

Saos-2 골육종 세포에서 iron chelating agent, deferoxamine에 의한 apoptosis 유도

전북대학교 의과대학 임상의학연구소, 소아과학교실[†], 치과대학 생화학교실[†]

박은혜 · 이효정* · 이수연* · 김선영 · 이호근[†] · 이대열* · 황평한*

= Abstract =

Iron chelating agent, deferoxamine, induced apoptosis in Saos-2 osteosarcoma cancer cells

Eun Hye Park, M.S., Hyo Jung Lee, M.D.*, Soo Yeon Lee, M.D.*, Sun Young Kim, Ph.D.
Ho Keun Yi, Ph.D.[†], Dae Yeol Lee, M.D.*, and Pyoung Han Hwang, M.D.*

Research Institute of Clinical Medicine^{*}, Department of Pediatrics, School of Medicine,
Department of Biochemistry[†], School of Dentistry, Chonbuk National University, Jeonju, Korea

Purpose : Iron is a critical nutritional element that is essential for a variety of important biological processes, including cell growth and differentiation, electron transfer reactions, and oxygen transport, activation, and detoxification. Iron is also required for neoplastic cell growth due to its catalytic effects on the formation of hydroxyl radicals, suppression of host defense cell activities, and promotion of cancer cell multiplication. Chronic transfusion-dependent patients receiving chemotherapy may have iron overload, which requires iron-chelating therapy. We performed this study to demonstrate whether the iron chelating agent deferoxamine induces apoptosis in Saos-2 osteosarcoma cells, and to investigate the underlying apoptotic mechanism.

Methods : To analyze the apoptotic effects of an iron chelator, cultured Saos-2 cells were treated with deferoxamine. We analyzed cell survival by trypan blue and crystal violet analysis, apoptosis by nuclear condensation, DNA fragmentation, and cell cycle analysis, and the expression of apoptotic related proteins by Western immunoblot analysis.

Results : Deferoxamine inhibited the growth of Saos-2 cell in a time- and dose-dependent manner. The major mechanism for growth inhibition with the deferoxamine treatment was by the induction of apoptosis, which was supported by nuclear staining, DNA fragmentation analysis, and flow cytometric analysis. Furthermore, bcl-2 expression decreased, while bax, caspase-3, caspase-9, and PARP expression increased in Saos-2 cells treated with deferoxamine.

Conclusion : These results demonstrated that the iron chelating agent deferoxamine induced growth inhibition and mitochondrial-dependent apoptosis in osteosarcoma Saos-2 cells, suggesting that iron chelating agents used in controlling neoplastic cell fate can be potentially developed as an adjuvant agent enhancing the anti-tumor effect for the treatment of osteosarcoma. (Korean J Pediatr 2009;52:213-219)

Key Words : Deferoxamine, Apoptosis, Signal pathway, Osteosarcoma

서 론

철분은 적혈구, 헤모글로빈, 마이오글로빈, 사이토크롬 등의 성분이 되고 인간이 생명을 유지하는데 필수적인 요소이지만 과량의 철분은 독성을 나타내므로 트랜스페린(transferrin)과 같은 혈청

단백과 결합하거나 세포내 저장, 위장관의 흡수 조절을 통하여 체내의 적절한 철분의 유용성을 유지한다. 그러나 과량의 철분이 있을 때 이러한 조절 기전이 어려워지고 점막이 손상됨에 따라 철분은 혈액 내로 쉽게 통과될 수 있고 트랜스페린이 철분과 결합하는 능력이 고갈될 때 자유 철 이온은 증가하게 된다. 자유철은 미토콘드리아로 들어가 산화적 인산화를 억제하여 대사적 산증을 나타내고 또한 철분은 독성의 수산화 자유 라디칼(toxic hydroxyl free radical)과 막지질의 과산화(membrane lipid peroxidation)를 일으켜 여러 가지 전신증상을 나타낸다¹⁾. 또한 철분은 직접적인 부식제로 과량 복용 시에 구토, 설사, 복통을 일으키고 장 천공뿐만 아니라 점막궤양, 출혈이 발생될 수 있다²⁻⁵⁾.

수혈기술의 비약적인 발전으로 인하여 순적혈구빈혈, 재생 불

Received : 25 December 2009, Revised : 9 January 2009

Accepted : 19 January 2009

Address for correspondence : Pyoung Han Hwang, M.D.

Department of Pediatrics, Chonbuk National University Hospital, 634-18, Keumam-dong, Jeonju, Jeonbuk 561-712, Korea

Tel : +82.63-250-1472, Fax : +82.63-250-1464

E-mail : hwaph@chonbuk.ac.kr

량성 빈혈, 골수 이형성증, 중증 지중해 빈혈 등 다양한 만성 불응성 빈혈과 같은 혈액질환을 가진 환자들의 삶이 연장되는 것은 물론 삶의 질적인 향상도 이루어졌다. 그러나 이와 같은 환자들이 빈혈로 인한 합병증으로 사망하는 경우가 감소한 반면에 수혈 받은 혈액으로부터 유래된 철의 과부하로 인하여 간, 심장 등의 여러 장기에 철분이 침착되는 헤모시데린침착증(hemosiderosis)으로 인하여 갑작스럽게 사망하기도 한다^{6,7}. 더욱이 무병생존율을 증가시키기 위하여 강화된 항암화학요법에 의한 중증의 골수 억제제로 인하여 빈번한 수혈을 받고 있는 소아 종양환자들에게 헤모시데린침착증이 증가하는 추세이다. 이러한 반복수혈로 인한 헤모시데린침착증을 치료할 수 있는 킬레이트 약제에는 deferoxamine이 사용되어 왔으며 최근에는 경구용 제제인 deferasirox 등이 있다.

Deferoxamine은 *Streptomyces pilosus*로부터 추출된 철 킬레이트약제로서 비교적 저분자량단백(M.W. 656.79)으로 임상적으로는 철분 과량상태에 사용되고 있으며, 이 약물은 조직내에서 철을 제거하는 작용이 있으므로 체내의 철을 제거하여 조직 내의 철의 농도를 감소시켜 수산기의 생성을 감소시킬 수 있다고 보고된 바 있다^{8,9}. Deferoxamine은 유리철, 페리틴, 헤모시데린에 결합된 철과 반응하지만 트랜스페린, 헤모글로빈, 사이토크롬에 결합된 철은 제거하지 않는다. 따라서 혈중 내 철 농도가 감소하게 되면 조직으로부터 철이 이동함으로써 여러 장기에 축적된 병적인 철을 배설 제거하는 효과가 있으며 대량수혈로 인하여 헤모시데린 침착증이 발생한 환아에서 deferoxamine 투여는 체내 저장철의 제거에 매우 효과적이었던 연구결과가 보고되었다¹⁰.

그 외의 기능으로는 관상동맥 폐쇄로 만든 심근경색 동물 모델에서 deferoxamine을 전처치 후 심근경색 범위를 줄인다는 보고가 있었으며¹¹ paraquat 투여에 의한 간과 폐 조직의 산화성 손상에서 deferoxamine이 폐와 간 조직의 malondialdehyde (MDA) 감소, 카탈라제 활성도 증가, 폐 조직의 superoxide dismutase (SOD), 환원형 글루타치온(GSH)의 증가를 나타내어 지질과산화 억제 및 항산화 효과를 보였다¹².

최근에 deferoxamine에 의하여 악성 구강 각질세포의 성장을 억제하고 세포자멸사를 유도하며¹³, 난소암세포의 증식을 억제하고 세포자멸사를 유도하여 난소암의 성장을 억제하였다는 보고¹⁴가 있어 소아 종양환자들에서 강화된 항암화학요법으로 인한 빈번한 수혈에 의하여 체내에 철이 축적될 때 사용하는 deferoxamine이 철을 제거할 뿐만 아니라 암세포의 세포자멸사를 유도하는지에 대하여 알아보고 세포자멸사를 유도한다면 그 경로에 대하여 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 세포배양

본 연구에서 사용되었던 골육종 세포주 Saos-2는 한국세포주

은행(Korean Cell Line Bank, 서울대학교 암연구소)에서 구매하였다. 세포 배양액은 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) 배지에 56°C에서 30분간 가열하여 비활성화 시킨 10% 우태아 혈청(FBS, Hyclone, Logan, Utah, USA), penicillin (100 unit/mL), streptomycin (100 µg/mL), glutamine (300 µg/mL)을 첨가하여 제조하였다. 세포주는 위의 배양액을 사용하여 37°C, 95% 습도, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였고, 통상적으로 세포가 confluent 직전에 도달하는 3-4일 간격으로 계대 배양을 하였으며, 실험에는 총 35계대 이하인 세포만을 사용하였다.

2. 세포성장 측정 및 크리스탈 바이올렛 염색을 이용한 세포성장 분석

Saos-2 세포를 24 well plate에 2×10⁴개씩 배양시키고 0, 10, 30, 50 µM의 deferoxamine을 처리한 후, 1, 2, 3일 후에 트리판 블루 염색으로 세포성장을 측정하였다. 살아있는 세포의 정도를 측정하기 위하여 6 well plate에 2×10⁵개씩의 세포를 배양시키고 deferoxamine을 농도별로 처리하였다. 처리 48시간 후 배양 용기를 50% 메탄올로 고정시키고 phosphate buffered saline (PBS)로 3회 세척하여 생존 세포만을 용기에 부착시켰다. 부착된 세포는 크리스탈 바이올렛으로 염색하여 관찰하였다.

3. DNA 단편화(Fragmentation)

Saos-2 세포에 deferoxamine을 농도별로 처리하여 48시간 배양한 후 세포에서 일어나는 DNA의 단편화를 다음과 같이 실험하였다. 세포를 차가운 PBS로 2번 세척하여 새로운 튜브에 옮기고 lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.5% Triton X-100) 500 µL를 첨가하여 얼음에서 30분간 용해시키고, 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 세포 찌꺼기를 제거한 뒤 상층액을 새 튜브에 옮겼다. phenol/chloroform 500 µL를 처리하여 천천히 섞고 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 기타의 단백질을 제거하였다. 순수 DNA를 새로운 튜브에 옮긴 후 1/10 volume의 3 M sodium acetate와 2배의 에탄올을 넣은 후 얼음에서 30분간 방치하여 침전시켰다. 4°C, 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 DNA pellet을 얻은 후 70% 에탄올로 세척하고, 공기 중에 건조시킨 후 2 µg/µL RNase A가 함유된 TE (pH 8.0) 20 µL에 녹여 1.5% 한천 겔에서 전기영동 하여 DNA 단편화를 확인하였다.

4. 핵 응축(Nuclear condensation)

세포핵의 염색은 deferoxamine을 여러 농도로 처리한 후 48시간 동안 배양 후 먼저 세포를 회수하여 찬 PBS 용액으로 세척하여 슬라이드 글라스에 옮긴 후 실온에서 약 5분간 Carnoy 용액(메탄올:초산=3:1)으로 고정시켰다. 이 위에 Hoechst 용액 (0.1 mg/mL in PBS)을 떨어뜨린 후 실온에서 10분간 염색시키고 PBS 용액으로 2회 세척하였다. 염색 후 형광현미경에서 관찰하였다.

5. 세포주기 분석

Deferoxamine처리 후 변화되는 세포주기를 propodium iodine (PI)의 염색으로 검토하였다. Saos-2 세포주에 deferoxamine 30, 50, 70 μM 을 PBS에 희석시켜 24시간 농도별로 처리한 후 새로운 배지로 교체하였다. 처리 48시간 후 세포를 PBS로 세척하였고, 70% 에탄올로 얼음에서 30분간 고정하였다. 대략 5만개의 세포에 최종농도가 PI 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, RNase 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 되도록 첨가한 후에 유세포분석기(FACScan flow cytometer, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)을 이용하여 세포주기를 분석하였다.

6. Western hybridization

Saos-2 세포에 deferoxamine을 처리한 24시간과 48시간 후 세포로부터 총 단백질을 분리하였다. 세포를 2-3회 차가운 PBS로 세척 후 100 mm 배양용기에 1 mL의 PBS-TDS (1 \times PBS, 1% Triton X-100, 0.05% sodium deoxycholate, 0.01% SDS, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin, 1 mM EDTA, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pepstatin, 0.2 mM PMSF) 용액을 첨가, 15분간 얼음 위에서 방치 후 13,000 rpm에서 5분간 원심하여 세포막 성분 등을 제거하였으며, 단백질 농도는 bovine serum albumin (BSA)을 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 정량 하였다. 10 μg 의 용해질을 7.5% mini gel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) SDS-PAGE (poly acrylamide gel electrophoresis)로 변성 분리하였고, 이를 니트로셀룰로오스 막 (Hybond-C Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)에 60 V로 2시간동안 전기적으로 이동하였다. 막의 블로킹은 5% 탈지유가 함유된 TBS (TBS + 0.1% Tween 20)용액에서 상온에서 1시간동안 실시하였다. 세포자멸사에 관련된 단백질의 발현을 측정하기 위한 1차 항체를 1:1,000으로 TBS 용액에 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후 TBS로 3회 세척하였다. 2차 항체로는 horse radish peroxidase (HRP)가 결합된 anti-mouse IgG 혹은 anti-rabbit IgG (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)를 1:5000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응하였다. TBS로 3회 세척 후 ECL 기질(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)과 30-60초간 반응 후 LAS-3000 imaging system (FUJIFILM, Japan)을 통해 immunoreactive bands의 상대적 강도가 정량화 되었다. 본 실험에 사용한 항체는 다음과 같다. Akt : phospho-Akt (ser 473) from mice, #9276S, Cell Signaling, Bervelry, MA, USA., Akt from rabbit, #9272, Cell Signaling, Bervelry, MA, USA., Bcl-2 : Bcl-2 from mouse, sc-7382, Santa Cruz, CA, USA., Bax : Bax from rabbit, #554106, PharMingen, San Diego, CA, USA., Caspase 3 : caspase 3 from rabbit, sc- 7148, Santa Cruz, CA, USA., Caspase 9 : caspase 9 from rabbit, sc-7885, Santa Cruz, CA, USA., p38 : phospho-p38 MAP kinase (Thr180/Tyr182) From rabbit, #9211S, Cell Signaling, Ber-

velry, MA, USA.

7. 통계처리

통계 방법은 Student's *t*-test를 사용하여 검정하였으며 *P*값은 0.05 미만일 때 통계적인 유의성으로 인정하였다.

결 과

1. Deferoxamine에 의한 세포의 성장억제

골육종 세포인 Saos-2에 0, 30, 50, 70 μM 의 deferoxamine을 처리한 후 1, 2, 3일째 세포의 수를 측정한 결과 시간과 농도에 의존해서 골육종 세포의 증식이 억제되었다. 이러한 성장억제는 배양 1일째부터 나타났고 30, 50 μM 처리한 세포는 2일째부터는 세포가 전혀 성장을 하지 못하여 세포수가 현저하게 감소하였다(Fig. 1A). 살아있는 세포의 정도를 측정하기 위하여 6 well plate에 2×10^5 개씩의 세포를 배양시키고 deferoxamine을 농도별로 처리하여 24시간 후 살아있는 세포는 크리스탈 바이올렛으로 염색하여 관찰한 결과 농도 의존적으로 살아있는 세포수의 감소를 보였다(Fig. 1B).

2. Deferoxamine에 의한 세포의 핵 응축 및 DNA 단편화의 변화

Deferoxamine에 의한 세포 내에서의 형태학적 변화를 알아보기 위하여 세포핵만을 특이적으로 염색시키는 Hoechst 용액을 사용하여 세포핵의 모양을 대조군과 비교하여 관찰한 결과 deferoxamine의 농도에 의존하여 세포자멸사를 시사하는 세포 수

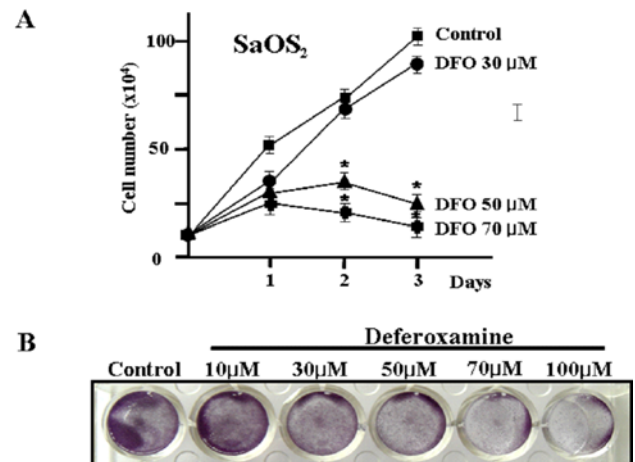


Fig. 1. Effects of deferoxamine (DFO) on cell survival in Saos-2 osteosarcoma cancer cells. Cells were treated with various concentrations of deferoxamine for 3 days. Cell survival was analyzed by trypan-blue method (A), and clonogenic survival was assayed by crystal violet staining (B). The number of cells was determined and the results presented are mean \pm SD of triplicates. **P*<0.05 (as compared with control).

축으로 인한 크기의 감소와 핵 응축이 증가하였다(Fig. 2B).

Deferoxamine을 처리 시 Saos-2 세포의 성장 억제에 세포자멸사에 의한 것인지를 확인하고자 세포자멸사가 발생하면 endonuclease에 의해 DNA가 180-200 bp 크기의 oligonucleosome으로 잘리게 되어 한천 겔에 전기영동에서 특징적인 사다리 모양을 보이는 현상을 이용해 세포자멸사 유도 여부를 관찰하였다. Deferoxamine의 처리 시 DNA 단편화 현상을 보여 세포자멸사가 일어났음을 알 수 있었으며 deferoxamine의 처리 농도가 증가할수록 DNA 단편화는 증가되었다(Fig. 2A).

3. Deferoxamine에 의한 세포주기 분석 및 세포자멸사 유도

골육종 세포인 Saos-2에 0, 30, 50, 70 μ M의 deferoxamine을 처리한 후 각 세포들의 세포주기를 유세포분석기로 분석한 결과에서 deferoxamine 처리 후 2일째 50 μ M 농도에서 G1의 arrest와 아울러 세포자멸사 분획인 A₀기의 증가를 보였다(Fig. 2C).

Deferoxamine을 처리한 후 1, 2, 3일째 세포를 측정된 결과 시간과 농도에 의존해서 골육종세포의 증식이 억제되었다. 이러한 성장억제는 배양 1일째부터 나타났고 50, 70 μ M 처리한 세포는 2일째부터는 세포가 전혀 성장을 하지 못하여 세포수가 현저하게 감소하였다. 이러한 세포수의 감소가 세포자멸사에 기인되는 것인지를 알아보기 위해 세포자멸사 유도 시에 나타나는 단백질인 poly (ADP-ribose) polymerrase (PARP)의 활성을 조사한 결과 deferoxamine을 처리한 후 2일째부터 PARP의 활성이 나타났으며 농도에 의존해서 활성도가 증가되어 골육종 세포에서 deferoxamine에 의해 세포자멸사가 유도되었음을 알 수 있었다(Fig. 3).

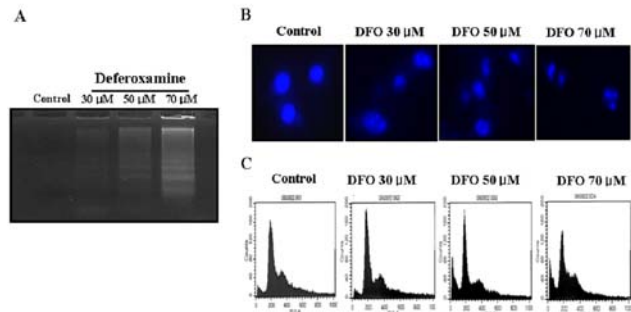


Fig. 2. Effect of deferoxamine (DFO) on the induction of apoptosis in Saos-2 osteosarcoma cancer cells. (A) Internucleosome DNA fragmentation. Cells were incubated with various concentrations of deferoxamine for 2 days, and then DNA was extracted from the cells. The fragmented DNA was analyzed by electrophoresis in 2% agarose gel and visualized with ethidium bromide. (B) Nuclear morphological analysis. Cells were treated with various concentrations of deferoxamine for 2 days and stained with DAPI for nuclear staining. Stained cells were examined by fluorescence microscopy. (C) Analysis of cell cycle and deferoxamine-treated Saos-2 cell by using FACS. Cells were incubated with various concentrations of deferoxamine for 2 days.

4. Deferoxamine 처리 후 Saos-2 세포에서 세포자멸사 유도 기전

세포자멸사가 유도되는 경로의 하나로서 미토콘드리아로부터 사이토크롬 C의 분비를 제어하는 Bcl-2와 Bax의 발현을 관찰하였다. Deferoxamine을 농도별로 처리한 후 24시간과 48시간 경과 후에 세포자멸사를 예방 또는 지연시켜 세포의 생존을 연장시키는(anti-apoptosis) Bcl-2의 발현은 deferoxamine의 농도가 증가 할수록 대조군에 비해 현저한 감소를 보였다. 반면 미토콘드리아로부터 사이토크롬 C의 분비를 촉진시켜 세포자멸사를 유도시키는 Bax의 발현은 deferoxamine의 처리농도가 증가할수록 대조군에 비해 현저히 증가를 보였다(Fig. 4). 이는 deferoxamine에 의한 Saos-2 세포에서 세포자멸사를 유도하는 중에 deferoxamine의 농도에 의존하여 Bcl-2의 감소와 Bax의 증가를 보이는 것을 시사한다.

위의 Bcl-2와 Bax에 의해 미토콘드리아로부터 분비가 조절되는 사이토크롬 C는 단백질 분해효소이며 세포자멸사에 발현되는 caspase 9의 활성을 유도시킨다. 이러한 기전과 동일하게 Saos-2 세포에 deferoxamine을 농도별로 처리한 후 48시간에 caspase 9의 활성이 강하게 나타났다. Caspase 9은 하부의 caspase 3를 활성화시키는 작용이 있으며, 이러한 caspase 3의 활성이

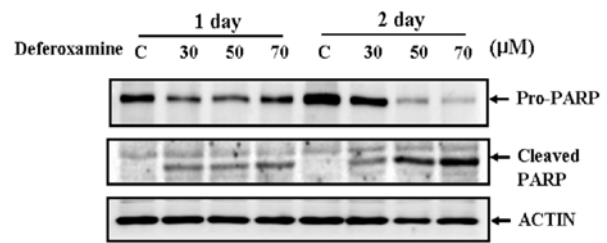


Fig. 3. Effect of deferoxamine on the expression of apoptosis-related proteins in Saos-2 osteosarcoma cancer cells. Cells were treated with various concentrations of deferoxamine for 1 day or 2 days. PARP expression was analyzed by Western immunoblot analysis with specific antibody. To confirm equal protein levels, the same blot was stripped and developed with anti-actin antibody.

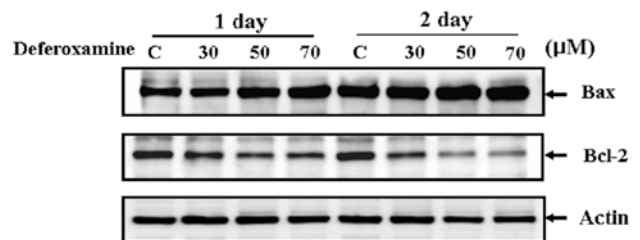


Fig. 4. Effect of deferoxamine on the expression of apoptosis-related proteins in Saos-2 osteosarcoma cancer cells. Cells were treated with various concentrations of deferoxamine for 1 day or 2 days. Bax and Bcl-2 expression were analyzed by Western immunoblot analysis with specific antibody. To confirm equal protein levels the same blot was stripped and developed with anti-actin antibody.

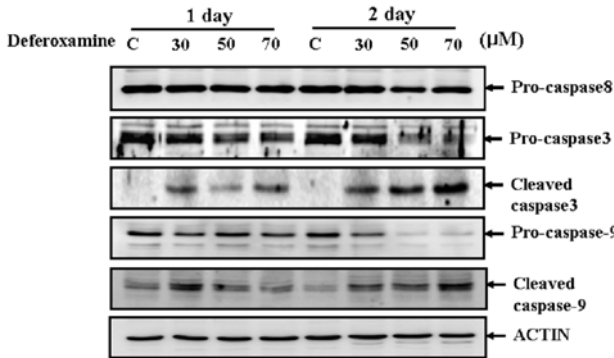


Fig. 5. Effect of deferoxamine on the expression of apoptosis-related proteins in Saos-2 osteosarcoma cancer cells. Cells were treated with various concentrations of deferoxamine for 1 day or 2 days. Caspase-3, caspase-9, and caspase-8 expression were analyzed by Western immunoblot analysis with specific antibody. To confirm equal protein levels the same blot was stripped and developed with anti-actin antibody.

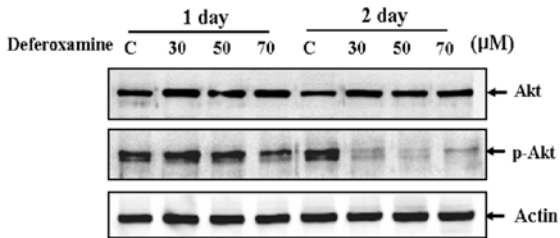


Fig. 6. Effect of deferoxamine on the expression of apoptosis-related proteins in Saos-2 osteosarcoma cancer cells. Cells were treated with various concentrations of deferoxamine for 1 day or 2 days. Akt and p-Akt expression were analyzed by Western immunoblot analysis with specific antibody. To confirm equal protein levels, the same blot was stripped and developed with anti-actin antibody.

deferoxamine을 처리한 Saos-2 세포에서 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 5).

미토콘드리아로부터 사이토크롬 C의 분비에 의해서 유도되는 세포자멸사 경로의 상부에 존재하는 유전자의 주요기능으로 Akt/PKB 세포 생존의 경로가 존재한다. Saos-2세포에 deferoxamine을 처리한 후 변화되는 Akt/PKB의 활성화를 phospho-Akt/PKB의 발현으로 확인한 결과 deferoxamine 처리 후 활성화와 비활성화를 구분하지 않는 Akt/PKB의 세포내 발현량은 변화가 거의 없었으나 반면에 활성화 형태는 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 6).

고 찰

체내에 철이 과도하게 침착되면 여러 장기에 해부학적 또는 기능적 손상을 초래하게 되는데 이중 간 손상은 과도한 철 축적과 함께 궁극적으로 비가역적 간 섬유화와 간경화가 초래된다. 간 외에도 자주 손상을 입게 되는 장기는 심장이며 이는 헤모시데린침착증의 가장 흔한 사망원인이 된다¹⁵⁾. 심근세포에서 철의

미만성 축적이 이루어져 심근의 수축력에 이상을 가져오며 간질의 섬유화가 일어나며¹⁶⁾, 시간이 경과할수록 심비대 및 박출 계수의 현저한 감소를 보이고 울혈성 심부전이 발생한다^{2, 17)}. 심방 및 심실부정맥도 심한 철 과부하 상태에서 발생할 수 있으며 이로 인해 돌연사하는 경우도 있을 것으로 생각된다²⁾. 또한 췌장의 내분비 기능 이상으로 일부의 경우 당뇨병이 발생하여 인슐린 치료가 필요한 경우도 있을 수 있으며 뇌하수체 기능 이상 중 성선 자극 호르몬의 감소로 인하여 성기능의 미숙을 초래하고 부신, 갑상선 및 부갑상선 기능 이상이 동반될 수 있다⁴⁾. 현기증, 경련 등의 중추신경계 이상 및 구토, 설사, 복통 등의 위장관 증상과 멜라닌 세포에 의한 멜라닌의 생산 증가로 인해 과색소침착이 발생하기도 한다³⁾.

이러한 헤모시데린침착증 환자들을 위한 치료약제로는 비경구약제인 deferoxamine, 경구 약제로 첫 번째 개발된 deferiprone과 최근에 개발된 경구약제인 deferasirox 등이 있다. 이들 중 지난 40년 동안 유용성이 증명된 유일한 철 킬레이트 약제는 deferoxamine인데, 한 분자의 acetic acid, 두 분자의 succinic acid, 세 분자의 1-amino 5-hydroxylamin-opentane이 한 개의 사슬을 이루며 ferric iron이 deferoxamine과 결합하면 위의 여섯 분자들이 ion 주위로 모이면서 안정된 구조를 만든다. Ferric ion에 대한 킬레이트는 부피물기준(molar basis)으로 1:1로 일어나고 1 g의 deferoxamine은 85 mg의 ferric iron과 결합하여 ferrioxamine을 형성하여 소변과 대변으로 배설된다¹⁸⁾.

수혈 시 농축 적혈구 1 unit 속에는 철이 225 mg 정도가 함유되어 있지만 체내에는 철 배설 기전이 존재하지 않기 때문에 강화된 항암화학요법으로 인하여 반복적 대량 수혈을 요하는 각종 소아 중앙환자들에게 철 과부하에 따른 장기손상이 우려되어 deferoxamine의 사용이 증가되고 있다.

철은 세포 성장과 분화, 전자 전달 반응, 산소 전달, 해독작용 등 여러 가지 중요한 생체 반응에 반드시 필요한 요소로서 중앙세포의 성장과 증식에도 절대적으로 필요하기 때문에 철 킬레이트 약제를 투여하면 철의 생체 반응을 억제하므로 소아 중앙환아들에서 deferoxamine의 투여가 중앙세포에서도 성장이나 증식을 억제할 것으로 생각되었다.

실험 결과는 예상대로 골육종세포인 Saos-2에 deferoxamine을 처리하였을 때 시간과 농도에 의존하여 세포의 증식이 현저히 억제됨을 확인하였고(Fig. 1) 이러한 세포 수의 감소가 세포자멸사의 유도에 의한 것 인지를 알아보기 위하여 세포내에서의 형태학적 변화를 관찰하였다. 세포핵만을 특이적으로 염색시키는 Hoechst 용액을 사용하여 세포핵의 모양을 대조군과 비교하여 관찰한 결과 deferoxamine의 농도에 의존하여 세포자멸사를 시사하는 세포 수축으로 인한 크기의 감소와 핵 응축이 증가됨을 볼 수 있었다(Fig. 2B). 아울러 deferoxamine의 처리 농도에 의존적으로 DNA 단편화도 증가되었으며(Fig. 2A), 세포주기 분석에서도 농도 의존적으로 A₀기의 증가를 보였으며(Fig. 2C), 세포자멸사 유도 시에 나타나는 단백질인 PARP의 활성을 조사한 결

과 농도 증가에 따라 활성도가 증가되어 골육종 세포에서 deferoxamine에 의해 세포자멸사가 유도되었음을 알 수 있었다 (Fig. 3). 이러한 결과는 최근 보고된 deferoxamine에 의하여 악성 구강 각질세포의 성장을 억제하고 세포자멸사를 유도하며¹³⁾, 난소암세포의 증식을 억제하고 세포자멸사를 유도하여 난소암의 성장을 억제하였다는 보고¹⁴⁾의 결과와 일치하였다.

다음으로 Saos-2 세포에 deferoxamine을 처리하여 세포자멸사가 유도되었다면 세포자멸사와 관련된 분자의 발현을 검토하여 활성화되는 경로를 추적하였다. 일반적인 세포자멸사의 경로는 미토콘드리아로부터 사이토크롬 C 유리에 의해 일어나는 경로¹⁹⁾와 tumor necrosis factor (TNF)계의 신호전달에 의해 일어나는 경로로 구분 되어진다²⁰⁾. TNF에 의한 경로는 TNF 수용체를 자극시켜 유도되는 세포자멸사로 최근에 TNF 수용체와 동일한 기능을 갖는 tumor necrosis factor receptor associated factors (TRAFs)가 분리되어 그 활성 기전이 알려지고 있다²¹⁾. TRAFs는 고유의 protein kinase의 활성을 갖고 있으며 TNF의 자극으로 하류의 세포자멸사 경로의 하나로 caspase-8을 활성화시켜 세포자멸사를 유도시킨다. 그러나 본 실험에서는 caspase-8의 활성화에 대한 변화가 전혀 보이지 않아 골육종 세포에서 deferoxamine은 TNF와 같은 Fas-L, TNF로부터 유도되어 수용체를 매개하는 경로와는 다르게 DNA의 손상이 유발되어지는 세포 내부로부터의 세포자멸사의 활성 경로로 예측된다. 따라서 deferoxamine에 의한 세포자멸사는 미토콘드리아의 붕괴에 의해서 유도되는 경로로 추정하였다.

미토콘드리아로부터 유도되는 세포자멸사의 특징은 사이토크롬 C가 유리되어 caspase의 활성을 야기시킨다. 이러한 사이토크롬 C의 조절은 Bcl-2 관련 단백질에 의해 조절되고 있다^{22, 23)}. Deferoxamine처리 후 Saos-2 세포는 anti-apoptotic protein인 Bcl-2 발현이 감소되었다. Bcl-2와는 다르게 pro-apoptotic protein인 Bax는 미토콘드리아로부터 사이토크롬 C의 분비를 유도시킨다²³⁾. Deferoxamine을 처리한 Saos-2 세포에서 Bax의 발현이 증가됨으로써 미토콘드리아로부터 사이토크롬 C가 분비되었음을 확인하였다(Fig. 4).

이렇게 유리된 사이토크롬 C는 caspase-9를 활성화시키며 활성화된 caspase 9는 하류의 caspase-3을 활성화시킨다^{24, 25)}. 본 연구에서도 Saos-2 세포에서 deferoxamine 처리 후 caspase-9와 -3의 연속적인 활성화가 나타났다(Fig. 5). 따라서 deferoxamine에 의해 세포내의 세포자멸사가 유도되었으며 그 활성화 경로는 미토콘드리아의 붕괴로부터 시작될 것으로 추정된다.

Akt/PKB경로는 세포 생존력을 활성화시키는 대표적인 경로이다²⁶⁾. Fig. 6의 결과에 의하면 deferoxamine 처리 후 phospho-Akt/PKB의 활성화가 감소되었다. 어떠한 경로로 감소시키지는 확인되지 않았지만, deferoxamine 처리 후 Saos-2 세포는 Akt/PKB의 활성이 억제됨으로서 세포의 성장을 조절하지 못하여 미토콘드리아로 이어지는 세포자멸사가 일어나는 것으로 추측된다.

결론적으로 강화된 항암화학요법으로 인하여 반복적 대량 수혈에 의한 철 과부하에 따른 장기손상이 우려되는 골육종 뿐만 아니라 각종 소아 종양환자들에서 deferoxamine의 사용은 철 제거 효과뿐만 아니라 종양 세포의 증식 억제 효과가 있으며, Akt/PKB의 활성이 억제됨으로서 세포의 성장을 조절하지 못하여 미토콘드리아 매개된 세포자멸사를 유도하였다.

요 약

목적 : 철은 세포 성장과 분화, 전자 전달 반응, 산소 전달, 해독작용 등 여러 가지 중요한 생체 반응에 반드시 필요한 요소로서 종양세포의 성장과 증식에도 절대적으로 필요하다. 최근에 철 킬레이트제인 deferoxamine이 악성 구강 각질세포의 성장을 억제하고 세포자멸사를 유도하며, 난소암세포의 증식을 억제하고 세포자멸사를 유도하여 난소암의 성장을 억제하였다고 보고되었다. 그러므로 반복적인 수혈에 의하여 헤모시테린침착증이 발생한 소아 종양 환아에서 deferoxamine이 철을 제거 할 뿐만 아니라 암세포의 세포자멸사를 유도하는지에 대하여 알아보고 세포자멸사를 유도한다면 그 경로에 대하여 알아보고자 하였다.

방법 : 골육종세포인 Saos-2에서 deferoxamine에 대한 효과를 알아보기 위하여 크리스탈 바이올렛과 트리판 블루 염색으로 세포의 성장 및 증식을 측정하였고, DNA 분획, 핵 응축, 세포주기 분석으로 세포자멸사를 분석하였고, 세포자멸사와 관련된 분자들의 발현을 Western hybridization으로 분석하였다.

결과 : Deferoxamine은 Saos-2 세포에 대하여 시간과 농도에 의존적으로 세포 증식 억제 효과를 나타내었다. 이러한 세포 증식 억제 효과는 DNA 단편화, 핵 응축, 세포주기 분석에서의 A₀기의 증가, PARP의 활성화도의 증가 등 세포자멸사가 유도되었음을 알 수 있었다. 또한 Saos-2 세포에서 deferoxamine 처리 후 Akt/PKB의 활성화가 억제되어 caspase 9의 활성화, 그 하류의 caspase 3의 활성화로 이어지는 미토콘드리아 매개되는 경로로 세포자멸사가 유도되었다.

결론 : 결론적으로 철 킬레이트제인 deferoxamine이 세포증식을 억제시키고 세포자멸사를 유도시킴으로써 골육종 세포의 증식을 억제하는 것을 보여주었다. 따라서 반복적 대량 수혈에 의한 철 과부하에 따른 장기손상이 우려되는 각종 소아 종양환자들에서 deferoxamine은 체내 축적된 철을 제거할 뿐만 아니라 종양 환자의 치료에 있어서 항암제 치료의 효과를 증가시킬 수 있는 새로운 치료법으로 개발될 수 있을 것이다.

References

- 1) Papanikolaou G, Pantopoulos K. Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;202:199-211.
- 2) Engle JP, Polins KS, Stile IL. Acute iron intoxication: treatment controversies. *Drug Intell Clin Pharm* 1987;21:153-9.
- 3) Henretting FM, Temple AR. Acute iron poisoning in child-

- ren. *Emerg Med Clin North Am* 1984;2:121-32.
- 4) Schauben JL, Augenstein WL, Cox J, Sato R. Iron poisoning: Report of three cases and a review of therapeutic intervention. *J Emerg Med* 1990;8:309-19.
 - 5) Proudfoot AT, Simpson D, Dyson EH. Management of acute iron poisoning. *Med Toxicol* 1986;1:83-100.
 - 6) Cooper B, Bunn HF, Propper RD, Nathan DG, Rosenthal DS, Moloney WC. Treatment of iron overload in adults with continuous parenteral Deferoxamine. *Am J Med* 1977;63:958-66.
 - 7) Cohen AR, Mizanin JM, Schwartz E. Rapid removal of excessive iron with daily, high dose intravenous chelation therapy. *J Pediatr* 1989;115:151-5.
 - 8) Van der wal NA, Van Oirsschot JF, Van Dijk A, Verhoef J, van Asbeck BS. Mechanism of protection of alveolar type2 cells against paraquat-induced cytotoxicity by deferoxamine. *Biochem Pharmacol* 1990;39:1665-71.
 - 9) Kohen R, Chevion M. Paraquat toxicity is enhanced by iron and induced by deferoxamine in laboratory mice. *Biochem Pharmacol* 1984;34:1841-3.
 - 10) Lee JH, Cho B, Jeong DC, Kim HK. Effect of desferrioxamine therapy in patients with transfusional hemosiderosis due to severe aplastic anemia. *Korean J Pediatr Hematol Oncol* 1997;4:62-9.
 - 11) Watanabe BI, Limm W, Suehiro A, Suehiro G, Premaratne S, McNamara JJ. Failure of deferoxamine to reduce myocardial infarct size in a primate model of ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 1993;55:537-42.
 - 12) Kang SA, Jang YJ, Park H. In vivo dual effects of vitamin C on paraquat-induced lung damage: dependence on released metals from the damaged tissue. *Free Radic Res* 1998;28:93-107.
 - 13) Lee SK, Lee JJ, Lee HJ, Lee J, Jeon BH, Jun CD, et al. Iron chelator-induced growth arrest and cytochrome c-dependent apoptosis in immortalized and malignant oral keratinocytes. *J Oral Pathol Med* 2006;35:218-26.
 - 14) Brard L, Granai CO, Swamy N. Iron chelators deferoxamine and diethylenetriamine pentaacetic acid induce apoptosis in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2006;100:116-27.
 - 15) McLaren GD, Muir WA, Kellermeier RW. Iron overload disorder: natural history, pathogenesis, diagnosis, and therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1983;19:205-61.
 - 16) Olson LJ, Edwards WD, McCall JT, Ilstrup DM, Gersh BJ. Cardiac iron deposition in idiopathic hemochromatosis: histologic and analytic assessment of 14 hearts from autopsy. *J Am Col Cardiol* 1987;10:1239-43.
 - 17) Freeman AP, Giles RW, Berdoukas VA, Walsh WF, Choy D, Murray PC. Early left ventricular dysfunction and chelation therapy in thalassemia major. *Ann Intern Med* 1983;99:450-4.
 - 18) Keberle H. The biochemistry of desferrioxamine and its relation to iron metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 1964;119:758-68.
 - 19) Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996;86:147-57.
 - 20) Wallach D, Boldin M, Varfolomeev E, Beyaert R, Vandenaebelle P, Fiers W. Cell death induction by receptors of the TNF family: towards a molecular understanding. *FEBS Lett* 1997;410:96-106.
 - 21) Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985;228:1440-3.
 - 22) Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome C from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:4997-5002.
 - 23) Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome C and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479-89.
 - 24) Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N, Nunez G. Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:4386-91.
 - 25) Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:1312-6.
 - 26) Kandel ES, Hay N. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res* 1999;253:210-29.