

## Prodigiosin이 두경부 종양세포주의 TRAIL매개 세포자멸사에 미치는 효과

고신대학교 의과대학 이비인후과학교실,<sup>1</sup> 계명대학교 의과대학 면역학교실<sup>2</sup>  
김주연<sup>1</sup> · 이강대<sup>1</sup> · 이환호<sup>1</sup> · 김우성<sup>1</sup> · 이재훈<sup>1</sup> · 박종욱<sup>2</sup>

### Effect of Prodigiosin on TRAIL-Mediated Apoptosis of Head and Neck Cancer Cell

Joo Yeon Kim, MD, PhD<sup>1</sup>, Kang Dae Lee, MD, PhD<sup>1</sup>, Hwan Ho Lee, MD, PhD<sup>1</sup>,  
Woo Sung Kim, MD<sup>1</sup>, Jae Hoon Lee, MD<sup>1</sup> and Jong Wook Park, PhD<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, College of Medicine, Kosin University,  
Gospel Hospital, Busan,

<sup>2</sup>Department of Immunology, Keimyung University, College of Medicine, Daegu, Korea

#### —ABSTRACT—

**Background and Objectives** : Prodigiosin (PG) is a red pigment produced by *Serratia marcescens* with immunosuppressive and apoptotic activities. The purpose of this study was to evaluate the apoptotic effect and mechanism of PG on head and neck cancer, and show possibility of combination treatment with tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL) in TRAIL resistant cancer cells. **Materials and Methods** : Three head and neck cancer cell lines (AMC-HN4, AMC-HN6, AMC-HN9) were treated with PG and TRAIL. In order to know the mechanism of apoptosis, caspase 3 activity and apoptosis related protein expression were monitored by Western blotting. **Results** : TRAIL and PG induced apoptosis of AMC-HN9 cancer cells in dose-dependent manner. In AMC-HN4 cancer cells cotreated with PG and TRAIL, apoptosis was increased with up-regulation of PARP and DR5 expression and down-regulation of inactive form of caspase 3. **Conclusions** : PG effectively recovers TRAIL sensitivity in AMC-HN4, TRAIL and PG-resistant cancer cells, via DR5 up-regulation. PG alone or combination therapy with TRAIL could be a potent new strategy for treating head and neck cancer. (J Clinical Otolaryngol 2008;19:63-71)

**KEY WORDS** : Head and neck cancer · Prodigiosin · TRAIL · Apoptosis.

## 서 론

Prodigiosin (2-methyl-3-pentyl-6-methoxypro-

논문접수일 : 2008년 4월 1일  
심사완료일 : 2008년 4월 29일  
교신저자 : 이강대, 602-702 부산광역시 서구 암남동 34  
고신대학교 의과대학 이비인후과학교실  
전화 : (051) 990-6284 · 전송 : (051) 245-8539  
E-mail : kdlee@ns.kosinmed.or.kr

digiosene, PG)은 *Serratia marcescens*에서 추출된 적색 색소로 T 세포매개 면역반응을 억제하는 면역억제성이 있으며, 항균, 항말라리아와 항암 효과에 대하여 연구가 보고되고 있다. PG는 조혈암 세포,<sup>1)</sup> 위암 세포,<sup>2)</sup> 유방암 세포와<sup>3)</sup> 폐암세포 등<sup>4)</sup> 다양한 인간 종양세포주에 세포자멸사(apoptosis)를 촉진시킨다. 그러나 이 물질은 정상 림프구나 암이 아닌 세포주에는 큰 독성을 보이지 않아 면역억제제 또는 항암제로 활용가치가 매우 높다.<sup>5)</sup> PG의 항암기전은 리소솜성 알킬화에 의해 세포내

pH를 변화시키거나,<sup>6)</sup> 세포주기에서 G1-S 이행을 중지시켜 세포증식을 억제하며,<sup>7)</sup> DNA에 손상을 일으켜 세포독성을 나타내는 것으로 보고되고 있다.<sup>8)</sup> 또한 mitogen activated protein kinase(MAPK) 조절인자로서 PG의 다양한 역할이 보고되고 있다.<sup>9)</sup>

더욱이 여러 암세포주의 연구에 의하면 미토콘드리아 매개 세포자멸사를 일으키며 이런 작용은 P53 결함 세포주에서도 나타나므로 PG는 항암제로 높은 활용성이 기대되고 있다.<sup>1)10)</sup>

Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand(TRAIL)은 종양괴사인자(tumor necrosis factor) 족에 속하는 단백질로 Fas 리간드와 종양괴사인자로 이루어져 있다. 이들 구성인자의 역할과 마찬가지로 TRAIL은 두개의 사멸수용체(death receptor, DR), 즉 DR4 및 DR5에 결합하여 다양한 종양세포에서 TRAIL매개 세포자멸사를 일으키게 된다.<sup>11)</sup> DR은 세포질의 사멸영역(death domain)의 발현으로 인해 아답터 단백질(adaptor protein)과 결합하여 procaspase 8을 활성화시킨다.<sup>11)</sup> 이러한 caspase 8을 통한 세포자멸사는 caspase 3 활성을 통한 경로와 미토콘드리아를 매개로 하는 경로로 나뉜다. 종양괴사인자나 Fas 리간드의 치명적인 독성과는 달리 TRAIL은 암세포주에서 선택적으로 세포자멸사를 일으키며, 정상세포에서는 세포독성을 나타내지 않는 것으로 알려져 있다.<sup>12)</sup> TRAIL은 이러한 장점으로 인하여 항암제로 개발하기 위해 많은 연구가 진행되고 있다. 그러나 최근 연구에서 TRAIL에 내성을 가지는 암세포들이 보고되고 있어 TRAIL 단독 치료만으로는 다양한 암세포에 대한 효과적인 항암제 역할을 할 수 없을 것으로 생각된다.<sup>13)</sup> 따라서 TRAIL에 대한 내성을 극복하고 감수성을 높일 수 있는 TRAIL sensitizer에 대한 연구가 필요하다.

본 연구에서는 PG가 효과적으로 두경부 종양세포 사멸하고, 특히 TRAIL에 내성을 가지는 세포주에 대해 sensitizer로서 세포자멸 유도효과를 상승시키는 기전을 규명하고자 하였다. PG와 TRAIL 병용치료의 효과적인 결과들은 다양한 항암제 내성을 지니는 두경부암에 안전하고 효과적인 치료법을 제시할 수 있을 것이다. 더욱이 본 연구는 우리가 아는 한, PG의 TRAIL매개 세포자멸사에서 효과가 상승되는 기전을 밝힌 첫 보고이다.

## 대상 및 방법

### 시료 및 항체

PG는 *Serratia marcescens*에서 생산되는 붉은색 색소로 한국생명공학 연구원 생물자원센터 김영국 박사로부터 제공받았으며, 그 구조는 Fig. 1과 같다(분양번호 KCTC 0386BP).

세포사멸 작용을 보이는 TRAIL은 KOMA Biotech (Korea)사에서 구입하였으며, 항산화제인 N-Acetyl-L-Cysteine(NAC)과 caspase 억제제인 Benzyloxy-carbonyl-Val-Ala-Asp-CH<sub>2</sub>OC(O)-2, 6,-dichlorobenzene(z-VAD)는 Carbiochem(Germany)사 제품을 구입하여 사용하였다. Western blot에 사용한 항체로 heat shock cognate protein(Hsc) 70과 C/EBP-homologous protein(CHOP), myeloid cell leukemia 1(Mcl-1) 및 Phospholipase C(PLC)- $\gamma$ 1에 대한 항체는 Santa Cruz(USA)사에서, caspase 3에 대한 항체는 Stressgen(USA)사에서, X-linked inhibitor of apoptosis protein(XIAP)에 대한 항체는 BD Biosciences(USA)사에서, 그리고 poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)에 대한 항체는 Cell signaling(USA)사에서, death receptor(DR) 5에 대한 항체는 KOMA Biotech(Korea)사에서 구입하여 사용하였다.

### 방법

#### 세포배양

두경부 종양세포주인 AMC-HN4, AMC-HN6 및 AMC-HN9 세포주는 아산의료원 이비인후과 교실에서 분양받았다. 세포주의 배양에는 10% fetal calf serum(FCS), 20 mM HEPES buffer와 100  $\mu$ g/ml genta-

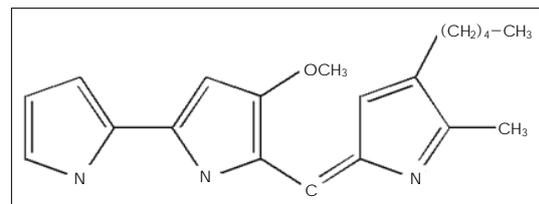


Fig. 1. The structure of prodigiosin.

micin이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's medium(DMEM)을 사용하였다.

#### 세포자멸사 분석

배양된 세포를  $2.5 \times$  trypsin-EDTA(Gibco, USA)로 떼어내어 세포를 수거한 후 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척하였다. PBS 100  $\mu$ g를 첨가하여 세포를 부유한 다음 여기에 100% ethanol을 200  $\mu$ g 첨가하여 4°C에서 1시간 이상 세포를 고정하였다. 세포를 원심하여 상층을 제거한 후 PBS 100  $\mu$ g를 첨가하여 세포를 부유시켰다. 여기에 50  $\mu$ g/ml RNase A(Sigma, USA)를 250  $\mu$ g 넣고 37°C에서 30분 경과 후 50  $\mu$ g/ml propidium iodide(Sigma, USA)를 동량 첨가하고 빛을 차광하여 37°C에서 20분간 반응시켰다. FACS Calibur-A flow cytometry(BD, USA)를 사용하여 세포주기와 세포자멸사(%)를 측정하였으며, 3회 반복하여 평균과 표준편차를 구하였다.

#### Western blotting

배양한 세포를 수거한 후  $0.8 \times 10^6$ 개의 세포를 lysis buffer(137 mM NaCl, 15 mM EGTA, 0.1 mM sodium orthovanadate, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100, 25 mM MOPS, 100  $\mu$ M phenylmethylsulfonyl fluoride, 20  $\mu$ M leupeptin, pH 7.2) 50-100  $\mu$ g에 부유시켜 세포를 용해하였다. 용해된 세포를 12,000 rpm으로 30분간 원심하여 상층을 수거하였다. Protein assay reagent kit(Pierce, USA)로 단백질 농도를 측정하고 정량한 후 동일량을 polyacrylamide gel에 점종하여 전기영동하였다. 영동 후 Immobilon-P membranes(Millipore corporation, USA)에 단백질을 옮긴 후 각 표적단백질에 대한 항체와 결합시킨 다음 ECL Western blotting kit(Millipore corporation, USA)을 이용하여 특이적인 단백질을 검출하였다.

#### Caspase 3 activity assay

Caspase 3 활성을 측정하기 위하여 96 well microplate에 100  $\mu$ l reaction buffer(1% NP-40, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 137 mM NaCl, 10% glycerol)와 cell lysates를 20  $\mu$ g 넣은 뒤 5  $\mu$ M DEVD-pNA(a

caspase 3 substrate)를 첨가하였다. 37°C에서 2시간 반응시킨 뒤 405 nm에서 spectrophotometer를 이용해 흡광도를 측정하였다.

## 결 과

### TRAIL의 두경부 종양세포주 세포자멸사 유도 효과

TRAIL이 두경부 종양세포주에 세포자멸사를 일으키는지를 알아보기 위하여 3종의 두경부 종양세포주에 TRAIL을 20 또는 30 ng/mL 농도로 처치하고 18시간 배양한 후 세포를 수거하였다. Propidium iodide로 세포를 염색한 후 유세포 분석기를 이용해 세포자멸사를 나타내는 sub G1기 세포 수를 측정된 결과 TRAIL 처치 농도가 증가할수록 세포자멸사가 증가함을 보였다. 3종의 세포주 중 TRAIL 매개 세포자멸사가 가장 잘 일어나는 세포주는 AMC-HN9이었으며, TRAIL 매개 세포자멸사에 가장 내성을 보이는 세포주는 AMC-HN4로 나타났다(Fig. 2).

### TRAIL처리가 caspase 3 활성화에 미치는 영향

TRAIL매개 세포자멸사에 caspase 3가 관여하는지를 알아보기 위해 3종의 두경부 종양세포주에 TRAIL을 20 또는 30 ng/mL 농도로 처치하고 18시간 배양한 후 세포 단백질을 수거하여 caspase 3 활성을 측정하였다. TRAIL 처치 농도가 증가할수록 caspase 3 활성이 증가함을 보였다. 3종의 세포주 중 caspase 3 활성이 가장

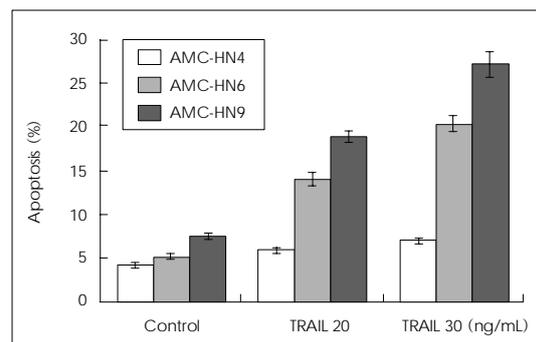


Fig. 2. Effect of TRAIL-mediated apoptosis on various head and neck cancer cells. AMC-HN4, AMC-HN6 and AMC-HN9 cells were treated with 20 or 30 ng/mL of TRAIL for 18 hours. Apoptosis of cancer cells was analyzed as a sub-G1 fraction by FACS.

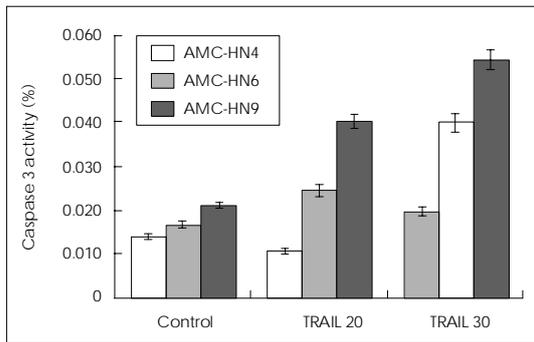
잘 일어나는 세포주는 AMC-HN9 이었으며, 가장 낮은 활성을 보이는 세포주는 AMC-HN4로 나타났다(Fig. 3).

**TRAIL처치가 두경부 중앙세포주의 세포자멸사 관련 단백질 발현에 미치는 효과**

3종의 두경부 중앙세포주에 TRAIL을 20 또는 30 ng/mL 농도로 처치하고 18시간 배양한 후 세포 단백질을 수거하여 전기영동하고 Western blot을 실시하였다. TRAIL처치에 따른 PLC- $\gamma$ 1 분쇄형의 출현은 AMC-HN9세포가 가장 뚜렷하였으며, 비 활성화형 caspase 3의 감소는 TRAIL을 처치한 AMC-HN6 및 AMC-HN9 세포에서 나타났다. DR5는 AMC-HN4와 AMC-HN6 세포에서는 검출이 되지 않았으며, AMC-HN9 세포에서는 TRAIL처치에 의해 DR5 발현이 다소 감소하였다(Fig. 4).

**PG의 세포자멸사 유도효과 및 세포자멸 관련 단백질 발현에 미치는 영향**

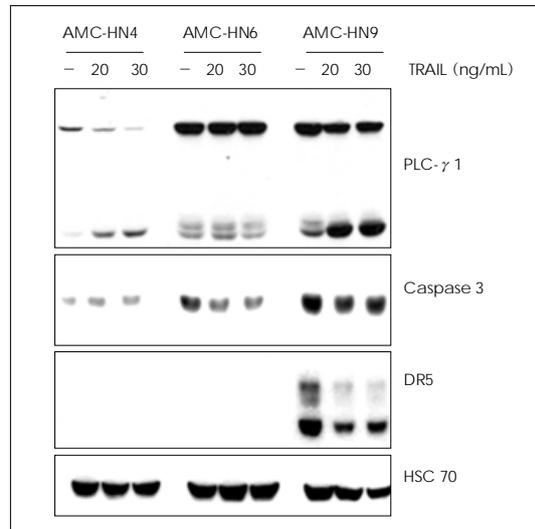
PG가 두경부 중앙세포주에 세포자멸사를 일으키는지를 알아보기 위하여 3종의 두경부 중앙세포주에 PG를 0.5, 1 또는 2  $\mu$ M 농도로 처치하고 18시간 배양한 후 세포를 수거하였다. Propidium iodide로 세포를 염색한 후 유세포 분석기를 이용해 세포자멸사를 나타내는 sub G1기 세포수를 측정된 결과, PG 처치 농도가 증가할수록 세포자멸사가 증가함을 보였다. 3종의 세포주 중 PG매개 세포자멸사가 가장 잘 일어나는 세포주는 AMC-HN9



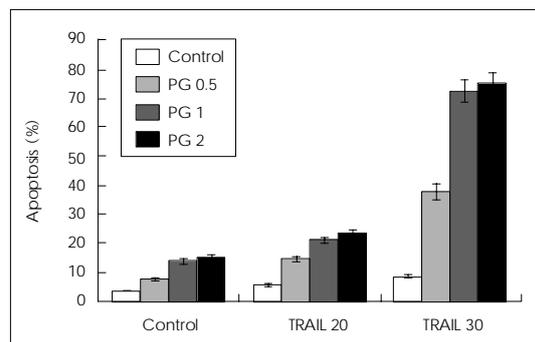
**Fig. 3.** Effect of TRAIL on caspase activation in various head and neck cancer cells. AMC-HN4, AMC-HN6 and AMC-HN9 cells were treated with 20 or 30 ng/mL of TRAIL for 18 hours. Equal amounts of cell lysates were subjected to analyze caspase 3 activity.

이였으며, PG 매개 세포자멸사에 가장 내성을 보이는 세포주는 AMC-HN4로 나타났다(Fig. 5).

PG가 3종의 두경부 중앙세포주의 세포자멸사 관련 단백질 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여, AMC-HN4, AMC-HN6 및 AMC-HN9 세포주에 PG를 0.5, 1 또는 2 M 농도로 처치하고 18시간 배양한 후 단백질을 수거하고 Western blot을 실시하였다(Fig. 6).



**Fig. 4.** Effect of TRAIL on apoptosis-related protein expression in various head and neck cancer cells. AMC-HN4, AMC-HN6 and AMC-HN9 cells were treated with 20 or 30 ng/mL of TRAIL for 18 hours. Equal amounts of cell lysates were subjected to electrophoresis and analyzed by Western blot for PLC- $\gamma$ 1, caspase 3 and DR 5. HSC 70 was used as control for the loading of protein level.



**Fig. 5.** Effect of PG on induction of apoptosis in various head and neck cancer cells. AMC-HN4, AMC-HN6 and AMC-HN9 cells were treated with 0.5, 1 or 2 M of PG for 18 hours. Apoptosis of cancer cells was analyzed as a sub-G1 fraction by FACS.

첨가한 PG농도가 증가함에 따라 3종의 두경부 세포주에서 PARP 분쇄형의 출현이 증가하였다. 비활성형 caspase 3의 감소는 PG를 처리한 AMC-HN4 및 AMC-HN9 세포에서 나타났다. DR5는 3종의 세포 모두에서 PG처리 농도에 따라 발현이 증가되었으며, Mcl-1 long form의 감소는 PG를 처리한 AMC-HN9 세포주에서 가장 뚜렷이 나타났다. XIAP의 발현은 세포주간 차이가 없었으며, PG에 의해서도 변화가 나타나지 않았다.

**Caspase차단이 PG에 의한 세포자멸사 및 세포자멸-관련 단백질 발현에 미치는 영향**

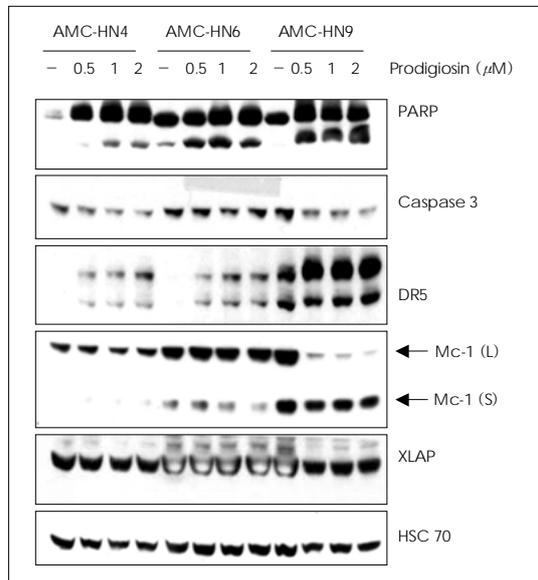
AMC-HN4 및 AMC-HN9 세포주에 PG(1 μM), z-VAD(50 μM) 또는 PG와 z-VAD를 병용 처리한 후 18시간 배양하였다. 세포를 수거하여 propidium iodide로 염색한 후 유세포 분석기를 이용해 세포자멸사를 나타내는 sub G1기 세포수를 측정된 결과 Fig. 5에서와 같이 PG처치에 의해 세포자멸사가 증가하였으며, AMC-HN4보다 AMC-HN9에서 세포자멸사가 더 뚜렷이 나

타났다. 그러나 두 세포주 모두에서 PG와 더불어 z-VAD를 처리한 경우 세포자멸사가 대부분 차단되었다. z-VAD를 단독으로 처리한 군에서는 세포자멸사가 대조군과 같은 수준으로 거의 나타나지 않았다(Fig. 7).

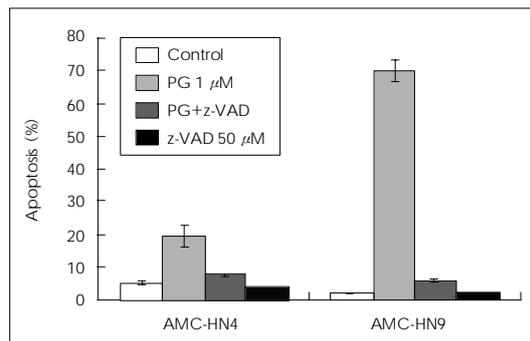
z-VAD를 이용한 caspase 작용차단이 세포자멸관련 단백질 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여, AMC-HN4 및 AMC-HN9 세포주에 PG 0.7 M, z-VAD 50 M 또는 PG와 z-VAD를 병용 처리한 후 18시간 배양하였다. 단백질을 수거하여 Western blot을 실시한 결과 AMC-HN9세포에서 PG 처치에 의해 나타난 PLC-γ 분쇄형이 z-VAD를 처치함으로써 사라짐을 볼 수 있었으며 두 세포주 모두에서 비활성형 caspase 3의 감소는 보이지 않았다. 두 세포주 모두에서 PG처치에 의해 DR5 발현이 증가되었으며, PG와 z-VAD를 동시에 처리한 군에서도 DR5가 증가하였다. AMC-HN9 세포주에서 PG처치에 의해 감소된 Mcl-1은 z-VAD 처치에 의해 차단되었다(Fig. 8).

**항산화제 NAC이 PG매개 세포자멸사에 미치는 영향**

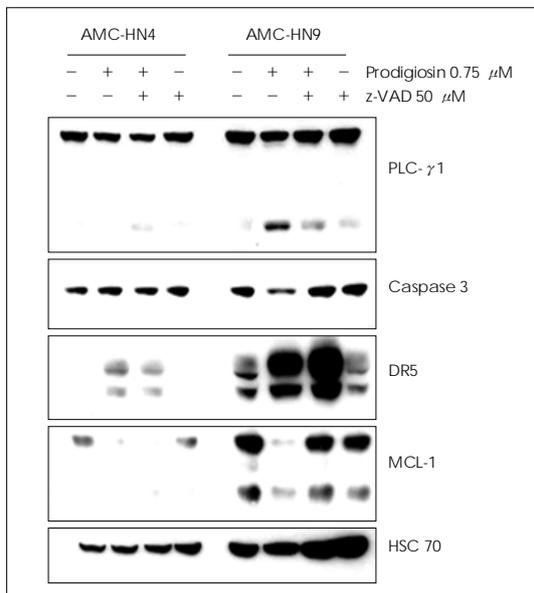
Reactive oxygen species(ROS)가 PG매개 세포자멸사에 영향을 주는지를 규명하기 위해AMC-HN9세포주에 PG 0.5 μM, NAC 50 μM 또는 PG와 NAC을 병용 처리하고 18시간 배양한 후 세포를 수거하였다. Propidium iodide로 세포를 염색한 후 유세포 분석기를 이용해 세포자멸사를 나타내는 sub G1기 세포수를 측정된 결과 PG처치 군에서 세포자멸사가 증가하였으나 NAC은



**Fig. 6.** Effect of PG on apoptosis-related protein expression in various head and neck cancer cells. AMC-HN4, AMC-HN6 and AMC-HN9 cells were treated with 0.5, 1 or 2 μM of PG for 18 hours. Equal amounts of cell lysates were subjected to electrophoresis and analyzed by Western blot for PARP, caspase 3, DR 5, Mcl-1 and XIAP. HSC 70 was used as control for the loading of protein level.



**Fig. 7.** Caspase 3 inhibitor (z-VAD) inhibits PG-induced apoptosis. AMC-HN4 and AMC-HN9 cells were treated with PG (1 μM) or z-VAD (50 μM) alone or PG and z-VAD for 18 hours. Apoptosis of cancer cells was analyzed as a sub-G1 fraction by FACS.



**Fig. 8.** Effect of caspase-3 inhibitor (z-VAD) on PG-mediated protein expressions. AMC-HN4 and AMC-HN9 cells were treated with PG (1M) or z-VAD (50 μM) alone or PG and z-VAD for 18 hours. Equal amounts of cell lysates were subjected to electrophoresis and analyzed by Western blot for PLC-γ1, caspase 3, DR 5, Mcl-1 and XIAP. HSC 70 was used as control for the loading of protein level.

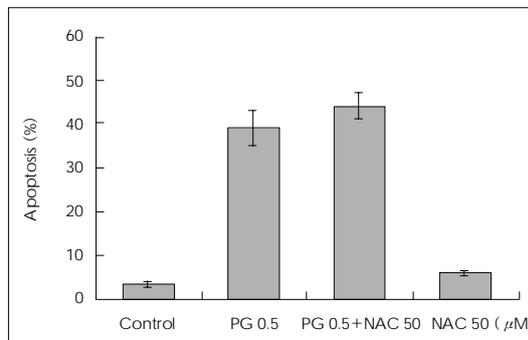
PG에 의한 세포자멸사에 영향을 미치지 않았다(Fig. 9).

**DR5 발현 차단이 PG 관련 세포자멸사에 미치는 영향**

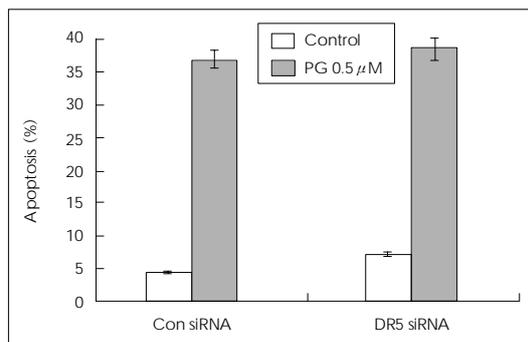
PG가 AMC-HN9 세포주에서 DR5 발현을 증가시켰으며, PG의 이러한 작용이 z-VAD에 차단되지 않았다(Fig. 8). PG에 의한 세포자멸사에 DR5의 연관성을 규명하기 위해 AMC-HN9 세포 주에 DR5siRNA 또는 control siRNA를 감염시킨 후 PG(0.5 μM)를 처리하고 18 시간 배양하였다. Propidium iodide로 세포를 염색한 후 유세포 분석기를 이용해 세포자멸사를 나타내는 sub G1 기 세포수를 측정된 결과 대조군과 DR5siRNA를 처리한 두 군 모두에서 세포자멸사가 증가하였다(Fig. 10).

**PG와 TRAIL 병용에 의한 세포자멸사 유도효과**

PG 또는 TRAIL에 의한 세포자멸사에 가장 내성을 보이는 AMC-HN4 세포를 대상으로 두 약제를 병용할 때의 세포자멸성을 알아보기 위하여, AMC-HN4 세포에 PG(0.75 μM), TRAIL(30 ng/mL) 또는 PG와 TRAIL



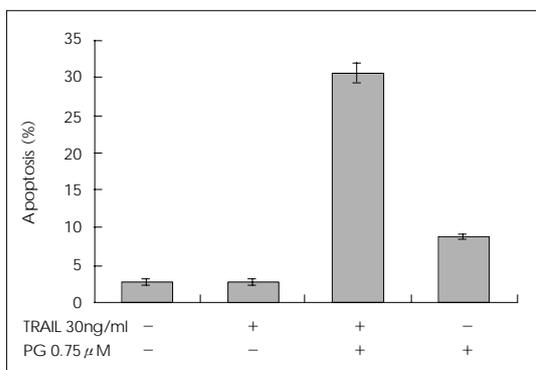
**Fig. 9.** Effect of antioxidant NAC on PG-induced apoptosis in AMC-HN9 cells. AMC-HN9 cells were treated with PG (0.5 M) or NAC (50 M) alone or PG and z-VAD for 18 hours. Apoptosis of cancer cells was analyzed as a sub-G1 fraction by FACS.



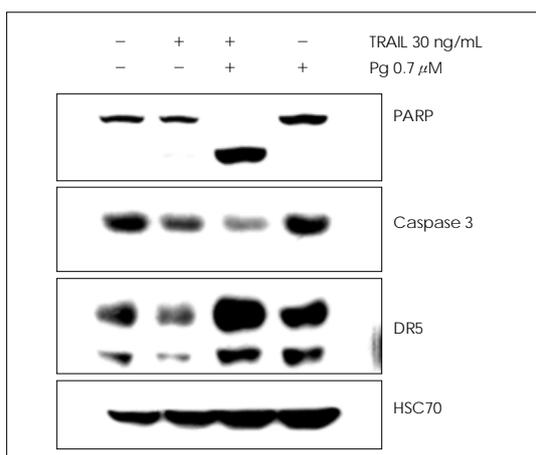
**Fig. 10.** Effect of DR5 down-regulation on PG induced apoptosis in AMC-HN9 cells. AMC-HN9 cells transfected with DR5siRNA or control siRNA were treated with PG (0.5 M) for 18 hours. Apoptosis of cancer cells was analyzed as a sub-G1 fraction by FACS.

을 병용 처리하고 배양한 후 유세포분석을 통해 sub G1 기 세포수를 측정된 결과, Fig. 2 및 5에서와 같이 PG 또는 TRAIL 단독 처리군에서는 세포자멸사가 크지 않았다. 그러나 두 물질을 동시에 처리한 군에서는 세포자멸사가 매우 증가하였다(Fig. 11).

PG와 TRAIL 병용효과의 기전을 규명하기 위해 AMC-HN4 세포에 PG (0.75 μM), TRAIL(30 ng/mL) 또는 PG와 TRAIL을 병용 처리하고 배양한 후 단백질을 수거하여 Western blot을 실시한 결과, PG 또는 TRAIL 단독 처리시는 PARP 분쇄형의 증가와 비활성형 caspase 3의 감소가 나타나지 않았으나, 두 물질을 동시에 처리한 군에서는 세포자멸사 증가와 더불어 PARP 분쇄형은 증가하고 비 활성형 caspase 3의 감소가 나타났다. 또



**Fig. 11.** PG sensitizes AMC-HN4 cells to TRAIL-mediated apoptosis. AMC-HN4 cells were treated with PG (0.75 μM) or TRAIL (30 ng/mL) or PG and TRAIL for 18 hours. Apoptosis of cancer cells was analyzed as a sub-G1 fraction by FACS.



**Fig. 12.** Effect of PG and TRAIL on apoptosis-related proteins expression in AMC-HN4 cells. AMC-HN4 cells were treated with PG (0.75 μM) or TRAIL (30 ng/mL) or PG and TRAIL for 18 hours. Equal amounts of cell lysates were subjected to electrophoresis and analyzed by Western blot for PARP, caspase 3 and DR 5. HSC 70 was used as control for the loading of protein level.

DR5의 발현도 두 물질 병용한 경우에만 현저히 증가함을 보였다(Fig. 12).

## 고 찰

세포자멸사 경로에는 크게 DR을 경유한 외부경로와 미토콘드리아를 매개로 하는 내부경로가 있다.<sup>14)</sup> DR을 경유하는 한 경로 중의 하나로서 TRAIL은 세포막에 있

는 TRAIL 수용체, 즉 DR4와 DR5에 결합하여 세포자멸사를 유발할 수 있다.<sup>11)</sup> 또한 TRAIL은 다양한 종양세포에서 세포자멸사를 유도하지만 정상세포에는 세포독성이 없는 항종양물질이다. TRAIL이 세포표면의 DR에 결합하면 Fas-associated death domain의 활성화를 거쳐 caspase 8이 활성화됨으로서 세포자멸이 야기된다.<sup>11)</sup> 따라서 이들 DR의 발현율은 TRAIL매개 세포자멸사에 중요한 부분이다. 그러나 종양세포들은 DR 발현 감소, DR매개 신호전달 차단 등 여러가지 기전을 이용해 TRAIL에 내성을 보이는 경우가 많으며,<sup>13)</sup> 이러한 현상은 TRAIL의 임상적 사용에 많은 한계를 갖게 한다. 따라서 TRAIL에 대한 내성을 억제하고 감수성을 높일 수 있는 TRAIL sensitizor에 대한 연구가 최근 이루어지고 있다.

3종의 두경부 종양세포를 대상으로 TRAIL에 의한 세포사멸 정도를 조사한 결과 모든 세포주에서 TRAIL의 농도가 증가함에 따라 세포사멸이 증가하였으나 세포 간 상대적 세포사멸 정도를 비교해보면 AMC-HN4 세포의 세포사멸 정도가 가장 낮게 나타났다. 또 TRAIL에 의한 caspase 3 활성 변화를 조사한 결과에서도 AMC-HN4 세포주의 caspase 3 효소 활성도가 가장 낮은 것으로 나타났다. 따라서 3종의 두경부 종양세포주 중 AMC-HN4 세포가 가장 TRAIL에 내성을 가지는 종양세포임을 알 수 있다.

각 두경부 종양세포주에서 TRAIL에 의해 나타나는 세포자멸사 관련 단백질의 변화를 보면 TRAIL 처리에 의해 비활성 caspase 3가 감소되고 caspase에 의해 PLC-γ1 파괴가 일어남을 알 수 있다. 그러나 이런 현상 역시 AMC-HN9에서는 뚜렷하나 AMC-HN4 세포에서는 상대적으로 미약하게 나타난다. TRAIL 수용체인 DR5 발현이 AMC-HN9 에는 뚜렷이 검출되나 AMC-HN4 세포에서는 거의 보이지 않음을 보아 AMC-HN4 세포가 TRAIL에 내성을 가지는 기전은 DR5 발현 감소에 의해 TRAIL의 세포 결합을 차단하기 때문인 것으로 생각된다 PG는 조혈암 세포,<sup>1)</sup> 위암 세포,<sup>2)</sup> 유방암 세포와<sup>3)</sup> 폐암세포 등<sup>4)</sup> 다양한 인간 종양세포주에 세포자멸사(apoptosis)를 촉진시킬 수 있다. PG가 두경부 종양세포에서도 세포자멸사를 일으킬 수 있는지 알아보기 위해 PG를 3종의 두경부 종양세포주에 처치하고 세포자멸사 정도를 분석한 결과 AMC-HN9 세포에서 세포자멸사가

가장 잘 일어났으며, AMC-HN4 세포는 TRAIL과 마찬가지로 PG에도 가장 내성을 보였다. 두경부 종양세포주에 PG를 처리하고 단백질 분석한 결과 PG농도가 증가함에 따라 비활성형 caspase 3가 감소되고 caspase에 의해 PARP 파괴가 일어남을 알 수 있다. 3종의 두경부 세포주 중 AMC-HN9 세포가 이 현상이 가장 뚜렷하고 AMC-HN4 세포는 변화가 가장 미미하였으며, 세포자멸사를 억제하는 단백질인 Mcl-1의<sup>15)</sup> 발현은 AMC-HN9 세포에서만 일어났다. 이 결과는 PG에 의한 세포자멸사에서 AMC-HN4 세포가 가장 내성이며, AMC-HN9 세포가 가장 감수성을 나타낸다. PG에 의해 유도되는 세포자멸사에 caspase가 직접적으로 관여하는지를 알아보기 위해 AMC-HN4 및 AMC-HN9 세포에 PG 및 caspase 억제제인 z-VAD를 각각 또는 병용처리하고 세포자멸사를 조사한 결과 AMC-HN4는 물론 AMC-HN9 세포에서도 세포자멸사가 완전히 차단됨을 보여, caspase가 PG에 의한 세포사멸에 중요한 역할을 하고 있음을 확인할 수 있었다. PG에 의한 세포자멸사 관련 단백질의 변화가 caspase에 의해 영향을 받는지를 분석하기 위해 상기한 실험에서 단백질을 추출하여 Western blotting을 실시한 결과 z-VAD가 PG에 의한 비활성 caspase 3 감소와 PLC- $\gamma$ 1 파괴를 차단하며, Mcl-1의 감소도 차단할 수 있음을 보였으나, PG에 의한 DR5증가에는 아무 영향이 없었다. 따라서 PG에 의한 Mcl-1의 감소는 PG에 의해 유도된 caspase의 단백질 분해 작용 때문이며, PG 처리에 의한 DR5의 발현 증가는 caspase와는 무관하게 일어남을 의미한다.

AMC-HN4 세포와 같이 많은 종양세포들이 다양한 기전을 이용해 TRAIL에 내성을 보이고 있으며,<sup>16)</sup> 종양화학예방제를 이용해 이런 종양세포들의 TRAIL에 대한 감수성을 증가시키는 연구들이 진행되어오고 있다.<sup>17-19)</sup> 본 연구결과에서 PG에 의한 세포자멸사 관련 단백질의 변화 중 가장 흥미로운 점은 PG가 3가지 세포주 모두에서 DR5의 발현을 증가시킨 점이다. DR5가 증가하면 종양세포가 TRAIL에 민감하게 반응하여 죽을 수 있기 때문에 PG의 이러한 작용은 TRAIL 내성 종양세포주를 TRAIL에 감수성을 가지게 할 가능성이 있음을 시사한다. AMC-HN4 세포주에 PG 또는 TRAIL을 각각 단독 또는 병용처리하고 세포자멸사를 분석한 결과 각각 사용

했을 때에 비해 두 물질을 병용한 군에서 세포자멸사가 현저히 증가하였다. 또 단백질 발현을 분석한 결과에서도 두 물질을 병용한 군에서 비활성 caspase 3 감소와 PLC- $\gamma$ 1 파괴가 현저히 증가하여 이 두 물질이 서로 상승작용 함을 알 수 있다. 또 DR5의 경우 두 물질을 병용한 군에서 발현이 더욱 증가하였다. 이상의 결과로 보아 PG에 의한 DR5 발현 증가가 AMC-HN4를 TRAIL에 민감하게 만드는 주 기전임을 알 수 있다.

종양세포에 손상을 주는 기전으로 항암물질에 의해 유발된 ROS 역시 중요한 역할을 하며, ROS는 TRAIL 수용체인 DR을 증가시키는 작용이 있다.<sup>20)</sup> 본 연구에서 PG에 의해 유도되는 두경부 종양세포 사멸에 ROS가 관여하는지를 알아보기 위해 PG와 ROS차단제인 NAC을 각각 또는 병용하여 처리하고 세포사멸 여부를 조사한 결과 NAC은 PG에 의한 세포자멸사를 전혀 차단하지 않았다. 이 결과는 PG의 항암작용에 ROS는 관여하지 않음을 시사한다. 또 PG가 유발하는 DR5의 역할을 증명하기 위해 AMC-HN9 세포주에 DR5를 특이하게 차단하는 DR5 siRNA를 전달하고 PG의 세포사멸작용을 분석한 결과 PG는 DR5 siRNA에 의한 DR5의 차단에도 불구하고 세포자멸사를 충분히 일으킴을 알 수 있었다. 따라서 PG는 DR5 및 ROS를 통한 세포사멸 이외에 다른 여러 가지 기전을 통해서도 두경부 종양세포의 세포사멸을 유발할 수 있음을 알 수 있다.

이상의 연구를 통하여 3종의 두경부 종양세포주 중 AMC-HN4가 TRAIL과 PG에 가장 내성을 보이는 세포주이며, TRAIL과 PG를 병용하면 DR5발현을 증가시켜 TRAIL에 감수성이 증가함을 처음으로 규명하였다. 또 PG는 DR5 발현 및 ROS 등과 무관하게 caspase의 존적으로 강한 항암력을 나타냄을 알 수 있다. PG의 항암력 및 항암기전과 더불어 두경부 종양세포의 TRAIL 저항성 극복에 관한 결과는 PG를 임상적으로 두경부암 환자의 치료에 이용할 수 있는 근거를 제공해준다.

## 결론

이상의 연구를 통하여 3종의 두경부 종양세포 중 AMC-HN4 세포가 TRAIL과 PG에 모두 내성을 보이는 세포주라는 것을 알 수 있다. 이 세포주에 TRAIL과 PG 병

용시 DR5 발현이 현저히 증가하고, caspase 활성화에 의한 세포자멸이 증가하는 것으로 보아, PG는 이 세포주에 DR5 발현을 증가시킴으로써 암세포를 TRAIL에 감수성이 되게 한다고 생각한다. 또 PG는 TRAIL과 DR5 또는 ROS와는 무관하게 두경부 종양세포주에 caspase 의존성 세포자멸사를 초래하는 작용이 있음을 알 수 있다.

항암제 중 일부는 암세포에 세포자멸사를 일으키는 작용을 한다. 각각의 항암물질은 특정 기전에 의해 손상과 기능파괴를 일으켜 세포자멸사에 이르도록 하므로, 최신 항암제 연구는 암세포에 더욱 선택적으로, 효과적인 작용을 하는 물질의 개발이라 할 수 있다. 따라서 PG 단독 또는 PG와 TRAIL 병용요법은 다양한 항암내성을 가지는 두경부 암에 대한 항암제 개발에 새로운 길을 제시할 것이라고 생각한다.

**중심 단어** : 두경부 종양 · Prodigiosin · TRAIL · 세포자멸사.

## REFERENCES

- 1) Montaner B, Navarro S, Piqué M, Vilaseca M, Martinell M, Giralt E, et al. Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. *Br J Pharmacol* 2000;131 (3):585-93.
- 2) Díaz-Ruiz C, Montaner B, Pérez-Tomás R. Prodigiosin induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in gastric cancer cell line HGT-1. *Histol Histopathol* 2001;16 (2):415-21.
- 3) Soto-Cerrato V, Llagostera E, Montaner B, Scheffer GL, Pérez-Tomas R. Mitochondria-mediated apoptosis operating irrespective of multidrug resistance in breast cancer cells by the anticancer agent prodigiosin. *Biochem Pharmacol* 2004;68 (7):1345-52.
- 4) Llagostera E, Soto-Cerrato V, Montaner B, Pérez-Tomás R. Prodigiosin induces apoptosis by acting on mitochondria in human lung cancer cells. *Ann NY Acad Sci* 2003;1010:178-81.
- 5) Yamamoto C, Takemoto H, Kuno K, Yamamoto D, Nakai K, Baden T, et al. Cycloprodigiosin hydrochloride, a  $H^+/Cl^-$  symporter, induces apoptosis in human colon cancer cell lines in vitro. *Oncol Rep* 2001;8 (4):821-4.
- 6) Sato T, Konno H, Tanaka Y, Kataoka T, Nagai K, Wasserman HH, et al. Prodigiosins as a new group of  $H^+/Cl^-$  symporters that uncouple proton translocators. *J Biolchem* 1998; 273 (34):21455-62.
- 7) Pérez-Tomás R, Montaner B. Effects of the proapoptotic drug prodigiosin on cell cycle-related proteins in Jurkat T cells. *Histol Histopathol* 2003;18 (2):379-85.
- 8) Melvin MS, Wootton KE, Rich CC, Saluta GR, Kucera GL, Lindquist N, Manderville RA. Copper-nuclease efficiency correlates with cytotoxicity for the 4-methoxypyrrrolic natural products. *J Inorg Biochem* 2001;87 (3):129-35.
- 9) Yamamoto D, Uemura Y, Tanaka K, Nakai K, Yamamoto C, Takemoto H, et al. Cycloprodigiosin hydrochloride  $H^+/Cl^-$  symporter induces apoptosis and differentiation in HL-60 cells. *Int J Cancer* 2000;88 (1):121-8.
- 10) Bunz F, Hwang PM, Torrance C, Waldman T, Zhang Y, Dillehay L, et al. Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J Clin Invest* 1999; 104 (3):263-9.
- 11) Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A. TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* 2000;12 (6):611-20.
- 12) Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 1997;277 (5327): 818-21.
- 13) Keane MM, Ettenberg SA, Nau MM, Russell EK, Lipkowitz S. Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines. *Cancer Res* 1999;59 (3):734-41.
- 14) Wilsin MR. Apoptotic signal transduction: emerging pathways. *Biochem Cell Biol* 1998;76 (4):573-82.
- 15) Cuconati A, Mukherjee C, Perez D, White E. DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells. *Genes Dev* 2003;17 (23):2922-32.
- 16) Lippa MS, Strockbine LD, Le TT, Branstetter DG, Strathdee CA, Holland PM. Expression of anti-apoptotic factors modulates Apo2L/TRAIL resistance in colon carcinoma cells. *Apoptosis* 2007;12 (8):1465-78.
- 17) Jung EM, Park JW, Choi KS, Park JW, Lee HI, Lee KS, et al. Curcumin sensitizes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis through CHOP-independent DR5 upregulation. *Carcinogenesis* 2006; 27 (10):2008-17.
- 18) Kim YH, Park JW, Lee JY, Kwon TK. Sodium butyrate sensitizes TRAIL-mediated apoptosis by induction of transcription from the DR5 gene promoter through Sp1 sites in colon cancer cells. *Carcinogenesis* 2004;25 (10):1813-20.
- 19) Lee TJ, Jung EM, Lee JT, Kim S, Park JW, Choi KS, et al. Mithramycin A sensitizes cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis by down-regulation of XIAP gene promoter through Sp1 sites. *Mol Cancer Ther* 2006;5 (11):2737-46.
- 20) Whibley CE, McPhail KL, Keyzers RA, Maritz MF, Leaner VD, Birrer MJ, et al. Reactive oxygen species mediated apoptosis of esophageal cancer cells induced by marine triprenyl toluquinones and toluhydroquinones. *Mol Cancer Ther* 2007;6 (9):2535-43.