

시스플라틴과 염소이온통로저해제가 K562세포와 K562/ADM세포의 생존에 미치는 영향

리철준, 박성희

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《정보기술, 나노기술, 생물공학은 현시대 과학기술발전의 핵심기초기술입니다.》

(《김정일선집》 증보판 제22권 20~21페이지)

1968년에 처음으로 흰생쥐백혈구세포에서 다약제내성(Multidrug resistance: MDR)현상이 알려졌다.[4] 시스플라틴(DDP)은 림상에서 비교적 넓은 항암폭을 가지는 제일 중요한 항암제 중의 하나[1]로 되고있으나 종양세포에서 시스플라틴에 대한 내성이 나타나는것으로 하여 그 치료효과가 낮아지고있다.[2]

또한 염소이온통로(Cl chloride channel: CIC)는 세포증식, 아포토시스에서도 중요한 작용을 한다는것이 밝혀졌으며 이에 따라 염소이온통로저해제 NPPB(5-nitro-2-phenylpropylamino benzoic acid)를 비롯한 여러가지 저해제들이 알려졌다.[7]

현재 종양세포에서 시스플라틴을 비롯한 항암제에 대한 내성이 많이 나타나므로 종양 치료에서 장벽으로 되는 항암제내성에 대한 분자적물림새를 밝히기 위한 연구가 많이 진행되고있다.[3, 5]

우리는 종양치료에서 문제로 되고있는 항암약물내성에 대한 기초연구로서 여러가지 약물들을 사람백혈병세포그룹 K562세포와 K562/ADM(Adriamycin)세포[6]에 처리하고 생존률 측정과 다약제내성(MDR)에 관여하는 다약제내성유전자 *mdr1*, 다약제내성관련유전자 *mpr1* (multidrug resistance-associated protein 1)의 전사수준을 분석하고 그것에 대하여 논의하였다.

재료와 방법

재료로는 사람백혈병세포그룹 K562세포와 K562/ADM세포를 리용하였다.

세포배양에는 IMDM배지(《Thermo》)와 소태아혈청(《Gibco》)을, 세포생존률검사에는 MTT(《Sigma》), DMSO(《Sigma》)를 리용하였다.

약물로는 시스플라틴(《KABI》)과 NPPB(《KLAB》)를 리용하였다.

실험방법 세포그룹은 10% 소태아혈청을 함유한 IMDM배지에서 37°C, 5% CO₂세포배양 장치(《SANYO》)에서 배양하고 계대하였다. MTT법으로 약물의 농도에 따르는 세포성장억제률을 검사하였다.[7] 다음의 공식으로 세포성장억제률(%), 세포생존률(%)을 평가하였다.

$$\text{세포성장억제률} = \frac{\text{OD}_{\text{대조}} - \text{OD}_{\text{처리}}}{\text{OD}_{\text{대조}}} \cdot 100$$

$$\text{세포생존률} = \frac{\text{OD}_{\text{처리}}}{\text{OD}_{\text{대조}}} \cdot 100$$

총RNA분리와 RT-PCR는 선행방법[6]에 기초하여 진행하였다.

결과 및 논의

1) 시스플라틴(DDP)이 K562세포와 K562/ADM세포의 증식에 미치는 영향

각이한 용량의 시스플라틴은 K562세포와 K562/ADM세포의 증식에 영향을 미치며 시스플라틴을 $10\mu\text{g/mL}$ 로 처리할 때 증식억제률은 K562세포에서 35%, K562/ADM세포에서 21%였다. 시스플라틴을 $40\mu\text{g/mL}$ 로 처리할 때에는 K562세포에 대한 증식억제률이 83%, K562/ADM에 대한 증식억제률은 69%에 달한다.(표 1, 그림 1)

표 1. K562세포와 K562/ADM세포에서 시스플라틴의 증식억제률

DDP의 농도 $/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	증식억제률/%	
	K562	K562/ADM
0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
2.5	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.02
5.0	$0.21 \pm 0.05^*$	0.13 ± 0.04
10.0	$0.35 \pm 0.02^{**}$	$0.21 \pm 0.05^*$
20.0	$0.68 \pm 0.01^{**}$	$0.42 \pm 0.01^{**}$
40.0	$0.83 \pm 0.01^{**}$	$0.69 \pm 0.01^{**}$

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

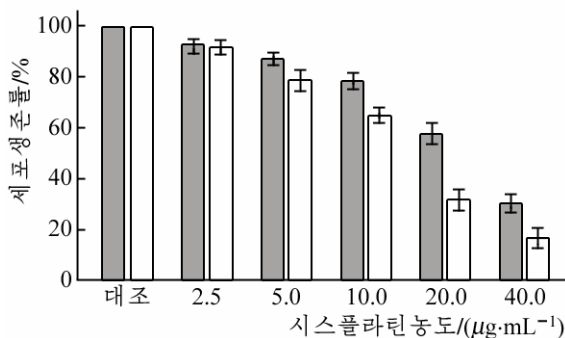


그림 1. DDP가 K562세포(■)와 K562/ADM 세포(□)의 생존률에 미치는 영향

2) NPPB가 K562세포와 K562/ADM세포의 증식에 미치는 영향

NPPB(5-nitro-2-phenylpropylamino benzoic acid)를 $50\mu\text{mol/mL}$ 의 농도로 처리할 때 K562세포와 K562/ADM세포의 증식에 대한 억제작용이 약하게 나타났다. 그러나 NPPB의 양이 $100\mu\text{mol/mL}$ 까지 증가할 때 K562세포와 K562/ADM세포의 증식에 대하여 비교적 명백한 억제작용을 나타낸다.(표 2, 그림 2)

표 2. K562세포와 K562/ADM세포에 대한 NPPB의 증식억제률

NPPB의 농도 $/(\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1})$	증식억제률/%	
	K562	K562/ADM
0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
25	0.06 ± 0.02	0.05 ± 0.02
50	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.03
100	$0.37 \pm 0.05^*$	$0.33 \pm 0.03^*$

* $p < 0.05$

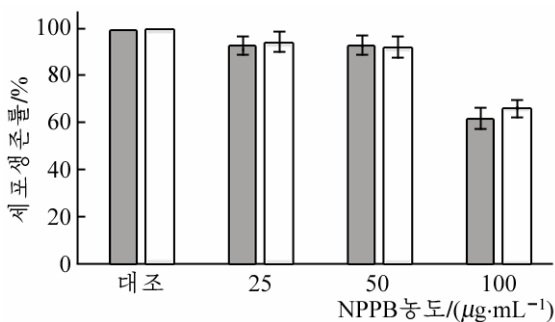


그림 2. NPPB가 K562세포(■)와 K562/ADM 세포(□)의 생존률에 미치는 영향

3) NPPB와 DDP가 K562세포와 K562/ADM세포의 증식에 미치는 영향

MTT비색법으로 측정한데 의하면 대조에 비하여 $50\mu\text{mol/mL}$ NPPB시험구에서는 K562세포와 K562/ADM세포의 생존률이 변화되지 않았으나 $10\mu\text{g/mL}$ DDP시험구에서는 K562세포와 K562/ADM세포의 생존률이 낮아지는 즉 억제작용이 나타났다. 그리고 $10\mu\text{g/mL}$ DDP

+50 μ mol/mL NPPB를 함께 처리한 시험구에서의 세포생존률은 DDP시험구에 비하여 명백하게 높았다.(그림 3)

4) K562세포와 K562/ADM세포에서 *mdr1*, *mrp1*의 전사수준

RT-PCR결과에 의하면 다약제내성유전자 *mdr1*과 다약제내성관련유전자 *mrp1*이 K562세포에서 전사되지 않으며 다약제내성인 K562/ADM세포에서는 *mdr1*과 *mrp1*이 전사된다는것이 밝혀졌다.

또한 K562/ADM세포에서는 NPPB와 DDP를 함께 리용한 실험구에서 DDP를 리용한 시험구에서보다 *mdr1*과 *mrp1*의 전사수준이 높아졌다.(그림 4)

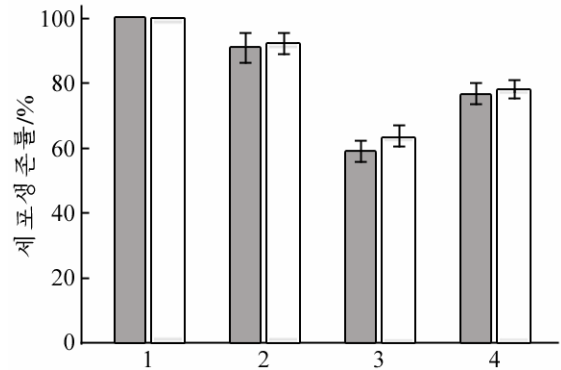


그림 3. NPPB와 DDP가 K562세포(□)와 K562/ADM세포(■)의 생존률에 미치는 영향

1-대조, 2-NPPB, 3-DDP, 4-DDP+NPPB

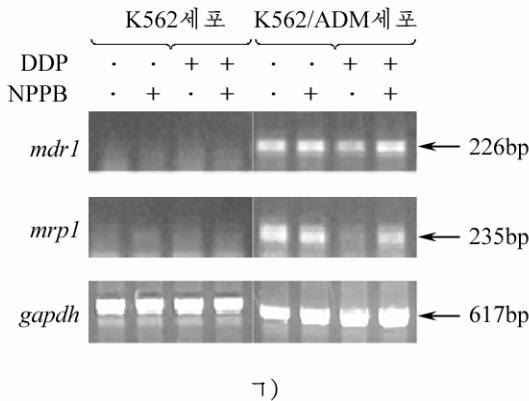


그림 4. K562/ADM세포에서 *mdr1*과 *mrp1*의 전사수준을 보여주는 전기영동상(ㄱ)과 도표(ㄴ)

전사수준도표에서 1-대조, 2-NPPB, 3-DDP, 4-DDP+NPPB; ■ *mdr1*, □ *mrp1*

맺 는 말

1) 시스플라틴(40 μ g/mL)에 대하여 증식억제률이 K562세포(83%)와 K562/ADM세포(69%)에서 차이나는데 50 μ mol/mL의 NPPB는 K562세포와 K562/ADM세포의 증식에 대하여 모두 명백한 억제작용이 없으나 100 μ mol/mL의 NPPB는 K562세포와 K562/ADM세포의 증식에 대하여 억제작용을 한다.

2) K562세포에서는 다약제내성현상이 나타나지 않으며 다약제내성인 K562/ADM세포에서는 다약제내성에 관여하는 유전자들인 *mdr1*과 *mrp1*이 전사된다.

참 고 문 헌

- [1] A. Ardizzoni et al.; Ann. Oncol., 10, 13, 1999.
- [2] S. M. Cohen et al.; Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 67, 93, 2001.
- [3] M. Christina et al.; Breast Cancer: Targets and Therapy, 20, 353, 2015.
- [4] D. Kessel Cancer Res., 28, 938, 1968.
- [5] C. Marzolini et al.; Clin. Pharmacol. Ther., 75, 1, 13, 2004.
- [6] Y. Tada et al.; Int. J. Cancer, 98, 4, 630, 2002.
- [7] W. William et al.; Gene Biotechnology, CRC Press, 16~71, 2011.

주체107(2018)년 7월 5일 원고접수

Influence of Cisplatin and Chloride Channel Blockers on Survival of K562 Cells and K562/ADM Cells

Ri Chol Jun, Pak Song Hui

40 μ g/mL cisplatin has controlled the proliferation of K562 cells(inhibition ratio 83%) and K562/ADM cells(inhibition ratio 69%), 50 μ mol/mL NPPB has not inhibited the proliferation of K562cell and K562/ADM cell but 100 μ mol/mL NPPB inhibited.

Multidrug resistance, MDR has not appeared in the K562 cells and multidrug resistance genes *mdr1* and *mrp1* have been transcribed in the K562/ADM cell.

Key words: cisplatin, chloride channel blocker