

구강 편평세포암종 세포주에서 Cyclosporin A와 Taxol 투여시 PI-3 kinase/Akt1 Pathway에 의한 세포사멸 병용효과

김규영 · 이재훈

단국대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2007;33:426-436)

APOPTOTIC EFFECT IN COMBINATION OF CYCLOSPORIN A AND TAXOL ON ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA CELL LINE THROUGH THE PI-3 KINASE/AKT1 PATHWAY

Kyu-Young Kim, Jae-Hoon Lee

Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Dankook University

Oral cancer take up 2-6% of all carcinomas and squamous cell carcinoma, which is the most common type in oral cancer, has a poor prognosis due to its high metastasis and recurrence rates.

In treating oral cancer, chemotherapy to the primary, metastasized and recurrent lesion is a very important and useful treatment, even though its widespread usage is limited due to high general toxicity and local toxicity to other organs.

Taxol, a microtubule stabilizing agent, is an anticancer drug that induces cell apoptosis by inhibiting depolymerization of microtubules in between the metaphase and anaphase of the cell mitosis. Recently, its effectiveness and mechanism on various tumor has been reported. However, not much research has been done on the application of Taxol to oral squamous cell carcinoma.

Cyclosporin A, which is an immunosuppressant, is being used on cancers and when co-administered with Taxol, effectiveness of Taxol is enhanced by inhibition of Taxol induced multidrug resistance.

In this study, Cyclosporin A with different concentration of Taxol was co-administered to HN22, the oral squamous cell carcinomacell line. To observe the cell apoptosis and the mechanisms that take part in this process, mortality evaluation of tumor cell using wortmannin, c-DNA microarray, RT-PCR analysis, cytometry analysis and western blotting were used, and based upon the observation on the effect and mechanism of the agent, the following results were obtained:

1. The HN22 cell line viability was lowest when 100 μ M of Wortmannin and 5 μ g/ml of Taxol were co-administered, showing that Taxol participates in P13K-AKT1 pathway.
2. In c-DNA microarray, where 1 μ g/ml of cyclosporine A and 3mg/ml of Taxol were co-administered, no up regulation of AKT1, PTEN and BAD c-DNA that participate in cell apoptosis was observed.
3. When 1 μ g/ml of Cyclosporin A was applied alone to HN22 cell line, no difference was found in AKT1, PTEN and BAD mRNA expression.
4. Increased AKT1, mRNA expression was observed when 3 μ g/ml of Taxol was applied alone to HN22 cell line.
5. When 1 μ g/ml of Cyclosporin A and Taxol (3 μ g/ml and 5 μ g/ml) were co-administered to HN22 cell line, PTEN mRNA expression increased, whereas AKT1 and BAD mRNA decreased.
6. As a result of cytometry analysis, in the group of Cyclosporin A(1 μ g/ml) and Taxol(3 μ g/ml) co-administration, increased Annexin V was observed, which shows that apoptosis occurred by deformation of plasma membrane. However, no significant difference was observed with varying concentration.
7. In western blot analysis, no caspase 3 was observed in the group of Cyclosporin A(1 μ g/ml) and Taxol(3 μ g/ml) co-administration.

From the results of this study, it can be concluded that synergistic effect can be observed in combination therapy of Taxol and Cyclosporin A on oral squamous cell carcinoma cell line, where decreased activity of the cell line was observed. This resulted in decreased AKT1 and BAD mRNA and increased PTEN mRNA expression and when wortmannin and Taxol were co-administered, the viability decreased which confirms that Taxol decreases the viability of tumor cell line. Hence, when Taxol and cyclosporine A are co-administered, it can be assumed that cell apoptosis occurs through Akt1 pathway.

Key words: Cyclosporin A, Taxol, PI-3 Kinase/Akt1, cDNA microarray

이재훈

330-714 충남 천안시 안서동29

단국대학교 치과대학 부속병원 구강외과

Jae-Hoon Lee

Dept. of OMFS, College of Dentistry, Dankook University

29 Anseodong, Choeran, Chungnam, 330-714, Korea

Tel: 82-41-550-1991~3 Fax: 82-41-551-8988

E-mail: lee201@dankook.ac.kr

I. 서론

구강암은 전체 암중 2-5% 정도의 발생 빈도를 보이며, 두경부의 암중 후두암 다음으로 호발하는 암이다¹⁾. 구강암 중에는 편평세포암종이 가장 호발하며 편평세포암종은 전이 및 재발률이 높아 예후가 몹시 불량하다²⁾. 구강암의 치료법중 하나로

사용되는 항암화학요법은 수술요법, 방사선요법의 전후 또는 동시에 사용되며, 원발 병소뿐만 아니라 전이되거나 재발되는 병소에 대한 예방이나 치료에 매우 중요한 방법이다.

미세소관형성억제형 항암화학요법제인 Taxol은 미세소관형성억제형 항암화학요법제(Microtubule stabilizing agent) 중 초기부터 사용이 확립된 약제로 폐암, 유방암, 난소암, 식도암과 같은 고형 암의 치료에 사용되고 있다. Taxol의 주된 치료 기전은 종양세포에서 미세소관을 안정화시키는 것으로 Taxol이 세포주기 중 일정 단계에 관여하여 세포사멸을 유도 한다^{3,8)}.

Taxol에 의한 세포사멸(Apoptosis)은 lymphoid cell의 G₂/M 단계에서 Bcl-2의 인산화를 유도하여 일어나고⁹⁾, ovarian cell에서는 JNK 활성화로 G₂/M 세포 주기가 차단되어 발생된다고 하였다¹⁰⁾. Leukemia HL-60 세포주에 Taxol을 적용한 경우, Caspase 9, 3의 활성화로 세포사멸이 유도하였으며¹¹⁾, CCRF-HSB-2 세포주에서는 Caspase 10의 활성화에 의해 Caspase 3과 6이 활성화되고 Bcl-2가 분해되어 세포사멸을 유발하였다¹²⁾. 이와 같은 미세소관형성억제형 항암화학요법제는 tubulin의 β -subunit과 결합하여 미세소관의 성장과 분해에 관여하는 것이다. 미세소관 작동에 대한 억제는 mitotic spindle의 파괴와 세포주기를 metaphase와 anaphase에서 멈추게 함으로써 결과적으로 세포사멸을 일으킨다^{13,14)}.

Cyclosporin A는 T림파구의 활성화와 cytotoxic T세포의 활성을 억제하는 면역억제제이며, 여러 세포에서 세포사멸 경로의 전환을 유도하여 세포사멸에도 관여하는 것으로 알려져 있다¹⁵⁻²¹⁾. 최근의 구강 편평세포암종 세포주에 Cyclosporin A를 단독 투여한 시험관 내 실험 연구에서는 Cyclosporin A의 농도를 증가시킴에 따라 Caspase 9의 증가와 Bcl 2, VDAC2의 감소를 나타냈고 이에 따라 세포사멸 효과가 나타났다고 하였다²²⁾. 또한 항암화학치료 중 Taxol과의 병용 시 나타나는 세포사멸 효과 및 항암효과의 상승작용들이 보고 되면서 다양한 암에서 병용효과에 대한 연구가 진행되고 있다²³⁻²⁷⁾. 여러 암에 Taxol 투여 시 나타나는 taxol induced drug resistance는 Cyclosporin A를 병용함으로써 저항성이 변화되고 항암효과도 증가되었다고 보고 되고 있다²⁸⁾.

Taxol 투여 시 나타나는 Taxol에 대한 내성에는 Akt1이 관여하는 것으로 알려져 있다^{29,30)}. PI3K/Akt pathway는 세포 생존에 관여하는 결정적인 인자로서 암 유발조절인자이기도 하며, 항암화학요법제에 대한 저항성을 나타내는 인자이다³¹⁻³⁷⁾. 반면, 종양억제 유전자로 알려진 PTEN은 세포가 과 성장, 과 분열되지 않도록 적절히 조절을 함으로써 세포주기를 조절하여 종양을 억제하는 역할을 담당한다. PTEN은 종양유도 PI3-K/Akt 신호 전달체계(signaling pathway)를 비활성화 시켜 암 발생 억제 작용을 하며, 반대로 인간의 여러 고형암에서는 PTEN의 기능 상실이 확인되고 있어 항암치료 확인 시 PTEN의 중요성을 보여 주고 있다³⁸⁻⁴⁰⁾. Bcl-2의 길항자(antagonist)로 알려진 BAD는 세포사멸 촉발인자이며 세포의 세포사멸을 조절하며, 세포사멸 억제물질의 활동을 전환시킨다. PI3K/Akt1 pathway의 하위 target 인 BAD는 난소암에서 Taxol 약물내성을 부분적으로 억제시키

며. 또한 BAD의 과발현으로 Taxol에 대한 감수성을 증가시켰다고 하였다⁴¹⁾.

이와 같이 Taxol과 Cyclosporin A의 병용효과에 대해 여러 고형암에서 연구되어 항암약물요법의 새로운 장으로 제시되고 있으나 구강 편평세포암종에서의 효과와 기전에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 이에 본 연구는 구강 편평세포암종 세포주(HN22)에 Taxol과 Cyclosporin A를 단독 및 병용 투여하고, PI3K 억제제인 Wortmannin을 사용한 종양세포의 생존률평가, c-DNA microarray, RT-PCR분석, Western blotting 및 유세포분석법 등을 이용하여 Taxol 및 Cyclosporin A와 연관된 세포사멸 과정에서 PI3K/Akt1 pathway, PTEN, BAD 및 Caspase 3 등을 관찰하여 구강내 편평세포암종에 대한 치료제로서의 Taxol의 가능성과 작용 시 나타나는 기전을 관찰하고자 하였다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 구강 편평세포암종 세포주 배양

구강 편평세포암종 세포주로는 HN22(Main state university, USA)를 사용하였으며, HN22 종양세포 2×10⁶개를 100mm dish에 각 3개씩 분주하여 10% FBS(fetal bovine serum)를 포함하는 DMEM(Hyclone, USA)에 배양하였고, 조건은 95% 습기가 있는 CO₂배양기를 사용하였다.

2. Cyclosporin A의 농도조절 및 약제투여

Cyclosporin[®](종근당)을 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹이고 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco, USA)으로 희석시켜 Stock solution으로 1 μ g/ml을 만들었다. 본 연구에 사용한 Cyclosporin A 농도는 1 μ g/ml로 각각 조절하였다. 대조군으로는 Cyclosporin A가 포함되지 않은 배양액에 구강 편평세포암종 세포주를 배양하였으며, 실험군으로는 투여된 약제에 따라 4군으로 분류하였다. 실험군은 1 μ g/ml Cyclosporin A 단독, 3 μ g/ml Taxol[®](한국BMS제약) 단독, 1 μ g/ml Cyclosporin A에 3 μ g/ml Taxol 동시투여, 그리고 1 μ g/ml Cyclosporin A에 5 μ g/ml Taxol 동시투여로 구분하여 배양된 세포주에 넣고 역상차 현미경으로 관찰하였다.

3. Wortmannin과 Taxol을 이용한 구강 편평세포암종 세포주(HN22)의 종양세포 생존력 분석

96 well을 사용하였으며 well당 2×10⁴개의 세포를 3 well에 분주하고 37°C의 CO₂배양기에서 24시간 배양하였다. Wortmannin 100 μ M과 3 μ g/ml 및 5 μ g/ml 농도의 Taxol을 넣고 72시간을 배양 후 MTT(5-diphenyl dimethyl-tetrazolium bromide)용액 50 μ l를 각각의 well에 첨가하고 다시 34시간 동안 37°C 54% CO₂ 배양기에서 배양한 후 상층액을 제거하여 MTT에 의해 형성된 결정만 남겼다. 그 다음 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 0.2ml씩 각각의

well에 분주하여 잘 혼합하였고 microplate reader로 파장 550nm에서 형광도를 측정하였다.

4. cDNA Microarray 분석

추출된 RNA를 이용하여 Target DNA probes의 합성과 hybridization과정은 다음과 같이 시행하였다⁵⁹⁾. 역전사반응을 위한 반응 혼합물은 다음과 같다. 400 unit의 역전사효소(super-script II TM, Invitrogen) 2mg의 oligo-DT(Amersham biosciences. UK) 1 nM dATP, dCTP, dGTP, 0.6nM dTTP 그리고 0.1mM cy3-또는 cy5-dUTP(NEN Life Science Products, Boston, USA)의 혼합물을 42°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 역전사반응 동안 total RNA의 각각 50µg을 cy3 또는 cy5-dut로 labelling 시켰다. cy3와 cy5로 labelling된 cDNA를 PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany)로 정제하였다. 정제된 cDNA를 서로 혼합하여 Microcon YM-30(Millipore corp., Bedford, MA, USA)을 사용하여 농축 하였다. Hybridization을 하기위한 혼합물은 다음과 같다. 39 µl의 labelling 된 cDNA target, 25 µl의 20× SSC, 1 µl의 10%SDS, 30 µl의 formamide(sigma), 1 µl의 hhuman cot-1 DNA (20µg/µl, in vitrogen), 2 µl의 yeast tRNA(10µg/µl, invitrogen)과 2 µl의 polyA RNA(10µg/ul, sigma) hybridization 혼합물은 100°C에서 2분간 열을 가한 후 즉시 hybridization시켜 17,446개의 인간 cDNA 복제가 (invitrogen)된 cDNA microarray를 만들었다. 이 hybridization은 습기가 있는 Hybchamber X(Genomic Tree, Inc, Korea)로 42°C에서 12-16시간 동안 이루어진다. Hybridization이 끝난후 laser scanner(Axon 4000B, Axon instruments Inc, Foster CA,

USA)로 image scanning을 시행하였다(Fig. 1). 형광강도는 Genepix pro4.0 software(Axon instruments Inc, Foster, CA, USA)를 사용하여 각 pixel의 형광강도의 평균을 계산하여 분석하였다. Genespring 6.2 (Silicon Genetics, Redwood CA, USA)를 사용하여 data를 분석하였다. 0.01 %의 유의수준에서 single T-test를 시행하였다(Table 1).

5. RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction)

Amplification을 이용한 Akt1, PTEN, and BAD mRNA expression 분석하기 위하여 1µg DNase로 처리된 total RNA를 Random

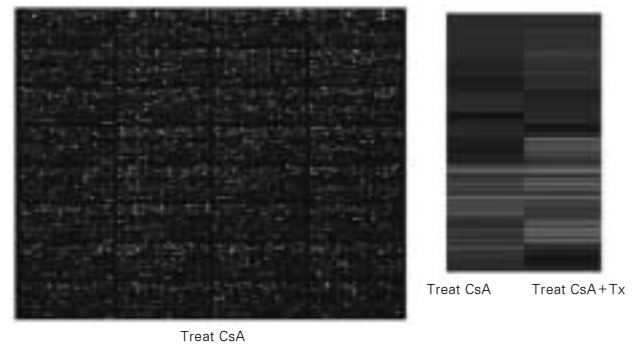


Fig. 1. Gene expression related to Cyclosporin A(1µg/ml) as a control group and Cyclosporin A(1µg/ml) + Taxol(3µg/ml).

Table 1. cDNA Microarray Data Analysis

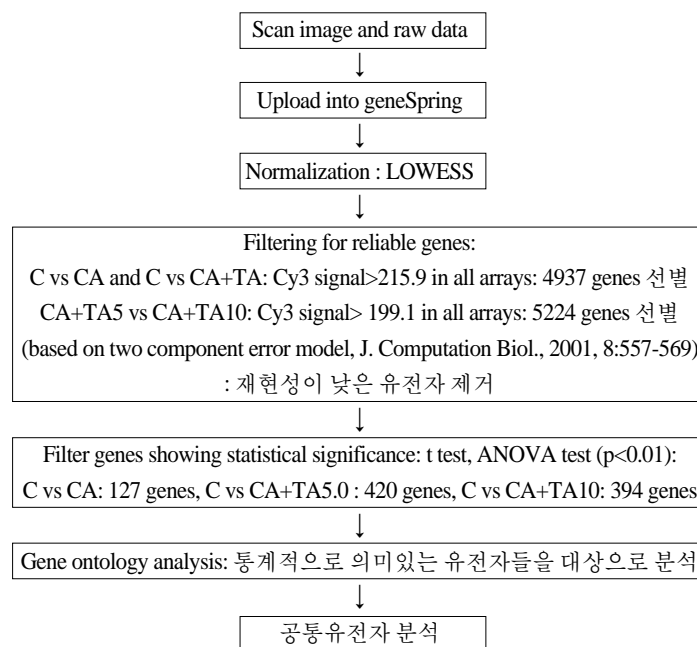


Table 2. Primers used in RT-PCR

PTEN (putative protein tyrosine phosphatase)	
sense :	AACGTGGGAGTAGACGGGAT
antisense :	TAGCCCTCAGGAAGAGACCA
Akt1	
sense :	GCCCTACATCACAGGAGGAA
antisense :	GCGTGAGTGTGGATATGTGG
BAD (Bcl-X/Bcl-2 binding protein)	
sense :	CGGAGGATGAGTGACGAGTT
antisense :	ACTTCCGCCATATTCAAGA?

hexamer primers에 70°C에서 10분간 섞은 후 얼음 속에 넣어두었다. 이것을 다시 첫 번째 strand buffer의 5배로 섞고, 100mM dithiothreitol(DTT), 10mM dNTPs, 10U RNAase와 200U/μl superscript II reverse transcriptase (Gibco BRL, USA)를 섞어 42°C에 60분간 처리후 cDNA를 만들었다. 이 cDNA를 80μl 물에 희석한 후 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl, 100mM Tris-HCl, pH8.3 200μM dTAD, dTTP, dGTP, biotinylated-dCTP를 0.75μl씩 만들고 double 2.5μl cDNA가 포함된 1unit Tag-polymerase (Gibco BRL, USA)를 반응물 총량이 50μl로 만들어 PCR을 사용하여 증폭시켰다. 한 cycle은 변색 과정은 1분간 95°C, 증폭을 위해 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분간 처리하고, 마지막 확장을 위해 72°C에서 10분간 시행하였다. 이 실험에 사용된 PCR Primer들은 Table 2와 같다. 정상인의 GAPDH를 대조군으로 위와 같은 방법으로 증폭시켰으며, PCR 반응물은 2% 아가로스 젤을 사용하여 분리하고, 젤 건조기에 말린 후 enhanced chemiluminescence (ECL, Gibco BRL, USA)방법을 사용하였다. 필름에 노출한 후 현상을 하고 농도계를 사용한 semiquantitative 방법으로 각각의 mRNA 수준을 GAPDH 수준으로 나누어 평균을 구하여 상호 비교하였다. 대조군은 mRNA expression Bcl-2/mRNA expression GAPDH을 1로 하고 나머지 요소 발현량/mRNA expression GAPDH로 환산하여 표시하였다.

6. Flow cytometry 분석

FITC와 결합된 Annexin V (이하 Annexin V-FITC), Propidium Iodide와 binding buffer는 BD Pharmingen사로부터 구입하였다. 배지에서 떼어낸 세포를 냉장상태의 PBS로 2회 세척한 후 1× binding buffer에 1×10⁶/ml가 되도록 하였다. 100μl의 용액(1×10⁶)을 5ml 용기에 옮겼다. Annexin V-FITC과 Propidium Iodide 5μl 저장용액을 가한 후 빛을 차단하고 실온에서 15분 동안 배양 하였다. 배양을 완료한 후에는 400μl의 1× binding buffer를 각 tube에 가하여 한 시간 내에 flow cytometry로 분석 하였다. Flow cytometry의 compensation과 quadrants 설정을 위한 대조군

의 준비를 위해서 100μl (1×10⁶ cells)의 세포 부유액을 3개의 시험관에 가하고 첫 번째 시험관에는 Annexin V-FITC나 Propidium Iodide를 넣지 않았고, 두 번째 시험관에는 Annexin V-FITC만 넣었고 세 번째 시험관에는 Propidium Iodide만을 넣었다. 염색한 세포들의 분석에는 FACScan flow cytometer(Becton Dickinson, Mountain View, CA)를 이용하였고, Flow cytometer에 설치된 Cell Questpro program (Becton Dickinson)을 사용하였다.

7. Western blot analysis

PVDF membrane으로의 단백질 Transfer가 끝난 후 membrane을 적당한 크기로 잘라 5% skim milk (in PBST)로 상온 30-60분간 낮은 속도로 회전시키며 blocking을 실시한다. 1차 antibody 처리는 5% skim milk (in PBST)에 희석하여 상온에서 2-3시간 혹은 4°C에서 overnight 처리한다. 1차 washing은 15분 간격으로 4번을 PBST로 시행한다. 1차에 사용한 antibody에 맞는 2차 antibody를 선정(α-mouse, α-rabbit 또는 α-goat)하여 적절히 희석해서 상온에서 1.5시간 반응을 실시한다. PBST를 5분 간격으로 4번, PBS로 2번 교체하면서 2차 washing을 시행한다.

ECL(peroxidase-labeled 된 2차 antibody 사용 시) 반응 후 물기는 깨끗이 제거하고 카셋트 넣어 암실작업을 준비한다. PVDF membrane 위에 X-ray film을 놓고 exposure 후 develop → fix → washing → 건조의 순서로 결과를 확인한다.

III. 연구 결과

1. Wortmannin and Taxol 투여 시 HN22 세포주의 생존력 분석

Wortmannin과 Taxol 단독 투여시보다 Wortmannin과 Taxol을 동시 투여 시 세포 생존력이 낮아짐을 보였으며, 5μg/ml Taxol 투여 시 종양세포의 세포생존력이 약 32%로 가장 낮게 관찰되었다(Table 3).

Taxol만 단독 투여하는 경우 일반적으로 약물내성이 발생되어 PI3K의 활성이 여러 암에서 나타났으나 PI3K inhibitor인 Wortmannin을 병용함으로써 효과를 증진시킬 수 있었다. 본 연구에서 PI3K활성과 반비례로 Taxol에 대한 감수성이 증가됨을 볼 수 있었다.

2. cDNA microarray 분석

Cyclosporin A (1μg/ml)를 대조군의 유전자 분석 기준으로 하였으며, 실험군으로는 Cyclosporin A (1μg/ml), Taxol(3μg/ml)을 동시 투여 후 유전자 발현을 분석한 결과 세포사멸에 관여하는 Bcl-2, Bax, PTEN, Akt1, BAD 등의 up-regulation 차이는 크게 없었다. 이에 본 연구에서는 미세소관 안정화 제제의 하나인 Taxol 투여 시에 세포사멸 과정에 관여할 것으로 생각한 세포주기 조절자 PTEN, 세포사멸에 관여하는 Akt1, PI3K/Akt1 경로

Table 3. HN22 Cell Line Viability by Wortmannin and Taxol

Wortmannin (100 μ M)	Taxol (3 μ g/ml)	Wortmannin + Taxol(3 μ g/ml)	Wortmannin + Taxol(5 μ g/ml)
80 \pm 6.5	65 \pm 2.7	50 \pm 3.2	32 \pm 2.5

Mean \pm SD(%)

Table 4. Gene Expressions in HN22 Cell Line Treated with Cyclosporin A + Taxol

Gene Bank	Name	Function	Up regulation
AH005966	PTEN	Cell cycle regulator	1.0
AH011307	Akt1	Apoptosis	1.0
AF021792	BAD	Proapoptosis	1.0

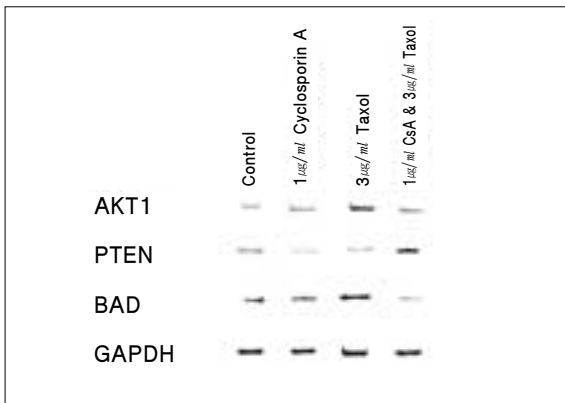


Fig. 2. The Combined Effect of Cyclosporin A(1 μ g/ml) and Taxol(3 μ g/ml) on Akt1, PTEN and BAD mRNA expression in HN 22 Cell Line by RT-PCR.

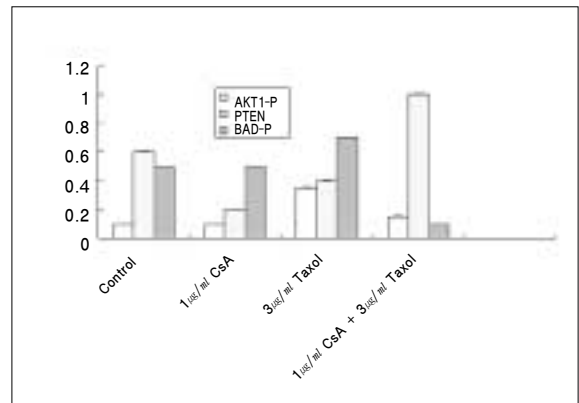


Fig. 3. The Combined Effect of Cyclosporin A(1 μ g/ml) and Taxol(3 μ g/ml) on Procaspase 3 Expression Measurement in HN 22 Cell Line.

의 하위 target이며 Proapoptosis에 관여하는 BAD를 선택하여 mRNA 발현을 분석하였다(Table 4).

3. RT-PCR 분석법에 의한 Akt1, PTEN, BAD 발현

HN22 세포주에 Cyclosporin A 1 μ g/ml와 Taxol 3 μ g/ml을 동시 투여 시 증양억제 유전자로 작용하는 PTEN의 증가가 대조군에 약 1.5배, Cyclosporin A 투여군 보다 약 4.5배, Taxol 투여군 보다 약 2.2배 정도 높게 발현되었으며, Akt1은 Taxol 투여군 보다 약 1/3 정도 감소되었고, BAD는 약 7배 정도 발현이 감소되는 양상을 보였으며 대조군 및 Cyclosporin A 단독 투여군 보다도 약 1/6정도 감소를 보였다(Fig. 2, 3). 이는 Taxol과 Cyclosporin A 병용 시 과 발현된 PI3K 활성이 감소되고, 이에 따라 BAD의 출현도 현저히 감소된다는 것을 보여주는 것이다. 즉 Taxol과 Cyclosporin A 병용시 PI3K/Akt1 pathway가 비활성이 됨으로써 약물의 효과가 증대되는 것으로 생각된다.

4. Annexin V-FITC를 이용한 유세포 분석

Cyclosporin A 1 μ g/ml 단독 투여, Taxol 5 μ g/ml 단독 투여, Cyclosporin A 1 μ g/ml 와 Taxol 5 μ g/ml 병용 시 Caspase 3, Annexin V를 이용한 유세포 분석에서 Caspase 3의 활성도는 약 37%에서 38% 사이의 활성도를 보여 대조군에 비하여 활성도가 거의 없는 것으로 확인되었다. 반면에, 단독 또는 병용 투여시 대조군에 비해 Annexin V는 약 3배 정도의 증가를 보여 세포 원형질막의 변형에 의한 세포사멸을 확인할 수 있었다(Fig. 4, Table 5).

5. Western blot analysis를 이용한 Procaspase 3의 발현 분석

HN22 세포주에 Cyclosporin A 1 μ g/ml 단독 투여, Taxol 3 μ g/ml 단독 투여, Cyclosporin A 1 μ g/ml와 Taxol 3 μ g/ml 병용 시 대조군과 실험군 모두 Procaspase 3의 발현에 있어 활성도에 큰 차이가 없어 Caspase 3의 비활성을 생각할 수 있었다(Fig. 5).

Table 5. Flow Cytometry Analysis of HN22 Cell Lines by Fluorescence of Caspase 3 and Annexin-V

Caspase 3		Annexin V	
MARKER	%Total	MARKER	%Total
Control	38.34	Control	7.81
CsA 1	39.33	CsA 1	29.90
CsA 1 + Tx 5	38.71	CsA 1 + Tx 5	20.75
Tx 5	37.38	Tx 5	20.85

CsA: Cyclosporin A, Tx: Taxol, 단위($\mu\text{g}/\text{ml}$)

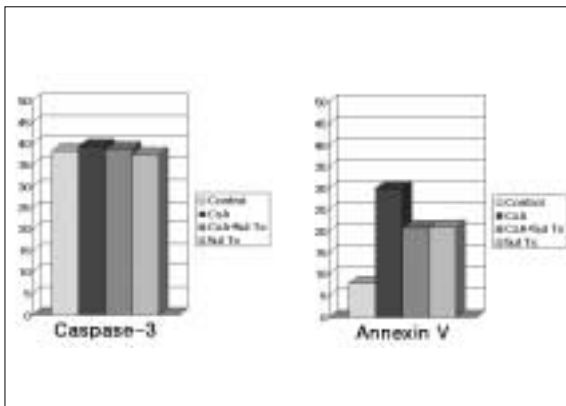


Fig. 4. Flow Cytometry Analysis of NH22 Cells by Fluorescence of Caspase 3 and Annexin-V.

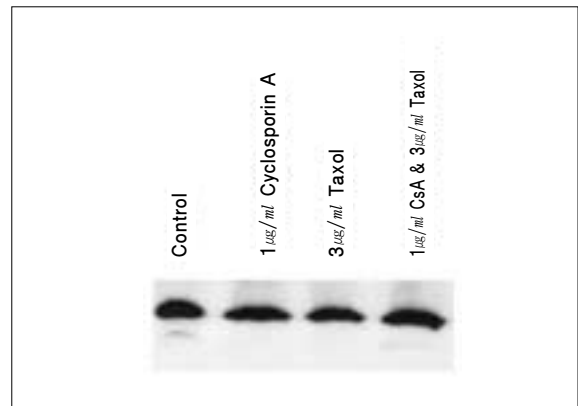


Fig. 5. The Combined Effect of Cyclosporin A($1\mu\text{g}/\text{ml}$) and Taxol($3\mu\text{g}/\text{ml}$) on Akt1, PTEN and BAD mRNA expression Measurement in HN 22 Cell Line by Densitometer.

IV. 총괄 및 고찰

세포사멸(Apoptosis)이란 다세포생물에서 프로그램 된 세포의 사망을 일컫는다. 암세포는 anti-apoptotic survival pathway를 통해 세포사멸을 제어하게 되는데 이 과정에는 Bcl-2와 Bcl-XL의 과 발현을 통한 세포사멸의 억제 및 p53 유전자의 기능을 소실, PI3K/Akt 경로 활성화 등에 의해 세포사멸이 억제되고 있다. 어떤 암세포들은 Bcl-2 단백질을 많이 만들어내어 세포사멸을 억제하기도 한다.

세포사멸 중 미토콘드리아를 통한 Caspase의 경로(Mitochondrial pathway of caspase activation)는 intrinsic apoptosis pathway로서 두 가지 경로로 구분되며, Caspase-dependent pathway와 AIF-dependent pathway로 나눌 수 있다. 미토콘드리아를 통한 기전은 항암화학요법에 의해 유도될 뿐만 아니라 DNA손상, oxidative stress, 기아상태(starvation)의 세포내에서 기시되는 death signal의 integration과 propagation에 중요한 역할을 한다⁶⁾. Caspase-dependent pathway는 미토콘드리아 외막의 투과성이 유도되어 intermembrane space에 존재하는 cyochrome c가 세포질로 방출되고 Apaf1과 결합하며 이 결합체에 Caspase 9가 결합하여 Caspase 9의 활성이 유도된 후 이어서 Caspase 3을 활성화시키

는데, Caspase 3은 여러 기질단백질들을 절단하여 세포사멸을 유도하게 된다⁴⁾. Caspase는 세포사멸을 촉발하는 대표적 신호 전달 효소로 대부분의 세포사멸의 경우에서 활성화된다. 이 경로는 pro-apoptotic Bax, Bid와 anti-apoptotic Bcl2, Bcl-XL 등의 단백질 및 기타 cytochrom C, smac/DIABLO 등 여러 단백질들에 의해 조절된다. 미토콘드리아 intermembrane space에 존재하는 AIF(Apoptosis inducing factor)는 세포질에서 cytochrome C의 방출을 증가시키고 세포막에서 phosphatidylserine의 세포 외부로의 노출을 증가시키고 핵으로 이동하여 large-scale DNA fragmentation을 촉진한다⁴⁾. 그러므로 phosphatidylserine을 측정하면 세포막의 변화를 확인할 수 있어 세포사멸을 확인할 수 있게 되므로 본 연구에서는 phosphatidylserine을 측정할 수 있는 index인 Annexin V 이용한 유세포분석을 시행하여 세포사멸 정도를 확인 하였다.

미토콘드리아와 관계없는 경로로는 receptor-mediated caspase activation인 extrinsic apoptosis pathway로서 death receptor (Fas, TNFR1,DR5)에 ligand (FasL, TNF- α , TRAIL)의 결합으로 발생하고 활성 Caspase 8이 형성되어 Caspase 3을 활성화시켜 세포사멸을 일으킨다. Caspase cascade의 활성화는 세포막에서 TNF 또는 Fas 신호전달에 의한 Caspase 8 활성화경로와 미토콘드리아에서 시

작되어 Caspase 9 활성화 경로의 두가지 경로가 알려져 있다⁴⁾. 본 연구에서는 Western blot을 시행하여 Caspase 3의 활성도를 측정 한 결과 약제에 따라 큰 차이가 없는 것으로 나타나 이러한 통로를 통하여 세포사멸이 발생하였다고 생각되지 않았다.

세포사멸조절 인자는 cell surface receptors & ligands, cell cycle regulators, proteolytic enzymes, Bcl-2 family, inhibitors of apoptosis protein, 그 외 여러 signals로 분류된다. Bcl-2 family는 세포사멸 억제인자인(Anti-apoptotic factors) Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Ced-9, BHRF-1, E1b-19kDa, A1, ASFV-5HL, Bcl-W, NR13 그룹과 세포사멸 촉진인자인(Proapoptotic factors) Bax, Bcl-XS, Bak, BAD, Bik, Bid 등으로 이루어져 있다. 세포사멸을 저해하는 Bcl-2와 Bcl-XL이 많은 암에서 발현되며, 암의 기시 및 진행과 치료에 저항하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. Bcl-XL의 발현은 약물내성 암 세포주와 연관된 것으로 알려져 있으며⁴³⁾, Bcl-2의 감소는 항암제 감수성을 증가시키고 생체 내 생존을 증가 시킨다⁴⁴⁾. 종양조직에서 세포분화도에 따른 Bcl-2 발현율은 미분화 세포암에서 가장 높게 나타나며, Bcl-2의 과다 발현은 세포사멸이 진행되어야 할 돌연변이 세포의 생명을 연장시킨다. Bcl-2는 미토콘드리아 본체를 지키는 역할을 하는데, 항암제에 의해 미토콘드리아의 손상이 야기되면, Bcl-2 인산화가 세포주기 G₂/M 단계에서 발생하여 Bcl-2의 세포사멸억제 기능이 차단된다⁴⁵⁾. 그러므로 cDNA microarray 분석법 등에서 이들 인자를 관찰함으로써 세포사멸과정을 측정할 수 있는데 본 연구 결과 이러한 유전자의 up regulation은 관찰되지 않아 이들 유전자 중 선별적으로 다른 변화가 발생하여 세포사멸이 유도될 것으로 생각되어 PTEN, Akt1, BAD 등을 RT-PCR분석을 통해 의미 있는 결과를 얻었다.

BAD는 세포사멸 촉발인자이며, Bcl-2의 길항자(antagonist)로 알려져 있다. 또한 BCL-2 binding protein, BCL-2 binding component, 그리고 BCL-X/BCL-2 binding protein으로 알려져 있다. BAD는 세포사멸을 조절하며, 세포사멸억제물질의 활동을 전환시킨다. PI3K/Akt pathway의 하위 target인 BAD는 난소암에서 Taxol약물내성을 부분적으로 억제시켰으며, BAD의 과발현은 Taxol에 대한 감수성을 증가시켰다고 하였다⁴¹⁾. 반면에 Bax는 세포분화도가 좋은 각화편평세포암에서는 높게 나타나고 세포사멸을 촉진하였다²⁷⁾.

본 연구에서 phosphoinositide 3-kinase inhibitor 인 Wortmannin과 Taxol을 동시 투여한 경우 생존력의 감소를 보여 PI3K의 억제에 의한 효과가 있는 것으로 생각된다. PI3K는 항암 치료 기전에 관여하는 분자들의 연구를 비롯해 생물학적, 병리생리학적 연구에 널리 사용되고 있는데, 세포분열(mitogenesis), 세포사멸, 세포분착 및 이동(motility)조절에 관여하는 heterodimeric enzyme이며 사람의 종양에서 전구종양유전자(protooncogene)로 생각되고 있다⁴⁶⁾. 여러 연구들에 의하면 PI3K/Akt pathway는 세포 생존에 관여하는 인자이며 또한 암유발조절인자로서, 항암화학요법에 저항성을 나타내는 인자로 밝혀져 있다³¹⁻³³⁾. 한편 PI3K는 종양의 악성도와 침습에 대한 표지자이며, 두경부 편평세포암종의 다단계 발암모델(multistep carcinogenesis

model)에 관여하며, 항암약물요법 시 항암약물의 potential target으로 간주되고 있다⁴⁶⁾. PI3K signaling은 다양한 세포기능들의 변경을 위한 세포의 신호 검출의 해석에 있어서 중추적인 역할을 한다. 세포의 휴지기에서는 이 경로가 정지되어 있지만, 인간의 종양에서는 일반적으로 이 경로의 통제가 해제되어 구조적 활성이 나타나게 된다⁴⁷⁾. PI3K는 extracellular signal들에 대한 반응으로 다양한 세포기능들의 변형에 매우 중요한 역할을 한다. PI3K의 중요한 하향 효과기(downstream effector)는 PI3K 활성화에 대한 반응으로 나타나는 serine-threonine kinase Akt이다.

PI3K와 세포변형간의 원인이 되는 연관성은 1980년대 중반 Polioma virus의 Middle T antigen의 oncogenic activity가 PI3K 활성을 유도하는 능력에 연관되어 있다는 것이 밝혀지면서부터 알려졌다. 인간의 종양에서 PI3K 경로 활성화의 주요한 역할은 더 최근이 되어야 밝혀졌는데, PTEN이라는 종양 억제 유전자의 positional cloning과 PTEN protein의 산물들이 PI3K기능을 억제하고, 결과적으로 Akt를 통한 하향신호(downstream signaling)를 억제하는 lipid phosphatase라는 것이 발견되면서 부터였다. 이후 다양한 인간의 종양에서 이 경로에 관여되는 여러 요소들의 변이(mutate)와 억제(deregulation)가 세포의 변형시 이 경로에서 중요한 역할로 조명받기 시작했다⁴⁸⁾.

PI3K signalling의 종료는 inositol ring의 다른 phosphate들에서 일어나는 phosphoinositide phosphatase들의 활동에 의해 일어난다. PI3K signalling은 최근에 알려진 family인 dual-specificity protein phosphatases/3-PI phosphatases의 활동에 의해 완전히 종료될 수 있다. 이 family의 prototype member가 종양억제 유전자인 PTEN이며, PTEN은 모든 PI3K 생성물의 비활성에 관여 한다⁴⁹⁾. 가장 잘 알려진 PI3K target은 Akt, serine/threonine kinase이다⁵⁰⁾. PI3K 활성화와 3-PI 생성에 의해 Akt가 PH domain을 통해 세포막으로 충진된다. 이 상호작용으로 activation loop중의 인산화 site가 노출되며, PDK1과 PDK2를 포함하는 3-PIs에 의해 다른 kinase들이 자극되어 인산화가 일어난다. 활성화가 되면 여러 Akt phosphorylate는 대사조절, translational control, BAD, caspase 9와 같은 forkhead transcription factor들을 통한 세포생존을 이끌게 되며, Akt는 cyclin D1과 E2F를 통한 cell cycle의 조절에 관여한다⁵⁰⁾.

PI3K family inhibitors에는 세포침투성(cell-permeable) PI3K inhibitor인 wortmannin과 LY294002가 있으며 이들은 세포사멸과 signaling pathway에 일반적으로 사용된다⁵¹⁻⁵²⁾. 어떤 자극이 들어오면 세포막에서 PI3K의 인산화가 발생되어 cytosol로부터 Akt가 세포막으로 재위치 되게 된다. 이후 Akt는 인산화되고, Caspase 9, BAD와 같은 Pro-apoptotic protein의 활성을 억제시키거나 Pro-survival target을 활성화시켜 세포사멸을 억제시킨다⁵³⁻⁵⁵⁾. 이러한 세포 생존을 촉진시키는 가장 핵심적인 역할을 하는 PI3K/Akt pathway는 약물치료 연구에 매우 중요하며, 따라서 이 pathway의 억제제인 Wortmannin과 LY294002또한 많은 관심을 가지며, 항암약물요법의 단독 치료제 또는 병용치료제로 각광을 받고 있다^{27,56-60)}. 이 두 제제는 실험과 임상에 의해 종양의 성장을 억제하며, 세포가 방사선 치료에 민감하게 해준다

는 것이 알려졌다. 또한 이 제제들의 여러 연구에 의해 PI3K가 종양치료 시 치료의 목표가 된다는 것이 알려졌다^{51,61-64}. 본 연구에서는 Taxol에 의한 구강 편평세포암종 세포주의 세포사멸 기전의 경로를 확인하기 위해 PI3K inhibitor인 Wortmannin과 Taxol을 동시 투여한 결과에서 세포주의 생존력의 저하가 단독 투여군보다 뚜렷이 나타나 PI3K의 억제에 의한 항암효과를 알 수 있었다.

Watanabe 등³¹은 췌장암에서 PI3K/Akt pathway가 세포의 생존과 사멸에 중요한 역할이 있다 하였으며, Jin 등³²은 난소암 환자의 연구에서 원발 난소암 환자의 PI3K/Akt1의 활성이 39%의 높은 빈도로 나타나는 것을 보고하여 PI3K/Akt1 pathway가 난소암 발생에 밀접한 관계가 있음을 임상적으로 보여 주었다. 이들은 PI3K/Akt pathway의 활성은 고분화도의 종양과 후기종양에서 관찰된다고 하였으며, 이는 PI3K/Akt1이 ovarian tumor에서 초기단계보다는 진행된 단계에서 중요한 역할을 담당한다 하였다. PI3K/Akt1 pathway의 활성은 악성 암으로의 전환과 항암화학요법에 대한 저항성을 유도하게 되며, PI3K inhibitor나 dominant negative Akt1에 의한 이 경로의 억제는 난소암 세포의 cisplatin-induced cell death 뿐만 아니라 세포사멸을 진행시키며, 세포성장을 중단시켜 PI3K inhibitor나 dominant negative Akt1 같은 억제인자가 항암화학요법의 내성을 줄여줄 뿐만 아니라 세포사멸까지 도달하게 해 준다고 하였다³³.

인간의 백혈병 세포주에 대한 연구에서도 항암화학요법의 약물 내성을 나타내는 세포주와 PI3K/Akt1 pathway에 대한 관계를 기술하였다³⁴. PI3K activity는 세포의 증식과 생존, 이주와 같은 여러 가지 기능으로 종양과 연관되어 있으며, 그로 인해 PI3K family가 약물요법의 target으로 관심을 받고 있다⁵¹.

Amorphimoltham 등⁶⁵은 두경부의 편평세포암종에서 Akt pathway의 활성을 관찰하였는데, 이들에 의하면 serine/threonine protein kinase는 phosphatidylinositol 3-kinase의 downstream target이고, 세포의 성장과 사멸에 관여되는 결정적인 조절자라고 하였으며, 서로 다른 stage의 두경부 편평세포암종 환자 및 동물 실험에서 Akt의 활성상태를 관찰하여 두경부 편평세포암종에서 유도된 세포주중 많은 부분에서 Akt의 구조적인 활성이 나타났다 보고하였고, 두경부 편평세포암종에서도 앞의 연구 결과들과 같은 Akt1 pathway의 역할을 강조하였다. Gastric, ovarian, pancreatic, prostate cancer와 같은 인간의 여러 종양에서는 Akt 유전자들이 증폭되거나 이들 단백질들이 과 발현되어 나타나는 것으로 알려져 있다⁵⁰. 이에 반해 PTEN은 종양억제 유전자로 알려져 있으며, 많은 암에서 PTEN의 돌연변이가 관찰된다. PTEN은 세포가 과성장, 과분열되지 않도록 적절히 조절을 함으로써 세포주기를 조절하여 종양을 억제하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. PTEN은 암을 유발하는 PI3K/Akt signaling pathway를 비활성화 시켜 암 발생 억제 작용을 하며, 반대로 인간의 여러 고형암에서는 PTEN의 기능상실이 확인되고 있어 암 발생의 억제에 PTEN이 중요하게 관여함을 보여준다^{38,39}. 종양억제에 관여하는 PTEN의 phosphatase 활성은 매우 중요한 기능이라고 보고되고 있는데 Akt/PKB signaling pathway를 비활

성화 시켜, 종양을 억제하는 역할을 한다³⁸. 즉 PTEN은 oncogenic PI3-K/Akt signaling pathway를 비활성화 시켜 암 발생 억제 작용을 하며, 반대로 인간의 여러 고형암에서는 PTEN의 기능 상실이 확인되고 있다³⁹. PTEN의 돌연변이는 ovarian, prostate, glioblastoma cancer에서 발견되며, PTEN 활성이 상실되면 3-PIs level의 증가와 Akt와 같은 PI3K target들의 활성이 증가 된다^{49,66}. PTEN 유전자의 상실만으로 종양이 유발되는 것은 드물지만 PTEN의 상실로 종양 발생이 촉진되고, PTEN의 과 표현에 의해 세포사멸이 유도됨이 보고되었다^{67,68}. 본 실험에서 Cyclosporin A와 Taxol을 병용한 경우 PTEN이 증가됨을 보여 PI3K/Akt1 경로를 통한 항암효과를 추론 할 수 있었다.

세포사멸의 초기단계는 세포표면에서 일어나게 되어 원형질 막의 변형이 나타나게 되는데, 그 변형 중 하나는 원형질막 내부에서 바깥 층으로의 phosphatidylserine의 전위이다. 그러므로 phosphatidylserine의 노출은 세포의 사망과정을 확인시켜주는 증명이 될 수 있다. 항응고 작용을 가지고 있는 Annexin V는 Ca²⁺이 나타난 경우에 음성의 전극을 띤 인지질형의 phosphatidylserine과 특이적으로 결합하며, phosphatidylcholine과 sphingomyelin과의 결합이 최소화 되는 성질 때문에 세포사멸 세포를 감별해 내는 도구로 유용하게 사용된다. 비대칭적인 phosphatidylserine에서의 변화들은 세포사멸과 함께 형태학적인 변화가 일어나거나 membrane의 완전성이 상실되기 전에 발생하는 Annexin V의 세포막과의 결합을 측정함으로써 분석되는데, Annexin V와 FITC를 결합하여 유세포분석에 의해 single-cell basis에서 세포사멸되는 세포를 확인하고 정량적인 분석이 가능하다. FITC-Annexin V(green fluorescence)와 non-vital dye propidium iodide(red fluorescence)(=PI)와 함께 세포를 staining 하면(bivariate analysis) 완전한 세포들은 (FITC-PI-)로, 초기의 apoptotic cell들은 (FITC+PI-)로, 후기의 apoptotic cell이나 necrotic cell들은(FITC+PI+)로 분류되어 구분이 된다⁶⁹. 그러므로 Annexin V를 이용하여 원형질막 변형에 의한 phosphatidylserine의 노출을 확인할 수 있어 sensitive probe으로 이용할 수 있다. 그러나 세포표면 외측으로의 phosphatidylserine의 전위는 세포사멸만의 특이성은 아니며 세포의 괴사에서도 나타나는 현상이다. 그러므로 위와 같이 dye exclusion test를 통해 세포막의 완전성을 확인하면서 세포표면에 형광 표지된 Annexin V가 부착되는 것을 측정함으로써 괴사와 구분하여 세포사멸 여부를 확인할 수 있다⁷⁰. 본 연구에서도 이점에 착안한 형광 표지된 Annexin V 및 Caspase 3을 이용하여 유세포분석을 하였으며, Caspase 3의 경우는 대조군과 Cyclosporin A와 Taxol의 단독 사용 및 병용 시 모두 유의성이 없었으며, Annexin V는 대조군에 비해 Cyclosporin A와 Taxol의 단독 사용 및 병용 시 모두 높게 나타나 원형질막 변형에 의한 phosphatidylserine의 노출에 의한 세포사멸을 확인할 수 있었다.

미세소관형성억제형 항암화학요법제인 Taxol은 난소, 폐, 두경부, 방광, 식도 등의 암 치료에 효과적인 것으로 보고되고 있다^{41,71}. 이와 같은 미세소관형성억제형 항암화학요법제는 tubulin의 β -subunit과 결합하여 미세소관의 성장과 분해에 관여한

다. 미세소관 작동에 대한 억제는 mitotic spindle의 파괴와 세포 주기를 metaphase와 anaphase에서 멈추게 함으로서 결과적으로 세포사멸을 일으키는 것이다^{3,9,13,14,43,72}. Taxol에 의한 세포사멸은 lymphoid cell에서는 Bcl-2 인산화로 인한 비활성이 G₂/M 단계에서 발생하여 유도 된다고 하였으며⁹, Ovarian cell에서는 JNK 활성으로 G₂/M 세포 주기가 차단됨으로써 진행되며¹⁰, Leukemia HL-60 세포주에서는 Caspase 9, 3의 활성화에 의한 세포사멸로 보고되었고¹¹, CCRF-HSB-2 세포주에서는 Caspase 10의 활성화에 의해 Caspase 3과 6이 활성화 되고 Bcl-2가 분해 되어 세포사멸이 유도 되었다¹². 이와 같이 Taxol의 세포사멸 양상은 다양한 경로로 발현되는 것으로 보고 되고 있다.

Cyclosporin A는 림프구에서 신호전달과정에 영향을 줄 뿐 아니라 지방세포나 근육세포와 같은 다양한 세포에서 신호 전달 과정에 관여하여 각 세포의 세포사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다. 또한 신경종양세포에서 세포사멸과 Akt pathway의 관련이 보고되었고, leukemia 세포주에서 Cyclosporin A에 의한 세포사멸, 골수세포에서 다핵과골세포의 파괴 및 Caspase 3의 활성화도 증가를 보였다^{73,75}.

Cyclosporin A와 Taxol의 병용 사용시 Cyclosporin A가 Taxol의 항암작용에 도움을 주는 것으로 알려져 있다. 즉 Cyclosporin A에 의해 Taxol induced multidrug resistance를 감소시켜 p-glycoprotein이 억제됨으로 항암효과를 증강 시킨다^{23,25,76-80}. Hepatoma에서 Taxol과 Cyclosporin A를 병용 사용 시에는 Caspase 9, Caspase 3 등의 활성도를 증가시키고 Hep G2 cell에서 미토콘드리아의 활성막이 저하되어 세포사멸이 증가되며, 이는 PI3 kinase-Akt pathway가 억제되어 일어난다고 하였다²⁷.

이와 같이 Taxol과 Cyclosporin A의 단독 및 병용투여에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다. 그러나 항암효과에 대한 기전 및 세포사멸에 이르는 경로는 정확히 밝혀져 있지 않다. 이에 본 연구에서는 구강 편평세포암종 세포주에 Taxol과 Cyclosporin A 병용시 세포주의 활성이 저하됨을 보여 상승효과를 관찰할 수 있었으며, 이때 Akt1 및 BAD mRNA의 감소와 PTEN mRNA의 발현 증가가 나타났으며, Wortmannin과 Taxol 병용 시 생존률이 감소되는 것으로 보아 Taxol이 세포주 생존률을 저하시키는 것을 확인 할 수 있었다. 결과적으로 Taxol과 Cyclosporin A 병용시 Akt1 경로를 통한 세포사멸이 진행되는 것으로 생각되었으며 이 결과를 토대로 연구가 계속 진행된다면 구강 편평세포암종에 대한 Taxol과 Cyclosporin A 병용요법의 기전이 정확히 밝혀지게 되어 항암치료에 유용하게 적용되리라 생각한다.

V. 결 론

구강 편평세포암종 세포주인 HN22에 Cyclosporin A를 농도 차이를 둔 Taxol과 단독 및 병용투여 하여 세포사멸 효과 및 이에 관여하는 기전에 대해 관찰하기 위해 PI3K 억제제인 Wortmannin을 사용한 종양세포의 생존률 평가, c-DNA microarray, RT-PCR분석, 유세포분석법 및 Western Blotting 을 이용하여 약제 병용 효과 및 작용 기전을 관찰한 결과 다음과 같은 결과

를 얻었다.

1. 종양세포 생존률은 Wortmannin 100 μ M과 Taxol 5 μ g/ml를 동시 투여 시 가장 낮아 Taxol이 PI3K-Akt1 pathway에 관여함을 볼 수 있었다.
2. Cyclosporin A 1 μ g/ml, Taxol 3 μ g/ml를 동시 투여한 c-DNA Microarray 결과에서 세포사멸에 관여하는 Akt1, PTEN 및 BAD c-DNA의 up regulation은 관찰되지 않았다.
3. 종양 세포주에 Cyclosporin A 1 μ g/ml를 단독 투여 시 Akt1, PTEN 및 BAD mRNA 발현에는 차이가 없었다.
4. 종양 세포주에 Taxol 3 μ g/ml를 단독 투여 시 Akt1, mRNA 발현 증가가 보여 Taxol내성에 의한 Akt1의 표현으로 인지되었다.
5. 종양 세포주에 Cyclosporin A 1 μ g/ml와 Taxol 3 μ g/ml 및 Taxol 5 μ g/ml를 동시 투여 시 PTEN mRNA 발현은 증가하였으나, Akt1과 BAD mRNA는 감소하였다.
6. 유세포분석 결과 Cyclosporin A 1 μ g/ml와 Taxol 3 μ g/ml 동시 투여군에서 Annexin V의 증가가 관찰되어 약제의 병용시 원형질막의 변형으로 세포사멸이 진행됨을 볼 수 있었으나, 이의 농도에 따른 차이는 보이지 않았다.
7. Western blot 에서는 Cyclosporin A 1 μ g/ml와 Taxol 3 μ g/ml 동시 투여군에서 Caspase 3의 발현은 인지되지 않았다.

이상의 연구결과에서 구강 편평세포암종 세포주에 Taxol과 Cyclosporin A의 병용 시 세포주의 활성이 저하됨을 보여 병용 치료 시 상승효과를 관찰 할 수 있었다. 이 때 Akt1 및 BAD mRNA 감소와 함께 PTEN mRNA의 발현증가가 나타났으며, Wortmannin과 Taxol 병용시 생존률이 감소 되는 것으로 보아 Taxol이 세포주 생존률을 저하시키는 것을 확인 할 수 있었다. 이에 Taxol과 Cyclosporin A 병용시 세포사멸은 Akt1 경로를 통해 진행되는 것으로 생각되었다.

참고문헌

1. Hromas RA, North JA, Burns CP: Decreased cisplatin uptake by resistant L1210 leukemia cells. *Cancer Lett* 1987;36(2):197-201.
2. Vikran B, Strong E, Shah J et al.: Failure at the primary site-following multimodality treatment for advanced head and neck cancer. *Head Neck Surg* 1984;6:720.
3. Lockshin RA and Williams CM: Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J Insect Physiol* 1964;10:643-649.
4. Choi EJ: *Experimental & Molecular medicine* Vol.33 Supplement, December 2001;83-93.
5. Fadeel B, Gleiss B, Hogstrand K et al: Phosphatidylserine exposure during apoptosis is a cell-type-specific event and does not correlate with plasma membrane phospholipid scramblase expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;266(2):504-11.
6. Kaufmann SH, Earnshaw WC: Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 2000;256(1):42-9.
7. Amos LA, Lowe J: *Chem. Biol.* 6, 65-69, 1999.
8. Crown J, O' Leary M: *Lancet* 355,1176-1178, 2000.
9. Haldar S, Jena N, Croce CM: Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92(10):4507-4511.
10. Wang TH, Popp DM, Wang HS, et al.: Microtubule dysfunction induced by paclitaxel initiates apoptosis through both c-Jun N-terminal Kinase(JNK)-dependent and independent pathways in ovarian

- cancer cell. *J Biol Chem* 1999;19(274)12:8208-8216.
11. Lu KH, Leu K, Liao HH, et al.: Induction of caspase -3-dependent apoptosis in human leukemia HL-60 cells by paclitaxel. *Clin Chem Acta* 2005;357(1):65-73.
 12. Park SJ, Wu CW, John D, et al. : Taxol Induces Caspase-10-dependent Apoptosis. *J Bio Chem* 2004;279(49) :51057-51067.
 13. Jordan MA, Wendell K, Gardiner S, et al.: Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Res* 1996;56(4):816-825.
 14. Yvon AM, Wadsworth P, Jordan MA: Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells. *Mol Biol Cell* 1999;10(4):947-959.
 15. Laupacis A, Keown PA, Ulan RA: Cyclosporin A : a powerful immunosuppressant. *Can med Assoc J* 1986;126:1041.
 16. Satoshi M, Shigeo K: Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharm* 2000;47:119-125.
 17. Braida M, Knop J: Effect of cyclosporin A on the T-effector and T-suppressor cell response in contact sensitivity. *Immun* 1986;59:503-511.
 18. Mongini C, Waldner C, Lopes EC, et al.: Induction of apoptosis in murine lymphoma cells by cyclosporin A. *Int J Mol Med* 2001; 7(4):431-437.
 19. Healy E, Dempsey M, Lally C, et al.: Apoptosis and necrosis : mechanisms of cell death induced by cyclosporine A in a renal proximal tubular cell line. *Kidney Int* 1998;54(6):1955-1966.
 20. Justo P, Lorz C, Sanz A, et al.: Intracellular mechanisms cyclosporin A-induced tubular cell apoptosis. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(12):3072-3080.
 21. Zupanska A, Dziembowska M, Ellert MA, et al.: Cyclosporine A induces growth arrest or programmed cell death of human glioma cells. *Neuro chem Int* 2005;47(6):430-441.
 22. Lim HW, Kim KW: Anti-cancer effect of Cyclosporin A on oral squamous cell carcinoma cell line *J Kor Oral Maxillofac Surg* 2004;30(06):474-481.
 23. Meerum-Terwogt JM, Malingre MM, Beijnen JH, et al.: Coadministration of oral cyclosporin A enables oral therapy with paclitaxel. *Clin. Cancer Res* 1999;5:3379-3384.
 24. Kimura Y, Aoki J, Kohno M, et al.: P-glycoprotein inhibition by the multidrug resistance-reversing agent MS-209 enhances bioavailability and antitumor efficacy of orally administered paclitaxel. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002;49(4):322-8.
 25. Mirte MM, Dick JR, Jos H, et al.: Coadministration of cyclosporine strongly enhances the oral bioavailability of docetaxel. *J Clin Oncology* 2001;19(4):1160-1166.
 26. Koshkina NV, Golunski E, Roberts LE, et al.: Cyclosporin A aerosol improves the anticancer effect of paclitaxel aerosol in mice. *J Aerosol Med* 2004;17(1):7-14.
 27. Meerum Terwogt JM, Malingre MM, Beijnen JH, et al.: *Clin Cancer Res.* 1999;5(11):3379-84.
 28. Lin HL, Lui WY, Liu TY, Chi CW: Reversal of Taxol resistance in hepatoma by cyclosporin A : involvement of the PI-3 Kinase-Akt 1 pathway. *British Journal of Cancer* 2003;88,973-980.
 29. Andjelkovic M, Jakubowicz T, Cron P, et al.: Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(12):5699-5704.
 30. Datta SR, Dudek H, Tao X, et al.: Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997;91(2):231-241.
 31. Watanabe H, Saito H, Rychahou PG, et al.: Aging is associated with decreased pancreatic acinar cell regeneration and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activation. *Gastroenterology.* 2005;128(5):1391-1404.
 32. Jin Q. Cheng: Phosphoinositide 3-Kinase/Akt1 Pathway and Human Ovarian Cancer SEP 2002. Annual rept. 1 Sep 2001-31 ug 2002.
 33. Neri LM, Borgatti P, Tazzari PL, Bortul R, Cappellini A, Tabellini G, Bellacosa A, Capitani S, Martelli AM: The phosphoinositide 3-kinase/Akt1 pathway involvement in drug and all-trans-retinoic acid resistance of leukemia cells. *Mol Cancer Res* 2003;1(3):234-46.
 34. Polakis P: The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta* 1997;1332(3):F127-F147.
 35. Brown JD, Moon RT. Wnt signaling: Why is everything so negative? *Curr Opin Cell Biol* 1998;10(2):182-187.
 36. Bafico A, Liu G, Yaniv A, et al.: Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat Cell Biol* 2001;3(7):683-686.
 37. Ohigashi T, Mizuno R, Nakashima J, et al.: Inhibition of Wnt Signaling Downregulates Akt Activity and Induces Chemosensitivity in PTEN-Mutated Prostate Cancer Cells *Prostate* 2005;62:61-68.
 38. Simpson L, and Parsons R: PTEN : life as a tumor suppressor. *Exp. Cell Res* 2001;264:29-41.
 39. Maitra A, Hruban RH: A new mouse model of pancreatic cancer: PTEN gets its Akt together. *Cancer Cell* 2005;8(3):171-2.
 40. Arnaud B, Stephen MR, V. Wee Yong: PTEN/MMAC1/TEP1 in signal transduction and tumorigenesis. *Eur J Biochem* 1999;263:605-611.
 41. Tamai K, Semenov M, Kato Y, et al: LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 2000;407(6803):530-535.
 42. Li H, Zhu H, Xu C, et al: Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998;94(4):491-501.
 43. Amundson SA, Myers TG, Scudiero D, et al: An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines *Res* 2000;60:6101-6110.
 44. Reed JC: Promise and problem of Bcl-2 antisense therapy. *J Natl / Cancer Inst* 1997;89, 988-990.
 45. Haldar S, Basu A, Croce CM: Bcl-2 is the guardian of microtubule integrity. *Cancer Res* 1997;57:229-233.
 46. Stahl U, Wenk J, Wagener F, et al: Phosphoinositide 3-kinase(PI3-K) expression. Tumorigenesis of epithelial carcinoma of the mouth. *Pathologie* 2004;25(1):31-7.
 47. Paez GP, Sellers WR: The PI3K/PTEN/Akt pathway: A critical mediator of oncogenic signaling. In: Frank DA, ed. *Signal Transduction in Cancer.* *Cancer Treat Res* 2003;115:145-67.
 48. Fruman, Meyers & Cantley, Katso et al., 2001; Vanhaesebroeck & Waterfield, 1999.
 49. Vazquez F, Sellers WR: The PTEN tumor suppressor protein: an antagonist of phosphoinositide 3-kinase signalling. *Biochem Biophys Acta* 2000;1470:M21-M35.
 50. Kandel ES, Hay N: The regulation and activities of the multi-functional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res* 1999;253:210-229.
 51. Stein RC, Waterfield MD: PI3-kinase inhibition : a target for drug development? *Mol Med Today* 2000;6:347-357.
 52. Vanhaesebroeck B, Waterfield MD: Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res.* 253:239-254. doi:10.1006/excr. 4701, 1999.
 53. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME: Cellular survival : a play in three Acts. *Genes Dev* 1999;13(22):2905-27.
 54. Plas DR, Thompson CB: Akt-dependent transformation : there is more to growth than just surviving. *Oncogene* 2005;24(50):7435-7442.
 55. Zimmermann S, Moelling K: Phosphorylation and regulation of Raf by Akt(protein kinase B). *Science* 1999;286(5445):1741-1744.
 56. Daniel T. Bergstralh, Jenny PY. Ting: Microtubule stabilizing agents: Their molecular signaling consequences and the potential for enhancement by drug combination *Cancer Treatment Reviews* 2000;32:166-179.
 57. Cheng JQ, Lindsley CW, Cheng GZ, et al: The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery. *Oncogene* 2005;24(50): 7482-7492.
 58. MacKeigan JP, Taxman DJ, Hunter D, et al: Inactivation of the antiapoptotic phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway by the combined treatment of Taxol and mitogen-activated protein kinase inhibition. *Clin Cancer Res* 2002;8(7):2091-2099.
 59. Hu L, Hofmann J, Lu Y, et al: Inhibition of phosphatidylinositol 30-

- kinase increases efficacy of paclitaxel *in vitro* and *in vivo* ovarian cancer models. *Cancer Res* 2002;62(4):1087-1092.
60. Shingu T, Yamada K, Hara N, et al: Synergistic augmentation of antimicrotubule agent-induced cytotoxicity by a phosphoinositide 3-kinase inhibitor in human malignant glioma cells. *Cancer Res* 2003;63(14):4044-4047.
 61. Schultz RM, Merriman RL, Andis SL, et al: *In vitro* and *in vivo* anti-tumor activity of the phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor, wortmannin. *Anticancer Res* 1995;15:1135-1139.
 62. Price BD, Youmell MB: The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor wortmannin sensitises murine fibroblasts and human tumor cells to radiation and blocks induction of p53 following DNA damage. *Cancer Res* 1996;56:246-250.
 63. Davol PA, Bizuneh A, Frackelton AR Jr.: Wortmannin, a phosphoinositide 3-kinase inhibitor, selectively enhances cytotoxicity of receptor-directed-toxin chimeras *in vitro* and *in vivo*. *Anti-cancer Res* 1999;19:1705-1713.
 64. Lemke LE, Paine-Murrieta GD, Taylor CW, Powis G: Wortmannin inhibits the growth of mammary tumors despite the existence of a novel wortmannin-insensitive phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999;44:491-497.
 65. Amornphimoltham P, Sriuranpong V, Patel V, et al: Persistent activation of the Akt pathway in head and neck squamous cell carcinoma: a potential target for UCN-01. *Clin Cancer Res* 2004;15;10(12 Pt 1):4029-37.
 66. Roymans D, Slegers H: Phosphatidylinositol 3-kinases in tumor progression. *Eur J Biochem* 2001;268:487-498.
 67. Li Y, Podsypanina K, Liu X, et al: Deficiency of pten accelerates mammary oncogenesis in MMTV-Wnt-1 transgenic mice. *BMC Mol Biol* 2:2. doi: 10.1186/1471-2199-2-2, 2001.
 68. Weng LP, Brown JL, Eng C: PTEN induces apoptosis and cell cycle arrest through phosphoinositide-3-kinase/Akt-dependent and -independent pathways. *Hum Mol Genet* 2001;10:237-242.
 69. Stefania Morrone: ANNEXIN V in "Purdue Cytometry CD-ROM Series, volume 4". Dept. Experimental Medicine & Pathology, University "La Sapienza", Rome, Italy.
 70. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, et al : A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995;17;184(1):39-51.
 71. Rowinsky E: The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents. *Annu Rev Med* 1997; 48:353374.
 72. Sharon L. Schendel, Zihua Xie, Myrta Oblatt Montal, et. al.: Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2, *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;13;94(10):5113-5118.
 73. Ciechomska I, Pyrzynska B, Kazmierczak, et al: Signalling and activation of Forkhead are indispensable for upregulation of FasL expression in apoptosis of glioma cell. *Oncogene* 2003;23:22(48): 7616-27.
 74. Bustamante J, Caldes Lopes E, Garcia M, et al: Disruption of mitochondrial membrane potential during apoptosis induced by Psc 833 and CsA in multidrug resistant lymphoid leukemia. *Toxicol Appl Pharmacol* 15 190(1):44-51.
 75. Igarashi K, Hirotsani H, Woo JT, et al.: Cyclosporin A and Fk506 induce osteoclast apoptosis in mouse bone marrow cell cultures. *Bone* 2004;35(1):47-56.
 76. Kruijtzter CM, Schellens JH, Mezger J, et al.: Phase II and pharmacologic study of weakly oral paclitaxel plus cyclosporine in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2002;20(23):4508-4516.
 77. Nomura T, Yamamoto H, Mimata H, et al.: Enhancement by cyclosporin A of taxol-induced apoptosis of human urinary bladder cancer cells. *Urol Res* 2002;30(2):102-111.
 78. Kemper Em, van Zandberger Ae, Cleypool C, et al.: Increased penetration of paclitaxel into the brain by inhibition of P-glycoprotein. *Clin Cancer Res* 2003;9(7):2849-2855.
 79. Bardelimeijer HA, Ouwehand M, Meijnen JH, et al.: Efficacy of novel p-glycoprotein inhibitors to increase the oral uptake of paclitaxel in mice. *Invest New Drug* 2004;22(3):219-229.
 80. Torres K, Horwitz SB: Mechanism of Taxol-induced cell death are concentration dependent. *Cancer Res* 1998;58:3620-3626.