

후두암 및 폐암 세포주에서 Flavopiridol이 방사선에 의한 아포토시스에 미치는 영향

가톨릭대학교 의과대학 방사선종양학교실*, 서울대학교 의과대학 암연구소†, 서울대학교 의과대학 방사선종양학교실†

김수지* · 권은경† · 이승희† · 박혜진† · 우홍균†,†

목적: 세포 주기 억제제인 flavopiridol이 후두암과 폐암 세포주에서 방사선에 의한 아포토시스에 미치는 영향을 알아보고 세포 내 아포토시스 조절 물질들의 발현에 어떤 변화를 가져오는지 알아본다.

대상 및 방법: 사람 후두암 세포주인 AMC-HN3와 폐암 세포주인 NCI-H460을 배양하여 1) 아무 처치도 하지 않은 군, 2) 방사선 조사만 한 군, 3) flavopiridol 약물 처치만 한 군, 4) 방사선과 flavopiridol 동시 병합 치료를 한 군으로 나누어 비교하였다. 방사선 조사시 4 MV 선형가속기의 X-ray를 10 Gy 조사하였고 flavopiridol은 세포 배양액에 100 nM 농도로 희석하여 24시간 동안 투여했다. 치료를 시작한 시점으로부터 24시간 후에 네 군의 아포토시스를 비교하였다. 아포토시스는 유세포 분석기를 이용하여 sub-G1 세포의 분율로 구했다. 또한 네 군에서 cleaved caspase-3, cleaved PARP (poly(ADP-ribose) polymerase), p53, p21, cyclin D1, phosphorylated Akt (protein kinase B) 발현 양상을 비교하기 위해 면역단백분석을 시행하였다.

결과: 방사선 단독 처치 또는 flavopiridol 단독 처치한 군에 비해 방사선과 flavopiridol을 동시 병합 치료한 군에서 아포토시스가 증가하는 것을 두 가지 암세포주 모두에서 확인할 수 있었다. 면역단백분석에서도 cleaved caspase-3, cleaved PARP 발현이 동시 병합 치료 군에서 높게 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 두 세포주 모두에서 flavopiridol에 의해 cyclin D1 발현이 감소되는 것을 확인하였으나 flavopiridol이 p53, p21 발현에 미치는 영향은 세포주에 따라 다르게 나타났으며 Akt 발현은 두 세포주 모두에서 flavopiridol 투여에 의한 변화가 없었다.

결론: 본 실험을 통해 사람 후두암 및 폐암 세포주에서 flavopiridol이 방사선에 의한 아포토시스를 증가시킴으로써 방사선 치료 효과를 증진시킬 수 있음을 확인하였다. Flavopiridol이 p53, p21 발현에 미치는 영향은 세포주에 따라 다른 것으로 나타났으며 phosphorylated Akt 발현은 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

핵심용어: Flavopiridol, 방사선, AMC-HN3, NCI-H460, 아포토시스

서 론

Flavopiridol은 *Dysoxylum binectariferum*라는 인도 자생 식물을 원료로 한 합성 플라보노이드의 일종으로 세포주기를 조절하는 cyclin-dependent kinases (cdks)를 강력하게 억제함으로써 세포 주기의 진행을 억제하는 약물이다. Flavopiridol을 암 치료에 이용하고자 하는 시도는 미국 국립암

센터(National Cancer Institute)에서 시작되었다.¹⁾ 진행된 암 환자들에게 flavopiridol을 단독으로 투여한 제 1상 및 제 2상 임상 시험에서 secretory diarrhea 등의 심각한 부작용이 많은 것으로 나타났다.^{2~6)} 따라서 이 약물을 단독으로 투여하기 보다는 다른 항암제와 병용하여 암 치료에 사용하고자 하는 연구들이 진행되고 있다.^{7~9)}

Flavopiridol을 방사선 치료 효과를 증진시키는 목적으로 사용하고자 하는 시도는 비교적 최근에 들어와서 이루어졌으며 몇몇 마우스 및 인간 인간 암세포주에서 방사선의 세포 살상 효과를 증진시킨다는 결과들이 보고 되었다.^{10~13)} 본 저자들은 이전에 인간 자궁경부암 세포주인 HeLa에서 flavopiridol이 방사선에 의한 세포 살상 효과를 증진시킴을 국내에 보고한 바 있다.¹⁴⁾

이 논문은 2007년 10월 16일 접수하여 2007년 11월 20일 채택되었음.
책임저자: 우홍균, 서울대학교 의과대학 방사선종양학교실
Tel: 02)2072-3177, Fax: 02)765-3317
E-mail: wuhg@snu.ac.kr
본 연구는 서울대학교 일반 연구비 04-2005-050-0의 지원에 의하여 이루어졌음.

널리 알려진 바와 같이 방사선에 의한 세포 살상 형태는 증식사(mitotic death)와 아포토시스(apoptosis)가 있으며 방사선에 의한 암세포의 아포토시스를 증가시킴으로써 암 치료 효과를 증진시킬 수 있다.

본 연구에서는 flavopiridol이 방사선으로 인한 암세포의 아포토시스에 미치는 영향을 알아보고 flavopiridol에 의해 세포 내 아포토시스 조절 물질의 발현에 어떠한 변화가 일어나는지 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 세포 배양

인간후두암 세포주인 AMC-HN3는 조직학적으로는 중등도로 분화된 편평상피암이며, 울산의대 아산병원에서 무상으로 분양 받았다. 이 세포주는 10% fetal bovine serum (JRH Biosciences Inc., Lenexa, KS)과 12.5 µg/mL gentamycin을 첨가한 DMEM (Join Bio Innovation, South Korea) 배지에서 온도 37°C, 5% 이산화탄소 조건에서 배양하였다. 인간 폐암 세포주인 NCI-H460은 American Tissue Culture Collection (ATCC)에서 구입했고 조직학적으로는 폐의 대세포암이었다. 이 세포주는 20% fetal bovine serum을 첨가한 DMEM에서 배양하였다.

2. Flavopiridol 투여 및 방사선 조사

약물 flavopiridol은 Aventis Pharmaceuticals (Bridgewater, NJ) 사로부터 무상제공 받았다. 분말상태의 약물을 실험에 사용하기 전에 DMSO에 1 mM 농도로 희석해 두었다가 세포에 투여 시 세포 배양액에 원하는 농도로 희석하여 투여했다. Flavopiridol은 24시간 동안 처치하였으며 24시간이 지난 후엔 배양액을 갈아주었다.

예비 실험에서 두 가지 세포주에 대해 flavopiridol의 IC50 (세포 생존율이 50%가 되는 농도)를 구했을 때, AMC-HN3와 NCI-H460에서 각각 85 nM, 110 nM이었다(상세 결과 생략). 따라서 본 실험에서는 flavopiridol 투여 시 100 nM 농도를 사용하였다.

방사선은 선형가속기(Clinac 4/100, Varian, Palo Alto, CA)를 이용해 10 Gy 선량의 4 MV의 X-ray를 조사하였다.

3. 유세포 계측 검사(Flow cytometric assay)

아포토시스가 유발된 세포군을 정량적으로 분석하기 위하여 유세포계측기(FACS Calibur, Becton Dickinson, San Jose, CA)를 이용하였다. 처치가 끝난 세포를 회수하여 인산완충액(phosphate buffered saline, PBS)으로 세척한 후 1%

농도로 PBS에 희석한 formaldehyde 용액에 고정시켰다. 세포들을 다시 한번 세척한 후 80% cold ethanol을 넣고 24시간 동안 두었다가 PBS로 두 번 세척하였다. 세포들을 0.25% Triton X-100 용액에 5분간 두었다가 1200 rpm에서 5분간 원심 분리한 후에 다시 세척하고 5 µg/mL의 propidium iodide (Molecular probes, the Netherlands)와 0.1% RNase A (Sigma, St. Louis, MO) 용액을 첨가하여 상온에서 20분간 염색하였다.

4. 면역단백분석(Western blotting)

세포들을 차가운 cell lysis buffer (iNtRON Biotechnology, Seoul, Korea)에 용해한 뒤 13,000 g, 20분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액에서 단백질 정량을 시행한 후 단백질 30 µg을 취하여 12.5% SDS-PAGE로 전기영동한 후 PVDF membrane (Millipore Corp., Bedford, MA)로 이동시켰다. 이를 5% 탈지유와 0.1% Tween-20을 포함하는 Tris-buffered saline (TBST)에 한 시간동안 처리하고 분석하고자 하는 각 단백질에 대한 1차 항체로 4°C에서 하룻밤동안 처리하였다. 다시 TBST로 세척하고 peroxidase가 접합되어있는 2차 항체로 1시간 동안 반응시킨 후 chemiluminescence system (Amersham Pharmacia Biotech, Piscatasay, NJ)으로 발색시킨 후 band를 관찰하였다. 사용된 항체는 caspase-3 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), PARP (Cell Signaling Technology), p53 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), p21 (Santa Cruz Biotechnology), cyclin D1 (BD biosciences, San Jose, CA), phospho-Akt (Ser 473) (Cell Signaling Technology), α-tubulin (Sigma, St. Louis, MO) 등으로 생산회사가 추천하는 농도를 사용하였다.

5. 통계학적 방법

유세포 분석기를 이용해 구한 sub-G1 fraction은 3회 반복 실험 결과를 평균(표준편차로 나타내었고 두 평균치의 비교는 Student's t-test 방법을 이용하였다.

결 과

1. 방사선에 의한 아포토시스율

유세포 분석기를 이용하여 sub-G1 fraction을 측정하여 아포토시스율(평균±표준편차)을 구했다.

AMC-HN3 세포들을 아무 처치도 하지 않았을 때 24시간 후의 아포토시스율은 4.0±1.5%였으며, 10 Gy 방사선을 조사하고 24시간 후엔 9.4±0.4%, 100 nM Flavopiridol을 24시간동안 단독 처치한 후엔 19.7±2.2%였다(Fig. 1). 방사선

과 Flavopiridol 동시 병합치료(R+F)24 후의 아포토시스율은 $41.9 \pm 13.4\%$ 로서 방사선 단독 혹은 Flavopiridol 단독 처리 후의 아포토시스율보다 통계적으로 유의하게 더 증가하였다($p < 0.05$).

NCI-H460 세포들을 아무 처리 하지 않았을 때 24시간 후의 아포토시스율은 $7.3 \pm 2.6\%$ 였으며, 방사선 및 flavopiridol 단독 처리 24시간 후의 아포토시스율은 각각 $14.9 \pm 8.2\%$, $15.5 \pm 4.9\%$ 이었다(Fig. 2). 방사선과 flavopiridol 동시 병합 치료 후의 아포토시스율은 $27.1 \pm 2.2\%$ 로서 방사선 단독 처

치 후의 아포토시스율과는 통계적으로 유의한 차이가 있었으나($p < 0.05$) flavopiridol 단독 처리 후의 아포토시스율과는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 못했다($p = 0.08$).

2. Cleaved PARP, cleaved caspase-3 발현의 변화

면역단백분석으로 아포토시스 신호전달 과정의 마지막 단계에서 활성화되는 caspase-3와 PARP 발현을 조사하였다.

AMC-HN3와 NCI-H460 두 가지 세포주 모두에서 방사선 또는 flavopiridol 단독 처리한 경우보다 방사선과 flavopiridol

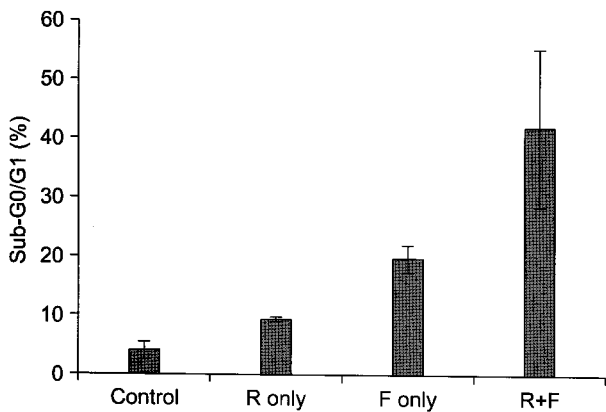


Fig. 1. Apoptotic rate of AMC-HN3 cells measured by sub-G1 portion of flow cytometry. Cells were treated with radiation alone (R only), flavopiridol alone for 24 hours (F only) or flavopiridol in combination with radiation (R+F) as described in "Materials and Methods". An increase of apoptotic rate was achieved by combination treatment. Vertical bars are standard deviations of mean.

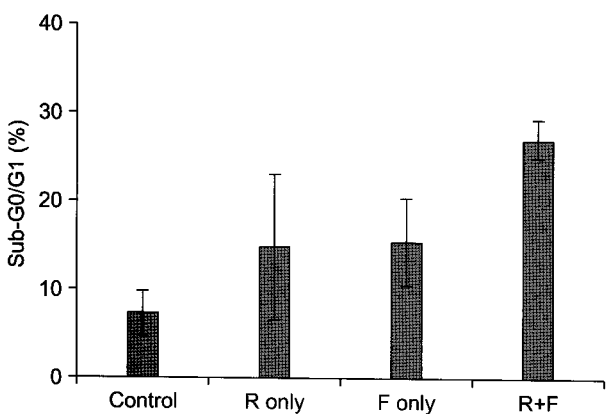


Fig. 2. Apoptotic rate of NCI-H460 cells measured by sub-G1 portion of flow cytometry. Cells were treated with radiation alone (R only), flavopiridol alone for 24 hours (F only) or flavopiridol in combination with radiation (R+F) as described in "Materials and Methods". An increase of apoptotic rate was achieved by combination treatment. Vertical bars are standard deviations of mean.

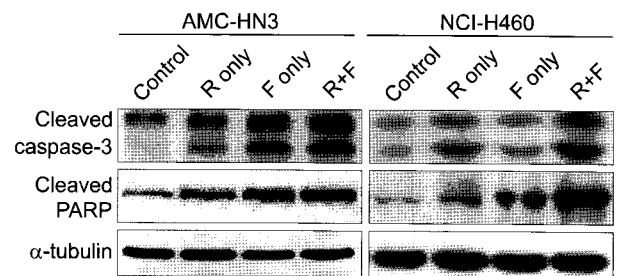


Fig. 3. Western blot analysis of PARP and caspase-3 cleavage. Cells were treated with 10 Gy of radiation (R only), 100 nM of flavopiridol (F only), or combination of radiation and flavopiridol (R+F) and protein was isolated. Lysates were analyzed by Western blotting as described in "Materials and Methods". Cleaved products of PARP and caspases-3 were detected in cells undergoing apoptosis. Flavopiridol increased radiation-induced apoptosis in AMC-HN3 and NCI-H460 cells. Data are representative of three independent experiments.

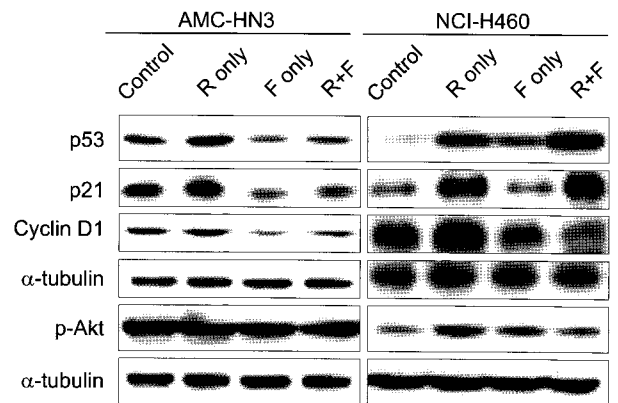


Fig. 4. Flavopiridol effect on protein expressions of p53, p21 cyclin D1, and phosphorylated Akt (p-Akt). Cells were treated with 10 Gy of radiation (R only), 100 nM of flavopiridol (F only), or combination of radiation and flavopiridol (R+F) and protein was isolated. Lysates were analyzed by Western blotting as described in "Materials and Methods". Flavopiridol downregulated cyclin D1 expression and it had no effect on Akt activation in both cell lines. Flavopiridol effect on p53 and p21 expressions was different according to cell lines. Data are representative of three independent experiments.

을 병합 치료했을 때에 caspase-3와 PARP가 더욱 활성화 되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

3. p53, p21, cyclin D1, phosphoylated Akt 발현의 변화

두 세포주 모두에서 방사선 조사 24시간 후에 p53 및 p21 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). Cyclin D1은 NCI-H460 세포주에서는 방사선 조사 후에 증가했으나 AMC-HN3 세포주에서는 방사선 조사 후에도 아무 처치도 하지 않은 경우와 비교해 차이가 없었다.

Flavopiridol 단독 처치 후에 두 가지 세포주 모두에서 cyclin D1 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 방사선과 flavopiridol 동시 병합 치료 후의 cyclin D1 발현은 아무 처치도 하지 않은 경우나 방사선 단독 처치한 경우에 비해서 감소하였다.

AMC-HN3 세포주는 Flavopiridol 처치에 의해서 p53과 p21 발현이 감소하였다. 그러나 NCI-H460 세포주는 Flavopiridol 처치가 p53 및 p21 발현에 변화를 주지 않았다.

Flavopiridol은 두 세포주 모두에서 phosphorylated Akt 발현에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

고안 및 결론

Flavopiridol은 몇몇 암세포주에서 아포토시스를 증가시키므로써 방사선효과를 증진시키는 약물로 보고되고 있다. Jung 등은 대장암 및 위암 세포주에서 flavopiridol이 감마선에 의한 아포토시스를 증가시킨다고 보고하였고 Raju 등은 식도암 세포주에서 flavopiridol이 방사선에 의해 유도되는 아포토시스를 증가시킨다고 보고하였다.^{10,11)} Kim 등은 본 실험에서 사용된 것과 같은 NCI-H460 세포주를 사용했는데 docetaxel과 flavopiridol 두 가지 약물 병합치료가 방사선에 의한 아포토시스를 증가시키므로써 *in vivo*와 *in vitro* 조건 모두에서 암세포에 대한 방사선치료 효과를 증진시켰다고 보고하였다.¹⁵⁾

본 실험에서는 후두암 및 폐암 세포주를 사용하여 flavopiridol이 방사선에 의한 아포토시스에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 정량적 분석을 위해 유세포 분석기를 사용하여 sub-G1 fraction을 구했을 때 방사선 단독 또는 flavopiridol 단독 처치한 경우보다 두 가지를 병합 치료 했을 때에 방사선에 의한 아포토시스가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 방사선에 의한 아포토시스 신호전달 체계의 맨 마지막 단계에서 활성화되는 caspase-3와 이의 substrate인 PARP cleavage를 면역단백분석으로 조사했을 때 flavopiridol이 방사선에 의한 아포토시스를 증가시키는 것을 다시 확

인할 수 있었다.

본 실험에서는 또한 세포 내에서 세포 주기 및 아포토시스 조절에 관여하는 p53, p21, cyclin D1에 대한 면역단백 분석도 시행하여 flavopiridol이 이 물질들에 어떤 변화를 가져오는지 알아보려고 하였다. 이 중 cyclin D1은 이미 알려진 바와 같이 두 세포주 모두에서 flavopiridol에 의해 발현이 감소됨을 확인할 수 있었다. 그러나 p53과 p21은 세포주에 따라 Flavopiridol 처치에 의한 변화가 다르게 나타났다. AMC-HN3 세포주에서는 flavopiridol에 의해 p53과 p21 발현이 감소되었는데, NCI-H460 세포주에서는 flavopiridol에 의해 p53은 발현이 증가되는 것으로 나타났고 p21의 경우에는 변화가 없는 것으로 나타났다. Jung 등은 위암 및 대장암 세포주에서 flavopiridol이 방사선에 의한 p21 발현을 감소시키는 것으로 보고하였고 이러한 변화가 방사선에 의한 아포토시스 증가와 관련이 있을 것으로 추론한 바 있다.¹¹⁾ 즉, 방사선을 조사했을 때 세포의 반응으로 p21 발현이 증가하여 세포 주기상 G1기 정체(G1 arrest)로 가는 것을 flavopiridol이 억제하여 방사선에 의한 아포토시스가 증가하는 것으로 생각할 수 있다. 그러나 같은 저자들도 p21 발현 감소 정도와 아포토시스 증가 정도가 꼭 일치하지 않는 것을 관찰하였고, 본 실험에서 NCI-H460 세포주에서는 p21 발현 감소가 관찰되지 않는 것으로 보아 이 한가지만으로 flavopiridol에 의한 아포토시스 증가를 모두 설명할 수는 없을 것으로 본다.

Cyclin D1의 과발현은 두경부암에서 나쁜 예후인자로 알려져 있다.¹⁶⁾ 그러나 방사선치료에 대한 반응 또는 치료 결과는 cyclin D1이 과발현된 두경부암에서 오히려 더 좋았다는 보고들이 있다.^{17,18)} 따라서 flavopiridol에 의한 cyclin D1의 발현 감소가 두경부암의 방사선 치료에 대한 반응에 어떻게 관련이 있는지에 대해서는 현재로서는 단언하기 어렵고 향후 전임상 또는 임상 실험을 통해 밝혀야 할 부분으로 생각된다.

최근 세포의 phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K)-Akt 신호전달 체계는 방사선에 의해 활성화 되어 방사선 저항성 (radioresistance)을 나타내고 아포토시스를 저해함으로써 세포의 생존을 유도하는 것으로 알려져 있다.^{19~22)} 따라서 이 신호전달 체계를 억제하는 약물은 암세포의 방사선에 대한 민감도를 높이고 아포토시스를 증가시킬 수 있을 것으로 생각되고 있다. 본 실험에서는 flavopiridol이 Akt 활성화를 억제하지는 않는지 면역단백분석을 통해 확인해 보고자 하였는데 flavopiridol은 두 가지 세포주 모두에서 Akt 활성화에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

결론적으로 flavopiridol은 후두암 및 폐암 세포주에서 아

포토시스를 증가시킴으로써 방사선 치료 효과를 증진시킬 수 있음을 확인하였고, 세포 내 아포토시스 조절 물질에 대한 영향은 세포주에 따라 다르게 나타나는 것을 보았다. 아포토시스 조절 물질에 대한 영향은 향후 gene level에서의 좀 더 많은 연구가 필요하다고 본다. 또한 향후 본 저자들은 동물 실험을 통해 flavopiridol의 방사선 치료 효과 증진을 다시 확인할 계획이며, 방사선에 의한 DNA 손상 및 복구 기전에 flavopiridol이 미치는 영향에 대해서도 추가적인 연구가 필요하다고 생각한다.

참 고 문 헌

1. **Kelland LR.** Flavopiridol, the first cyclin-dependent kinase inhibitor to enter the clinic: current status. *Expert Opin Investig Drugs* 2000;9:2903-2911
2. **Senderowicz AM, Headlee D, Stinson SF, et al.** Phase I trial of continuous infusion Flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with refractory neoplasm. *J Clin Oncol* 1998;16:2986-2999
3. **Schwartz GK, Ilson D, Saltz L, et al.** Phase II study of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol administered to patients with advanced gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 2001; 19:1985-1992
4. **Shapiro GI, Supko JG, Patterson A, et al.** A phase II trial of cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol in patients previously untreated stage IV non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:1590-1599
5. **Aklu M, Kindler HL, Donehower RC, Mani S, Vokes EE.** Phase II study of flavopiridol in patients with advanced colorectal cancer. *Ann Oncol* 2003;14:1270-1273
6. **Liu G, Gandara DR, Lara PN Jr, et al.** A phase II trial of flavopiridol (NSC #649890) in patients with previously untreated metastatic androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:924-928
7. **Schwartz GK, O'Reilly E, Ilson D, et al.** Phase I study of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol in combination with paclitaxel in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2002;20:2157-2170
8. **Shah MA, Kortmansky J, Motwani M, et al.** A phase I clinical trial of the sequential combination of irinotecan followed by flavopiridol. *Clin Cancer Res* 2005;11:3836-3845
9. **El-Rayes BF, Gadgeels S, Parchment R, Lorusso P, Philip PA.** A phase I study of flavopiridol and docetaxel. *Invest New Drugs* 2006;24:305-310
10. **Raju U, Nakata E, Mason KA, Kian Ang K, Milas L.** Flavopiridol, a cyclin-dependent kinase inhibitor, enhances radiosensitivity of ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 2003;63: 3263-3267
11. **Jung C, Motwani M, Kortmansky J, et al.** The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol potentiates γ -irradiation-induced apoptosis in colon and gastric cancer cells. *Clin Cancer Res* 2003;9:6052-6061
12. **Newcomb EW, Lymberis SC, Lukyanov Y, et al.** Radiation sensitivity of GL261 murine glioma model and enhanced radiation response by flavopiridol. *Cell Cycle* 2006;5: 93-99
13. **Raju U, Ariga H, Koto M, et al.** Improvement of esophageal adenocarcinoma cell and xenograft responses to radiation by targeting cyclin-dependent kinases. *Radiother Oncol* 2006; 80:185-191
14. **Kim SZ, Wu HG, Shin JH, Park HJ, Kim IA, Kim IH.** Enhancement of radiation effects by flavopiridol in uterine cervix cancer cells. *Cancer Research and Treatment* 2005;37: 191-195
15. **Kim JC, Saha D, Cao Q, Choy H.** Enhancement of radiation effects by combined docetaxel and flavopiridol treatment in lung cancer cells. *Radiother Oncol* 2004;71:213-221
16. **Michalides RJ, van Veelen NM, Kristel PM, et al.** Overexpression of cyclin D1 indicates a poor prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;123:497-502
17. **Yoo SS, Carter D, Turner BC, et al.** Prognostic significance of cyclin D1 protein levels in early-stage larynx cancer treated with primary radiation. *Int J Cancer* 2000;90:22-28
18. **Shintani S, Mihara M, Ueyama Y, Matsumura T, Wong DT.** Cyclin D1 overexpression associates with radiosensitivity in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2001;96:159-165
19. **Alessi DR, Cohen P.** Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr Opin Genet Dev* 1998;8:55-62
20. **Downward J.** Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:262-267
21. **Datta K, Bellacosa A, Chan TO, Tsichilis PN.** Akt is a direct target of the phosphatidylinositol 3-kinase: activation by growth factors, v-src and v-Ha-ras, in Sf9 and mammalian cells. *J Biol Chem* 1996;271:30835-30839
22. **Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, et al.** Regulation of cell death protease caspases-9 by phosphorylation. *Science* 1998;282:1318-1321

Abstract

Effect of Flavopiridol on Radiation-induced Apoptosis of Human Laryngeal and Lung Cancer Cells

Suzy Kim, M.D., Ph.D.*, Eun Kyung Kwon, B.S.[†], Seung Hee Lee, B.S.[†],
Hye Jin Park, B.S.[†] and Hong Gyun Wu, M.D., Ph.D.^{†,‡}

*Department of Radiation Oncology, The Catholic University of Korea College of Medicine,
[†]Cancer Research Institute, [‡]Department of Radiation Oncology,
Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: To investigate the flavopiridol effect on radiation-induced apoptosis and expression of apoptosis-related genes of human laryngeal and lung cancer cells.

Materials and Methods: A human laryngeal cancer cell line, AMC-HN3 and a human lung cancer cell line, NCI-H460, were used in the study. The cells were divided into four groups according to the type of treatment: 1) control groups; 2) cells that were only irradiated; 3) cells treated only with flavopiridol; 4) cells treated with flavopiridol and radiation simultaneously. The cells were irradiated with 10 Gy of X-rays using a 4 MV linear accelerator. Flavopiridol was administered to the media at a concentration of 100 nM for 24 hours. We compared the fraction of apoptotic cells of each group 24 hours after the initiation of treatment. The fraction of apoptotic cells was detected by measurement of the sub-G1 fractions from a flow cytometric analysis. The expression of apoptosis-regulating genes, including cleaved caspase-3, cleaved PARP (poly (ADP-ribose) polymerase), p53, p21, cyclin D1, and phosphorylated Akt (protein kinase B) were analyzed by Western blotting.

Results: The sub-G1 fraction of cells was significantly increased in the combination treatment group, as compared to cells exposed to radiation alone or flavopiridol alone. Western blotting also showed an increased expression of cleaved caspase-3 and cleaved PARP expression in cells of the combination treatment group, as compared with cells exposed to radiation alone or flavopiridol alone. Treatment with flavopiridol down regulated cyclin D1 expression of both cell lines but its effect on p53 and p21 expression was different according to each individual cell line. Flavopiridol did not affect the expression of phosphorylated Akt in both cell lines.

Conclusion: Treatment with flavopiridol increased radiation-induced apoptosis of both the human laryngeal and lung cancer cell lines. Flavopiridol effects on p53 and p21 expression were different according to the individual cell line and it did not affect Akt activation of both cell lines.

Key Words: Flavopiridol, Radiation, AMC-HN3, NCI-H460, Apoptosis