

Induction of G1 Phase Cell Cycle Arrest and Apoptotic Cell Death by 5-Fluorouracil in Ewing's Sarcoma CHP-100 Cells

Sung Ok Kim¹ and Yung Hyun Choi^{2,3*}

¹Department of Food Science & Biotechnology, College of Engineering, Kyungsoo University, Busan 608-736, Korea

²Department of Biochemistry, Dongguk University College of Korean Medicine, Busan 614-714, Korea

³Anti-Aging Research Center & Blue-Bio Industry RIC, Dongguk University, Busan 614-714, Korea

Received February 10, 2016 / Revised June 23, 2016 / Accepted June 27, 2016

5-fluorouracil (5-FU), a pyrimidine analog, is a widely used anticancer drug, which works through irreversible inhibition of thymidylate synthase. In the present study, it was investigated the anti-proliferative effects and molecular mechanisms of 5-FU using Ewing's Sarcoma CHP-100 Cells. The present data indicated that treatment of 5-FU to CHP-100 cells induced a G1 phase arrest of the cell cycle in a time-dependent manner. 5-FU-induced G1 arrest was correlated with the accumulation of the hypophosphorylated form of the retinoblastoma protein (pRB) and association of pRB with the transcription factors E2F-1 and E2F-4. Although 5-FU treatment did affect the levels of cyclin-dependent kinases, the levels of cyclin A and B were markedly down-regulated as compared with the untreated control group. In addition, 5-FU-induced G1 arrest of CHP-100 cells was also associated with the induction of apoptosis, as determined by apoptotic cell morphologies, degradation of poly(ADP-ribose) polymerase and Annexin V staining. Furthermore, 5-FU induced the loss of mitochondrial membrane potential with up-regulated pro-apoptotic Bax expression, down-regulated anti-apoptotic Bcl-2 expression and cytochrome *c* release from mitochondria to cytosol. Collectively, the data suggest that 5-FU is effective in inducing cell growth reduction and apoptosis, in part, by reducing phosphorylation of pRB and activating mitochondrial dysfunction in CHP-100 cells.

Key words : 5-FU, apoptosis, Ewing's sarcoma, G1 arrest

서 론

육종(sarcoma, 肉腫)은 골수림프조직을 제외한 생체의 지지조직인 비상피조직에서 발생하는 악성종양을 총칭하는 것으로 골육종, 악성 섬유성 조직구종, 백혈병 등이 대표적인 예이다[8, 16]. 비록 위암, 간암, 췌암 등과 같은 상피성 악성종양에 비해 발병 빈도는 낮지만 유년층에서 많이 발병하며, 혈행성 전이를 일으키기 쉽고 일반적으로 예후는 좋지 않은 편이다[25, 33]. 그 중 1920년에 명명된 Ewing 육종(Ewing's sarcoma)은 미분화성 소원형 세포(undifferentiated small round cell)로 구성되는 악성종양으로 기원은 아직 분명하지 않으며, 20세 전에 높은 발생률을 보이지만 아시아 또는 흑인에서는 상대적으로 낮은 편이다[3, 23]. Ewing 육종은 인체 모든 뼈에서나 발생할 수 있지만, 사지에 가장 많이 나타나며 골수, 폐, 신장, 심장, 부신, 기타 연조직 등을 포함해 다른 곳으로 전이

될 수 있다[3, 30]. 특히 Ewing 육종이 항암제 및 방사선에 민감하기 때문에 수술보다 항암화학치료나 방사선 치료를 복합적으로 시행하는 것이 권고하고 있다. 항암화학치료는 수술로 암세포가 제거되었다고 해도 다른 곳으로 전이를 예방하기 위한 방법으로도 시행되며, 항암제로는 주로 vincristine, adriamycin, cyclophosphamide 등이 사용되고 있다[3, 4, 31].

항암치료를 위한 약물 개발에서 주요한 전략 중의 하나가 정상세포의 증식과 분열에는 영향을 주지 않으면서 암세포 선택적으로 증식 억제를 통한 체내에서 제거하는 방법이다. 따라서 암세포 선택적인 증식 억제와 apoptosis를 유도할 수 있는 약물의 발굴은 항암제 개발을 위한 절대적인 필수 요건으로 인식되고 있다[6, 10]. 가장 광범위하게 사용되는 항암제의 일종으로 uracil 유도체인 5-fluorouracil (5-FU, C₄H₃FN₂O₂)은 대사 길항 화학요법제의 일종으로 thymidylate synthase의 활성을 억제시켜 DNA 합성을 저해하거나, RNA의 uracil에 대체되어 RNA의 기능 장애를 유발한다[19]. 그 동안 많은 선행 연구에서 5-FU의 항암활성이 암세포의 세포주기 교란 및 apoptosis 유도를 통하여 이루어지고 있음이 보고되어 왔다[17, 18, 21, 22]. 그리고 비록 5-FU가 Ewing 육종의 치료를 위한 항암제로 일부 사용되고 있으나[14, 24], 5-FU에 의한 Ewing 육종의 증식억제 및 apoptosis 관련 기전 연구는 매우

*Corresponding author

Tel : +82-51-850-7413, Fax : +82-51-853-4036

E-mail : choiyh@deu.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.

미비한 실정이다. 본 연구에서는 5-FU의 항암작용에 대한 부가적인 자료를 얻기 위하여 Ewing 육종 CHP-100 세포의 증식에 미치는 영향을 평가하고 세포 증식 억제효과가 세포주기 교란 및 apoptosis 유도와의 연관성이 있는지를 조사하였다.

재료 및 방법

세포 배양 및 MTT assay

본 연구에 사용된 Ewing 육종 CHP-100 세포는 10% fetal bovine serum, penicillin 및 streptomycin 등이 혼합된 RPMI 1640 배지(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. 5-FU는 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 증류수에 적정 농도로 희석하여 사용하였다. 5-FU 처리에 의한 CHP-100 세포의 증식억제 정도를 확인하기 위하여 MTT assay를 이용하였다. 이를 위하여 CHP-100 세포에 50 µM의 5-FU를 적정시간 동안 처리한 후 배지를 제거하고 0.5 mg/ml 농도의 3-(4,5-dimethyl-2 thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 처리하고 37°C에서 3시간 동안 다시 반응시켰다. 반응이 끝난 다음 MTT 시약을 제거하고 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 이용하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 96 well plate에 200 µl씩 옮겨서 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포주기 분포도 분석

5-FU 처리에 따른 CHP-100 세포의 세포주기 분포도 변화의 정량적 분석을 위하여 준비된 세포를 모은 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 phosphate-buffered saline (PBS)를 이용하여 2~3회 정도 세척하였다. 이들 세포를 CycleTEST PLUS DNA REAGENT Kit (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 고정 및 염색을 하여 4°C, 암실에서 30분 동안 반응을 시켰다. 반응시킨 세포를 35-mm mesh를 이용하여 단일세포로 분리한 후 flow cytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson)를 적용시켜 형광반응에 따른 Cellular DNA content 및 histogram을 CellQuest software 및 Modifit LT (Becton Dickinson) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

단백질의 분리, immunoprecipitation 및 Western blot analysis

단백질 발현 변화 분석을 위해 25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM ethylenediaminetetra acetic acid, 1% nonidet P-40, 0.1 mM sodium orthovanadate, 2 µg/ml leupeptin 및 100 µg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride가 함유

된 lysis buffer를 이용하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질들의 농도를 측정 후, Western blot analysis를 위해 동량의 단백질들을 sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하여 분리하고 PVDF membrane (Schleicher & Schuell, Keene, NH, USA)으로 전이시켰다. 각각의 membrane에 적정 항체 및 enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Corp., Arlington Heights, IL, USA) 용액을 이용하여 단백질들의 발현 변화를 조사하였다. 아울러 retinoblastoma protein (pRB)와 E2Fs 단백질들과의 결합 여부 확인을 위한 immunoprecipitation을 위해서, 500 µg의 단백질을 4°C에서 E2F-1 및 E2F-4 항체와 면역 반응을 1시간 동안 시킨 다음, immunocomplex를 protein G/A-Sepharose beads (Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 이용하여 준비한 후, 이를 Western blot analysis에 사용하였다. 본 실험에 사용된 1차 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였으며, 2차 항체들은 Amersham Corp.에서 구입하였다.

DAPI 용액을 이용한 핵의 형태 변화 관찰

준비된 세포들을 PBS로 2회 수세 후 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2)에 희석된 2.0% paraformaldehyde 고정액(Sigma-Aldrich Chemical Co.)으로 1시간 세포들을 고정하였다. 고정 후, 세포들을 수회 수세한 후 0.05 M phosphate buffer (pH 7.2)에 2.5 µg/ml의 농도로 희석된 4,6-diamidino-2- phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich Chemical Co.) 용액으로 상온 암하에서 20분 염색하였다. 이를 다시 PBS로 수회 수세하여 건조시킨 후 형광현미경(fluorescence microscope, Carl Zeiss) 하에서 핵의 형태를 비교하였다.

Annexin V staining에 의한 apoptosis의 정량적 측정

5-FU 처리에 의한 apoptosis 유발 정도를 정량적으로 분석하기 위하여 준비된 세포들을 모은 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 이들 세포를 PBS를 이용하여 2~3회 정도 세척하고 annexin V binding buffer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 부유시킨 다음 annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) 및 propidium iodide (PI)를 처리하여 암실에서 20분 동안 반응을 시켰다. 반응이 끝난 후 flow cytometer에 적용시켜 apoptosis가 유발된 세포(V⁺/PI⁻)를 형광반응에 따라 분석하였다.

Mitochondrial membrane potential (MMP, Δψm)의 분석

5-FU 처리에 의한 CHP-100 세포의 MMP 값 변화 정도를 측정하기 위하여 준비된 세포들에 10 µM의 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide (JC-1, Sigma-Aldrich Co.) 용액을 처리하여 20분 동안 상온에서 반

응시켰다. 반응이 끝난 후 상층액을 제거하고 PBS를 첨가하여 세포를 부유시킨 다음 flow cytometer에 적용시켜 MMP의 변화를 측정하였다.

통계 처리

모든 실험결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였고 SigmaPlot (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA)을 이용하여 Student t-test를 이용하여 통계적 유의성을 얻었다.

결과 및 고찰

5-FU에 의한 CHP-100 세포의 G1 arrest 유발

5-FU가 Ewing 육종 CHP-100 세포의 증식에 미치는 영향을 분석하기 위하여 CHP-100 세포에 50 μM의 5-FU를 적정 시간 (0~72시간) 동안 처리한 후, MTT assay를 수행하였다. Fig. 1A에 나타난 바와 같이 CHP-100 세포에 5-FU의 처리 시간의 증가에 따라 CHP-100 세포의 증식이 유의적으로 억제되었다. 예를 들어 24시간 처리군에서 정상배지에서 배양된 CHP-100 세포에 비하여 약 62% 정도의 생존율을 나타내었는데, 이는 대장암세포 및 간암세포 등에서 관찰된 결과와 매우 유사하였

다[26, 27].

5-FU 처리에 따른 CHP-100 세포의 증식 억제가 세포주기 진행에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하기 위하여 50 μM의 5-FU가 처리된 배지에서 배양된 세포들을 대상으로 flow cytometry 분석을 실시한 결과는 Fig. 1B와 같다. 5-FU가 처리되지 않은 조건에서 배양된 CHP-100 세포의 전체 세포주기 분포도 중, sub-G1기를 제외한 나머지 세포 집단에서의 G1기에 해당되는 세포의 빈도는 약 58% 정도였지만, 5-FU 처리 시간의 증가에 따라 G1기에 속하는 세포의 빈도가 꾸준히 증가되어 48시간 및 72시간 처리군에서 약 83% 및 90%로 나타났으며, 상대적으로 S기 및 G2/M기에 해당되는 세포의 빈도는 감소되었다. 이러한 결과는 간암세포, 유방암세포, 자궁경부암세포, 대장암세포 등과 같은 대부분의 암세포에서 나타난 결과와 유사하여[1, 27, 29], 5-FU 처리에 의한 CHP-100 세포의 증식억제도 세포주기 G1 arrest와 연관이 있음을 의미함을 알 수 있었다.

CHP-100 세포의 pRB/E2Fs 경로에 미치는 5-FU의 영향

세포증식은 세포분열 각 단계를 조절하는 유전자 산물들의 발현 정도에 따라 조절되는 복잡한 과정이며, 그동안 진핵세포 주기 조절에 관여하는 많은 유전자들이 밝혀지고 그들 단백질의 특징 및 기능의 이해에 관하여 큰 진전이 있어 왔다. 그 중, retinoblastoma tumor suppressor 유전자의 산물인 pRB는 G1기에서 S기로의 전이에 관여하는 중요한 단백질로서, 비인산화(unphosphorylation)된 pRB는 S기의 개시에 필수적인 단백질들의 전사 활성을 촉진하는 전사활성 인자에 속하는 E2Fs family 단백질과 결합함으로써 그들의 활성을 억제하는 것으로 알려져 있다[2, 32]. 즉 정상적인 세포분열을 위해서는 G1 cyclin-dependent kinases (Cdks)에 의한 인산화(phosphorylation)로 pRB의 불활성화가 요구된다[5, 32]. 따라서 연구에서 5-FU의 처리에 의해 CHP-100 세포들이 G1기에서 증식이 억제되었기 때문에 pRB의 인산화에 미치는 5-FU의 영향을 조사하였다. Fig. 2A의 결과에서 알 수 있듯이 5-FU의 처리 시간의 경과에 따라 탈인산화된 pRB의 양이 증가하면서 상대적으로 인산화된 pRB의 발현 양은 감소되었지만, E2Fs family에 속하는 E2F-1 및 E2F-4의 발현에는 큰 변화가 없었다 (Fig. 2A). 이러한 pRB 단백질의 인산화에 따른 E2Fs family 단백질과의 결합 여부를 조사한 결과 5-FU 처리 시간의 경과에 따라 pRB와의 결합이 점차 증가하였음을 알 수 있었다(Fig. 2B). 따라서 5-FU 처리에 의한 pRB의 탈인산화로 E2Fs 단백질과의 결합이 증대되어 S기로의 진입에 필요한 유전자들의 전사활성 억제에 기여하였을 것으로 예상된다.

CHP-100 세포의 주요 세포주기 조절 단백질들의 발현에 미치는 5-FU의 영향

Cyclin 단백질군은 진핵세포 분열의 양성 조절인자로서 해

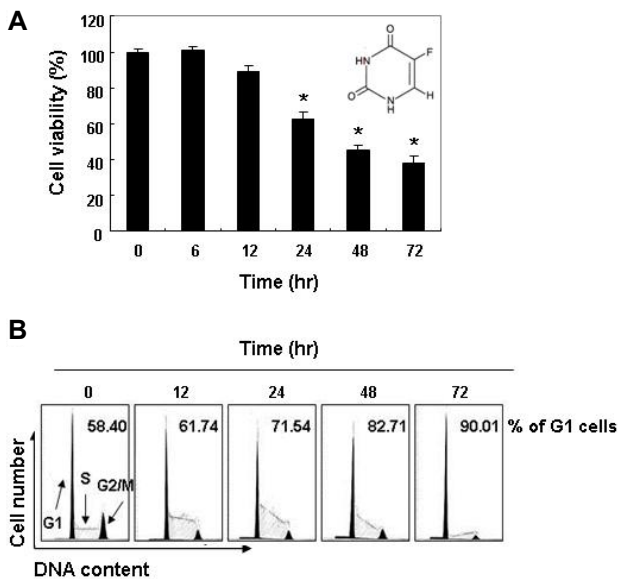


Fig. 1. Inhibition of cell viability and induction of G1 arrest of the cell cycle by 5-FU in CHP-100 Ewing's sarcoma cells. Cells were incubated in the presence of 50 μM 5-FU for the time indicated. (A) The growth inhibition was measured by the metabolic-bye-based MTT assay. The data shown are means ± SD of three independent experiments. Each point represents the mean ± SD of three independent experiments (* p<0.05 vs. untreated control). (B) The percentages of cells in G phase were calculated by a DNA flow cytometer. Data represent the means of two independent experiments.

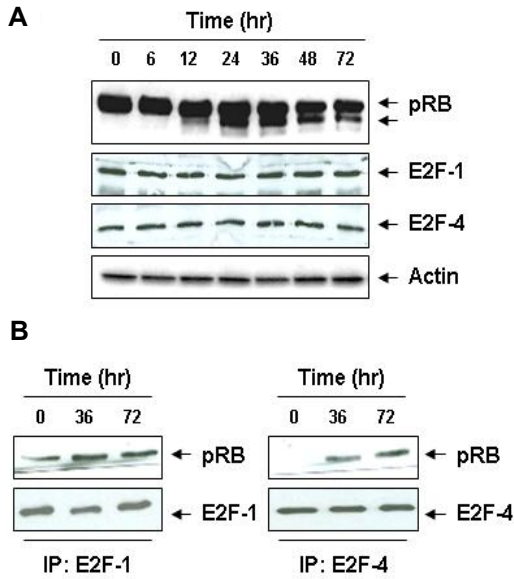


Fig. 2. Increased association of pRB with E2Fs by 5-FU in CHP-100 cells. (A) After treatment with 50 μ M 5-FU for the time indicated, cells were lysed and then equal amounts of cell lysates were separated on SDS-polyacrylamide gels and transferred to PVDF membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies and the proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control. (B) Total cell lysates (500 μ g) were prepared and immunoprecipitated with anti-E2F-1 or E2F-4 antibodies, separated on 8% SDS-polyacrylamide gels, and transferred onto PVDF membranes. Western blots were probed with anti-pRB, anti-E2F-1 and anti-E2F-4 antibodies and an ECL detection system (IP, immunoprecipitation).

당 cyclin-dependent kinase (Cdk)에 결합하여 그들의 kinase 활성을 증가시킨다. 특히 G1기 진행에 특징적으로 요구되는 cyclin이 D-type cyclins로서 cyclin D1, D2 및 D3이 알려져 있는데 이들은 Cdk2, Cdk4 및 Cdk6와 복합체를 형성함으로써 pRB의 인산화에 기여한다[2, 5]. 이로서 세포들은 S기로의 전이가 가능해지며, G1 후기에서 S기 초기로의 전이에는 cyclin E가 관여하는데 이는 Cdk2와 결합을 한다. 그리고 세포주기의 S기의 진행에 필요한 cyclin으로는 cyclin A이고, 이와 complex를 이루는 kinase는 Cdk2이며, G2기에서 M기로의 전이에는 cyclin B와 Cdc2 (Cdk1)가 필요한 것으로 알려져 있다 [20, 28]. 따라서 5-FU 처리에 따른 G1 arrest 현상과 연관된 cyclin 및 Cdk 단백질들의 발현 변화를 조사한 결과, 조사된 Cdk (Cdc2, Cdk2 및 Cdk4)의 발현은 큰 변화가 없었으나 (Fig. 3A), S기 진행 이후에 양성 조절인자로서 역할을 하는 cyclin A 및 cyclin B의 발현은 5-FU 처리 시간의 경과에 따라 점차 그 발현의 수준이 현저하게 감소하였다(Fig. 3B). 그리고 cyclin D2의 발현은 비교적 안정된 수준을 유지하였으나, cyclin D1의 발현은 5-FU 처리 24시간 전후에 가장 낮게 관찰되

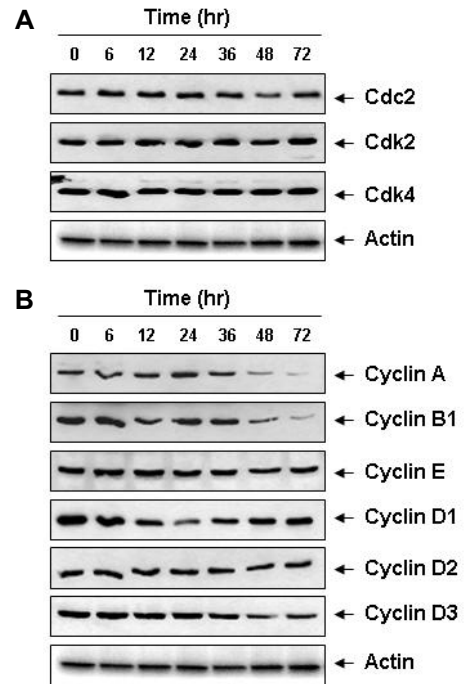


Fig. 3. Effects of 5-FU on the levels of cyclins and Cdks in CHP-100 cells. Cells were incubated in the presence of 50 μ M 5-FU for the time indicated, and then the cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to PVDF membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies, and the proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

었으며, cyclin D3의 경우 5-FU 처리에 따라 점차 감소되었다. 그러나 cyclin 및 Cdk 단백질들의 발현 감소 자체가 세포주기 진행을 전적으로 좌우하는 것은 아니기 때문에 각각의 Cdk들에 대한 직접적인 활성 억제 여부에 관한 후속 연구가 요구된다.

5-FU에 의한 CHP-100 세포의 apoptosis 유발

한편 생명체의 정상적인 생명유지와 발생과정에 필수적인 apoptosis는 병리학적인 요인에 의한 세포의 죽음인 necrosis에 비하여 다양한 세포내외 인자들에 의한 신호전달과정을 통한 능동적인 세포자멸 현상이다. 전형적인 apoptosis가 일어난 세포에서 볼 수 있는 가장 일반적인 변화는 형태학적으로 세포의 크기가 축소되며, 핵의 응집과 DNA의 단편화이다 [9, 10]. 다음은 5-FU 처리에 의한 CHP-100 세포의 증식억제가 apoptosis 유발과 직접적인 연관이 있는지를 확인하기 위하여 정상 및 5-FU가 처리된 배지에서 배양된 세포를 대상으로 핵산에 특이적으로 결합하는 형광물질인 DAPI 염색을 실시하였다. Fig. 4A에 나타난 결과에서 알 수 있듯이 정상 배지에서 자란 CHP-100 세포에서는 핵의 형태가 뚜렷하게 염색되었으나 5-FU가 처리된 세포의 경우는 처리 시간의 증가에 따라

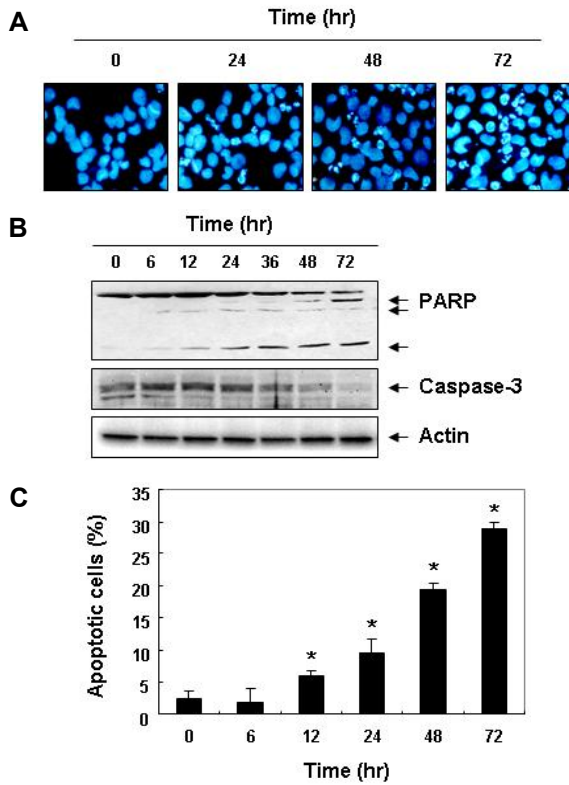


Fig. 4. Induction of apoptosis by 5-FU in CHP-100 cells. Cells were treated with 50 μ M 5-FU for the time indicated. (A) The cells were fixed and stained with DNA specific fluorescent dye DAPI solution. The stained nuclei were observed under a fluorescent microscope (Original magnification, 400 \times). (B) Total cell lysates were prepared and Western blot analysis was performed using antibodies to PARP and caspase-3, and an ECL detection system. Actin was used as an internal control. (C) To quantify the degree of apoptosis induced by 5-FU, cells were stained with FITC-conjugated Annexin V and PI for DNA flow cytometry analysis. Apoptotic cells are determined by counting the % of annexin V⁺/PI⁻ cells and the percent of annexin V⁺/PI⁺ cells. Results shown are expressed as the mean of three independent experiments (* $p < 0.05$ vs. untreated control).

apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 염색질 응축에 의한 apoptotic body의 형성이 점차 증가되어 DNA의 단편화가 초래되었음을 알 수 있었다. 아울러 caspase-3의 활성 증가에 따라 apoptosis가 일어났을 경우 관찰되는 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 단백질의 단편화 현상[11, 13]도 5-FU 처리에 따라 증가되었다(Fig. 4B). 비록 5-FU의 처리에 의하여 PARP가 단편화되었지만, 활성형 caspase-3의 발현 증가는 관찰할 수 없었다. 그러나 많은 경우 pro-caspase의 발현 감소는 active-caspase 형태로 cleavage가 일어난 것으로 추정되므로 5-FU에 의한 apoptosis 유도에는 caspase의 활성이 관여하는 것으로 생각된다. 또한 5-FU 처리에 따른 apopto-

sis 유발 정도를 annexin V 염색으로 통하여 확인한 결과, 5-FU 처리 시간의 증가에 따라 유의적으로 점차 증가되었음을 알 수 있었다(Fig. 4C). 따라서 본 연구의 결과는 5-FU 처리에 의한 CHP-100 세포의 G1 arrest 유발에 의한 증식억제가 apoptosis 유도과 연계되었음을 의미하는 것이며, caspase의 활성 증가가 관여하였을 가능성을 보여주는 것이다.

5-FU에 의한 CHP-100 세포 미토콘드리아 기능의 손상

미토콘드리아의 기능과 연관된 apoptosis 조절에 중요한 역할을 하는 Bcl-2 family에 속하는 단백질들에는 Bcl-2 및 Bcl-xL 등과 같은 apoptosis를 억제하는 anti-apoptotic 단백질과 Bax, Bak 및 Bad 등과 같은 apoptosis를 유발하는 pro-apoptotic 단백질로 구성되어 있으며, 그들은 dimer의 형태로 결합하여 균형을 이루고 있다[7, 12]. 그러나 apoptosis 유도 신호에 따라 이들 사이에 균형이 깨어지게 되면 미토콘드리아 내부로부터 세포질로 cytochrome c와 같은 apoptosis를 유발하는 단백질이 방출되어 caspase의 활성과 DNA의 단편화와 연관된 endonuclease와 같은 효소의 활성이 증가된다[7, 15]. 따라서 본 연구에서는 5-FU 처리에 의한 CHP-100 세포의 apoptosis 유발과 연관된 기전 해석을 위하여 Bcl-2 family에 속하는 Bcl-2 및 Bax의 발현 변화를 조사하였다. Fig. 5A에 나타난 결과에서 알 수 있듯이, 5-FU 처리 시간 의존적으로 Bcl-2의 발현이 다소 감소되었으며, pro-apoptotic 단백질인 Bax의 발현은 매우 증가되었다. 이러한 변화가 미토콘드리아의 기능 이상과 연관성이 있는지를 조사하기 위하여 MMP 값의 변화를 JC-1 염색을 통하여 분석한 결과, 5-FU 처리 시간 경과에 따라 미토콘드리아 기능 손상의 지표인 MMP 값의 손실이 매우 증가하였다(Fig. 5B). 이러한 미토콘드리아의 기능 손상은 cytochrome c의 세포질 유리와 밀접한 연관성이 있으므로 정상 및 5-FU가 처리된 배지에서 배양된 CHP-100 세포들의 세포질 및 미토콘드리아 단백질을 분리하여 cytochrome c의 발현 변화를 조사한 결과, 5-FU 처리에 따라 세포질 내 cytochrome c의 발현이 상대적으로 증가되었음을 확인하였다(Fig. 5C). 따라서 본 연구의 결과는 5-FU 처리에 따른 Bcl-2에 대한 Bax의 상대적인 발현 증가가 미토콘드리아 막의 교란을 유발하였으며, 이에 따라 apoptosis 유도에 핵심적인 역할을 하는 cytochrome c의 세포질로의 이동에 따라 CHP-100 세포가 apoptosis를 유도하였음을 의미한다.

이상의 결과에서 5-FU 처리에 따른 CHP-100 세포의 증식 억제는 G1 arrest와 연관성이 있으며, 5-FU 처리에 의한 G1 arrest는 pRB의 탈인산화에 따른 S기 진행 관련 유전자들의 발현 차단을 유발하였을 것으로 생각된다. 아울러 5-FU 처리에 의한 CHP-100 세포의 생존 저하는 apoptosis 유도에 따른 것이며, 여기에는 Bcl-2 family 단백질들의 발현 교란에 의한 미토콘드리아의 기능 소실과 연관성이 있음을 알 수 있었다. 본 연구의 결과는 중앙 증식 차단을 위하여 광범위하게 사용

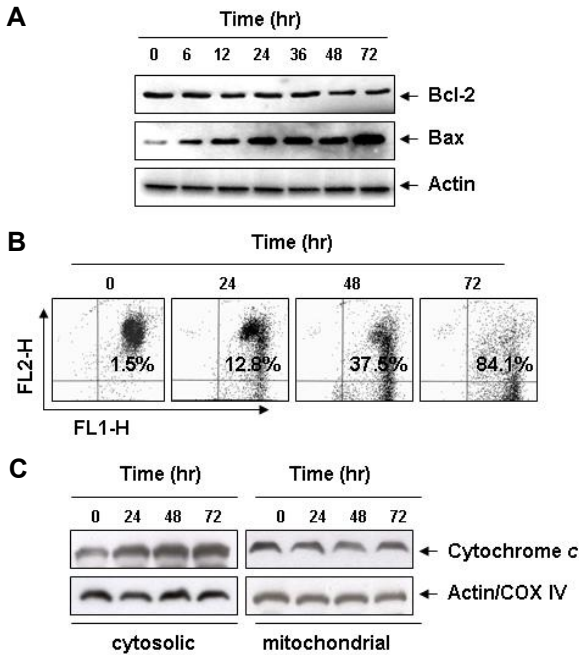


Fig. 5. Effects of 5-FU on the expression of Bcl-2 family proteins and cytochrome c, and values of MMP in CHP-100 cells. (A) Total cell lysates were prepared from cells treated with 50 μ M 5-FU for the time indicated and Western blot analysis was performed using antibodies to Bcl-2 and Bax, and ECL detection. Actin was used as an internal control. (B) The cells were stained with 10 μ M JC-1 for 20 min at 37°C. The mean JC-1 fluorescence intensity was then detected using a flow cytometer. Data represent the means of two independent experiments. (C) The cytosolic and mitochondrial proteins were extracted and Western blot analyses were performed using the indicated antibodies and an ECL detection system. Actin and cytochrome c oxidase subunit 4 (COX IV) were used as internal controls for the cytosolic and mitochondrial fractions, respectively.

되는 5-FU의 항암활성에 대한 추가적인 자료로서의 활용에 기여할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2016학년도 동의대학교 교내연구비에 의해 연구되었음(201601020001).

References

1. Adamsen, B. L., Kravik, K. L. and De Angelis, P. M. 2011. DNA damage signaling in response to 5-fluorouracil in three colorectal cancer cell lines with different mismatch repair and TP53 status. *Int. J. Oncol.* **39**, 673-682.
2. Ahlander, J. and Bosco, G. 2009. The RB/E2F pathway and regulation of RNA processing. *Biochem. Biophys. Res. Com-*

- mun.* **384**, 280-283.
3. Balamuth, N. J. and Womer, R. B. 2010. Ewing's sarcoma. *Lancet Oncol.* **11**, 184-192.
4. Bernstein, M., Kovar, H., Paulussen, M., Randall, R. L., Schuck, A., Teot, L. A. and Juergens, H. 2006. Ewing's sarcoma family of tumors: current management. *Oncologist* **11**, 503-519.
5. Dick, F. A. and Rubin, S. M. 2013. Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **14**, 297-306.
6. Dobashi, Y., Takehana, T. and Ooi, A. 2003. Perspectives on cancer therapy: cell cycle blockers and perturbators. *Curr. Med. Chem.* **10**, 2549-2558.
7. Donovan, M. and Cotter, T. G. 2004. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim. Biophys. Acta* **1644**, 133-147.
8. Frith, A. E., Hirbe, A. C. and Van Tine, B. A. 2003. Novel pathways and molecular targets for the treatment of sarcoma. *Curr. Oncol. Rep.* **15**, 378-385.
9. Han, S. I., Kim, Y. S. and Kim, T. H. 2008. Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions. *BMB Rep.* **41**, 1-10.
10. Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y. and Sakuragi, N. 2014. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed. Res. Int.* **2014**, 150845.
11. Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. E. and Poirier, G. G. 1993. Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* **53**, 3976-3985.
12. Kroemer, G. 1997. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat. Med.* **3**, 614-620.
13. Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Poirier, G. G. and Earnshaw, W. C. 1994. Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **371**, 346-347.
14. Lee, S. G., Choi, J. R., Kim, J. S., Park, T. S., Lee, K. A. and Song, J. 2009. Therapy-related acute lymphoblastic leukemia with t(9;22)(q34;q11.2): a case study and review of the literature. *Cancer Genet. Cytogenet.* **191**, 51-54.
15. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S. and Wang, X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479-489.
16. Lim, J., Poulin, N. M. and Nielsen, T. O. 2015. New strategies in sarcoma: Linking genomic and immunotherapy approaches to molecular subtype. *Clin. Cancer Res.* **21**, 4753-4759.
17. Liu, H. C., Chen, G. G., Vlantis, A. C., Leung, B. C., Tong, M. C. and van Hasselt, C. A. 2006. 5-fluorouracil mediates apoptosis and G1/S arrest in laryngeal squamous cell carcinoma via a p53-independent pathway. *Cancer J.* **12**, 482-493.
18. Liu, H. C., Chen, G. G., Vlantis, A. C., Tong, M. C., Chan, P. K. and van Hasselt, C. A. 2008. Induction of cell cycle arrest and apoptosis by 5-fluorouracil in laryngeal cancer cells containing HPV16 E6 and E7 oncoproteins. *Clin. Biochem.* **41**, 1117-1125.

19. Longley, D. B., Harkin, D. P. and Johnson, P. G. 2003. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 330-338.
20. Macaluso, M., Montanari, M., Cinti, C. and Giordano, A. 2005. Modulation of cell cycle components by epigenetic and genetic events. *Semin. Oncol.* **32**, 452-457.
21. McGinn, C. J., Pestalozzi, B. C., Drake, J. C., Glennon, M. C., Kunugi, K., Otterson, G., Allegra, C. J., Johnston, P. G. and Kinsella, T. J. 2000. Cell cycle regulation of the G0/G1 transition in 5-fluorouracil-sensitive and -resistant human colon cancer cell lines. *Cancer J.* **6**, 234-242.
22. Nagano, H. 2010. Treatment of advanced hepatocellular carcinoma: intraarterial infusion chemotherapy combined with interferon. *Oncology* **78**, S142-147.
23. Paulussen, M., Fröhlich, B. and Jürgens, H. 2001. Ewing tumour: incidence, prognosis and treatment options. *Paediatr. Drugs* **3**, 899-913.
24. Pratt, C. B., Meyer, W. H., Howlett, N., Douglass, E. C., Bowman, L. C., Poe, D., Mounce, K., Kun, L. E. and Houghton, J. A. 1994. Phase II study of 5-fluorouracil/leucovorin for pediatric patients with malignant solid tumors. *Cancer* **74**, 2593-2598.
25. Ramia, J. M., De la Plaza, R., Garcia, I., Perna, C., Veguillas, P. and García-Parreño, J. 2012. Liver metastasis of endometrial stromal sarcoma. *World J. Hepatol.* **4**, 415-418.
26. Runtuwene, J., Amitani, H., Amitani, M., Asakawa, A., Cheng, K. C. and Inui, A. 2015. Hydrogen-water enhances 5-fluorouracil-induced inhibition of colon cancer. *PeerJ* **3**, e859.
27. Saleh, E. M., El-Awady, R. A. and Anis, N. 2013. Predictive markers for the response to 5-fluorouracil therapy in cancer cells: Constant-field gel electrophoresis as a tool for prediction of response to 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Oncol. Lett.* **5**, 321-327.
28. Santamaria, D. and Ortega, S. 2006. Cyclins and CDKS in development and cancer: lessons from genetically modified mice. *Front. Biosci.* **11**, 1164-1188.
29. Sasaki, K., Tsuno, N. H., Sunami, E., Tsurita, G., Kawai, K., Okaji, Y., Nishikawa, T., Shuno, Y., Hongo, K., Hiyoshi, M., Kaneko, M., Kitayama, J., Takahashi, K. and Nagawa, H. 2010. Chloroquine potentiates the anti-cancer effect of 5-fluorouracil on colon cancer cells. *BMC Cancer* **10**, 370.
30. Shweikeh, F., Bukavina, L., Saeed, K., Sarkis, R., Suneja, A., Sweiss, F. and Drazin, D. 2014. Brain metastasis in bone and soft tissue cancers: a review of incidence, interventions, and outcomes. *Sarcoma* **2014**, 475175.
31. Whelan, J., Khan, A., Sharma, A., Rothermundt, C., Dileo, P., Michelagnoli, M., Seddon, B. and Strausss, S. 2012. Interval compressed vincristine, doxorubicin, cyclophosphamide alternating with ifosfamide, etoposide in patients with advanced Ewing's and other small round cell sarcomas. *Clin. Sarcoma Res.* **2**, 12.
32. Wong, J. V., Dong, P., Nevins, J. R., Mathey-Prevot, B. and You, L. 2011. Network calisthenics: control of E2F dynamics in cell cycle entry. *Cell Cycle* **10**, 3086-3094.
33. Yang, J., Du, X., Wang, G., Sun, Y., Chen, K., Zhu, X., Lazar, A. J., Hunt, K. K., Pollock, R. E. and Zhang, W. 2014. Mesenchymal to epithelial transition in sarcomas. *Eur. J. Cancer* **50**, 593-601.

초록 : CHP-100 Ewing's 육종세포에서 5-fluorouracil에 의한 G1 arrest 유도 및 apoptosis 유발에 관한 연구

김성욱¹ · 최영현^{2,3*}

(¹경성대학교 공과대학 식품응용공학부, ²동의대학교 한의과대학 생화학교실, ³동의대학교 항노화연구소)

Pyrimidine 유도체의 일종인 5-fluorouracil (5-FU)은 광범위하게 사용되는 항암제의 일종으로, thymidylate synthase의 활성을 억제시켜 핵산의 합성 및 대사기능 장애 유발 물질이다. 본 연구에서는 Ewing's 육종 CHP-100 세포에서 5-FU의 증식억제와 연관된 기전 해석으로 시도하였다. 본 연구의 결과에 의하면, 5-FU 처리 시간의 경과에 따른 CHP-100 세포의 증식억제가 세포주기 G1 arrest 유발에 따른 것임을 알 수 있었다. 5-FU에 의한 CHP-100 세포의 G1 arrest는 retinoblastoma protein (pRB)의 탈인산화에 따른 전사인자 E2F-1 및 E2F-4와의 결합 촉진과 연관성이 있었다. 비록 5-FU 처리가 cyclin-dependent kinases의 발현에는 크게 영향을 주지 않았으나, 정상배지에서 배양된 대조군에 비하여 cyclin A 및 B의 발현이 5-FU 처리 시간 의존적으로 억제되었다. 또한 5-FU에 의한 CHP-100 세포의 G1 arrest는 apoptosis 유도와 연관이 있음을 핵 내 염색질의 응축에 따른 apoptotic body의 형성 증가, poly (ADP-ribose) polymerase의 단편화 및 annexin V 염색 등을 통하여 확인하였다. 아울러 5-FU는 pro-apoptotic Bax 단백질의 발현 증가 및 anti-apoptotic Bcl-2의 발현 감소를 통한 mitochondrial membrane potential의 소실을 촉진시켰으며, 이로 인하여 미토콘드리아에서 세포질로의 cytochrome c 유리가 증가시켰음을 알 수 있었다. 따라서 본 연구의 결과는 5-FU에 의한 CHP-100 세포의 증식억제와 연관된 G1 arrest 및 apoptosis 유도에는 pRB의 인산화 억제 및 미토콘드리아 기능의 손상이 최소한 관여하고 있음을 의미하는 것이다.