대한방사선종양학회지 2003;21(3):207 ~ 215

C3H/HeJ 마우스 간암에서 MEK 억제제에 의한 방사선 감수성 향상 효과

연세대학교 의과대학 방사선종양학교실, 두뇌한국21 의과학 사업단

김 성 희,성 진 실

목 적: Extracellular signal-regulated kinase (ERK)는 mitogen-activated protein kinase cascade의 일원으로 다양한 세포독성 자극에의해유도되는 apoptosis에 반대되는역할을 한다. 따라서 ERK의억제는항암제로서유용하게사용될 것으로 생각되어진다.

대상및방법: 마우스간암인 HCa-I는TCD50가 80 Gy 이상으로 강한방사선내성종양으로 알려져있으며, 방사선 민감성의 증진을 위해다양한항암제가실험되었으나 뚜렷한 효과를나타내지 못했다. 이 실험을 통해 *in vivo*, 특히 방사선 내성종양에서 ERK의 억제가 방사선에 의한 항암 작용을 증진시키는지 알아보고자 하였다. C3H/HeJ마우스에 종양의 크기가 7.5 ~ 8 mm가 되었을 때 PD98059 (0.16 μg/50 μl로 종양에 직접 주사)를 처리하였다.

결 과: 처리 1시간째에 p-ERK가 0.5배로 억제되었다. 종양 성장 지연 분석에서 증강 지수가 전 처리군과 후 처리군에서 각각 1.6과 1.87로 PD98059가 종양의 방사선 감수성을 증가시키는 것으로 관찰되었다. 25 Gy 방사선과 PD98059 복합처리 시 apoptosis가 크게 증가되었다. 각 실험군의 apoptosis 최대치는 방사선 조사군에서 1.4%, PD98059 처리군에서 0.9%, 복합처리군의 전 처리군과 후 처리군에서 각각 4.9%, 5.3%를 나타냈다. Apoptosis 조절 물질의 변화는, p53의 발현이 복합처리군에서 PD98059 전 처리군과후처리군모두에서 24시간까지 대조군에 비해 2.7배,3.2배의 높은발현수준을유지하여처리 1시간째부터 발현 증가를 하여 24시간까지 지속되는것이 관찰되었다. $p21^{WAF1/CIP1}$의 발현은 p53 발현 변화와 유사한 양상으로 특히 PD98059 후 처리군에서 방사선 조사군이나 PD98059 전처리군과비교하여높은발현수준을보였으며, 24시간까지 3.2배의높은발현수준을유지하는것으로 나타났다. Bcl-X_S는 25 Gy 방사선 조사군이나 PD98059 처리군에서는 뚜렷한변화를 보이지 않았으나복합 처리군 중 전 처리군에서 4시간 째 대조군에 비해 1.93배 증가를 보였으며, 후 처리군에서는 1시간후에 1.83배의 증가를 보였다. 모든 실험군에서 Bcl-2, Bcl-X_L, Bax는 뚜렷한 발현 변화를 보이지 않았다.

결 론: 방사선 내성 종양인 간암에 MEK 억제제를 방사선 조사와 복합 처리하여 방사선 감수성을 향상시켜 치료 효율의 상승을 유도 할 수 있을 것으로 생각된다.

핵심용어: PD98059, 전리 방사선, Apoptosis, 간암

서 론

전리 방사선은 많은 종류의 세포에서 다른 세포 자극 요인과 같이 apoptosis를 유도한다.[1] 종양 세포에 전리 방사선을 조사하면 수 시간 내에 apoptosis가 일어나게 된다.[2~4] 이러한 apoptosis의 활성화에 의해 세포의 제거가 이루어질 수 있으며, apoptosis 기작은 종양세포를 제거하는데 강력한 도구로 이용되어질 수 있다.[5]

전리 방사선은 핵 DNA 뿐만 아니라 여러 신호 전달 체계를 활성화하는 세포막에도 영향을 준다.[1] 전리 방사선은 death receptor에도 영향을 주어 종양 세포가 더 많은 apoptosis를 유도 할 수 있게 간접적으로도 작용한다. 최근 전리 방사선에 의해 유도되는 apoptosis에서 세포막이 중요한 target으로 인식되어지고 있다.[6] 전리 방사선은 epidermal growth factor receptor (EGFR), tumor necrosis factor receptor (TNFR)과 같은 cytokine receptors를 활성화시키며, 방사선에 의해 활성화된 EGFR은

이 논문은 2003년 3월 19일접수하여 2003년 8월 29일채택되었음.

책임저자: 성진실, 연세대학교 의과대학 방사선종양학교실
Tel: 02)361-7631, Fax: 02)312-9033
E-mail: jsseong@yumc.yonsei.ac.kr

mitogen-activated protein kinase (MAPK)와 stress-activated protein kinase (SAPK/JNK) 등의 신호 전달 체계를 개시, 증폭시켜 세포의 증식과 생존을 조절하게 된다.[7 ~ 12] 이러한 receptor와 관련 물질의 증가는 세포 보호 반응을 유발한다.[7] 또한 여러 연구에서 EGFR의 기능 상실이 종양세포의 방사선 감수성을 높인다는 것이 증명되었다.[13 ~ 16]

암 치료에 방사선 치료 효과는 종양의 방사선 민감성에 의해 결정된다. 따라서 방사선 감수성을 항진시키기 위한 연구들이 시행되어 왔다. 두경부암에서 항-EGFR 단일항체와 방사선 조사를 복합 치료하여 국소적 종양 치료 효율이 상승됨이 보고되었다.[17] 그러나 EGFR은 여러 신호 전달 체계의 상위에 위치하므로 EGFR의 억제는 정상 세포에서 많은 부작용을 초래하게 된다.[18] 따라서 좀 더 종양세포에 한정적으로 작용할 수 있는 target을 필요로 하며 신호 전달 체계에서 EGFR보다 하위의 물질을 조절하는 것이 한 방법이 될 수 있다.

세포가 전리 방사선에 노출되었을 때 EGFR을 통해서 MAPK 전달 체계가 활성화될 수 있다.[7,19] 이 MAPK family 중 가장 먼저 알려진 것은 extra-cellular signal-regulated protein kinase1 (ERK1)과 ERK2이다. ERK1/ERK2는 proto-oncogene인 *ras*의 하위 체계로써 인산화되어 활성화된다.[20] Ras는 Raf1을 활성화시키고 이것은 MEK1을 활성화시키며, 활성화된 MEK1은 ERK1과 ERK2를 인산화 시킨다.[21 ~ 24] 이러한 MAP kinase는 세포성장을 조절하는 전사 인자인 Elk-1 등 다양한 기질을 인산화시킨다.[25] MEK1의 기질로써는 ERK1과 ERK2 만이 알려져 있다.[26] 이러한 사실은 ERK1과 ERK2가 MAPK 전달체계에 중요한 역할을 한다는 것을 보여주며 ERK1/ERK2가 증식에 관여되는 질병에서 중요한 target으로 인식되어지고 있다. 전리 방사선에 의해 활성화된 MAPK 전달체계는 그 기작은 아직 정확히 알려 지지 않았으나 방사선 내성을 갖게 한다.[7,8,19]

전리 방사선이 bovine aortic endothelial 세포와 U937 human monoblastic leukemia 세포에서 SAPK/JNK 전달 체계에 의해 apoptosis를 유도한다고 보고되었다.[27] 이와 반대로 증식에 관여되는 전달 체계인 MEK1/ERK 전달체계는 anti- apoptosis에 역할을 하고 ERK와 JNK 전달체계 사이의 균형에 의해 세포가 생존하거나 apoptosis된다.[8,28,29]

지금까지의 연구결과 종양 세포에서 전리 방사선에 의한 ERK의 활성화는 방사선 내성 유발에 중요한 역할을 한다고 생각되어, ERK를 방사선 감수성 증진을 위한 target으로 하여, MEK 억제제를 이용한 방사선 감수성의 향상을 유도하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 마우스 동종암의 이식

실험 동물은 주령 8 ~ 10주되는 C3H/HeJ 웅성 마우스를 사용한다. 마우스는 SPF (specific pathogen free) 상태로 공급 및 사육하며 온도 22°C, 습도 55%가 일정하게 유지되는 사육환경에서 상자 당 5마리씩 사육하였다. 실험에 사용한 종양은 모두 C3H/HeJ 마우스 동종암으로서 HCa-I, Fsa-II, SCC-VII, MCa-K 및 OCa-I이다. 종양 세포들을마우스 대퇴부에 이식하여 종양을 성장시켰다. 종양 세포는 괴사가 없는 부분을 기계적으로 부수어 0.025% trypsin 처리한 후 체로 여과시키고 Sweeney 필터로 통과시켜, 단일 부유화된 종양세포만얻었다. 종양세포액을 4°C에서 1500 rpm으로 원심분리 시켜서 침전물만 얻어 이를 다시 재부유화시켰다. 재부유화 된 세포액 10㎕에 trypan blue 염색약 990㎕를 섞고 이중 10㎕만 취하여 100배 현미경 하에서 hemocytometer로 활성세포수만 계수하였다. 계수된 세포수를 기준으로 1×10^6개의세포를마우스대퇴부에주사하였다. 종양의 성장은 주 2 ~ 3회 caliper로 측정하여 관찰하며 평균직경 8 mm에 도달하였을 때 실험을 시작하였다.

2. 방사선 조사 및 MEK inhibitor 처리

방사선 조사는 치료용 선형가속기(Varian Co. Milpitas, CA)를 이용하여 종양을 심은 대퇴부만을 특수 제작된 고정대에 고정하여 25 Gy를 조사하였다. PD98059 (Calbiochem. San Diego. CA. USA)는 0.16㎍/50㎕의 농도로 투여하였다.[30] 종양 평균직경 7.5 ~ 8 mm 일 때 방사선 조사를 하거나 MEK 억제제인 PD98059를 종양에 직접 주사, 또는 두 가지를 복합 처리하였다. 방사선 조사와 PD98059 투여 후 일정한 시간간격으로 마우스를 경추 탈구사시킨 후 종양조직을 채취하였다.

3. 종양 성장 지연 분석

종양 성장 지연은 방사선 조사와 약물처리에 대한 종양 반응을 분석하는데 사용되었다. 종양이 평균직경 7.5 ~ 8 mm일 때 무작위로 실험군을 나누고, 방사선 조사나 약물처리 후 평균직경 13 mm가 될 때까지 2 ~ 3일 간격으로 caliper로 크기를 측정하였다. 종양 성장 지연은 방사선 조사나 약물처리 후 종양이 평균직경 12 mm까지 자라는데 걸리는 시간에서 대조군의 종양이 평균직경 12 mm까지

자라는데 걸리는 시간을 감한 절대성장지연(absolute growth delay: AGD)으로 나타내었다. 증강지수(enhancement factor; EF)는 표준성장지연(normalized tumor growth delay; NGD)을 절대성장지연으로 나눈 값이다. 표준성장지연은 방사선조사와 약물치료를복합처리한종양이평균직경 12 mm까지 자라는데 걸리는 시간에서 약물만을 처리한 종양이 평균직경 12 mm까지 자라는데 걸리는 시간을 감한 값이다. 종양 성장 지연은 각 실험군 당 8~10마리를 기준으로 산출하였다.

4.Apoptosis의 평가

채취한 조직의 일부를 고정액에 고정시켜서 파라핀에 포매하고 4μm 절편을 만들어 terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotinnickendlabeling(TUNEL)을 하였다. TUNEL은 Apop Tag *in situ* detection kit (Oncor, Gaithersburg, MD)를 이용하여 시행하였다.Apoptosis의 평가는 400배 광학현미경 하에서 시행하고 1000개의 세포핵 당 apoptosis를 계수 하였다.

5.Western blotting

채취한 조직의 일부를 western blotting을 이용하여 p-MAPK와 apoptosis와 관련된 유전물질의 발현을 분석하였다. 채취한 조직의 약 1mm^{3}을 잘게부수어인산완충액(pH 7.4)으로 3회 세척한 후 100mMHEPES,200mMNaCl, 20% glycerol, 2% NP40, 2 mM EDTA, 40 mM β-glyceraldehyde-phosphate, 2 mM sodium fluoride, 1 mM DTT, 1 mM sodium orthovanadate, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5μg/ml leupeptin, 2μg/ml apro-tinin 등을 포함한 냉각 완충액에서 1시간 처리하였다. 이를 4°C에서 20분간원심분리하여 단백질이 용해되어 있는 상층액을 얻었다. 얻은 단백질 용액은 polyacrylamide gel에서 전기 영동 시킨 후 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 이를 5% 탈지유와 0.1% Tween-20를포함하는 Tris-buffered saline (TBST)에 2시간 동안처리하고분석하고자하는각유전자에대한 1차항체로 2시간 처리하였다. 다시 TBST로 세척하고 horseradish peroxidase가 접합되어 있는 2차 항체로 1시간 처리한 후 ECL Western blotting detection system (Amersham, UK)을사용하여 luminescentimage analyzer (Fuji film, Japan)로 band의 농담을 조사하였다. 발현수준의 평가는 densitometry (Amersham)를 이용하여 분석하였다. 사용된 항체는 EGFR (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA.), p-ERK (CellSignaling Technology, Beverly, UK), p53 (Ab7, Oncogene Science, Manhassett, NY, USA), Bcl-$X_{L/S}$ (BD Biosciences, San Diego, CA, USA.), Bcl-2 (N-19, Santa Cruz Bio-technology), $p21^{WAF1/CIP1}$ (Santa Cruz Bio-technology), α- Tubulin (Oncogene Science) 등으로생산회사가추천하는농도를사용하였다.

6. Immunoprecipitation

인산화된 EGFR을관찰하기위하여위의방법으로얻은단백질 용액으로 immunoprecipitation을 시행하였다. 300μg의 단백질 용액을 5μg의 항 토끼 EGFR항체와 단백 G-Sepharose beads (Amersham)로 immunoprecipitation하였다. 침전물을냉각된 RIPA 완충액으로 2번, 인산완충액으로 1번 세척한 후 2×SDS (1×SDS=250 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 10% glycerol, 0.06% bromphenol blue, 2% β-mercaptoethanol) sample 완충액 30μl을 넣어 100°C에서 5분간끓였다. 얻은 단백질은 polyacrylamide gel에서 전기 영동시킨 후 항-phosphotyrosine 항체(PY20,SantaCruz Biotechnology)를 1차 항체로 사용하여 위의 방법으로 진행하였다.

결 과

1. 마우스 종양에서 p-ERK 발현

5종류의 마우스 종양에서 Western blotting을 이용하여 p-EGFR과 p-ERK의 단백질 발현 수준을 조사하였다. 종양의 방사선 민감성은 TCD50로 나타낼 수 있는데 TCD50에 의하면 HCa-I, FSa-II, SCC-VII는방사선내성종양으로 MCa-K, OCa-I는 방사선민감성종양으로 분류된다(Table 1).[31]

종양의 종류에 따라 EGFR과 p-ERK의 발현 수준에 차이를 보였다. EGFR의 발현 수준은 방사선 내성 종양인 HCa-I, FSa-II, SCC-VII에서 방사선민감성종양인 MCa-K, OCa-I 보다 2~2.5배 높게 발현되었다. p-EGFR는 HCa-I에서가장높게발현되었으며, MCa-K, OCa-I, FSa-II, SCC-VII 순으로 발현이 점차 감소함이 관찰되었다. p-ERK의 발현 수준은 p-EGFR 의 발현 수준과비슷한양상을보였다(Fig. 1).

2. PD98059에 의한 ERK의 억제

마우스종양인 HCa-I에서 PD98059 처리 후 ERK 활성 억제를 조사하기 위하여 MEK 활성의 산물인 인산화된 ERK에

Table 1. TCD50 (50% tumor cure dose) in mouse tumors[31]

	HCa-I	FSa-II	SCC-VII	MCa-K	OCa-I
TCD50 (Gy)	≥80	74.8	? 80	42.9	52.6

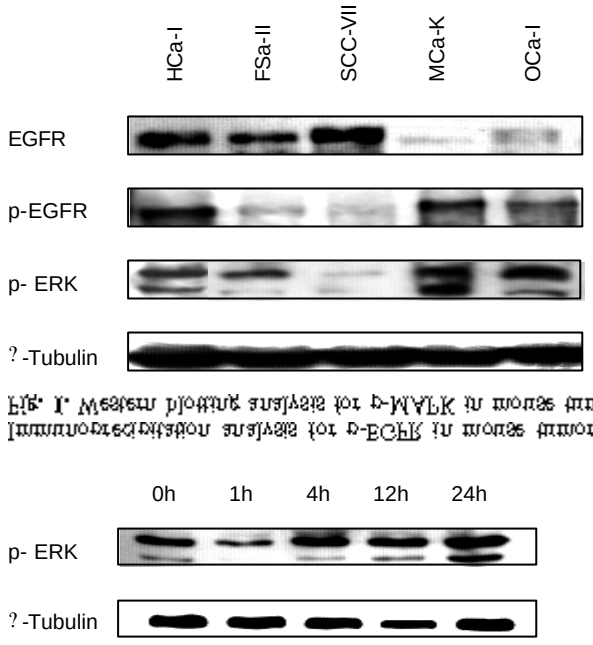

Fig. 1. Western blot analysis for p-EGFR in murine tumors. Immunoprecipitation analysis for p-MAPK in murine tumors.

Fig. 2. Western blotting analysisfor p-MAPK inhepatocarcinoma, HCa-I. PD98059 were administeredintratumorallyasasingledose at a constant volume of 0.16㎍/50㎕.

특이적으로 반응하는 항체를이용하여 관찰하였다. *in vivo* 에서 MAP kinase 활성의변화를 관찰하기 위해서 PD98059를 개체 당 0.16㎍/50㎕로 종양에 직접 주사하여 일정시간 간격으로 종양을 채취하여 Western blotting으로 인산화된 ERK의 수준을 분석하였다. PD98059 처리 1시간 째에 p-MAPK 발현 수준이 대조군에 비하여 0.5배 줄어든 것이 관찰되었다(Fig. 2).

3. PD98059에 의한 방사선 감수성 증가

MAPK 신호전달 체계가 *in vivo* 마우스 종양의 방사선 감수성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 마우스 간암 종양인 HCa-I를 이식하여 종양성장 지연을 관찰하였다. 대조군, 방사선 조사군, PD98059 투여군, 방사선 조사 15분 전 PD 98059 투여군, 방사선 조사 1시간 후 PD98059 투여군의 실험군으로 나누어 종양성장을 측정하였다. PD98059는 약물처리 단독으로는 절대성장지연이 0.7일로 뚜렷한 종양성장 지연이 나타나지 않았다. 그러나 PD98059와 방사선 조사를 복합 처리한 결과 PD98059를 15분 전 처리군에서 7.5 mm에서 12 mm가 되는 시간이 13.26일, 1시간 후 처리군에서 14.41일로 각각의 표준성장 지연이 7.03일, 8.18일로 두 실험군 모두에서 종양성장 지연을 보였다. 약물과

Table2.Antitumorefficacyofradiation,PD98059,oracombinationand PD98059inmurinehepatocarcinoma,HCa-I

Treatment	Time (days) to grow from 7.5 to 12 mm	Absolute growth delay	Normalized growth delay	Enhancement factor
Control	5.52±0.25			
RT	9.9±0.55	4.38		
PD98059	6.23±0.34	0.71		
PD-RT*	13.26±0.62	7.74	7.03	1.6
RT-PD†	14.41±0.67	8.89	8.18	1.87

Radiation dose was a single 25 Gy exposure. PD98059 were administered intratumorally as a single dose at a constant volume of 0.16㎍/50㎕. PD98059 wereadministered 15minprior(*) to or 1h after (†)radiation. The absolutegrowthdelay(AGD)was defined as the time in days for the tumors to reach 12mm in treated mice minusthemeantimetoreach12mmintheuntreated control gorup.Thenormalizedgrowthdelay(NGD)wasdefinedas the time in days for tumors to reach 12mm in mice treated by thecombinationtreatmentminusthetimeindaystoreach12mm in mice treated bydrugonly.The enhancement factor (EF) was calculated by dividing the NGD by the AGD.

방사선 조사를 복합 처리한 실험군에서 약물에 의한 방사선 감수성 향상은 증강지수로 정의되어질 수 있는데, PD98059를 방사선 조사 15분 전과 방사선 조사 1시간 후에 처리한 실험군에서 증강지수가 각각 1.6과 1.87으로 나타났다(Table 2, Fig. 3).

4. 방사선 조사와 PD98059 복합 처리시 apoptosis 유도 증가

전리 방사선에 의한 종양 반응은 종양세포의 apoptosis 유도 향상을 포함하여 여러 가지 기작에 의해서 결정되어진다. 방사선 감수성의 증가는 apoptosis 유도증가에 의하여 이루어질 수 있으므로 PD98059와 방사선 조사 복합 처리시 apoptosis의 변화를 관찰하였다.

HCa-I는 방사선에 의한 apoptosis 유도 수준에 내성을 나타내어, 25 Gy 방사선 조사 시 최고치는 4시간 째 1.4%였고 PD98059 단독 투여 시에는 24시간 째 0.9%의 최대치를 보였다. 그러나 복합 처리군에서는 PD98059 전 처리군에서 4시간 째 4.9%의 최대치를 보였으며, 후 처리군에서 12시간 째에 apoptosis 유도 수준이 5.3%의 최대치를 보였다. 방사선 조사나 PD98059 단독 처리시 보다방사선조사와 PD98059 복합 처리시 apoptosis 유도증가 양상이 관찰되었다(Fig. 4).

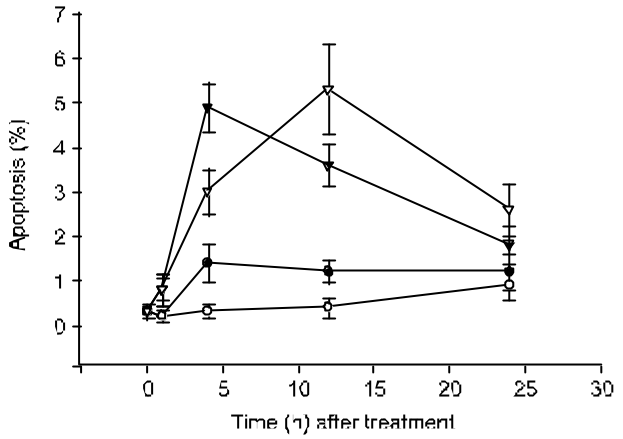

Fig. 3. Growth delay murine hepatocarcinoma, HCa-I. PD98059 were administered intratumorally as a single dose at a constant volume of 0.16 μg/50 μl. Growth delay analysis for (?) control, (?) 25 Gy single dose of radiation, (?) PD980590.16 μg/50μl, and the combination of PD98059 and radiation, where PD98059 was given (?) 15 min before radiation or (?) 24h after radiation. Vertical bars are standard errors of mean.

Fig. 4. Induction of apoptosis by (?) PD980590.16 μg/50 μl, (?) 25 Gy single dose of radiation and the combination of PD98059 and radiation, where PD98059 was given (?) 15min before radiation or (?) 24h after radiation. Treatment was given when the tumors reached 8mm in diameter. Vertical bars are standard errors of mean.

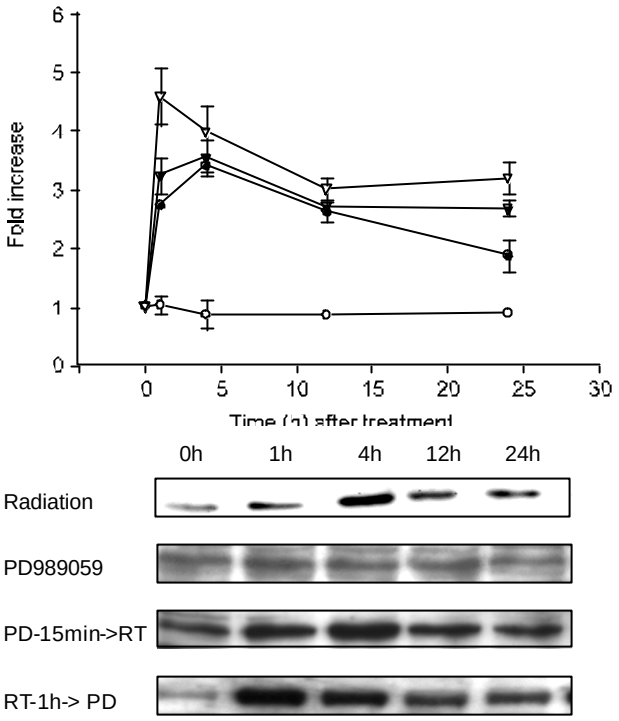

Fig. 5. Western blotting analysis for p53. Densitometric analyses are plotted for (?) radiation, (?) PD98059 treatment, PD98059 was given (?) 15 min before radiation or (?) 24h after radiation. Vertical bars are standard errors of mean.

5. 방사선 조사, PD98059 투여 및 복합 처리시 apoptosis 조절 인자의 변화

방사선 조사와 PD98059 복합 처리가 apoptosis 조절 인자에 미치는 영향을 알아보기 위하여 방사선 조사군, PD98059 처리군, 복합 처리군에서 p53, $p21^{WAF1/CIP1}$ 및 Bcl-2 family (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-X_S, Bax)의 발현을 분석하였다. 방사선 조사와 PD98059 복합처리군의 시간 간격은 방사선 조사 15분전 PD98059 투여군, 방사선 조사 1시간 후 PD98059 투여군으로 나누어서 일정한 시간 간격으로 종양 조직을 채취하여 Western blotting으로 관찰하였다.

25 Gy 방사선 조사 후 p53의 발현은 1시간째부터 증가하기 시작하여 24시간부터 정상 수준으로 회복하기 시작하였다. PD989059 처리군에서 p53은 뚜렷한 발현 변화가 보이지 않았다. 그러나 복합 처리군에서 PD98059 전 처리군과 후 처리군 모두에서 24시간까지 대조군에 비해 2.7배, 3.2배의 높은 발현 수준을 유지하였다. p53의 발현이 처리 1시간째부터 발현 증가를 하여 24시간까지 지속되는 것이 관찰되었다(Fig. 5).

$p21^{WAF1/CIP1}$의 발현은 p53 발현변화와 유사한 양상으로 특히 PD98059 후 처리군에서 방사선 조사군이나 PD98059 전 처리군과 비교하여 높은 발현수준을 보였으며 24시간까지 3.2배의 높은 발현 수준을 유지하는 것으로 나타났다(Fig. 6).

Bcl-X_S는 25 Gy 방사선 조사나 PD98059 단독 처리 군에서는 뚜렷한 변화를 보이지 않았으나 복합 처리 군에서는 전 처리군에서 4시간째 대조군에 비해 1.93배 증가를 보였으며 후 처리군에서는 1시간 후에 1.83배의 증가를 보였다 (Fig. 7).

모든 실험군에서 Bcl-2, Bcl-X_L, Bax는 뚜렷한 발현 변화를 보이지 않았다.

고안 및 결론

종양 치료에서 방사선과 항암 약물의 복합 치료는 두 치료법간의 상승작용을 이용하여 종양 반응을 향상시키기 위해 시행된다.[32] 현재 간암의 치료에서 사용되고 있는 약물들로서는 5-fluorouracil (5-FU), adriamycin, cisplatin 등이 가장 보편적이며, 약물 단독의 임상적 효과는 기대에

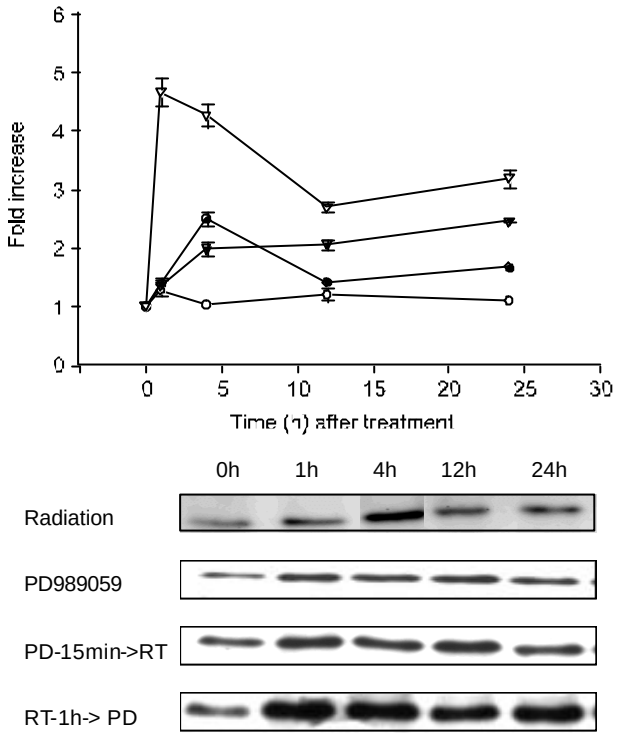

Fig. 6. Western blotting analysis for $p21^{WAF1/CIP1}$. Densitometric analyses are plotted for (?) radiation, (?) PD98059 treatment, PD98059wasgiven(?) 15 minbeforeradiationor(?)24hafter radiation. Vertical bars are standard errors of mean.

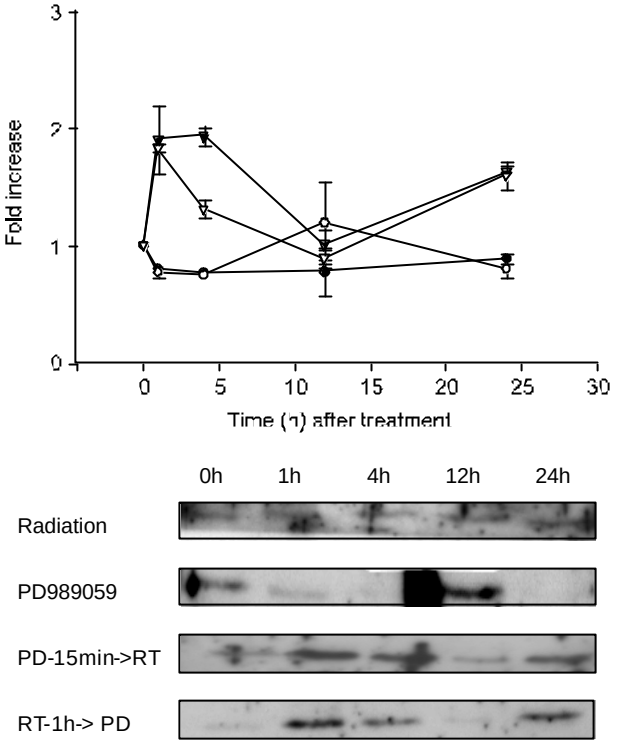

Fig. 7. Western blotting analysis forBcl-X_S. Densitometric analyses are plotted for (?) radiation, (?)PD98059 treatment, PD98059 was given (?) 15 minbeforeradiationor(?) 24hafterradiation. Vertical bars are standard errors of mean.

못 미치고 있다.[33] 효과적인 종양 반응을 유도하기 위해서 방사선 치료와 함께 처리함으로써 유용하게 사용될 수 있는 약물을 찾는 연구가 필요로 되어지고 있다.

PD98059[2-(2'-amino-3'-methoxyphenyl)-oxanaphthalen-4- one]는 MEK-1를 선택적으로 억제하여 MAPK의 인산화와 활성화를 억제한다.[33] MEK 억제제를 이용한 종양성장 지연 실험으로 human squamous cell carcinoma cell에서 PD98059를 통한 침윤억제와, PD184352를 사용한 colon 26 carcinoma의 종양 성장 지연에 관한 보고가 있다.[35,36]

국내 호발암인 간암은 그간 방사선 치료의 역할이 그리 부각되지 못하였으나, 최근 방사선 치료가 활발히 적용되기 시작하면서 방사선의 항암 효과를 항진시키기 위한 일련의 노력들이 진행되어 오고 있다.[37 ~ 39] 본 연구에 사용된 마우스 간암인 HCa-I는 인체 간암과 유사한 몇 가지 특성을 가지고 있다. 방사선 감수성이 낮고, 전이가 잘 되며, 종양의 악성도가 높다는 점이다.[31,40] 이 종양은 50% 종양 완치선량(TCD50)이 80 Gy 이상이며 방사선에 의한 apoptosis의 유도수준이 낮은 방사선 내성 종양으로 알려져 있다.[31,40] 또한 방사선 조사와 5-FU, adriamycin, cisplatin 등의 항암제 복합 처리 시에도 뚜렷한 종양 반응 향상이 나타나지 않았다.[37]

HCa-I에 MEK 억제제인 PD98059를 사용하여 방사선 감수성을 실험한 결과, PD98059가 HCa-I의 방사선 감수성을 효과적으로 증가시킴을 보여 주었다. 방사선 조사나 PD98059 단독 처리만으로는 뚜렷한 종양억제를 보이지 않았으나 복합 처리 시 증강지수(EF)가 전 처리군에서 1.6, 후 처리군에서 1.87로서 방사선 조사와 PD98059간의 상호작용이 종양억제에 유효한 역할을 한다는 가능성이 제시되었다. 이는 지금까지의 연구에서 사용된 MEK 억제제의 용량보다 낮은 농도의 PD98059를 사용하여 얻은 결과로서 소량의 PD98059를 이용하여 방사선 민감성을 높일 수 있음을 확인할 수 있었다.[12]

방사선 감수성의 증가는 apoptosis 유도증가에 의하여 이루어질 수 있으므로 PD98059와 방사선 조사 복합처리에 의한 apoptosis의 변화를 관찰하였다. TUNEL을 통한

apoptosis 계수 결과, 방사선 조사와 PD98059 복합 처리 시 apoptosis 유도 증가를 보였다. 25 Gy 방사선 조사시 최고치는 4시간 후 1.4%였고 PD98059 단독 투여 시 24시간 후 0.9%의 최대치를 보였다. 그러나 복합 처리 시 PD98059 전 처리군에서 4시간 후 4.9%의 최대치를 보였으며, 후 처리군에서 12시간 후 apoptosis 유도 수준이 5.3%의 최대치를 보여 복합 처리군에서는 apoptosis가 현저히 증가됨이 관찰되었다. 이러한 결과는 PD98059가 apoptosis를 통해 방사선 감수성 향상을 유도함을 암시한다. 이는 *in vitro*에서 PD98059에 의한 MEK의 억제가 방사선에 의해 유도되는 apoptosis를 증가시킨다는 일련의 결과들과 일치한다.[41,42]

조절 물질의 발현 변화는 방사선 조사와 PD98059 복합 처리시 p53, $p21^{WAF1/CIP1}$, Bcl-X_S에서 뚜렷한 변화가 관찰되었다. p53은 방사선 단독 조사군에서 1시간째부터 증가하여 24시간째부터 회복되기 시작한 반면 복합 처리군에서는 PD98059 전 처리군과 후 처리군 모두에서 24시간까지 대조군에 비해 2.7배, 3.2배의 높은 발현 수준을 유지하였다. $p21^{WAF1/CIP1}$의 발현은 p53 발현 변화와 유사한 양상으로 특히 PD98059 후 처리군에서 방사선 조사군이나 PD98059 전 처리군과 비교하여 높은 발현수준을 보였으며, 24시간까지 3.2배의 높은 발현 수준을 유지하는 것으로 나타났다. Bcl-X_S는 25 Gy 방사선 조사나 PD98059 단독 처리 군에서는 뚜렷한 변화를 보이지 않았으나 복합 처리군에서는 전 처리군에서 4시간 후 대조군에 비해 1.93배 증가를 보였으며 후 처리군에서는 1시간 후에 1.83배의 증가를 보였다. 이는 p53, $p21^{WAF1/CIP1}$, Bcl-X_S이 PD98059에 의한 종양 성장 지연에 주요한 작용을 한다는 것을 암시한다.

향후 임상적 응용 가능성을 타진하기 위하여 이 약물 치료의 독성 연구가 더 진행되어야 한다. 임상에서 간암의 방사선 치료는 위 및 소장처럼 방사선 허용선량이 낮은 주변 조직의 합병증을 동반하게 되므로, 정상 조직에서 방사선 치료와 약물 복합의 효과가 어떠한 지가 임상 적용 전에 먼저 연구되어야 한다. 또한 임상에서는 방사선 치료시 분할 조사를 이용하는데 분할조사시 MEK 억제제와 분할 조사간의 상호작용이 단일 조사시와는 다른 생물학적 현상이 나타날 것이므로 이에 대한 연구가 더 요구되어진다.

결 론

PD98059는 방사선에 의한 종양억제 효과를 향상시키며 이러한 증강효과에 p53, $p21^{WAF1/CIP1}$, Bcl-X_S이 주요한 역할을 한다고 나타났다. 방사선 내성 종양인 간암에 MEK 억제제를 방사선 조사와 복합처리 하므로 방사선 감수성을 향상시켜 치료 효율의 상승을 유도할 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. VerheijM,RuiterGA,ZerpSF,etal. TheroleoftheSAPK/JNK signalling pathway in radiation-induced apoptosis. Radiother Oncol 1998;47:225-232
2. Dewey WC, Ling CC, Meyn RE. Radiation-induced apoptosis: relevance to radiotherapy. Int J Radiat Biol 1995;33: 781-796
3. Yanafihara K, Nii M, Numoto M, et al. Radiation-induced apoptotic cell deathinhumangastricepithelialtumorcells: correlation between mitotic death and apoptosis. Int J Radiat Biol 1995;67:677-685
4. OlivePL,BanathJP,DurandRE. Developmentofapoptosis and polyploidy in human lymphoblast cells as a function of position in the cell cycleatthetimeofirradiation.Radiat Res 1996;146:595-602
5. ZhivotovskyB,JosepB,OrreniusS. Tumorradiosensitivityand apoptosis. Exp Cell Res 1999;248:10-17
6. Santana P, Pena LA, Haimovitz-Friedman A, et al. Acid sphinogomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defectiveinradiation-inducedapoptosis.Cell1996;86: 189-199
7. Schmidt-UllrichR,MikkelsenR,DentP,etal. Radiation induced porliferation of human A431 squamouscarcinomacells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation. Oncogene 1997;15:1191-1197
8. CarterS,AuerKL,ReardonDB,etal. Inhibition ofthe mitogen activated portein (MAP) kinase cascade potentiates cell killing by low dose ionizing radiation in A431 human squamous carcinoma cells. Oncogene 1998;16:2787-2796
9. Balaban N, Moni J, Shannon M, et al. The effect of ionizing radiation on signal transduction: Antibodies to EGF receptor sensitize A431 cells to radiation. Biochem Biophys Acta 19996;1314:147-156
10. Xia Z, DickensM,RaingeaudJ,etal. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. Science 1995;270:1326-1331
11. Rosette C, Karin M. Ultraviolet light and osmotic stress. Activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors.Science1996;274:1194-1197
12. PapM,CooperGM. Role of glycogensysthase kinase-3 inthe phosphatidyl inositol3-kinase/Akt cellsurvival pathway. J Biol Chem 1998;273:19929-19932
13. Contessa JN, Reardon DB, Todd D, et al. The inducible expression of dominant-negative epidermalgrowthfactor receptor-CD533 results in radiosensitization of human

mammary carcinomacells.ClinCancerRes1999;5:405-411
14. BaselgaJ,NortonL,AlbanellJ,etal. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/ neu overexpressing human breast cancer xenografts. Cancer Res 1998;58:2825-2831
15. Huang SM, Bock JM, Harari PM. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis,andradiosensitivityin squamous cell carcinomas of the head and neck. Cancer Res 1999;59:1935-1940
16. Dent P, Jarvis WD, BirrerMJ,etal. The roles of signaling by the p42/p44 mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway; a potential route to radio- and chemo-sensitization of tumor cells resulting in the induction of apoptosis and loss of clonogenicity. Leukemia 1998;12:1843-1850
17. Ezekiel MP, Robert F, Meredith RF, et al. Phase I study of anti-EGFR antibody C225 in combinationwith irradiaiton in patients with advansedsquamouscellcarcinomaofthe head and neck(SCCHN). ProcAmAssocClinOncol1998; 17:3952
18. Busam KJ, Capodieci P, MotzerR,etal. Cutaneousside- effects in cancer patients treated with the antiepidermal growth factor receptor antibody C225. Br J Dermatol 2001; 144:1169-1176
19. Kavanagh BD,DentP,Schmidt-UllrichR,etal. Ca2+ dependent stimulation of mitogen activated protein kinase activity in A431 cells by low dose ionizing radiation. Radiat Res 1998;149:579-587
20.WarnePH,VicianaPR,DownwardJ. Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 *in vitro*. Nature 1993;364:352-355
21. DentP. Activationofmitogen-activatedprotein kinasekinase by v-Raf in NIH 3T3cells and in vitro. Science 1992;257: 1404-1407
22. Crews CM,Alessandrini A, EriksonRL. The primary structureof MEK,a protein kinase thatphosphorylates theERKgene product. Science 1992;258:478-480
23. Her JH. Dual phosphorylation and autophosphorylation in mitogen-activated protein (MAP) kinase activation. Biochem J 1993;296:25-31
24. Anderson NG, Maller JL, Tonks NK, et al. Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. Nature 1990;343: 651-653
25. Marais R, Wynne J, Treisman R. The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. Cell 1993;73:381-393
26. Seger R. Purification and characterization of mitogen-activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells. J Biol Chem 1992;267:14373- 14381
27. Verheij M, Bose R, Lin XH, et al. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-inducedapoptosis. Nature 1996;380:75-79.
28. CanmanCE,KastanMB. Signal transduction. Three paths to stress. Nature 1996;384: 213-214
29. Cosulich S, Clarke P. Apoptosis: Does stress kill? Curr Biol 1996;6:1586-1588
30. Sgambato V, Pages C, Rogard M, et al. Extracellular signal-regulated kinase(ERK)controlsimmediateearly gene induction on corticostriatal stimulation. J Neuroscience 1998;18: 8814-8825
31. Milas L, Wike J, Hunter NR, et al. Macrophage content of murine sarcomas and carcinomas: Association with tumor growth parameters and tumorradiocurability. Cancer Res 1987;47:1069-1075
32.SteelGG. Combinationof radiotherapyandchemotherapy.In: Steel GG, ed. Basic Radiation Biology. London: Edward Arnold Publishers, 1993;151-62
33. Venook AP. Treatment of hepatocellular carcinoma: Too many options? J Clin Oncol 1994;12:1323-1334
34. Dudley DT, Pang L, Decker SJ, etal. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. Proc Natl Acad Sci U S A 1995;92:7686-7689
35. Simon C, HicksMJ,Nemechek AJ, etal. PD 098059,aninhibitor of ERK1 activation attenuates the in vivo invasiveness of head and neck squamous cell carcinoma. Br J Cancer 1999;80:1412-1419
36. Sebolt-LeopoldJS, DudleyDT,Herrera R, et al. Blockadeofthe MAP kinase pathwaysuppressesgrowthofcolontumors *in vivo*. Nat Med 1999;5:810-816
37. Seong J, Kim SH, Suh CO. Enhancement of tumor radioresponse by combined chemotherapy in murine hepatocarcinoma.J GastroenterolHepatol2001;16:883-889
38. Park HC, Seong J, HanKH,etal. Dose response relationship in local radiotherapy for hepatocellular carcinoma. J Korean Soc Ther Radiol Oncol 2001;19:118-126
39. Seong J, Keum KC, Han KH, et al. Combined transcatheter arterial chemoembolization and local radiotherapy for unresectablehepatocellularcarcinoma.J Korean Soc Ther Radiol Oncol 1998;16:159-165
40. Seong J, Hunter N, Milas L. Induction of apoptosis and expression of apoptosisrelatedgene products in response to radiation in murine tumors. J Korean Soc Ther Radiol Oncol 1997;15:187-195
41. Vrana JA,Grant S, Dent P. Inhibition of the MAPK pathway abrogates BCL2-mediated survival of leukemia cells after exposure to low-dose ionizing radiation. Radiat Res 1999;151:559-569
42. Cartee L, Vrana JA,WangZ,etal. Inhibition of the mitogen activated protein kinase pathway potentiates radiation-induced cell killing via cell cycle arrest attheG2/M transition and independentlyofincreasedsignalingbythe JNK/c-Jun pathway. Int J Oncol 2000;16:413-422

Abstract

Enhancement of Tumor Response by MEK Inhibitor in Murine HCa-I Tumors

Sung Hee Kim, M.S. and Jinsil Seong, M.D.

Department of Radiation Oncology, Yonsei University Medical College, Brain Korea 21 Project for Medical Science, Yonsei University Medical College, Seoul, Korea

Purpose: Extracellular signal-regulated kinase (ERK), which is part of the mitogen-activated protin kinase cascade, opposes initiation of the apoptotic cell death which is programmed by diverse cytotoxic stimuli. In this regard, the inhibition of ERK may be useful in improving the therapeutic efficacy of established anticancer agents.

Materials and Methods: Murine hepatocarcinoma, HCa-I is known to be highly radioresistant with a TCD50 (radiation dose yield in 50% cure) of more than 80 Gy. Various anticancer drugs have been found to enhance the radioresponse ofthis particular tumor butnonewere successful.Theobjective of this study was to explore whether the selective inhibition ofMEK could potentiate the antitumor efficacy ofradiation in vivo, particularly in the case of radioresistant tumor.C3H/HeJ mice bearing 7.5~8 mm HCa-I, were treated with PD98059 (intratumoral injection of 0.16㎍ in 50㎕).

Results: Downregulation ofERK by PD98059 was most prominent1hafterthetreatment.In the tumor growth delay assay, the drug was found to increase the effect of the tumor radioresponse with an enhancement factor (EF) of 1.6 and 1.87. Combined treatment of 25 Gy radiation with PD98059 significantly increased radiation induced apoptosis. The peak apoptotic index (number ofapoptotic nucleiin 1000 nucleiX100) was 1.2% in the case of radiation treatment alone, 0.9% in the case of drug treatment alone and 4.9%, 5.3% in the combination treatment group. An analysis of apoptosis regulating molecules with Western blotting showed upregulation of$p53, p21^{WAF1/CIP1}$ and Bcl-X_S in thecombination treatmentgroup as compared to their levels in either the radiation alone or drug alone treatment groups. The level of other molecules such as Bcl-X_L, Bax and Bcl-2 were changed to a lesser extent.

Conclusion: The selective inhibition ofMEK in combination with radiation therapymayhavepotentialbenefit in cancer treatment.

Key Words: PD98059, Ionizing radiation, Apoptosis, Hepatocarcinoma