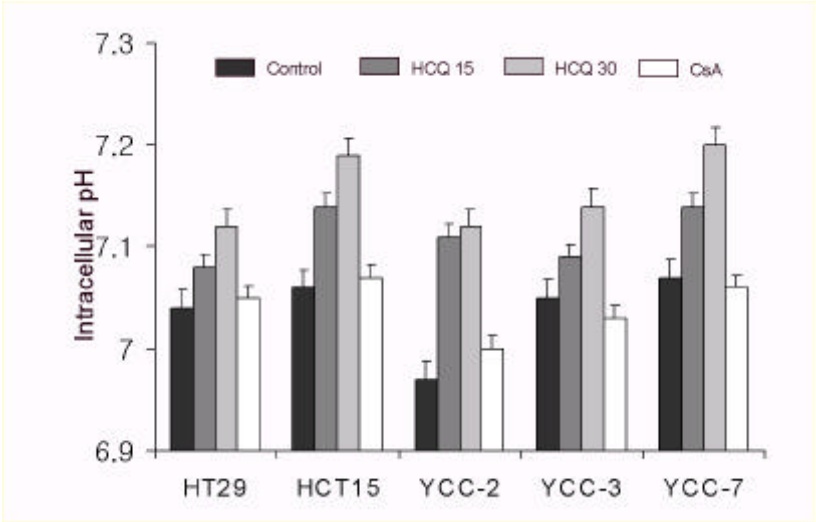


Fig. 9. Effect of hydroxychloroquine and cyclosporin A on intracellular pH. 1×10^{7} cells were incubated for 2 hours in media containing pH-sensitive fluorescent dye, SNARF-1 with hydroxychloroquine or cyclosporin A. Although hydroxychloroquine seems to elevate the intracellular pH, there was no correlation between elevated intracellular pH and cytotoxicity. HCQ15, hydroxychloroquine 15 μg/ml; HCQ30, hydroxychloroquine 30 μg/ml; CsA, cyclosporin A 1 μg/ml.

IV. 고 찰

위암은 우리 나라에서 가장 발병 빈도가 높으며, 대장암은 식이 습관 등 생활 환경의 변화로 최근에 증가하고 있는 암으로서, 이들 암은 진단 당시 혹은 치료 후에 P-당단백의 과발현으로 인한 항암제내성 획득 및 치료 실패가 문제점으로 지적되고 있다.[19,21,31] 위암의 치료는 다중약제내성과 밀접한 연관이 있는 doxorubicin을 기본으로 한 병용화학요법이 근간이 되고 있고, 대장암은 정상 대장조직에서 P-당단백의 발현이 높아 진단 당시에 이미 각종 항암제에 대한 다중약제내성을 나타낸다. 따라서, 위암 및 대장암은 다중약제내성 극복 연구를 위한 좋은 대상이라고 할 수 있다.[23,32-34]

일반적으로 위암조직을 이용한 연구에서 P-당단백의 발현율은 0 27.8%로 비교적 낮게 보고되고 있는 반면, 대장암은 약 60%로 비교적 높은 발현율을 보이는 것으로 보고되어 있다.[19,21,31,35] 대장암의 경우에는 내인적인 다중약제내성이 문제가 되고, 위암의 경우에는 1차 치료 실패 후 P-당단백의 발현으로 인한 다중약제내성이 문제가 된다. Doxorubicin을 근간으로 하는 수술 전 항암요법을 시행 받은 위암 환자들을 대상으로 수술 전후 조직표본에서 P-당단백의 발현을 조사한 결과, 발현율이 27.8%에서 37.5%로 증가하였고, P-당단백

의 발현정도 역시 증가하였음이 보고된 바 있다.[21] 암 세포주를 대상으로 한 실험에서 저용량의 doxorubicin에 지속적으로 노출시키면 P-당단백의 발현이 유도될 수 있으나,[36] 생체 내에서 P-당단백의 발현을 유도할 수 있는 doxorubicin의 용량과 사용기간은 확실하지 않다. 그러나, 항암약물치료 시 P-당단백 억제제를 조기에 사용할 경우 P-당단백 양성세포의 출현을 막을 수 있다는 보고가 있다.[37] 본 연구에서 사용된 사람 위암 및 대장암 세포주는 MTT 검사 결과에서 IC_{50} 값이 모두 임상적으로 사용할 수 있는 용량을 훨씬 넘어 강한 약제내성을 보였으며, YCC-2 세포주를 제외한 모든 세포주에서 P-당단백의 발현이 관찰되었다. 따라서, P-당단백의 발현이 본 연구에 사용된 세포주에서 보인 약제내성의 주된 기전의 하나라고 생각된다.

항암제가 암세포에 대한 항암효과를 나타내기 위해서는 궁극적으로 항암제가 세포내로 이동하여 활성화되고, 세포내의 표적물질과 적절하게 반응하는 단계를 거쳐야 한다.[4] 그러나, 이러한 과정에서 암세포는 항암제의 작용을 극복하기 위한 여러 가지 변화를 일으킴으로써 약제내성을 유발하게 된다. 즉 약제내성은 항암제에 대한 암세포의 세포 생리학적인 방어기전의 일종이라고 할 수 있다. 비록 다양한 원인 및 기전에 의하여 다중약제내성이 유발되나, 다중약제내성을 표현하는 세포에서 일어나는 변화는 몇 가지 공통적인 특징이 있다.[27] 첫째, 세포내 항암제 약물농도의 감소와 이로 인한 약제감수성의 저하인데, 다중약제내성 표현형 세포가 나타내는 가장 큰 특징이다. 둘째, P-당단백과 같은 새로운 단백질이 발현되고, 셋째, 세포내 pH의 변화, 세포사멸 감수성 변화 및 세포막 구조의 변화와 같은 세포 생리학적인 변화가 유발된다.

다중약제내성의 원인 중에서 P-당단백에 의한 기전이 가장 중요하며, 가장 널리 연구되었다. 초기에는 주로 급성골수성백혈병, 다발성골수종, 만성림프구성백혈병 등의 혈액암 환자에서 P-당단백의 임상적 의의에 대한 연구가 진행되었는데, P-당단백의 과발현이 각종 혈액암 환자에서 관해 실패의 중요한 원인으로 보고되었다.[18] 뿐만 아니라, 유방암, 신장암, 대장암 및 위암 등의 고형암 환자에서도 P-당단백의 과발현이 치료성적 및 예후를 예측하는 중요한 인자로 제시되었다.[18-21] 이러한 임상적 결과에 근거하여 다중약제내성을 극복하기 위한 다양한 연구가 진행되었는데, 이러한 연구의 방향은 앞에서 언급한 바와 같이 다중약제내성을 표현하는 세포에서 나타나는 공통적인 특징에 근거하여, 첫째, P-당단백의 기능을 조절하거나, 둘째, *mdr1* 유전자 혹은 P-당단백의 발현을 억제하거나, 셋째, P-당단백에 의한 다중약제내성 표현 세포의 세포 생리학적 변화를 교정하는 것을 목표로 하는 것이다.[2,5,11,22,23,27]

초기의 연구는 주로 P-당단백의 기능을 억제하는 약제들을 개발하는 것이 주된 목표가 되었다. 1981년 Tsuro 등은 다중약제내성을 보이는 암세포들이 감수성 암세포에 비해 세포막과 세포질에 더 많은 양의 칼슘을 함유하고 있다는 사실에 근거하여 verapamil 등의 칼슘통로차단제를 사용하였다.[24] 이들은 verapamil이 P-당단백의 약제배출과정을 억제하여 항

암제의 세포내 축적을 증가시킴으로써 다중약제내성을 극복할 수 있었다고 최초로 보고하였다.[24] 이후 verapamil 이외에도 CsA, calmodulin, phenothiazine, quinine, tamoxifen 등의 약물들이 구조적인 공통점은 없으나 직접 P-당단백에 경쟁적으로 결합하여 약물배출펌프 기능을 억제함으로써 다중약제내성의 극복을 위하여 사용될 수 있음이 보고되었다. 암 세포주를 대상으로 한 실험에서 P-당단백에 의한 다중약제내성을 극복하기 위하여 verapamil은 2 10 μM, CsA은 1 μg/ml의 용량이 사용되었으며, 약제감수성이 약 2 120배 증가되는 효과를 볼 수 있었다.[4,16] 본 연구에서는 hydroxychloroquine 15 μg/ml의 투여로 doxorubicin에 대한 약제감수성이 세포주에 따라 1.38 52.7배, 30 μg/ml의 투여로는 6.1 316배 증가하였다. 이전의 연구 결과, 약제감수성이 증가되는 정도는 P-당단백의 발현정도와 상관관계가 있는 것으로 보고된 바 있는데, 본 연구에서도 같은 결과를 얻을 수 있었다.[18] 이러한 결과는 P-당단백 억제제가 작용하는 주된 기전이 P-당단백의 기능을 억제함으로 약제감수성을 증가시킴을 의미한다. 그러나, 동일한 세포주에서 동일한 P-당단백 기능억제제를 투여하였을 경우에도 P-당단백의 표적이 되는 항암제에 따라 내성극복의 차이가 심하게 나타나는데, 이는 P-당단백의 전사 후 수식과정에 의하여 각 항암제에 대한 친화도가 변화하거나 P-당단백 억제제의 결합부위가 변화하기 때문인 것으로 설명된다.[16]

본 연구에서 비교 약물로 사용한 CsA 1 μg/ml은 doxorubicin의 약제감수성을 1.11 63.2배 증가시켰는데, 이는 기존의 보고와 동일한 결과였고, hydroxychloroquine 15 μg/ml을 사용한 결과와 유사하였다. 그러나, hydroxychloroquine 30 μg/ml을 투여하였을 경우 P-당단백이 발현되지 않았던 YCC-2 세포주나 P-당단백에 의한 약제내성과 관련이 없는 DDP와의 병용 시에도 약제감수성이 4.73 67.9배 증가하였다. 이러한 결과는 hydroxychloroquine이 P-당단백의 발현 감소 및 기능 억제에 의해서 약제감수성을 증가시킬 뿐 아니라, P-당단백의 발현과는 관계없는 다른 기전이 약제내성의 극복에 일부 관여할 수 있음을 시사한다.

기존에 사용되었던 대부분의 P-당단백 기능 억제제는 *in vitro* 실험에서의 탁월한 내성극복 효과에도 불구하고, 실제로는 높은 혈중 농도가 요구되고, 심독성 및 신독성 등 약 자체의 심각한 부작용이 발생하며, 항암제의 대사 및 배출에 영향을 미쳐 독성을 증가시킬 수 있는 제한점이 있다.[4,5,11,16] 이러한 관점에서 본 연구에서 사용된 hydroxychloroquine 30 μg/ml은 하루 400 mg을 복용하였을 때 도달할 수 있는 용량으로 비교적 안전하게 사용할 수 있는 장점이 있다.[38] 그러나, 일반적으로 인체 내에서의 약제내성은 정상의 약 2 4배 정도인데, 약제내성을 연구하기 위하여 사용되는 세포주들은 이에 비하여 과도하게 높은 내성을 보이기 때문에 *in vitro*의 결과만으로 *in vivo*에서의 효과를 예측하기는 어렵다.[27] 뿐만 아니라, 실제 임상에서 약제내성의 극복을 위해 사용되는 P-당단백억제제의 용량과 사용기간에 대한 보고가 없어 이에 대한 연구가 필요하다. 최근에는 기존에 사용된 P-당단백 억제제의 독성을 줄인 PSC 833, LY 335979, dexaverapamil 등의 유도체가 개발되었으나[4] PSC 833, dexaverapamil 역시 내성의 극복을 위해서는 비교적 높은 농도가 요구되므로 독성이

문제가 되고 있다.

P-당단백의 발현을 직접 억제하여 내성을 극복하려는 노력으로 P-당단백에 대한 단클론 항체나 antisense oligonucleotide를 이용한 방법이 시도되고 있다. 단클론항체는 *Pseudomonas* 독소 등과 융합하거나 혹은 단독으로 사용하는데, P-당단백 외부에 존재하는 인식부위를 인식하여 항암제의 세포독성도를 증가시키는 것으로 보고되어 있으며, *in vitro* 및 *in vivo* 동물실험에서 확인된 바 있다.[39,40] 그러나, 단클론항체가 정상적으로 존재하는 P-당단백도 인식하기 때문에 조혈모세포와 같은 조직이 파괴되어 독성을 유발하는 것이 큰 문제점으로 지적되고 있다. 특이적으로 P-당단백의 발현을 감소시키는 방법으로는 antisense oligonucleotide를 이용한 방법이 시도되었고,[41] 최근에는 ribozyme을 이용하여 *mdr1* mRNA를 직접 목표로 한 치료법이 소개되었다.[42] 본 연구결과, hydroxychloroquine의 투여로 P-당단백의 발현이 감소되고, 약제감수성이 증가하는 것을 관찰하였는데, 최근 연구에서 동일계 약물인 chloroquine 100 μM을 투여하였을 때 세포막의 P-당단백의 발현이 감소하였다는 결과와 유사하다.[29] 이 연구에서 세포막의 P-당단백은 지속적으로 세포막과 세포내 소기관사이에 일정한 비율을 유지하며(세포막 70%, 세포내 소기관 30%) 순환하는데, chloroquine에 의하여 세포내 소기관이 알칼리화되면 세포막과의 순환이 억제되어 세포내 소기관에 축적됨이 밝혀졌다. 즉 P-당단백의 세포내 분포가 변화하여 세포막에서의 P-당단백 펌프기능이 억제되어 약제감수성을 증가시키지만, P-당단백의 절대량은 변화하지 않았다. 본 연구에서는 hydroxychloroquine투여 후 24시간까지 P-당단백의 발현이 감소하여 기존의 chloroquine에 의한 보고와 상이한 결과를 보였다. 또한, P-당단백의 발현 감소가 P-당단백의 기능을 억제하는 정도와 밀접한 상관관계를 보였으나, hydroxychloroquine이 P-당단백의 발현을 감소시키는 기전은 명확하지 않다.

최근에 다중약제내성 세포의 세포생리학적인 특성이 많이 규명되었는데, 그 중 세포질 및 라이소좀 등 세포 소기관의 산성화가 다중약제내성의 발생과 밀접한 관계가 있음이 보고된 바 있다.[28,29] P-당단백의 기질이 되는 항암제들은 대부분 약염기를 띠어 산성화된 세포 소기관에 축적되고, 궁극적으로 세포외로 배출되어 항암제의 세포독성이 감소된다는 사실이 밝혀졌다.[43] 따라서, 세포질 및 세포 소기관을 알칼리화 시켜서 약염기성 항암제의 세포내 분포를 변화시키고, 세포질 및 핵내의 표적물질과 반응하는 항암제의 농도를 증가시켜 약제감수성을 증강시키려는 방안이 제시되었는데, 이러한 약제로는 monencin, balfilomycin 등이 있다. Hydroxychloroquine 역시 chloroquine과 함께 세포내 pH를 증가시켜 약리 작용을 나타내는 대표적인 약물인데, 이들에 의한 세포내 pH의 변화는 P-당단백의 발현과 세포내에서의 항암제 분포를 변화시켜 세포독성도를 증가시킬 수 있으며,[28,29,42] 본 연구에서도 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 다만, hydroxychloroquine에 의하여 세포내 pH가 증가하는 경향을 보였으나, 세포독성도와의 연관성은 규명하지 못하였다.

또한, 최근에 P-당단백 억제제의 다양한 기전에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있는데,

다중약제내성과 세포사멸과의 연구가 그 중 하나이며,[44,45] 일반적으로 P-당단백 양성인 세포주가 세포사멸에 대해서도 내성을 보인다고 알려져 있다.[4] 최근에 개발된 PSC 833 및 LY 335979 등의 약제는 P-당단백 양성인 세포주에서 선택적으로 세포사멸을 유발하고, 항암제와의 병용투여시 세포사멸을 상승시키는 것으로 보고되어 세포사멸기전을 통한 다중약제내성의 극복이 기대된다.[44,45] Hydroxychloroquine 역시 루프스 환자의 림프구와 정상 말초혈액세포의 세포사멸을 유발하는 것이 알려져 있다.[38,46] 본 연구에서 P-당단백의 발현 여부와 관계없이 30 μg/ml의 농도에서 약제감수성이 증가하였는데, 여기에 세포사멸의 기전이 관여할 수 있는바 이에 대한 추가적인 연구가 필요하리라 생각된다.

이상과 같이 많은 연구에도 불구하고 P-당단백에 의한 다중약제내성의 극복에는 아직까지 여러 가지 어려운 점이 있는데, 첫째, P-당단백에 의한 다중약제내성 이외에도 다양한 약제내성이 발생할 수 있다는 점과,[47] 둘째, P-당단백억제에 의한 독성과 항암제의 대사 및 배출과정에 영향을 받을 수 있다는 것이다. 따라서 새로운 기전과 안전성을 갖춘 P-당단백 억제제의 개발이 절실히 요구되는 실정이다. 이상의 결과로 hydroxychloroquine은 P-당단백의 발현에 의한 다중약제내성을 극복하는 유용한 약제의 한가지로 생각된다. 그러나, hydroxychloroquine 투여시 P-당단백이 발현되지 않은 YCC-2 세포주에서도 약제 감수성이 증가되었고, P-당단백에 의한 내성과 관련이 없는 DDP와의 병용시에도 약제감수성이 증가되는 것이 관찰되었다. 이러한 결과는 hydroxychloroquine이 P-당단백을 억제하는 것 이외에 다른 기전으로 약제감수성을 증가시킬 수 있음을 의미하며, 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 연구는 사람 위암 및 대장암 세포주에서 P-당단백의 발현을 조사하고 hydroxychloroquine이 P-당단백의 발현, 세포내 약물 축적 및 세포독성에 미치는 영향을 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 본 연구에서 사용된 사람 위암(YCC-2,3,7) 및 대장암(HT29, HCT15) 세포주 중 YCC-2를 제외한 모든 세포주에서 *mdr1* 유전자 및 P-당단백의 발현이 관찰되었다. HT29, HCT15, YCC-3 및 YCC-7 세포주에서 P-당단백의 발현지수(expression factor)는 각각 4.62, 13.1, 5.93, 7.19로 P-당단백의 발현을 확인할 수 있었으며, YCC-2 세포주의 발현지수는 1.65로 P-당단백이 발현되지 않았다.

2. 본 연구에서 사용된 사람 위암 및 대장암 세포주는 모두 doxorubicin과 DDP (cis-diamminedichloroplatinum)에 대하여 강한 내성을 보였으며(IC_{50}=0.30 9.77 μg/ml for doxorubicin; 2.24 14.8 μg/ml for DDP), hydroxychloroquine 투여 후 doxorubicin과 DDP에 대한 약제감수성이 증가하였다. 그러나, DDP에 대한 약제감수성은 hydroxychloroquine 30 μg/ml

을 투여하였을 경우에만 증가하였다. 또한 hydroxychloroquine 30 μg/ml 투여시 P-당단백이 발현되지 않은 YCC-2 세포주에서도 doxorubicin에 대한 약제감수성이 증가하는 것이 관찰되었다.

3. 각 세포주에서 hydroxychloroquine 투여 후 doxorubcin에 대한 내성극복정도는 P-당단백의 발현정도와 밀접한 상관관계를 보였으나(R^2=0.90 for hydroxychloroquine 15 μg/ml; 0.84 for hydroxychloroquine 30 μg/ml), DDP의 경우에는 관련이 없었다.

4. P-당단백이 발현된 세포주에서 hydoxychloroquine 투여 후 24시간까지 세포막 P-당단백의 발현이 27.1 82.8% 감소되었으며, hydroxychloroquine 30 μg/ml 투여시 더욱 의미있게 감소되었다.

5. Hydroxychloroquine은 세포내 doxorubicin의 농도를 증가시키고, 세포 밖으로의 배출을 억제시켰다. 세포내 doxorubicin 농도는 hydroxychloroquine 30 μg/ml을 투여하였을 때 더욱 의미있게 증가하였으며, P-당단백이 발현된 세포주에서 세포내 doxorubicin의 축적 농도는 P-당단백 발현감소와 밀접한 상관관계를 보였다(R^2=0.96 for HT29; 0.78 for HCT15; 0.64 for YCC-3; 0.71 for YCC-7).

6. Hydroxychloroquine은 세포내 pH를 상승시키는 경향을 보였으나, 세포독성도와는 관련이 없었다.

이상의 결과로 hydroxychloroquine은 P-당단백의 발현을 억제하여 다중약제내성을 극복하는 유용한 약제로 생각된다. 그러나, P-당단백이 발현되지 않거나, P-당단백에 의한 내성과 관련이 없는 약제에서도 약제감수성이 증가되는 것으로 보아 hydroxychloroquine에 의한 약제감수성 증가 기전에는 P-당단백을 억제하는 것 이외에 다른 기전이 존재할 수 있음을 시사하며, 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Dalton WS. Drug resistance modulation in the laboratory and the clinic. Semin Oncol 1993; 20:64-9.
2. Beck WT, Dalton WS. Mechanisms of drug resistance. In: Devita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer: Principles and practice of oncology, 5th ed. Philadelphia: JB Lippincott, 1997.
3. Chanber BA. The oncogene and cancer. J Clin Oncol 1986;4:626.
4. Bradshaw DM, Arcei RJ. Clinical relevance of transmembrane drug efflux as a mechanism of multidrug resistance. J Clin Oncol 1999;16:3674-90.
5. Lum BL, Fisher GA, Brophy NA, Yahanda AM, Adler KM, Kaubisch S, et al. Clinical trial of modulation of multidrug resistance: pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. Cancer 1993;72:3502-14.

6. Kessel D, Botterill V, Wondinsky I. Uptake and retension of daunorubicin by mouse leukemic cells as factors in drug response. Cancer Res 1968;28:938-41.
7. Biedler JL, Reihm H, Peterson RHF, Spengler BA. Membrane-mediated drug resistance and phenotypic reversion to normal growth behavior of Chinease hamster cells. J Natl Cancer Inst 1975;55:671-80.
8. Ling V, Thompson LH. Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine. J Cell Physiol 1974;83:103-16.
9. Dano K. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrich ascites tumor cells. Biochem Biophys Acta 1973;323:466-83.
10. Inaba M, Sakuri Y. Enhanced efflux of actinomycin D, vincristine and vinblastine in doxorubicin-resistant subline of P388 leukemia. Cancer Lett 1979;8:111-5.
11. Raderer M, Scheithaner W. Clinical trials of agents that reverse multidrug resistance. Cancer 1993;72:3553-63.
12. Gros P, Croop J, Housman D. Mammalian drug resistance gene: complete cDNA sequence indicates a strong homology to bacterial transport proteins. Cell 1986;47:371-80.
13. Chen C-J, Chin JE, Ueda K, Clark CP, Pastan I, Gottesman MM. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug resistant human cell. Cell 1986;47:381-9.
14. Gerlach JH, Endicott JA, Juranka PF. Homology between p-glycoprotein and a bacterial hemolysin transport protein suggest a model for multidrug resistance. Nature 1986;324:485.
15. McGrath JP, Varshavky A. The yeast STE6 gene codes a homologue of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein. Nature 1989;340:400-4.
16. Fojo A, Ueda K, Slamon DI, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a multidrug resistant gene in human tumors and tissues. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:265-9.
17. Theibaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: evidence for localization in brain capillaries and cross-reactivity on one antibody with a muscle protein. J Histochem Cytochem 1989;37:159-68.
18. Salmon SE, Grogan TM, Miller T, Scheper R, Dalton WS. Prediction of doxorubicin resistance in vitro in myeloma, lymphoma, and breast cancer by p-glycoprotein staining. J Natl Cancer Inst 1989;81:696-702.
19. **양한광, 박재갑, 김진복, 로리 골드스타인. 인체 위장관암 조직에서의 *mdr1* 유전자 발현에 관한 연구. 대한암학회지** 1991;23:54-64.
20. Sikic BI. Modulation of multidrug resistance: at the threshold. J Clin Oncol 1993;11:1629-35.
21. Chung HC, Gong SJ, Yoo NC, Noh SH, Kim JH, Roh JK, et al. P-glycoprotein as an intermediate end point of drug resistance to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced gastric cancer. Yonsei Med J 1996;37:397-404.

22. Sikic BI. Clinical trial modulation of multidrug resistance: Pharmacokinetic and pharmacodynamic consideration. Cancer Clin Oncol 1993;72:3502-14.
23. Stein U, Walther W, Shoemaker RH. Modulation of *mdr1* expression by cytokines in human colon carcinoma cells: an approach for reversal of multidrug resistance. Br J Cancer 1996; 74:1384-91.
24. Tsuro T, Lida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. Cancer Res 1981;41:1967-72.
25. Fox RI. Mechanisms of action of hydroxychloroquine as an antirheumatic drug. Semin Arthr Rheumatol 1993;23(suppl 1):82-91.
26. Fox R. Anti-malarial drugs: possible mechanisms of action in autoimmune disease and prospects for drug developments. Lupus 1996;5(suppl 1):S4-10.
27. Simon SM, Schindler M. Cell biological mechanism of multidrug resistance in tumors. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:3497-504.
28. Hurwitz SJ, Terashima M, Mizunuma N, Slapak CA. Vesicular anthracycline accumulation in doxorubicin-selected U-937 cells: participation of lysosomes. Blood 1997;89:3745-54.
29. Kim H, Barroso M, Samanta R, Greenberger L, Sztul E. Experimentally induced changes in the endocytic traffic of p-glycoprotein alter drug resistance of cancer cells. Am J Physiol 1997;273:C687-702.
30. Carmichael J, Degraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell B. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res 1987;47:936-42.
31. Park J-G, Kramer BS, Lai S-L, Goldstein LJ, Gazdar AF. Chemosensitivity patterns and expression of human gastric and colorectal carcinoma cell lines. J Natl Cancer Inst 1990; 82:193-198.
32. Endo K, Maehara Y, Kusumoto T, Ichiyoshi Y, Kuwano M, Sugimachi. Expression of multidrug resistance associated protein (MRP) and chemosensitivity in human gastric cancer. Int J Cancer 1996;68:372-7.
33. Hotta T, Tanimura H, Yamaue H, Iwahashi M, Tani M, Tsunoda T, et al. Modulation of multidrug resistance by cepharanthine in fresh human gastrointestinal tumor cells. Oncology 1997;54:153-7.
34. Yeh K-H, Chen C-L, Shun C-T, Lin J-T, Lee W-J, Lee P-H, et al. Relatively low expression of *mdr1* and its possible clinical implication in gastric cancers. J Clin Gastroenterol 1998; 26:274-8.
35. Goldstein LJ, Galski H, Fojo A, Willingham M, Lai SL, Gazdar A, et al. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. J Natl Cancer Inst 1989;81:116-24.
36. Rogan AM, Hamilton TC, Young RC, Klecker RW Jr, Ozol RF. Reversal of adriamycin

resistance by verapamil in human ovarian cancer. Science 1984;224:994-6.
37. Beketic-Oreskovic L, Duran GE, Chen G, et al. Decreased mutation rate for cellular resistance to doxorubicin and suppression of *mdr1* gene activation by the cyclosporin PSC 833. J Natl Cancer Inst 1995;87:1593-602.
38. Meng XU, Feller JM, Ziegler JB, Pittman SM, Ireland CM. Induction of apoptosis in peripheral blood lymphocytes following treatment in vitro with hydroxychloroquine. Arth Rheum 1997;40:927-35.
39. Fitzgerald D, Willingham M, Carderell C, et al. A monoclonal antibody-Pseudomonas toxin conjugate that specifically kills multidrug resistance cells. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84:4288-92.
40. Arceci RJ, Stieglitz K, Bras J, et al. Monoclonal antibody to an external epitope of the human *mdr1* P-glycoprotein. Cancer Res 1993;53:310-317.
41. Bouffard D, Ohkawa T, Kijima H, et al. Oligonucleotide modulation of multidrug resistance. Eur J Cancer 1996;32A:1010-8.
42. Scanlon KJ, Ishida H, Kashani-Sabet M. Ribozyme-mediated reversal of the multidrug-resistance phenotype. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:11123-7.
43. Altan N, Chen Y, Schindler M, Simon SM. Defective acidification in human breast tumor cells and implication for chemotherapy. J Exp Med 1998;187:1583-98.
44. Lehne G, Anglis P, Boer M, Rugstad HE. Growth inhibition, cytokinesis failure and apoptosis of multidrug-resistant leukemia cells after treatment with P-glycoprotein inhibitory agents. Leukemia 1999;13:768-78.
45. Cabot MC, Giuliano AE, Han T, Liu Y. SDZ PSC 833, the cyclosporin A analogue and multidurg modulator, activates ceramide synthesis and increase vinblastine sensitivity in drug-sensitive and drug resistant cancer cells. Cancer Res 1999;59:880-5.
46. Potvin F, Petitclerc E, Marceau F, Poubelle PE. Mechanisms of action of antimalarials in inflammation: induction of apoptosis in human endothelial cells. J Immunol 1997;158:1872-9.
47. Sikic BI. Pharmacologic approach to reversing multidrug resistance. Semin Hematol 1997; 34:40-8.

Abstract

Effects of hydroxychloroquine on multidrug resistance in human gastric and colon cancer cell lines

Joon Oh Park

Brain Korea 21 Project for Medical Sciences
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Jae Kyung Roh)

Multidrug resistance (MDR) is a primary reason for the failure of anti-cancer chemotherapy and the mechanisms of MDR have been extensively studied. P-glycopotein (P-gp) is a 170-KD transmembrane glycoprotein and functions as an ATP-dependent drug efflux pump. Increased P-gp expression has shown in a number of solid tumors such as breast, renal, and colon cancer, as well as in hematologic malignancies, and has been reported to be an adverse prognostic factor. P-gp mediated MDR is reversed by a variety of compounds which inhibit the drug efflux from the cell. However, they require high serum concentrations to reverse the drug resistance, and alter the pharmacokinetics of anti-cancer agents, which lead to clinical toxicities.

In this study, the expression of P-gp in human gastric (YCC-2, 3, and 7) and colon (HT29, and HCT15) cancer cell lines were investigated, and the effects of hydroxychloroquine (HCQ) on the expression of P-gp and the cytotoxicity were evaluated. Using flow cytometry, the degree of P-gp expression was determined by the expression factor (EF), the ratio of mean fluorescence values to P-gp and irrelevant antibodies. The EF were 4.62 for HT29, 13.1 for HCT15, 1.65 for YCC-2, 5.93 for YCC, and 7.19 for YCC-7. All gastric and colon cancer cell lines were highly resistant to doxorubicin and DDP (cis-diamminedichloroplatinum) on MTT assay (IC_{50}: 0.30 9.77 μg/ml for doxorubicin; 2.24 14.8 μg/ml for DDP), and HCQ reversed the resistance to doxorubicin in P-gp expressed gastric and colon cell lines (YCC-3, YCC-7, HT29, and HCT-15). The EF and sensitization ratio (SR, the ratio of IC_{50} with doxorubicin to doxorubicin plus HCQ) were positively correlated (R^2=0.9 for HCQ 15 μg/ml and 0.84 for HCQ 30 μg/ml). After treatment of HCQ, the fluorescent intensities of P-gp were decreased and the intracellular accumaulation of doxorubicn was increased in dose-dependent manner, which were inversely correlated (R^2=0.96 for HT29; 0.78 for HCT15; 0.64 for YCC-3; 0.71 for YCC-7). Although hydroxychloroquine

seems to elevate the intracellular pH, there was no correlation between elevated intracellular pH and cytotoxicity.

It is concluded that HCQ enhances the cytotoxicity in P-gp expressed human gastric and colon cancer cell lines via reversal of P-gp, however, other mechanisims than P-gp expressions in reversal of multidrug resistance by hydroxychloroquine are yet to be elucidated.

Key Words: multidrug resistance, P-glycoprotein, hydroxychloroquine