

Endogenous Nitric Oxide Strengthens Doxorubicin-induced Apoptosis in Human Colorectal Cell Lines

Soon Jae Im¹, Ji Hye Kim¹ and Min Young Kim^{1,2*}

¹Toxicology Laboratory, Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Science, SARI, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

²Research Institute for Subtropical Agriculture and Biotechnology, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

Received June 16, 2014 / Revised July 8, 2014 / Accepted July 29, 2014

Doxorubicin is a general chemotherapy drug widely used for a number of cancers. However, the correlation between endogenous nitric oxide (NO[•]) levels and chemoresistance to doxorubicin remains unclear. In this study, we investigated the effect of endogenous NO[•] on the anticancer activity of doxorubicin in human colon cancer cell lines HCT116 and HT29 with different p53 status. The cells were treated with either doxorubicin alone or in combination with the NO[•] synthase (NOS) inhibitor N^G-monomethyl-L-arginine (NMA). Doxorubicin differentially inhibited the growth of both the HCT116 (p53-WT) and HT29 (p53-MUT) cells, which was mitigated by cotreatment with NMA. Further studies revealed that inhibition of endogenous NO[•] mitigated doxorubicin-induced apoptosis in the HCT116 and HT29 cells, as evidenced by apoptotic DNA fragmentation and the sub-G1 peak of apoptotic markers. Apoptosis was delayed in the HT29 cells, and its magnitude was greatly reduced, underscoring the importance of the modulation of p53 in the response. RT-PCR analysis revealed that doxorubicin down-regulated levels of inhibitors of the apoptosis family (cellular IAP-1 and -2). Collectively, these data show that induction of apoptosis by doxorubicin in human colon cancer cells is possibly related to modulation of endogenous NO[•], the expression of the IAP family of genes, and the status of p53. The underlying mechanisms may represent potential targets for adjuvant strategies to improve the efficacy of chemotherapy for colon cancer.

Key words : Apoptosis, doxorubicin, endogenous nitric oxide, human colon cancer cells, inhibitors of apoptosis

서 론

대장암은 대장의 점막에서 발생하는 선암이 주를 이루며 결장과 직장에 생기는 악성종양으로, 우리나라에서는 식습관의 변화로 인해 대장암이 2008년 기준 전체 암 발생률 중 약 12.7%를 차지하고, 사망률은 약 9.9%를 차지하고 있다. 또한 대장암은 연간 6.4%의 변화율(Annual Percent Change, APC)로 발생률이 지속적으로 증가하고 있는 것으로 밝혀져 암의 예방, 원인 규명 및 치료를 위해 국가적 차원에서 노력을 하고 있으며, 관련 연구도 활발히 진행되고 있다[11].

Doxorubicin은 anthracycline 계열의 항암제로, 대장암, 백혈병, 폐암, 유방암 등 다양한 종류의 암을 치료하는데 사용되고 있으며, DNA의 염기쌍 사이에 끼어들어 DNA 중합효소와 RNA 중합효소를 억제하여 세포사멸(apoptosis)을 유발함

으로써 항암효과를 나타내는 것으로 알려져 있다[18, 26]. Doxorubicin같은 기존 항암제의 효과를 증가시키거나 새로운 항암제의 개발을 위해 암세포의 apoptosis에 관한 연구가 꾸준히 진행되고 있는데, apoptosis는 발생과정상 불필요하거나, 노화 또는 손상을 입어 본래의 기능을 하지 못하는 세포를 제거하기 위해 종양억제유전자 p53을 비롯한 여러 가지 유전자들과 관련 단백질들의 조절에 의해 세포가 죽는 방식을 의미하며, 세포괴사(necrosis)와 함께 세포의 죽음을 초래하는 중요한 메커니즘으로 알려져 있다. 치명적인 손상을 입어 세포사멸에 의해 제거되지 못한 세포는 면역질환과 신경 퇴화, 암 발생 등 인체에 유해한 작용을 하게 된다[16, 17].

Apoptosis를 유발하는 원인 중 하나인 DNA 손상은 다양한 요인들에 의해 발생하기도 하지만, 산화질소(nitric oxide, NO[•])에 의해서도 DNA의 손상이 발생할 수 있다. NO[•]는 세포증식과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있는데, 적당한 농도의 NO[•]는 세포증식에 긍정적인 영향을 주지만, NO[•]가 결핍되거나 과도한 농도의 NO[•]는 세포 내에서 DNA 손상 및 세포의 죽음 등 부정적인 영향을 초래한다[4, 10, 19, 22]. 세포는 세포 내에서 필요한 NO[•]를 생성하기 위해 NO[•]를 합성시키는 NO[•] 합성효소(Nitric Oxide Synthase, NOS)를 가지고 있는데, NOS에는 inducible NOS (iNOS), endothelial NOS (eNOS)와

*Corresponding author

Tel : +82-64-754-3349, Fax : +82-64-756-3351

E-mail : jeffmkim@jejunu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

neuronal NOS (nNOS) 등이 존재하고, 세포는 NOS의 발현을 조절함으로써 NO[•] 농도를 일정하게 유지시킨다[21].

Apoptosis는 다양한 요인들에 의하여 영향을 받는데, apoptosis 억제에 관여하는 단백질들이 발견되었고 이 단백질들을 apoptosis 억제 단백질(Inhibitor of apoptosis protein, IAP)이라고 분류하게 되었다. 다양한 IAP가 존재하지만, 사람에게서 발견된 IAP로는 cellular inhibitor of apoptosis proteins (cIAP-1 and cIAP-2), human inhibitor of apoptosis proteins (HIAP-1 and HIAP-2), neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP), X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), survivin 등이 알려져 있으며, IAP는 다양한 메커니즘의 조절에 관여함으로써 세포의 apoptosis를 유도하거나 억제시킬 수 있다[6, 15].

본 연구에서는 인간 대장암 세포주에서 p53 유전자의 발현 상태 차이가 기존 항암제인 Doxorubicin의 항암효과에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보고자 하였다. 또한, apoptosis 유도 작용에 Doxorubicin에 의해 생성된 산화질소와 IAP의 역할을 알아보기 위해 NOS 및 cIAP-1, cIAP-2, XIAP, survivin과 같은 IAP의 발현 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용된 Doxorubicin은 Toronto Research Chemicals Inc. (North York, ON, Canada)에서 구입하여 멸균된 증류수에 녹인 후 400 μ M stock으로 만들어 -20 $^{\circ}$ C에 보관하여 사용하였다. N^G-monomethyl-L-arginine (NMA, Cal-Biochem, Salt Lake City, UT, USA)도 멸균된 증류수에 녹인 후 400 mM stock으로 만들어 -20 $^{\circ}$ C에 보관하여 사용하였다.

세포배양

인간 대장암 세포주인 HCT116 (p53-WT)과 HT29 (p53-MUT)는 Massachusetts Institute of Technology (Cambridge, MA, USA)의 Gerald N. Wogan 교수님으로부터 분양 받았으며, 10% 우태아혈청(Fetal bovine serum, FBS, PAA Laboratories, Pasching, Austria)과 1% 항생제(100 units/ml Penicillin-Streptomycin, PAA Laboratories)가 포함된 Mc Coy's 5A 배지(Gibco, Grand Island, MD, USA)를 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. 매 72시간마다 Trypsin-versene mixture (Lonza, Walkersville, MD, USA)를 이용하여 세포를 부유상태로 만든 다음 세포를 1 \times 10⁵ cells/ml로 분주하여 계대 배양하였다.

Trypan blue assay에 의한 세포 생존율 측정

세포 생존율 측정은 Tolnai [27]의 방법을 변형하여 진행하였다. 6-well plate에 HCT116과 HT29 세포를 2 \times 10⁶ cells/

well가 되도록 분주한 다음 Doxorubicin과 NMA를 적정농도로 처리하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 48시간 후 배지를 제거하고 phosphate-buffered saline (PBS, PAA Laboratories)를 각 well당 1 ml을 첨가하여 세포를 세척시킨 다음 Trypsin-versene mixture를 각 well당 0.5 ml씩 처리하여 세포를 부유시킨 후, trypan blue (Lonza)를 동량으로 첨가하여 2분간 처리하였다. 처리된 세포들을 혈구계수기(Haemocytometer, Marienfeld-superior, Lauda-Königshofen, Germany)에 고정하여 광학현미경을 이용하여 살아있는 세포의 수를 비교하였다.

Griess assay에 의한 산화질소 생성량 측정

위와 동일한 방법으로 물질을 처리한 세포를 배양하여 Green 등[8]의 방법을 변형하여 산화질소 생성량 측정 실험을 진행하였다. Doxorubicin과 NMA를 적정농도로 처리하여 48시간 동안 배양한 후 배지를 수확하여 원심분리한 후 상층액 100 μ l를 96-well plate에 옮기고 동량의 Griess reagent (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 처리하여 실온에서 10분간 반응시키고 Spectra MR microplate reader (Dynex Technologies Inc., Chantilly, VA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이에 표준치를 구하기 위해 sodium nitrite (Sigma Chemical Co.)를 단계적으로 희석하여 사용하였다.

RT-PCR에 의한 mRNA 발현 분석

mRNA 수준에서 NOS의 발현을 확인하기 위해서 Doxorubicin을 처리한 세포들을 수확하여 TRI reagent (Sigma Chemical Co.)를 이용하여 RNA를 정제하였다. TRI reagent를 첨가하여 실온에서 5분간 반응시켜 세포를 분해시키고 chloroform을 첨가하였다. 12,000 \times g로 4 $^{\circ}$ C에서 15분간 원심분리하고 상층액을 새로운 microtube에 옮겼다. 여기에 iso-propanol을 첨가하고 상온에서 10분간 반응시킨 뒤, 12,000 \times g로 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. 원심분리 후, RNA pellet을 75% EtOH로 세척하고 12,000 \times g로 4 $^{\circ}$ C에서 5분간 원심분리하였다. 추출한 RNA를 DEPC-water에 녹여 정제된 total RNA를 정량하였다. 정제한 total RNA 1 μ g을 주형으로 하여 각각의 primer [13]와 TOP script™ one-step RT-PCR kit (Enzymomics, Daejeon, Korea)를 넣고 GenePro Thermal Cycler TC-E (Bioer technology, Hangzhou, China)를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. PCR 산물은 ethidium bromide가 포함된 1.5% agarose gel에서 100 V, 30분간 전기영동하여 Chemidoc Universal hood II (Bio-rad, Hercules, CA, USA)으로 발현을 확인하였다. 대조군으로 β -actin을 사용하였다.

Flow cytometry에 의한 세포주기 분석

세포주기 측정은 Krishan [14]의 방법을 변형하여 실험을 진행하였다. HCT116과 HT29 세포에 Doxorubicin을 처리하여 48시간 동안 배양한 후, PBS로 세척하고 70% EtOH로 4°C에서 30분간 고정하였다. 1% FBS가 포함된 PBS로 세척하고 500 µg/ml propidium iodide (PI, Sigma Chemical Co.)와 10 µg/µl RNase A (Sigma Chemical Co.)를 처리하여 37°C에서 30분간 염색하였다. 염색된 세포는 BD FACS calibur™ flow cytometer (BD biosciences, San Jose, CA, US)로 측정하였으며, CellQuest program을 사용하여 분석하였다.

Doxorubicin 처리에 의한 DNA 단편화 측정

HCT116과 HT29 세포에 Doxorubicin을 처리하여 48시간 동안 배양한 후, 세포를 수집하여 GenElute Mammalian Genomic DNA miniprep kit (Sigma Chemical Co.)로 genomic DNA를 분리하였다. 분리한 DNA를 1.8% agarose gel에서 50 V로 2시간동안 전기영동하고 ethidium bromide (Amresco, Solon, OH, USA)로 1시간 동안 염색한 다음, Chemidoc Universal hood II를 이용하여 DNA 단편화를 확인하였다.

통계분석

모든 실험 결과는 PASW statistics 19 (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS) 통계 프로그램을 이용하여 평균 (mean) ± 표준편차(S.D.)로 나타났다. 각 실험군의 분석 항목별 통계의 유의성은 Student t-test를 이용하여 통계적 유의성을 얻었다.

결과 및 고찰

Doxorubicin과 NMA 처리에 의한 HCT116과 HT29 세포의 생존율 변화

Doxorubicin과 NMA가 HCT116과 HT29 세포의 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위해 Doxorubicin과 NMA를 농도별로 48시간 처리하여 배양한 후 trypan blue assay를 이용하여 세포 생존율의 변화를 확인하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 HCT116과 HT29 세포에 Doxorubicin을 처리하였을 경우, 농도 의존적으로 생존율이 감소되었음을 알 수 있었다. 또한 Doxorubicin을 처리했을 때 생존율이 약 30%가 되는 농도인 4 µM에 추가적으로 NMA를 농도별로 처리하였을 경우에는 Doxorubicin 단독 처리군에 비해 NMA의 농도 의존적으로 생존율이 증가함을 알 수 있었다. 산화질소 합성효소 억제제로 알려진 NMA는 세포 내 독성을 나타내는 산화질소의 생성을 억제하는 것으로 알려져 있는데[2], 이 때문에 Doxorubicin의 세포성장 억제활성을 감소시킨 것으로 생각된다. p53-WT인 HCT116 세포가 p53-MUT인 HT29에 비해 Doxor-

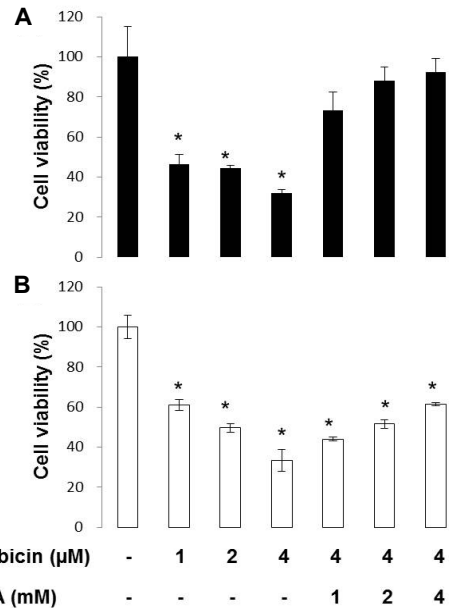


Fig. 1. Cell viability assay on Doxorubicin-treated human colon cancer cell lines. HCT116 (A) and HT29 (B) cells were treated with either Doxorubicin alone or in combination with NMA. Cell viability was determined by trypan blue assay after 48 hr. Results are presented as a percentage of control cells. Each value represents mean ± SD of three individual experiments. *p<0.05 compared to the untreated group.

ubicin에 민감하게 반응하였으며(Fig. 1A), NMA 처리 시에도 HCT116 세포가 HT29 세포에 비해 세포 생존율의 증가가 더 큼을 알 수 있었다(Fig. 1B). Doxorubicin 처리 시, p53이 없는 섬유아 세포보다 p53이 정상적인 섬유아 세포에서 세포생존율이 더 많이 감소했다는 연구 결과[7]와 맞물려 Doxorubicin 처리 시 p53-WT인 HCT116 세포가 p53-MUT인 HT29 세포보다 세포 생존율의 변화가 큰 이유는 p53의 발현 차이라는 것을 알 수 있었다.

Doxorubicin과 NMA 처리에 의한 산화질소 생성량 변화

Doxorubicin에 의해 산화질소 생성이 유도되고, NMA에 의해 산화질소 생성이 저해되는지를 확인하기 위해 griess assay를 통한 산화질소 생성량을 측정하였다. HCT116 (Fig. 2A)과 HT29 (Fig. 2B) 모두에서 Doxorubicin 농도 의존적으로 산화질소 생성량이 증가하였으며, Doxorubicin 4 µM에 NMA를 농도별로 처리한 결과, Doxorubicin 단독 처리군에 비해 산화질소 생성량이 감소함을 보였다. Doxorubicin이 산화질소 생성을 증가시킨다는 연구결과들[5, 12]과 같이 Doxorubicin은 산화질소의 생성을 증가시켰으며, NMA는 이러한 Doxorubicin의 작용을 상쇄시켜 산화질소 생성 유도를 방해하는 효과를 보였다. 또한, 정상 p53-WT인 HCT116 세포(Fig. 2A)가 p53-MUT인 HT29 세포(Fig. 2B)와 비교해서 Doxorubicin에

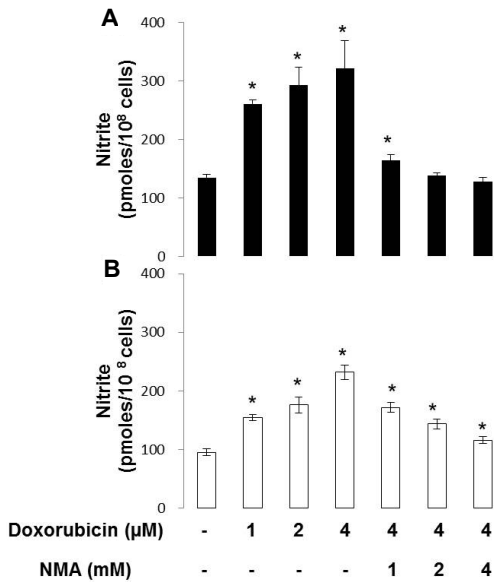


Fig. 2. Griess assay on Doxorubicin-treated human colon cancer cell lines. HCT116 (A) and HT29 (B) cells were treated with either Doxorubicin alone or in combination with NMA. Nitrite measurement was determined by Griess assay after 48 h. Results are presented as a percentage of control cells. Each value represents mean \pm SD of three individual experiments. * $p < 0.05$ compared to the untreated group.

의한 산화질소 생성량의 증가폭과 NMA에 의한 산화질소 생성량의 감소폭이 크게 나타난 것은 p53이 내인성 산화질소 생성에 관여하는 NOS의 발현을 조절하기 때문[1]인 것으로 사료된다. Doxorubicin에 의해 유도된 산화질소 생성은 암세포의 생존율을 저해하고, NMA는 Doxorubicin의 산화질소 생성 유도력을 억제하여 암세포의 생존율을 증가시켰다. 이는 산화질소가 세포에 산화적 스트레스를 주게 되고, 이로 인해 NF- κ B와 NRF2, p21의 발현이 증가하면서 세포 독성을 나타낸다는 연구 결과[25]처럼 Doxorubicin이 산화질소 생성을 유도하고, 이렇게 생성된 산화질소가 HCT116과 HT29 세포에 산화적 스트레스를 주어 세포 생존율을 저해한 것으로 생각된다.

HCT116과 HT29 세포의 NOS 발현에 미치는 Doxorubicin의 영향

대장암 세포에서 NOS의 발현이 증가하면 내인성 산화질소의 생성이 증가하게 되고, 이로 인해 세포 생존율은 감소하고 세포사멸 유전자의 발현이 증가하면서 apoptosis가 증가하는 것으로 알려져 있다[20]. Fig. 1에서는 Doxorubicin 농도 의존적으로 HCT116과 HT29 세포의 세포 생존율이 감소함을 알 수 있었고, Fig. 2에서는 세포 생존율이 감소함에 따라 산화질소 생성량이 증가함을 알 수 있었다. Doxorubicin에 의한 산화질소 생성량의 변화가 산화질소 합성효소인 NOS의 발현량과 관계가 있는지를 확인하기 위해 RT-PCR을 이용하여 mRNA

수준에서의 NOS 발현량을 확인하였다. HCT116 세포(Fig. 3A)와 HT29 세포(Fig. 3B) 모두에서 Doxorubicin 농도 의존적으로 nNOS, iNOS 및 eNOS의 발현량이 증가함을 알 수 있었고, NOS 중 eNOS와 nNOS의 발현량이 iNOS에 비해 뚜렷하게 증가되는 것을 관찰 할 수 있었다. 모두 같은 NOS이지만, iNOS는 Ca²⁺/CaM-비의존성 경로를 통해 발현되고, eNOS와 nNOS는 Ca²⁺/CaM-의존성 경로를 통해 발현되는 것으로 알려져 있다[3]. 따라서 iNOS보다 eNOS와 nNOS의 발현이 크게 증가한 것은 발현 경로에 의한 것으로 생각된다. 소 대동맥 내피 세포에 Doxorubicin 처리 시 eNOS의 발현이 증가하지만 iNOS의 발현에는 변화가 없고, Ca²⁺ 조절이 eNOS 발현에 영향을 끼친다는 연구결과[12]가 이를 뒷받침한다. Doxorubicin이 HCT116과 HT29 세포에서 Ca²⁺/CaM-의존성 경로를 활성화시켜 iNOS보다 eNOS와 nNOS의 발현을 증가시킨 것으로 생각된다.

Doxorubicin 처리에 의한 HCT116과 HT29 세포의 sub-G1 arrest

Apoptosis가 유발되면 DNA가 절단되어 세포는 G₁기 가지 못하고 sub-G₁기가 증가하게 된다[9]. Fig. 4A는 HCT116 세포의 sub-G₁기의 변화를 나타낸 것인데, HCT116세포에서 Doxorubicin의 처리 농도가 증가할수록 sub-G₁기의 세포 빈도가 대조군에 비해 유의적으로 증가하였음을 관찰하였다. HT29 세포에서도 마찬가지로 Doxorubicin 농도 의존적으로 유의적인 증가를 보였다(Fig. 4B). 이 결과는 근위세뇨관 세포에 Doxorubicin 처리 시 sub-G₁기의 세포 빈도가 증가하고 처리 농도가 증가함에 따라 sub-G₁기의 세포 빈도가 증가한다는 연구 결과와 유사한 경향을 보였다[24]. 그러나 NOS 억제제인 NMA를 처리한 결과, HCT116과 HT29 세포에서 sub-G₁

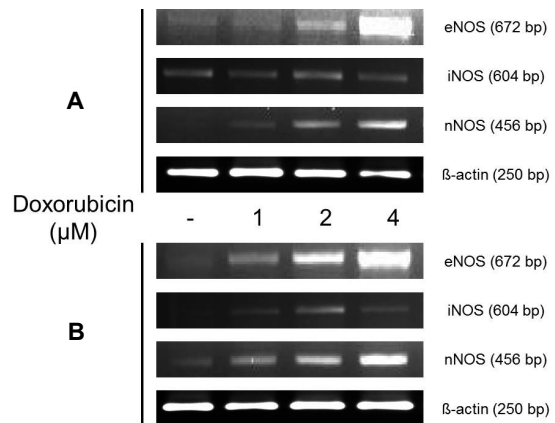


Fig. 3. The mRNA expression levels of eNOS, iNOS and nNOS were detected using RT-PCR. HCT116 (A) and HT29 (B) cells were treated Doxorubicin. The polymerase chain reaction (PCR) products were separated on 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide.

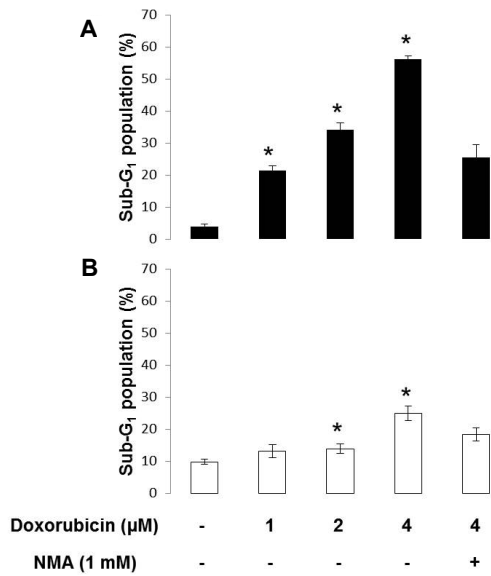


Fig. 4. Sub-G₁ population assay on Doxorubicin-treated human colon cancer cell lines. HCT116 (A) and HT29 (B) cells were treated with either Doxorubicin alone or in combination with NMA. Sub-G₁ population was determined using flow cytometry. Results are presented as a percentage of control cells. Each value represents mean ± SD of three individual experiments. **p*<0.05 compared to the untreated group.

기의 세포 빈도가 Doxorubicin 단독 처리시의 sub-G₁기보다 감소함을 보였다. 본 연구를 통해 Doxorubicin이 인간 대장암 세포에서 sub-G₁ arrest를 유발한다는 것을 알 수 있었고, NOS 억제제인 NMA가 Doxorubicin의 sub-G₁ arrest 유발을 억제하는 것도 알 수 있었다.

Doxorubicin 처리에 의한 HCT116과 HT29 세포의 apoptosis 유발

DNA 단편화는 apoptosis의 전형적인 특징이며[23], 골육종 세포에서 Doxorubicin 처리에 의해 sub-G₁기의 세포 빈도와 DNA 단편화가 증가한다고 보고되었다[28]. Fig. 5에 나타나듯이 HCT116과 HT29 세포 모두에서 Doxorubicin을 처리하지 않은 대조군에 비해 Doxorubicin을 처리한 군에서 DNA 단편화가 확인되었으며, Doxorubicin의 농도가 증가할수록 DNA 단편화 또한 증가함을 확인하였다. 세포주기에서 sub-G₁기의 세포 빈도와 DNA 단편화가 Doxorubicin 농도 의존적으로 증가한 것으로 보아, Doxorubicin이 HCT116과 HT29 세포에서 apoptosis를 유발시킨 것으로 사료된다.

HCT116과 HT29 세포에서 Doxorubicin에 의한 IAP 발현 변화

HCT116과 HT29 세포에서 Doxorubicin에 의해 apoptosis의 특징인 sub-G₁ arrest와 DNA 단편화를 확인하였다. Doxor-

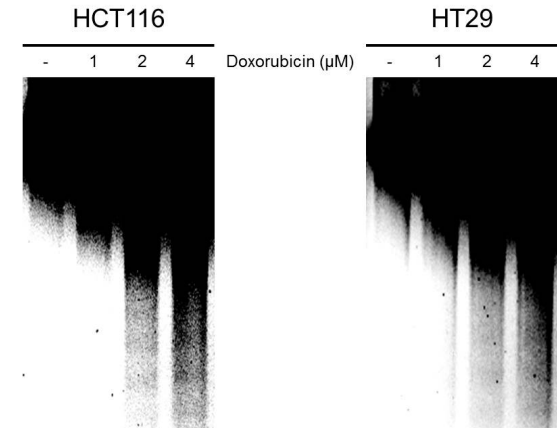


Fig. 5. DNA fragmentation analysis by agarose gel electrophoresis in genomic DNA isolated from control and Doxorubicin treated HCT116 and HT29 cells.

ubicin에 의한 apoptosis가 IAP 발현량의 변화와도 관련이 있는지 IAP 중 survivin, XIAP, cIAP-1과 cIAP-2의 발현량 변화를 mRNA 수준에서 확인하기 위해 RT-PCR을 진행하였다. Fig. 6A에서 보이는 바와 같이 HCT116 세포에서는 Doxorubicin에 의해 survivin과 cIAP-1이 감소하는 것을 확인하였고, HT29 세포에서는 XIAP가 감소하는 것을 Fig. 6B를 통해 알 수 있었다. 이러한 IAP의 발현 변화 결과는 p53 유전자 발현의 차이가 Doxorubicin의 apoptosis 유도 작용에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합해보면, Doxorubicin은 인간 대장암 세포주인 HCT116과 HT29 세포에서 농도 의존적으로 세포 생존

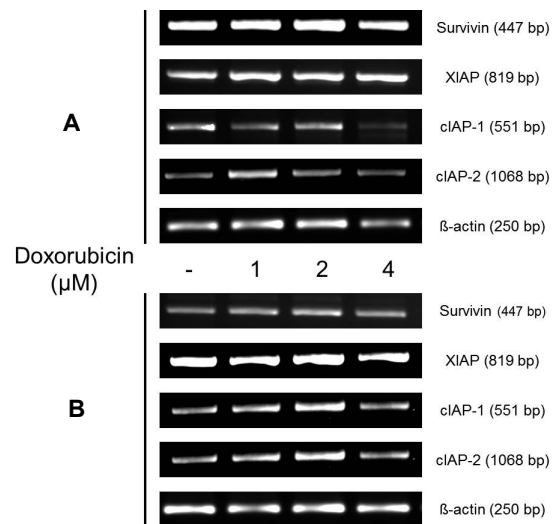


Fig. 6. The mRNA expression levels of survivin, XIAP, cIAP-1 and cIAP-2 were detected using RT-PCR. HCT116 (A) and HT29 (B) cells were treated Doxorubicin. The polymerase chain reaction (PCR) products were separated on 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide.

을 감소시키고 산화질소 생성량을 증가시켰으나, p53 유전자의 상태에 따라 세포 생존율의 감소도와 산화질소 생성량의 증가량은 조금의 차이를 보였다. 이러한 변화는 eNOS와 nNOS의 발현 증가로 내인성 산화질소의 생성이 증가하여 세포 생존율에 영향을 주었다. 세포주기에서 sub-G₁기의 세포 빈도의 증가에도 p53 유전자의 상태에 따라 증가율이 차이를 보였다. DNA 단편화는 HCT116과 HT29 세포 모두에서 일어났으며, IAP 발현에 있어서는 조금 차이를 보이고 있었음을 알 수 있었다. 종양억제유전자인 p53은 암 치료에 있어 apoptosis와 관련된 중요한 유전자로 알려져 있다. p53 유전자의 발현은 손상된 세포의 DNA가 자가복구를 통해 암 세포의 정상적인 apoptosis를 유도하지만, p53 유전자가 세포 내 존재하지 않거나 p53 유전자에 손상이 발생하여 정상적으로 발현되지 못하면 손상된 DNA에 대한 자가복구 기작이 제대로 작동하지 않고 apoptosis가 정상적으로 일어나지 않아 오히려 암 세포의 발생을 유도하게 된다[17]. 본 연구 결과에서 HCT116 (p53-WT)과 HT29 (p53-MUT)의 차이는 apoptosis와 밀접한 관련이 있는 p53 유전자의 발현 차이에 의한 것임을 알 수 있었다. 따라서, Doxorubicin은 인간 대장암 세포에서 내인성 산화질소의 생성을 증가시켜 apoptosis를 유발을 하지만 p53 유전자의 영향을 받는다는 것을 알 수 있었으며, *in vivo* 실험을 통해 p53 유전자와 내인성 산화질소에 의한 Doxorubicin의 항암 효과 증대에 관한 연구를 진행시켜야 할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2011년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업입니다(No. 2011-0006617).

References

1. Ambs, S., Hussain, S. P., and Harris, C. C. 1997. Interactive effects of nitric oxide and the p53 tumor suppressor gene in carcinogenesis and tumor progression. *FASEB J* **11**, 443-448.
2. Billiar, T. R., Curran, R. D., Harbrecht, B. G., Stuehr, D. J., Demetris, A. J. and Simmons, R. L. 1990. Modulation of nitrogen oxide synthesis *in vivo*: NG-monomethyl-L-arginine inhibits endotoxin-induced nitrate/nitrite biosynthesis while promoting hepatic damage. *J Leukoc Biol* **48**, 565-569.
3. Bonavida, B., Khineche, S., Huerta-Yepez, S. and Garbán, H. 2006. Therapeutic potential of nitric oxide in cancer. *Drug Resist Updat* **9**, 157-173.
4. Brüne, B., Knethen, A. V. and Sandau, K. B. 1998. Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur J Pharmacol* **351**, 261-272.
5. De Boo, S., Kopecka, J., Brusa, D., Gazzano, E., Matera, L., Ghigo, D., Bosia, A. and Riganti, C. 2009. iNOS activity is necessary for the cytotoxic and immunogenic effects of doxorubicin in human colon cancer cells. *Mol Cancer* **8**, 108-111.
6. Deveraux, Q. L. and Reed, J. C. 1999. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* **13**, 239-252.
7. Dunkern, T. R., Wedemeyer, I., Baumgärtner, M., Fritz, G. and Kaina, B. 2003. Resistance of p53 knockout cells to doxorubicin is related to reduced formation of DNA strand breaks rather than impaired apoptotic signaling. *DNA Repair* **2**, 49-60.
8. Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* **126**, 131-138.
9. Hartwell, L. H. and Kastan, M. B. 1994. Cell cycle control and cancer. *Science* **266**, 1821-1828.
10. Huerta, S., Chilka, S. and Bonavida, B. 2008. Nitric oxide donors: novel cancer therapeutics (review). *Int J Oncol* **33**, 909-927.
11. Jung, K. W., Park, S. H., Kong, H. J., Won, Y. J., Lee, J. Y., Park, E. C. and Lee, J. S. 2011. Cancer statistics in Korea: incidence, mortality, survival, and prevalence in 2008. *Cancer Res Treat* **43**, 1-11.
12. Kalivendi, S. V., Kotamraju, S., Zhao, H., Joseph, J. and Kalyanaraman, B. 2001. Doxorubicin-induced apoptosis is associated with increased transcription of endothelial nitric-oxide synthase. Effect of antiapoptotic antioxidants and calcium. *J Biol Chem* **276**, 47266-47276.
13. Kim, J. H. and Kim, M. Y. 2014. Immature citrus fruit extracts enhance the apoptosis inducing potential of cisplatin in human malignant Melanoma A375 Cells via regulation of nitric oxide and inhibitor of apoptosis family (IAP). *J Life Sci* **24**, 454-460.
14. Krishan, A. 1975. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol* **66**, 188-193.
15. LaCasse, E. C., Baird, S., Korneluk, R. G. and MacKenzie, A. E. 1998. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* **17**, 3247-3259.
16. Makin, G. and Dive, C. 2001. Apoptosis and cancer chemotherapy. *Trends Cell Biol* **11**, S22-S26.
17. Makin, G. and Hickman, J. A. 2000. Apoptosis and cancer chemotherapy. *Cell Tissue Res* **301**, 143-152.
18. Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G. and Gianni, L. 2004. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* **56**, 185-229.
19. Mocellin, S., Bronte, V. and Nitti, D. 2007. Nitric oxide, a double edged sword in cancer biology: searching for therapeutic opportunities. *Med Res Rev* **27**, 317-352.
20. Mojic, M., Mijatovic, S., Maksimovic-Ivanic, D., Miljkovic, D., Stosic-Grujicic, S., Stankovic, M., Mangano, K., Travalii, S., Donia, M., Fagone, P., Zocca, M. B., Al-Abed, Y., McCubrey, J. A. and Nicoletti, F. 2012. Therapeutic potential of nitric oxide-modified drugs in colon cancer cells. *Mol Pharmacol* **82**, 700-710.
21. Moncada, S. and Higgs, E. A. 1995. Molecular mechanisms

- and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J* **9**, 1319-1330.
22. Murphy, M. P. 1999. Nitric oxide and cell death. *Biochim Biophys Acta* **1411**, 401-414.
 23. Nagata, S. 2000. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* **256**, 12-18.
 24. Park, E. J., Kwon, H. K., Choi, Y. M., Shin H. J., and Choi, S. D. 2012. Doxorubicin induces cytotoxicity through upregulation of perk-dependent ATF3. *PloS One* **7**, e44990.
 25. Shah, G., Zhang, G., Chen, F., Cao, Y., Kalyanaraman, B. and See, W. A. 2014. iNOS expression and NO production contribute to the direct effects of BCG on urothelial carcinoma cell biology. *Urol Oncol* **32**, 45.
 26. Tang, N., Du, G., Wang, N., Liu, C., Hang, H. and Liang, W. 2007. Improving penetration in tumors with nano-assemblies of phospholipids and doxorubicin. *J Natl Cancer Inst* **99**, 1004-1015.
 27. Tolnai, S. 1975. A method for viable cell count. *Methods Cell Sci* **1**, 37-38.
 28. Tsang, W. P., Chau, S. P. Y., Kong, S. K., Fung, K. P. and Kwok, T. T. 2003. Reactive oxygen species mediate doxorubicin induced p53-independent apoptosis. *Life Sci* **73**, 2047-2058.

초록 : Doxorubicin에 의한 내인성 산화질소가 인간 대장암 세포주에서의 세포사멸에 미치는 효과

임순재¹ · 김지혜¹ · 김민영^{1,2*}

(¹제주대학교 생명공학부 독성학 실험실, ²제주대학교 아열대농업생명과학연구소)

Doxorubicin은 광범위한 암을 치료하는데 사용되는 일반적인 항암제이지만, 내인성 산화질소 생성량과 Doxorubicin의 항암 효과의 상관 관계에 대해서는 아직 명확하게 밝혀지지 않았다. 본 연구에서는 인간 대장암 세포에서 Doxorubicin의 항암 활성에 내인성 산화질소가 미치는 영향을 확인하고자 하였다. HCT116 (p53-WT)과 HT29 (p53-MUT) 세포에서 Doxorubicin 처리에 의해 세포 생존율의 차이를 보였으며, NMA 병행처리는 Doxorubicin의 효과를 감소시켰음을 확인할 수 있었다. 추가 연구를 통해 HCT116과 HT29 세포에서 sub-G₁ 기의 세포 빈도와 DNA 단편화의 결과를 통해 내인성 산화질소가 Doxorubicin에 의한 apoptosis를 조절하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 인간 대장암 세포에서 내인성 산화질소와 IAP 발현, p53의 상태에 따른 조절이 Doxorubicin에 의해 유도된다는 것을 보여주며, 이러한 메커니즘은 대장암에서 화학요법의 효율을 향상시키기 위한 전략적인 표적으로 이용할 수 있을 것으로 생각된다.