

□ 원 저 □

## 폐암 세포에서 Gemcitabine에 의한 세포 사멸과 p53의 역할

단국대학교 의과대학 내과학교실

김도형, 배강우, 옹학심, 최은경,  
김윤섭, 박재석, 지영구, 이계영

=Abstract=

### Gemcitabine-induced Cell Death in Lung Cancer Cells : the Role of p53

Doh Hyung Kim, M.D., Wha Shim Yong, Eun Kyung Choi, M.D.,  
Youn Seup Kim, M.D., Jae Seuk Park, M.D., Young Koo Jee, M.D.,  
and Kye Young Lee, M.D.

*Departments of Internal Medicine, Dankook University College of Medicine, Chonan, Korea*

**Background** : Gemcitabine is a new anti-cancer agent for treating non-small cell lung cancer. Functioning as an antimetabolite, it induces anti-cancer effects by suppressing DNA synthesis after being incorporated into the DNA as a cytosine arabinoside analogue. When Gemcitabine is incorporated into the DNA, the p53 gene may be activated by induction of the DNA defect. However, there are a few studies on the molecular mechanisms of Gemcitabine-induced cell death. This study examined the role of p53 in Gemcitabine-induced cell death.

**Methods** : A549 and NCI-H358 lung cancer cells were used in this study. The cell viability test was done using a MTT assay at Gemcitabine concentrations of 10nM, 100nM, 1uM, 10uM and 100uM. A FACScan analysis with propidium iodide staining was used for the cell cycle analysis. Western blot analysis was done to investigate the extent of p53 activation. For the functional knock-out of p53, stable A549-E6 cells and H358-E6 cells were transfected pLXSN-16E6SD which is over expresses the human papilloma virus E6 protein that constantly degrades p53 protein. The functional knock out of p53 was confirmed by Western blot analysis after treatment with a DNA damaging agent, doxorubicine.

---

\*이 연구는 2001 학년도 단국 대학교 대학 연구비의 지원으로 연구 되었음.

Address for correspondence :

**Kye Young Lee, M.D. & Ph.D.**

Dankook University Medical Center, Division of Pulmonary Medicine

16-5, Anseo-dong, Chonan, 330-715, Korea

Phone : +82-417-550-3916 Fax : +82-417-556-3256 E-mail : kyleemd@anseo.dankook.ac.kr

**Results** : Gemcitabine exhibited cell toxicity in dose-dependent fashion. The cell cycle analysis resulted in an S phase arrest. Western blot analysis significant p53 activation in time-dependent manner. Gemcitabine-induced cytotoxicity was reduced by 20-30% in the A549-E6 cells and the 30-40% in H358-E6 cells when compared with the A549-neo and H358-neo control cells.

**Conclusion** : Gemcitabine induces an S phase arrest, as expected for the anti-metabolite, and activates the p53 gene. Furthermore, p53 might play an important role in Gemcitabine-induced cell death. Further investigation into the molecular mechanisms on how Gemcitabine activates the p53 gene and its signaling pathway are recommended. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2002, 53:275-284)

---

**Key words** : Gemcitabine, Cell death, p53, Lung cancer.

## 서 론

Gemcitabine(difluorodeoxycytidine:dFdC)은 대장암과 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 두경부 종양, 신장암, 방광암, 유방암 등 다양한 solid tumor에서 효과가 보고된 임상적 유용성이 큰 새로운 antineoplastic 계열의 항암제이다<sup>1-6</sup>. Gemcitabine은 cytosine arabinoside의 유사체(analogue)로 nucleoside transport system을 통해 세포 내에 들어가 인산화 대사물인 dFd-CDP와 dFd-CTP를 형성하며 dFd-CTP가 성장중인 DNA의 C-site에 결합하여 DNA 합성을 억제함으로써 항암 효과가 나타나는 것으로 알려져 있다<sup>7,8</sup>. p53은 tumor suppressor gene으로 DNA 손상에 반응하여 G1/S cell cycle arrest를 유발하고 아포토시스(apoptosis)를 진행한다<sup>9-13</sup>. 이러한 p53의 기능으로 볼 때 Gemcitabine이 DNA에 결합되면 손상된 DNA에 의해 p53 단백질이 활성화 될 것이라는 사실은 쉽게 추측 할 수 있다. 그러나 아직 Gemcitabine에 의한 세포 손상에서 p53의 역할에 대해서는 연구 보고가 많지 않은 실정이다. 이에 저자들은 Gemcitabine을 처치한 폐암 세포에서 관찰되는 세포 사멸에서 p53의 역할을 규명하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

## 연구 방법

### 1. 세포주 및 세포배양

세포 독성 검사와 세포 주기 검사를 위하여 폐암 세포주로 A549 세포주와 H358 세포주를 이용하였으며, 모두 ATCC에서 구입한 세포주이다. 두 세포주는 RPMI 1640 배지에서 10% fetal bovine serum, 2mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 U/mL streptomycin 등을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

### 2. Plasmids 및 transfection study

p53 활성화 여부 및 p53의 기능적인 knock-out 실험에서 Human papilloma virus-E6(HPV-E6) expression vector(pLXSN-16E6SD)는 스탠포드 대학 Dr. Rosen으로부터 공여 받았으며, lipofectamine-plus(Gibco-BRL)를 이용하여 A549-E6와 H358-E6를 제조하였다. 대조 세포주로 mock transfection한 세포주 A549-neo와 H358-neo 세포주를 사용하였다.

### 3. MTT assay

Gemcitabine에 의한 세포 독성 검사를 위하여

MTT assay를 시행하였다. MTT assay는 96-well plate에 세포 10,000 개 씩 분주한 후 Gemcitabine 100nM, 1uM, 10uM, 100uM을 각각 처치하여 24시간 후 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT) 5mg/mL 용액 20uL를 첨가하고 2시간 incubation한 후 0.1N acidified CH<sub>3</sub>Cl-HCl를 추가하면 세포들이 용해되는데 ELISA plate reader 590 nm에서 파장을 측정하여 cell viability를 결정하였다. p53의 발현과 Gemcitabine의 세포 독성에 대한 효과를 검사하기 위해 p53에 대해 기능적 knock-out한 A549-E6와 H358-E6 안정 세포주를 Gemcitabine 100nM, 1nM, 10nM, 100nM로 처치하였으며, 대조 세포주인 A549-neo 와 H358-neo에도 동량의 Gemcitabine으로 처치하고 같은 방법으로 MTT assay를 시행하여 비교하였다.

#### 4. FACSscan

Gemcitabine에 의한 세포 주기 분석은 FACSscan (Becton Dickinson사)을 이용하였다. A549 세포주에 대해 Gemcitabine 100uM을 처치한 세포주와 대조 세포주를 각각 4시간, 8시간, 12시간 후 harvest하고 cold ethanol로 고정시켰으며 cell lysate를 propidium iodide (10ug/mL)로 DNA를 염색하고 FACSscan을 이용하여 G1, S, G2 분석을 측정하였다.

#### 5. Western blot 분석

p53 활성화를 확인하기 위해 Western blot 분석을 시행하였다. A549 세포주와 H358 세포주에 대해 각 세포주를 4개의 60mm 배양접시에서 80~90%의 confluency가 되도록 배양한 후 Gemcitabine 10uM을 처치하였고 0, 2, 6, 10시간 후 Trypsin/EDTA로 harvest하여 lysis 용액 (1% SDS, 1mM

sodium vanadate, 10mM Tris-HCl pH 7.4)으로 whole cell lysate를 획득한 후 5분 간 4°C, 14,000 rpm에서 원심분리하여 단백 추출을 얻었다. Bradford assay로 단백질 농도를 측정하고 3분간 가열하여 denaturation 시킨 후 SDS-PAGE로 전기영동하여 nitrocellulose에 transfer 하였다. Blot을 blocking buffer (4% milk, 1% BSA, 10mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM NaCl, 0.1% Tween 20)에서 1시간 incubation한 후 1차 항체를 4% milk, 1% BSA, 10mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM NaCl, 0.1% Tween 20 등을 포함한 4% milk 용액에 1:1000 희석하여 1시간 동안 실온에서 incubation하고 10분씩 3회 세척한 후 horseradish peroxidase conjugated된 2차 항체 반응을 1시간 거친 다음 역시 3회 세척한 후 ECL (Amersham, Arlington Heights, IL)방법으로 결과를 확인하였다. 또한 ERK2 Ab를 reprobing하여 p53 Ab가 동량 투여 됐음을 확인하였다. A549-neo와 A549-E6 및 H358-neo와 H358-E6 세포주에 대해 p53의 기능적인 knock-out은 강력한 p53 유도 약제인 doxorubicin 1uM을 사용한 후 동일한 방법으로 western blot을 시행함으로써 확인하였다.

### 결 과

#### 1. 폐암 세포주 A549와 H358에서 Gemcitabine-유도성 세포독성

A549와 H358 세포주를 대상으로 Gemcitabine에 의한 세포 독성 검사를 시행하였다. Gemcitabine 10nM, 100nM, 1uM, 10uM, 100uM을 각각 처치하여 24시간 후 MTT assay로 cell viability를 측정 한 결과 A549 세포주에서 cell viability는 각각 97.5±3%, 88.9±4.5%, 69.1±6.5%, 53.3±4.5%, 36.9±5.5%로 전처치한 Gemcitabine 농도에 비례하여 증가된 세포 독성을 관찰할 수 있었으며, H358 세포

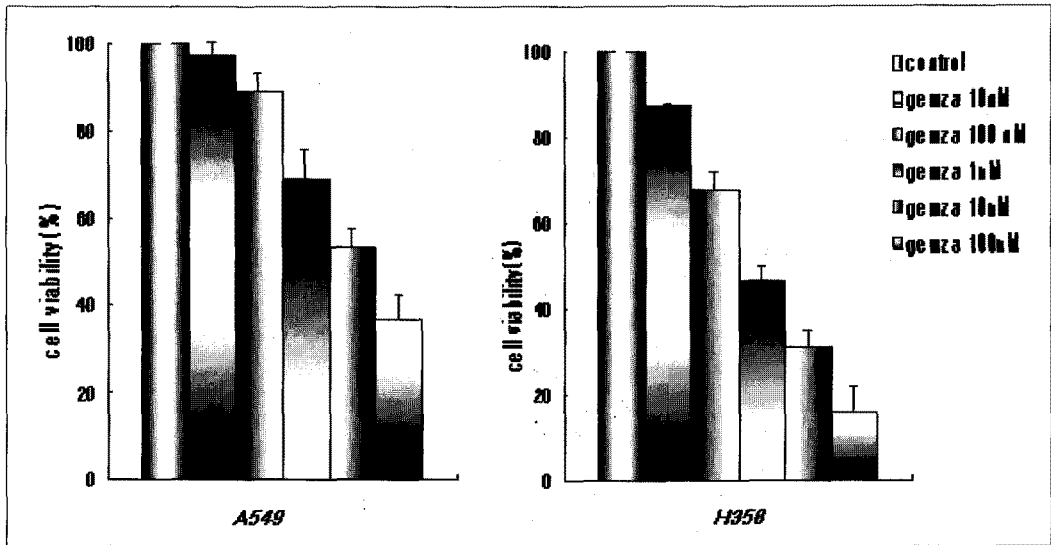


Fig. 1. Dose-dependent Gemcitabine-induced Cell death in A549 & H358 cells Gemcitabine has showed cell toxicity in dose-dependent fashion.

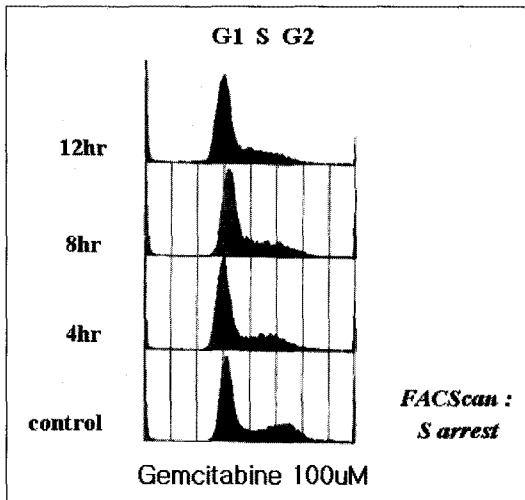


Fig. 2. Cell cycle analysis of Gemcitabine in A549 cells, which is resulted in S phase arrest.

주의 cell viability는 각각  $87.1 \pm 1.45\%$ ,  $67.8 \pm 4.5\%$ ,  $46.9 \pm 3.2\%$ ,  $31.0 \pm 3.8\%$ ,  $15.6 \pm 6.1\%$ 로 역시 전처치한 Gemcitabine 농도에 비례하여 세포 독성이 증가되는 경향을 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

## 2. FACScan을 이용한 세포 주기 검사

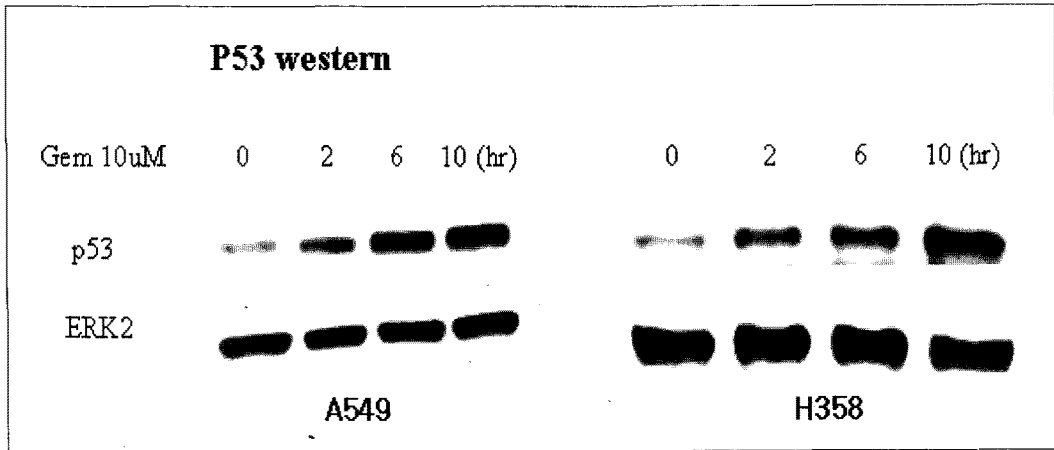
A549 세포주에 대해 Gemcitabine 100uM을 처치한 후 4시간, 8시간, 12시간 후 FACScan을 이용하여 세포 주기 검사를 시행한 결과 S phase arrest를 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

## 3. p53 발현에 대한 Gemcitabine의 효과

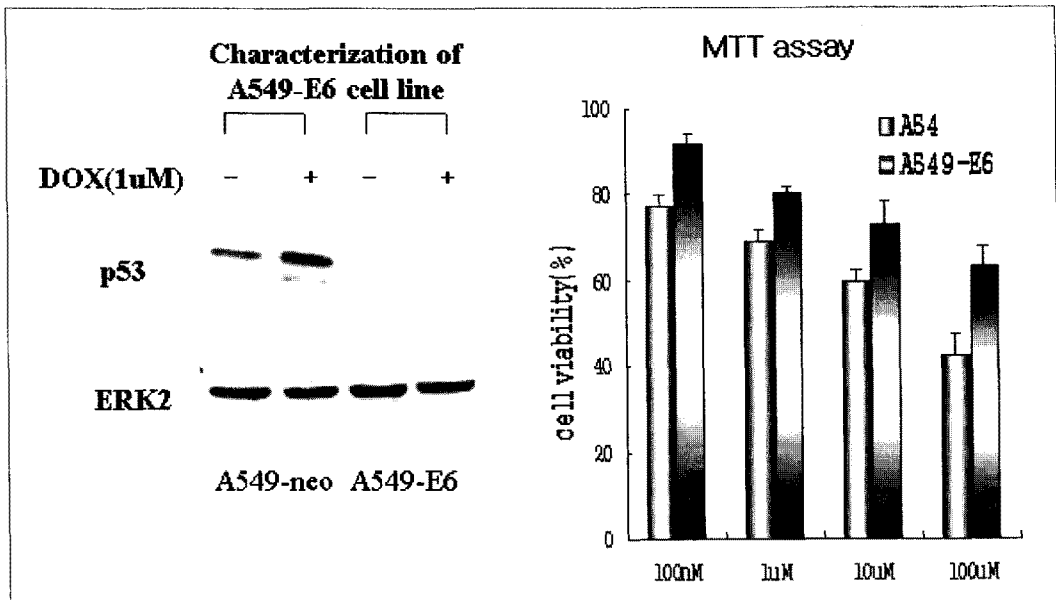
p53의 발현을 확인하기 위해 Western blot 분석을 시행하였으며 A549 세포주와 H358 세포주에 대해 Gemcitabine 10uM을 처치한 후 2시간, 6시간, 10시간 후 발현된 p53 단백질을 분석하였고, 시간 경과에 따라 Gemcitabine은 p53의 활성화를 현저히 유도함을 관찰 할 수 있었다(Fig. 3).

## 4. A549-neo와 A549-E6 세포주에서 Gemcitabine의 효과

HPV-E6 expressing vector(pLXSN-16E6SD)를



**Fig. 3.** Effect of Gemcitabine on p53 expression  
Western blot for p53 activation in gemcitabine-treated in A549 and NCI-H358 cells showed significant p53 activation in time-dependent manner.



**Fig. 4.** Effect of Gemcitabine on cell survival in A549-neo and A549-E6 cells  
Gemcitabine-induced cytotoxicity was 20-30% reduced in A549-E6 cells when compared with A549-neo control cells.

과발현시켜 p53 단백질의 분해를 촉진시키는 안정 세포주 A549-E6와 대조 세포주 A549-neo 세포주에 doxorubicin 1uM을 처치한 후 western blot 분

석을 시행하여 A549-E6 세포주에서 p53의 기능적 knock-out이 있음을 확인하였다. A549-E6에 Gemcitabine 100nM, 1uM, 10uM, 100uM을 처치하고

A549-neo 역시 동량의 Gemcitabine으로 처치한 후 MTT assay를 시행한 결과, A549-neo의 경우 각각 77.2±2.5%, 69.1±2.3%, 59.3±3.4%, 42.3±5.3%의 세포 생존을 보였으나 A549-E6의 경우 92±2.1%, 80±1.7%, 73±5.6%, 63.1±4.6%의 생존을 보여 Gemcitabine의 세포 독성은 p53이 발현되지 않은 경우 대조 세포주에 비해 20-30%의 차단 효과가 있음을 알 수 있었다(Fig. 4).

### 5. H358-neo와 H358-E6 세포주에서 Gemcitabine의 효과

HPV-E6 expressing vector를 과발현하는 안정 세포주 H358-E6와 대조 세포주 H358-neo 세포주에 doxorubicin 1μM을 처치한 후 western blot 분석으로 H358-E6 세포주에서 p53의 기능적 knock-out이 있음을 증명했다. 같은 방법으로 Gemcitabine 100nM, 1μM, 10μM, 100μM을 H358-E6와

H358-neo에 처치한 후 MTT assay를 시행하였으며 H358-neo의 경우 각각 67.8±3.5%, 46.7±2.7%, 31.0±4.5%, 15.6±5.4%의 세포 생존율을 보였고, H358-E6는 87.2±2.3%, 68.6±7.5%, 50.6±4.5%, 44.2±8%의 생존율을 보여 H358-E6 세포주에서 세포 독성은 대조 세포주에 비해 30-40%의 차단 효과가 있음을 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

### 고 찰

p53은 tumor suppressor gene으로 각종 암에서 발견되는 가장 흔한 유전자 변화이며, p53 gene의 돌연변이는 p53 gene product의 기능적 결핍 또는 비활성화를 유발하여 종양 발생의 병인과 치료 성적에서 중요한 역할을 하는 것으로 생각되고 있다<sup>14-16</sup>. 실제로 p53의 돌연 변이는 소세포 폐암의 거의 대부분에서 발견되고 있으며, 비소세포 폐암의 약 50%가 p53의 돌연 변이를 발현하는 것으로 알려

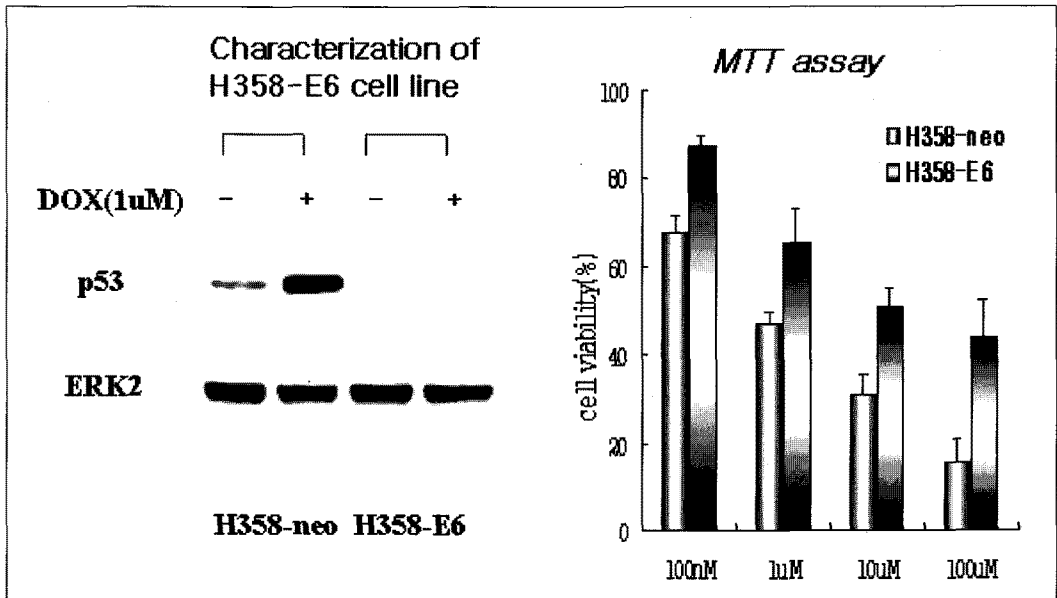


Fig. 5. Effect of Gemcitabine on cell survival in H358-neo and H358-E6 cells Gemcitabine-induced cytotoxicity was 30-40% reduced in H358-E6 cells when compared with H358-neo control cells.

져 있다<sup>17</sup>. p53은 apoptotic machinery의 조절에 있어 중추적 역할을 수행하며, DNA 손상에 반응하여 G1/S cell cycle arrest를 유발하고 아포프토시스를 개시한다<sup>9-13</sup>. p53 gene product의 기능적 이상이나 결핍을 보이는 세포는 DNA 손상에 반응하여 아포프토시스를 진행 시킬 수 없는 세포에서 발견 되는데, 이는 p53의 상태가 DNA 손상에 대한 반응을 결정하는 중요 결정 인자임을 보이는 것으로 항암제를 비롯한 세포 독성 물질과 방사선 치료등에 대한 종양세포의 감수성과 저항성에 관련 있는 것으로 생각된다<sup>12,13,18</sup>.

Gemcitabine은 다양한 solid tumor에 대한 항암 효과를 인정 받은 새로운 antimetabolite 계열의 항암제이다. Gemcitabine은 세포 내로 nucleoside transport system을 통해 들어가 monophosphopyridine kinase와 diphosphokinase에 의해 순차적으로 인산화되어 dFd-CDP와 dFd-CTP를 형성하며, dFd-CTP는 성장중인 DNA의 C-site에 결합하여 3' - 5' endonuclease에 의한 DNA의 복구를 막아 "masked DNA chain termination"을 거치게 한다<sup>7,8,19-21</sup>. 다른 활성형 대사 산물인 dFd-CDP 역시 ribonuclease reductase를 억제하여 간접적으로 DNA의 합성을 억제하고 de novo DNA synthesis pathway를 차단하며, 정상적인 deoxynucleotide triphosphate의 세포내 농도를 저하시켜 dFd-CTP의 activity를 강화한다<sup>22</sup>. 또한 Gemcitabine은 RNA에도 결합하여 RNA 합성을 억제하는 것으로 알려져 있다<sup>23</sup>. 이러한 p53의 역할과 Gemcitabine의 작용기전으로 보아 DNA 손상에 이은 p53의 활성화와 아포프토시스가 Gemcitabine의 치료 효과 및 저항성에 있어 중요한 역할을 하리라 쉽게 추측할 수 있다. 본 연구에서 A549 세포주와 H358 세포주에 대한 세포 주기 검사에서 S phase arrest가 관찰되었고, p53 western blot을 통해 Gemcitabine 처치 후 p53의 발현이 증가됨을 관찰 할 수 있었으며, p53의 기능적 knock-out 상태에서

Gemcitabine을 처치한 후 A549-E6에서 20-30%, H358-E6에서 30-40%의 세포 독성의 차단 효과를 관찰할 수 있었다. 즉, Gemcitabine이 폐암 세포에서 p53의 발현을 유도하여 세포의 아포프토시스를 유발하며, p53의 기능적인 차단으로 세포 독성의 효과가 감소하는 것을 확인 하였다. 이러한 결과를 바탕으로 Gemcitabine에 의한 폐암 세포의 사멸 및 약제에 대한 감수성과 저항성에 p53의 발현 여부가 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있었는데, 이는 wild type p53(wt-p53)을 갖는 세포가 mutant p53(mut-p53)을 동반한 세포들보다 Gemcitabine에 민감하다는 Feng와 Chen 등의 보고와 같은 소견이며, wt-p53 vector를 p53 null cell에 transfection하여 Gemcitabine의 감수성을 증가 시켰다는 다른 보고와도 일치 한다<sup>24-26</sup>. 그러나 Merlin과 Rieger등의 보고에서는 Gemcitabine의 세포 독성에 있어 wt-p53과 mut-p53간의 감수성 차이를 관찰 할 수 없었다고 한다<sup>27,28</sup>. 이는 비록 p53이 DNA 손상에 반응하여 아포프토시스를 개시하는 중요한 역할을 수행 할지라도 아포프토시스의 진행은 apoptotic pathway의 down stream을 조절하는 여러 유전자들(ex. Bcl-2, Bcl-X/L, Bax, Bim etc)의 복잡하고 유기적인 작용에 의해 조절되기 때문으로 생각되며, Gemcitabine에 의한 세포 독성이 p53의 다른 유전자들의 영향을 받고 있을 가능성을 시사 한다. 그러나 본 연구에서 apoptotic pathway의 down stream regulator에 대한 연구는 이루어지지 않았으며, 향후 Gemcitabine에 의해 p53의 활성화가 발생하는 신호 경로와 p53 활성화에 의한 아포프토시스의 신호 경로에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 요 약

### 연구배경:

Gemcitabine은 폐암에서 임상적 유용성이 큰 새로

운 항암제이다. 저자들은 폐암세포에서 Gemcitabine에 의한 세포 사멸과 p53의 역할을 규명하고자 하였다.

**방 법 :**

폐암 세포주로 A549와 H358 세포주를 이용하였고 세포 독성 검사는 MTT assay를 이용하였으며 Gemcitabine 농도는 10nM, 100nM, 1uM, 10uM, 100uM을 사용하였다. 세포 주기 검사는 FACScan을 이용하여 분석하였고 p53 활성화 여부는 western blot을 사용하였다. p53 단백질 분해를 촉진시키는 안정적 세포주 A549-E6과 H358-E6을 제조하고 대조 세포주 A549-neo와 H358-neo 세포주와 비교하여 p53의 기능적 knock-out 실험을 시행하였다. p53의 기능적 knock-out은 p53 유도 약제인 doxorubicine 1uM을 사용하여 western blot으로 확인하였다.

**결 과 :**

A549와 H358 세포주에서 Gemcitabine은 농도에 비례한 세포 독성을 보였고 S phase arrest와 p53의 활성화를 유도하였다. 안정적 세포주 A549-E6과 H358-E6은 MTT assay에서 대조 세포주 A549-neo와 H358-neo에 비해 각각 20-30%, 30-40%의 세포 독성 차단효과를 보였다.

**결 론 :**

Gemcitabine은 S phase arrest를 유발시키고 p53 단백질의 활성화를 유도하며 p53의 기능소실이 Gemcitabine에 대한 저항인자로 작용하고 있음을 확인할 수 있었다. 향후 Gemcitabine에 의해 p53의 활성화가 발생하는 신호경로와 p53 활성화에 의한 아포프토시스의 신호경로에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

**참 고 문 헌**

1. Hertel LW, Boder GB, Kroin JS, Rinzel SM, Poore GA, Todd GC, Grindey GB. Evaluation

of the antitumor activity of gemcitabine (2', 2'-difluoro-2'-deoxycytidine). *Cancer Res* 1990;50:4417-22.

2. Abbruzzese JL, Grunewald R, Weeks EA, Gravel D, Adams T, Nowak B, Mineishi S, et al. A phase I clinical, plasma, and cellular pharmacology study of gemcitabine. *J Clin Oncol* 1991;9:491-8.

3. Cormier Y, Eisenhauer E, Muldal A, Gregg R, Ayoub J, Goss G, Stewart D, et al. Gemcitabine is an active new agent in previously untreated extensive small cell lung cancer (SCLC). A study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Ann Oncol* 1994;5:283-5.

4. Catimel G, Vermorken JB, Clavel M, de Mulder P, Judson I, Sessa C, Piccart M, et al. A phase II study of Gemcitabine (LY 188011) in patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. EORTC Early Clinical Trials Group. *Ann Oncol* 1994;5:543-7.

5. De Mulder PH, Weissbach L, Jakse G, Osieka R, Blatter J. Gemcitabine: a phase II study in patients with advanced renal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 1996;37:491-5.

6. Carmichael J, Philip P, Rea D, Kerr H, Walling J, Harris AL, Possinger K. Gemcitabine: an active drug in advanced breast cancer. results of a Phase II study. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1992;11:77.

7. Huang P, Chubb S, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W. Action of 2', 2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res* 1991; 51:6110-7.

8. Plunkett W, Huang P, Xu YZ, Heinemann V,



- Grunewald R, Gandhi V. Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potentiation. *Semin Oncol* 1995;22:3-10.
9. Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993;362:847-9.
  10. Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cipl in normal human fibroblasts. *Genes Dev* 1994;8:2540-51.
  11. Kagawa S, Fujiwara T, Hizuta A, Yasuda T, Zhang WW, Roth JA, Tanaka N. p53 expression overcomes p21WAF1/CIP1-mediated G1 arrest and induces apoptosis in human cancer cells. *Oncogene* 1997;15:1903-9.
  12. Caelles C, Helmborg A, Karin M. p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature* 1994;370:220-3.
  13. Haupt Y, Rowan S, Shaulian E, Kazaz A, Vousden K, Oren M. p53 mediated apoptosis in HeLa cells: transcription dependent and independent mechanisms. *Leukemia* 1997;11:337-9.
  14. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991;253:49-53.
  15. Hollstein M, Shomer B, Greenblatt M, Soussi T, Hovig E, Montesano R, Harris CC. Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. *Nucleic Acids Res* 1996;24:141-6.
  16. Kovach JS, Hartmann A, Blaszyk H, Cunningham J, Schaid D, Sommer SS. Mutation detection by highly sensitive methods indicates that p53 gene mutations in breast cancer can have important prognostic value. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:1093-6.
  17. Takahashi T, Takahashi T, Suzuki H, Hida T, Sekido Y, Ariyoshi Y, Ueda R. The p53 gene is very frequently mutated in small-cell lung cancer with a distinct nucleotide substitution pattern. *Oncogene* 1991;6:1775-8.
  18. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456-62.
  19. Mackey JR, Mani RS, Selner M, Mowles D, Young JD, Belt JA, Crawford CR, Cass CE. Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer Res* 1998;58:4349-57.
  20. Bouffard DY, Laliberte J, Momparler RL. Kinetic studies on 2', 2'-difluorodeoxycytidine (Gemcitabine) with purified human deoxycytidine kinase and cytidine deaminase. *Biochem Pharmacol* 1993;45:1857-61.
  21. Plunkett W, Huang P, Gandhi V. Preclinical characteristics of gemcitabine. *Anticancer Drugs* 1995;6:7-13.
  22. Huang P, Plunkett W. Induction of apoptosis by gemcitabine. *Semin Oncol* 1995;22:19-25.
  23. Ruiz van Haperen VW, Veerman G, Vermorcken JB, Peters GJ. 2', 2'-Difluoro-deoxycytidine (gemcitabine) incorporation into RNA and DNA of tumour cell lines. *Biochem Pharmacol* 1993;46:762-6.
  24. Feng L, Achanta G, Pelicano H, Zhang W, Plunkett W, Huang P. Role of p53 in cellular response to anticancer nucleoside analog-

- induced DNA damage. *Int J Mol Med* 2000; 5:597-604.
25. Chen M, Hough AM, Lawrence TS. The role of p53 in gemcitabine-mediated cytotoxicity and radiosensitization. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000;45:369-74.
26. Cascallo M, Calbo J, Gelpi JL, Mazo A. Modulation of drug cytotoxicity by reintroduction of wild-type p53 gene (Ad5CMV-p53) in human pancreatic cancer. *Cancer Gene Ther* 2000 ;7:545-56.
27. Merlin T, Brandner G, Hess RD. Cell cycle arrest in ovarian cancer cell lines does not depend on p53 status upon treatment with cytostatic drugs. *Int J Oncol* 1998;13:1007-16.
28. Rieger J, Durka S, Streffer J, Dichgans J, Weller M. Gemcitabine cytotoxicity of human malignant glioma cells: modulation by anti-oxidants, BCL-2 and dexamethasone. *Eur J Pharmacol* 1999;365:301-8.