[UCI]I804:24011-200000234277

2007년 2월
박사학위논문

항암제내성 대장암세포에 대한 betulinic acid의 치료상승효과

조선대학교 대학원

의학과

정 권 율

항암제내성 대장암세포에 대한 betulinic acid의 치료상승효과

Synergistic effect of combined betulinic acid with anticancer drugs in anticancer drug-resistant colon cancer cells

2007년 2월 25일

조선대학교 대학원
의학과

정 권 율

항암제내성 대장암세포에 대한 betulinic acid의 치료상승효과

지도교수 최 철 희

이 논문을 의학박사학위신청 논문으로 제출함.

2006년 10월 일

조선대학교 대학원 의학과

의학과

정 권 율

정 권 율의 박사학위논문을 인준함

위원장	대학교 교수	민 영돈	인
위 원	대학교 교수	임 성철	인
위 원	대학교 교수	김 상현	인
위 원	대학교 교수	조 훈	인
위 원	대학교 교수	최 철희	인

2006년 12월 일

조선대학교 대학원

목 차

도목차 i

Abstract 1

서론 3

재료 및 방법 5

결과 10

고찰 15

결론 21

참고문헌 22

도목차

Figure 1. Chemical structure of betulinic acid..28

Figure 2. Cytotoxicity of betulinic acid, 5-FU, IRT, and OXT against SNU-C5/WT cells for 72 h...29

Figure 3. IC_{30} values of 5-FU, IRT, or OXT containing various concentrations of betulinic acid (BetA) against SNU-C5/WT cells for 72 h. 30

Figure 4. Cytotoxicity of 5-FU, IRT, and OXT on SNU-C5/5FU-R cells for 72 h. 31

Figure 5. Cytotoxicity of IC_{30} of 5-FU, IRT, or OXT according to various concentrations of betulinic acid (BetA) on SNU-C5/5FU-R cells for 72 h. 32

Figure 6. Cytotoxicity of 5-FU, IRT, and OXT on SNU-C5/IRT-R cells for 72 h. 33

Figure 7. Cytotoxicity of IC_{30} of 5-FU, IRT, or OXT according to various concentrations of betulinic acid (BetA) on SNU-C5/IRT-R cells for 72 h. 34

Figure 8. Cytotoxicity of 5-FU, IRT, and OXT on SNU-C5/OXT-R cells for 72 h. 35

Figure 9. Cytotoxicity of IC_{30} of 5-FU, IRT, or OXT according to various concentrations of betulinic acid (BetA) on SNU-C5/OXT-R cells for 72 h. 36

Figure 10. Fluorescence microscopy of SNU-C5/WT cells after treatment with betulinic acid (BetA) for 24 and 48 h. 37

Figure 11. Western blot analysis of caspase-3 and -9 in SNU-C5/WT cells after treatment with betulinic acid (BetA) for 12, 24 and 48 h......................38

Figure 12. Western blot analysis of Bcl-2 and Bad in SNU-C5/5FU-R, SNU-C5/IRT-R, and SNU-C5/OXT-R cells after treatment with 5-FU alone or in combination wit BetA, IRT alone or in combination with BetA, and OXT alone or in combination with BetA for 12, 24 and 48 h, respectively. 39

ABSTRACT

Synergistic effect of combined betulinic acid with anticancer drugs in anticancer drug-resistant colon cancer cells

Jung, Kwon-Ryul

Advisor: Prof. Choi, Cheol-Hee, M.D. & Ph.D.
Department of Medicine,
Graduate School of Chosun University

Primary or acquired resistance of tumors to established chemotherapeutic regimens still constitutes a big concern in oncology. Thus, attempts to improve the survival of cancer patients largely depend on strategies to target tumor cell resistance. The aim of this study was to investigate the effect of betulinic acid (BetA) as a chemosensitizer in anticancer drug treatment of chemoresistant colon cancer cell lines. Chemoresistant sublines against 5-FU (SNU-C5/5FU-R), IRT (SNU-C5/IRT-R), and OXT (SNU-C5/OXT-R) were made from the wild type of colon adenocarcinoma cell line SNU-C5. To analyze the role and effect of BetA in SNU-C5 and SNU-C5/R cell lines, the author carried out MTT assay, Western blot analysis, PI staining, Hoechst staining, and DNA fragmentation test. BetA alone was a good chemotherapeutic drug for SNU-C5, SNU-C5/5FU-R,

and SNU-C5/OXT-R cells. Combination of BetA with IRT or OXT was effective in the SNU-C5/5FU-R cells, and combination of BetA with 5-FU, IRT or OXT was effective in the SNU-C5/OXT-R cells. The role of BetA on cancer cell death was induction of apoptosis through mitochondrial pathway. BetA alone or in combination with anticancer drugs worked in concert to induce activation of caspases and then apoptosis in some cell lines resistant to different anticancer drugs.
These findings indicate that utility of BetA as a chemosensitizer in chemotherapy may be a new strategy to enhance the efficacy of chemotherapy, which warrants further investigation.

Key Words: colon cancer, SNU-C5, betulinic acid, chemoresistance, apoptosis, chemosensitizer

서 론

식생활습관의 서구화, 비만, 음주 및 흡연 등에 의하여 한국인의 대장암 발생율은 과거 20 년 전에 비하여 급격하게 증가하여(Kim and Ahn, 2004), 남자의 경우 위암, 폐암, 간암에 이어 9.8%로 4위를 차지하고, 여자의 경우는 위암, 유방암에 이어 10.4%로 3위를 차지하고 있다 (Korea Cancer Center, 2006). 뿐만 아니라 대장암에 의한 암사망율도 급격하게 높아져 폐암, 위암, 간암에 이어 9.1%로 4위를 차지한다 (Korea Cancer Center, 2006; Korea National Statistical Office, 2006).

대장암은 비록 외과적 제거술로 완치가 가능하지만, 불행하게도 증례의 약 50%는 보조적 치료를 병행함에도 불구하고 결국 치료불가능한 전이병소를 만든다 (American Cancer Society, 2000). 따라서 1차 치료에 실패한 재발증례나, 원격전이가 발생한 증례를 효과적으로 처리하는 것은 대장암의 치료실패와 이에 따른 대장암 사망율을 낮출 수 있는 적절한 방법이 된다. 그러나 1차 화학약제 치료실패에 따른 내성의 발생은 치료용량의 증대나 새로운 복합약물치료 시도는 물론 치료기간의 연장을 필요하게 되지만, 아직까지 효율적인 치료방법을 제시하지 못하고 있는 실정이며 일부 시도도 많은 생물학적 위해(biological hazard)를 감수해야하는 처지이다. 따라서 효과적이며 보다 안전한 치료법의 개발이 절실한 상황이다.

5-Fluorouracil (5-FU)을 기초로 한 항암요법은 전이성 대장암 환자의 생존율을 높이고, 삶의 질을 개선하는 기본치료법으로 사용되어져 왔다 (Jonker et al., 2000). 그러나 전이성 대장암에 대한 5-FU의 반응율

(response rate)은 약 20%이다. 따라서 최근 수년전부터 전이성 대장암의 화학요법이 전통적인 fluoropyrimidine-modulated treatment로부터 irinotecan (IRT) 이나 oxaliplatin (OXT)과 같은 새로운 약제를 포함하는 적극적인 치료로 변화되고 있다 (Water & Cunningham, 2000).

Betulinic acid (BetA) [3β-hydroxy-lup-20(19)lupaen-28-carbonic acid] (Fig. 1)는 동아프리카 상록수 *Ziziphus mauritiana*에서 최초로 분리되었으며, 흰 자작나무에 풍부하다 (Pisha et al, 1995). 이는 악성 흑색종 세포주(Pisha et al, 1995; Liu et al., 2004)나 신경외배엽기원의 종양세포(Fulda et al., 1999)에 선택적인 세포자멸사(apoptosis) 유도효과가 있다.

화학요법을 포함한 대부분의 항암요법은 기본적으로 암세포의 자멸사 유도에 초점이 맞추어져 있기 때문에, 대부분의 항암치료내성은 자멸사 프로그램의 결함에 의하여 초래된다고 볼 수 있다 (Herr & Debatin, 2001; Johnstone et al., 2002). 따라서 화학약제내성(chemoresistance)을 극복하고/거나 화학약제의 세포독성(chemical cytotoxicity)을 증대시킬 수 있는 새로운 제제의 개발과 이들의 효율적인 병합법 개발이 강력히 요청된다.

이에 저자는 재발성 또는 전이성 대장암의 치료에 효과적인 것으로 알려진 5-FU, irinotecan, oxaliplatin에 내성을 갖는 세포주를 SNU-C5를 토대로 수립하고, 종양세포의 자멸사 유도효과가 있는 것으로 밝혀진 BetA의 내성 대장암 세포주에서의 효과를 검토하여 각종 항암제 내성 대장암의 치료에 적용이 가능한지를 평가하고자 한다.

재료 및 방법

1. 연구재료

가. 세포주 및 세포배양

SNU-C5 세포주(KCLB No. 0000C5, 한국세포주은행 분양)를 10% fetal bovine serum (GIBCO BRL)과 1X antibiotic-antimycotic (GIBCO BRL)이 포함된 RPMI 1640에 배양하였다. SNU-C5 세포주는 항암치료나 방사선 치료를 받은 적이 없는 대장의 저분화 선암종에서 수립되었다.
세포는 37℃, 5% CO_2 배양기에서 10 cm petri dish에 1.5 x 10^6 개의 세포 밀도가 유지되게 분주한 후 하룻밤 배양을 하여 약물처리를 하였다.

나. 항암제 내성 세포주 선별

항암제 5-FU, IRT 및 OXT는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. IC_{50} 농도의 5-FU (17.75 μM), IRT (0.83 μM), OXT (9.09 μM)를 각각 함유한 배양액에 SNU-C5 세포(wild type)를 배양하였다. 한 농도에서 약물을 3일간 투여 후 약물을 제거하여 며칠 또는 몇 주 배양한 후 confluent해지면 약물의 농도를 50%씩 증가시키는 방법으로 선별하여 IC_{50} 농도의 10배 이상 되는 약물이 존재하는 배지에서도 잘

자라는 내성 아세포주(chemoresistant sublines) SNU-C5/5FU-R, SNU-C5/IRT-R, SNU-C5/OXT-R를 각각 수립하였다. 내성 아세포주를 수립한 후 안정될 때까지 일주일에 두 번씩 최소 6개월 이상 계대 배양 후 실험에 사용하였다.
5-FU, IRT 및 OXT에 대한 SNU-C5 내성세포주 SNU-C5/5FU-R, SNU-C5/IRT-R과 SNU-C5/OXT-R를 대상으로 내성발생기전에 관여된 것으로 추정되는 인자들을 분석한 결과 SNU-C5/5FU-R의 경우 5-FU에 대한 대표적인 내성기전으로 작용하는 thymidylate synthetase가 증가되지 않았고 Pgp나 MRP와 같은 약물 수송체(drug transporter)의 변화는 없었으나, 이들 수송체의 기질 약물을 방출(efflux) 하는 것이 확인되어 Pgp나 MRP 이외의 수송체가 있을 가능성이 있었다. 다른 내성기전을 갖는 것으로 알려진 여러 다른 항암제에 대해서도 내성을 보여 확인 결과 NF-κB, AP-1 (c-Jun)의 증가 소견이 관찰되었다. 또한 SNU-C5/5FU-R과 SNU-C5/IRT-R의 경우 COX-2가 증가되어 있어 이의 작용에 의하여 내성에 일부 기여한 것으로 판단된다(Kim et al, 2005).

다. 시약

polyclonal rabbit anti-human Bcl-2, polyclonal anti-caspase-3, monoclonal mouse anti-bad는 Biosciences Pharmingen (San Diego, CA, USA)에서, cychloheximide, 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5- diphenyl tetrazolium bromide (MTT), propidium iodide, Hoechst 33342, monoclonal mouse anti-actin, 5-FU, irinotecan, oxaloplatin 및 betulinic acid는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서,

polyclonal anti-caspase-9, goat anti-rabbit IgG HRP, anti-mouse IgG HRP, ECL system은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구매하였다. 그리고 기타 세포배양에 필요한 시약은 GIBCO BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구매하였다.

2. 연구방법

가. 단백질 분리정제

5 x 10^5 개 정도의 세포를 100Ø T/C dish에 분주하고, 37℃, 5% CO_2 배양기에서 24시간 배양한 후 IC_{50} 농도의 항암제 또는 BetA, 그리고 IC_{30} 농도의 항암제 및 BetA 병합제를 각각 처리하고 12, 24 및 48 시간 배양하였다. 대조군은 배양액만 넣어주고 같은 시간 배양하였다. 각 시간대별로 trypsin/EDTA로 처리하여 세포를 수확하여 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)로 세척한 후 1X CHAPS 용해완충액 (10 mM Tris HCl, pH 7.5, 1nM $MgCl_2$ 1mM EDTA, 0.1 nM Benaxmidine, 5 mM β-mercaptoethanol, 0.5% CHAPS, 10% Glycerol) 200 μl로 처리하고 얼음위에서 30분간 방치한 후 12,000 rpm, 4℃에서 20분간 원심분리하여 상층액을 얻었다.

나. *Western blot* 분석

배양된 세포를 PBS로 씻고, 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 5 mM EGTA, 50 mM glycerophosphate, 20 mM NaF, 1 mM

Na_3VO_4, 2 mM PMSF, 10 μg/ml leupeptin 및 10 μg/ml aprotinin으로 용해시켜 원심분리한 후 단백질 양을 정량하였다. 동량의 단백질을 SDS-PAGE (15%)를 통하여 분리한 후 nitrocellulose 막에 옮겨 해당 항체를 이용하여 immunoblot을 시행하였다. 반응신호는 ECL system을 이용하여 측정하였다.

다. 세포독성 분석

배양세포의 생존율은 MTT assay를 이용하였다. 방법은 배양세포를 2 x 10^5 cells/ml의 농도로 RPMI 1640에 풀어 100 μl의 배양세포 현탁액을 96 well microplate에 넣어 하룻밤을 배양한 후 72시간 동안 세포를 해당약물에 노출시켰다. 그리고, MTT (0.5 mg/ml)와 함께 4시간동안 배양을 한 후 배지를 제거하고 150 μl dimethyl sulfoxide (DMSO)를 추가하여 formazan crystal을 잘 용해시켜 96-well microtiter plate reader VERSAmax (Molecular Device, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 약물을 처치한 well의 흡광도 값을 약물을 처치하지 않는 대조군 세포가 들어 있는 흡광도 값으로 나눈 다음 백분율로 나타내었다. Data는 각 실험당 3회 반복실험하여 평균값과 표준편차로 나타내었다.

라. *DNA* 분절*(fragmentation)* 분석

Wizard Genomic DNA purification kit (Promega, WI, USA)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 즉, 약물처리 후 떠있는 세포 및 달라붙은 세포 모두를 채취하여 RNase 용액이 첨가된 lysis buffer로 37℃에서 1시간

동안 세포용해를 시켰다. DNA를 에탄올로 하룻밤 침전시킨 후 함수용액에 넣었다. 10 μg의 DNA를 1.2% agarose gel에 분리시켜 DNA band 양상을 ethidium bromide로 20분간 염색을 한 후 자외선 투과기(UV illuminator)에서 판독하였다. 일정한 간격의 ladder signal이 관찰되면 세포자멸사를 의미하는 DNA 분절이 있다고 판정하였다.

마. 형태 분석

약물처리 후 세포를 PBS로 조심스럽게 3번 세척한 후 10% 중성 포르말린에 30분간 고정하였다. 다시 세포를 PBS로 세척한 후 propidium iodide (PI) 용액(50 μg/ml of propidium iodide; 100 μg/ml of RNase A)이나 Hoechst 33258로 염색을 하였다. 표본을 디지털 형광현미경(Leica DM 5000 B, Wetzlar, Germany)을 이용하여 세포핵 염색을 중점적으로 관찰하였다.

바. 통계학적 분석

통계학적 분석은 Student's t test 및 paired Student's t test (SigmaPlot 2001)를 이용하였으며, 통계학적 유의 수준은 $p<0.05$로 하였다.

결 과

*1. SNU-C5*의 항암제 및 *BetA* 감수성

본 실험에 사용된 SNU-C5 세포주의 항암제 감수성을 MTT 분석 결과를 토대로 검토하여 BetA와의 병합요법을 위한 IC_{30} 값을 구했는데, 5-FU: 6 μg/ml, IRT: 18 μg/ml, OXT: 100 μg/ml, BetA: 1 μg/ml 이었다 (Fig. 2).

SNU-C5에 대한 BetA와 항암제 병용시 각 항암제 IC_{30} 농도에서 BetA의 농도에 따른 효능을 비교하여 보면 그림 3과 같은데, 그림에서 확인되는 것과 같이 wild type 대장암세포주 SNU-C5에서는 BetA 단독의 효과보다 병합요법시 효능이 더 감소하였다($p<0.005$) (Fig. 3).

*2. SNU-C5/R*의 항암제 및 *BetA* 감수성

Wild type 대장암세포주 SNU-C5에서 5-FU, IRT, OXT를 투여하여 만든 화학약제 내성 대장암세포주 SNU-C5/5FU-R, SNU-C5/IRT-R, SNU-C5/OXT-R을 대상으로 BetA와 항암제 병용시 각 항암제 IC_{30} 농도에서 BetA의 농도에 따른 효능을 비교하여 보았다.

*1) SNU-C5/5FU-R*의 항암제 및 *BetA* 감수성

우선 SNU-C5/5FU-R 세포주의 경우 약제내성에 의하여 고농도의 5-FU를 처리하여도 세포사가 미미하게 일어나는 반면 IRT나 OXT에는

교차내성 없이 좋은 약효를 보이고 있는 것을 확인하였다 (Fig. 4). 그러나, SNU-C5/5FU-R에 IC_{30} 농도의 IRT (25 μg/ml), OXT (105 μg/ml)는 물론 5-FU (약제내성으로 인하여 IC_{30}에 도달하지 않아 250 μg/ml를 적용)를 BetA와 병용하거나 BetA 단독 투여시 유의하게 높은 (p<0.0001) 세포성장 억제율을 보였다. 더욱이 5-FU와 BetA를 병용한 경우보다 동일용량의 BetA 단독 투여의 경우 더 좋은 약효를 보였다 (Fig. 5).

2) SNU-C5/IRT-R의 항암제 및 BetA 감수성

SNU-C5/IRT-R 세포주의 경우 IRT는 물론 5-FU 및 OXT에도 심한 교차내성을 보였다. 그러나, SNU-C5 wild type에서의 IRT IC_{50} 농도의 약 2배인 100 μg/ml을 SNU-C5/IRT-R 세포주에 적용하였을 경우 IC_{50}에 도달할 수는 있었으나, 곧 정체기에 접어들었다 (Fig. 6).
그리고 SNU-C5/IRT-R에 IC_{30} 농도의 5-FU (135 μg/ml), IRT (22 μg/ml), OXT (250 μg/ml)를 BetA와 병용하거나 BetA 단독 투여시에도 유의한 세포성장 억제율 증가를 볼 수 없었다 (Fig. 7).

3) SNU-C5/OXT-R의 항암제 및 BetA 감수성

SNU-C5/OXT-R 세포주는 OXT에 심한 내성을 보여 IC_{30} 농도를 구할 수도 없었다. 뿐만 아니라 5-FU 및 IRT에도 교차내성을 보였다 (Fig. 8).
그러나 SNU-C5/OXT-R에 IC_{30} 농도의 5-FU (31.25 μg/ml), IRT (28 μg/ml), OXT (IC_{30} 농도를 구할 수 없어 500 μg/ml로 설정)를 BetA와 병용하거나 BetA 단독 투여에 따른 세포성장 억제율 변화를 비교관찰한 결과 모두 유의하게 세포성장 억제율 증가를 관찰할 수 있었다

(p<0.0005). 특히 OXT 처리의 경우 단독처리시 IC_{30} 농도를 구할 수도 없었는데 BetA와 병용투여시 뚜렷한 약효의 증가가 나타났다 (p<0.0001) (Fig. 9).
이와 같이 항암제 단독투여 시보다 BetA를 항암제와 병용투여하거나 BetA 단독 투여시 뚜렷한 항암효과의 개선이 나타났지만 그 효과가 SNU-C5/5FU-R에서의 뛰어난 효과와는 달리 IC_{50}에도 미치지 못하였다.

3. BetA의 세포자멸사 유도작용

SNU-C5 세포주에 BetA (0-10 μg/ml)를 처리한 후 24 시간과 48 시간 경과 후의 변화를 PI 염색과 Hoechst 염색을 한 후 디지털 형광현미경을 이용하여 비교하였다. 5 μg/ml을 투여 후 24 시간 경과시 관찰한 경우 세포사(cell death)는 관찰되지만 세포자멸사(apoptosis)는 일어나지 않았으나, 48 시간 경과시 관찰한 경우 많은 세포자멸사가 관찰되었다. 그리고, 이는 DNA 분절 검사에 의하여 세포자멸사임을 다시 확인 할 수 있었다. 10 μg/ml을 투여한 경우는 24 시간 경과시 더욱 증가된 세포자멸사를 확인할 수 있었으나, 48 시간 경과시는 세포 개체수의 감소 등으로 세포자멸사가 약간 감소하는 듯한 소견을 보였다 (Fig. 10).

4. SNU-C5에 BetA 처치시 caspases의 변화

BetA (5 μg/ml)를 wild type SNU-C5에 처리 후 시간경과에 따른 caspase-9과 -3의 변화를 관찰한 결과 caspase-9과 -3의 점차적인

감소와 cleaved caspase-3의 점차적인 증가가 관찰되었다 (Fig. 11). 이로서 BetA 투여시 SNU-C5 세포는 자멸사가 초래됨을 알 수 있었다.

*5. SNU-C5/R*에 항암제와 *BetA* 병용시 *Bcl-2*와 *Bad*의 변화

화학약제 내성 대장암세포주 SNU-C5/5FU-R, SNU-C5/IRT-R, SNU-C5/OXT-R을 대상으로 BetA와 항암제 병용시 Bcl-2와 Bad의 변화를 항암제 단독 투여시와 비교하였다.

1) SNU-C5/5FU-R 세포의 *Bcl-2*와 *Bad* 변화

SNU-C5/5FU-R 세포주에 IC_{30} 농도의 5-FU를 단독처리한 경우와 5-FU/BetA를 병합투여한 경우로 분류하여 시간 경과에 따른 Bcl-2와 Bad의 변화를 비교하였다. 그 결과 병합투여군에서 시간이 경과할수록 Bcl-2는 유의하게 감소하는 양상을 보였다($p<0.05$). 그러나 Bad는 약간 증가하는 소견을 보였으나 통계학적으로 유의하지 않았다(Fig. 12).

2) SNU-C5/IRT-R 세포의 *Bcl-2*와 *Bad* 변화

SNU-C5/IRT-R 세포주에 IC_{30} 농도의 IRT를 단독처리한 경우와 IRT/BetA를 병합투여한 경우로 분류하여 시간 경과에 따른 Bcl-2와 Bad의 변화를 비교하였다. 그 결과 Bcl-2 및 Bad 모두 병합투여군에서 시간이 경과할수록 감소하는 소견을 보였으나 Bad의 변화에서만 통계적 유의성이 확인되었다 ($p<0.05$) (Fig. 12).

3) SNU-C5/OXT-R 세포의 *Bcl-2*와 *Bad* 변화

SNU-C5/OXT-R 세포주에 IC_{30} 농도의 OXT를 단독처리한 경우와

OXT/BetA를 병합투여한 경우로 분류하여 시간 경과에 따른 Bcl-2와 Bad의 변화를 비교하였다. 그 결과 병합투여군에서 시간이 경과할수록 Bcl-2 는 점차 감소하는 반면 Bad는 점차 증가하는 소견을 보였는데 Bad의 변화에서만 통계적 유의성이 확인되었다 ($p<0.05$) (Fig. 12).

고 찰

최근 암 발생율이 급격하게 높아지면서 새로운 효과적인 치료약제의 개발이 더욱 절실히 요구되고 있다. 그러나 실제 임상에서 암의 화학요법이 실패하는 주된 이유는 항암제 자체의 효능에 기인하는 것보다 항암제에 대한 내성의 출현 때문인 경우가 많다. 매년 암 치료 실패로 사망하는 환자의 약 80%가 항암제에 대한 내성과 관련되어 있다는 사실은 새로운 항암제의 개발도 중요하지만 내성을 제어할 수 있는 방법을 개발하는 것이 더욱 시급함을 알 수 있다 (Ichihashi & Kitajima, 2001; Luqmani, 2005; Takara et al., 2006).

항암제에 대한 내성 양상은 매우 다양하다. 특히 한 항암제에 의하여 내성 암세포가 발생되면 다른 항암제에 대해서도 내성을 지닐 수 있기 때문에 어떤 내성기전이 관여하고 있는지를 정확하게 규명하는 것은 매우 중요하다. 어떤 항암제에 내성을 보이는 암 세포가 다른 여러 종류의 항암제에도 비슷한 내성을 보이는 현상을 다약물 내성이라 한다. 다약물 내성이 출현하면 처음의 항암제와는 구조적·기능적으로 전혀 무관한 다른 항암제에 대해서도 교차내성을 보일 수 있으므로 다른 항암제로 쉽게 대체할 수도 없어 임상적으로 치료제의 선별에 문제가 된다. 또한, 내성을 극복하기 위하여 더 많은 양의 항암제를 투여하면 독성을 초래할 뿐 아니라 내성기전을 더욱 더 자극할 위험이 높다 (Ichihashi & Kitajima, 2001; Schondorf et al., 2002; Schondorf et al., 2003; Luqmani, 2005).

다약물 내성의 출현은 항암제를 세포 밖으로 품어내는 배출펌프의 발현에 기인된 경우가 많다. 이외의 내성기전으로는 topoisomerase와 같은

항암제 표적 효소의 질적·양적변화, 글루타치온 대사의 변화, 세포사 관련 유전자의 변화 등이 보고되고 있다 (Riordan & Ling, 1979; Ling, 1987; Luqmani, 2005). 그러나 암의 종류와 항암제에 따라 다르기 때문에 내성기전을 정확하게 규명하는 것이 중요하다. 또한 지금까지 알려져 있는 내성기전으로는 설명할 수 없는 내성 암세포도 존재하기 때문에 새로운 내성 관련 인자를 발굴하기 위한 많은 노력이 진행 중이다. 왜냐하면 정확한 내성기전을 토대로 이에 적합한 내성억제법을 개발 적용하면 항암제에 대한 감수성을 증가시켜 효과적인 치료를 할 수 있을 것으로 기대되기 때문이다 (Sikic et al., 1997; Kaye, 1998; Keller et al., 2005; Bonhoure et al., 2006).

한국인의 경우 최근 20 여년간 식생활습관의 서구화, 비만 등으로 급격한 발생율과 사망율 증가세를 보이고 있어 관심이 집중되고 있는 암 중 하나가 대장암이다 (Kim & Ahn, 2004). 대장암의 일반적인 치료는 외과적 절제술이지만 약 50 % 정도가 치료가 곤란한 전이가 발생 된다 (American Cancer Society, 2000). 이때 환자의 생존율과 삶의 질을 개선 할 수 있는 방법으로 종양세포의 thymine 생합성을 억제하여 결국 DNA합성을 못한 세포는 증식능력을 상실하여 죽게 만드는 5-FU를 기초로 한 화학요법이 시행되어 오고 있다 (Jonker et al., 2000). 그러나 최근 IRT나 OXT 같은 새로운 약제가 개발되고 그 효능이 밝혀졌는데, IRT은 camptothecin의 반합성 유도물(semi-synthetic derivative)로서 topoisomerase I을 억제하며, 반응율은 약 15%인데 심각한 설사가 발생할 수 있다. 최근 이의 효율을 높이기 위한 5-FU 및 leucovorin과의 병합요법이 호응을 받고 있다.

OXT은 cisplatin이나 carboplatin과 같은 다른 백금(platinum) 제제와 작용기전이 유사하며 종양세포내에서 DNA의 guanine과 교차결합을 형

성하여 결국 DNA와 RNA의 합성을 억제한다. 일반적인 백금제제는 신장독성이나 청력손실 등의 부작용이 심각할 수 있고, SH group을 함유하는 화합물과도 결합할 수 있어 metallothionein이 유발되는 상황이나 glutathione이 상승하는 경우 약물에 대한 감수성이 떨어지게 된다. 하지만 oxaliplatin은 cisplatin 내성 대장암 세포주에 효과가 있을 뿐만 아니라 신장독성이 없고, 간독성도 거의 없다 (Raymond et al., 1997). 5-FU 치료에 실패한 대장암 환자를 대상으로 최근 5-FU에 leucovorin과 oxaliplatin을 병합치료하여 반응율을 높이는 좋은 결과들이 보고되고 있으나 여러 가지 약물부작용이 문제시되고 있다.

이와 같이 IRT이나 OXT과 같은 신약을 5-FU와 여러 방식으로 조합하여 난치성 대장암의 치료효율을 높이는 시도를 하고 있다 (Water & Cunningham, 2000). 그럼에도 불구하고 5-FU는 물론 새로운 약제인 IRT나 OXT도 이들 약제에 대한 내성이 대장암세포주인 SNU-C5에서 발생됨이 확인되어 결국 암치료의 궁극적 실패요인인 약물내성 문제에 봉착하게 된다.

여러 종류의 종양에서 보이는 치료약제에 대한 특발성(primary) 또는 속발성(acquired) 내성은 종양의 근본적인 치료에 어려움을 줄 뿐만 아니라, 치료실패의 주 요인이다. 이러한 약제내성의 문제를 해결하고, 궁극적으로 암환자의 생존율을 높이기 위한 최근의 각종 시도들은 복합약물요법을 개발하거나, 새로운 화학감작제를 발굴하여 새로운 조합의 약제를 투여함으로써 표적 종양세포의 내성을 줄이거나 없애는데 집중되고 있다 (de Gramont et al., 1997; Bae YZ et al., 2002).

최근 동아프리카의 *Ziziphus mauritiana*라는 상록수에서 처음 분리된 BetA는 pentacyclic triterpenoid로서 백 자작나무에 풍부하게 존재하는데(Pisha et al, 1995), 악성흑색종(Pisha et al, 1995; Liu et al.,

2004) 및 신경외배엽 기원의 종양세포(Fulda et al., 1999) 자멸사를 선택적으로 일으킨다고 알려져 있다. BetA에 의한 세포자멸사는 CD95와 같은 수용체/리간드 (receptor/ligand) 계통을 통하거나 p53이 관여되어 일어나는 것이 아니라(Fulda et al., 1997), 미토콘드리아 투과성의 감소(Fulda et al., 1998), 미토콘드리아내 cytochrome *c*의 세포질내 유리(Fulda and Debatin, 2000), 반응성 산소기(ROS) 형성이나 crm-A-insensitive caspase의 활성화 등을 통하여 일어난다 (Wick et al., 1999).

Fulda와 Debatin는 인체에 발생하는 각종 악성종양에 대한 기존 항암제의 세포 자멸사 유도효과가 BetA의 감작효과에 의하여 어떠한 영향을 받는가를 실험하였다 (Fulda and Debatin, et al., 2005). 연구결과에 따르면 medulloblastoma, glioblastoma 및 melanoma 세포주는 물론 신세포암(renal cell carcinoma)이 있는 환자에서 직접 배양한 세포 모두에서 doxorubicin, etoposide, Taxol 또는 actinomycin D에 BetA를 병합투여한 경우 농도 의존성(dose-dependent), 시간 의존성(time-dependent)으로 종양세포의 자멸사 유도가 현저하게 증가하였다. 그러나, 인체 섬유모세포를 대상으로 한 실험에서는 이러한 결과를 보이지 않아 약간의 종양 특이성이 있을 것이라 보고하였다.

본 실험에서 BetA를 wild type SNU-C5에 처리한 경우 시간 경과에 따라 caspase-9과 -3의 점차적인 감소와 cleaved caspase-3의 점차적인 증가가 세포자멸사 초래 증가와 함께 관찰되었는데, 이는 BetA가 미토콘드리아를 통해서 세포자멸사를 일으킴을 시사한다.

SNU-C5/R에 항암제와 BetA를 병행투여시 Bcl-2와 Bad의 변화를 비교 관찰한 결과 SNU-C5/5FU-R과 SNU-C5/OXT-R 세포에서는 BetA 병행투여 후 시간경과에 따라 Bcl-2는 감소하는 반면 Bad는 증가하였

으나, SNU-C5/IRT-R 세포에서는 Bcl-2 및 Bad 모두 감소하였다. 이러한 차이를 BetA의 유의한 효과가 없었던 SNU-C5/IRT-R 세포의 MTT 분석 결과와 비교하여 보면 Bad의 증감이 BetA에 의한 세포자멸사 증감에 중요한 역할을 담당하고 있음을 알 수 있다. 즉, BetA 투여 후 Bad의 유의한 증가는 세포자멸사의 증가를 초래하지만, Bad의 유의한 감소는 세포자멸사의 감소를 초래할 것으로 기대된다. 하지만 이와 관련된 충분한 세부적인 연구가 추가로 수행되어야 할 것으로 판단된다.

Kasperczyk 등(Kasperczyk et. al, 2005)의 연구에 따르면 인간 neuroblastoma 세포주 SHEP에서 BetA는 NF-κB 활성을 높여 결국 세포자멸사를 억제함이 확인되어 BetA와 병용하는 항암제가 NF-κB 억제제라면 항암제의 치료효과가 떨어지게 되므로 BetA의 사용이 금기되어야 한다.

한편 Fulda 등의 연구에 의하면 neuroblastoma 세포주 SHEP에서 BetA에 의한 세포 자멸사는 미토콘드리아의 transmembrane potential을 상실케 하고, permeability transition pore complex를 간섭하여 결국 미토콘드리아내의 세포 자멸사 관련인자들이 세포질내로 유리되고 caspase 분열과 각종 세포 자멸사 기작이 일어나 초래되는 것으로 보고하였다 (Fulda et al., 1998).

본 실험에서는 이와 같은 BetA의 세포 자멸사 유도기전에 관여하는 정확한 신호전달 체계 등에 대한 내용은 구체적으로 검증한 바 없으나, PI 염색, Hoechst 염색을 통한 세포 형태관측, DNA 분절검사 및 caspase-3 및 -9의 변화 비교, MTT 분석 등을 통하여 BetA가 wild type SNU-C5 및 항암제 내성 SNU-C5/R 세포주의 세포 자멸사를 일으킨다는 사실을 확인 할 수 있었다. 이와 같은 BetA의 세포 자멸사

유도 작용은 MTT 분석을 통하여 BetA의 농도변화에 따라 SNU-C5 및 SNU-C5/R 세포주의 성장억제율이 현저하게 증가되는 것을 알 수 있었다.

내성암세포주 SNU-C5/5FU-R, SNU-C5/IRT-R, SNU-C5/OXT-R에 대한 기존 항암제와 BetA의 병합효과를 보면 SNU-C5/5FU-R의 경우 5-FU에 심한 내성을 보이나 IRT 및 OXT에는 교차내성 없이 좋은 약효가 확인되었다. 그리고, BetA를 병합투여한 경우 IRT와 OXT는 물론 5-FU에서도 좋은 항암효과를 보였는데, 5-FU는 BetA와 병용하는 것보다 BetA를 단독으로 투여하는 것이 더 좋은 항암효과를 보였다.

SNU-C5/OXT-R는 OXT는 물론 5-FU와 IRT에도 교차내성이 관찰되었지만 BetA와 항암제를 병합투여하거나 BetA만 단독 투여한 경우 좋은 항암효과를 보였다. 특히 OXT 단독 투여시보다 OXT와 BetA를 병합투여한 경우 가장 뚜렷한 항암효과의 개선이 나타났다.

한편 SNU-C5/IRT-R의 경우는 IRT는 물론 5-FU와 OXT에도 심한 교차내성이 관찰되었고, BetA를 항암제와 병합투여시에도 유의한 항암효과 증가가 없었다. 이와 같이 SNU-C5/R 중에서 SNU-C5/IRT-R에 대한 경우를 제외하고 SNU-C5/5FU-R와 SNU-C5/OXT-R의 치료에 기존의 항암제에 BetA를 병합투여하거나 BetA를 단독투여할 경우 효과적으로 내성이나 교차내성을 해결할 수 있을 것으로 사료된다.

따라서, 이러한 BetA는 기존의 여러 항암제에 대한 내성발생시 일부 내성 암세포주에서 뛰어난 치료 감작효과가 확인되어 기존의 각종 항암제와 함께 BetA의 병합투여가 효과적일 것으로 기대되나, 다른 많은 종류의 인체 암에 대한 추가적인 BetA의 감작효과 실험 및 자료의 확립을 통한 효과 검증이 폭넓은 임상적용을 위하여 반드시 추가되어야 될 것으로 사료된다.

결 론

대장암의 화학요법에 가장 흔히 사용되는 약제인 5-FU, IRT, OXT에 대해 내성을 갖는 세포주를 SNU-C5를 토대로 제작하여 최근 세포사 유도작용이 밝혀진 BetA의 약제내성 극복효과를 비교 검토하였다.
BetA는 SNU-C5 세포의 미토콘드리아를 통한 caspase 계통에 작용하여 자멸사를 유도하며, 내성암 세포주에 내성유발 항암제와 BetA를 병합투여시 SNU-C5/5FU-R 및 SNU-C5/OXT-R 세포에서 좋은 항암효과를 보여 항암제 내성을 극복하기 위한 화학감작제로 사용될 수 있다고 판단된다. 그러나 SNU-C5/IRT-R 세포에서는 이와 같은 효과를 보이지 않아 일반적 적용보다는 각종 종양 및 약물에 따른 BetA의 작용 특이성을 밝혀 차이를 규명하는 등 면밀한 검토가 선행되어야 될 것으로 판단된다.

감사의 글

많은 분들의 격려와 가르침이 있었기에 무사히 학위과정을 마칠 수 있었으며 알찬 논문을 낼 수 있었습니다. 본 논문이 기초의학이나 임상의학에 조금이나마 도움이 되었으면 하는 것이 저자의 바램입니다.

먼저 저에게 많은 관심을 가지고 세심히 지도해주신 약리학교실의 최철희 교수님께 깊은 감사의 말씀을 드립니다. 또한 많은 조언과 도움을 주신 외과의 민영돈 교수님, 공대 응용화학소재공학과의 조 훈 교수님, 경북대 약리학교실의 김상현 교수님과 병리학교실의 임성철 교수님께 진심으로 감사드립니다.

실험을 하는데 정교한 실험기법이나 문제를 같이 해결해 주고 도와준 석사과정 최정은 선생님과 내성세포연구센터의 한송이교수님 및 이태범 실장님께 감사드립니다.

마지막으로 묵묵히 사랑으로 후원해준 나의 가족에게 감사드리고, 돌아가신 부모님의 영전에 본 박사학위논문을 바칩니다.

참고문헌

American Cancer Society: Cancer facts and figures-2000. Atlanta, GA, American Cancer Society, 2000.

Bae YZ, Jung JH, Moon CH, Kim SH, Kwon HC, Kim JS, Kim HJ. A phase II study of oxaliplatin combined with 5-fluorouracil and leucovorin (Mayo Clinic regimen) in 5-fluorouracil refractory colorectal cancer. Cancer Res Treat 34; 218-22, 2002.

Bonhoure E, Pchejetski D, Aouali N, Morjani H, Levade T, Kohama T, Cuvillier O. Overcoming MDR-associated chemoresistance in HL-60 acute myeloid leukemia cellsby targeting sphingosine kinase-1. Leukemia 20: 95-102, 2006.

de Gramont A, Vignoud J, Tournigand C, Louvet C, Andre T, Varette C, Raymond E, Moreau S, Le Bail N, Krulik M. Oxaliplatin with high- dose leucovorin and 5-fluorouracil 48-hour continuous infusion in pretreated metastatic colorectal cancer. Eur J Cancer 33; 214-9, 1997.

Fulda S, Debatin KM. Betulinic acid induces apoptosis through a direct effect on mitochondria in neuroectodermal tumors. Med Pediatr Oncol 35; 616-8, 2000.

Fulda S, Debatin KM. Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by betulinic acid. Neoplasia 7; 162-70, 2005.

Fulda S, Friesen C, Los M, Scaffidi C, Mier W, Benedict M, Nunez G, Krammer G, Peter ME, Debitin KM. Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-dependent apoptosis via activation of

caspase in neuroectodermal tumors. Cancer Res 57; 4956-64, 1997.

Fulda S, Jeremias I, Pietsch T, Debatin KM. Betulinic acid: a new chemotherapeutic agent in the treatment of neuroectodermal tumors. Klin Padiatr 211; 319-22, 1999.

Fulda S, Scaffidi C, Susin SA, Krammer G, Kroemer G, Peter ME, Debatin KM. Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptotic factors by betulinic acid. J Biol Chem 273; 33942-8, 1998.

Herr I, Debatin KM. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. Blood 98; 2603-14, 2001.

Ichihashi N, Kitajima Y. Chemotherapy induces or increases expression of multidrug resistance-associatedprotein in malignant melanoma cells. Br J Dermatol 144: 745-50, 2001.

Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. Cell 108; 153-64, 2002.

Jonker DJ, Maroun JA, Kocha W. Survival benefit of chemotherapy in metastatic colorectal cancer: A meta-analysis of randomised controlled trials. Br J Cancer 82; 1789-94, 2000.

Kasperczyk H, La Ferla-Bruhl K, Westhoff MA, Behrend L, Zwacka RM, Debatin KM, Fulda S. Betulinic acid as new activator of NF-kappaB: molecular mechanism and implications for cancer therapy. Oncogene 24; 6945-56, 2005.

Kaye SB. Multidrug resistance: clinical relevance in solid tumours

and strategies for circumvention. Curr Opin Oncol Suppl 1: S15-9, 1998.

Keller G, Schally AV, Nagy A, Halmos G, Baker B, Engel JB. Targeted chemotherapy with cytotoxic bombesin analogue AN-215 can overcome chemoresistance in experimental renal cell carcinomas. Cancer 104: 2266-74, 2005.

Kim DH, Ahn YO. Molecular epidemiology of colon cancer. Cancer Res Treat 36; 93-99, 2004.

Kim KJ, Min YD, Choi CH, Lee TB. The role of selective COX-2 blocker on the 5-FU, irinotecan and oxaliplatin resistant colon cancer cell lines. J Kor Soc Colpoproctol 21; 93, 2005.

Korea National Cancer Center: Cancer Death Rate-2004. Korea National Cancer Center, http://www.ncc.re.kr, 2006.

Korea National Cancer Center: Cancer Incidence 1999-2001. Korea National Cancer Center, http://www.ncc.re.kr, 2006.

Korea National Statistical Office; Annual Report of Causes of Death-2004. Korea National Statistical Office, http://nso.go.kr, 2006.

Ling V. Multidrug resistance and P-glycoprotein expression. Ann N Y Acad Sci 507: 7-8, 1987.

Liu WK, Ho JCK, Cheung FWK, Liu BPL, Ye WC, Che CT. Apoptotic activity of betulinic acid derivatives on murine melanoma B16 cell line. Eur J Pharmacol 498; 71-8, 2004.

Luqmani YA. Mechanisms of drug resistance in cancer

chemotherapy. Med Princ Pract 14 Suppl 1:35-48, 2005.

Pisha E, Chai H, Lee IS, Chagwedera TE, Farnsworth NR, Cordell GA, Beecher CW, Fong HH, Kinghorn AD, Brown DM, Wani MC, Wall ME, Hieken TJ, Das Gupta TK, Pezzuto JM. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. Nat Med 1; 1046-51, 1995.

Raymond E, Buquet-Fagot C, Djelloul S, Mester J, Cvitkovic E, Allain P, Louvet C, Gespach C. Antitumor activity of oxaliplatin in combination with 5-fluorouracil and the thymidylate synthase inhibitor AG337 in human colon, breast, and ovarian cancers. Anticancer Drugs 8; 876-85, 1997.

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 254: 12701-5, 1979.

Schondorf T, Kurbacher CM, Gohring UJ, Benz C, Becker M, Sartorius J, KolhagenH, Mallman P, Neumann R. Induction of MDR1-gene expression by antineoplastic agents in ovarian cancer cell lines. Anticancer Res 22: 2199-203, 2002.

Schondorf T, Neumann R, Benz C, Becker M, Riffelmann M, Gohring UJ, Sartorius J, von Konig CH, Breidenbach M, Valter MM, Hoopmann M, Di Nicolantonio F, KurbacherCM. Cisplatin, doxorubicin and paclitaxel induce mdr1 gene transcription in ovarian cancer cell lines. Recent Results Cancer Res. 161: 111-6, 2003.

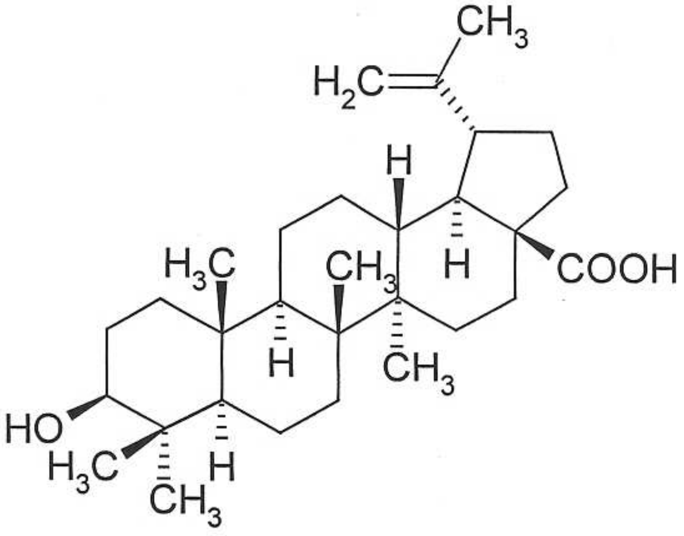
Sikic BI, Fisher GA, Lum BL, Halsey J, Beketic-Oreskovic L, Chen G. Modulation and prevention of multidrug resistance by inhibitors of P-glycoprotein. Cancer Chemother Pharmacol 40 Suppl:S13-9, 1997.

Takara K, Sakaeda T, Okumura K. An update on overcoming

MDR1-mediated multidrug resistance in cancer chemotherapy. Curr Pharm Des 12: 273-86, 2006.

Water J, Cunningham D. The changing face of chemotherapy in colorectal cancer. Br J Cancer 84; 1-7, 2000.

Wick W, Grimmel C, Wagenknecht B, Dichgans J, Weller M. Betulinic acid-induced apoptosis in glioma cells: a sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing. J Pharmacol Exp Ther 289; 1306-12, 1999.



$C_{30}H_{48}O_3$

Figure 1. Chemical structure of betulinic acid.

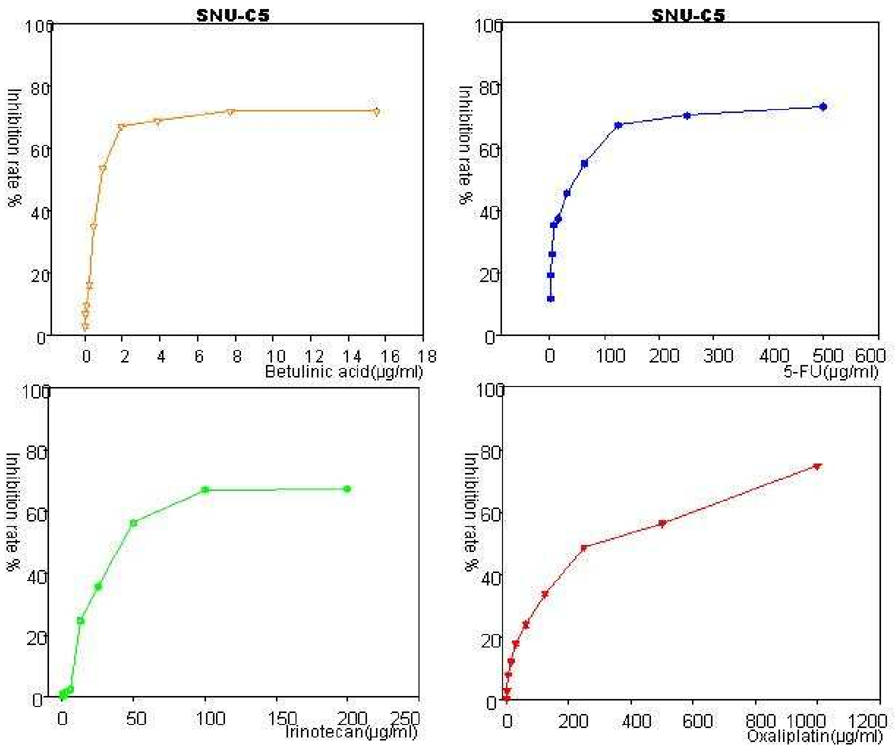


Figure 2. Cytotoxicity of betulinic acid, 5-FU, IRT, and OXT against SNU-C5/WT cells for 72 h. Cytotoxicity was determined using the MTT assay. Data shown are expressed as means ± standard deviation from three independent experiments.

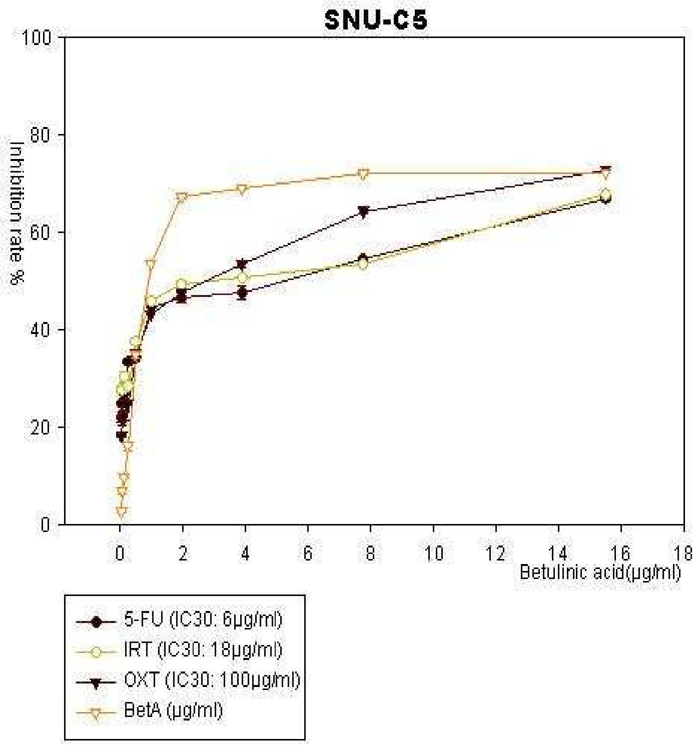


Figure 3. IC_{30} values of 5-FU, IRT, or OXT containing various concentrations of betulinic acid (BetA) against SNU-C5/WT cells for 72 h. Data are expressed as mean ± standard deviation from three independent experiments. SNU-C5/WT cells are more sensitive to the cytotoxicity of BetA alone.

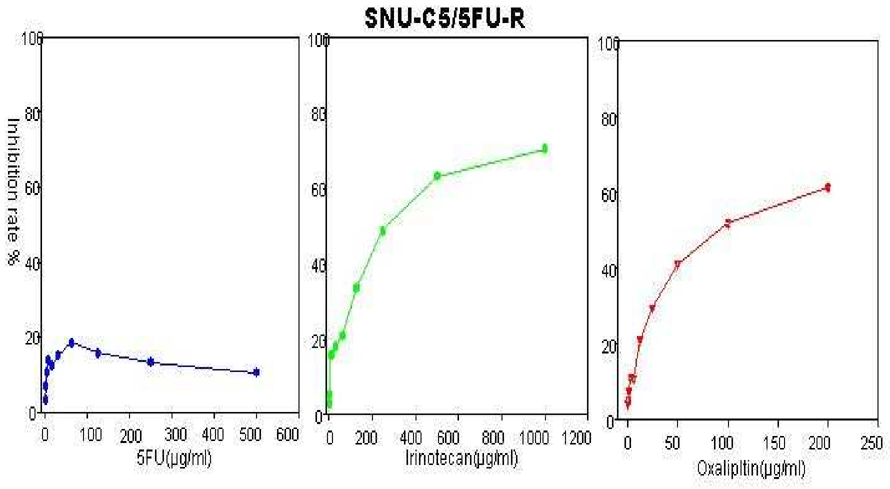


Figure 4. Cytotoxicity of 5-FU, IRT, and OXT on SNU-C5/5FU-R cells for 72 h. The data are means ± standard deviation (*n*=3). SNU-C5/5FU-R cells showed resistance against 5-FU, whereas it appears sensitivity against IRT and OXT.

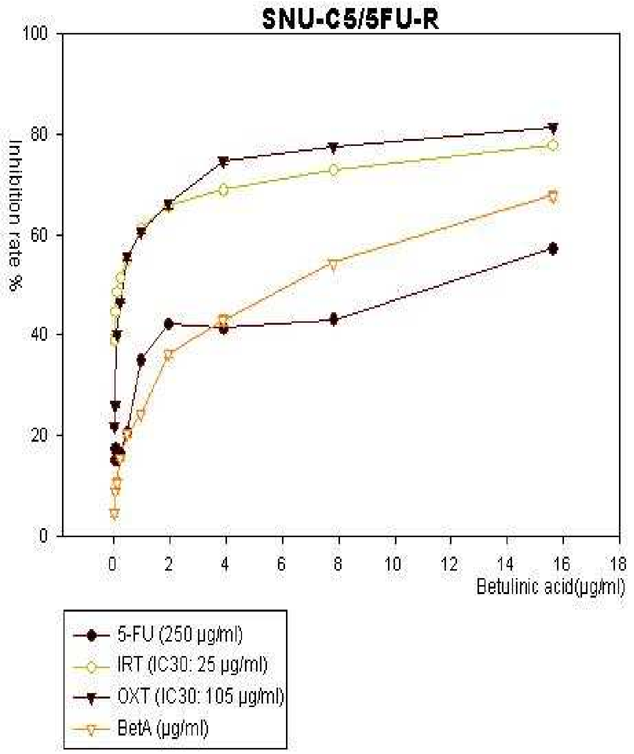


Figure 5. Cytotoxicity of IC_{30} of 5-FU, IRT, or OXT according to various concentrations of betulinic acid (BetA) on SNU-C5/5FU-R cells for 72 h. The data are means ± standard deviation (*n*=3). SNU-C5/5FU-R cells are more sensitive to the cytotoxicity of BetA alone or in combination with anti-cancer drugs than that of anti-cancer drug alone.

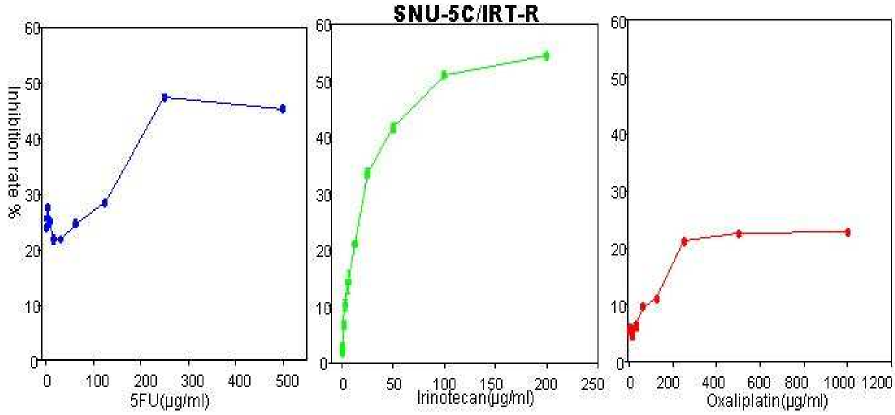


Figure 6. Cytotoxicity of 5-FU, IRT, and OXT on SNU-C5/IRT-R cells for 72 h. The data are means ± standard deviation (*n*=3). SNU-C5/IRT-R cells show resistance to 5-FU and OXT as well as IRT.

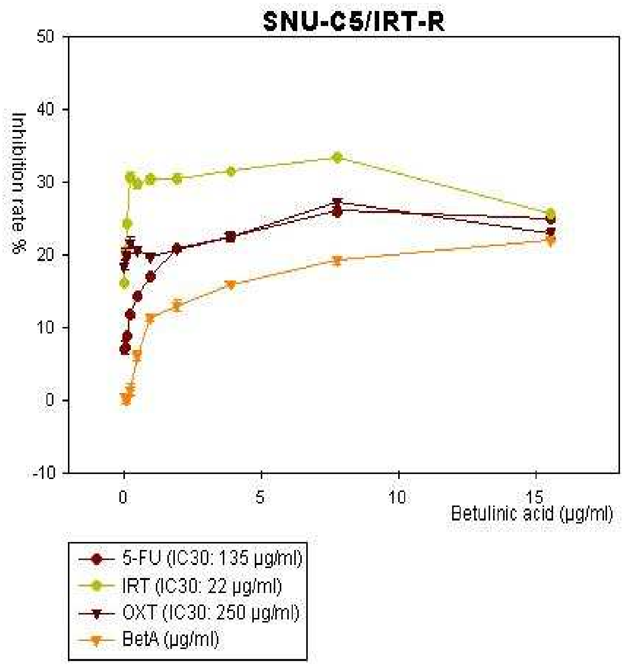


Figure 7. Cytotoxicity of IC_{30} of 5-FU, IRT, or OXT according to various concentrations of betulinic acid (BetA) on SNU-C5/IRT-R cells for 72 h. The data are means ± standard deviation (*n*=3). SNU-C5/IRT-R cells are resistant to combination of BetA and anti-cancer drugs as well as BetA alone.

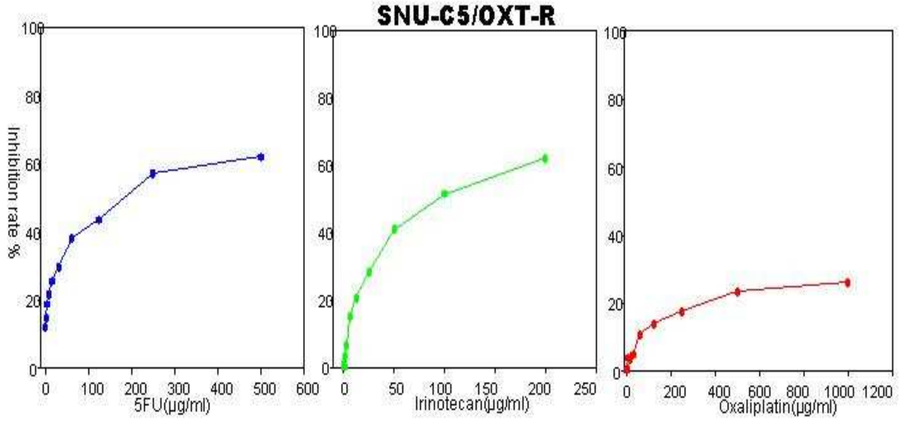


Figure 8. Cytotoxicity of 5-FU, IRT, and OXT on SNU-C5/OXT-R cells for 72 h. The data are means ± standard deviation (n=3). SNU-C5/OXT-R cells show resistance to 5-FU and IRT as well as OXT.

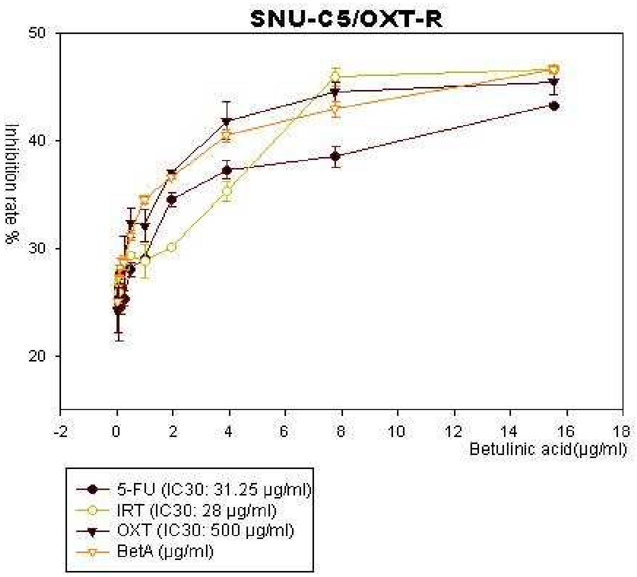


Figure 9. Cytotoxicity of IC_{30} of 5-FU, IRT, or OXT according to various concentrations of betulinic acid (BetA) on SNU-C5/OXT-R cells for 72 h. The data are means ± standard deviation (*n*=3). SNU-C5/OXT-R cells are more sensitive to the cytotoxicity of BetA alone or in combination with anti-cancer drugs than that of anti-cancer drug alone. However, their cytotoxicities never reach the IC_{50} value.

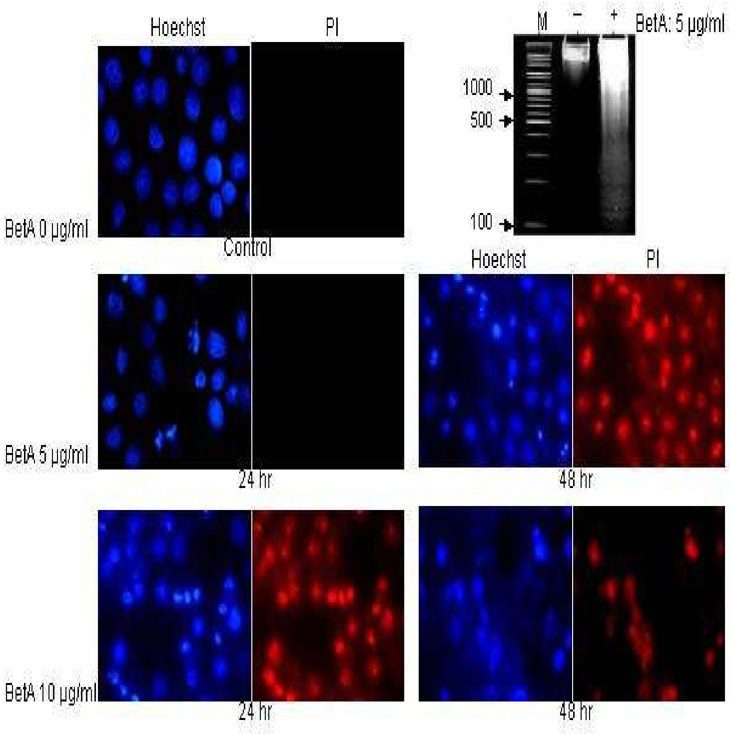


Figure 10. Fluorescence microscopy of SNU-C5/WT cells after treatment with betulinic acid (BetA) for 24 and 48 h. Hoechst staining and PI staining show apoptotic cell death in a time- and dose-dependent manner. Typical DNA ladder is prominent in SNU-C5/WT cells treated with BetA (5 µg/ml), but not in the cells not treated with BetA.

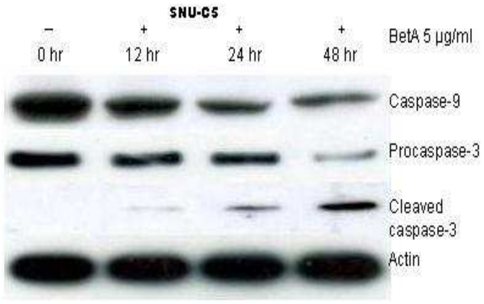


Figure 11. Western blot analysis of caspase-3 and -9 in SNU-C5/WT cells after treatment with betulinic acid (BetA) for 12, 24 and 48 h. BetA induces decrement of caspase-3 and -9 and increment of cleaved caspase-3 in a time-dependent manner. The data is representative of at least three independent experiments.

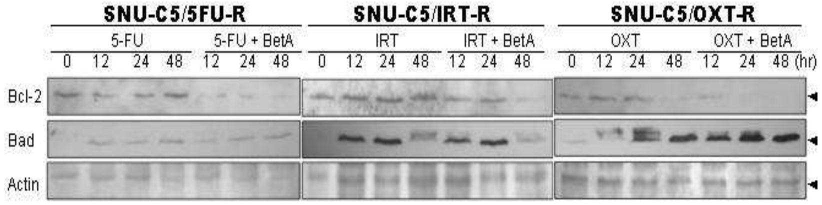


Figure 12. Western blot analysis of Bcl-2 and Bad in SNU-C5/5FU-R, SNU-C5/IRT-R, and SNU-C5/OXT-R cells after treatment with 5-FU alone or in combination wit BetA, IRT alone or in combination with BetA, and OXT alone or in combination with BetA for 12, 24 and 48 h, respectively. BetA induces decrement of Bcl-2 and increment of Bad in SNU-C5/5FU-R and SNU-C5/OXT-R cells, but decrement of the both in SNU-C5/IRT-R cells.

저작물 이용 허락서

학 과	의학과	학 번	20057461	과 정	박사학위과정
성 명	한글: 정권율　　한문: 丁權律　　영문: Jung, Kwon-Ryul				
주 소	광주광역시 동구 학동 금호베스티빌 101-605				
연락처	062-368-7572(직장), 062-236-2360 (자택), 011-625-3773				
논문제목	한글 : 항암제내성 대장암세포에 대한 betulinic acid의 치료상승효과 영문 : Synergistic effect of combined betulinic acid with anticancer drugs in anticancer drug-resistant colon cancer cells				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

-다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집・형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포・전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송・출력을 허락함.

2006년 12월 27일

저작자: 정 권 율(서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하