

폐암세포주에서 저용량 시스플라틴에 의해 유도된 자가포식

원광대학교 의과대학 ¹내과학교실, ²흉부외과학교실, ³핵의학교실, ⁴방사선종양학교실, ⁵병리학교실

신정현¹, 장혜연¹, 정진수¹, 조경화¹, 황기은¹, 김소영¹, 김휘정¹, 이삼윤², 이미경², 박순아³, 문성록⁴, 이강규⁴, 조향정⁵, 양세훈¹

Induction of Autophagy by Low Dose of Cisplatin in H460 Lung Cancer Cells

Jeong Hyun Shin, M.D.¹, Hye Yeon Jang, B.S.¹, Jin Soo Chung, M.D.¹, Kyung Hwa Cho, M.D.¹, Ki Eun Hwang, M.D.¹, So Young Kim, M.D.¹, Hui Jung Kim, M.D.¹, Sam Youn Lee, M.D.², Mi Kung Lee, M.D.², Soon Ah Park, M.D.³, Sun Rock Moon, M.D.⁴, Kang Kyu Lee, M.D.⁴, Hyang Jeong Jo, M.D.⁵, Sei Hoon Yang, M.D.¹

Departments of ¹Internal Medicine, ²Thoracic Surgery, ³Nuclear Medicine, ⁴Therapeutic Radiology & Oncology, ⁵Pathology, Wonkwang University College of Medicine, Iksan, Korea

Background: Most lung cancer patients receive systemic chemotherapy at an advanced stage disease. Cisplatin-based chemotherapy is the main regimen for treating advanced lung cancer. Recently, autophagy has become an important mechanism of cellular adaptation under starvation or cell oxidative stress. The purpose of this study was to determine whether or not autophagy can occurred in cisplatin-treated lung cancer cells.

Methods: H460 cells were incubated with RPMI 1640 and treated in 5 μ M or 20 μ M cisplatin concentrations at specific time intervals. Cells surviving cisplatin treatment were measured and compared using an MTT cell viability assay to cells that underwent apoptosis with autophagy by nuclear staining, apoptotic or autophagic related proteins, and autophagic vacuoles. The development of acidic vascular organelles was using acridine orange staining and fluorescent expression of GFP-LC3 protein in its transfected cells was observed to evaluate autophagy.

Results: Lung cancer cells treated with 5 μ M cisplatin-treated were less sensitive to cell death than 20 μ M cisplatin-treated cells in a time-dependent manner. Nuclear fragmentation at 5 μ M was not detected, even though it was discovered at 20 μ M. Poly (ADP-ribose) polymerase cleavages were not detected in 5 μ M within 24 hours. Massive vacuolization in the cytoplasm of 5 μ M treated cells were observed. Acridine orange stain-positive cells was increased according in time-dependence manner. The autophagosome-incorporated LC3 II protein expression was increased in 5 μ M treated cells, but was not detected in 20 μ M treated cells. The expression of GFP-LC3 were increased in 5 μ M treated cells in a time-dependent manner.

Conclusion: The induction of autophagy occurred in 5 μ M dose of cisplatin-treated lung cancer cells.

Key Words: Autophagy; Cisplatin; Lung Neoplasms

서 론

항암 화학 요법에 의한 세포 죽음은 세포괴사 외에 세

포괴사(apoptosis)라는 기전에 의해 세포 죽음이 일어난다고 알려져 있고, 세포괴사는 항암치료 효과를 나타내는 중요한 기전으로 알려져 있다¹. 최근 연구에서 계획된 세포죽음(programmed cell death, PCD)은 전적으로 세포괴사만을 의미하는 것이 아니고, 세포가 스스로 파괴되어 서로 다른 형태와 방법을 사용하여 세포죽음을 유도한다는 것이 알려지기 시작했다^{2,7}. 이러한 세포 죽음을 type II PCD라고 하고, 최근에는 PCD를 type I 세포괴사, type II 자가포식(autophagy)으로 분류하였으며, type II는 특

Address for correspondence: Sei Hoon Yang, M.D.
Department of Internal Medicine, Wonkwang University Hospital, 344-2, Shinyong-dong, Iksan 570-711, Korea
Phone: 82-63-859-2582, Fax: 82-63-855-2025
E-mail: yshpul@wonkwang.ac.kr

Received: May. 8, 2010

Accepted: Jun. 25, 2010

정적으로 자가포식낭(autophagic vacuole)형성이 과도하게 일어나 이 현상을 자가포식에 의한 세포 죽음(auto-phagic cell death)으로 명명하였다². 자가포식이란 세포가 기아상태 또는 스트레스에 대한 대사분해반응으로, 세포 내 대사를 유지하기 위하여 세포 단백질, 세포 소기관(organelles) 그리고 세포질이 탐식 및 소화되고 재사용되는 것을 말한다¹.

자가포식은 병원체 제거, 자멸한 세포의 탐식작용에도 관여한다. 대부분 정상세포에서는 항상성을 유지하는 정도의 자가포식이 일어나는데, 이는 단백질 응집과 결합이 있는 세포의 하부구조물 축적을 막기 위해 일어난다⁸.

자가포식은 낮은 수준의 자극에 의해서 유도되는 경우 세포 내 항상성 유지 및 생존에 필수적인 기전으로 이해되지만, 과도한 자극에서는 자가포식이 type II PCD로 진행되는 것으로 알려져 있다. 특히 자가포식은 여러 종양 세포주에서 항암 치료에 의해 활성화 된다는 보고가 있지만, 암 형성이나 억제와의 관련성에 대해서는 확실히 증명된 것이 없다⁹⁻¹³.

폐암은 아직까지도 예후가 불량한 암으로 알려져 있다. 그 이유로는 진단 당시에 이미 림프절 전이 및 타 장기로 전이가 60~70% 정도 일어난다. 그러므로 진행된 폐암에서 주된 치료는 암세포 분열을 억제하는 세포독성 약제를 사용하여 암세포의 증식을 억제하는 것으로 폐암에서는 시스플라틴(cisplatin)이 포함된 두 가지 약제가 사용되고 있다. 이에 본 연구에서는 세포 독성이 강한 시스플라틴¹⁴을 처리하였을 때 자가포식이 유도되는지에 대한 연구가 없어 NCI H460 세포주를 대상으로 시스플라틴 처리 후 자가포식 현상이 일어나는지 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1. 재료

1) 세포주

NCI-H460 대세포 폐암 세포주는 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)로부터 구입하여 계대 배양하면서 실험하였다.

2) 시약 및 기기

RPMI 1640, 항생제, trypsin 및 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS) 등 세포배양에 필요한 재료는 GIBCO BRL (Grand Island, NY, USA) 제품을 구입하였으며, 배양 용기(24-well plate, 48-well plate, 6 cm dish, 10 cm dish)는 Nunc (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Denmark)

에서 구입하여 사용하였다. 시스플라틴(0.5 mg/mL)은 일동제약회사(Seoul, Korea)에서 제공받아 실험을 진행하였다. 3-methyladenin (3MA), Hoechst33342, Propidium Iodide (PI), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), Acridin orange (AO)는 Sigma (St Louis, MO, USA), Annexin V-FITC 세포사멸 검출 키트는 Assay Designs (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하였다. Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 항체는 Cell Signaling (Boston, MA, USA), MAP-LC3, Actin, GAPDH 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), 2차 항체는 Amersham (Buckinghamshire, UK), Polyvinylidene Fluoride (PVDF) membrane과 Enhanced Chemiluminescent kit (ECL)은 Milipore Co. (Billerica, MA, USA)에서 구입하였다.

2. 방법

1) 폐암 세포주 배양 및 시약처리

NCI-H460 세포는 CO₂ 세포배양기(37°C, 5% CO₂)에서 1% 항생제와 1% HEPES 그리고 10% 우태아 혈청이 포함된 RPMI 1640 배양액으로 배양하였으며, 24시간 간격으로 배양액을 교체하여 log phase에 있는 세포들로 실험을 진행하였다. 배양된 세포에 5 μM (LD 20), 20 μM (LD 50) 시스플라틴을 처리한 후, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간 간격으로 세포생존율을 측정하였다.

2) 세포생존율 측정

NCI-H460 폐암 세포(5×10⁴ cells/mL)는 48 well plate 세포 배양관에 분주하여 12시간 이상 CO₂ 세포 배양기 안에서 안정시켰다. 5 μM, 20 μM 시스플라틴을 처리 후 실험 시간에 맞추어 MTT 용액(5 mg/mL, phosphate buffered saline [PBS], pH 7.4)은 배양액 부피의 1/10되게 첨가하여 4시간 반응시켰다. 4시간 후 배양액을 제거하고 0.5 mL DMSO를 첨가하여 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 formazan을 용해시킨 다음, 96 well용 분광광도계 (THERMOMax, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 595 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 이 흡광도 값을 이용하여 세포생존율을 정상 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

3) 세포의 형태적 변화 관찰

시스플라틴을 처리한 후 세포의 형태학적인 변화를 관찰하기 위해 H460 세포를 24-well plate에 분주한 후 5 μM, 20 μM 시스플라틴이 포함된 배양액에서 24시간, 48시간 배양 후 배지를 모두 제거하고 PBS (pH 7.4)로 2회

세척하였다. 세포에 300 μ L crystal violet 용액(0.05% crystal violet, 3.7% paraformaldehyde)을 처리하여 실온에서 5분 동안 반응시킨 후, 1 mL PBS로 2회 세척한 다음 광학 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 세포의 핵과 세포질을 관찰하였다.

4) 세포고사 확인을 위한 핵 염색과 DNA 정량분석

H460 세포 핵 염색을 위하여 핵 염색제인 Hoechst 33342를 사용하였다. 5 μ M, 20 μ M 시스플라틴을 처리한 후 24시간, 48시간이 경과하여 배지를 모두 제거하고 3.7% formaldehyde 용액에 30분간 고정시킨 다음 PBS로 2회 세척하고 10 μ M Hoechst 33342로 10분간 염색한 후 다시 PBS로 세척하여 형광현미경으로 DNA 분절현상을 관찰하여 세포고사를 확인하였다. 또한 세포고사의 정량적 분석을 위하여 세포 DNA를 Annexin V로 염색한 후 유식 세포분석기(FACS Vantage flow cytometry; Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA)를 이용하였다. 대조군과 시스플라틴 5 μ M, 20 μ M을 처리한 세포를 24시간 배양한 후에 트립신을 사용하여 배양관에서 떼어낸 후, 포집하여 PBS로 세척하였다. 세척된 세포의 세포고사를 분석하기 위해 세포고사 검출 키트(Assay designs)를 사용하였으며, 회사에서 제시한 방법에 따라 시행하였다. 96 μ L binding buffer (PBS containing 1 mM calcium chloride)에 FITC가 결합된 annexin V (0.5 μ g/mL final concentration)로 염색을 시행하였다. 실온에서 10분 동안 반응 후 250 μ L binding buffer를 더 첨가하여 유식 세포분석기를 이용하여 정보를 얻고 분석은 Cell Quest software (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하였다.

5) 자가포식 확인을 위한 형태학적 관찰 및 기능학적 분석

자가포식은 acridine orange 염색을 이용한 세포질 내 산성소포체(acidic vesicular organelle), plasmid GFP-LC3 세포질 내 발현, LC3 I, II 단백질 발현을 통해 증명된다. Acridine orange 염색은 5 μ M 시스플라틴을 처리한 세포를 각각 2시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간 배양한 후 PBS로 2회 세척한 다음 1 μ g/mL acridine orange (AO)를 37°C에서 15분 동안 반응시켰다. 반응 후 PBS로 세척하고 세포질 내 산성소포체를 관찰하였다. Plasmid GFP-LC3는 서울 여자대학교 이도희 교수로부터 분주 받아 실험에 사용하였다. H460 세포(5×10^4 /mL)를 48 세포 배양관에 1 일 안정화시킨 후 1 μ g plasmid GFP-LC3 DNA를 Lipofectamin 2000 (40 μ L/mL), transfection 용액(Invitro-

gen)을 이용하여 세포 내로 형질도입(transfection)을 시켰다. GFP-LC3가 형질 도입된 세포에서 형광현미경을 이용하여 세포질 내에서 발광을 관찰하였다. LC3 I, II 단백질 발현을 알아보기 위해 배양된 H460 세포를 포집하여 차가운 PBS로 2회 세척한 후 파쇄용액(50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 μ g/mL aprotinin)과 4°C에서 30분간 반응시켰다. 동량의 세포파쇄액(200 μ g)과 5X sample buffer를 혼합하여 100°C에서 5분 가열하여 단백질변성을 유도한 후에 10% 및 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 Mini Trans-Blot (BIO-RAD, Richmond, CA, USA)을 이용(0.8 mA/cm)하여 PVDF membrane으로 이동시키고, blocking buffer (5% skim milk)와 상온에서 1시간 반응시켰다. PARP, LC3, Actin 그리고 GAPDH에 대한 항체는 0.05% (v/v) tween-20이 함유된 Tris-buffered saline (TBS-T)에 1 : 1,000으로 희석하여 PVDF membrane과 4°C에서 12시간 이상 반응시켰으며, 일차항체에 대한 이차항체 anti-rabbit IgG conjugated horse radish peroxidase (HRP)과 anti-mouse IgG conjugated HRP를 TBS-T로 희석(1 : 5,000)하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, enhanced chemiluminescent kit (ECL)을 이용하여 현상하였다.

6) 통계 처리

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이며, 이들의 평균(mean)과 표준편차(standard deviation, SD)를 산출하여 결과를 표시하였다. 실험결과와 통계처리는 Student's t-test를 이용하였으며, $p < 0.05$ 인 경우에 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

1. H460 세포주에서 시스플라틴에 의한 세포생존율 감소

NCI-H460 폐암 세포주를 이용하여 시스플라틴 농도에 따른 세포 죽음을 알아보려고 하였다. 5 μ M, 20 μ M 시스플라틴 농도로 처리한 각각 폐암 세포를 시간 의존적으로 배양하여 세포 생존을 알아보는 MTT 분석방법으로 세포 죽음을 측정하였다.

대조군에는 시간 의존적으로 세포 생존의 증가를 보여 주고 있지만, 5 μ M 시스플라틴으로 처리한 폐암 세포는 20 μ M 시스플라틴보다 시간 의존적으로 세포 죽음이 감소하였다. 즉, 시스플라틴으로 처리한 후 48시간이 경과

하였을 때 20 μM 에서는 세포 생존이 50%, 5 μM 에서는 80%였다(Figure 1).

2. H460 세포에서 시스플라틴 농도에 따른 세포고사

5 μM , 20 μM 시스플라틴을 처리하였을 때 시간 의존적으로 세포고사가 일어나는지 알아보려고 하였다. 세포

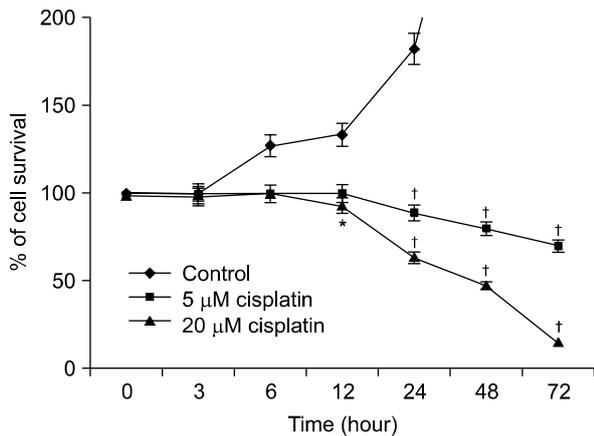


Figure 1. Effect of cisplatin-induced cell death on H460 cells. Tumor cells were seeded at 5×10^4 cells per well in 48-well flat-bottomed plates and incubated overnight at 37°C. After treated with cisplatin (5 μM or 20 μM) for 3 hr, 6 hr, 12 hr, 24 hr, 48 hr, and 72 hr, the viability of the untreated cells was regarded as 100%. The viability of cell was measured by MTT assay. Control: no cisplatin-treated cells. Means \pm SD (n=3). *p \leq 0.05, †p \leq 0.01.

고사가 일어나면 형태학적인 특징으로 염색사 응축현상 (chromatin condensation), 핵산 분절현상을 관찰할 수 있는데, 5 μM 시스플라틴 처리 후 24시간에는 세포고사의 형태학적인 특징은 관찰되지 않았고, 48시간에는 적은 수의 염색사 응축을 확인할 수 있었고, 20 μM 시스플라틴에서는 24시간부터 뚜렷하게 세포고사 특징을 관찰할 수 있었다.

세포고사를 정량적으로 측정하기 위해 시스플라틴 5 μM 처리 24시간 후에 Annexin V로 염색하고 유식 세포 분석기로 분석하였다. 세포고사는 대조군에서 0.01%로 거의 세포고사가 일어나지 않지만 5 μM 시스플라틴 경우는 12.54%, 20 μM 시스플라틴 경우는 86.5%의 세포고사를 정량적으로 확인할 수 있었다(Figure 2).

세포 내에서 세포고사 경로의 마지막 단계 단백질인 PARP 분절은 Figure 3에서와 같이 20 μM 시스플라틴 처리 시 6시간부터 PARP 분절이 관찰되었고 시간 의존적으로 증가하였으며 48시간에는 분절된 PARP 양이 최고에 이르렀다. 반면 5 μM 시스플라틴 처리 후 48시간에서만 분절된 PARP를 확인할 수 있었다(Figure 3).

3. 시스플라틴 농도에 따른 자가포식의 형태학 관찰 및 정량적 분석

5 μM 시스플라틴을 처리한 세포는 24시간에 자가포식의 형태학적 특징인 자가포식낭이 세포질에서 관찰되었고, 48시간에는 수가 현저히 증가됨을 관찰할 수 있었지

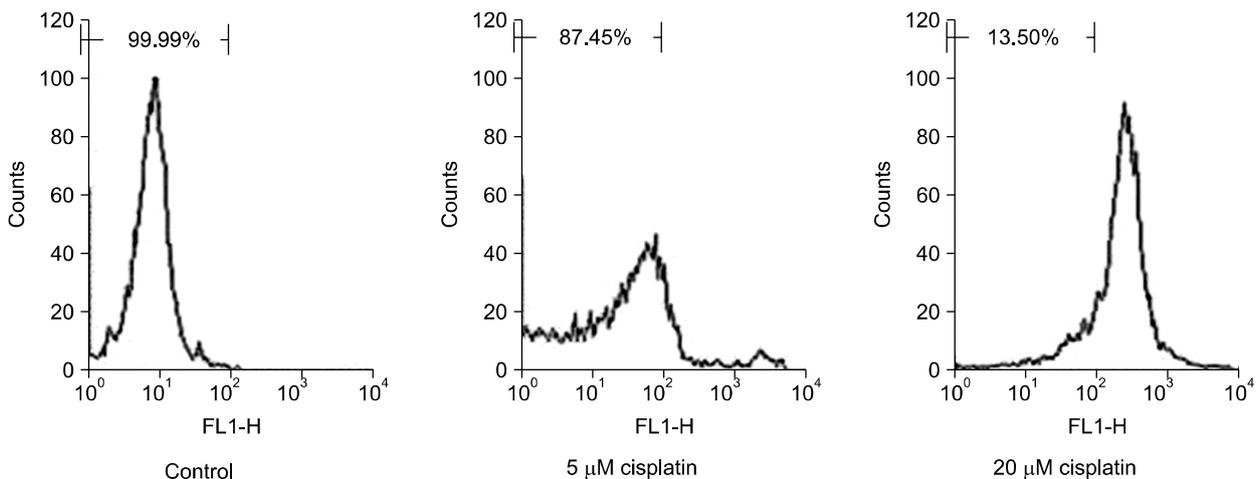


Figure 2. Cell death induced by cisplatin in NCI-H460 cells did not involve apoptosis. Cells were treated with 5 μM , 20 μM or 5 μM cisplatin with 10 mM 3-MA for 24 hr and assayed for apoptosis by FACS following annexin V-FITC staining. Control cells were treated with RPMI 1640 medium. The data shown are representative of three independent experiments.

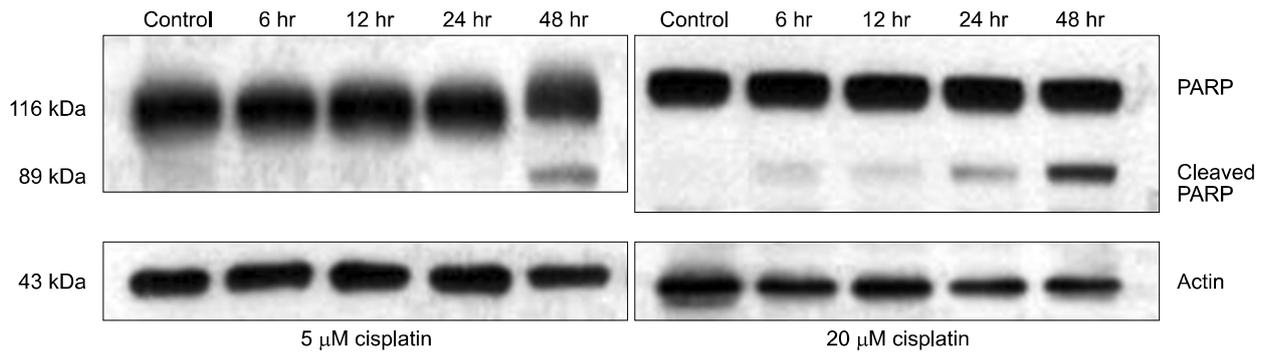


Figure 3. Lung cancer cells were treated for several times with 5 μ M and 20 μ M cisplatin. Western blot analysis showing effects of cisplatin. Western immunoblots probed with antibodies against poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) & cleaved PARP and Actin.

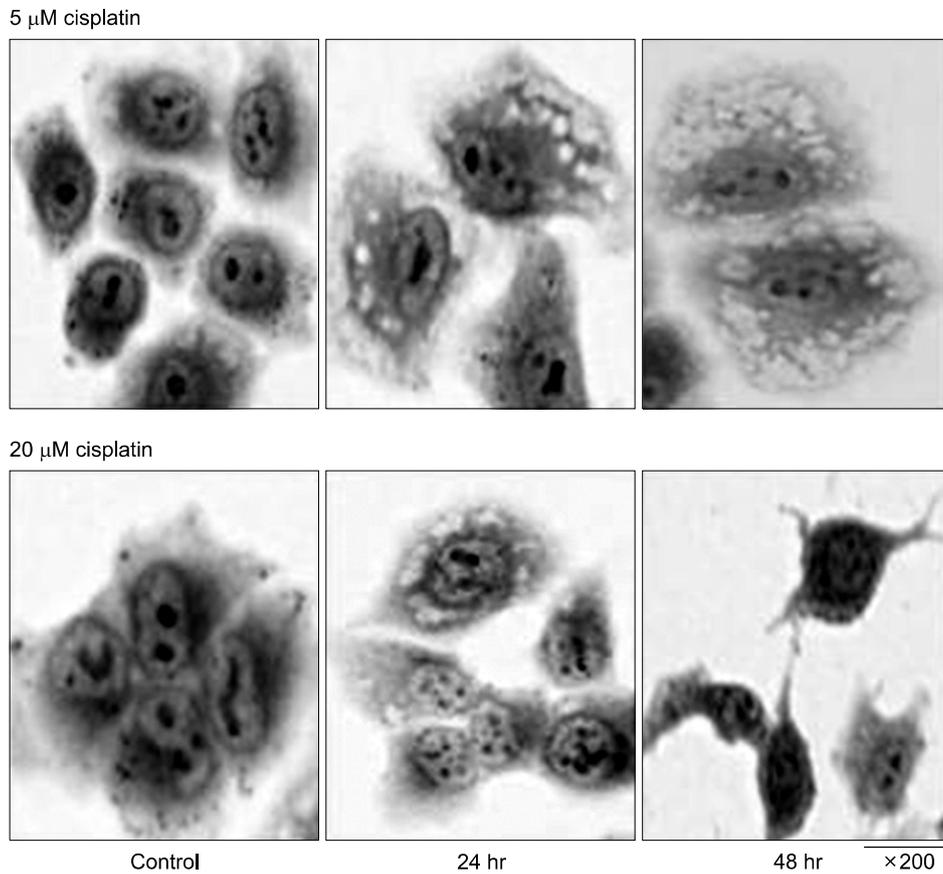


Figure 4. Cisplatin induced morphologic changes of H460 cells. Direct observation of cells treated with 5 μ M and 20 μ M cisplatin for 2 hr, 6 hr, 12 hr, 24 hr, and 48 hr. Scale bar: $\times 200$. Sample were examined under a light microscope.

만, 20 μ M 시스플라틴 처리한 세포에서는 24시간에 적은 수의 자가포식낭이 관찰되었다가, 48시간에는 소실됨을 확인할 수 있었다(Figure 4). 자가포식이 일어나면 자가포

식낭의 여러 구성 성분이 분해되어 아미노산을 형성하고 acridine orange 염색 시 산성소포체로 관찰되는데 5 μ M 시스플라틴을 처리한 세포에서 세포질 내 산성소포체가

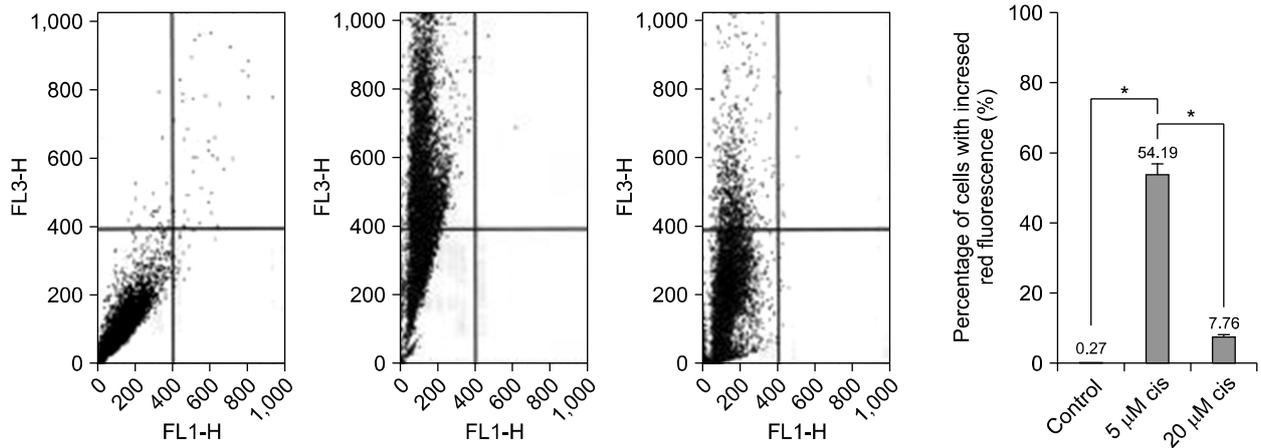


Figure 5. AVOs development in cisplatin-treated H460 cells and its quantification using FACS analysis. H460 cells contained RPMI 1640 (control), 5 μM, 20 μM cisplatin or 3-MA with 5 μM cisplatin for 24 hr were stained with acridine orange and analyzed by fluorescent microscopy. Representative images in each group were shown. Note the formation of acridine orange-accumulating AVOs (bright red fluorescence) in cisplatin-treated H460 cells. Similar results were obtained in three independent experiments. * $p \leq 0.01$.

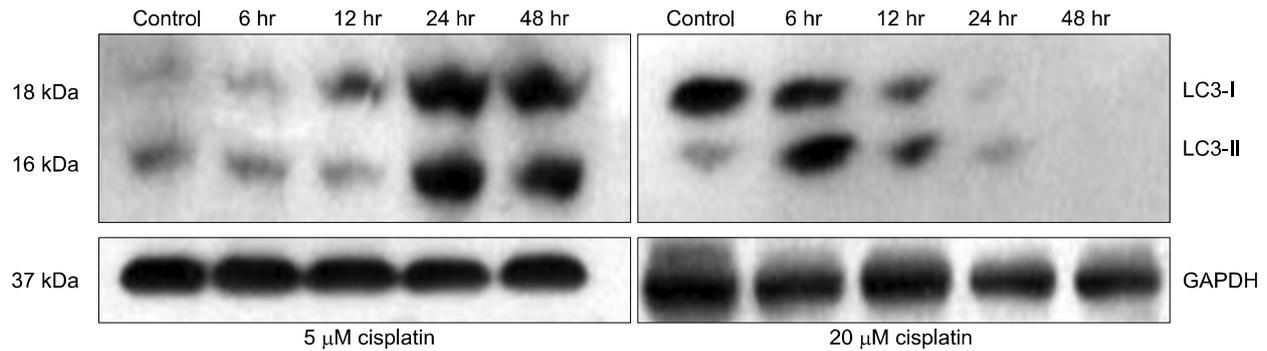


Figure 6. Induction of autophagic protein LC3-I and formation of LC3-II in H460 cells. Cells were treated with 5 μM, 20 μM cisplatin for various time periods as indicated. LC3-I (18 kDa) and LC3-II (16 kDa) induction and conversion of LC3-I to LC3-II were determined by Western blotting.

2시간부터 관찰되었고 시간 경과에 따라 세포질 내에 산성세포체 수가 증가하였으며 24시간, 48시간에는 송이모양(cluster)으로 관찰됨을 확인하였다. 시스플라틴 처리 24시간 후에 세포내 산성세포체의 정량적 측정을 위해 유식 세포분석기를 이용해 분석한 결과 5 μM 시스플라틴에서 54.2%, 20 μM 시스플라틴에서는 7.7%로 5 μM 시스플라틴에서 자가포식이 증가됨을 확인할 수 있었다 (Figure 5).

4. 시스플라틴 농도에 따른 LC3 단백질 발현 양상

LC3-I는 세포질에 존재하고 LC3-II는 자가포식이 진행 시 형성되는 자가포식소체에 존재하는 것으로 알려져 있

며, 자가포식이 시작되면 LC3-I이 LC3-II로 전환된다. LC3는 자가포식소체 형성의 좋은 지표로 알려져 있다. 5 μM 시스플라틴을 처리한 폐암세포에서 autophagosome-incorporated LC3-II 단백질은 24시간, 48시간에 발현이 일어남을 보여주지만, 20 μM 시스플라틴 처리 시는 초기 6시간, 12시간에 LC 3-II의 발현이 관찰되다가 24시간, 48시간에는 발현되지 않음을 확인할 수 있었다(Figure 6).

자가포식이 일어나면 세포질 내에 LC3 단백질이 증가하는데 이를 형태학적으로 확인하기 위해 형질 도입된 GFP-LC3 세포에서 세포질 내 GFP-LC3 발현을 확인하였다. GFP-LC3가 형질 도입된 세포에 5 μM 시스플라틴을 처리 시 2시간부터 세포질 내에서 GFP-LC3을 확인할 수

있었으며, 24시간, 48시간에는 cluster 형태로 관찰되었다.

고 찰

폐암은 진단 당시에 이미 주위 조직으로 침윤이 일어나 수술이 불가능한 경우가 많으며, 항암치료나 방사선 치료로도 완치가 어려워 사망률 1위를 차지하는 암으로 알려져 있다. 하지만 1980년대에 시스플라틴 등장과 1990년 새로운 2세대 항암제의 개발로 인해 생존율의 증가를 보였지만, 아직까지는 만족할 만한 결과는 보이지 못하고 있다. 또한 최근에는 표적치료제의 등장으로 보다 특이적인 상황에서 효과를 보고 있지만 아직까지는 시스플라틴을 근간으로 하는 항암치료가 진행성 폐암에서 사용되고 있다. 그러나 시스플라틴에 의한 독성, 즉 3등급 이상의 백혈구와 혈소판 감소증, 구토, 신경학적 독성, 신독성 등으로 인해 환자가 힘들고 치료를 중단하는 경우가 종종 발생한다. 그래서 국소적 진행성 폐암 환자에서 비시스플라틴을 근간으로 하는 항암치료를 시행하였으나, 시스플라틴을 사용한 병합치료보다는 효과가 적고, 또한 표적치료제도 일부 환자에서만 의미 있는 결과를 보여 3기 이상의 환자에서 표준 항암치료로 독성이 있지만 시스플라틴 사용을 권장하고 있다. 많은 연구자들이 시스플라틴에 의한 독성을 줄이기 위해 용량강도(dose intensity)를 조정하지만 적은 용량으로 치료 시에는 효과가 적어지는 한계가 있다.

본 연구는 저용량 시스플라틴(LD 20)을 처리해도 고용량 시스플라틴(LD 50)을 처리 시 나타나는 세포독성 효과를 얻기 위해서는 세포괴사와 같은 죽음 외에 세포죽음을 유도할 수 있는 계획된 세포사멸과 같은 기전을 유도하거나 증폭시키는 것이 중요한 역할을 담당할 수 있으리라는 가정 하에, type II PCD라고 알려진 자가포식이 세포생존 또는 죽음에 관여한다고 알려져 있어 시스플라틴의 농도에 따라 세포괴사와 자가포식이 어떻게 일어나는지를 알아보고자 하였다.

자가포식은 2005년 이후로 더 많은 연구를 통해 자가포식과 관련된 신호 전달이 밝혀지고 있으며, 특히 암에서는 자가포식과 세포괴사의 관련성에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다. 특히 암에서는 자가포식 역할에 대하여 많은 논쟁이 있는데, 자가포식이 세포생존에 관여하는지, 아니면 세포 사멸에 관여하는지 현재까지 확실히 알려진 바는 없다. 세포 생존기능은 영양상태가 제한된 환경에서 암세포들을 살아남게 하고 방사선치료 및 항암화학요법

에 견딜 수 있도록 돕는다. 그러나 세포사멸 기능은 암세포가 스스로 죽게 하거나, 방사선이나 화학요법에 노출되었을 때 죽게 돕는다. 이와 같이 역설적인 기능은 자가포식이 암의 친구인지, 적인지에 대해 논쟁할 수밖에 없게 만든다¹⁵⁻¹⁷.

본 연구에서는 20 μ M 시스플라틴을 처리하였을 때 많은 DNA 분절이 관찰되었으나 5 μ M 시스플라틴을 처리 시에는 세포괴사 때 보이는 DNA 분절은 관찰되지 않았다. Annexin V로 염색한 세포에서 20 μ M 시스플라틴에서는 91.2%, 5 μ M 시스플라틴에서는 12.6%의 세포괴사가 일어나, 5 μ M 시스플라틴에 의한 20%의 세포죽음이 세포괴사 외 다른 기전에 의해 일어날 것으로 추측되어 최근 계획된 세포사멸의 한 기전인 자가포식이 일어나는지 알아보려고 하였다. 5 μ M 시스플라틴 처리 후 세포질에 많은 양의 자가포식낭이 24시간, 48시간에 관찰되고 또한 자가포식 표지자인 산성소포체의 발현이 시간 의존적으로 증가하였다. 또한 자가포식을 정량적으로 분석해보면 20 μ M 시스플라틴 처리 시 7.8%, 5 μ M 시스플라틴 처리 시 54.2%의 자가포식이 발생함을 확인할 수 있었다. 또한 세포질 내에서 LC-3 I의 LC3-II로의 전환은 20 μ M에서는 초기 시간에 일시적으로 일어나지만, 5 μ M에서는 시간 의존적으로 증가하는 양상을 보였으며, GFP-LC3 형질 도입 시 세포질 내에 GFP-LC3의 발현이 시간 의존적으로 증가하였다.

자가포식이 없으면 세포들이 스트레스 상황(대사 스트레스, 항암화학요법)에서 죽음에 대한 감수성이 증가한다. 역으로 자가포식이 높거나 세포괴사가 제대로 되지 않는 상황에서는 세포를 죽음으로 이끌 수 있다. 아직까지는 자가포식을 유발하거나 억제하여 종양세포들을 사멸할 수 있다고 결론을 내릴 수는 없다¹⁸. 세포죽음과 암에서 자가포식 역할과 관련된 수많은 모순점들이 있어 상당히 어려움이 있다. 세포괴사 기전에 결함이 생긴 종양 세포를 이용한 동물실험에서 자가포식은 대사 스트레스 동안 종양세포 생존을 증진시키지만, 종양발생, 괴사, 염증을 막아주기도 한다. 따라서 적어도 이 경우 자가포식의 종양 억제 효과가 자가포식에 의한 생존기전보다 중요하다. 반대로 활성화된 암 원인 유전자에 의해 발생한 종양으로 하는 동물실험에서는 chloroquine으로 자가포식을 억제시키면 치료에 의해 유도되는 세포괴사와 종양 소멸을 증가시킨다. Chloroquine과 HDAC inhibitor, SAHA의 병합은 imatinib 저항 만성 골수성 백혈병 세포를 죽이는데 상승효과가 있고, 이는 암 치료에 있어 자가포식 억제제의

치료적 이용을 뒷받침해주는 방어적 기능이다¹⁹⁻²².

향후 NCI-H460 세포에서 시스플라틴 처리 시에 자가포식이 어떻게 세포 생존에 관여하는지 신호전달 경로에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

This paper was supported by Wonkwang University in 2009.

참 고 문 헌

1. Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 2004;6:463-77.
2. Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 2004;23:2891-906.
3. Schwarze PE, Seglen PO. Reduced autophagic activity, improved protein balance and enhanced in vitro survival of hepatocytes isolated from carcinogen-treated rats. *Exp Cell Res* 1985;157:15-28.
4. Canuto RA, Tessitore L, Muzio G, Autelli R, Baccino FM. Tissue protein turnover during liver carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1993;14:2581-7.
5. Kisen GO, Tessitore L, Costelli P, Gordon PB, Schwarze PE, Baccino FM, et al. Reduced autophagic activity in primary rat hepatocellular carcinoma and ascites hepatoma cells. *Carcinogenesis* 1993;14:2501-5.
6. Ahlberg J, Yucel T, Eriksson L, Glaumann H. Characterization of the proteolytic compartment in rat hepatocyte nodules. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1987;53:79-88.
7. Yucel T, Ahlberg J, Glaumann H. Overall proteolysis in perfused and subfractionated chemically induced malignant hepatoma of rat: effects of amino acids. *Exp Mol Pathol* 1989;50:38-49.
8. Levine B. Cell biology: autophagy and cancer. *Nature* 2007;446:745-7.
9. Bursch W, Ellinger A, Kienzl H, Török L, Pandey S, Sikorska M, et al. Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis* 1996;17:1595-607.
10. Kanzawa T, Kondo Y, Ito H, Kondo S, Germano I. Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide. *Cancer Res* 2003;63:2103-8.
11. Paglin S, Hollister T, Delohery T, Hackett N, McMahon M, Sphicas E, et al. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res* 2001;61:439-44.
12. Yao KC, Komata T, Kondo Y, Kanzawa T, Kondo S, Germano IM. Molecular response of human glioblastoma multiforme cells to ionizing radiation: cell cycle arrest, modulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, and autophagy. *J Neurosurg* 2003;98:378-84.
13. Butler R, Mitchell SH, Tindall DJ, Young CY. Nonapoptotic cell death associated with S-phase arrest of prostate cancer cells via the peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand, 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2. *Cell Growth Differ* 2000;11:49-61.
14. Fram RJ. Cisplatin and platinum analogues: recent advances. *Curr Opin Oncol* 1992;4:1073-9.
15. Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in breast cancer. *Autophagy* 2007;3:610-3.
16. Levine B. Unraveling the role of autophagy in cancer. *Autophagy* 2006;2:65-6.
17. Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, Vicencio JM, Criollo A, Maiuri MC, et al. Anti- and pro-tumor functions of autophagy. *Biochim Biophys Acta* 2009;1793:1524-32.
18. Levine B, Abrams J. p53: the Janus of autophagy? *Nat Cell Biol* 2008;10:637-9.
19. Høyer-Hansen M, Jäättelä M. Autophagy: an emerging target for cancer therapy. *Autophagy* 2008;4:574-80.
20. Jin S, White E. Role of autophagy in cancer: management of metabolic stress. *Autophagy* 2007;3:28-31.
21. Maiuri MC, Tasmir E, Criollo A, Morselli E, Vicencio JM, Carnuccio R, et al. Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes. *Cell Death Differ* 2009;16:87-93.
22. Rubinsztein DC, Gestwicki JE, Murphy LO, Klionsky DJ. Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:304-12.