

## 대장암 세포에서 5-FU의 세포독성에 대한 NSAIDs의 보조적인 효과

조선대학교 의과대학 외과학교실, <sup>1</sup>내성세포연구센터, <sup>2</sup>약리학교실

이태범<sup>1</sup> · 김경중 · 민영돈 · 강성인<sup>2</sup> · 정권율<sup>2</sup> · 이재업<sup>2</sup> · 최철희<sup>1,2</sup>

### Adjuvant Effect of NSAIDs on the Cytotoxicity of Colon Cancer Cells to 5-FU

Tae-Bum Lee<sup>1</sup>, Kyung-Jong Kim, M.D., Young-Don Min, M.D., Sung-In Kang, M.D.<sup>2</sup>, Kwon-Ryul Jung, M.D.<sup>2</sup>, Jae-Up Lee, M.D.<sup>2</sup>, Cheol-Hee Choi, M.D.<sup>1,2</sup>

Department of Surgery, <sup>1</sup>Research Center for Resistant Cells, <sup>2</sup>Department of Pharmacology, College of Medicine, Chosun University, Gwangju, Korea

**Purpose:** Cyclooxygenase (COX)-2, an inducible enzyme that catalyzes the conversion of arachidonic acid to prostaglandins, is believed to be an important enzyme related to colorectal cancer. A large number of studies have supported the concept that non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) targeting COX alter the biologic processes of colon carcinogenesis. Although COX-2 inhibitors generally reduce the growth rate of established tumors, tumor regression is rarely observed. Hence, it is reasonable that COX-2 inhibitors be given in conjunction with standard anti-cancer therapy in treating cancer. We investigated whether aspirin and meloxicam not only are cytotoxic but also potentiate the antitumor effect of 5-Fluorouracil (5-FU) against colon cancer cells. **Methods:** Expressions of COX-1 and COX-2 were determined by using the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) & Western blotting assay in 9 colon cancer cell lines. The cytotoxicities of NSAIDs and/or 5-FU were determined by using a microculture tetrazolium dye (MTT) assay. **Results:** COX-1 mRNA and protein, as well as COX-2 mRNA, were variably expressed in all the cell lines tested whereas COX-2 protein was expressed in HT-29 and to a lesser extent in HCT-8, but not in the other cell lines. We selected two representative cell lines, HT-29 expressing COX-2 protein and SNU-C1 not expressing it.

The dose-dependent cytotoxicity was observed in both cell lines treated with aspirin and with meloxicam. A combination treatment of aspirin or meloxicam with 5-FU revealed some additive effect, rather than a synergistic effect, for both cells lines. This additive effect was remarkable even for low concentrations of the drugs. Furthermore, the additive effect was highest when the combination was administered sequentially, 5-FU followed by aspirin or meloxicam, in both cell lines. **Conclusions:** These results suggest that a combination therapy using NSAIDs and 5-FU might be useful in the treatment of colon cancer cells not expressing COX-2, as well as in colon cancer cells expressing COX-2. **J Korean Soc Coloproctol 2005;21: 121-128**

**Key Words:** COX-2, NSAIDs, 5-FU, Additive effect, Colon cancer cells

COX-2, 비스테로이드성 항염제, 5-FU, 부가적 효과, 대장암세포

### 서 론

결장직장암의 발생 빈도 및 이로 인한 사망률은 이미 한국에서 상당한 비중을 차지하고 있으며, 그 중요성이 급격히 증가되고 있다. 결장직장암에서 가장 중요한 치료는 수술이지만, 항암요법은 진행성인 경우 또는 수술 전 후의 보조적인 치료로 많이 이용되고 있으며 그 중에서도 5-Fluorouracil (5-FU)는 그 치료의 근간을 이루고 있다. 그러나 5-FU의 실제 결장직장암에 대한 반응률은 15~20% 정도이다. 내인성 또는 획득성 약

접수: 2005년 1월 5일, 승인: 2005년 6월 2일  
책임저자: 김경중, 501-759, 광주광역시 동구 서석동 588  
조선대학교병원 외과  
Tel: 062-220-3073, Fax: 062-228-3441  
E-mail: kjkim@chosun.ac.kr

이 논문은 2003년도 춘계대장항문학회에서 포스터 구연되었음.  
이 연구는 과학기술부·한국과학재단지원 내성세포연구센터(MRC, R13-2003-009) 지원으로 수행되었음.

Received January 5, 2005, Accepted June 2, 2005  
Correspondence to: Kyung-Jong Kim, Department of Surgery, Chosun University Medical School, 588 Seoseok-dong, Dong-gu, Gwangju 501-759, Korea.  
Tel: +82-62-220-3073, Fax: +82-2-228-3441  
E-mail: kjkim@chosun.ac.kr

물내성이 항암요법의 큰 장애가 되고 있으며,<sup>1</sup> 이를 극복하기 위한 효과적인 방법들이 필요한 실정이다.

Cyclooxygenase (COX)은 arachidonic acid를 prostaglandin으로 전환시키는데 중요한 역할을 하는 효소로 COX-1과 COX-2 두 가지의 동형효소가 알려져 있다. COX-1은 정상인 모든 조직에서 항상 발현되고 위 점막의 보호, 신장의 기능 조절 등의 중요한 역할을 하고 있으며, COX-2는 cytokines 또는 mitogens 등에 의해 유발되어 염증반응에 밀접하게 관여한다. 비스테로이드성 항염제(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)가 작용하는 주요한 표적은 COX이며, 이 COX를 억제하여 항염증, 진통 등의 효과를 나타낸다. COX-2가 결장 직장암뿐만 아니라 많은 암에서 중요한 역할을 하고 있으며, 비스테로이드성 항염제가 암의 예방 및 치료에 효과가 있다는 것은 역학적 연구, 실험적인 연구뿐만 아니라 임상실험에서도 증명이 되고 있다. 그러나 COX-2의 억제로는 종양의 완전한 억제를 기대하기 어렵기 때문에 기존의 다른 요법들과 병행하여 투여하는 것이 바람직하다.<sup>2,3</sup>

이에 본 연구는 비스테로이드성 항염제가 대장암세포주에 세포독성 작용이 있는지를 알아보고 또 5-FU와 병행 투여되었을 때 5-FU의 작용을 증강시키는지 알아보고자 하였다.

## 방 법

### 1) 재료

비스테로이드성 항염제로 가장 많이 사용되고 있는 비선택적인 COX-2 억제제인 aspirin (Sigma, St. Louis, MO, USA)과 비교적 선택적인 COX-2 억제제인 meloxicam (Boehringer Ingelheim, Vienna, Austria)을 사용하였으며, 항암제로 5-FU (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용하였다.

인간의 대장암세포주인 SNU-C1, SNU-C4, SNU-C5, COLO320HSR, LoVo, DLD-1, HT-29, HCT-8, HCT-116을 한국 세포주 은행에서 분양 받았다. 이 세포주들은 10% fetal bovine serum (Sigma, St. Louis, MO, USA)이 함유된 RPMI 1640 배양액(GibcoBRL, Grand Island, NY, USA)으로 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 습윤 배양기에서 배양하였다.

### 2) 연구 방법

#### (1) 역전사-중합효소 연쇄반응을 이용한 COX-1와 COX-2의 발현양상

##### ① 총 RNA의 추출: Acid guanidinium thiocyanate-

phenol-chloroform 추출방법을<sup>4</sup> 이용하여 9개의 대장암 세포주에서 각각 총 RNA를 분리 추출하였다. 자세한 방법은 다음과 같다. 암세포주 1×10<sup>7</sup>개를 차가운 PBS로 두 번 세척한 후 세포침전물에 변성용액(4 M guanidinium thiocyanate, 25 mM sodium citrate pH 7.0, 0.5% sarcosyl, 0.1 M 2-mercaptoethanol) 1 ml을 넣어 파이프토 여러 번 섞은 후 polypropylene tube에 옮긴 후 변성용액 1 ml당 2 M sodium acetate 용액(pH 4.0) 0.1 ml, 수화된 phenol 1 ml, chloroform-isoamylalcohol (24 : 1) 0.3 ml를 넣어 혼합하고 15분 이상 얼음에 두었다. 시료를 3,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 수층을 깨끗한 Corex<sup>R</sup> 유리 튜브에 옮긴 다음 차가운 isopropanol 동량을 넣고 -20°C에서 최소 1시간 이상 방치하였다. 이를 다시 10,000 g에서 20분간 원심 분리하여 얻은 RNA 침전물에 변성용액과 isopropanol을 동량 넣어 섞은 후 -20°C에서 1시간 방치한 후 10,000 g로 15분간 RNA를 재원침시켰다. RNA 침전물을 75% ethanol로 씻은 후, 침전물을 수 분간 실온에서 건조시켜 DEPC water에 녹였다. RNA 농도(1OD=40µg/ml)는 260 nm에서 spectrophotometer (DU<sup>R</sup> 650, Beckman-Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA)로 측정하고, RNA 순도는 A260/A280 비로, RNA 보존도는 RNA 5µg를 전기영동하여 28 S와 18 S band들을 확인하여 각각 결정하였다. 이상에서 사용된 모든 초자제품은 180에서 8시간 이상 구웠고 Tris, SDS 이외의 모든 용액은 DEPC 농도를 0.1%가 되도록 제조한 후 하룻밤 동안 방치 후 고압 증기 멸균하였다.

② 역전사-중합효소 연쇄반응: First strand cDNA를 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT (Promega, Madison, USA), 1 U/µl RNasin (Promega, Madison, USA), 1 mM each dNTP, oligo(dT)<sub>20</sub> 100 ng과 MMLV reverse transcriptase (Promega, Madison, USA) 200 U가 함유된 20µl의 용액에서 총 RNA 1µg으로부터 합성하였다. PCR은 1×PCR 완충액(10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 100µg/ml gelatin, 0.05% triton X-100)에 25 ng의 RNA로부터 합성된 cDNA, 각각의 primer 20 pmole, 50µM dNTP와 taq DNA polymerase (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 2.5 unit가 함유된 25µl의 반응액에서 PCR (GeneAmp PCR System 2400, Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 시행하였다. 정량을 위해서 5µCi의 [<sup>32</sup>P]dCTP를 반응 혼합물에 첨가하였다. 사용한 primer와 PCR 조건은 Table 1, 2와 같다. PCR 산물 25µl로부터 COX-1과 COX-2 산물

**Table 1.** PCR primers of COX-1, COX-2 and  $\beta$ -actin

Gene*	S & AS <sup>†</sup>	Nucleotide sequences	Sequences region <sup>‡</sup>	Length of PCR products	References <sup>§</sup>
COX-1	S	5'-TGCCCAGCTCCTGGCCCCGCGCT-3'	516~539	304 bp	[5]
	AS	5'-GTGCATCAACACAGGCGCCTCTT-3'	796~819		
COX-2	S	5'-CGAGGTGTATGTATGAGTGT-3'	219~239	594 bp	[5]
	AS	5'-TCTAGCCAGAGTTTCACCGT-3'	792~812		
$\beta$ -actin	S	5'-GACTATGACTTAGTTGCGTTA	1912~1932	501 bp	[6]
	AS	5'-GTTGAACTCTCTACATACTCCG	2392~2412		

\*COX-1 = Cyclooxygenase-1, COX-2 = Cyclooxygenase-2; <sup>†</sup> Sense and antisense; <sup>‡</sup> The oligonucleotide primers constructed for PCR correspond to the sense and antisense based within these reported sequences; <sup>§</sup>References for primer sequences.

**Table 2.** PCR condition of COX-1, COX-2 and  $\beta$ -actin

Gene	Cycles	Hot start	Denaturation	Annealing	Extension	Final extension
COX-1	21			60°C, 30 sec		
COX-2	21	94°C, 12 min	94°C, 30 sec	55°C, 30 sec	72°C, 1 min	72°C, 5 min
$\beta$ -actin	17			53°C, 30 sec		

10 $\mu$ l와  $\beta$ -actin 5 $\mu$ l를 섞은 후 7% 비변성 polyacrylamide gel상에서 각각 전기영동하여 분리하였다. 전기영동 후 gel를 건조 후 X-ray 필름에 노출시켜 autoradiography를 시행하였다.

**(2) 단백질 추출 및 Western blot analysis를 이용한 COX-1과 COX-2 발현 양상:** 세포를 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)와 10 $\mu$ g/ml leupeptin을 함유한 추출완충액(1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS를 함유한 PBS용액)으로 용해시킨 후 sonication해서 DNA를 조각냈다. 단백질의 정량은 Bovine serum albumin (BSA)을 표준으로 이용해서 Bio-Rad protein assay kit를 이용하여 측정했다. Western blot 방법은 Towbin 등<sup>7</sup>에 의해 처음 기술된 방법을 이용했다. 세포 총단백질 50 $\mu$ g을 0.1% SDS를 함유한 7% (w/v) polyacrylamide gel에서 전기영동한 후 gel에 존재하는 단백질을 electroblotting 방법으로 nitrocellulose (NC) filter에 옮겼다. 비특이적인 결합을 차단하기 위하여 NC filter를 5% 탈지분유를 함유한 tris-buffered saline-tween (TBST) 용액에 넣고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 0.05% TBST 용액으로 15분간 1회 세척한

후 다시 새로운 TBST 용액에서 5분간 2회 세척했다. Filter를 1 : 1,000 COX-1 1차 항체(Santacruz, Santa Cruz, CA, USA)와 1 : 250 COX-2 1차 항체(BD Pharmingen, San Diego, CA, USA)를 함유한 TBST 용액에 넣고 실온에서 1시간 동안 방치한 후 위와 같은 방법으로 세척했다. 세척한 후 peroxidase가 표지된 1 : 1,000 COX-1와 COX-2 2차 항체(Santacruz, Santa Cruz, CA, USA)를 함유한 TBST 완충용액에 filter를 넣고 실온에서 각각 1시간 동안 방치한 후 TBST 완충용액으로 15분간 1회 5분간 4회 세척했다. Enhanced chemiluminescence (ECL) Western blot 방법을 이용하여 band들을 가시화했다.

**(3) 세포독성 실험:** 세포독성 실험은 살아있는 암세포의 미토콘드리아 탈수소 효소작용에 의해 수용성의 노란색 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]을 환원시켜 자주색을 띠는 비수용성의 formazan을 형성하며 microplate (ELISA) reader로 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하는데 살아있고 대사적으로 왕성한 세포의 농도를 반영한다. Pieters 등<sup>8</sup>의 방법을 사용하여 세포독성 실험을 시행하였다. 96

well microplate (Falcon)에 세포주를 적절한 농도로 희석( $2 \times 10^4$ /ml)시키고 세포부유액 90 $\mu$ 씩을 각각 넣었다. 그리고 24시간 후에 COX-2 억제제인 aspirin과 meloxicam의 세포독성을 측정하기 위하여 aspirin은 10 mM부터 그리고 meloxicam은 2 mM부터 5배씩 희석하여 약물을 제조한 후 10 $\mu$ 씩 넣고 약물대신 PBS를 넣어 세포의 대조군으로 삼고, 세포 대신 배양액만을 넣어 blank로 삼았다. 잘 흔든 후 3일간 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한 후 모든 well에 5 mg/ml의 MTT (Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액 10 $\mu$ 를 가해주고 다시 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 4~5시간 더 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 그리고 COX-2 억제제와 항암제인 5-FU의 병합투여 효과 실험은 aspirin 또는 meloxicam을 항암제인 5-FU와 단독투여, 병합투여하여 2일 동안 배양하였다. 실험에 사용한 약물의 농도는 HT-29 세포주에서는 aspirin 2 mM, meloxicam 500 $\mu$ M, 5-FU 10 $\mu$ M을 사용하였으며 SNU-C1 세포주에서는 aspirin 2 mM, meloxicam 100 $\mu$ M, 5-FU 100 $\mu$ M을 사용하였다.

Monolayer 세포주(HT-29)인 경우 각 well에서 상층액 80 $\mu$ 씩 버린 다음 150 $\mu$ l DMSO를 넣고 10 min 동안 shaking해서 생성된 formazan 결정을 잘 녹여서 microplate reader ( $\mu$ -QUANT, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였고 suspension 세포주 (SNU-C1)인 경우 0.04 N-HCL/Isopropanol 용액 100 $\mu$ 를 넣은 다음 formazan을 잘 녹인 후 흡광도를 측정하였다.

(4) 통계처리: 실험 결과는 평균 $\pm$ 표준편차 형태로 나타내며 두 그룹간의 통계적인 분석은 Student's *t*-test 방법을 이용하였다. P<0.05인 경우 통계적인 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

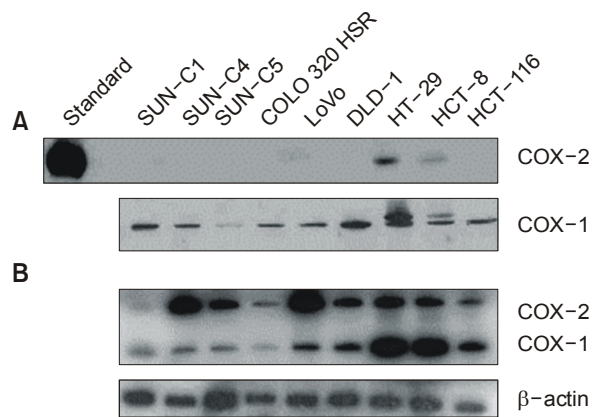
## 결 과

### 1) 대장암세포주에서 COX-1과 COX-2의 발현

COX-1의 mRNA와 단백질, COX-2의 mRNA는 모든 대장암 세포주에서 다양한 발현을 보였으나, COX-2 단백질은 HT-29 세포주와 HCT-8 세포주에서만 발현이 관찰되었다(Fig. 1).

### 2) COX-2억제제에 대한 세포독성 효과

COX-2 단백질이 발현되는 HT-29 세포주와 COX-2 단백질이 발현되지 않는 SNU-C1 세포주를 선택하였다. Aspirin을 처치하였을 때, 용량의존적인 세포독성 효과가 두 세포주 모두에서 관찰되었으며, HT-29보다



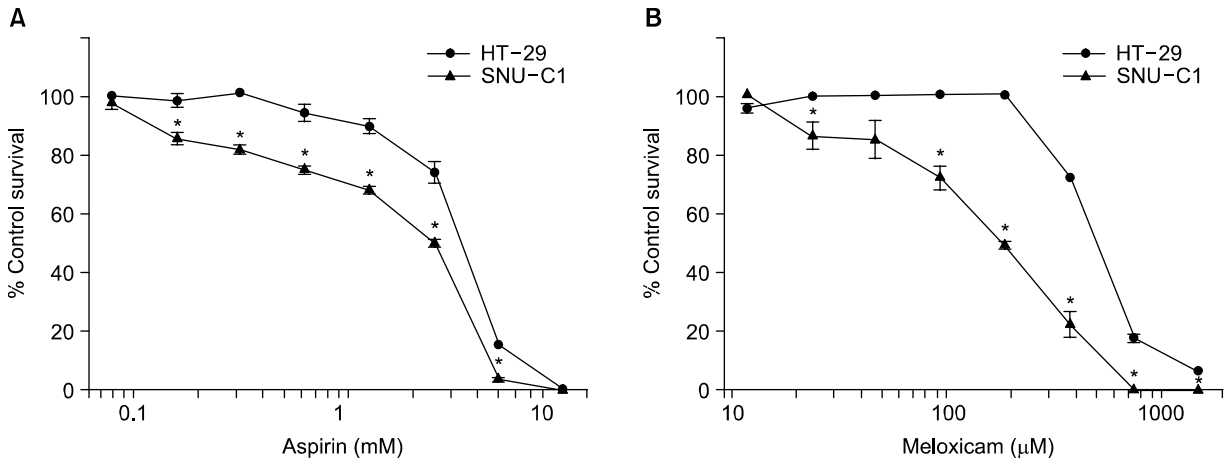
**Fig. 1.** The Western blot analysis (A) and RT-PCR (B) for COX-1 and COX-2 in colon cancer cell lines. The protein samples were extracted from cells and then 50 $\mu$ g and 100 $\mu$ g of total cellular protein were separated respectively on 12% SDS/polyacrylamide gel for Western blot analysis of COX-1 and COX-2. COX-2 standard (10 $\mu$ g). COX-2 standard was prepared from the RAW 264.7 cell line. The cDNAs reverse transcribed from RNA were separately amplified with each primer pair for COX-1 and COX-2 genes. Aliquots of each PCR reaction mixture were separated on a 7% polyacrylamide gel in Tris-acetate-EDTA. The gel was dried and exposed on X-ray film overnight.

는 SNU-C1에서 세포독성 효과가 더 크게 나타났다. Meloxicam을 처치하였을 때도 비슷한 결과가 관찰되어, aspirin이나 meloxicam에 대한 세포독성 효과가 COX-1이나 COX-2의 발현수준과는 일치하지 않음을 알 수 있었다(Fig. 2).

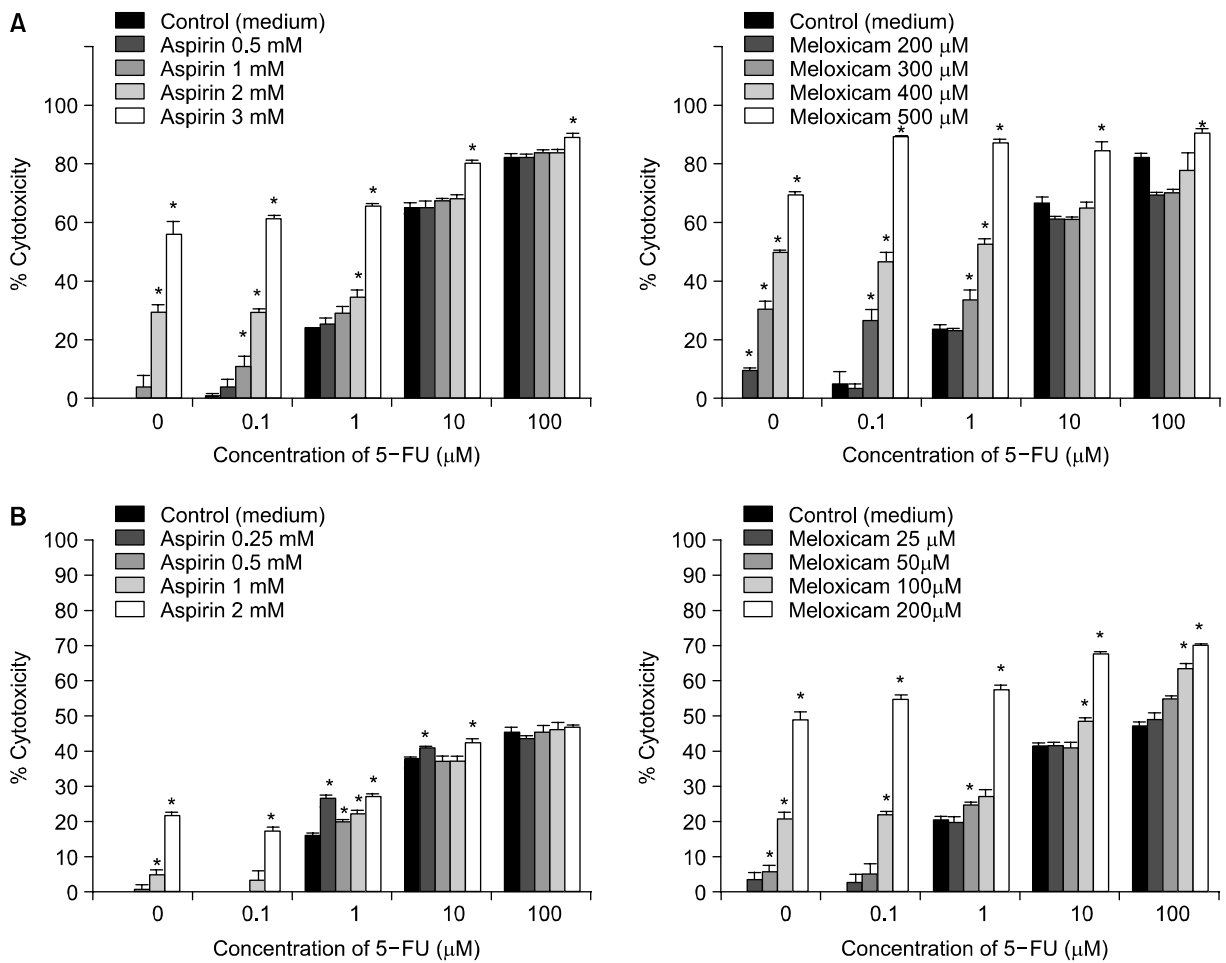
### 3) Aspirin 또는 meloxicam을 5-FU와 병합투여시의 세포독성 효과.

COX-2 단백질이 발현되는 HT-29 세포주에서, 여러 농도로 aspirin과 5-FU를 병합 투여하였을 때, 0.1 $\mu$ M과 1 $\mu$ M과 같은 저농도의 5-FU에서는 aspirin이 농도의존적으로 5-FU의 세포독성을 증강시키는 것이 관찰되었으며, 10 mM 이상의 고농도에서는 여러 농도의 aspirin을 투여해도 세포독성 증강 효과가 관찰되지 않았다. Meloxicam과 5-FU를 병합 투여하였을 경우에도 비슷한 결과를 관찰할 수 있었으나, aspirin이 1 mM~3 mM 정도에서 5-FU의 세포독성 효과를 증진시켰지만, meloxicam은 0.3 mM~0.5 mM 정도에서도 5-FU의 세포독성효과를 증진시키는 효과가 관찰되어 meloxicam이 더 효과적이라는 것을 알 수 있었다.

COX-2 단백질이 발현되지 않는 SNU-C1 세포주에



**Fig. 2.** Cytotoxicity effect of aspirin and meloxicam in HT-29 (A) and SNU-C1 (B) cells that express and do not express COX-2, respectively. The cytotoxicity was determined by MTT assay. The experiments were carried out in triplicate. Bars = Standard Error (SE); \*Significant difference ( $P < 0.05$ ) from HT-29 cytotoxic values by Students *t*-test.



**Fig. 3.** Cytotoxicity effect of combined aspirin or meloxicam and 5-FU in HT-29 (A) and SNU-C1 (B) cells that express and do not express COX-2, respectively. The cytotoxicity was determined by 3-day MTT assay. The experiments were carried out in triplicate. Bars = SE; \*Significant difference ( $P < 0.05$ ) from control values by Students *t*-test.

서 aspirin과 5-FU를 병합 투여하였을 때, HT-29 세포주에서와 비슷한 효과가 관찰되었다. SNU-C1 세포주에서 5-FU와 meloxicam을 병합 투여하였을 때, 거의 모든 농도의 5-FU에서 0.1 mM과 0.2 mM의 meloxicam이 세포독성을 의의 있게 증진시켜 aspirin에서보다 10배 이상 효과적이라는 것을 알 수 있었다(Fig. 3).

**4) 비스테로이드성 항염제와 5-FU의 처치 순서에 따른 세포독성 효과**

HT-29 세포주에서 aspirin과 5-FU를 여러 조합으로 순차적으로 또는 병합 투여하였을 경우 세포독성 효과는 5-FU를 먼저 투여하고 24시간 후 aspirin을 투여(5-FU → aspirin)하였을 때 48.25%로 다른 어떤 조합보

다 가장 크게 나타났다. Meloxicam과 5-FU의 경우는 병합 투여 시에는 세포독성 효과가 20.05%였지만 meloxicam → 5-FU의 조합에서는 38.16%, 5-FU → meloxicam의 조합에서는 37.73%로 병합 투여보다는 5-FU와 meloxicam을 따로따로 투여하는 것이 세포독성 효과가 더 증가되는 것을 알 수 있었다(Table 3).

SNU-C1 세포주에서 aspirin과 5-FU를 여러 조합으로 순차적으로 또는 병합 투여하였을 경우 5-FU → aspirin 조합에서 세포독성 효과가 33.48%로 다른 어떤 조합보다 가장 크게 관찰되었으며, meloxicam과 5-FU의 경우에서도 5-FU → meloxicam의 조합에서 35.85%로 다른 조합보다 가장 큰 세포독성 효과가 관찰되었다(Table 4).

**Table 3.** Effect of treatment sequence with aspirin (A) or meloxicam (B) and 5-FU on cytotoxicity in HT-29 cells that express COX-2

(A)		
24-hr treatment		Mean % cytotoxicity±SE
1	2	
Medium	Aspirin	6.45±1.00
Medium	5-FU	16.25±2.70
Medium	Aspirin+5-FU	26.02±2.71*
Aspirin	5-FU	20.82±2.58*
5-FU	Aspirin	48.25±5.58* <sup>†</sup>

(B)		
24-hr treatment		Mean % cytotoxicity±SE
1	2	
Medium	Meloxicam	25.73±5.47
Medium	5-FU	21.65±1.17
Medium	Meloxicam+5-FU	20.05±8.91
Meloxicam	5-FU	38.16±4.93 <sup>†</sup>
5-FU	Meloxicam	37.73±4.51 <sup>†</sup>

HT-29 cells were pretreated with medium only, 2 mM aspirin or 10µM 5-FU (A) and medium only, 500µM meloxicam or 10µM 5-FU (B) for 24 hours (treatment 1), respectively. Medium was removed and cells were washed twice with RPMI 1,640 medium. Cells were incubated with 2 mM aspirin and/or 10µM 5-FU (A) and 500µM meloxicam or 10µM 5-FU (B) for 24 hours (treatment 2), respectively. Cytotoxicity was assessed by 2-day MTT assay. The results were obtained in triplicate independent experiments. \*Significantly higher for combination treatment than for aspirin or meloxicam alone (P < 0.05); <sup>†</sup> Significantly higher for combination treatment than for 5-FU alone (P < 0.05).

**Table 4.** Effect of treatment sequence with aspirin (A) or meloxicam (B) and 5-FU on cytotoxicity in SNU-C1 cells that do not express COX-2

(A)		
24-hr treatment		Mean % cytotoxicity±SE
1	2	
Medium	Aspirin	8.38±0.18
Medium	5-FU	10.25±3.23
Medium	Aspirin+5-FU	13.81±1.45*
Aspirin	5-FU	22.19±4.56*
5-FU	Aspirin	33.48±0.77* <sup>†</sup>

(B)		
24-hr treatment		Mean % cytotoxicity±SE
1	2	
Medium	Meloxicam	0
Medium	5-FU	11.39±3.09
Medium	Meloxicam+5-FU	19.55±10.09
Meloxicam	5-FU	21.34±5.76*
5-FU	Meloxicam	35.85±6.77* <sup>†</sup>

SNU-C1 cells were pretreated with medium only, 2 mM aspirin or 100µM 5-FU (A) and medium only, 100µM meloxicam or 100µM 5-FU (B) for 24 hours (treatment 1), respectively. Medium was removed and cells were washed twice with RPMI 1,640 medium. Cells were incubated with 2 mM aspirin and/or 10µM 5-FU (A) and 100µM meloxicam or 100µM 5-FU (B) for 24 hours (treatment 2), respectively. Cytotoxicity was assessed by 2-day MTT assay. The results were obtained in triplicate independent experiments. \*Significantly higher for combination treatment than for aspirin or meloxicam alone (P < 0.05); <sup>†</sup> Significantly higher for combination treatment than for 5-FU alone (P < 0.05).

## 고 찰

암의 형성(carcinogenesis)에 관여하는 중요한 물질 중의 하나로 알려진 COX-2는 대장암 조직에서 약 80% 이상에서 발현되는 것으로 알려져 있다.<sup>9,10</sup> 대장암 세포주에서 COX-2의 발현은 전사(transcription) 단계, 후전사(post-transcription) 단계, 그리고 단백질 단계에서 조절되는 것으로 알려져 있으며, 이 중 전사조절이 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 고분화(well differentiated) 암 조직에서 잘 발현되는 것으로 알려져 있다.<sup>11</sup> COX-2의 발현을 억제하는 물질은 많이 알려져 있지 않으나 야생형(wild type) p53이 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 대장암 세포주에서 COX-2 mRNA는 모든 세포주에서 다양하게 발현되었지만, 단백질의 발현은 mRNA의 발현정도와는 비례하지 않고, 2개의 세포주에서만 발현이 되어 후전사 단계(post-transcriptional level)나 단백질 단계에서의 기전이 기능을 하는 COX-2 단백질의 발현에 중요한 영향을 끼치는 것으로 생각된다. 본 연구에 사용된 세포주 중에 SNU-C1 등은 야생형의 p53을 발현하는 것으로 알려져 있으며, HT-29 세포주는 돌연변이형 p53을 발현하는 것으로 알려져 있어,<sup>12,13</sup> 야생형 p53이 COX-2의 발현을 억제한다는 연구와 일치하는 것을 알 수 있었다.

COX-2 억제제로 알려진 비스테로이드성 항염제가 항암효과를 나타내는 기전은 크게 세 가지로 나눌 수 있다. 첫째, 비스테로이드성 항염제가 COX를 억제시켜 prostaglandin의 합성을 저해하여 이로 인해 matrix metalloproteinase (MMP) 활성도를 저하시키거나 세포 부착(cell adhesion)을 증가시켜 암세포의 침습력(tumor invasion)을 저하시키는 기전, 여러 혈관신생 물질(angiogenic factors)을 저하시켜 혈관형성능(angiogenesis)을 저하시키는 기전, 또는 bcl-2저하, bax 활성화 등으로 세포사(apoptosis)를 직접 유발하는 기전 등이 있다.<sup>14,15</sup> 둘째, 비스테로이드성 항염제가 COX 비의존적으로 NF(nuclear factor)-κB 또는 PPARs (peroxisome proliferative-activated receptor) 등에 직접 작용하여 이러한 물질들을 활성화시켜 유전자의 전사를 조절하고 prostaglandin의 저하와 같은 효과를 유발하여 항암효과를 나타낼 수 있다.<sup>16-18</sup>

셋째, COX의 기질인 arachidonic acid가 비스테로이드성 항염제의 투여로 축적되어 이로 인해 세포사를 유발시킬 수 있는 ceramide의 농도가 상승되어 세포사

를 일으킬 수 있다.<sup>19</sup> 본 연구에서는 COX-2의 발현여부와 상관없이 비스테로이드성 항염제가 세포독성을 보여 COX-2 비의존적인(independent) 기전이 상당히 관여하는 것을 시사하였다.

5-FU와 비스테로이드성 항염제의 병합투여가 항암효과를 상승 또는 증가시킨다는 것을 세포 내의 분자학적인 수준에서 증명한 연구 결과는 많지가 않다. Mizutani 등<sup>20</sup>은 방광암세포주에서, 5-FU는 세포사를 촉진시키는 Bax를 상승시키고, JTE-522는 세포사를 억제시키는 Bcl-XL의 발현을 억제시켜, 두 가지의 약제를 병합 투여하였을 때 Bax/Bcl-XL ratio를 증가시켜 상승작용(synergic effect)을 나타낸다고 보고 하였다. 그 외에 다른 연구들에서 추론해 볼 때, 비스테로이드성 항염제는 PGE<sub>2</sub>를 억제하여 성장신호체계(growth signaling pathway)를 억제시킬 수 있으며, 5-FU는 Fas 신호체계를 활성화 하여 death signaling pathway를 활성화 할 수 있기 때문에 두 약제의 병합투여는 세포사에 중요한 두 가지 신호체계에 영향을 주어 상당한 항암효과를 나타낼 수 있을 가능성이 있으나,<sup>21</sup> 이러한 병합투여를 뒷받침할 만한 이론적인 근거에 대한 보다 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각한다. 본 연구에서 사용된 aspirin이나 meloxicam은 저자들의 기대와 달리 5-FU의 작용을 상승(synergy)시키지는 못하였으며, COX-2 단백질의 발현 여부에 상관없이 부가적인(additive) 효과를 관찰할 수 있었다. 이러한 약제들은 많은 이유로 결장직장암 환자들에게 자주 처방되는 약제이기 때문에 부가적인 효과만으로도 충분히 병합투여의 의의는 있을 것으로 생각한다. 본 연구에서 보인 흥미로운 결과는 5-FU를 투여하고 나중에 비스테로이드성 항염제를 투여했을 때 가장 큰 효과가 관찰되었으며, 이는 기존의 다른 연구에서는 찾아볼 수 없었던 결과이다. 비스테로이드성 항염제를 항암제와 병합 투여할 때 지속적인 투여는 부작용을 나타낼 가능성이 있기 때문에 약물의 투여 시점을 정확히 설정하여 효과가 최대한 보이는 시점에만 투여하면 보다 더 효과적인 병합 투여가 될 가능성이 있다. 비스테로이드성 항염제를 항암제와 병합 투여할 때 약물 투여의 순서와 농도 등에 대해서는 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각한다.

최근에 COX-2 억제제와 여러 항암제 또는 방사선 치료 등을 병합 투여하여 반응률을 조사하는 많은 임상 연구가 결장직장암 뿐만 아니라 여러 가지의 암에서 이루어지고 있어 몇 년 후면 그 결과가 확실히 나타날 것으로 기대한다.<sup>22,23</sup>

## 결 론

대장암세포주에서 비스테로이드성 항염제는 5-FU와 병합 투여하였을 때, COX-2의 단백질의 발현여부와 상관없이 5-FU의 항암효과를 증대시키기 때문에 임상적으로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각한다. 그러나 비스테로이드성 항염제의 투여 시점, 농도 등에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

## REFERENCES

- Ardalan B, Cooney DA, Jayaram HN, Carrico CK, Glazar RI, Macdonald J, et al. Mechanism of sensitivity and resistance of murine tumors to 5-fluorouracil. *Cancer Res* 1980;40:1431-7.
- Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ, Piantadosi S, Hyland LM, Celano P, et al. Treatment of colonic and rectal adenoma with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993;328:1313-6.
- Giovannucci E, Egan KM, Hunter DJ, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, et al. Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *N Engl J Med* 1995;333:609-14.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
- Goel A, Boland CR, Chauhan DP. Specific inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by dietary curcumin in HT-29 human colon cancer cells. *Cancer Lett* 2001;172:111-8.
- Nakajima-Iijima S, Hamada H, Reddy P, Kakunaga T. Molecular structure of the human cytoplasmic beta-actin gene: interspecies homology of sequences in the introns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:6133-7.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedures and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350-4.
- Pieters R, Huismans DR, Leyva A, Veerman AJ. Adaptation of the rapid automated tetrazolium dye based (MTT) assay for chemosensitivity testing in childhood leukemia. *Cancer Lett* 1988;41:323-32.
- Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, Dubois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenoma and adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1994;107:1183-8.
- 강원경, 천준성, 장세진, 조현민, 천성원, 안창혁 등. 대장-직장암에서 Cyclooxygenase-2의 발현. *대한대장항문학회지* 2004;20:112-7.
- Shao J, Sheng H, Inoue H, Morrow JD, Dubois RN. Regulation of constitutive cyclooxygenase-2 expression in colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 2000;275:33951-6.
- Rand A, Glenn KS, Alvares CP, White MB, Thibodeau SM, Karnes WE Jr. p53 functional loss in a colon cancer cell line with two missense mutations (218leu and 248trp) on separate alleles. *Cancer Lett* 1996;98:183-91.
- Violette S, Poulain L, Dussaulx E, Pepin D, Faussat AM, Chambaz J, et al. Resistance of colon cancer cells to long-term 5-fluorouracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and Bcl-X(L) in addition to Bax and p53 status. *Int J Cancer* 2002;98:498-504.
- Reddy BS, Rao CV, Rivenson A, Kelloff G. Inhibitory effect of aspirin on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Carcinogenesis* 1993;14:1493-7.
- Boolbol SK, Dannenberg AJ, Chadburn A, Martucci C, Guo XJ, Ramonetti JT, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression and tumor formation are blocked by sulindac in a murine model of familial adenomatous polyposis. *Cancer Res* 1996;56:2556-60.
- He TC, Chan TA, Vogelstein B, Kinzler KW. PPAR-delta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* 1999;99:335-45.
- Yamamoto Y, Yin MJ, Lin KM, Gaynor RB. Sulindac inhibits activation of the NF-kappa B pathway. *J Biol Chem* 1999;274:27307-14.
- Poligone B, Baldwin AS. Positive and negative regulation of NF-kappaB by COX-2: roles of different prostaglandins. *J Biol Chem* 2001;276:38658-64.
- Chan TA, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mechanisms underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:681-6.
- Mizutani Y, Kamoi K, Ukimura O, Kawauchi A, Miki T. Synergistic cytotoxicity and apoptosis of JTE-522, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, and 5-fluorouracil against bladder cancer. *J Urol* 2002;168:2650-4.
- Backus HH, Dukers DF, van Groeningen CJ, Vos W, Bloemena E, Wouters D, et al. 5-Fluorouracil induced Fas upregulation associated with apoptosis in liver metastases of colorectal cancer patients. *Ann Oncol* 2001;12:209-16.
- Blanke CD. A phase II trial of celecoxib, irinotecan, 5-fluorouracil and leukovorin in patients with unresectable or metastatic colorectal cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002;21:505.
- Csiki I. Cyclooxygenase-2 inhibition+docetaxel in recurrent non-small cell lung cancer; preliminary results of a phase II trial. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002;21:1187.