Journal of Life Science 2010 Vol. 20. No. 1. 103~112 ©JLS / ISSN 1225-9918

Association of Genetic Variations with Pemetrexed-Induced Cytotoxicity in Non-Small Cell Lung Cancer Cells

Seong-Ae Yoon, Jung Ran Choi, Jeong-Oh Kim, Jung-Young Shin, XiangHua Zhang and Jin-Hyoung Kang[1]*

Laboratory of Medical Oncology, Catholic Research Institutes of Medical Science
[1]*Department of Medical Oncology, Seoul St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea, 505 Banpo-dong, Seocho-gu, Seoul, 137-701, Korea*

Received November 21, 2009 / Accepted November 21, 2009

Pemetrexed has demonstrated clinical activity in non-small cell lung cancer (NSCLC) as well as other solid tumors. It transports into the cells via reduced folate carrier (RFC) and is polyglutamated by folypolyglutamate synthetase (FPGS). Pemetrexed directly inhibits several folate-dependent enzymes such as thymidylate synthase (TS), dihydrofolate reductase (DHFR), and glycinamide ribonucleotide formyltransferase (GARFT). We investigated the effects of genetic variations and the expression of RFC, FPGS, TS and DHFR enzymes on drug sensitivity to pemetrexed in NSCLC cells. Polymorphisms in RFC, FPGS, and DHFR were genotyped in four NSCLC cells - A549, PC14, HCC-1588, and H226. Real-time RT-PCR and Western blot was performed to evaluate mRNA transcripts and protein of these genes. The cytotoxicity of pemetrexed was measured by SRB assay. In PC14 and H226 cells, increased mRNA expressions of RFC and FPGS were associated with higher cytotoxicity to pemetrexed. 2R/2R genotype of TS and its increased mRNA expression were associated with drug resistance to pemetrexed in A549 cells, whereas 3R/3R genotype in TS with decreased mRNA expression was associated with higher sensitivity in H226 cells. After pemetrexed treatment, an inverse change of *DHFR* mRNA and protein expression was found. The strongest linkage disequilibrium (LD) was discovered between -1726C>T and -1188A>C SNP of DHFR gene. Our findings suggest the cytotoxic effect of pemetrexed may be associated with genetic polymorphisms and the expression level of genes involved in pemetrexed metabolisms in NSCLC cells.

Key words : Pemetrexed, non-small cell lung cancer cell line, gene expression, polymorphism, cytotoxicity

서 론

페메트렉시드(pemetrexed, alimta®)는 중피종(mesothelioma)과 비소세포폐암(non-small cell lung cancer)을 비롯한 다양한 암종에서 엽산(folate) 대사과정에 관여하는 대사물질의 활성을 억제하여 항암효능을 나타낸다[3,4]. 다중표적 항엽산제(multitargeted antifolate)인 pemetrexed는 엽산의 세포 내 주요 이동통로인 reduced folate carrier (RFC)를 통해 세포 내로 유입된 후 folylpolyglutamate synthetase (FPGS)에 의해 폴리글루타민산염(polyglutamate) 유도체로 활성 되어 thymidylate synthase (TS)와 dihydrofolate reductase (DHFR)를 표적하는 것으로 알려져 있다[4,12].

엽산의 세포 내 주요 이동통로인 RFC는 세포 내로 pemetrexed가 유입될 때 folate receptor-α (FR-α), low pH transporter와 함께 세포막에 존재하는 운반체로서, pemetrexed가 세포막을 경계로 양방향을 자유롭게 이동할 수 있는 통로로 작용한다[3]. 최근 RFC 유전자의 단일염기서열 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)은 다양한 질환의 발병 위험성과 연관되어 있고[6,26], pemetrexed와 구조적으로 유사한 항암제인 methotrexate의 약물 저항성과 상관성이 있다고 보고되었다[6].

세포 내로 유입된 pemetrexed는 FPGS 효소에 의해 글루타민산염(glutamate)과 결합하여 폴리글루타민산염(polyglutamate) 유도체 형태로 활성을 나타내는데, 모노글루타민산염(monoglutamate) 유도체보다 엽산의 환원된 형태인 폴리글루타민산염 유도체가 표적 효소에 보다 높은 친화력을 보인다[16]. 최근 다인종 연구에서 알려진 FPGS 유전자 다형성은 미토콘드리아와 세포질 모두에 존재하는 다형성인 것으로 확인되었고, 이 중 V22I와 F13L은 아미노산 변이가 있는 다형성으로 모든 인종에서 15% 이상의 빈도로 발현된다는 것이 알려졌다[12]. 또한 유방암 세포주에서 FPGS 효소의 활성과 단백질 발현 정도를 측정하고 5-fluorouacil (5-FU)와 methotrexate의 세포 독성 효과와의 상관성을 측정한 결과 FPGS 유전자의 과발현이 이들 항암제의 감수성과 관련이 있음을 확인하였다[5].

Pemetrexed의 표적효소 중 5,10-methylene tetrahydrofolate (methylene-THF)의 의존성 효소인 TS는 엽산 대사과정에서

*Corresponding author
Tel : +82-2-2258-6043, Fax : +82-2-533-8450
E-mail : jinkang@catholic.ac.kr

deoxyuridylate (dUMP)에서 deoxythymidylate (dTMP)로 환원된 형태가 메틸화되는 과정을 촉진하는 효소이다[10]. 임상연구에서 TS 발현이 높은 환자의 경우 5-FU의 항암효과가 감소하고 생존율이 낮은 것으로 나타났고, TS 단백질 발현양상은 TSER 유전형에 의해 조절된다는 연구 결과가 있었다[2]. TS 유전자의 2R/3R과 G/C 다형성 연구결과 경구 fluoropyrimidine을 투여한 환자군에서 반복염기 서열(repeat nucleotide)의 길이와 유전형 조합에 따라 생존율에 차이가 있음이 보고되어, TS 유전형이 fluoropyrimidine계 약물의 항암 효과를 예측할 수 있는 유전자 지표임이 알려졌다[2,10].

DHFR은 세포 내로 엽산이 유입될 때 TS의 작용물질인 dihydrofolate (DHF)가 tetrahydrofolate (THF)로 환원되는 과정에서 작용하는 효소로, 세포 내 대사와 세포성장에 필수적인 역할을 한다[25]. DHFR 유전자의 엑손(exon)과 인트론(intron) 경계부분을 중심으로 전체 코딩 부분의 염기서열을 분석한 결과 인트론의 -19 bp 결손부분과 9 bp의 반복염기서열이 DHFR 발현에 중요한 다형성인 것으로 알려졌다[7,19]. 하지만 TS와 glycinamide ribonucleotide formyl transferase (GARFT) 표적효소에 비해 pemetrexed와의 친화력이 떨어지기 때문에 폴리글루타민산염으로 전환효과가 적은 것으로 나타났고, DHFR와 pemetrexed의 결합력은 methotrexate와의 친화력에 비해 1,000배나 낮은 것으로 보고되었다 [21].

표적분자가 여러 개인 pemetrexed와 같은 항암제는 엽산의 대사 과정과 유사하고 복잡한 인체 내 대사과정으로 인해 유전적 다형성이 약물효능을 결정하는 중요한 변수가 될 것으로 예상되지만 아직까지 항암효능을 예측하고 결정할 수 있는 생체표지자(biomarker)가 알려져 있지 않았다[13,14]. 하지만 최근 임상연구 결과에서 선암 조직형(adenocarcinoma)의 폐암 환자가 비선암 조직형(non adenocarcinoma)인 환자에 비해 pemetrexed의 반응률이 유의하게 높은 것으로 확인되어, 조직형에 따른 폐암 세포 내 표적 유전자 또는 약물대사와 관련된 유전자 발현차이가 항암효능에 중요한 역할을 할 것으로 예측되고 있다[18].

본 연구에서는 조직형이 서로 다른 비소세포폐암 세포주를 이용하여 pemetrexed의 대사과정에 관여하는 유전자들의 단일염기서열 다형성, mRNA와 단백질 발현 정도를 비교하고, pemetrexed의 세포독성 효과와의 상관성을 분석하였다.

재료 및 방법

페메트렉시드(pemetrexed)

페메트렉시드(pemetrexed, alimta®)는 Eli Lilly & Co. (Indianapolis, IN, USA)에서 제공받았다. 0.15 M NaCl에 용해하여 pemetrexed의 최종농도를 25 mg/ml가 되게 하였고, 용해된 약물은 멸균된 1.5 ml tube에 각각 분주하여 -20°C에 보관했다.

세포주 배양

비소세포폐암 세포주(NSCLC) 중에서 조직학적 특성이 서로 다른 선암 세포주와 편평상피 폐암(squamous cell carcinoma) 세포주를 선정했고 각 세포주는 한국세포주은행(http://cellbank.snu.ac.kr)에서 구입했다. 선정된 선암 세포주는 A549와 PC14이고, 편평상피 폐암 세포주는 HCC-1588와 H226 세포주이다. 모든 세포주는 불활성(heat-inactivated)된 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco BRL, Grand Island, NY)와 penicillin-streptomycin (Gibco BRL, Grand Island, NY)이 포함된 RPMI1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY) 배양액을 이용했고, A549 세포주는 DMEM (Gibco BRL, Grand Island, NY)으로 배양했다. 각 세포주는 Φ150/147.8 cm^2 세포배양접시(tissue culture dish) (TPP, Trasadingen, Switzerland)를 이용하여 5% CO_2 와 95% O_2로 조정된 배양기내에서 37°C를 유지하면서 3일마다 배양액을 교체하였다. 세포수집은 0.25% trypsin/EDTA를 이용했다.

RNA 추출

선정된 세포주에서 RNA를 얻기 위해 수집된 세포는 WelPrep total RNA isolation reagent (Welgene, Korea) 1 ml를 혼합하여 균질화한 다음 실온에 5분간 방치했다. 방치한 균질액은 chloroform (Merck, Gemany) 200 μl를 약 10-20초 동안 혼합하여 실온에서 3분 동안 반응시킨 다음, 12,000 rpm에서 약 15분 동안 원심 분리하였다. 원심 분리한 상층액은 1.5 ml 튜브에 500 μl를 취하여 옮기고 동량의 isopropanol을 첨가하여 혼합한 다음 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 12,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리한 뒤, 상층액을 버리고 RNA 침전물(pellet)을 얻었다. RNA 침전물에 75% 에탄올 1 ml을 넣어 혼합하고 약 10분 동안 12,000 rpm에서 원심 분리하여 RNA 침전물을 2번 세척하고 실온에서 건조시켰다. 건조된 침전물은 DEPC 50 μl에 녹인 후 55~60°C에서 10분 동안 열처리하여 260 nm 파장의 흡광도로 RNA 양을 측정했다. 1 ug/ul의 complementary DNA (cDNA) 합성은 MaximeTM RT PreMix kit (Intron, Korea)를 이용하여 cDNA와 master mixture의 부피가 20 μl가 되도록 하였다. 45°C에서 1시간, 95°C에서 5분간 두어 효소를 불활성화한 뒤 4°C에 방치했고, 합성된 cDNA는 사용 전까지 -20°C 에 보관하였다.

실시간 정량적 중합효소 연쇄반응 (Real-time PCR)

합성된 cDNA는 RFC, FPGS, TS 및 DHFR를 Fast Start Universal SYBR mastermix (ROX) 2X (Roche, Germany)을 이용하여 실시간 정량적 중합효소 연쇄반응(real-time PCR), (Stratagene, Cedar Creek TX)을 하였다. 실시간 정량적 중합효소의 프라이머(primer)는 Table 1과 같다. 실시간 정량적 중합효소 연쇄반응은 95°C에서 30초, 62~65°C에서 30초와

Table 1. Primer sequences used for real-time PCR

Gene	Primer sequence (5′ to 3′)
RFC	F : CGT CAA GAC CAT CAT CAC TTT CA R : CAG GAT CAG GAA GTA CAC GGA GTA T
FPGS	F : CTA TGC CGT CTT CTG CCC TAA C R : ACC TGG TCC AGT GTC ACT GTG A
TS	F : CAC ACT TTG GGA GAT GCA CAT ATT R : TTC GAA GAA TCC TGA GCT TTG G
DHFR	F : ATG CCT TAA AAC TTA CTG AAC AAC CA R : TGG GTG ATT CAT GGC TTC CT

RFC, reduced folate carrier; FPGS, folylpolyglutamate synthetase; TS, thymidylate synthase; DHFR, dihydrofolate reductase.

72°C에서 30초로 40 주기를 시행했다. 비소세포폐암 세포주의 mRNA 발현양상은 housekeeping gene인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)와 상대적 비율을 비교하였다. 세 번 이상 반복 실험하여 재현성을 확인했다.

유전형 분석 (Genotyping)

정상인 20명에서 DHFR의 유전자 다형성(SNP)을 확인하기 위해 DHFR 유전자를 직접 염기서열 분석(direct sequencing analysis) 하였다. 직접 염기서열 분석으로 확인한 SNP는 프로모터(promoter)에 위치한 -1726C>T, -1188A>C와 -825G>A 이었고, exon 1에 위치한 721A>T 이었다. RFC (80G>A와 696T>C), FPGS (263T>C, 1270C>T와 1370C>T), TS (2R/3R와 6del) 및 DHFR (-1726C>T, -1188A>C, -825A>G와 721A>T)의 SNP를 포함하는 부위를 PCR하여 유전형을 분석하였다. 유전형 분석에 사용된 프라이머는 Table 2와 같다.

4개 SNP는 primer3 (http://primer3.sourceforge.net/webif.php) 프로그램으로 합성했고, 유전형 분석에 이용한 primer의 염기서열과 조건은 Table 2로 나타냈다. 각 세포주에서 genomic DNA를 추출하여 20 μl 반응성 용액에서 95°C에서 5분, 94°C에서 30초, 60°C에서 1분, 72°C에서 1분, 72°C에서 10분 동안 증폭하였다. 증폭한 산물은 BigDye Terminator V3.1 cycle sequencing kit와 ABI prism 3100 sequencer로 직접염기서열 분석을 시행하여 RFC, FPGS와 DHFR의 유전형을 분석하였다. TS 유전자는 증폭한 산물을 12% polyacrylamide gel에서 전기영동하여 28bp repeat 개수로 2R/3R을 구분하여 유전형을 확인했다. VNTR G>C SNP는 HaeⅢ, TS 1494del 6은 Dra I의 제한효소를 이용하여 그 산물을 20% polyacrylamide gel에서 확인하였다.

세포 독성 측정

4개의 비소세포폐암 세포주는 trypsin/EDTA로 처리하여 세포를 배양접시 바닥에서 떼어낸 후, 1,000 rpm에서 5분 동안 원심 분리하여 세포를 침전시킨 다음 적당량의 배지용액에

Table 2. Primer sequences used for amplification of the four genes

Gene	SNP	Primer sequence (5′ to 3′)
RFC	80G>A	F : CTG ACT CCA CCC CTC CTT R : CCG CGT GAA GTT CTT GTC
	696T>C	F : AAG CGC AGC CTC TTC TTC R : TGC ACG TAG TAG ACC ACC AG
FPGS	263A>G	F : ACA ATA AGC TGG GCC TA G R : TAG GTG CCT TTT GTT TTT GG
	1270C>T	F : TCT GCC CTA ACC TGA CAG AG R : TGT GAA ATG CAG CTG AAG AC
TS	2R or 3R	F : GTG GCT CCT GCG TTT CCC CC R : CTG CGA GCC GGC CAC AGG
	6 del/ins	F : CAA ATC TGA GGG AGC TGA GT R : CAG ATA AGT GGC AGT ACA GA
DHFR	-1726C>T	F : AGG TTC CTT CGG ATC CAC TC R : CCC TCT GTG CCT TTG CTA CA
	-1188A>C	F : ACC CAA GCT GCC ACC TAC AT R : ATG GAG TCC TTC CTG TTG CC
	-825A>G	F : CTG GGG AAC TGC ACA ATA TG R : CAG GTC TCC TGA CTC CCA TT
	721A>C	F : GGA CCG TCA CCT TCC CTA AA R : TCC CCA ATG AGT GGT GTA GC

RFC, reduced folate carrier; FPGS, folylpolyglutamate synthetase; TS, thymidylate synthase; DHFR, dihydrofolate reductase. Primers are designed based on RFC, FPGS, TS, and DHFR gene.

다시 부유시켰다. 세포밀도(number of cells/ml)는 부유액을 10배로 희석한 후 혈구 계산판에서 측정했다.

본 실험을 하기 위해 96 well plate에 접종할 적정 세포수는 1~10×10^3개 범위로 정했다. 항암제 대신 배양액을 가해 72시간 동안 배양한 후 sulforhodamine B (SRB) 검색법으로 흡광도를 측정했고, 가장 적당한 세포밀도를 결정했다. 6개의 세포주는 96 well plate에 각각 2 × 10^3 cell/well로 분주하여 24시간 동안 배양했고, pemetrexed를 0.01~30 uM (0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30) 농도로 72시간 처리했다.

약물 처리한 세포는 phosphate buffered saline (PBS)로 씻어낸 후 약물의 세포독성을 측정하기 위해 SRB 검색법을 이용하였다. SRB 검색법은 10% trichloroacetic acid (TCA) 200 μl를 이용하여 4°C에서 1시간 동안 고정한 후 증류수로 세척했고, 세포의 총 단백질은 0.4% SRB 용액 70 μl에서 15분 염색한 후 1% glacial acetic acid로 단백질에 결합하지 않은 염색용액을 세척하여 건조시켰다. 단백질에 결합된 염색용액을 10 mM Tris (pH 7.5)로 용해시킨 후 enzyme-linked immunosorvent assay (ELISA) reader (Spectra Max 250, Molecula Devices, USA)를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정했다.

세포독성 결과는 각 농도마다 약물 처리하기 전과 약물 처리 후의 흡광도를 측정하고, 약물 처리 전과 후 세포의 흡광도

를 백분율(%)로 환산하였으며, 같은 방법을 3회 반복했다. 실험 결과는 Sigma plot (SYSTAT Software, version 9.0, USA)으로 각 농도별 용량-반응 분석(dose-response)을 하여 IC_{50}값을 산출했다.

Western blotting

비소세포폐암 세포주는 각 세포주의 pemetrexed의 최종농도가 세포주의 IC_{50}값이 되도록 처리했고, 72시간 후 PBS로 세척했다. 약물 처리한 세포는 1.5 ml tube에 모아 homogenize buffer (Biovision, USA)에 용해시킨 뒤 4°C, 700× *g* 에서 10분 동안 원심 분리하여 상층액을 분리하고 10,000× *g*에서 30분 동안 원심 분리하여 단백질 성분을 분리했다. Bradford assay를 통해 정량한 단백질은 sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer를 첨가하여 70°C에서 5분 동안 변성시켰다. 40 ug의 단백질 추출물은 8% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gel에서 분리했고 완충용액(25 mm Tris base, 190 mM glycine, 20% methanol)을 이용하여 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Millipore Corporation, USA)에 옮겼다. Membrane은 tris buffered saline (TBS, 10 mM Tris HCl pH 7.5, 150mM NaCl)과 0.1% tween-20이 혼합된 완충용액에서 10분씩 3회 세척했고, 10% skim milk가 첨가된 용액(10% 탈지분유, 0.1%의 tween-20이 함유된 TBS buffer)으로 상온에서 30분 동안 반응하여 blocking 하였다. Blocking 한 후 RFC (1:200), FPGS (1:300), TS (1:500)와 DHFR (1:1000) 1차 항체로 1시간 동안 반응시켰고, 0.1% tween-20을 함유한 TBS (TTBS)로 3번 세척한 다음 horseradish peroxidase와 결합된 2차 항체를 1:1000으로 희석하여 1시간 동안 반응하였다. 다시 TTBS로 3회 세척하고 ECL Western Blotting analysis System (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)을 이용하여 감광하고, 감도(density)를 측정하였다.

결 과

약물 처리 전 RFC, FPGS, TS와 DHFR의 mRNA 발현 비교

선정한 각 세포주에서 pemetrexed의 대사과정에 영향을 주는 인자인 RFC, FPGS, TS와 DHFR의 mRNA 발현 정도를 알아보았다.

RFC의 mRNA 발현 정도

약물 처리 전 RFC 유전자의 mRNA 발현 양상은 PC14 세포주에서 가장 높았고, A549와 HCC-1588 세포주는 비슷한 수준으로 발현되었다. H226 세포주에서는 RFC의 mRNA 발현이 다른 세포주와 비교해 상대적으로 가장 낮은 것을 확인하였다 (Fig. 1A).

FPGS의 mRNA 발현 정도

A549 세포주에서 가장 낮은 FPGS mRNA 발현 양상을 나타냈고, PC14와 HCC-1588에서는 중간수준의 발현 양상을 보였다. 반면, H226세포주의 FPGS 발현양상은 다른 세 개의 세포주에 비해 2-3배 정도 높은 것을 알 수 있었다(Fig. 1B).

TS의 mRNA 발현정도

네 개의 세포주 중 A549 세포주에서 TS mRNA 발현 정도가 가장 높은 것으로 나타났지만, 나머지 세포주들의 발현 정도는 거의 비슷한 수준으로 관찰되었다. PC14세포주는 모든 세포주에서 중간수준의 발현 정도를 보였고, HCC-1588과 H226 세포주는 상대적으로 낮은 발현을 나타냈다(Fig. 1B).

DHFR mRNA 발현정도

DHFR의 mRNA 발현은 A549 세포주에서 가장 낮은 것으로 관찰되었지만, PC14 세포주에서는 발현 정도가 높은 것으로 나타나 같은 조직형을 가진 선암 세포주에서 DHFR의 발현 양상이 다른 것을 확인하였다. 한편, 편평상피 폐암 세포주인

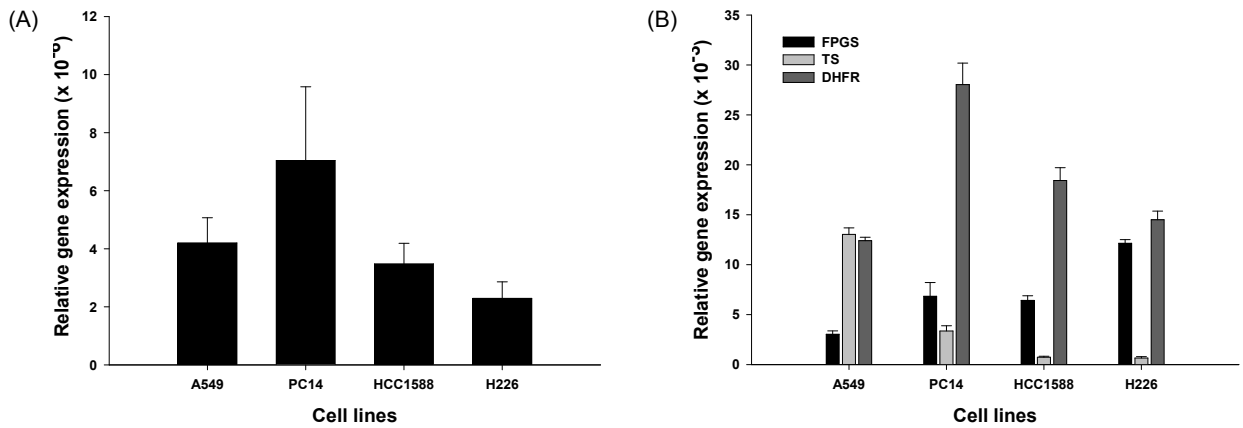

Fig. 1. Expression level of the RFC, FPGS, TS and DHFR mRNA transcripts period The expression of (A) RFC and (B) FPGS, TS, and DHFR in four cell lines. cDNA was prepared by reverse transcription from total RNA using a specific primer. Each bar represents the relative expression of the gene concerned versus the housekeeping gene, GAPDH, as determined by real-time RT-PCR.

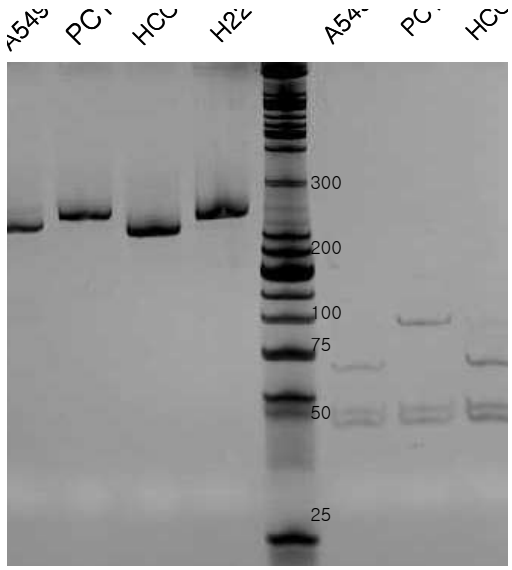

Fig. 2. TS 28 bp repeat VNTR and 5′-UTR G>C genotyping. The purified PCR products were separated on 12% polyacrylamide gel and visualised by ethidium bromide staining. Lane 1,3, homozygous 2R/2R genotype in A549 and HCC-1588 cells; Lane 2,4, 3RCC/3RCC genotype in PC14 and H226 cells (left). TS 5′UTR G>C genotyping was performed by HaeⅢ enzyme digestion. Each genotype with 3C allele showed digested fragments of 94 bp and 44 bp, while 3G and 2R allele showed digested fragments of 66 bp and 44 bp (right).

HCC-1588과 H226 세포주에서는 중간 정도의 DHFR mRNA 발현으로 비슷한 수준을 보였다(Fig. 1B).

유전형 분석(genotyping)

비소세포폐암 세포주에서 pemetrexed의 표적유전자인 RFC, FPGS, TS와 DHFR의 유전자 다형성을 조사하였다. DHFR 프로모터에 위치한 -1726C>T, -1188A>C SNP는 서로 연쇄 불평형 상태 (linkage disequilibrium, LD)에 있었다. 또한 DHFR 프로모터 부위의 3개의 유전형은 PC14와 HCC-1588 세포주에서 모두 공통적인 유전형 결과를 보였다. FPGS의 263A>G와 DHFR 721A>유전형 분석결과 선암 세포주인 A549와 PC14세포주에서 각각 GG와 AC 유전형을 보였고, 편평상피 폐암 세포주인 HCC-1588과 H226 세포주 모두에서는 AA 유전형을 나타냈다. 주요 표적인자인 TS 유전자의 5′UTR repeat 분석 결과, A549와 HCC-1588 세포주에서는 2R/2R 유전형이었고, PC14와 H226은 3R/3R 유전형이었다. FPGS의 1270C>T와1370C>T, TS 3′UTR의 6del/ins유전형은 모든 세포주에서 동일한 형태로 나타났고(data not shown), RFC 80 G>A는 다양한 형태의 유전형이 분포되어 있는 것을 알 수 있었다(Table 3).

Pemetrexed의 세포독성 측정

선정한 비소세포폐암 세포주에서 pemetrexed를 0.01~30 uM 농도로 72시간 동안 처리하여 각 세포주마다 약물의 세포독성을 측정하였다.

선정한 각 세포주의 IC_{50}값이 0.07~0.48 uM 범위로 나타났다. A549와 PC14 세포주의 IC_{50}값이 각각 0.48±0.08 uM과 0.08±0.01 uM였고, PC14 세포주에 비해 A549 세포주가 6배 높은 IC_{50}값을 보였다. 약물처리 후 A549와 PC14는 최고 약물농도(30 uM)에서 각각 23.79%와 28.74%의 살아있는 세포가 관찰되었다(Fig. 3A).

편평상피 폐암 세포주인 HCC-1588과 H226 세포주의 IC_{50}값은 각각 0.33±0.01 uM과 0.07±0.01 uM로 나타났고, H226 세포주는 모든 세포주에서 가장 높은 세포독성을 보였다. 낮은 세포독성을 보인 HCC-1588 세포주에서는 약물의 최고농도인 30 uM에서 37.07%의 살아있는 세포가 관찰되었고 가장 높은 세포독성을 나타낸 H226 세포주는 살아있는 세포가 19.14%로 관찰되었다(Fig. 3B).

선암 세포주와 편평상피 폐암 세포주는 다양한 IC_{50}값을 보였지만, 편평상피 폐암 세포주에서 가장 높은 세포독성을 보인 H226 (0.07 uM) 세포주의 IC_{50}값과 선암 세포주에서 가장 높은 세포독성을 나타낸 PC14 (0.08 uM)의 IC_{50}값은 비슷한 수준으로 나타냈다. 또한 선암 세포주에서 IC_{50}값이 가장 높은 A549는 편평상피 폐암 세포주에서 IC_{50}값이 높은 HCC-1588에 비해 IC_{50} 값이 높았고, 4개의 세포주에서 가장 낮은 세포독성 효과를 나타냈다(IC_{50}=0.48 uM 와 0.33 uM).

Table 3. The distribution of genotypes in RFC, FPGS, TS, and DHFR genes

	RFC		FPGS			TS		DHFR			
	80 G>A	696 T>C	263 A>G	1270 C>T	1370 C>T	5′UTR repeat	3′UTR 6 del/ins	-1726 C>T	-1188 A>C	-825 A>G	721 A>C
A549	GG	CC	GG	CC	CC	CG/CG	Ins 6	TT	CC	AA	AC
PC14	GG	CC	GG	CC	CC	CC/CC	Ins 6	CC	AA	GG	AC
HCC-1588	AG	CT	AA	CC	CC	CG/CG	Ins 6	CC	AA	GG	AA
H226	GG	CC	AA	CC	CC	CC/CC	Ins 6	CT	CC	AG	AA

RFC, reduced folate carrier; FPGS, folylpolyglutamate synthetase; TS, thymidylate synthase; DHFR, dihydrofolate reductase. UTR, untranslated region; repeat, 28-bp double or triple tandem repeats; del/ins, 6 bp insertion/deletion polymorphisms

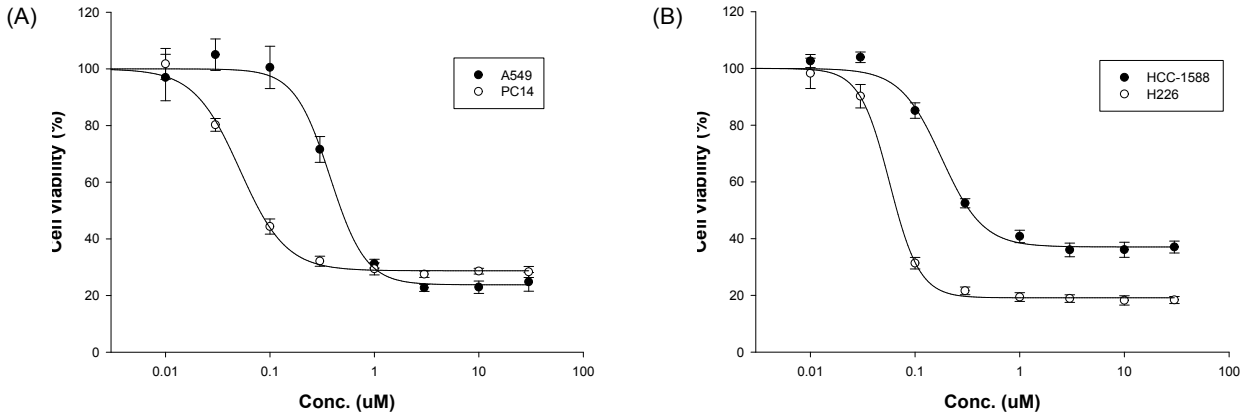

Fig. 3. The cytotoxicity of pemetrexed in (A) adenocarcinoma cells and (B) squamous cell carcinoma cells. The cells were treated with increasing concentration of pemetrexed for 72 hr and viable cells were measured by SRB assay. Data were presented as mean±SD of three independent experiments. IC_{50} values calculated using Sigma plot V9.0.

Pemetrexed 처리 후 RFC, FPGS, TS와 DHFR의 mRNA 발현

RFC mRNA 발현 정도

각 세포주에서 pemetrexed의 최종농도가 각 세포주의 IC_{50} 값이 되도록 처리한 후 RFC mRNA 발현양상을 비교하였다. 약물처리 후 RFC의 mRNA발현은 약물을 처리하기 전 mRNA 발현이 가장 높았던 PC14 세포주에서 가장 낮게 나타났고, A549와 H226에서는 약물처리 후 약물처리 전에 비해 RFC mRNA 발현 양상이 다소 감소했지만, HCC-1588 세포주에서는 약물 처리 후 RFC mRNA 발현이 투여 전에 비해 증가하는 경향을 보였다(Fig. 4).

FPGS mRNA 발현 정도

약물 처리 후 모든 세포주에서 FPGS mRNA 발현 정도가 낮아진 것을 관찰하였다. HCC-1588 세포주에서 약물 처리 전에 비해 4배 정도 감소하는 경향을 보였고, 2-3배의 mRNA 감소를 보인 다른 세포주에 비해 가장 큰 변화 정도를 나타냈다(Fig. 4).

TS mRNA 발현 정도

약물처리 후 TS mRNA 발현 양상은 A549에서 약 4배 정도, PC14 세포주에서는 약 2배 정도 발현이 감소한 것을 알 수 있었지만, HCC-1588과 H226세포주에서는 약물처리 전에 비해 mRNA 발현 정도 차이가 나타나지 않았다. 선암 세포주에서는 TS의 mRNA 발현 정도가 약물처리 후 두드러지게 감소했지만, 편평상피 폐암 세포주에서는 약물처리 전과 후의 TS mRNA 발현 변화가 거의 없는 것을 알 수 있었다(Fig. 4).

DHFR mRNA 발현 정도

약물 처리 후 A549와 H226에서 약 2배 정도 DHFR mRNA 발현이 감소하는 것을 확인하였고 HCC-1588과 PC14은 약간 감소하는 것으로 관찰하였다. DHFR mRNA 발현 정도는 조직형에 상관없이 모든 세포주에서 약물처리 후 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4).

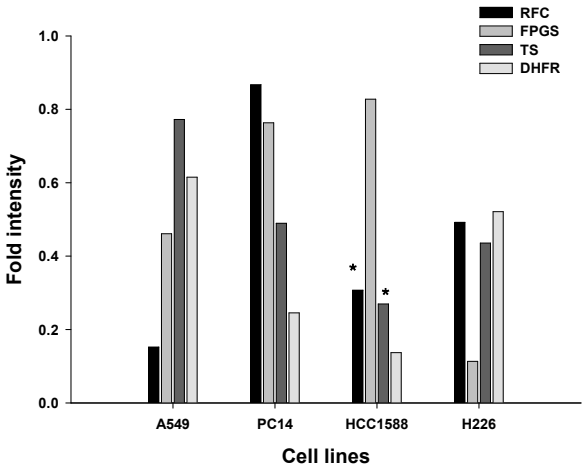

Fig. 4. The mRNA expression of RFC, FPGS, TS, and DHFR in NSCLC cells. Each cells treated with pemetrexed at IC_{50} values for 72 hr respectively. Fold change represents the relative fold intensities of each gene compared to untreated cells (y-axis). In HCC-1588 cells, RFC and TS expression levels were higher than untreated cells (*).

약물 처리 후 세포주의 mRNA 발현 양상 비교

약물 처리 후 모든 세포주에서 약물의 세포 내 유입과 활성에 관여하는 유전자인 RFC와 FPGS의 발현 양상 차이가 뚜렷하게 나타나지 않았지만, 표적유전자인 TS와 DHFR에서는 감소하는 경향을 나타냈다. 선암 세포주에서는 RFC와 FPGS 유전자의 mRNA 발현 정도가 약물 처리 전에 비해 약물처리 후에 편평상피 폐암 세포주에 비해 뚜렷한 변화를 나타냈다.

Pemetrexed 처리 후 RFC, FPGS, TS와 DHFR의 단백질 발현

선정한 각 세포주에서 pemetrexed의 대사과정에 영향을 주

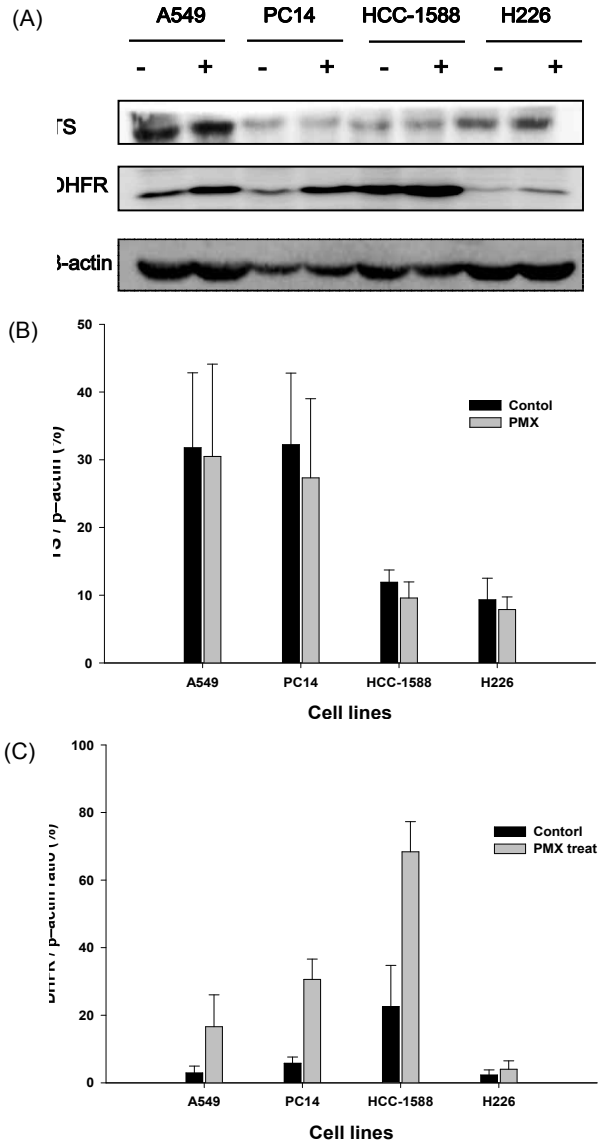

Fig. 5. Expression levels of RFC, FPGS, TS, and DHFR proteins. Four NSLCL cells treated with pemetrexed at IC_{50} for 72 hr. Equal amounts of total cell lysates were used for loading. The experiments were repeated at least three times independently (A). TS and DHFR protein expression in four cell lines by Western blotting (B). The relative band intensities by densitometry of TS and DHFR genes (B, C). β-actin was used as control.

는 인자인 RFC, FPGS, TS와 DHFR 의 단백질 발현 양상을 알아보았다. 각 세포주에서 pemetrexed의 최종농도가 각 세포주의 IC_{50}값이 되도록 처리한 후 비교하였다.

RFC와 FPGS의 단백질 발현에서 여러 개의 isotype이 나타나 정확한 발현을 알 수 없었다. A549 세포주에서는 다른 세포주에 비해 약물 처리 전 TS 단백질 발현양상이 상대적으로 매우 높았다. pemetrexed 약물 처리 후 TS의 발현은 기저 발현보다 낮아졌으며, DHFR의 발현은 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 5A).

약물 처리 후 표적유전자인 TS의 발현은 4개의 세포주 모두에서 감소했고(Fig. 5B), DHFR의 발현양상은 1.7~5.6배(H226와 PC14) 증가한 것을 알 수 있었다(Fig. 5A, 5C). 선암 세포주인 A549와 PC14는 약물의 세포 내 유입과 활성에 관여하는 유전자인 RFC와 FPGS 단백질 발현은 감소하고 주요 표적유전자인 TS와 DHFR의 발현은 증가하는 서로 상반되는 발현양상을 보였지만, 편평상피 폐암 세포주인 HCC-1588과 H226은 DHFR을 제외한 모든 인자들에서 발현양상의 뚜렷한 차이를 관찰할 수 없었다.

고 찰

Pemetrexed의 항암효능은 엽산의 대사과정에 관여하는 TS, DHFR, GARFT 효소를 억제하는 과정에서 나타난다[4]. 다중표적 항암제인 pemetrexed가 사용되고 있는 비소세포폐암 세포주에서 약물수송체인 RFC, 약물 활성 형태인 polyglutamation에 관여하는 FPGS, 표적분자인 TS와 DHFR 발현의 상관관계를 알아보고 pemetrexed의 세포독성 효과에 영향을 주는 인자를 알아보고자 하였다. 또한 pemetrexed 대사과정에 영향을 미치는 RFC, FPGS, TS와 DHFR 유전자의 단일염기서열 다형성을 분석하였다.

L1210 세포주에서는 RFC와 FPGS의 발현 감소가 pemetrexed의 낮은 세포독성과 연관성이 있다는 것을 확인하였고, FPGS mRNA 전사활성이 FPGS의 mRNA 뿐 아니라 단백질 발현과도 연관되어 있다는 연구결과가 있었다[22]. 이번 연구에서는 pemetrexed 처리 전 RFC와 FPGS mRNA의 발현이 높으면 pemetrexed의 세포독성 효과가 높은 것으로 나타났고, 약물 처리 후 RFC와 FPGS의 단백질 발현 분석결과 여러 개의 isotype 이 존재하는 것을 확인하였다. 다양한 FPGS 단백질 발현 형태로 인해 각 세포주마다 정확한 발현 정도를 측정하는 것이 어려웠고, FPGS mRNA발현 변화와 단백질 발현 정도의 상관성을 추정하는데 어려움이 있었다. Pemetrexed에 약물 저항성을 보인 A549 세포주에서는 약물 처리 전 RFC와 FPGS의 mRNA 발현 정도가 모두 낮은 것으로 관찰되어, RFC와 FPGS의 발현 감소와 pemetrexed 약물 저항성과의 상관성을 추측할 수 있었지만, 다른 세포주에서는 연관성이 발견되지 않았다.

선암 세포주와 편평상피 폐암 세포주에서 FPGS 유전자의 263A>G SNP은 서로 상반된 대립유전자(allele)로 구성된 유전형으로 나타나, 조직형에 따라 유전형이 다르다는 것을 알 수 있었다. 최근 pemetrexed가 세포 내로 유입되는 과정에서 RFC와 FPGS 뿐 아니라 약물수송에 관여하는 ABC 유전자의 연관성도 보고되고 있어[3], 약물대사 과정에 관여하는 다양한 유전자들의 유전형과 발현 정도 뿐 아니라 pemetrexed의 세포 내 농도변화에 따른 상관성도 분석해야 할 것으로 생각된다.

TS mRNA와 단백질 발현 정도는 종양세포의 증식과 분화에 중요한 영향을 주는 것으로 알려져 있고, TS 단백질 발현 정도는 세포독성 효과와 연관성이 있다는 것이 보고되었다[11]. 연구결과에서 약물 처리 전 TS mRNA 발현이 가장 높았던 A549세포주에서 pemetrexed에 가장 낮은 세포독성 효과를 보인 반면, TS mRNA 발현이 가장 낮았던 H226 세포주는 pemetrexed에 매우 높은 세포독성 효과를 나타냈다. 임상 연구에서 위암과 대장암 환자의 경우 TS 발현 정도가 높으면 5-FU의 항암효능과 예후가 불량한 것이 관찰되었고[9], 비소세포폐암 세포주에서 TS의 높은 mRNA 발현이 pemetrexed의 낮은 세포독성과 연관성이 있다는 결과가 있었다[23]. 반면, 대장암과 위암 세포주에서는 TS의 발현이 5-FU또는 pemetrexed 에 대한 세포독성과 연관성이 없다는 상반된 연구결과가 있었다[20].

TS 유전자의 5′-UTR 28 bp repeat과 VNTR G>C SNP를 분석한 결과 A549 세포주에서는 heterozygote 유전형인 2RGC/2RGC 유전형이었고, PC14 세포주의 유전형은 3RCC/3RCC로, 두 세포주의 유전형과 TS mRNA 발현과의 연관성이 관찰되었다. TS 유전자의 발현은 전사인자(transcription factor)인 USF-1이 enhancer에 결합할 때 발현이 감소되는 것으로 알려져 있다[15]. 연구결과에서 TS의 유전형에 따라 mRNA 발현이 다르게 나타났고, 편평상피 폐암 세포주보다 선암 세포주에서 발현 정도의 차이가 큰 것으로 관찰되었다. 약물 처리 전 TS mRNA와 단백질 발현 정도가 가장 높았던 A549 세포주에서는 pemetrexed에 가장 낮은 세포독성 효과를 보여 약물 저항성을 일으키는 기전 중 TS의 발현 정도가 중요한 역할을 할 것으로 생각되지만, 다른 세포주에서는 약물 저항성과TS 발현과의 연관성을 발견할 수 없었다.

DHFR 721A>C SNP 유전형의 경우 선암 세포주인 A549와 PC14 에서 heterozygote 유전형을 나타냈고, 편평상피 폐암 세포주인 HCC-1588과 H226에서는 homozygote의 유전형이 관찰되었다. DHFR의 -1726C>T SNP은 GATA 2와 E2F라는 전사인자가 결합하는 프로모터 부위에 위치하여 DHFR의 mRNA 발현을 조절하는 중요한 SNP으로 알려져 있다[8]. 연구결과에서 DHFR 유전자의 -1726CC와 -1188AA 유전형을 가진 PC14와 HCC-1588 세포에서는 약물처리 전 DHFR mRNA와 단백질 발현 정도가 높은 것으로 나타나, SNP과 mRNA 및 단백질 발현양상과는 상관성이 있음을 알 수 있었다. 4가지 세포주 모두에서 pemetrexed 약물처리 후 DHFR의 mRNA 발현은 약물처리 전보다 낮아지는 경향을 보였지만 단백질 발현은 오히려 증가하는 상반된 결과를 보였다.

Pemetrexed의 표적분자 중 하나인 DHFR을 선택적으로 저해하는 methotrexate를 처리한 후 DHFR 단백질의 발현 정도가 증가함에 따라 약물의 감수성이 낮아진다는 연구결과가 있었다[24]. 또한, DHFR이 methotrexate와 결합하면 DHFR 단백질이 형태학적인 안정화 상태가 되고, proteosome 분해를 기전적으로 안정화한다는 것이 알려져 있다[1]. Pemetrexed처리 후 연구결과에서 관찰되었던 DHFR mRNA 발현 감소와 단백질 발현 증가는 항엽산 약물인 methotrexate와 유사한 기전에 의한 것이라 생각된다. 세포 내 높은 DHFR 발현정도는 methotrexate의 낮은 세포독성과 연관이 있었지만[17], TS의 발현 억제에 보조적인 역할로서, pemetrexed의 세포독성 효과에 영향을 주는 표적분자라고 하기에는 미흡한 것으로 생각된다.

세포독성 효과 측정에서 pemetrexed를 최고농도(30 uM)로 72시간 동안 처리한 후에도 모든 세포주에서 17.14~37.07% 정도 살아있는 세포가 관찰되었다. Li 등은 pemetrexed (0.1~1 uM)를 처리했을 때 약물농도가 증가함에 따라 p-AKT 단백질 발현이 증가하는 것을 관찰하였다[13]. 연구결과에서 pemetrexed 최고농도에서도 상당수 존재하는 세포들은 pemetrexed 약물 저항성에 p-AKT가 중요한 역할을 할 것으로 추정된다.

Pemetrexed 처리 전과 72시간 처리 후 RFC, FPGS, TS 와 DHFR의 mRNA 발현 차이와 세포독성과의 연관성은 찾을 수 없었다.

본 연구에서는 선암 세포주와 편평상피 폐암 세포주에서 pemetrexed의 약물수송에 관련된 인자인 RFC, 대사관련 인자인 FPGS, 표적분자인 TS와 DHFR 유전자의 유전형을 알아보고, mRNA, 단백질 발현 정도와 세포독성 효과와의 상관성을 비교 분석하였다. Pemetrexed의 대사과정에 관여하는 TS, DHFR 외에 다양한 인자들이 작용하고 있기 때문에 일부 유전자의 발현만으로 pemetrexed의 세포독성을 설명하기에 미흡한 것으로 생각된다. 보다 다양한 세포주를 이용하여 수송체와 표적분자의 분석결과를 비교함으로써 pemetrexed의 항암효능을 일으키는 기전을 이해할 수 있을 것이다. 또한 대사과정에 관여하는 새로운 유전자들을 발굴하여 pemetrexed 항암효능에 영향을 주는 새로운 SNP의 분석도 필요할 것이라 생각된다. Pemetrexed의 세포독성 효과는 약물 대사과정에 관여하는 여러 분자들의 유전형과 발현 정도에 의해 결정되고 다양한 분석결과를 토대로 항암효능을 평가하는 것이 필요하다고 생각한다.

References

1. Ainavarapu, S. R., L. Li, C. L. Badilla, and J. M. Fernandez. 2005. Ligand binding modulates the mechanical stability of dihydrofolate reductase. *Biophys. J.* **89**, 3337-3344.
2. Amatori, F., A. Di Paolo, M. Del Tacca, G. Fontanini, F. Vannozzi, L. Boldrini, G. Bocci, M. Lastella, and R. Danesi. 2006. Thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase expression in colorectal cancer and normal mucosa in patients. *Pharmacogenet. Genomics* **16**, 809-816.
3. Assaraf, Y. G. 2007. Molecular basis of antifolate resistance.

Cancer Metastasis Rev. **26**, 153-181.
4. Chattopadhyay, S., R. G. Moran, and I. D. Goldman. 2007. Pemetrexed: biochemical and cellular pharmacology, mechanisms, and clinical applications. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 404-417.
5. Cho, R. C., P. D. Cole, K. J. Sohn, G. Gaisano, R. Croxford, B. A. Kamen, and Y. I. Kim. 2007. Effects of folate and folylpolyglutamyl synthase modulation on chemosensitivity of breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 2909-2920.
6. Drozdzik, M., T. Rudas, A. Pawlik, W. Gornik, M. Kurzawski, and M. Herczynska. 2007. Reduced folate carrier-1 80G>A polymorphism affects methotrexate treatment outcome in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics J.* **7**, 404-407.
7. Gellekink, H., H. J. Blom, I. J. van der Linden, and M. den Heijer. 2007. Molecular genetic analysis of the human dihydrofolate reductase gene: relation with plasma total homocysteine, serum and red blood cell folate levels. *Eur. J. Hum. Genet.* **15**, 103-109.
8. Huang, T. S., J. Y. Hsieh, Y. H. Wu, C. H. Jen, Y. H. Tsuang, S. H. Chiou, J. Partanen, H. Anderson, T. Jaatinen, Y. H. Yu, and H. W. Wang. 2008. Functional network reconstruction reveals somatic stemness genetic maps and dedifferentiation-like transcriptome reprogramming induced by GATA2. *Stem Cells* **26**, 1186-1201.
9. Johnston, P. G., H. J. Lenz, C. G. Leichman, K. D. Danenberg, C. J. Allegra, P. V. Danenberg, and L. Leichman. 1995. Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Res.* **55**, 1407-1412.
10. Kawakami, K. and G. Watanabe. 2003. Identification and functional analysis of single nucleotide polymorphism in the tandem repeat sequence of thymidylate synthase gene. *Cancer Res.* **63**, 6004-6007.
11. Kawasaki, G., I. Yoshitomi, S. Yanamoto, and A. Mizuno. 2002. Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase expression in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical and clinicopathologic study. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **94**, 717-723.
12. Leil, T. A., C. Endo, A. A. Adjei, G. K. Dy, O. E. Salavaggione, J. R. Reid, M. M. Ames, and A. A. Adjei. 2007. Identification and characterization of genetic variation in the folylpolyglutamate synthase gene. *Cancer Res.* **67**, 8772-8782.
13. Li, T., Y. H. Ling, I. D. Goldman, and R. Perez-Soler. 2007. Schedule-dependent cytotoxic synergism of pemetrexed and erlotinib in human non-small cell lung cancer cells. *Clin. Cancer Res.* **13**, 3413-3422.
14. Ma, C. X., S. Nair, S. Thomas, S. J. Mandrekar, D. A. Nikcevich, K. M. Rowland, T. R. Fitch, H. E. Windschitl, S. L. Hillman, S. E. Schild, J. R. Jett, C. Obasaju, and A. A. Adjei. 2005. Randomized phase II trial of three schedules of pemetrexed and gemcitabine as front-line therapy for advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **23**, 5929-5937.
15. Mandola, M. V., J. Stoehlmacher, S. Muller-Weeks, G. Cesarone, M. C. Yu, H. J. Lenz, and R. D. Ladner. 2003. A novel single nucleotide polymorphism within the 5′ tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Cancer Res.* **63**, 2898-2904.
16. Moran, R. G. 1999. Roles of folylpoly-gamma-glutamate synthetase in therapeutics with tetrahydrofolate antimetabolites: an overview. *Semin. Oncol.* **26**, 24-32.
17. Morganti, M., M. Coronnello, B. Caciagli, C. Biondi, A. Quattrone, S. Capaccioli, T. Mazzei, and E. Mini. 2000. Modulation of dihydrofolate reductase gene expression in methotrexate-resistant human leukemia CCRF-CEM/E cells by antisense oligonucleotides. *Anticancer Drugs* **11**, 285-294.
18. Ohe, Y., Y. Ichinose, K. Nakagawa, T. Tamura, K. Kubota, N. Yamamoto, S. Adachi, Y. Nambu, T. Fujimoto, Y. Nishiwaki, N. Saijo, and M. Fukuoka. 2008. Efficacy and safety of two doses of pemetrexed supplemented with folic acid and vitamin B12 in previously treated patients with non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **14**, 4206-4212.
19. Parle-McDermott, A., F. Pangilinan, J. L. Mills, P. N. Kirke, E. R. Gibney, J. Troendle, V. B. O'Leary, A. M. Molloy, M. Conley, J. M. Scott, and L. C. Brody. 2007. The 19-bp deletion polymorphism in intron-1 of dihydrofolate reductase (DHFR) may decrease rather than increase risk for spina bifida in the Irish population. *Am. J. Med. Genet. A.* **143A**, 1174-1180.
20. Peters, G. J., C. L. van der Wilt, C. J. van Groeningen, K. Smid, S. Meijer, and H. M. Pinedo. 1994. Thymidylate synthase inhibition after administration of fluorouracil with or without leucovorin in colon cancer patients: implications for treatment with fluorouracil. *J. Clin. Oncol.* **12**, 2035-2042.
21. Rollins, K. D. and C. Lindley. 2005. Pemetrexed: a multitargeted antifolate. *Clin. Ther.* **27**, 1343-1382.
22. Roy, K., K. Mitsugi, S. Sirlin, B. Shane, and F. M. Sirotnak. 1995. Different antifolate-resistant L1210 cell variants with either increased or decreased folylpolyglutamate synthetase gene expression at the level of mRNA transcription. *J. Biol. Chem.* **270**, 26918-26922.
23. Sigmond, J., H. H. Backus, D. Wouters, O. H. Temmink, G. Jansen, and G. J. Peters. 2003. Induction of resistance to the multitargeted antifolate Pemetrexed (ALIMTA) in WiDr human colon cancer cells is associated with thymidylate synthase overexpression. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 431-438.
24. Skacel, N., L. G. Menon, P. J. Mishra, R. Peters, D. Banerjee, J. R. Bertino, and E. E. Abali. 2005. Identification of amino acids required for the functional up-regulation of human dihydrofolate reductase protein in response to antifolate Treatment. *J. Biol. Chem.* **280**, 22721-22731.
25. Xu, X., M. D. Gammon, J. G. Wetmur, M. Rao, M. M. Gaudet, S. L. Teitelbaum, J. A. Britton, A. I. Neugut, R. M. Santella, and J. Chen. 2007. A functional 19-base pair deletion polymorphism of dihydrofolate reductase (DHFR) and risk of breast cancer in multivitamin users. *Am. J. Clin. Nutr.* **85**, 1098-1102.

26. Yates, Z. and M. Lucock. 2005. G80A reduced folate carrier SNP modulates cellular uptake of folate and affords protection against thrombosis via a non homocysteine related mechanism. *Life Sci.* **77**, 2735-2742.

초록 : 비소세포폐암 세포주에서 pemetrexed의 세포독성과 유전학적 다형성과의 상관성 조사

윤성애 · 최정란 · 김정오 · 신정영 · 장향화 · 강진형[1]*
(가톨릭대학교 의과대학 가톨릭의과학연구원 종양내과 연구실, [1]서울성모병원 종양내과)

페메트렉시드(pemetrexed, alimta®)는 중피종(mesothelioma)과 비소세포폐암 (non-small cell lung cancer)을 비롯한 다양한 암종에서 엽산(folate) 대사과정에 관여하는 대사물질의 활성을 억제하여 항암효능을 나타낸다. 다중표적 항암제 (multitargeted antifolate)인 pemetrexed는 엽산의 세포내 주요 이동통로인 reduced folate carrier (RFC)를 통해 세포 내로 유입된 후 folylpolyglutamate synthetase (FPGS)에 의해 폴리글루타민산염 (polyglutamate) 유도체로 활성되고 thymidylate synthase (TS)와 dihydrofolate reductase (DHFR)를 표적하는 것으로 알려져 있다. 조직형이 서로 다른 비소세포폐암 세포주를 선정하여 pemetrexed의 대사과정에 관여하는 유전자들의 단일염기서열 다형성을 조사하고, mRNA와 단백질의 발현 정도를 비교하여 pemetrexed의 세포독성 효과와의 상관성을 분석하였다. 4개의 비소세포폐암 세포주인 A549, PC14, HCC-1588과 H226에서 RFC, FPGS, TS와 DHFR의 유전형을 조사하였다. Pemetrexed의 약물의 감수성을 알아보기 위해 real-time PCR과 Western blot 방법으로 mRNA 발현과 단백질 발현 정도를 비교하였고, SRB 법으로 약물에 대한 세포독성 효과를 측정했다. PC14 세포주와 H226 세포주에서는 약물처리 전 RFC와 FPGS의 mRNA 발현이 높은 것으로 나타났고, IC_{50}값이 각각 0.08±0.01 uM과 0.07±0.01 uM로 pemetrexed에 대한 감수성이 높은 것을 알 수 있었다. A549 세포주에서 TS의 유전형이 2R/2R일 때 mRNA발현이 증가하고 pemetrexed의 약물 저항성과 관련이 있었다. 반면, TS의 유전형이 3R/3R로 나타난 H226에서는 mRNA 발현이 낮은 것을 알 수 있었지만 pemetrexed의 높은 감수성과 관련이 있었다. 세포주 모두에서 pemetrexed 약물처리 후 DHFR의 mRNA 발현은 약물처리 전보다 낮아지는 경향을 보였지만 단백질 발현은 오히려 증가하는 상반된 결과를 보였다. 또한 DHFR 프로모터에 위치한 -1726C>T, -1188A>C SNP는 서로 연쇄 불평형 상태(linkage disequilibrium, LD)에 있었다. 연구결과에서 pemetrexed의 세포독성 효과는 약물 대사과정에 관여하는 여러 분자들의 유전형과 발현 정도에 의해 결정되는 것을 알 수 있었고, 다양한 분석결과를 토대로 항암효능을 평가하는 것이 필요하다고 생각된다.