

2006년 8월

석사학위논문

유방암내성단백질(BCRP)를 과발현하
는 항암제내성암세포의 선별 및 프라
보노이드 BCRP억제제의 탐색

조선대학교 대학원

의 학 과

이 향 숙

유방암내성단백질 (BCRP)를 과발현하
는 항암제내성암세포의 선별 및 프라
보노이드 BCRP억제제의 탐색

Isolation and characterization of mitoxantrone-resistant
MCF-7 subline and screening of flavonoid BCRP inhibitors

2006년 6월 일

조선대학교 대학원

의 학 과

이 향 숙

유방암내성단백질(BCRP)를 과발현하
는 항암제내성암세포의 선별 및 프라
보노이드 BCRP억제제의 탐색

지도교수 최철희

이 논문을 의학 석사학위신청 논문으로 제출함

2006년 6월 일

조선대학교 대학원

의 학 과

이 향 숙

이향숙의 석사학위 논문을 인준함

위원장 대학교 교수 김 권 천 인

위원 대학교 교수 윤 지 수 인

위원 대학교 교수 최 철 희 인

2006년 6월 일

조선대학교 대학원

목 차

LIST OF TABLES	II
LIST OF FIGURES.....	III
ABSTRACT	IV
I . 서론	1
II . 실험재료 및 방법	3
1. 세포배양 및 내성 MCF-7세포주의 선별	3
2. 세포독성실험과 교차내성실험	3
3. Western blot 분석	4
4. Transcript 분석	4
5. Flow cytometry.....	5
6. Flavonoid의 화학요법 작용의 스크리닝.....	6
III . 실험결과	8
1. BCRP내성세포의 선별 및 MCF-7/MX5의 내성기전규명.....	8
2. Flow cytometry를 이용한 약물의 축적실험.....	9
3. 화학요법 감작제의 스크리닝	9
IV . 고찰.....	20
V . 결론.....	23
VI . 감사의 글	24
VII . 참고문헌.....	25

LIST OF TABLES

Table 1. Primer sequences used for PCR.....	7
Table 2. PCR conditions of BCRP, Pgp, MRP and β -actin.....	7
Table 3. Relative resistance of the mitoxantrone-resistant MCF-7 subline to a variety of anticancer drugs	13
Table 4. Chemosensitizing effects of flavonoids on MCF-7/MX5 over-expressing BCRP.....	19

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Structure of eleven flavonoids	11
Fig. 2. Cytotoxicity of mitoxantrone in the MCF-7/WT and MCF7/MX5 cells	12
Fig. 3. Expression of BCRP in the MCF-7/WT and MCF-7/MX5 cells.....	14
Fig. 4. Effects of nicardipine and sodium cyanide on drug accumulation in the MCF-7/MX5 cells.....	15
Fig. 5. Chemosensitizing effect of nicardipine on the MCF-7/MX5 cells overexpressing BCRP in the presence of mitoxantrone	16
Fig. 6. Flavonoid chemosensitizers superior to nicardipine	17
Fig. 7. Chemosensitizing effect of other flavonoids on the MCF-7/MX5 cells overexpressing BCRP in the presence of mitoxantrone.....	18

A B S T R A C T

Screening for flavonoid breast cancer resistance protein (BCRP) inhibitors using the mitoxantrone-resistant breast cancer cell subline MCF-7/DX5 overexpressing BCRP

Hyang Sok-Lee

Advisor: Prof. Cheol-Hee Choi, M.D. & Ph.D.

Department of medicine, Graduate School of Chosun University

Background and Objective: The overexpression of breast cancer resistant protein (BCRP) confers multidrug resistance (MDR) on cancer cells. MDR cells could be sensitized to anticancer drugs when treated concomitantly with a chemosensitizer. In this study, flavonoids have been screened for the development of chemosensitizers reversing BCRP-mediated MDR using a BCRP-overexpressing cancer cell line. **Materials and methods:** The mitoxantrone-resistant breast cancer cell subline was selected from the parental MCF-7 cells by treating mitoxantrone chronically. Expression of BCRP were determined using Western blot and RT-PCR analyses. Chemosensitizing effects of flavonoids were determined by the MTT assay. **Results:** The human breast cancer cell subline MCF-7/MX5 cells selected in the presence of 5 µg/ml mitoxantrone (MX) were more resistant to MX (15.7

times), doxorubicin (3.4 times), camptothecin (3.8 times), irinotecan (5.1 times) and 5-fluorouracil (4.4 times) than were the MCF-7 cells. Western blot and RT-PCR analyses revealed that the MCF-7/MX5 cells overexpressed BCRP mRNA and protein, whose activity was inhibited by nicardipine, a known BCRP inhibitor. Of eleven flavonoids tested 5,7,4'-trimethoxyflavone, 5,6,7,3',4',5'-hexamethoxyflavone and 5,6,7,3',4'-pentamethoxyflavone showed higher chemosensitizing effects than nicardipine.

Conclusion: The mitoxantrone-resistant breast cancer cell subline MCF-7/MX5 could provide a useful model for the screening of chemosensitizers of BCRP-mediated MDR. It is anticipated 5,7,4'-trimethoxyflavone, 5,6,7,3',4',5'-hexamethoxyflavone and 5,6,7,3',4'-pentamethoxyflavone could be candidates for BCRP inhibitors.

1. 서 론

최근 암 사망률이 한국에서 1위를 차지하면서 새로운 치료법의 개발이 더욱 절실히 요구되고 있으며 국내외에서 암의 치료율을 높이기 위해 부작용이 적고 효과가 좋은 새로운 항암제를 개발하려고 많은 연구를 하고 있다. 그러나 실제 임상에서 암의 화학요법이 실패하는 이유는 항암제에 대한 내성의 출현 때문인 경우가 많은데 해마다 암으로 죽는 수백만 명의 환자 중 약 90%가 항암제에 대한 내성과 관계가 있다는(Pereira 등, 1994)사실을 비쳐보면 새로운 항암제의 개발도 중요하지만 내성을 극복할 수 있는 물질의 개발도 시급하다고 할 수 있다.

내성 기전은 세포와 항암제의 종류에 따라 다소 다르지만, 항암제에 내성을 보이는 암세포가 다른 여러 종류의 항암제에도 비슷한 내성을 보이는 현상을 다약물내성(multidrug resistance, MDR)이라 한다. 다약물내성이 출현하면 처음의 항암제와는 구조적, 기능적으로 무관한 다른 항암제에 대해서도 교차내성을 보이므로 임상적으로 문제가 된다. 다약물내성의 기전으로는 항암제를 세포 밖으로 품어내는 배출펌프의 발현 때문인 경우가 많다. 대표적인 배출펌프는 암 세포의 형질막에 존재하는 170 KD의 P-glycoprotein (Pgp)(Juliano & Ling, 1976)와 다약물내성관련단백(multidrug resistance-associated protein, MRP)(Cole 등, 1992), 유방암 내성관련단백질(breast cancer resistance protein, BCRP)(Robery 등, 2001)등이 있다.

초기에는 항암제에 반응을 잘하던 암세포가 곧이어 내성을 보이는 경우가 많기 때문에 이러한 내성기전을 억제하여 내성 암세포의 항암제에 대한 감수성을 증가시킬 수 있는 약물을 개발하려는 노력을 해왔는데 이러한 약물을 화학요법 감작제(chemosensitizer)라고 하며, 또한 이들 약물이 대부분 항암제 배출펌프를 억제해서 효과를 나타내므로 배출 펌프 억제제(efflux pump inhibitors)라고도 부른다. 내성이 임상화학요법의 실패의 주된 원인이 되고 있어 내성을 역전시킬 수 있는 화학요법 감작제와 항암제를 동시에 투여해 항암화학요법의 치

효율을 높이려는 시도를 하고 있다. 현재까지 BCRP의 억제작용을 보이는 약물은 그 약물이 가지고 있는 고유한 약리작용과 부작용이 문제가 되고 있기 때문에 새로운 화학요법 감작제의 개발이 필요한 실정이다.

프라보노이드는 주로 식물에서 추출해낸 화합물로서 그 자체 독성이 없으며 항산화작용, 항암작용 및 화학감작작용 등으로 쓰이고 있다(Zhangs 등, 2005). 프라보노이드의 화학요법 감작제는 ATP의 아데닌 구조와 유사하기 때문에 ATP 결합부위에 결합한다. 뿐만 아니라, 프라보노이드는 스테로이드 RU 486의 결합을 부분적으로 억제하며 스테로이드 결합부위는 ATP결합부위와 가까이 있기 때문에 프라보노이드가 ATP결합부위와 주위의 스테로이드 결합부위에 결합하는 것으로 생각된다(Azevedo 등, 1996). 독성이 없으면서 BCRP억제효과가 뚜렷한 프라보노이드 BCRP를 억제제를 다량 스크리닝하기 위해서는 BCRP를 과발현하는 모델 세포가 필요하다. 그래서 본 연구에서는 배양이 가능한 유방암세포주를 이용하여 BCRP를 과발현하는 mitoxantrone 내성 아세포주 MCF-7/MX5 세포를 선별하였으며, 11개 프라보노이드로부터 항암제의 배출펌프를 억제할 수 있는 BCRP억제제를 탐색하였다.

II. 재료 및 방법

1. MCF-7 세포배양 및 내성 MCF-7세포주의 선별

56℃에서 30분간 열처리된 fetal bovine serum (FBS, GibcoBRL, USA) 10%와 항생제(antibiotic-antimycotic, GibcoBRL, USA)를 함유한 RPMI-1640 배지를 사용하여 MCF-7/WT (wild type) 세포주를 37℃, 5% CO₂와 습윤화된 배양기 (Sanyo, Japan)내에서 배양하였다. Mitoxantrone (Sigma, USA) IC₅₀농도(세포의 성장을 50%까지 억제할 수 있는 농도)를 함유한 배양액에서 MCF-7 세포주를 배양하여, 한 농도에서 약물을 3일간 투여 후 confluent해지면 약물의 농도를 50%씩 증가시키는 방법으로 선별하여 5 µg/ml의 mitoxantrone이 존재하는 배지에서도 잘 자라는 내성 아세포주를 얻었다.

2. 세포독성실험과 교차내성실험

항암제의 세포독성을 측정하기 위하여 MTT방법(살아있는 세포의 미토콘드리아 효소는 MTT를 환원시켜 formazan을 형성시킬 수 있음을 근거로 formazan의 농도를 측정함으로써 생존한 세포수를 간접적으로 측정)을 이용하여 여러농도의 mitoxantrone을 3일간 처리하여 얻은 반로그 약물농도-생존율곡선으로부터 IC₅₀농도를 구했다(Pieters 등, 1988). BCRP의 기질약물로 알려진 mitoxantrone, doxorubicin, camptothecin, irinotecan, 5-fluorouracil용액 10 µl를 96 well microplate에 넣고 5-7일간 약물없이 배양한 세포를 4x10⁴개/ml이 되도록 한 용액 90 µl aliquots를 해당 well에 넣었다. 이때 약물과 세포가 없는 well에는 약물대신 PBS만 넣어 세포의 대조로 삼고, 세포대신 배양액만 넣어 blank로 삼았다. 잘 흔든 후 3일간 CO₂ 배양기에서 배양한 후 MTT용액(5 mg/ml) 10 µl를 모든 well에 넣은 후 다시 5-6시간 배양한 후 배지를 suction하였다. 살아있는 세포의 미토콘드리아 효소에 의해 생성된 formazan은 99% DMSO용액 150 µl로 잘 녹여서 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율을 약물을 처리한 well의 흡광도값을 약물을

처리하지 않는 대조군 세포가 들어있는 흡광도값으로 나눈 다음 %값으로 나타내었다.

3. Western blot 분석

Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS, GibcoBRL, USA)으로 3회 세척한 세포를 1 mM PMSF (Sigma, USA)와 추출 완충액(2% sodium dodecyl sulfate, 4% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol을 함유한 pH=6.8의 Tris-HCl용액)으로 용해시킨 후 단백질의 농도는 Bio-Rad protein assay kit를 이용하여 측정하였고(DU^R 650 spectrophotometer, Beckman, USA), Western blot 방법은 Towbin 등 (1979)에 의해 처음 기술된 방법을 이용하였다.

4. Transcript 분석

1) 총 RNA의 추출

TRIzol 시약(Invitrogen)을 이용하여 총 RNA를 분리 추출하였다. Polypropylene tube에 5×10^6 개의 세포를 침전시킨 후 TRIzol 1ml을 넣고 5분 동안 15-30℃에서 반응시킨다. 200 μ l chloroform을 넣고 15초 동안 손으로 가볍게 섞어주고 2-3분 동안 15-30℃에서 반응시킨다. 4℃에서 13,200 rpm으로 15분 간 원심분리하고 상층액을 tube에 옮긴다. 500 μ l isopropyl alcohol을 넣고 잘 섞어준 다음 10분 동안 15-30℃에서 반응시킨다. 4℃에서 13,200 rpm 15분 동안 원심분리 하고 상층 액을 버리고 75% EtOH 1 ml를 RNA pellet에 넣고 vortexing하고 4℃에서 13,200 rpm으로 5분 간 원심분리 한다. 다음 실온에서 pellet를 건조 시킨 후 0.1% DEPC water에 다시 녹였다. RNA농도($1 A_{260}$ unit of single-stranded RNA = 40 μ g/ml)는 260 nm에서 측정하였고(DUR 650 spectrophotometer, Beckman, USA), RNA 순도는 A_{260} (260 nm에서의 흡광도)/ A_{280} (280 nm에서의 흡광도) 비로 결정하였다. 사용한 모든 용액은 제조한 후 하룻밤 동안 37℃에서 방치 후 121℃에서 20분간 고압 증기 멸균한 0.1% DEPC water를 가지고 만들었으며, 초자 기구는 180℃에서 8시간 이상 구운 후

사용하였다.

2) 역전사 중합효소 연쇄반응

First strand cDNA를 1 U/ μ l Rnasin (Promega), oligo(dT)₂₀ 100 ng, 50 mM Tris-HCl (PH 8.3), 75 mM KCl, 3 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 1X 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 tag DNA polymerase (Perkin Elmer, USA) 2.5 unit 가 함유된 25 μ l의 반응액에서 시행하였다(GeneAmp PCR system 2400, Perkin Elmer, USA). PCR 반응에 사용한 primer와 조건들은 Table 1, 2와 같다.

PCR 산물 25 μ l로부터 BCRP 10 μ l와 β -actin 5 μ l를 섞은 후 10% 비변성 polyacrylamide gel 상에서 2시간 동안 100 V로 전기영동 하여 분리하였다. 전기영동 후 gel을 1 μ g/ml의 ethidium bromide 용액에 20분 간 염색하고 다시 증류수에 철야로 담근 후 사진 촬영을 하였다(SL-5GD-Photographic system, USA).

5. Flow cytometry

세포밖으로 약물을 배출함으로써 약물의 축적을 감소시키는 세포막 transporter의 기능을 flow cytometry를 이용하여 간접적으로 측정하였다.

세포부유액을 차가운 PBS용액으로 2번 세척한 후 10⁶개/ml가 되도록 PBS용액에 부유한 후 형광을 내는 mitoxantrone (20 μ M)만 넣거나 BCRP억제제 nicardipine (5 μ M) 또는 ATP고갈제인 cyanide (2 mM)를 동시에 넣어 37°C에서 30분간 방치한 후, flow cytometer (FACSCalibur™, Becton Dickinson, USA)로 세포내의 형광량을 측정하였다. 이때 argon ion laser beam (488 nm)으로 laminar sheath flow의 세포를 여기시키고 세포의 형광 emission은 670 nm에서

측정하였다.

6. 프라보노이드의 화학요법 작용의 스크리닝

프라보노이드는 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma)에 녹인 다음 희석하여 사용하였다. MCF-7/MX5에 BCRP의 기질로 알려진 항암제인 mitoxantrone을 세포의 성장에 영향을 주지 않는 최대 농도(100 μ M)가 되도록 넣어준 후 BCRP억제제로 잘 알려진 nicardipine을 positive control로 사용하여 BCRP억제효과를 MTT방법으로 확인하였다. 같은 방법으로 11개 프라보노이드의 이 세포주에 대한 화학요법 감작효과를 MTT방법으로 각각 조사하였다.

Table 1. Primer sequences used for PCR

Gene ^a	S & AS ^b	Nucleotide sequences	Sequences Region ^c	Length of PCR products
BCRP	S	5'-CGACCGACGACACAGA-3'	2136-2151	475
	AS	5'-CTTAAATGAATGCGATTGAT-3'	2590-2610	
MDR-1	S	5'-CTGGTTTGATGTGCACGATGTTGG-3'	907-930	295
	AS	5'-TGCCAAGACCTCTTCAGCTACTG-3'	1179-1201	
MRP	S	5'-GACGGGAGCTGGGAAGTC-3'	4182-4201	396
	AS	5'-ACAACCTACTCCGGTGCC-3'	4553-4575	
β -actin	S	5' -GACTATGACTTAGTTGCGTTA-3'	1912-1932	501
	AS	5' -GTTGAACTCTCTACATACTTCCG-3'	2392-2412	

^a BCRP, BCRP gene; MDR-1, Pgp gene; MRP, MRP gene; β -actin, PCR control (house keeping gene).

^b Sense and antisense.

^c The oligonucleotide primers constructed for PCR correspond to the sense and antisense based within these reported sequences.

Table 2. PCR conditions of BCRP and β -actin

Gene	Hot start	Denaturation	Annealing	Extension	
BCRP	94℃, 12 min	94℃, 30 sec	53℃, 30 sec	72℃, 1 min	72℃에서 5분간 반응시킨 후 4℃에 보관
MDR-1			65℃, 30 sec		
MRP			53℃, 30 sec		
β -actin			53℃, 30 sec		

III. 결 과

1. BCRP내성세포의 선별 및 MCF-7/MX5의 내성기전 규명

1) BCRP내성세포의 선별

BCRP의 기질약물인 mitoxantrone IC_{50} 농도를 함유한 배양액에서 MCF-7/WT 세포주를 배양하여, 한 농도에서 약물을 3일간 투여 후 내성 표현형의 발현을 돕기 위해 약물을 제거하여 며칠 또는 몇 주 배양한 후 confluent해지면 약물의 농도를 50%씩 증가시키는 방법으로 선별하여 5 μ g/ml의 mitoxantrone이 존재하는 배지에서도 잘 자라는 내성 아세포주 MCF-7/MX5 세포주를 얻었다. MCF-7/MX5 세포주는 MCF-7/WT 세포주와 비교시 doubling time이 배로 증가하였으며 형태는 거의 비슷하였으나 뭉쳐서 자랐다. MCF-7/WT 세포주와 MCF-7/MX5 세포주에서 여러 농도의 mitoxantrone을 처치한 결과 IC_{50} 값으로 비교시 MCF-7/MX5는 MCF-7/WT보다 15.67배의 상대적 내성을 가지고 있었다(Fig 2). MCF-7/MX5 세포주는 다른 항암제인 doxorubicin, camptothecin, irinotecan, 5-fluorouracil 등 약물에도 교차내성을 보였다(Table 3).

2) MCF-7/MX5세포주의 내성기전 규명

Mitoxantrone 내성 MCF-7 아세포주에 transporter 단백질인 Pgp, MRP, BCRP의 과발현 유무를 확인하기 위하여 Western blot과 RT-PCR을 시행하였다. Western blot을 시행한 결과 MCF-7/WT과 MCF-7/MX5세포주에서 Pgp단백질은 발현이 되지 않았고 MRP단백질은 발현양이 같았다(결과미제시). RT-PCR의 결과도 Western blot의 결과와 마찬가지로 MCF-7/WT과 MCF-7/MX5 세포주에서 Pgp cDNA은 발현되지 않았고 MRP cDNA은 발현양의 차이를 보이지 않았다(결과 미제시). 그러나 MCF-7/WT 세포주에서는 BCRP의 발현양이 적었으나, MCF-7/MX5 세포주에서는 MCF-7/WT 세포주보다 9.85배 더 발현되어 있었다(Fig. 2). BCRP 단백질의 증가가 유전자 발현의 증가에 기인한 것인지를 알아보기 위하여 역전

사-중합효소 연쇄반응을 시행한 결과 Western blot 분석의 결과와 같이 BCRP cDNA가 MCF-7/MX5에서 MCF-7/WT보다 4.1배 더 발현되어 있었다(Fig. 2). 이 결과로 BCRP 단백질의 함량증가는 유전자 과발현으로 인한 mRNA의 증가 때문임을 알 수 있었다.

2. Flow cytometry를 이용한 약물의 축적실험

형광물질인 mitoxantrone의 축적을 flow cytometry를 이용하여 측정하였다. Flow cytometry를 이용한 세포내 약물축적실험에서 MCF-7/MX5는 mitoxantrone의 세포내 축적이 MCF-7/WT보다 31.77% 감소되었다. MCF-7/MX5세포에서 감소된 약물의 축적은 nicaedipine에 의해 12.33% 역전되었다. Sodium cyanide에 의해 MCF-7/WT에서는 약물의 축적이 31.78% 증가되었고 MCF-7/MX5에서는 약물의 축적이 53.97% 증가되었다(Fig 4).

3. 화학요법 감작제의 스크리닝

MCF-7/MX5에 BCRP의 기질로 알려진 항암제인 mitoxantrone을 세포의 생장에 영향을 주지 않는 최대 농도(100 μ M)가 되도록 넣어준 후 BCRP억제제로 잘 알려진 nicardipine을 positive control로 사용하여 BCRP억제효과를 MTT방법으로 측정하였다. 화학감작지수(chemosensitizing index, CI)를 MCF-7/MX5세포에서 mitoxantrone이 존재하지 않을 때와 존재할 때 암세포를 40%를 억제하는 프라보노이드의 약물농도의 비례값으로 계산하였다. Nicardipine은 자체독성을 보이면서 CI값이 3.87이었으나, 5,7,4'-trimethoxyflavone, 5,6,7,3',4',5'-hexamethoxyflavone, 5, 6, 7, 3',4'-pentamethoxyflavone은 CI값이 각각 14.67, 12.41, 5.15이상으로 BCRP의 억제제로 알려진 nicardipine보다 더욱 강력한 효과를 보였다(Fig 5 및 Fig 6). 5,7,3',4'-tetramethoxyflavone, 7,3',4'-trimethoxyflavone, 5,7,3',4'-tetrahydroxy-flavone, 3,7-dihydroxy-3',4'-dimethoxyflavone은 CI값이 각각 2.46, 2.38, 1.65, 1.58이상이었으며 3,6,3',4'-tetramethoxyflavone, 3,5,7-trihydroxy-3',4',5'-trimethoxyflavone,

3',4'-dimethoxyflavone, 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone은 400 μ M이상에서 효과가 없었다.(Fig 7 및 Table 4).

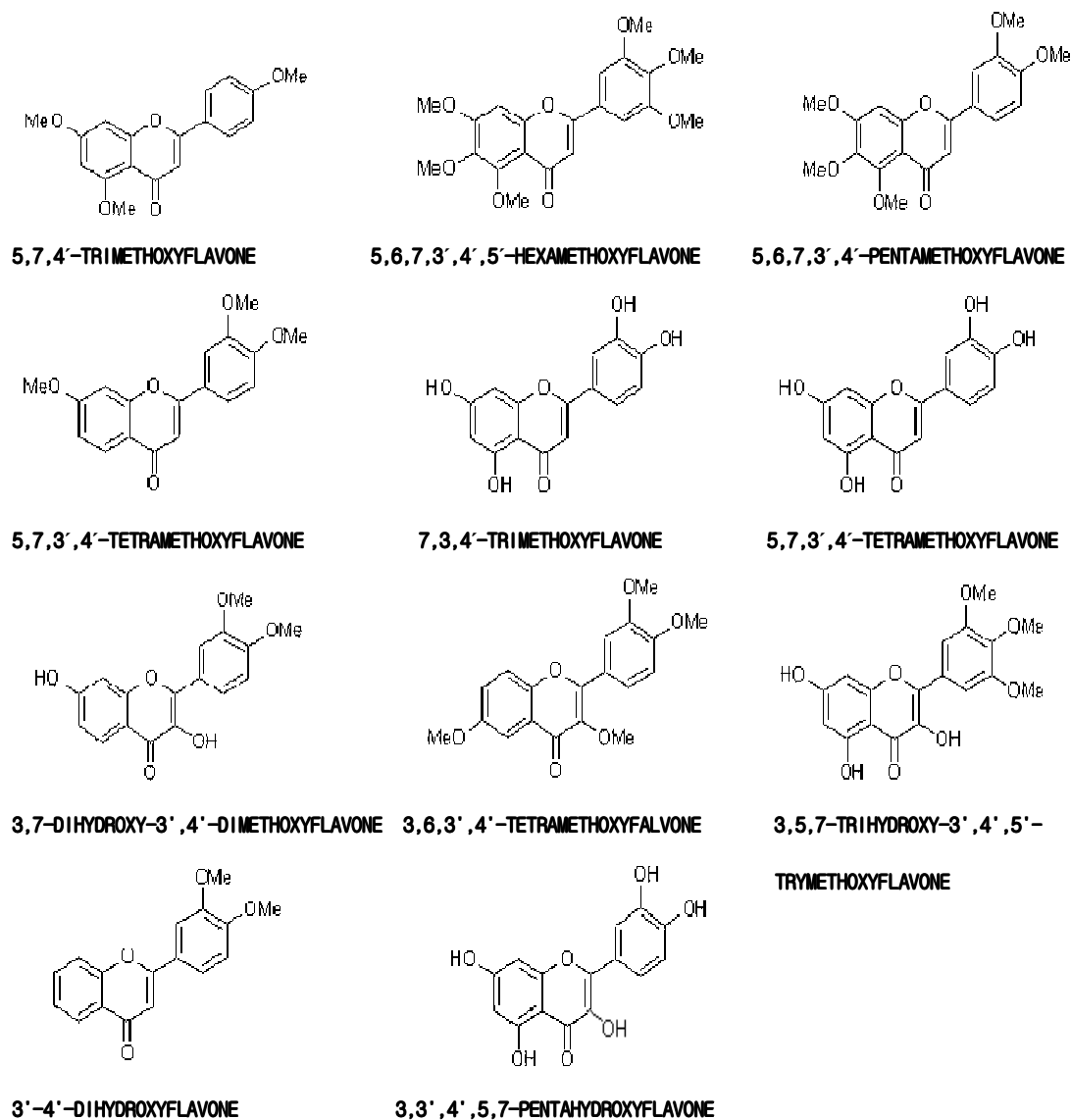


Fig 1. Structure of eleven flavonoids

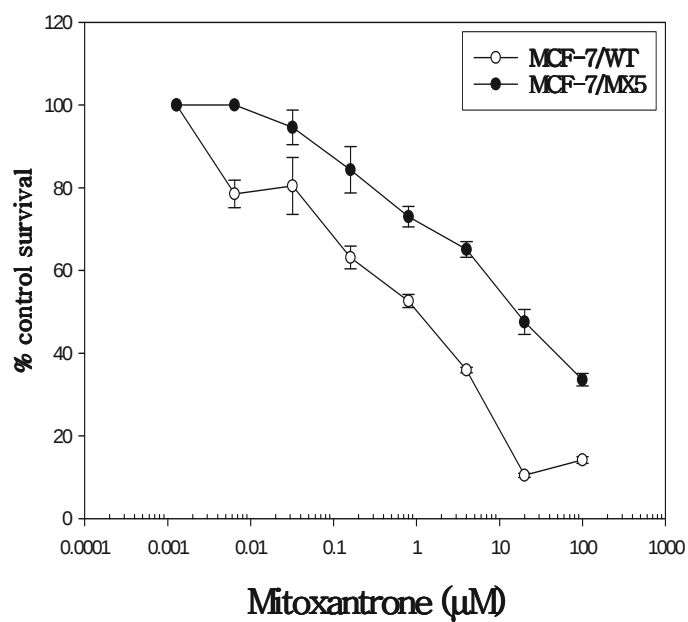


Fig. 2. Cytotoxicity of mitoxantrone in the MCF-7/WT and MCF-7/MX5 cells. The cytotoxicity was determined using the MTT assay.

Table 3. Relative resistance of the mitoxantrone-resistant MCF-7 subline to a variety of anticancer drugs.

Drug	IC ₅₀ ^a (μM)		Relative resistance ^b
	MCF-7/WT	MCF-7/MX5 ^c	MCF-7/MX5 ^c
Mitoxantrone	1.03	16.14	15.67
Doxorubicin	1.19	4.08	3.43
Camptothecin	0.22	0.84	3.82
Irinotecan	19.29	98.07	5.08
5-Fluorouracil	52.61	233.50	4.44

^a IC₅₀ value means drug concentration required to inhibit 50% of growth (72-h exposure).

^b relative resistance was calculated as the ratio of IC₅₀ which inhibited 50% growth of each drug-resistant sublines and the drug-sensitive parent line.

^c numbers refer to mitoxantrone concentrations in μg/ml.

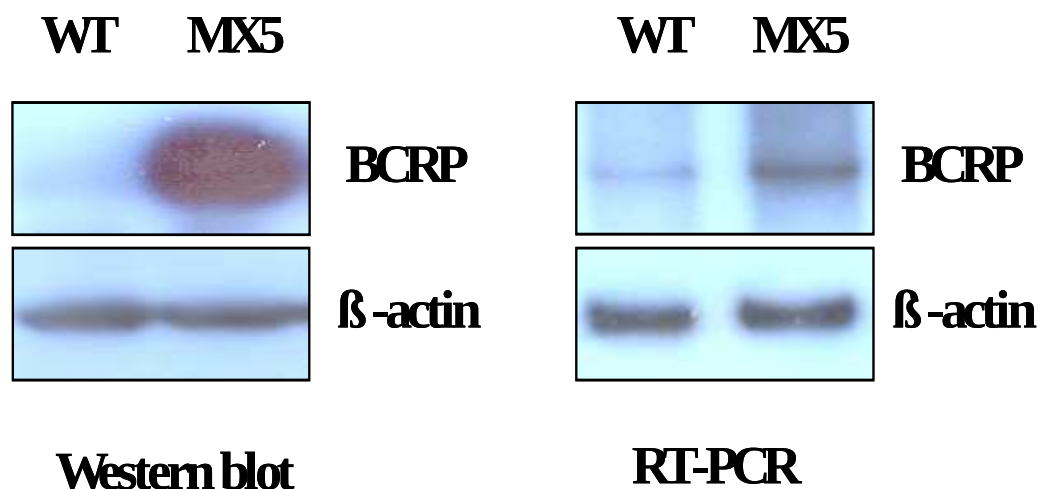


Fig. 3. Expression of BCRP in the MCF-7/WT and MCF-7/MX5 cells. Levels of BCRP and its mRNA were determined using Western blot analysis and RT-PCR method, respectively. WT, MCF-7/WT; MX5, MCF-7/MX5.

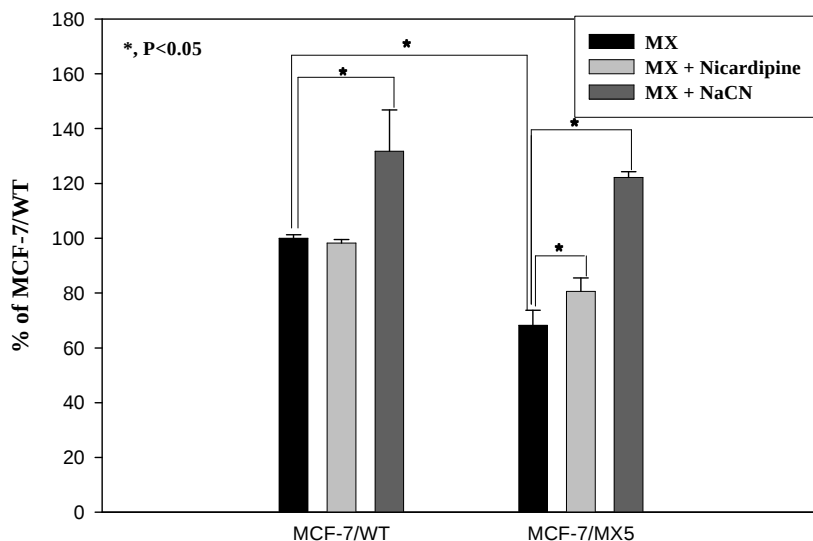


Fig. 4. Effects of nicardipine and sodium cyanide on drug accumulation in the MCF-7/MX5 cells. Intracellular drug accumulation was determined by flow cytometry. Cell suspensions ($5 \times 10^5/\text{ml}$) in PBS were exposed to mitoxantrone ($20 \mu\text{M}$), nicardipine ($5 \mu\text{M}$), sodium cyanide (2 mM) at 37°C for 30 min. Control represents mean fluorescence in the absence of mitoxantrone, nicardipine or sodium cyanide. Nicardipine, BCRP inhibitor; NaCN, sodium cyanide.

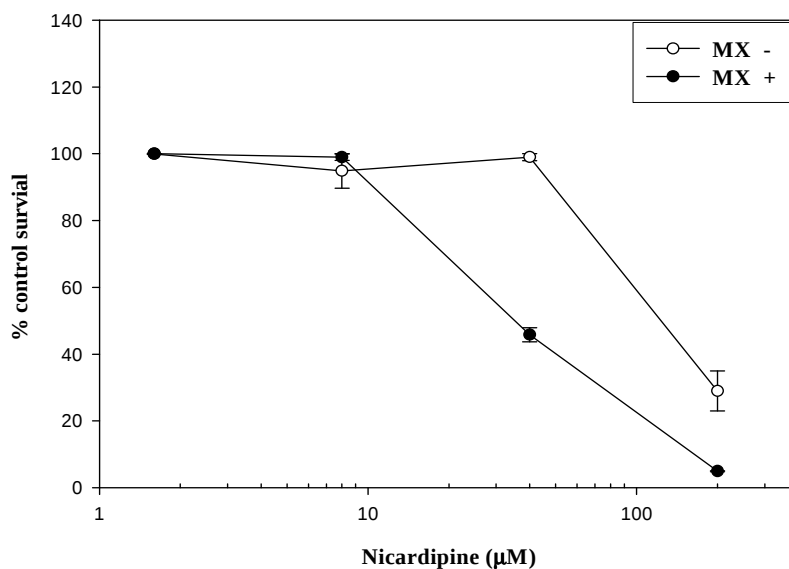


Fig. 5. Chemosensitizing effect of nicardipine on the MCF-7/MX5 cells. The cytotoxicity was determined using the MTT assay in the absence or presence of 100 μM mitoxantrone (24-h exposure). Bars, standard errors; Nicardipine, BCRP inhibitor; -/+, absence/presence.

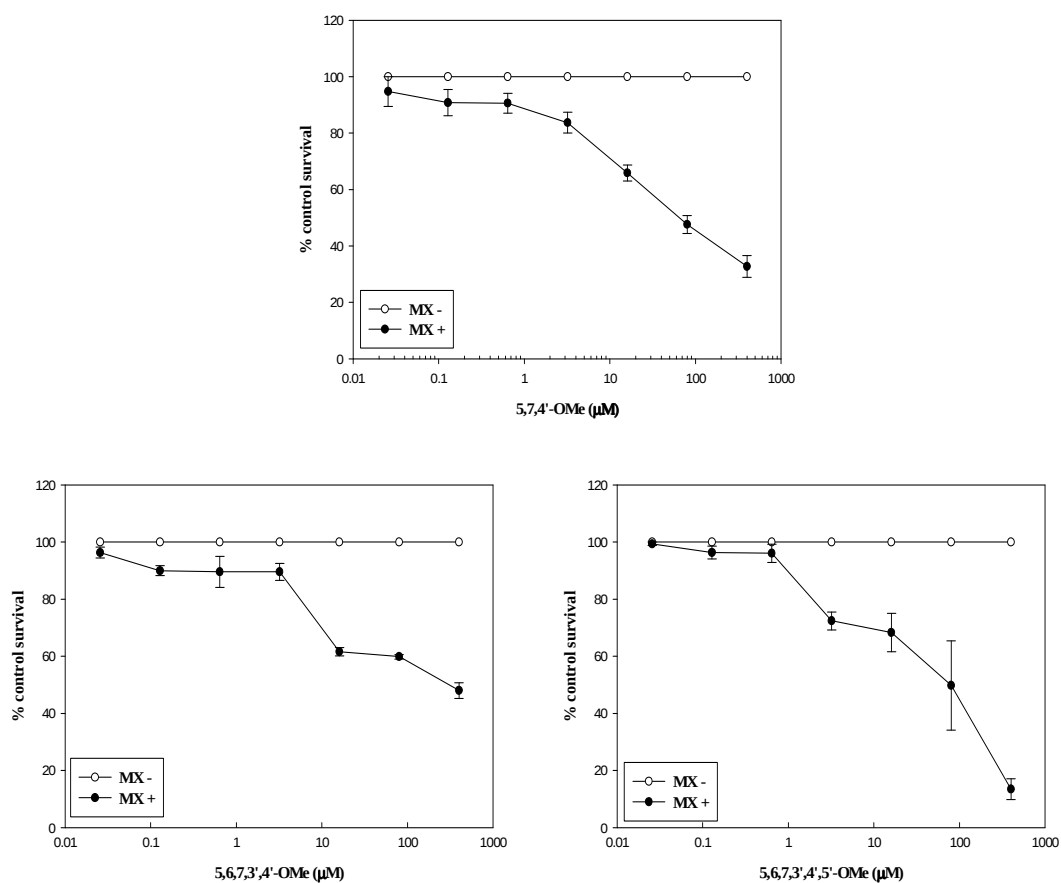


Fig 6. Flavonoid chemosensitizers superior to nicardipine. OMe, methoxy; -/+, absence/presence.

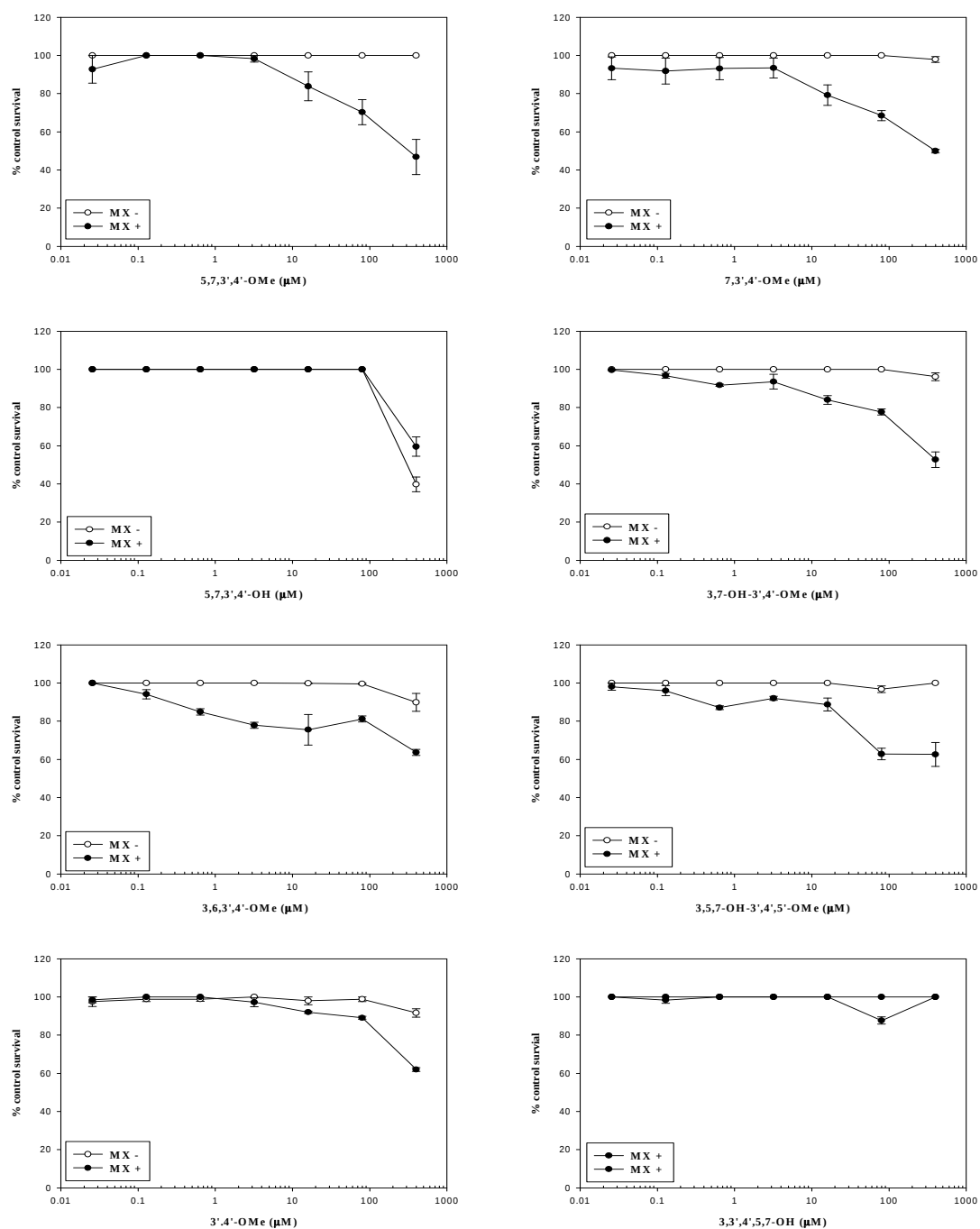


Fig. 7. Chemosensitizing effect of other flavonoids on the MCF-7/MX5 cells overexpressing BCRP in the presence of mitoxantrone. Bars, standard errors; Nicardipine, BCRP inhibitor; OMe, methoxy; OH, hydroxy.

Table 4. Chemosensitizing effects of the flavonoids on MCF-7/MX5 cells overexpressing BCRP

Chemosensitizer	IC ₄₀ ^a (μM) MX (- ^b)	IC ₄₀ ^a (μM) MX (+ ^b)	CI ^c
Nicardipine	99.19	26.19	3.87
5,7,4'-OMe ^d	>400	27.27	>14.67
5,6,7,3',4',5'- OMe ^d	>400	32.23	>12.41
5,6,7,3',4'- OMe ^d	>400	77.67	>5.15
5,7,3',4'- OMe ^d	>400	162.87	>2.46
7,3',4'- OMe ^d	>400	167.89	>2.38
5,7,3',4'-OH ^e	392.57	237.97	1.65
3,7-OH ^e -3',4'- OMe ^d	>400	252.86	>1.58
3,6,3',4'- OMe ^d	>400	400	>1
3,5,7-OH ^e -3',4',5'-OMe ^d	>400	400	>1
3',4'- OMe ^d	346.58	400	>1
3,3',4',5,7-OH ^e	>400	>400	>1

^a IC₄₀ value means drug concentration required to inhibit 40% of growth (24-h exposure).

^b +/-, presence/absence of drugs.

^c chemosensitizing index = IC₄₀(MX-)/IC₄₀(MX+)

^d OMe, methoxy.

^e OH, hydroxy

IV . 고 찰

항암제에 대한 암세포의 내성획득이 임상에서 암의 화학요법시 실패의 주된 원인중의 하나로 생각되고 있다. 유방암내성세포에서도 내성출현이 치료의 큰 장애가 되고 있어 예후가 좋지 않는 실정이다. 그러므로 유방암내성세포의 치료율을 높이기 위해서 내성을 극복하는 화학감작제의 개발이 필요한 실정이다. 본 연구에서는 유방암내성세포치료에 가장 흔히 사용되고 있는 항암제인 mitoxantrone을 유방암내성세포주(MCF-7)에 처치하여 인위적으로 내성세포를 선별하였고 이 세포를 이용하여 프라보노이드 화학감작제를 탐색하고자 하였다.

선별한 MCF-7/MX5세포는 형태와 크기는 MCF-7/WT세포와 비슷하였으나 성장할 때 모여서 자라는 특성이 있으며 doubling time이 증가되었는데 이는 인위적으로 만들어진 내성세포주에서 흔히 관찰되는 현상이다. 내성 유방암 아세포주에서는 기질약물인 mitoxantrone에 15.67 배의 내성을 보였으며 mitoxantrone 내성 유방암 아세포주는 선택약물인 topoisomerase II 억제제인 mitoxantrone이 외에 anthracycline 항생제인 doxorubicin, topoisomerase I 억제제로 알려져있는 camptothecin과 irinotecan, 항대사약물인 5-fluorouracil에도 다양한 정도로 교차내성을 보였다. 따라서 mitoxantrone 내성 유방암 아세포주는 다약물내성의 표현형을 보인다고 할 수 있다.

Mitoxantrone 내성 MCF-7 아세포주에서 다약물표현형의 내성기전을 알아보기 위하여 3가지 가장 잘 알려진 transporter 단백질인 Pgp, MRP, BCRP의 과발현 유무를 Western blot과 RT-PCR을 시행하여 확인하였다. Western blot을 시행한 결과 MCF-7/WT과 MCF-7/MX5세포주에서 Pgp단백질은 발현이 되지 않았고 MRP단백질은 발현양의 차이가 없었다(결과 미제시). RT-PCR의 결과도 Western blot의 결과와 마찬가지로 MCF-7/WT과 MCF-7/MX5 세포주에서 Pgp cDNA은 발현되지 않았고 MRP cDNA은 발현양의 차이를 보이지 않았다(결과 미제시). 그러나 Western blot의 결과로 볼 때 MCF-7/MX5세포주에서는 BCRP의 발현양이 MCF-7/WT보다 약 9.85배정도 많았으며, RT-PCR의 결과에서 볼 때 MCF-7/MX5 세포주

에서는 MCF-7/WT 세포주보다 약 4.1배정도 과발현되어 있었다(Fig. 3). 이로부터 MCF-7/MX5 세포주의 다약물내성기전은 BCRP단백질의 과발현에 의한 것으로 생각되며 BCRP단백질의 과발현양이 mRNA과발현양보다 많은 것은 MCF-7세포에서 BCRP단백질의 합성속도가 mRNA합성속도보다 빠르기 때문인 것으로 추측된다.

내성세포주에서 볼 수 있는 다약물내성 표현형의 특징중의 하나가 약물감수성세포와 비교할 때 약물의 축적이 감소되어 있다는 것이다. Mitoxantrone 내성 유방암 아세포주는 MCF-7세포와 비교할 때 세포내의 약물축적이 31.77% 감소되어 있었다. 또한 MCF-7/MX5에서 감소된 mitoxantrone의 약물축적은 BCRP억제제로 알려져 있는 nicardipine에 의해 12.33% 역전되었다. 이것은 BCRP단백질의 배출펌프의 작용이 억제되었을 가능성이 높음을 시사하는 것이다. Sodium cyanide에 의해 MCF-7/WT에서는 약물의 축적이 31.78% 증가되었고 MCF-7/MX5에서는 약물의 축적이 53.97% 증가되었다. 이와 같은 결과는 이 다약물내성기전은 에너지(ATP)의존성 BCRP단백질의 배출펌프의 작용에 의한 가능성이 높으나 BCRP단백질 이외의 기타 에너지(ATP)의존성 transporter단백질이 관여하고 있는 것으로 생각된다.

BCRP를 억제하는 화학요법반응증가제는 지금까지 알려진 것들로는 GF120918 (Milliepaard 등, 2001)나 fumitremorgin C (Ji & Morris, 2004), nobobiocin (Shiozawa 등, 2004), nicardipine (Zhang 등, 2005)등이 있으며 효과가 있으나 모두 세포자체독성이 강하다.

프라보노이드의 화학요법 감작제는 ATP의 아데닌 구조와 유사하기 때문에 ATP결합부위에 결합한다(Conseil 등, 1998). 뿐만 아니라, 프라보노이드는 스테로이드 RU 486의 결합을 부분적으로 억제한다(Sicheri 등, 1996). 스테로이드결합부위는 ATP결합부위와 가까이 있기 때문에 프라보노이드가 ATP결합부위와 주위의 스테로이드 결합부위에 결합하는 것으로 생각된다(Azevedo 등, 1996). 그리하여 프라보노이드가 BCRP배출펌프를 억제함으로써 화학요법감작제로 쓰일 수 있다.

천연물에서 유래되는 프라보노이드는 낮은 독성을 가지고 있기 때문에 비교

적 많은 용량의 사용이 가능하다(Zhang 등, 2005). 이번 실험에서는 BCRP억제제 screening을 위한 좋은 모델세포로 생각되는 MCF-7/MX5세포를 이용하여 11가지 프라보노이드를 MTT방법을 이용하여 화학요법감작작용을 조사한 결과 2가지를 제외한 다른 프라보노이드들은 다양한 화학감작작용을 나타냈다. BCRP억제제인 nicardipine보다 높은 CI값을 가진 프라보노이드로는 5,7,4'-trimethoxyflavone, 5,6,7,3',4',5'-hexamethoxyflavone, 5,6,7,3',4'-pentamethoxyflavone이었다. 이들 프라보노이드 구조활성관계에서 볼 때 5,7,4'-trimethoxyflavone에 3'-methoxy기가 더해진 5,7,3',4'-tetramethoxyflavone의 CI값이 낮은 것으로 보아서 3'-methoxy기는 BCRP억제활동에 부정적인 역할을 하고, 5,6,7,3',4'-pentamethoxyflavone에 5'-methoxy기가 더해진 5,6,7,3',4',5'-hexamethoxyflavone의 CI값이 높아진 것으로 봐서 5'-methoxy기는 긍정적인 역할을 하는 것으로 생각된다.

V. 결 론

MCF-7/MX5세포는 기질약물인 mitoxantrone에 15.67배의 내성을 보였으며 또한 다른 항암제에도 교차내성을 보여 다약물내성을 표현하였다. MCF-7/MX5세포에서 BCRP protein이 과발현되었으며 BCRP억제제인 nicardipine에 의해 억제되는 배출펌프의 기능도 하고 있으며 MCF-7/MX5세포는 BCRP억제제 screenig을 위한 좋은 모델세포로 생각된다. 이 모델세포를 이용하여 11가지 프라보노이드를 MTT방법을 이용하여 화학요법감작작용을 조사한 결과 5,7,4'-trimethoxyflavone, 5,6,7,3',4',5'-hexamethoxyflavone, 5,6,7,3',4'-penta-methoxyflavone은 BCRP의 억제제로 알려진 nicardipine보다 더욱 높은 화학감작작용을 보였으며 BCRP억제제개발의 좋은 후보물질로 기대된다.

VI. 감사의 글

배움의 희망을 안고 조선대학교 의과대학 약리학교실로 석사공부 하러 온지 벌써 2년, 모든 것이 낯설고 신기하던 때가 어제 같은 데 벌써 2년이 지나고 졸업을 맞이하게 되었습니다. 그 동안 외국 땅 에서 모든 것이 생소하고 막막 하던 저에게 힘과 용기를 심어주고 항상 따뜻한 배려와 관심을 주신 모든 분들께 진심으로 감사를 드리고 싶습니다.

2년 동안 저한테 좋은 학습기회를 주시고 학자의 길로 인도해주시고 연구의 진리와 도를 깨우쳐주신 스승님인 최철희교수님께 충심으로 감사의 뜻을 전하고 싶습니다. 언제나 친절함 웃음으로 반겨주신 임동윤교수님, 친구처럼 편하게 해주시던 전영진교수님 그리고 바쁘신 일상에도 저의 논문을 심사해주신 김권천교수님, 항상 엄격하게 요구하시던 윤지수교수님 감사합니다. 처음으로 저한테 실험을 가르쳐주신 항상 친절하시고 세심한 이태범실장님, 선배이신 항상 부지런한 주미씨와 화끈한 현이씨, 그리고 항상 천진한 웃음을 가진 지윤언니, 항상 마음 따뜻한 조교미선씨, 여러분의 따스한 배려와 도움이 있었기에 저의 유학생활이 재미있고 다채로웠던 같습니다. 그리고 항상 옆에서 고무해주시고 챙겨주시던 해부학의 이모, 같은 중국에서 온 열정적인 미훙언니께 감사의 마음을 전합니다.

멀리 계시지만 항상 걱정해주시고 고무격려해주시던 작은 이모와 이모부, 그리고 나에게 힘과 동력이 되어준 항상 용기를 잃지 않고 힘차게 살아가는 사랑 하는 나의 가족에게 이 논문을 드립니다.

VII. 참 고 문 헌

1. Pereira, E., Borrel, M.C., Fiallo, M., Garnier, S.A.. "Non-competitive inhibition of Pgp-associated efflux of THP-adriamycin by verapamil in living K562 leukemia cells." *Biochem. Biophys. Acta.* 1225:209-216, 1994.
2. Juliano, R.L., Ling, V.. "A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants." *Biochem. Biophys. Acta.* 455: 152-162, 1976.
3. Robinson, I.B.. "The role of the MDR1 (Pgp) gene in multidrug resistance in vitro and in vivo." *Biochem. Pharmacol.* 43:95-102, 1992.
4. Cole, S.P.C., Bhardwaj, G., Gerlach, J.H., Mackie, J.E., Grant, C.E., Almquist, K.C. et al.. "Overexpression of a transporter gene in a multidrug resistant human lung cancer cell line." *Science* 258:1650-1654, 1992.
5. De Azevedo, W.F. Jr., Mueller-Dieckman, H.J., Schuze-Gahmen, U., Worland, P.J., Sausville, E., Kim, S.H.. "Structural basis for specificity and potency flavonoid inhibitor of human CDK2, a cell cycle kinase." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(7): 2735-2740, 1996.
6. Sicheri, F., Moarefi, I., Kuriyan, J.. "Crystal structure of the Srcfamily tyrosine kinase Hck." *Nature* 385(6617): 602-609, 1996.
7. Zhangs, YangX, Coburn RA, Morris ME. Structure activity relationships and quantitative structure activity relationships for the flavonoid-mediated inhibition of breast cancer resistance protein. *Biochem Pharmacol.* 70(4): 627-639. 2005.
8. ZhangS, YangX, Morris ME. Flavonoids are inhibitors of breast

- cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport. *Mol Pharmacol*. 65(5): 1208-1216. 2004.
9. Cooray HC, Janvilisri T, vanVeen HW, Hladky SB, Barrand MA. Interaction of the breast cancer resistance protein with plant polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun*. 317(1): 269-275. 2004.
 10. Milliepaard M, van Gastelen MA, Tohgo A, Hausheer FH, van Waardenburg RC, de Jong LA, Pluim D, Beijnen JH, Schellens JH. Circumvention of breast cancer resistance protein (BCRP)-mediated resistance to camptothecins in vitro using non-substrate drugs or the BCRP inhibitor GF120918. *Clin Cancer Res*. 7(4): 935-941. 2001
 11. Ji Y, Morris ME. Effect of organic isothiocyanates on breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport. *Pharm Res*. 21(12): 2261-2269, 2004.
 12. Shiozawa K, Oka M, Soda H, Yoshikawa M, Ikegami Y, Tsurutani J, Nakatomi K, Nakamura Y, Doi S, Kitazaki T, Mizuta Y, Murase K, Yoshida H, Ross DD, Kohno S. Reversal of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)-mediated drug resistance by novobiocin, a coumermycin antibiotic. *Int J Cancer*. 108(1):146-51. 2004.
 13. Zhang Y, Gupta A, Wang H, Zhou L, Vethanayagam RR, Unadkat JD, Mao Q. BCRP transports dipyridamole and is inhibited by calcium channel blockers. *Pharm Res*. 22(12):2023-2034. 2005.
 14. G. Conseil, H. Baubichon-Cortay, G. Dayan, J.M. Jault, D. Barron and A. di Pietro , Flavonoids: a class of modulators with bifunctional interactions at vicinal ATP- and steroid-binding sites on mouse P-glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 9831-9836. 1998
 15. Nakanishi T, Karp JE, Tan M, Doyle LA, Peters T, Yang W, Wei D,

- Ross DD. Quantitative analysis of breast cancer resistance protein and cellular resistance to flavopiridol in acute leukemia patients. *Clin Cancer Res.* 9(9): 3320–3328. 2003.
16. Robey RW, Medina-Perez WY, Nishiyama K, Lahusen T, Miyake K, Litman T, Senderowicz AM, Ross DD, Bates SE. Overexpression of the ATP-binding cassette half-transporter, ABCG2 (Mxr/BCrp/ABCP1), in flavopiridol-resistant human breast cancer cells. *Clin Cancer Res.* 7(1): 145–152. 2001.
 17. Yanase K, Tsukanhara S, Mitsuhashi J, Sugimoto Y. Functional SNPs of the breast cancer resistance protein – therapeutic effects and inhibitor development. *Cancer Lett.* 234(1): 73–80. 2006.
 18. Sugimoto Y, Tsukahara S, Ishikawa F, Mitsuhashi J. Breast cancer resistance protein: molecular target for anticancer drug resistance and pharmacokinetics/pharmacodynamics. *Cancer Sci.* 96(8): 457–465. 2005.
 19. Phase II study of flavopiridol in patients with advanced colorectal cancer, *Annals of Oncology* . 14: 1270–1273. 2003.
 20. J.D. Allen and A.H. Schinkel, Multidrug resistance and pharmacological protection mediated by the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2), *Molecular Cancer Therapeutics* .1: 427–434. 2002.
 21. J.D. Allen, R.F. Brinkhuis, J. Wijnholds and A.H. Schinkel, The mouse Bcrp1/Mxr/Abcp gene: amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin, *Cancer Research* 59.: 4237–4241. 1999.
 22. Zhang S, Yang X, Coburn RA, Morris ME. Structure activity relationships and quantitative structure activity relationships

for the flavonoid-mediated inhibition of breast cancer resistance protein. *Biochem Pharmacol.* 70(4):627-39. 2005.

23. R. Allikmets, L.M. Schriml, A. Hutchinson, V. Romano-Spica and M. Dean, A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance, *Cancer Research* 58: 5337-5339. 1998.
24. S.V. Ambudkar, I.H. Lelong, J. Zhang, C.O. Cardarelli, M.M. Gottesman and I. Pastan, Partial purification and reconstitution of the human multidrug-resistance pump: characterization of the drug-stimulatable ATP hydrolysis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 8472-8476. 1992.
25. D.G. Bailey, J.M. Arnold, C. Munoz and J.D. Spence, Grapefruit juice-felodipine interaction: mechanism, predictability, and effect of naringin, *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 53: 637-642. 1993
26. P. Borst, R. Evers, M. Kool and J. Wijnholds, The multidrug resistance protein family, *Biochimica et Biophysica Acta* 1461: 347-357. 1999.
27. P. Borst, R. Evers, M. Kool and J. Wijnholds, A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins, *Journal of the National Cancer Institute* 92: 1295-1302. 2000.
28. A. Boumendjel, F. Bois, C. Beney, A.M. Mariotte, G. Conseil and A. Di Pietro, B-ring substituted 5,7-dihydroxyflavonols with high-affinity binding to P-glycoprotein responsible for cell multidrug resistance, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 11: 75-77. 2001.

29. A. Boumendjel, A. Di Pietro, C. Dumontet and D. Barron, Recent advances in the discovery of flavonoids and analogs with high-affinity binding to P-glycoprotein responsible for cancer cell multidrug resistance, *Medicinal Research Reviews* 22: 512-529. 2002.
30. M. Buchler, J. Konig, M. Brom, J. Kartenbeck, H. Spring, T. Horie and D. Keppler, cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats, *Journal of Biological Chemistry* 271: 15091-15098. 1996.
31. Buchler, A.S. Gukovskaya, M. Mouria, M.C. Buchler, M.W. Buchler, H. Friess, S.J. Pandol, H.A. Reber and O.J. Hines, Prevention of metastatic pancreatic cancer growth in vivo by induction of apoptosis with genistein, a naturally occurring isoflavonoid, *Pancreas* 26: 264-273. 2003.
32. A.F. Castro and G.A. Altenberg, Inhibition of drug transport by genistein in multidrug-resistant cells expressing P-glycoprotein, *Biochemical Pharmacology* 53: 89-93. 1997.
33. H.S. Chan, G. Haddad, P.S. Thorner, G. DeBoer, Y.P. Lin, N. Ondrusek, H. Yeger and V. Ling, P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for neuroblastoma, *New England Journal of Medicine* 325: 1608-1614. 1991.
34. C.J. Chen, J.E. Chin, K. Ueda, D.P. Clark, I. Pastan, M.M. Gottesman and I.B. Roninson, Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdrl (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells, *Cell* 47: 381-389. 1986

35. H.Y. Chen, T.S. Wu, S.F. Su, S.C. Kuo and P.D. Chao, Marked decrease of cyclosporin absorption caused by phellamurin in rats, *Planta Medicine* 68: 138-141. 2002.
36. J. Chen, H. Lin and M. Hu, Metabolism of flavonoids via enteric recycling: role of intestinal disposition, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 304: 1228-1235. 2003.
37. J.S. Choi, H.K. Choi and S.C. Shin, Enhanced bioavailability of paclitaxel after oral coadministration with flavone in rats, *International Journal of Pharmaceutics* 275: 165-170. 2004.
38. J.S. Choi, B.W. Jo and Y.C. Kim, Enhanced paclitaxel bioavailability after oral administration of paclitaxel or prodrug to rats pretreated with quercetin, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57: 313-318. 2004.
39. S.P. Cole, G. Bhardwaj, J.H. Gerlach, J.E. Mackie, C.E. Grant, K.C. Almquist, A.J. Stewart, E.U. Kurz, A.M. Duncan and R.G. Deeley, Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line, *Science* 258: 1650-1654. 1992.
40. S.P. Cole, K.E. Sparks, K. Fraser, D.W. Loe, C.E. Grant, G.M. Wilson and R.G. Deeley, Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells, *Cancer Research* 54: 5902-5910. 1994.
41. G. Conseil, H. Baubichon-Cortay, G. Dayan, J.M. Jault, D. Barron and A. Di Pietro, Flavonoids: a class of modulators with bifunctional interactions at vicinal ATP- and steroid-binding sites on mouse P-glycoprotein, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 31-9836.

1998.

42. Choi CH, Sun KH, An CS, Yoo JC, Hahm KS, Lee IH, Sohng JK, Kim YC. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by 5,6,7,3',4'-pentamethoxyflavone (Sinensetin). *Biochem Biophys Res Commun.* 26;295(4):832-840. 2002