

Radio-sensitivity of Human Colorectal Cancer Cell is Regulated by Potassium Cyanate

Eun Ju Yang, Jeong Hyun Chang*

Department of Clinical Laboratory Science, Daegu Haany University

Received: January 29, 2019. Revised: February 25, 2019. Accepted: February 28, 2019

ABSTRACT

Potassium cyanate (KCN) is an inorganic reagent and can induce the post-translation carbamylation of proteins. The carbamylated reaction in the body is involved in cell death in various diseases. According the results in our previous study, KCN enhances the radiosensitivity of human colorectal cancer cell line, HCT 116 cells. However, it was not enough to confirm the mechanism that KCN works in these cells. To determined the mechanisms of KCN in the cells with increased radiosensitivity, HCT 116 cells were treated KCN with low-dose gamma-radiation. And then, we examined alteration of the cell cycle, cell proliferation, cytokine level and the activation of cell signaling protein. As a result, cell cycle arrest and cell death were induced by the activation of caspase-3 and PARP in the irradiated cells with KCN treatment. These changes of the irradiated cell with KCN treatment were induced by the release of TNF- α via NF- κ B activation. In conclusions, enhanced radio-sensitivity mediated by KCN induced cell death and it occurs by NF- κ B-dependent TNF- α production.

Key Words: Potassium cyanate, colorectal cancer cell, radiation therapy

I. INTRODUCTION

Potassium cyanate (KCN)는 무기 화합물이며 이를 구성하고 있는 물질인 cyanic acid가 단백질 내의 펩타이드인 아미노산의 N-terminal과 비가역적으로 반응하여 단백질의 구조를 변화시키고 효소, 호르몬 등을 포함한 각종 물질의 활성을 변형시킨다.^[1-4] 이 과정은 번역 후 과정(post-translation)에서 발생하는 것으로 카바밀화(carbamylation)이라고 하는데 일부 논문에 따르면 다양한 심혈관계 질환에서 세포 사멸을 유도한다고 알려져 있다.^[5-6] 그래서 이를 이용하여 세포 사멸을 통해 치료하는 질환인 중앙 세포에 적용해보고자 한다. 특히 대장암 세포의 경우에는 다양한 암 중에서 사망률이 높은 편으로 그 발병률 또한 꾸준히 증가하고 있다.^[7] 대장암 환자의 치료는 대부분 수술과 방사선치료, 화학약물치료를 병행하고 있지만 방사선 및 약물독성으로 인

한 부작용도 많이 발생하는 실정이라 여전히 치료법 및 약제에 대한 개발이 필요하다.^[8]

항암치료 중 방사선치료는 대장암, 유방암, 폐암 등 다양한 암을 치료하는 효과적인 치료법으로 그 중요성이 증가하고 있다. 그 중 대장암, 직장암의 경우에는 초기 치료에 특히 중요한 과정으로 수술 전 종양의 크기를 줄이고 성공적인 수술 결과를 이끌어낸다.^[9] 그러나 대장암을 포함한 다양한 암을 구성하고 있는 세포 중 21~62%는 방사선에 저항성(radio-resistant)을 가지고 있다.^[10-12] 이렇게 방사선에 저항성을 가지고 있는 암세포의 효과적인 치료를 위해서는 화학치료제를 병행하여 방사선에 대한 세포의 감수성(radiosensitivity)을 높여 치료효과를 증가시킨다.

그래서 본 연구에서도 대장암세포의 방사선 감수성을 높일 수 있는 방안으로 KCN의 carbamylation 작용에 초점을 두어 그 효과 및 세포 내

* Corresponding Author: Jeong Hyun Chang E-mail: jhchang@dhu.ac.kr

Tel: +82-53-819-1350

작용기전을 구체적으로 파악하고자 한다. 특히 본 연구자들의 이전 논문에서 KCN이 HCT 116 세포에서 미토콘드리아 기능 저해, 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 생산 증가, 사이토카인 증가로 인해 세포자멸사 신호를 활성화 하여 세포죽음을 유도할 수 있음을 확인하였다.^[13-14] 또한 KCN 처리 후 저 선량의 광자선을 조사하여 HCT 116 세포의 방사선에 대한 감수성 증가를 일부 확인하였다.^[15]

고농도에서는 세포 및 체내 독성을 일으키는 KCN의 특성이 있어 본 연구에서는 더 낮은 농도의 KCN (2 mM)을 처리하기로 결정하였다. 본 연구팀은 이전 논문에서 KCN의 세포독성을 확인하기 위해 HCT 116 세포에 농도별로 처리한 다음 cell death를 관찰하였다.^[15] 그 결과 KCN 500 µg/mL (약 8 mM), 500 µg/mL (약 4 mM)에서 cell death가 유의하게 증가하였고 100 µg/mL (약 2 mM)에서는 아무런 변화가 관찰되지 않아 본 연구에서는 KCN이 세포에 cell death 자극을 주지 않은 채 다른 세포 내 자극을 유도해야 되기 때문에 2 mM의 농도를 선택하여 실험을 진행하였다. 그리고 이를 이용하여 인체에 부작용을 유발하지 않는 선에서 항암 효과를 유도할 수 있는지를 확인하고자 하였으며 KCN과 광자선 조사로 인한 세포죽음 뿐만 아니라 그와 관련된 세포내/외 기전을 확인하기 위해 cell cycle, cell death signal protein, cytokine 분비, 세포내 신호전달단백질의 변화를 관찰하여 명확하게 규명하고자 한다.

II. MATERIAL AND METHODS

1. 시약

Potassium cyanate (KCN) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)는 증류수(DW)에 녹여 10 mg/mL의 stock solution으로 제조하였다. DMEM 배지와 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)은 Life Technologies Inc. (Gaithersburg, MD, USA)의 것을 활용하였다.

Trypan blue 염색시약, Anti-PARP antibody, BAY-11-7082 (NF-κB inhibitor)는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)와 Propidium iodide

(PI)는 Fluka Chemie GmbH (Steinheim, Switzerland)의 것을 활용하였다. Caspase-GloR 3 assay kit는 Promega (Madison, WI, USA)에서, OptEIA Set human TNF-α는 BD biosciences (San Jose, CA, USA)에서 마련하였다.

2. 세포배양 및 KCN 처리

HCT-116 세포는 human colorectal cancer cell line으로 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입하였고, 10% FBS, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL)이 포함된 DMEM 배지에 부유시켜 37°C, 5% CO₂ 배양기에 배양하였다.

KCN 처리 시에는 HCT 116 세포를 배지에 새로 분주한 다음 12시간 배양한 후 2 mM의 농도로 처리하고 이후 12시간을 더 배양하였다.

3. 광자선 조사

세포의 사멸과 증식에 대한 광자선 조사는 선형 가속기(SIEMENS社의 SENSATION OPEN CT)를 이용한 조사를 실시하였다.

Linac을 이용하여 세포의 흡수선량을 각각 2 Gy의 흡수선량을 나타낼 수 있도록 조정하였으며 이 수치는 기존의 동일한 세포의 역치선량으로 알려져 있으며 이 선량을 기점으로 세포의 상태가 급변한다고 알려져 있기 때문이다.

광자선 조사 과정은 우선 90 mm 지름의 페트리 디쉬(petridish)에 HCT 116 세포를 분주한 후 10% FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지 10 mL에 부유시켰다. 이후 solid phantom위에 페트리디쉬를 올려 놓고 뚜껑을 연 다음 build up 1 cm를 고려하여 bolus 1 cm를 덮고 다음과 같은 조건으로 조사하였다. 광자선 조사는 SSD 100, 4MV (LET 1), Gantry 0°, Collimator 19 × 10, 의 조건으로 진행하였다.

세포의 관찰은 조사한 후 4R의 영향을 끝나는 시점을 충분히 고려하여 조사 후 24시간 뒤의 세포의 상태를 관찰하였다.

4. 세포주기정지 (cell cycle arrest) 검사

KCN 처리 및 광자선 조사 이후 세포를 70%

ethanol에 고정하고 50 µg/mL 농도의 PI 시약을 세포에 처리하여 세포내 DNA를 염색하였다. 이후 유세포분석기(FACScan flow cytometry, BD bioscience)로 각각의 세포 내 DNA 양을 측정하였다.

세포주기가 정상적으로 일어나면 DNA 합성기에서 DNA 양이 2배가 되고 세포주기가 정상적으로 일어나지 못하여 sub G0/G1 기에서 멈추게 되며 DNA 양이 감소한 채로 유지된다.

이를 측정하여 cell cycle arrest 정도를 확인하는데 이를 CellQuest software (BD bioscience)로 측정하였다.

5. Trypan blue 염색

세포 증식 및 세포죽음을 확인하기 위해 Trypan blue 염색을 실시하였다. Trypan blue는 세포부유액과 동량 희석하면 살아있는 세포에는 침투하지 못하고 죽은 세포에만 침투하여 세포생존/죽음 또는 세포 증식 여부를 확인할 수 있다. 세포생존율 계산법은 식(1)과 같다.

$$\text{세포생존율(\%)} = \frac{\text{염색이되지않은세포수}}{\text{전체세포수}} \times 100 \quad (1)$$

6. Caspase-3 activation 검사

Caspase-3 activation(활성도) 검사는 Caspase-GloR3 assay kit를 이용하여 효소흡착면역검사법(enzyme-linked immunosorbent assay)으로 검사하였다. 실험과정을 간단히 요약하면, 96 well plate에 측정하고자 하는 세포를 분주하고 배양 이후 100 µL의 caspase-3 Glo reagent를 첨가하여 실온에서 30 분간 방치한다. 만약 세포 내 caspase-3가 활성화되어 있다면 화학발광체(chemiluminescence)이 부착된 기질을 분해하여 발광현상이 일어나고 이를 luminometer (Tecan Infinite 200 Pro, Tecan, Switzerland)로 방법으로 실행한다.

7. Western blotting

세포 내 단백질을 검출하기 위해 실험에 사용한 세포를 세포용해액(10 mM HEPES, 10 mM NaCl,

0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1% NP-40, 0.5 mM PMSF, 0.1 mM DTT, 0.1 mM Na₃VO₄, protease inhibitor)으로 세포막을 용해시켜 단백질을 추출하였다.

세포단백추출물은 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에서 전기영동하여 nitrocellulose membrane으로 전기영동한 단백질 분획을 이동시켰다.

이후 membrane에 anti-PARP antibody와 반응시키고 기질과의 반응정도를 관찰하여 세포 내 PARP 활성 여부를 확인하였다. 각 샘플은 β-actin의 발현량을 기준으로 비교하였고 실험결과에 대한 통계학적 분석을 위해 단백질 발현정도를 Quantity One software (Bio-Rad Laboratory, Inc.)로 측정하여 정량화 하였다.

8. Cytokine 분비 측정

세포가 분비하는 cytokine (사이토카인) 중 세포자멸사와 관련 있는 TNF-α를 확인하기 위해 TNF-α ELISA kit를 이용하였다. 우선 각종 처리가 끝난 세포부유액을 새로운 시험관으로 옮겨 담아 원심분리를 하여 상층액을 분리하였다.

분리된 상층액에는 세포가 분비한 물질이 포함되어 있으므로 이를 이용하여 TNF-α를 측정하였다. 각각의 TNF-α 단백질의 농도는 표준물질을 통해 얻어진 표준곡선에 대입하여 계측하였다.

9. 통계 처리

실험으로 얻은 모든 결과는 mean ± SD 로 표현하였다. 그리고 각 실험 결과의 통계학적 유의성을 확인하기 위해 SPSS statistical software package (Version 10.0, Chicago, IL, USA)에서 Student's t-test를 실시하였다. p value가 0.05 이하이면 통계학적으로 유의하다고 판단하였다.

III. RESULT

1. KCN에 의해 방사선 감수성의 증가 확인

KCN의 방사선 감수성 증가 효과를 확인하기 위해 다른 암세포에 비해 방사선에 저항성이 다소 있

다고 알려진 대장암 세포를 이용하고자 사람 대장암세포주인 HCT 116 세포를 이용하였다.

Fig. 1은 colorectal carcinoma가 발견된 50대 남성 환자의 PET-CT (Positron Emission Tomography/Computed Tomography, 양전자 방출 컴퓨터 단층촬영기) 사진으로 대장직장암 진단 시 대표적인 영상의학 방법으로 사용한다. 대장직장암은 이 부분을 구성하고 있는 상피세포에서부터 암세포가 발생하는데 대장직장암세포에 대한 연구를 진행하기 위해서는 이와 유사한 세포주를 이용한다. 그 중에 대표적으로 HCT 116 세포가 있다. HCT 116 세포는 성인 남성의 대장직장 부위로부터 채취하여 변형을 통해 지속적인 증식이 가능하게 한 상피세포의 암세포 형태이다. 본 논문에서도 방사선에 저항성을 가지고 있는 대장직장암 세포의 변화를 관찰하고자 하였기 때문에 HCT 116 세포를 선택하여 실험을 진행하였다.



Fig. 1. PET-CT in Rectal Cancer.

KCN에 의한 세포의 방사선 감수성을 증가시키는 것이 목적이기 때문에 세포독성이 없는 KCN의 농도를 우선적으로 설정하고자 하였다. 하지만, 본 연구자들에 이전 연구 결과에서 KCN의 농도별 (0.1, 1, 2.5, 5 mM) 세포독성 결과를 확인해보았다.^[15]

Chang^[16]은 5 mM의 KCN을 처리하였고 이는 세포독성에 통계학적으로 유의한 차이가 없다고 판단되었지만 다소 세포가 사멸하는 경향을 보였다. 따라서 본 연구에서는 세포독성 여부를 완전히 배

제하기 위해 그 보다 낮은 농도인 2 mM을 선택하여 세포에 처리하였다. 그리고 방사선(광자선)을 이전 연구와 비교하여 보았을 때 좀 낮은 선량인 2 Gy로 조사하였다.^[16]

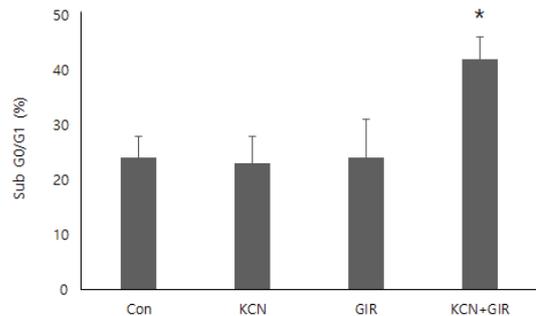


Fig. 2. Sub G0/G1 ratio of irradiated HCT 116 cell treated with KCN.

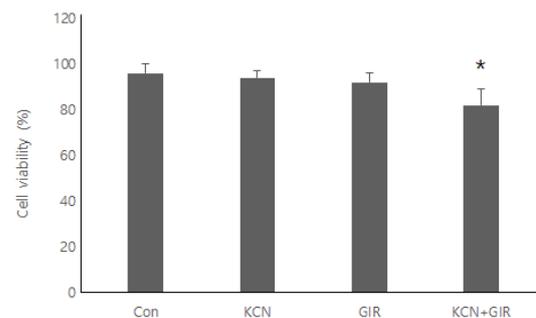


Fig. 3. Cell viability of irradiated HCT 116 cell treated with KCN.

그 결과 KCN과 광자선을 단독으로 낮게 처리한 세포군에서는 세포 주기에서 sub G0/G1기의 비율이 변화가 없었지만 KCN 처리 후 광자선을 조사한 세포에서는 Fig. 2.에서 통계적으로 유의하게 sub G0/G1기가 증가하였다. 이는 세포주기가 정상적으로 진행되는 것이 아니라 sub G0/G1기에서 멈춘 상태, 즉 cell cycle arrest 상태가 되어 세포 증식을 멈췄다는 것을 의미한다. 또한 Trypan blue 염색으로 살아있는 세포수를 측정된 결과 Fig. 2와 마찬가지로 Fig. 3.에서 KCN 처리 후 광자선을 조사한 세포에서 생존율이 감소하였다. 이는 KCN에 의해 HCT 116 세포의 방사선 감수성에 변화가 있음을 보여준다.

2. KCN에 의해 세포 죽음 신호 관련 변화 관찰

KCN이 HCT 116 세포에서 작용 메커니즘을 관찰하고자 광자선을 조사 후 세포사멸이 증가했는지 확인하기 위해 cell death와 연관된 세포신호전달 단백질인 caspase-3와 PARP의 발현 및 활성을 측정하였다. 그 결과 Fig 4와 Fig 5에서와 같이 KCN 처리 후 광자선을 조사한 세포에서 caspase-3와 PARP의 활성화가 증가함을 확인하였다.

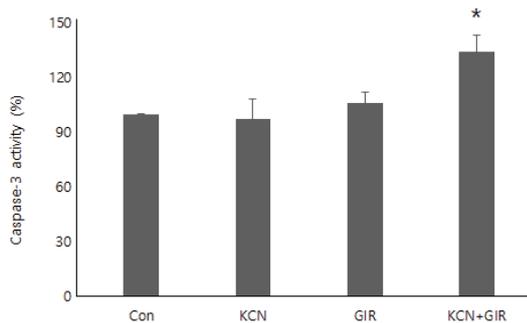


Fig. 4. Caspase-3 activity of irradiated HCT 116 cell treated with KCN.

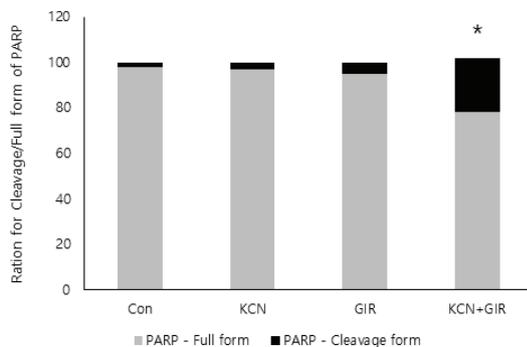


Fig. 5. PARP activity of irradiated HCT 116 cell treated with KCN.

3. KCN에 의해 세포 분비 물질 변화 관찰

저농도의 KCN이 HCT 116 세포의 방사선에 대한 감수성을 증가시켜 세포가 사멸이 되는 것을 Fig 2~5까지와 같이 확인 할 수 있다. 이러한 세포의 급격한 변화에는 세포내에서 분비되는 물질인 사이토카인이 작용하는 경우가 많다.

본 연구에서도 다양한 사이토카인 중 세포 염증 및 기능 저하에 관련되어있는 TNF- α 의 분비에

KCN 및 광자선이 작용하는 지 확인하였다. 그 결과 Table 1에서 다른 실험군에서는 변화가 감지되지 않은 한편 KCN 처리 후 광자선을 조사한 세포의 배양상층액에서 TNF- α 농도가 증가되어 있음을 관찰하였다.

Table 1. TNF- α level of irradiated HCT 116 cell treated with KCN

Group	Con	KCN	GIR	KCN+GIR
TNF- α (ng/mL)	1.9 \pm 0.1	2.3 \pm 0.2	2.1 \pm 0.3	3.0 \pm 0.6*

또한 KCN과 광자선이 TNF- α 발현을 자극할 때 세포내에서 어떠한 신호경로로 일어났는지 확인하기 위해 세포내 대표적인 염증유발 신호전달 단백질인 NF- κ B를 관찰하고자 하였다. 그래서 NF- κ B의 활성 억제제인 BAY-11-7082를 세포에 먼저 처리하여 NF- κ B 신호를 차단한 다음 KCN과 광자선을 처리하였다. 그 결과 Fig. 6에서 나타난 바와 같이 Table 1에서 증가한 TNF- α 의 발현이 BAY-11-7082에 의해 억제됨을 관찰하였다. 이는 KCN과 광자선에 의해 세포 내 NF- κ B가 활성화 되고 이후 TNF- α 발현이 자극받았음을 알 수 있다.

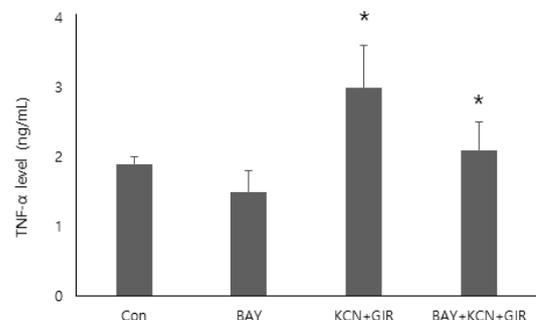


Fig. 6. Involvement of NF- κ B in the release of TNF- α .

IV. DISCUSSION

생체 내에서 cyanate는 요소(urea)로부터 분해되어 생산되는 물질로 사람의 혈장 내에 정상적으로 존재하고 이렇게 생산된 cyanate는 단백질의 구조나 활성을 변형시키는 카바밀화(carbamylation)를 유도한다.^{13,41} 그러나 과도한 양의 cyanate가 만성신장질환, 동맥경화증과 같은 질병에서 증가하고 증

가된 cyanate는 단백질의 carbamylation을 일으켜 세포자멸사를 유도하기도 한다.^[5,6] Cyanate는 정상 사람의 체내에 존재하며 인체에 악영향을 주지는 않지만 일정 농도 이상에서 carbamylation을 일으키는 성질을 이용하여 이전 연구에서 대장암 세포주의 세포자멸사 유도를 관찰하였다.^[13,14] Yang et al.^[13]에 따르면, KCN은 미토콘드리아에 자극을 주어 mitochondrial membrane potential (MMP)를 증가시키고 ROS를 발생시켜 세포 사멸에 이르게 한다고 보고되어 있다. 이 과정에서 미토콘드리아 활성화를 유도하는 주된 물질들이 세포에서 분비되고 이 물질을 사이토카인이라고 한다.^[17,18] 그 중 Yang et al.^[14]의 이전 연구에서 HCT 116 세포에서 KCN 처리에 의해 증가한 사이토카인으로 TNF- α 가 확인되었는데 TNF- α 는 pro-inflammatory cytokine으로 세포 내 Ca^{2+} 농도를 증가시키고 ROS 생산과 caspase cascade 활성화를 유도하여 최종적으로 세포자멸사를 유도한다.^[17] 이에 KCN의 단일 효과를 넘어서 항암치료의 기본인 방사선 치료와의 synergic effect를 확인하고자 본 연구에서는 방사선에 다소 저항성을 가지고 있는 대장암 세포주인 HCT 116 세포를 이용하였다. 방사선에 저항성을 보이는 암세포나 조직에서는 치료를 위해 다소 높은 선량의 방사선을 조사할 수밖에 없는데 이는 주변의 다른 정상 세포에게도 악영향을 미친다. 이를 방지하기 위해 화학요법과 방사선 치료를 병행하면 효과적으로 치료를 할 수 있다. Fig. 2와 Fig. 3은 각각 단독으로 저 농도의 KCN과 광자선을 처리한 세포에 비해 KCN을 미리 처리한 다음 저 선량의 광자선을 조사한 세포에서 세포 증식 주기가 정지하게 되고, 세포의 24시간 생존율이 감소함을 보여주었다. 그리고 Fig. 4와 Fig. 5에서 나타난 것처럼 이는 세포자멸사의 최종 과정인 caspase-3와 관련 신호단백질인 PARP 활성화에 의해 HCT 116 세포의 죽음이 유도되었음을 관찰하였다.

지금까지는 KCN과 광자선 조사에 의해 세포 내 변화를 확인하였다면 세포 외적으로 나타나는 변화가 있는지 확인하기 위해 세포가 분비하는 사이토카인을 확인하였고 위에서 언급한 바와 같이 본 논문에서도 KCN과 광자선을 각각 단독으로 처리한 세포에 비해 KCN을 처리한 다음 광자선을 조사

한 세포에서 통계적으로 유의하게 증가하였고 세포 내 신호전달과정을 통해 직접적으로 분비되었는지를 확인하기 위해 관련 신호전달 단백질인 NF- κ B inhibitor를 사용하였다. TNF- α 는 세포 표면의 수용체에 결합하여 세포내로 신호를 전달하게 되는 데 이때 IKK 활성화를 유도하여 I κ -B α 의 인산화를 일으키고 결국에는 NF- κ B를 자극하게 된다. 활성화된 NF- κ B는 DNA 전사 자극 인자로 작용하여 TNF- α 의 재생산을 증가시키고 세포의 생존과 죽음에 관여하게 된다.^[18] 본 연구에서도 Fig. 6에서처럼 KCN과 광자선 조사에 의해 HCT 116 세포가 분비하는 TNF- α 는 NF- κ B에 의해 분비됨을 확인하였고 이를 종합해본 결과 증가된 TNF- α 가 다시 세포를 자극하여 cell cycle arrest, caspase-3/PARP activation 과정을 거쳐 cell death를 유의하게 증가시키는데 관여한다고 해석할 수 있다.

V. CONCLUSION

생체 내에서 (2 mM)의 KCN을 세포에 투여하면 이후 저 선량의 광자선을 조사하더라도 사람 대장암세포주인 HCT 116 세포의 죽음을 유도할 수 있고 그 과정에서 KCN이 NF- κ B를 통한 TNF- α 을 생산하고 cell cycle arrest, PARP cleavage, caspase-3 activation 단계를 거치는 것을 확인하였다. 이러한 결과들을 토대로 KCN과 방사선과의 명확한 상관관계를 규명하기에는 부족하지만 KCN이 radio sensitizer로서 작용할 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다.

Reference

- [1] R. Fluckiger, W. Harmon, W. Meier, K. H. Gabbay, "Hemoglobin carbamylation in uremia," The New England journal of medicine, Vol. 304, No. 14, pp. 823-827, 1981.
- [2] L. M. Kraus, A. P. Jr. Kraus, "Carbamoylation of amino acids and proteins in uremia," Kidney International Supplement, Vol. 78, pp. S102-S107, 2001.
- [3] C. L. Kuckel, B. W. Lubit, P. K. Lambooy, P. N. Farnsworth, "Methylisocyanate and actin polymerization: The in vitro effects of

- carbamylation," *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1162, No. 1-2, pp. 143-148, 1993.
- [4] E. N. Inoue, I. Nagano, R. Ichinohasama, N. Asato, Y. Kondo, K. Iinuma, "Bimodal effects of platelet-derived growth factor on rat mesangial cell proliferation and death, and the role of lysophosphatidic acid in cell survival," *Clinical Science (London)*, Vol. 101, No. 1, pp. 11-19, 2001.
- [5] E. OK, A. G. Basnakian, E. O. Apostolov, Y. M. Barri, S. V. Shah, "Carbamylated low-density lipoprotein induces death of endothelial cells: A link to atherosclerosis in patients with kidney disease," *Kidney International*, Vol. 68, No. 1, pp. 173-178, 2005.
- [6] E. O. Apostolov, R. Debarti, W. M. Alovuia, M. V. Mikhailova, X. Wang, A. G. Basnakian, S. V. Shah, "Endonuclease G mediates endothelial cell death induced by carbamylated LDL," *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, Vol. 300, No. 6, pp. H1997-H2004, 2011.
- [7] P. G. Rychahou, J. Kang, P. Gulhati, H. Q. Doan, L. A. Chen, S. Y. Xiao, D. H. Chung, B. M. Evers, "Akt2 overexpression plays a critical role in the establishment of colorectal cancer metastasis," *Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A*, Vol. 105, No. 51, pp. 20315-20320, 2008.
- [8] T. L. Henriette, H. J. Guchelaar, H. Gelderblom, "Pharmacogenetics in chemotherapy of colorectal cancer," *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, Vol. 23, No. 2, pp. 257-273, 2009.
- [9] D. Blumberg, R. K. Ramanathan, "Treatment of colon and rectal cancer," *Journal of Clinical Gastroenterology*, Vol. 34, No. 1, pp. 15-26, 2002.
- [10] V. K. Mehta, J. Poen, J. Ford, P. S. Edelstein, M. Vierra, A. J. Bastidas, H. Young, G. Fisher, "Radiotherapy, concomitant protracted-venous-infusion 5-fluorouracil, and surgery for ultrasound-staged T3 to T4 rectal cancer," *Diseases of the Colon and Rectum*, Vol. 44, No. 1, pp. 52-58, 2001.
- [11] T. E. Read, E. K. M. McNevin, H. M. Gross, J. L. Lewis, G. Ratkin, J. Picus, E. H. Birnbaum, J. W. Fleshman, I. J. Kodner, R. J. Myerson, "Neoadjuvant therapy for adenocarcinoma of the rectum: tumor response and acute toxicity," *Diseases of the Colon and Rectum*, Vol. 44, No. 4, pp. 513-522, 2001.
- [12] H. Bouzourene, F. T. Bosman, M. Seelentag, M. Matter, P. Coucke, "Importance of tumor regression assessment in predicting the outcome in patients with locally advanced rectal carcinoma who are treated with preoperative radiotherapy," *Cancer*, Vol. 94, No. 4, pp. 1121-1130, 2002.
- [13] E. J. Yang, J. H. Chang, "Potassium cyanate induces apoptosis of human colorectal cancer cell via mitochondrial pathway," *Journal of Experimental & Biomedical Sciences*, Vol. 17, No. 3, pp. 177-184, 2011.
- [14] E. J. Yang, J. H. Chang, "TNF- α Regulates Potassium Cyanate-induced Apoptosis via NF- κ B Activation in HCT 116 Cells," *Biomedical Science Letters*, Vol. 20, No. 1, pp. 32-38, 2014.
- [15] E. J. Yang, J. H. Chang, "Potassium Cyanate Induces Apoptosis of Human Colorectal Cancer Cell via Mitochondrial Pathway," *Journal of Experimental & Biomedical Sciences*, Vol. 17, No. 3, pp. 177-184, 2011.
- [16] J. H. Chang, "The Effect of Potassium Cyanate (KCN) on Radiation Treatment of the Colorectal Cancer Cell Line, HCT 116," *Journal of Experimental & Biomedical Sciences*, Vol. 19, No. 2, pp. 98-104, 2013.
- [17] S. Busquets, X. Aranda, M. Ribas-Carbo, J. Azcon-Bieto, F. J. Lopez-Soriano, J. M. Argiles, "Tumor necrosis factor-alpha uncouples respiration in isolated rat mitochondria," *Cytokine*, Vol. 22, No. 1, pp. 1-4, 2003.
- [18] K. Schulze-Osthoff, A. C. Bakker, B. Vanhaesebroeck, R. Beyaert, W. A. Jacob, W. Fiers, "Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation," *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 267, No. 8, pp. 5317-5323, 2005.

Potassium cyanate에 의해 조절되는 사람 대장암 세포의 방사선 감수성 변화

양은주, 장정현*

대구한의대학교 임상병리학과

요약

Potassium cyanate는 무기화합물로 단백질의 번역 후 과정에서 카바밀화(carbamylation)을 유도할 수 있고 이러한 카바밀화 반응은 다양한 질병 및 조건에서 세포의 사멸과 관련이 있다. 이전 연구결과에서 KCN은 사람 대장암 세포주인 HCT 116세포의 방사선 감수성을 향상시키는 것을 확인하였지만 그 기전을 명확히 규명하기에는 많이 부족한 실정이다. 본 연구에서는 방사선에 다소 저항성을 가지는 대장암 세포에서 KCN이 방사선 감수성을 향상시키고 세포사멸 시키는 기전을 확인하기 위해 2 mM의 KCN 처리 후 저 선량의 광자선을 조사하여 세포주기, 세포 생존율, 세포 사멸 관련 단백질(caspase-1, PARP) 발현량, TNF- α 분비 및 TNF- α 관련 전사인자(NF- κ B)의 연관성을 확인하였다. 그 결과 KCN 처리 후 광자선을 조사한 세포에서 caspase-3 및 PARP의 활성이 증가하고 이는 세포주기의 정지와 세포사멸을 유도하였다. 또한 이 과정에서 DNA 전사인자인 NF- κ B에 의해 세포 외로 TNF- α 를 지속적으로 분비하여 세포사멸에 관여함을 확인하였다. 이러한 결과들을 토대로 KCN이 radiosensitizer로서 작용할 수 있는 가능성이 있다고 사료된다.

중심단어: Potassium cyanate, 대장암 세포, 방사선 치료

연구자 정보 이력

	성명	소속	직위
(제1저자)	양은주	대구한의대학교 임상병리학과	교수
(교신저자)	장정현	대구한의대학교 임상병리학과	교수