

대장암 세포에서 다약물 내성기전으로서 ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters의 발현과 기능

조선대학교 의과대학 외과학교실, ¹내성세포연구센터, ²약리학교실

정귀애 · 김경종 · 민영돈 · 이태범¹ · 강성인² · 정권율² · 최철희^{1,2}

Expression and Function of ABC Transporters as Multidrug Resistance Mechanisms in Colon Cancer Cells

Gui-Ae Jeong, M.D., Kyung-Jong Kim, M.D., Young-Don Min, M.D., Tae-Bum Lee¹, Sung-In Kang, M.D.², Kwon-Ryul Jung, M.D.², Cheol-Hee Choi, M.D.^{1,2}

Department of Surgery, ¹Research Center for Resistant Cells, ²Department of Pharmacology, Chosun University Medical School, Gwangju, Korea

Purpose: Multidrug resistance (MDR) is a phenomenon whereby tumor cells acquire resistance to a broad range of structurally and functionally diverse chemotherapeutic drugs. The most widely implicated mechanism of MDR is that concerned with altered membrane transporters in tumor cells. P-glycoprotein (Pgp), multidrug resistance protein (MRP), and breast-cancer-resistance protein (BCRP) are well-known membrane transporters that pump out anti-tumor agents by using an ATP-dependent process, the so-called ATP-binding cassette (ABC) superfamily or transporter. This study was undertaken to test the prevalence of each ABC transporter and to determine which transporter has functional activity in various colon cancer cells. **Methods:** Expressions of Pgp, MRP, and BCRP mRNA were determined in 9 colon-cancer cell lines by using an RT-PCR assay. The sensitivity to anticancer agents substrate for each ABC transporter in the colon cancer cells determined using an MTT assay. The accumulation of fluorescent compounds for functional detection of each ABC transporter was determined by using flow cytometry. **Results:** Pgp mRNA was variably expressed in 6 of 9 colon cancer cells lines. MRP and BCRP mRNA were expressed in all the 9 cell lines. A smaller cytotoxic effect to paclitaxel and a smaller amount of rhodamine123 accumulation were

observed in Colo 320HSR expressing the highest levels of Pgp than in SNU-C5 not expressing Pgp. These effects in Colo320HSR were reversed with the addition of various Pgp inhibitors, but such a reversal did not occur in SNU-C5. The cytotoxic effect to VP-16 was not related to the expression levels of MRP in Colo320HSR and SNU-C, but the amount of calcein-AM accumulation was reversed with addition of probenecid, MRP inhibitor. The cytotoxic effect and the drug accumulation of mitoxantrone were not related to the expression levels of BCRP. **Conclusions:** This study suggests that of the ABC transporters, primarily Pgp and MRP have functional activity in colon cancer cell lines. **J Korean Soc Coloproctol 2005;21:129-137**

Key Words: Colon cancer, Multidrug resistance (MDR), ABC transporter
대장암, 다약물 내성, ATP 결합카세트 transporter

서 론

암 화학요법의 주된 문제 중의 하나가 항암제에 대한 내성이라고 할 수 있다. 처음부터 표준 항암제에 반응하지 않는 일차내성(primary resistance 또는 natural resistance)이 있으며, 반면에 항암제에 처음에는 잘 반응을 보이던 종양에서 획득내성(acquired resistance)을 보이는 경우도 있다. 획득내성 중에서 다약물 내성(multidrug resistance, MDR)이 특히 문제가 되고 있다.¹ MDR이란 하나의 항암제에 노출된 암세포가 전에 사용한 적이 없는 구조나 기능이 다른 다양한 항암제에 내성을 보이는 현상을 말한다. 여러 가지 기전의 다약

접수: 2005년 1월 14일, 승인: 2005년 6월 2일
책임저자: 김경종, 501-759 광주광역시 동구 서석동 588
조선대학교병원 외과
Tel: 062-220-3073, Fax: 062-228-3441
E-mail: kjkim@chosun.ac.kr

이 연구는 과학기술부 한국과학재단지원 내성세포연구센터(MRC, R13-2003-009)지원으로 수행되었음.

Received January 14, 2005, Accepted June 2, 2005
Correspondence to: Kyung-Jong Kim, Department of Surgery, Chosun University Medical School, 588 Seoseok-dong, Dong-gu, Gwangju 501-717, Korea.
Tel: +82-62-220-3073, Fax: +82-2-228-3441
E-mail: kjkim@chosun.ac.kr

물 내성기전이 알려져 있으며, 가장 광범위하게 관련된 기전은 중앙세포의 세포막 이동의 변화이다. 이를 전형적인 다약물 내성(typical MDR 또는 classical MDR)이라고 한다. 이같은 전형적인 다약물 내성은 주로 항암제를 세포 밖으로 방출하는 세포막 배출펌프의 증가 때문인 경우가 많다. 이 중에서 대표적인 세포막의 배출펌프로는 170 KD의 분자량을 가지고 있는 P-glycoprotein (Pgp)으로 *MDR1* 유전자 증폭에 기인하는 경우가 많다.^{2,3} Pgp는 ATP가 결합하는 부분(domain)이 있으며, ATP를 에너지로 이용하여 다양한 외부물질(항암제에만 한정된 것은 아님)을 세포 밖으로 배출시키기 때문에 ABC (ATP-binding cassette) transporter에 속한다. 그 밖에 ABC superfamily에 속하는 인간의 세포막 배출펌프에는 다약물 내성관련 단백질(multidrug resistance-associated protein, MRP)과 유방암 내성단백질(breast cancer resistance protein, BCRP 또는 mitoxantrone resistance protein, MXR) 등이 있다.^{4,6} 이들 단백질은 혈액종양 및 많은 고형종양에서 항암제 내성과 관련되어 있으며, 또한 항암제에 대한 반응도를 예측할 수 있는 지표 또는 예후와도 관련이 있는 것으로 알려지고 있다.⁷

본 연구에서는 여러 대장암세포에서 ABC transporters의 발현 양상을 알아보고 또 어떤 단백질이 대장암 세포에서 주요한 기능을 하는지를 알아보고자 하였다.

방 법

1) 세포배양

인간의 대장암세포인 SNU-C1, -C4, -C5, COLO320HSR, LoVo, DLD-1, HT-29, HCT-8, HCT-116을 한국 세포주 은

행에서 분양 받았다. 이 세포주들은 10% fetal bovine serum (Sigma, USA)이 함유된 RPMI 1640 배양액(GibcoBRL)으로 37°C, 5% CO₂의 습윤 배양기에서 배양하였다.

2) 역전사-중합효소 연쇄반응을 이용한 ABC transporters의 발현양상

(1) 총 RNA의 추출: TRIzol Reagent (Invitrogen)를 이용하여 총 RNA를 분리 추출하였다. Polypropylene tube에 5×10⁶개의 세포를 침전시킨 후 TRIzol 1 ml을 넣고 5분 동안 15~30°C에서 incubation 하였다. 200µl chloroform을 넣고 15초 동안 손으로 가볍게 섞어주고 2~3분 동안 15~30°C에서 incubation 시켰다. 4°C에서 13,200 rpm으로 15분간 centrifuge하고 끝나면 상층의 것을 tube에 옮겼다. 500µl isopropyl alcohol을 넣고 잘 섞어준 다음 10분 동안 15~30°C에서 incubation시켰다. 4°C에서 13,200 rpm으로 15분 동안 centrifuge하고 상층액을 제거하고 75% EtOH를 RNA pellet에 넣고 vortexing하고 4°C에서 13,200 rpm으로 5분간 centrifuge 하였다. 다음 실온에서 pellet을 건조시킨 후 0.1% DEPC water에 다시 녹였다. RNA 농도(1 OD=A₂₆₀ unit of single-stranded RNA=40µg/ml)는 260 nm에서 측정하였고 (DU^R 650 spectrophotometer, Beckman), RNA 순도는 A₂₆₀ (260 nm에서의 흡광도)/A₂₈₀ (280 nm에서의 흡광도) 비로, RNA 보존도는 5µg RNA를 전기영동하여 확인하였다. 이상에서 사용된 모든 용액은 제조한 후 하룻밤 동안 37°C에서 보관 후 121°C에서 20분간 고압 증기 멸균한 0.1% DEPC water를 가지고 만들었다.

(2) 역전사-중합효소 연쇄반응: First strand cDNA를

Table 1. Primer sequences used for PCR

Gene	S & AS*	Nucleotide sequences	Sequences region [†]	Length of PCR products	References [‡]
Pgp	S	5'-CTGGTTTGTATGTGCACGATGTTGG-3'	907~930	295 bp	8
	AS	5'-TGCCAAGACCTCTTCAGCTACTG-3'	1179~1201		
MRP	S	5'-GACGGGAGCTGGGAAGTC-3'	4180~4197	355 bp	4
	AS	5'-ACAACCTACTCCGGTGCC-3'	4551~4568		
BCRP	S	5'-CGACCGACGACACAGA-3'	2136~2151	475 bp	5
	AS	5'-CTTAAATGAATGCGATTGAT-3'	2590~2610		
β-actin	S	5'-GACTATGACTTAGTTGCGTTA-3'	1912~1932	501 bp	9
	AS	5'-GTTGAACTCTCTACATACTTCCG-3'	2392~2412		

Pgp = P-glycoprotein; MRP = multidrug resistance-associated protein; BCRP = breast cancer resistance protein. *Sense and antisense; [†] The oligonucleotide primers constructed for PCR correspond to the sense and antisense based within these reported sequences; [‡] References for primer sequences.

Table 2. PCR conditions of Pgp, MRP, BCRP and β -actin

Gene	No. of cycles	Hot start	Denaturation	Annealing	Extension	
Pgp	21			65°C, 30 sec		
MRP	22	94°C, 12 min	94°C, 30 sec	53°C, 30 sec	72°C, 1 min	72°C, 5 min
BCRP	22			53°C, 30 sec		
β -actin	17			53°C, 30 sec		

Abbreviations for genes are the same as those in Table 1.

1 U/ μ l RNasin (Promega), oligo (dT) 450 ng, 40 mM Tris-HCl (pH 8.4), 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM each dNTP, 10 mM DTT (GibcoBRL)와 MMLV reverse transcriptase (GibcoBRL) 200 U가 함유된 20 μ l의 용액에서 총 RNA 1 μ g으로부터 합성하였다. PCR은 1 \times PCR 완충액(10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 100 μ g/ml gelatin, 0.05% triton X-100)에 25 ng의 RNA로부터 합성된 cDNA, 각각 primers 10 pmole, 50 μ M dNTP와 *taq* DNA polymerase (μ l Perkin Elmer) 2.5 unit가 함유된 25 μ l의 반응액에서 시행하였다. 정량을 위하여 3.33 UCi [α -³²P] dCTP를 반응 혼합물에 첨가하였다.

PCR 반응에 사용한 primer와 PCR조건은 Table 1, 2와 같다. PCR 기계는 GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer)을 사용하였다.

PCR 산물 25 μ l로부터 Pgp, MRP, BCRP 10 μ l와 β -actin 5 μ l를 7% 비변성 polyacrylamide gel상에서 100 V에서 2시간 동안 전기영동하였다. 전기영동 후 1시간 30분 동안 80°C에서 건조한 후 X-ray 필름에 노출시켜 autoradiography를 시행하였다.

3) MTT assay를 이용한 세포독성 실험

세포독성 실험은 살아있는 세포의 미토콘드리아에 존재하는 succinic dehydrogenase라는 효소가 MTT [3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide]를 환원시켜 formazan을 형성시킬 수 있음을 근거로 formazan의 농도를 측정함으로써 생존한 세포수를 측정하는 MTT 방법을 이용하였다.¹⁰ 대사과정이 정상적인 암세포는 미토콘드리아의 탈수소 효소작용에 의하여 노란색 수용성 MTT tetrazolium을 자주색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시킨다. MTT formazan의 흡광도는 540 nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아있고 대사적으로 왕성한 세포의 농도를 반영한다.

96 well microplate (Falcon)에 3일간 약물 없이 배양한 세포주를 적절한 농도로 희석시키고 세포 부유액 90 μ l

씩을 각각 넣었다. 그리고 24 시간 후에 측정하고자 하는 약물을 10 μ l씩 넣었다. 이때 약물대신 PBS (phosphate buffered saline)를 넣어 세포의 대조군으로 삼고, 세포 대신 배양액만을 넣어 blank로 삼았다. 잘 혼든 후 3일간 CO₂ 배양기에서 배양한 후 모든 well에 MTT 용액(5 mg/ml PBS, Sigma) 10 μ l를 가해주고 다시 37°C, 5% CO₂에서 4~5시간 더 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다.

Monolayer 세포인 경우 각 well에서 80 μ l씩 버린 다음 150 μ l DMSO를 넣고 10분 동안 shaking해서 생성된 formazan 결정을 잘 녹여서 microplate reader (Bio-Tek, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였고 suspension 세포인 경우 0.04 N-HCL/Isopropanol 용액 100 μ l을 넣은 다음 formazan을 잘 녹인 후 흡광도를 측정하였다.

$$\text{세포독성작용\%} = \frac{\text{항암제를 처치한 well의 흡광도}}{\text{항암제를 처치하지 않은 well의 흡광도}} \times 100$$

4) Drug accumulation test

세포 밖으로 약물을 배출함으로써 약물의 축적을 감소시키는 세포막 이동능을 유세포 분석기(FACSC ailburTM, Becton Dickinson)를 이용하여 간접적으로 측정하였다. 약물 없이 배양한 세포를 차가운 PBS (pH 7.4)용액으로 세 번 세척한 후 10⁶/ml가 되도록 PBS 용액에 부유한 후 Pgp, MRP, BCRP의 기질이 되면서 형광을 내는 rhodamine123 (2 μ M), calcein-AM (0.25 μ M), mitoxantrone (20 μ M)만 넣거나 Pgp, MRP, BCRP inhibitor인 PSC833 (5 μ M), probenecid (5 mM), FTC (10 μ M)을 동시에 넣어 37°C에서 1시간 동안 방치한 후 유세포 분석을 하였다.

5) 통계처리

실험 결과는 평균 \pm 표준편차 형태로 나타내며 두 그룹간의 통계적인 분석은 Student *t-test* 방법을 이용하였다. P<0.05인 경우 통계적인 유의성이 있는 것으로

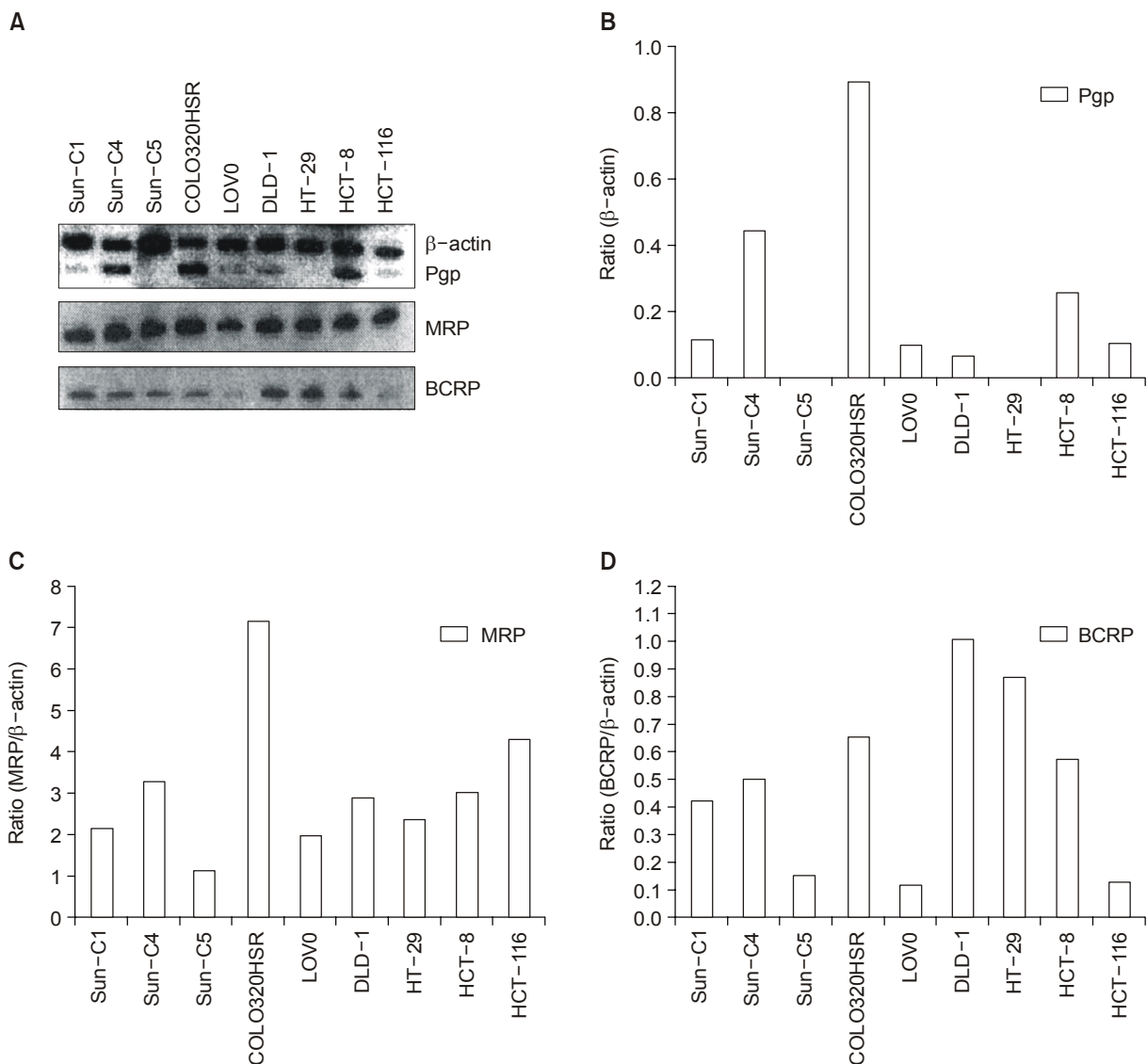


Fig. 1. (A) Expression of mRNA of ABC transporters in various colon cancer cells. Expression was determined by RT-PCR assay. β -actin is used as a control for RNA. The cDNA reverse-transcribed from mRNA was separately amplified with each primer pair for Pgp, MRP, BCRP and β -actin genes. Aliquots of each PCR reaction mixture were separated on 7% polyacrylamide gel in TAE. The gel was dried and exposed on X-ray film overnight. (B) The ratio of Pgp/ β -actin in the colon cancer cells. (C) The ratio of MRP/ β -actin in the colon cancer cells. (D) The ratio of BCRP/ β -actin in the colon cancer cells.

간주하였다.

결 과

1) ABC transporters의 발현양상

각각의 ABC transporters mRNA의 발현정도를 알아보기 위해 RT-PCR을 시행한 결과 Pgp mRNA는 9개의 대장암세포 중 6개에서 다양한 수준으로 발현되었으며, Colo320HSR 세포에서 가장 강하게 발현되었고, SNU-C5, HT-29와 HCT-116에서는 발현되지 않았다.

MRP와 BCRP mRNA는 9개의 대장암세포 모두에서 다양한 수준의 발현이 관찰되었다. Pgp, MRP 그리고 BCRP mRNA가 모두 발현된 경우는 9개의 대장암세포 중 6개의 세포로 66.6%를 차지하였다(Fig. 1).

2) 세포독성 실험

ABC transporters의 대략적인 기능을 알아보기 위해 Pgp, MRP 그리고 BCRP가 가장 강하게 발현되는 세포와 가장 약한 발현 또는 발현되지 않는 세포를 선택하여 MTT assay를 시행하였다. Pgp가 가장 강한 발현을

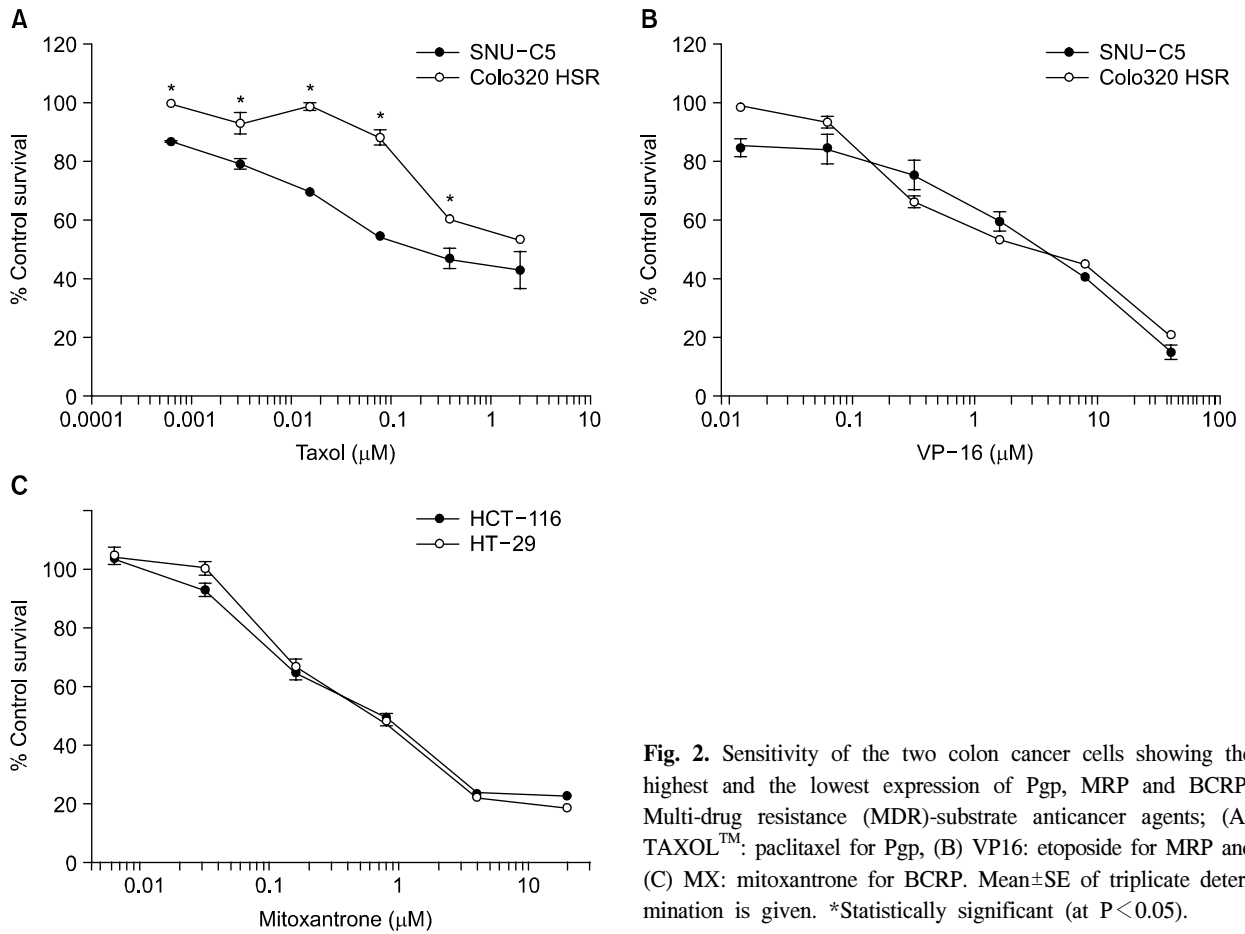


Fig. 2. Sensitivity of the two colon cancer cells showing the highest and the lowest expression of Pgp, MRP and BCRP. Multi-drug resistance (MDR)-substrate anticancer agents; (A) TAXOL™: paclitaxel for Pgp, (B) VP16: etoposide for MRP and (C) MX: mitoxantrone for BCRP. Mean±SE of triplicate determination is given. *Statistically significant (at P<0.05).

보이는 Colo320HSR과 Pgp가 발현되지 않는 SNU-C5에 Pgp의 기질인 Paclitaxel을 처치하였을 때 Colo320 HSR에서 SNU-C5에 비해 세포의 생존율이 의의 있게 증가한 것을 관찰할 수 있었다. MRP의 기질이 VP-16을 처치하였을 때는 MRP의 발현 수준과 세포독성 효과는 상관관계를 발견할 수 없었으며, BCRP의 기질인 mitoxantrone을 처치하였을 때 BCRP의 발현 수준과 세포독성 효과의 상관관계는 발견할 수 없었다(Fig. 2). Colo320HSR 세포에서는 paclitaxel을 저농도로 투여하고 여기에 cyclosporine, verapamil, 그리고 PSC 833 같은 Pgp 억제제를 같이 투여하였을 때 세포독성 효과가 의의 있게 증진되는 것이 관찰되었지만, SNU-C5에서는 의의 있는 Pgp 억제제의 효과를 관찰할 수 없었다. 또한 여러 가지의 Pgp 억제제 중에서 PSC 833이 가장 paclitaxel의 세포독성 효과를 증진시키는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

3) 약물축적 실험(drug accumulation test)

Rhodamine123을 처치하였을 때 Colo320HSR세포는 SNU-C5에 비해 세포 내 약물축적이 더 적음을 관찰할

수 있었으며, PSC 833을 같이 투여하였을 때 rhodamine123만을 투여한 것 보다 세포 내 약물의 축적이 의의 있게 증가한 것이 관찰되었으나 SNU-C5에서는 이러한 효과가 관찰되지 않았다.

SNU-C5와 Colo320HSR 모두에서 MRP 억제제인 probenecid를 같이 투여하였을 때 MRP의 기질이 되는 Calcein-AM 세포 내 농도가 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 MRP의 발현수준과 세포 내 약물 증가 정도는 비례하지 않았다. BCRP mRNA의 발현이 강한 HT-29에서 HCT-116에 비해 mitoxantrone의 세포 내 축적 정도가 낮았지만, FTC를 첨가하였을 때에 두 세포 모두에서 mitoxantrone의 세포 내 축적의 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 4).

고 찰

ABC transporters는 세균에서 인간에까지 널리 분포되어 있으며 100여 종이 넘는다. 인간에서는 현재까지 48개의 ABC 유전자가 보고되었고, 그 중에서 16개가

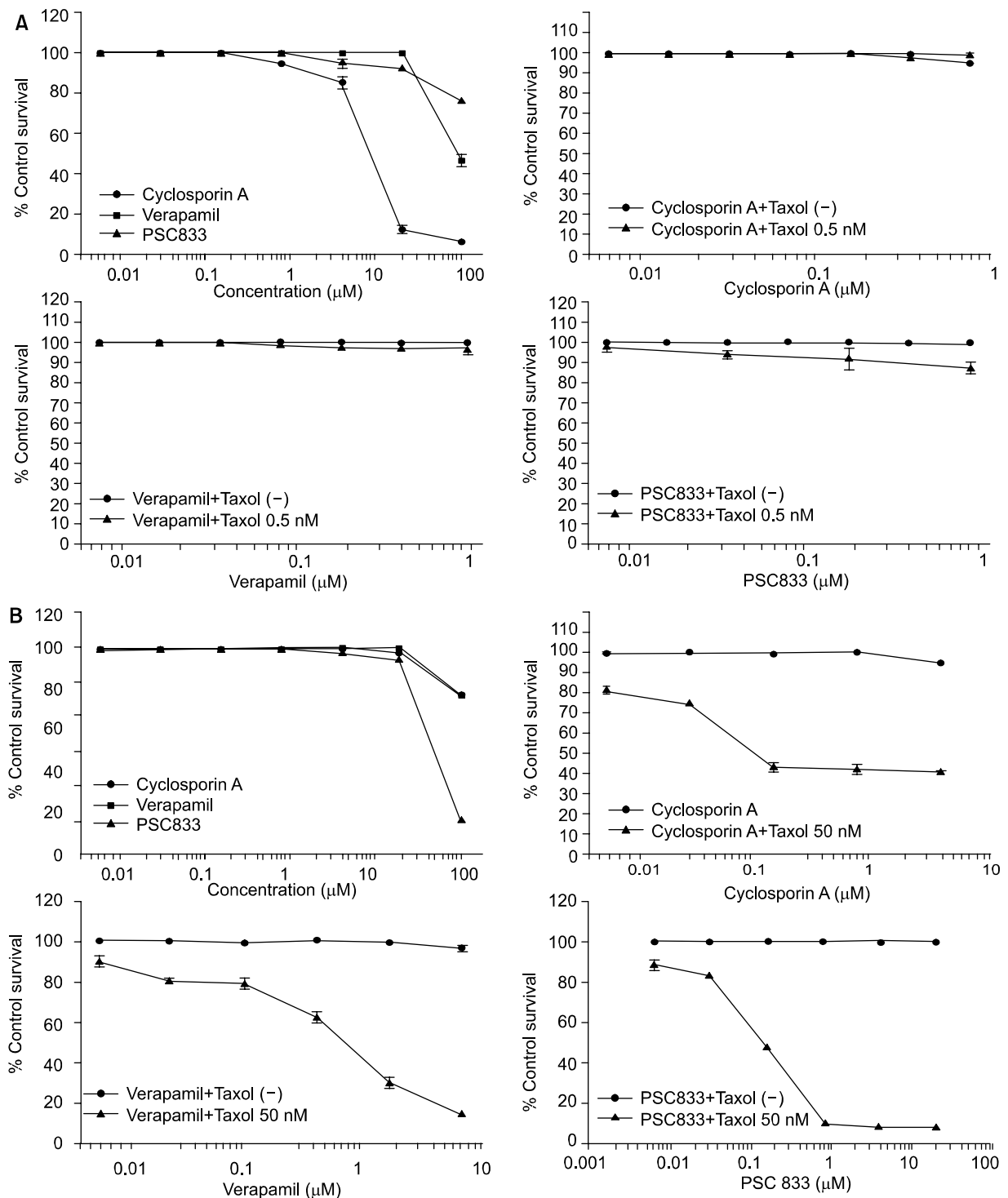


Fig. 3. Effect of P-glycoprotein inhibition on the taxol cytotoxicity. The taxol cytotoxicity in the presence or absence of cyclosporin A, verapamil, PSC833 in the two colon cancer cells, SNU-C5 showing the lowest (A) and Colo320HSR showing the highest (B) expression of P-glycoprotein using an MTT assay.

기능이 알려져 있다.¹¹ ABC superfamily에 속하는 포유동물 세포막 배출펌프에는 Pgp, MRP, BCRP 등이 있다. 이들 내성단백질은 ABC superfamily에 속한다는

것을 제외하고는 유전자의 위치, 아미노산서열, 구조, 기질 등에 있어 상당히 차이가 있다. ABC transporters의 생리작용은 아직까지 확실하게 알려져 있지 않지

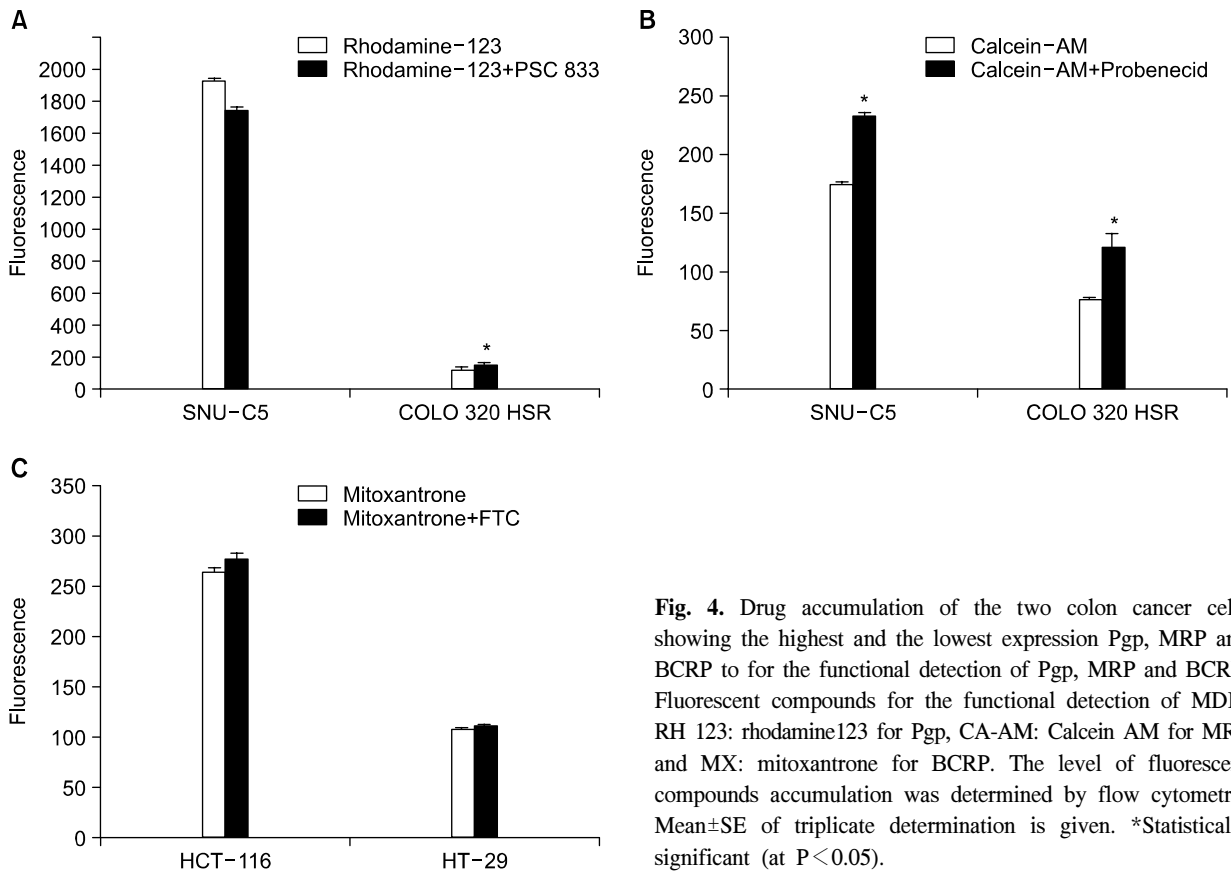


Fig. 4. Drug accumulation of the two colon cancer cells showing the highest and the lowest expression Pgp, MRP and BCRP to for the functional detection of Pgp, MRP and BCRP. Fluorescent compounds for the functional detection of MDR; RH 123: rhodamine123 for Pgp, CA-AM: Calcein AM for MRP and MX: mitoxantrone for BCRP. The level of fluorescent compounds accumulation was determined by flow cytometry. Mean±SE of triplicate determination is given. *Statistically significant (at P<0.05).

만 종양뿐만 아니라 정상조직인 소장, 대장, 간장, 췌장 등의 소화기계, 신장, 부신, 뇌와 고환 등의 상피세포와 내피세포의 세포막에 일정하게(constitutively) 발현되고 있다. ABC transporters의 조직분포로 비취볼 때 내인성 및 외인성 물질의 흡수와 배설에 관여하고 있는 것으로 생각되고 있다. ABC transporters는 지질, 담즙염, 독성물질, 펩타이드 등을 배출하는 것으로 알려져 있다.¹¹ 배출펌프를 정상적으로 발현하고 있는 세포는 물론이고 유전자는 존재하나 발현이 되고 있지 않는 세포에서 암이 유래한 경우, 항암제에 노출됨으로 인하여 유전자 발현이 시작되게 됨으로써 항암제에 대한 내성을 보이게 되어 공격적으로 임상 화학요법의 걸림돌이 되고 있다. Pgp의 기질이 되는 항암제로는 paclitaxel, vinblastine calcein-AM, etoposide, doxorubicin, epirubicin, rhodamine123, topotecan 등이 있으며, MRP의 기질이 되는 항암제는 calcein, methotrexate, vinblastine, etoposide epirubicin 등이 있으며, BCRP의 기질로는 mitoxantrone, lyso tracker, epirubicin 등이 있다.^{12,13} 일부의 항암제(예: epirubicin, doxorubicin, vinblastine 등)는 한가지의 세포막 배출펌프의 기질이 되

지 않고 중복 기질이 되기도 한다.

ABC transporters에 대한 연구는 백혈병 같은 혈액종양 세포와 고형종양으로는 유방암 등에서 많이 이루어지고 있다. 이러한 단백질이 처음부터 많이 발현되는 종양에서는 일차 내성을 보일 수 있으며,¹⁴ 또한 처음에는 적은 발현을 보이다가 항암치료 후 재발한 경우에 발현이 높아지는 경우도 있다.¹⁵ 때문에 이러한 단백질들은 항암치료를 하는 많은 악성종양에서 치료에 대한 반응도를 예측할 수 있는 인자 또는 예후 인자가 될 수 있으나 이에 대해서는 논란이 되고 있다.^{7,16}

ABC transporters가 다약물 내성과 밀접한 관계가 있기 때문에 내성을 초래하는 각 단백을 억제하여 항암제 내성을 극복하려는 많은 연구가 이루어지고 있다. 이러한 내성 억제물질은 항암제에 대한 내성을 역전하여 결과적으로 항암제에 대해 감수성을 보이도록 감각한다고 하여 화학감각제(chemosensitizer)라고 불린다. Pgp의 억제제로는 본 연구에 사용된 약물 같은 verapamil, cyclosporine A, PSC833 외에 quinidine, VX-710 등이 있고,¹³ MRP를 억제하는 화학 감각제에는 difloxacin, probenecid, indomethacin, RU-486 등이 있

며,¹⁷ BCRP를 억제하는 화학감작제에는 fumitremogin C (FTC), GF120918, Ko143¹⁸ 등이 있다. 이러한 물질은 *in vitro*와 동물실험에서는 어느 정도 효과가 있다고 입증되었으나,¹⁹ 임상적으로는 효과를 입증하지 못한 상태이다.

대장직장암은 진행성인 경우 일차요법이나 수술 후 보조적인 항암요법에 대해 내성을 보이는 것으로 알려져 있으며, 여기에는 ABC transporters, 특히 Pgp가 관여를 하는 것으로 알려져 있다.^{20,21} Pgp는 정상 대장 점막에서는 상당한 발현을 보인다. 암 조직에서의 발현에 대해서는, 정상조직에 비해 높게 발현된다는 보고도 있고,²² 암 조직이나 정상조직에 비해 발현의 차이가 없다는 보고도 있으며,²³ 또 정상조직에 비해 암 조직에서 더 낮게 발현된다는 보고도 있다.²⁴ 어쨌든 Pgp가 정상 대장직장 조직이나 암 조직에서 상당한 발현을 보이고 항암제 내성에 중요한 역할을 한다는 데에 대해서는 일치하고 있다. 본 연구에서도 여러 대장암세포에서 9개의 암세포 중에 3개를 제외하고 다양한 Pgp mRNA의 발현을 보이고 있으며, 또한 Pgp가 발현되는 세포는 Pgp가 항암제의 배출펌프로써 중요한 역할을 한다는 것을 확인할 수 있었다.

MRP도 정상 대장직장에서 발현되고 있으며, 암 조직에서의 발현은 역시 Pgp와 같이 정상보다 높다는 보고와 차이가 없다는 보고도 있다.^{24,25} 본 연구에서는 9개의 대장암세포 모두에서 다양한 수준의 MRP mRNA의 발현이 관찰되었으며, 기능적으로도 항암제 내성에 중요한 역할을 하는 것을 관찰할 수 있었다.

Pgp와 MRP가 대장암에서 항암제 내성에 모두 중요한 역할을 하지만, 두 단백질이 동시에 발현(co-expression)되지 않는다고 알려져 있다.^{24,25} 그러나 본 연구에서는 두 단백질 유전자가 동시에 발현되는 경우는 66.6%로 높았으며, 또한 항암제 배출펌프로써의 기능도 하고 있는 것이 관찰되었다.

ABC transporter 중 가장 늦게 발견된 BCRP는 정상적으로 태반에서 가장 높게 발현되며 대장조직에서도 보고에 따라 차이가 있지만,^{5,26} 상당히 발현되는 것으로 알려져 있다. 그러나 그 기능은 아직까지 정확히 알려져 있지 않다. Litman 등¹²은 Pgp와 MRP는 발현하지 않으며 BCRP만을 발현하는 대장암세포에서 mitoxantrone에 강한 내성을 보이며, anthracyclines, topotecan 등에도 교차내성을 보인다고 보고하였다. 본 연구에서는 9개의 대장암세포 모두에서 다양한 수준의 BCRP mRNA가 발현되었지만 배출펌프로써의 효과는 없는 것으로 관찰되었다. 본 연구에 사용된 세포는 모

두 Pgp나 MRP를 발현하고 기능을 하기 때문에 BCRP가 기능을 하지 않는 것으로 생각하며, BCRP는 대장암세포에서는 다약물 내성의 기전에 일차적인 관여를 하기보다는 Pgp나 MRP의 기능이 없을 경우에 기능을 하는 비전형적인 다약물 내성기전(atypical multidrug-resistance)에 중요한 역할을 하는 것으로 생각한다.

대장직장암의 화학요법제로 가장 많이 사용되고 있는 5-fluorouracil은 다행스럽게도 이들 ABC transporter의 기질이 되지는 않는 것으로 알려져 있으나, 최근에 진행성 암의 항암제로 사용되고 있는 camptothecin-11은 *in vitro* 실험에서 BCRP가 내성에 관여한다는 보고가 있다.²⁷ 때문에 대장직장암에서 새로운 화학요법제를 추가할 경우, ABC transporters에 의한 내성가능성이 있기 때문에 이를 염두해 두어야 할 것으로 생각한다.

결 론

대장암세포에서 다약물 내성기전으로서의 ABC transporters 중 Pgp와 MRP가 동시에 또는 개별적으로 중요한 역할을 하고 있으며 BCRP의 역할에 대해서는 추가의 연구가 필요할 것으로 생각한다.

REFERENCES

1. Clynes M. Cellular models for multiple drug resistance in cancer. *In Vitro Cell Dev Biol* 1993;29A(3 Pt 1):171-9.
2. Riordan JR, Ling V. Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability. *J Biol Chem* 1979;254:12701-5.
3. Ueda K, Clark DP, Chen CJ, Roninson IB, Gottesman MM, Pastan I. The human multidrug resistance (mdr1) gene. cDNA cloning and transcription initiation. *J Biol Chem* 1987;262:505-8.
4. Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992;258:1650-4.
5. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:15665-70.
6. Maliepaard M, van Gastelen MA, de Jong LA, Pluim D, van Waardenburg RC, Ruevekam-Helmers MC, et al. Overexpression of the BCRPP/MXR/ABCP gene in a topotecan-selected ovarian tumor cell line. *Cancer Res* 1999;59:4559-63.
7. Chevillard S, Pouillart P, Beldjord C, Asselain B, Beuzeboc

- P, Magdelenat H, et al. Sequential assessment of multidrug resistance phenotype and measurement of S-phase fraction as predictive markers of breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy. *Cancer* 1996;77:292-300.
8. Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, et al. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistance human cells. *Cell* 1986;47:381-9.
 9. 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.
 10. 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.
 11. Efferth T. The human ATP-binding cassette transporter genes: from the bench to the bedside. *Curr Mol Med* 2001;1:45-65.
 12. Litman T, Brangi M, Hudson E, Fetsch P, Abati A, Ross DD, et al. The multidrug-resistant phenotype associated with over-expression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J Cell Sci* 2000;113(Pt 11):2011-21.
 13. Avendano C, Menendez JC. Inhibitors of multidrug resistance to antitumor agents (MDR). *Curr Med Chem* 2002;9:159-93.
 14. Leith CP, Kopecky KJ, Chen IM, Eijdem L, Slovak ML, McConnell TS, et al. Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* 1999;94:1086-99.
 15. Han K, Kahng J, Kim M, Lim J, Kim Y, Cho B, et al. Expression of functional markers in acute nonlymphoblastic leukemia. *Acta Haematol* 2000;104:174-80.
 16. Borg AG, Burgess R, Green LM, Scheper RJ, Yin JA. Over-expression of lung-resistance protein and increased P-glycoprotein function in acute myeloid leukemia cells predict a poor response to chemotherapy and reduced patient survival. *Br J Haematol* 1998;103:1083-91.
 17. Kim HS, Min YD, Choi CH. Double-edged sword of chemosensitizer; increase of multidrug resistance protein (MRP) in leukemic cells by an MRP inhibitor probenecid. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;283:64-71.
 18. Rabindran SK, Ross DD, Doyle LA, Yang W, Greenberger LM. Fumitremorgin C reverse multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer Res* 2000;60:47-50.
 19. Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, et al. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 1994;77:491-502.
 20. Beck WT. Circumvention of multidrug resistance with anti-P-glycoprotein antibodies: clinical potential or experimental artifact? *J Natl Cancer Inst* 1995;87:73-5.
 21. Goldstein LJ, Galski H, Fojo A, Willingham M, Lai SL, Gazdar A, et al. Expression of a multidrug resistance gene in human cancer. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:116-24.
 22. Peters WH, Boon CE, Roelofs HM, Wobbes T, Nagengast FM, Kremers PG. Expression of drug-metabolizing enzymes and P-170 glycoprotein in colorectal carcinoma and normal mucosa. *Gastroenterology* 1992;103:448-55.
 23. Mizoguchi T, Yamada K, Furukawa T, Hidaka K, Hisatsuga T, Shimazu H, et al. Expression of the MDR1 gene in human gastric and colorectal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:1679-83.
 24. Fillpits M, Suchomel RW, Dekan G, Stiglbauer W, Haider K, Depisch D, et al. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 1997;75:208-12.
 25. Reymann A, Woermann C, Froschle G, Schneider C, Brasen JH, Lage H, et al. Sensitive assessment of cytotoxic drug resistance-mediating MDR1 and MRP in tumors of the gastrointestinal tract by RT-PCR. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1998;36:55-7.
 26. Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, et al. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res* 2001;61:3458-64.
 27. Brangi M, Litman T, Ciotti M, Nishiyama K, Kohlhagen G, Takimoto C, et al. Camptothecin resistance: role of the ATP-binding cassette (ABC), mitoxantrone-resistance half-transporter (MXR), and potential for glucuronidation in MXR-expressing cells. *Cancer Res* 1999;59:5938-46.