석 사 학 위 논 문

문주란(*Crinum asiaticum*)의 HL-60 세포 apoptosis 유도 효과 및 HL-60/MX2 세포 다약물내성 극복 효과

제주대학교 대학원
의 학 과

현 재 희

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2005년 12월

문주란(*Crinum asiaticum*)의 HL-60 세포 apoptosis 유도 효과 및 HL-60/MX2 세포의 다약물내성 극복 효과

지도교수 : 강 희 경

현 재 희

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함

2005년 12월

제주대학교 중앙도서관

현재희의 의학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 유 은 숙 (印)

위 원 박 덕 배 (印)

위 원 강 희 경 (印)

제주대학교 대학원

2005년 12월

The Effets of *Crinum asaticum* on the apoptosis induction in HL-60 and the reversal of multidrug resistance in HL-60/MX2

Jae-Hee Hyoun

(Supervised by Professor Hee-Kyoung Kang)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF MEDICINE

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

DEPARTMENT OF MEDICINE
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2005. 12

ABSTRACT

The present study investigated the antiproliferative and chemosensitizing effects of *Crinum asiaticum* var. japonicum, a plant distributed in Jeju island.

The 80 % methanol (MeOH) extract, chloroform ($CHCl_3$) fraction, and butanol (BuOH) fraction of the *C. asiaticum* inhibited the growth of HL-60 cells, human promyelocytic leukemia cells and HL-60/MX2 cells, mitoxantrone (MX) resistant HL-60 cells.

When the HL-60 and the HL-60/MX2 were treated with the $CHCl_3$ fraction and the BuOH fraction, DNA ladder and sub-G1 hypodiploid cells were observed. Furthermore, the $CHCl_3$ fraction and the BuOH fraction reduced Bcl-2 mRNA levels, whereas Bax mRNA level were increased. These results suggest that the inhibitory effects of *C. asiaticum* on the growth of the HL-60 and the HL-60/MX2 may arise from the induction of apoptosis.

Treatment of the HL-60/MX2 cells with the $CHCl_3$ fraction and the BuOH fraction resulted in marked decreases of the multidrug resistance protein (MRP) and breast resistance protein (BCRP) mRNA levels. In particular, the MX accumulation was increased in HL-60/MX2 cells when treated with the $CHCl_3$ fraction and the BuOH fraction. On the other hand, treatments with cyclosporin A, sulfinpyrazone and verapamil, which are competitive inhibitors of P-glycoprotein (P-gp), failed to suppress the accumulation of MX by *C. asiaticum*. From these results, the $CHCl_3$ fraction and the BuOH fraction of *C. asiaticum* seem to play pivotal roles as

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

chemosensitizing mediators.

Taken together, components of *C. asiaticum* might have a therapeutic potential for the treatment of human leukemia including MDR leukemia.

Key word: HL-60, HL-60/MX2, *Crinum asaticum*, apotosis, Bcl-2, bax, muiltidrug resistance(MDR), muiltidrug resistance (MRP), breast cance resistance protein (BCRP), mitoxantrone accumulation

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

목 차

ABSTRACT i

목 차 iii

LIST OF SCHEME v

LIST OF TABLES vi

LIST OF FIGURES vii

Ⅰ. 서 론 1

1. 연구배경

2. 연구목적

Ⅱ. 재료 및 방법 7

1. 문주란의 추출물 및 용매 분획물 제조

2. 세포 배양

3. 세포독성 실험

4. Analysis for DNA fragmentation

5. Cell cycle analysis

6. RNA extraction

7. RT-PCR analysis

8. MX accumulation

Ⅲ. 결 과 13

1. 문주란의 세포 증식 억제 효과

2. 문주란의 HL-60 세포 apoptosis 유도 효과

3. 문주란의 HL-60/MX2 세포 다약물 내성 극복 효과

3.1 문주란의 HL-60/MX2 세포 apoptosis 유도 효과

제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

3.2 문주란의 HL-60/MX2 세포 다약물내성 조절제 효과

Ⅳ. 고 찰 29
Ⅴ. 참 고 문 헌 32

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

LIST OF SCHEME

Scheme 1. Procedure for solvent extraction of *Crinum asiaticum* 11

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

LIST OF TABLES

Table 1. The sequences of primers and the expected sizes of the RT-PCR products 12

Table 2. PCR conditions of Bcl-2, Bax, MDR1, MRP, BCRP and β_2-MG .. 12

Table 3. Inhibitory effects of the 80 % MeOH extract or several solvent fractions from *C. asiaticum* on the growth of HL-60 cells and HL-60/MX2 cells 16

Table 4. Inhibitory effects of the 80 % MeOH extract or several solvent fractions from *C. asiaticum* on the growth of HEL-299 cells 17

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

LIST OF FIGURES

Figure 1. DNA fragmentation by the 80 % MeOH extract or several solvent fractions from *C. asiaticum* in HL-60 cells 18

Figure 2. The degree of apoptosis represented as the DNA content measured by flow cytometric analysis in HL-60 cells 19

Figure 3. RT-PCR analysis of Bcl-2 and Bax expression in the HL-60 cells treated with several solvent fractions from *C. asiaticum* 20

Figure 4. DNA fragmentation by the 80 % MeOH extract or several solvent fractions from *C. asiaticum* in HL-60/MX2 cells 21

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 5. The degree of apoptosis represented as the DNA content measured by flow cytometric analysis in HL-60/MX2 cells 22

Figure 6. RT-PCR analysis of Bcl-2 and Bax expression in the HL-60/MX2 cells treated with 80 % MeOH extract or several solvent fractions from *C. asiaticum* 23

Figure 7. RT-PCR analysis of MDR-1, MRP and BCRP expression in the HL-60/MX2 cells treated with 80% MeOH extract or several solvent fractions from *C. asiaticum* 24

Figure 8. Flow cytometry analysis of mitoxantrone accumulation by the 80% MeOH extract or several solvent fractions from *C. asiaticum* in

HL-60/MX2 cells 25

Figure 9. Flow cytometry analysis of mitoxantrone accumulation by and the 80 % MeOH extract or several solvent fractions of *C. asiaticum* in HL-60/MX2 cells 26

Figure 10. Flow cytometry analysis of mitoxantrone accumulation by Sulfinpyrazon and the 80% MeOH extract or several solvent fractions of *C. asiaticum* in HL-60/MX2 cells 27

Figure 11. Flow cytometry analysis of mitoxantrone accumulation by verapamil and the 80% MeOH extract or several solvent fractions of *C. asiaticum* in HL-60/MX2 cells 28

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅰ. 서 론

1. 연구배경

암의 예방, 진단 및 치료법을 개발하기 위하여 암의 발생 기전을 비롯한 세포와 유전자 차원의 연구가 광범위하게 진행되고 있다. 하지만 급속히 발전하는 연구기법에도 불구하고 암은 한국인의 5대 사망원인 중 약 46 %로 1위를 차지한다(보건복지부, 2004). 작년 한해 암으로 인한 사망자 수는 전체 사망자수의 약 26 %에 해당하는 6만 5천여 명에 달하고 매해 지속적으로 증가하는 추세이다(통계청, 2004). 암 환자 중 방사선치료가 용이하지 않거나, 이미 암이 전이된 환자들은 (전체 암 환자의 약 50 %) 주로 화학요법으로 치료한다. 대부분의 항암제는 일반 세포의 대사작용을 저해하지 않는 농도에서 apoptosis 과정을 유도, 활성화시키는 역할을 한다. Apoptosis는 cell death의 신호에 반응하여 일어나는 능동적인 과정으로 기존의 항암요법에 의한 암치료의 성공여부도 항암제 자체에 의한 암세포의 살해 능력보다 암세포에서 apoptosis가 잘 일어나도록 자극하는 능력에 의해 치료 효과가 좌우된다. 많은 항암제들이 효과적인 치료제로 사용되고 있지만 새롭게 대두되고 있는 문제점은 항암제에 대한 암세포의 내성 (resistance)이다(Tsuruo *et al.*, 1984). 항암제에 대한 내성은 장기적인 항암제 사용으로 약물에 노출된 세포들이 약물의 세포 내 축적을 감소시키거나(Shen *et al.*, 1986 ; Shen *et al.*, 2000 ; Gottesman *et al.*, 2002), 해독 작용 또는 배출을 활성화하거나(Schuetz *et al.*, 1996 ; Goto *et al.*, 2002), 표적이 되는 단백질을 변형(Urasaki *et al.*, 2001)시키는 등의 여러 가지 기전을 통하여 일어나게 된다. 이러한 과정은 암 치료에 가장 큰 장애 요소 일 뿐만 아니라 치료의 실패와도 깊은 관련이 있다(강, 1996). 약물에 대한 내성에 관여하는 기전은 다양하며, 그 중에서도 다약물내성(MDR ; Multidrug Resistance)이 중요한 부분을 차지하고 있다(Brooks *et al.*, 2003).

최근까지 주로 연구되어지고 있는 다약물 내성 관련 인자는 ATP-binding cassette (ABC) 약물 수송단백의 과발현에 의해 발생한다(Gottesman, 2002). ATP를 이용하여 능동적으로 약물을 수송하는 ABC 약물수송단백에는 P-glycoprotein (P-gp), multidrug resistance-associated protein (MRP), breast cancer resistance protein (BCRP)등이 보고 되었다(Kartner, 1983 ; Cole, 1992 ;

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Scheper, 1993 ; Ramachandran, 1997; Ross, 1998). 이들 단백은 혈액 종양 및 많은 고형 종양에서 항암제 내성과 관련되어 있으며, 항암제에 대한 반응도를 예측할 수 있는 지표 또는 예후와도 관련이 있는 것으로 알려지고 있다(Chevillard, 1996). 내성이 생기는 대부분의 항암제들은 치료 초기에는 효과가 있으나 곧이어 내성이 출현하게 되고 결국 화학요법이 실패하는 결과를 초래하는데, 이러한 문제점을 극복하기 위한 방법으로 내성기전을 우회할 수 있는 항암제를 사용하거나, 항암제에 대한 감수성을 증가시킬 수 있는 약물을 개발하려는 노력들이 이루어지고 있다(Consoli *et al.*, 1996 ; Perez-Soler *et al.*, 1997 ; Mazel *et al.*, 2001).

1-1. Apoptosis (programmed cell death)

수동적 세포사인 necrosis와는 달리 능동적 세포사인 apoptosis는 세포의 형태상 구별되는 'programmed cell death'로서 세포의 성장 (development) 및 항상성 (homeostasis)에 중요한 역할을 하고 있다(Cohen. 1993). 그 형태학적 특징으로는 세포가 수축하고, 핵 염색질이 농축되며, DNA가 잘려서 분절을 만들고, 핵막과 세포질 막에 소포가 생긴다. 핵은 농축된 핵 염색질이 핵막으로 편재된 뒤 분절(fragmentation)되어 세포 표면으로 돌출 되어 떨어져 나가게 되는데 이때 독립된 마상구조물인 고사체(apoptotic body)를 형성하고 고사체를 주위 세포 혹은 탐식 세포에 의해 탐식되어 소멸되는 과정을 밟는다(Duvall *et al.*, 1984 ; Willie, 1980 ; Arends *et al.*, 1990). DNA의 분절현상은 세포가 apoptosis로 들어가는 원인이 되는데 chromatin을 nucleosome으로 절단하기 위해 endonuclease를 생산하여 DNA를 분해하며, 이러한 현상은 ladder형태로 agarose gel에서 180bp의 특징적인 DNA 분절로 증명될 수 있다(Robaye *et al.*, 1991).

- Bcl-2 family

Bcl-2 family는 미토콘드리아로부터 apoptosis 동안에 중요한 사건이라고 여겨지는 AIF (apoptosis induce factor)와 cytochrome C의 방출을 방해함으로써 apoptosis를 방지한다. Bcl-2 family는 apoptosis를 억제하는 것과 촉진하는 집단으로 나눌 수 있는데 bcl-2나 bcl-xL은 apoptosis를 억제하며 Bax, Bcl-xS등은 촉진하는 작용을 한다. 특히 세포 사멸을 촉진하는 여러 가지 조건 아래서도 세포가 지속적으로 생존하는 것으로 봐서 bcl-2가 세포 생존에 중요한 역할을 한다고 판단하였고, 이어서 bcl-2의 역할이 세포의 apoptosis를 억제하기 때문이라는

것이 증명 되었다(Silkworth *et al.*, 1986). 그 이후 bcl-2가 과도하게 발현되면 apoptosis가 억제된다는 연구 결과들이 많이 제시되고 있다(Sumantran *et al.*, 1995). Bcl-2 자체의 활성도는 bax 에 의해서 조절되는 것으로 보이는데, bax는 bcl-2와 광범위한 아미노산 서열이 일치하고 있다(Farzandh *et al.*, 1982). 또한 bax는 homodimer로 존재하고 생체 내에서 bcl-2와 heterodimer를 형성할 수 있다는 것이 밝혀졌다. bcl-2와 bax는 death-repressing activity를 상쇄할 수 있는 능력을 갖고 있다. Bcl-2 family는 아미노산 서열상으로 매우 유사한 도메인을 가지고 있고 Bax 는 BH1, BH2, BH3을 가지고 있다는 점에서 Bcl-2와 매우 비슷하다(Annette *et al.,* 1996).

1-2. 다약물 내성 (Multidrug resistance, MDR)

다약물 내성은 사용 중인 항암제뿐만 아니라 구조나 기능이 전혀 다른 다양한 항암제에도 내성을 보이는 현상을 말한다(Biedler *et al.*, 1975 ; Gottesman, 2002). 실제 암 환자에 화학요법을 시도할 때 한 가지 항암제가 효력을 발휘하지 못 하는 경우에 이후 다른 항암제에 대해서도 내성을 보이는 사례가 빈번하며, 초기 치료 시 작용기전이 다른 여러 종류의 항암제를 동시에 투여하는 복합화학요법을 시도했음에도 불구하고 치료효과가 없는 현상을 자주 관찰 할 수 있다. 이로 인하여 사용 가능한 항암제의 범위가 매우 제한되는 것은 암의 화학요법에 있어서 중요한 문제점으로 지적되고 있다(Fojo *et al.*, 1987). 다약물 내성에 관련되는 항암제로는 doxorubicin과 daunomycin등의 anthracycline계 약물, vincristine와 vinblastine등의 vinca alkaloid계 약물, etoposide등의 epipodophyllotoxins계 약물 및 actinomycin D, taxol등의 항암제가 있으며 여러 종류의 서로 다른 항암제 간에는 교차내성 (cross-resistance)이 존재한다(Beck *et al.*, 1997 ; Raderer *et al.*, 1993 ; Sonneveld *et al.*, 1997).

1-2-1. ATP-binding cassette transpoter (ABC transporter)

ABC transporter의 작용은 아직 확실하게 알려져 있지는 않지만 종양 뿐 아니라 정상조직인 소장, 대장, 간장, 췌장 등의 소화기계, 신장, 부신, 뇌와 고환 등의 상피세포, 내피세포, 세포막에도 일정하게 발현하고 있다(Fojo *et al.*, 1987). 이와 같은 ABC transporter의 분포로 볼 때 물질의 흡수와 배설에 관여하고 있는 것으로 보인다.

① P-glycoprotein (P-gp)

P-glycoprotein 유전자에 대한 cDNA의 염기서열 순서가 규명됨에 따라 다약물내성과 관련된 MDR1 (mdr1) 유전자의 존재가 밝혀지게 되었다(Gros *et al.*, 1986). MDR1 유전자의 mRNA는 정상조직 즉 위, 소장, 대장, 담관, 신장, 부신, 간 등의 분비기능 상피세포에도 다량으로 존재하며, 정상적으로 발현이 많이 일어나는 조직에서 발생한 암의 경우 더 높게 발현된다(Noonter *et al.,* 1997). P-gp는 1,280개의 아미노산으로 구성되어 170 kDa의 분자량을 갖는 세포막 단백으로(Chen *et al.*, 1986 ; Gerlach *et al.*, 1986 ; McGrath *et al.*, 1989) 12개의 transmembrane region과 2개의 ATP-binding sites를 갖는다(Kartalou and Essigmann, 2001). 또한 P-gp는 약물을 수송하는 배출 펌프로 ATP를 에너지로 이용하여 anthracyclines, vinca alkaloids, adriamycin, topoisomerase Ⅱ inhibitor와 같은 치료 약물을 포함한 세포 독성 물질들을 세포 밖으로 배출하여 세포 내 약물의 축적을 줄인다(Ling and Thompson, 1974 ; Skovsgaard, 1978 ; Riordan *et al.*, 1985 ; Gerlach *et al.*, 1986 ; Gottesman and Pastan, 1993 ; Sen, 1987). P-gp 발현 세포들은 서로 다른 약물에 대한 교차 내성을 보인다(Kartner *et al.*, 1983). 각종 암에서 발견된 P-gp의 과발현은 치료실패의 중요한 요인으로 지적되고 있으며, 일부 암에서는 이들의 과발현이 치료결과 및 예후를 예측하는 인자로 제시 되었다(Salmon, 1989).

감수성 암세포에 비해 다약물내성을 보이는 암세포들의 세포막과 세포질에 더 많은 양의 칼슘이 함유되어 있다는 사실에 근거하여 칼슘통로 차단제인 verapamil을 사용한 결과, 약제배출과정이 억제되고 다약물내성을 극복할 수 있었다고 보고하였다(Bradshaw *et al.*, 1999 ; Safe *et al.*, 1978). verapamil 이외에도 cyclosporin A (CsA), sulfinpyrazone(Sul), calmodulin, phenothiazine, quinine, tamoxifen 등이 다약물내성의 극복을 위하여 현재 사용되고 있다(Ross et al., 1993).

② Multidrug resistance associated protein (MRP)

Cole등은 H69AR 폐암 세포주에서 다약물내성 관련 단백 (MRP)을 non-Pgp 매개성 다약물 내성의 기전으로 보고하였다(Cole, 1992). MRP는 1,531개의 아미노산으로 구성되어 있으며 190 kDa의 분자량을 갖는 세포막 단백질로

anthracyclines, vinca alkaloids, topoisomerase inhibitor 등에 교차 내성을 보이는 것으로 알려져 있다(Sonneveld *et al*, 1997). P-gp와 같이 ATP-binding cassette superfamily에 속하며(Schneider, 1994 ; Krishnamachay, 1993), 거의 모든 정상 조직에서 낮게 발현되는데 P-gp와는 달리 조직에 따른 뚜렷한 발현의 차이는 없어 정상적인 기능을 추정하기가 어렵다(Abbaszadegan, 1994 ; Nooter, 1997 ; Endo, 1996). 이후 만성 림프구성백혈병, 폐암, 식도암, 급성 골수성 백혈병등의 여러 가지 서로 다른 종양 세포에서 MRP의 과발현이 보고되었다(Zaman, 1993 ; Schneider, 1994).

③ Breast cancer resistance protein (BCRP)

BCRP는 MDR1이나 MRP가 없는 doxorubicin에 내성을 나타내는 MCF-7 AdVp3000 유방암 세포에서 분리되었다(Doyle. 1998). 또한 BCRP는 태반, 소장, 유방, 간, 조혈모세포 등에서 발현되어 mitoxantrone, anthracycline, methotrexate, topoisomerase I inhibitor 등의 약물들을 수송한다(Scheffer, 2000). BCRP의 억제제인 GF120918은 topotecan과 mitoxantrone의 생체이용률을 증가시킬 수 있고, 곰팡이 독인 fumitremorgin C(FTC)는 BCRP의 강력한 억제제이나 신경독성 때문에 in vivo 사용이 제한을 받아왔다. 최근에 FTC의 tetracyclic analogue인 Ko143이 현재까지 보고된 것 중에서 가장 강력하고 독성이 적은 것으로 알려지고 있다(Jonker *et al.*, 2000 ; Rabindran *et al.*, 2000 ; Allen *et al.*, 2002).

1-2-2. 화학감작제 (Chemosensitizer)

암의 화학요법 중에 다약물내성이 나타난 경우 내성을 극복할 정도로 많은 용량의 약물을 투여한다 하더라도 효과가 떨어질 뿐 아니라 독성만 초래하고 내성기전을 더욱 자극하는 결과를 초래할 수 있다. 이때 내성을 극복할 수 있는 방법은 내성을 억제하는 물질과 항암제를 동시에 투여하는 경우이다. 이러한 내성 억제물질은 항암제에 대한 내성을 역전하여 결과적으로 항암제에 대해 감수성을 보이도록 감작한다고 하여 화학감작제 (chemosensitizer)라고 하며 다약물내성 조절제(MDR modulator), 다약물내성 역전제 (MDR reverter)등으로도 불린다(최, 2002).

Cyclosporin A, verapamil 등은 자신이 가지고 있는 고유한 약리작용과는 무관

하게 P-gp의 경쟁적인 기질로 작용하여 내성을 억제한다(Tsuruo *et al.*, 1981 ; Slater *et al.*, 1986). 하지만 그 약물이 가지고 있는 고유한 약리작용과 부작용 등의 문제가 제기되어 새로운 화학감작제의 개발이 필요한 실정이다(Ferte *et al.*, 1999).

1-3. *Crinum asiaticum var. japonicum* (문주란)

본 연구에 사용된 문주란은 문주란속 (*Crinum*)의 수선화과에 속하며 열대와 아열대에 약 130여종이 분포되어있다(Dahlgren, 1985). 우리나라에는 하나의 변종인 문주란 (*Crinum asiaticum var. japonicum*)이 천연기념물 제19호로 지정·보호되고 있으며,제주도 토끼섬 주변의 모래밭을 따라 군락을 형성하고 있다. 형태학적 특성으로는 상록다년초로서 기둥모양의 근경이 있으며 비늘줄기의 밑동에서 굵은 수염뿌리가 많이 나오고 전체 키는 약 50 ㎝이다. 흰색의 꽃이 7~8월에 잎 사이에 70 ㎝ 내외의 꽃줄기에서 산형화서를 이루며 좋은 향기가 난다. 화관은 통이 길고 화관 끝이 깊게 갈라져있으며 수술은 화관의 목에 붙어있다. 자방은 3실로 이루어져 하위에 위치하고 열매는 삭과로서 일정하지 않게 갈라진다(박, 2000).

제주대학교 중앙도서관

Winiger(Winiger, 1995)등이 Amarylidaceae에 속한 알칼로이드들에 대하여 한 종류의 murine non-tumoral cell line (LMTK)과 두 종류의 humantumoral cell line (Molt4 lymphoid cell, HepG2 hepatoma)에 대한 세포독성을 측정하여 Pretazettine의 세포독성을 확인한 바 있으며 또한 문주란속에서 분리된 flavan의 Molt4 lymphoid cell에 대한 세포독성도 보고되었다(AbdElHagiz, 1991).

2. 연구목적

본 연구는 수선화과에 속하는 문주란의 급성 전골수성 백혈병 세포인 HL-60와 이를 모세포로하면서 혈액암에 효과적으로 실제 많이 사용되고 있는 항암제 mitixantrone(MX)에 내성을 지니고 있는 HL-60/MX2 세포에서의 apoptosis 유도 효과와 다약물내성 감작제로의 효능을 알아보았다. 우선, 문주란에 의한 HL-60와 HL-60/MX2 세포의 증식 억제 효과를 확인하였다. 문주란에 의한 HL-60 세포 증식 억제 효과가 apoptosis 유도에 의한 것인지 DNA 분절 및 DNA content 변화를 알아보았으며, apoptosis 유도 신호전달 기전에 중요한 Bcl-2와 Bax의 발현 양상을 조사하였다. 또한 문주란이 다약물내성 감작 효능을

나타내는지, HL-60/MX2 세포를 이용하여 내성 기전에 관여하는 MDR1, MRP 및 BCRP의 발현 변화 및 세포내 MX 축적을 증가시키는 효과를 조사하였다. 이러한 실험 결과로 문주란을 부작용이 적고 효과가 강력한 항암제와 다약물내성 감작제로 사용 가능한 근거를 제시하고자 하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 문주란의 추출물 및 용매 분획물 제조

본 연구에 사용된 재료는 제주도에서 자생하는 문주란 (*Crinum asiaticum*)으로 2004년 북제주군 구좌읍 하도리 일대에서 채취하였다. 채취한 문주란을 실내에서 통풍 건조한 후 분쇄기로 갈고, 미쇄분말 100 g을 취하여 중량의 10배에 해당하는 80 % methanol을 가한 후 상온에서 3일 동안 교반하였으며, 진공여과를 통해 상층액을 회수하였다. 이 과정을 3회 반복하여 모은 상층액을 감압 농축법을 이용하여 문주란 80 % MeOH 추출물 20 g을 얻었다. 80 % MeOH 추출물은 용매의 극성을 증가시키는 계통 분획법에 따라 증류수 1 L에 현탁시키고 hexane 1 L씩 3회 분배 추출하여 감압농축 후 hexane 분획 497 ㎎을 얻고, 잔여 수층에 chloroform 1 L를 부어 상기와 동일한 방법으로 추출하여 $CHCl_3$ 분획 162 ㎎을 얻고, 이상과 같은 방법으로 EtOAc 분획 200 ㎎, BuOH 분획 1.16 g, H_2O 분획 4.8 g을 얻었다. 각각의 분획물은 phosphate-buffered saline (PBS) 또는 ethanol에 용해시킨 후 원하는 농도에 따라 실험용 배지로 희석하여 사용하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2. 세포 배양

HL-60 (human promyelocytic leukemia) 세포는 한국 세포주 은행 (Korea Cell Line Bank)으로부터 분양 받아 실험에 사용하였고, HL-60/MX2 (mitoxantrone resistant human promyelocytic leukemia) 세포는 ATCC (American Type Culture Collection)로부터 분양받았다. HL-60/MX2 세포는 HL-60 세포 (ATCC CCL-240)를 모세포로 하여 항암제 mitoxantrone (MX)에 의해 내성이 유도된 세포로 최대 190 nM MX 농도에서까지 세포 성장이 가능하며 etoposide, teniposide, daunorubicin 및 doxorubicin 등에 교차내성을 나타낸다. 각각의 세포는 100 units/㎖의 penicillin-streptomycin (GIBCO Inc, NY, USA)과 10 % heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; GIBCO Inc, NY, USA)이 함유된 RPMI 1640 배지를 사용하여 37℃, 5% CO_2 항온기에서 배양하였으며, 계대배양은 3-4일에 한번씩 시행하였다.

3. 세포독성 실험

MTT assay (Carmichael *et al.* 1987)를 이용하여 세포 독성 실험을 하였다. 살아있는 암세포 mitochondria의 탈수소 효소작용에 의하여 수용성의 노란색 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]가 환원되어 형성되는 자주색을 띠는 비수용성의 formazan을 microplate (ELISA) reader로 540 nm 에서 흡광도를 측정하여, 생존하면서 대사적으로 왕성한 세포의 농도를 조사하였다. 각각의 세포 (2.5×10^5 cells/㎖)를 96 well plate에 넣고 문주란 분획물을 20, 50 및 100 ㎍/㎖의 농도로 처리하였다. 이를 4일간 배양한 다음 MTT (Sigma, MO, USA) 200 ㎕ (2 ㎎/㎖)을 첨가하고 4시간 동안 반응 시킨 후 plate를 1000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상층액을 제거하였다. Dimethylsulfoxide (DMSO ; Sigma, MO, USA) 150 ㎕를 가하여 침전물을 용해시킨 후 microplate reader (Amersham Pharmacia Biotech, NY, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 증식 억제 정도를 조사하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

4. Analysis for DNA fragmentation

HL-60 세포와 HL-60/MX2 세포 2.5×10^5 cells/㎖에 50 ㎍/㎖의 농도로 문주란 80 % 메탄올 추출물 및 용매 분획물을 처리한 다음 24시간 동안 배양하였다. 세포를 수집한 후 Promega Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, WI, USA)를 사용하여 DNA를 분리하였다. 분리한 DNA를 1.5 % agarose gel에서 40분 (100 V)동안 전기영동을 한 다음 ethidium bromide로 염색하고 UV transilluminator (Spectronics Corporation Westbury, NY, USA)하에서 DNA 분절 현상을 관찰하였다 (Purohit *et al*, 2000).

5. Cell cycle analysis

HL-60 세포와 HL-60/MX2 세포 2.5×10^5 cells/㎖에 50 ㎍/㎖의 농도로 문주란 클로르포름 분획물과 부탄올 분획물을 처리한 다음 24시간 동안 배양한 후, 세포를 수확하여 PBS로 세척하였다. 그 후 -20℃에서 70 % 에탄올로 30분 동안 고정 시키고 PBS 세척 후 RNase A (1 ㎎/㎖)를 처리한 다음에 propidium iodide (PI; Sigma, MO, USA)로 염색하고, COULTER® EPICS® XL™ Flow Cytometer (Coulter, Miami,

FL, USA)로 세포주기를 분석하였다(Nicoletti *et al*, 1991)

6. RNA extraction

HL-60 세포와 HL-60/MX2 세포 (5.0×10^5 cells/㎖)에 문주란 분획물을 50 ㎍/㎖의 농도로 처리한 다음 24시간 동안 배양한 후 총 RNA 추출은 TRI-reagent (MRC)를 사용하였다. 세포에 TRI-reagent를 첨가하여 균질화한 후, chloroform을 첨가하여 원심분리 하였다. 상층액에 동량의 isopropanol을 첨가하여 원심 분리하여 RNA를 침전시키고 75 %의 DEPC 처리된 에탄올로 세척한 후, 건조시켜 DEPC 처리된 증류수에 녹였다. 260 nm의 흡광도를 측정하여 RNA를 정량하였고, A260/A280의 비율이 1.7~1.9 범위 내의 값을 갖는 RNA를 실험에 사용하였다. 모든 실험은 RNase-free한 조건하에서 이루어졌다.

7. RT-PCR analysis

1 ㎍의 total RNA에 oligo$(dT)_{18}$ primer, dNTP (0.5 ㎛M), 1 unit RNase inhibitor 및 M-MuLV reverse transcriptase (2 U)를 가하여 70℃ 5 min, 37℃ 5 min, 37℃ 60 min, 그리고 70℃에서 10 min 동안 가열하였다. Polymerase chain reaction (PCR)은 합성된 cDNA로부터 MDR1, MRP, BCRP 및 β-Actin (Table 1)을 증폭시키기 위하여 2 ㎕ cDNA, 4 ㎛M의 5′ 과 3′ primer, 10x buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1 % Triton X-100), 250 ㎛M dNTP, 25 mM $MgCl_2$, 1 unit Taq polymerase (Promega, USA)를 섞고 distilled water로 전체를 25 ㎕로 맞춘 다음 Perkin-Elmer thermal cycler를 이용하여 PCR을 실시하였다. 이때 PCR 조건은 Table 2로 나타내었고 PCR에 의하여 생성된 산물은 3.5 % agarose gel에서 전기영동을 실시하고 ethidium bromide로 염색하여 특정 band를 확인하였다.

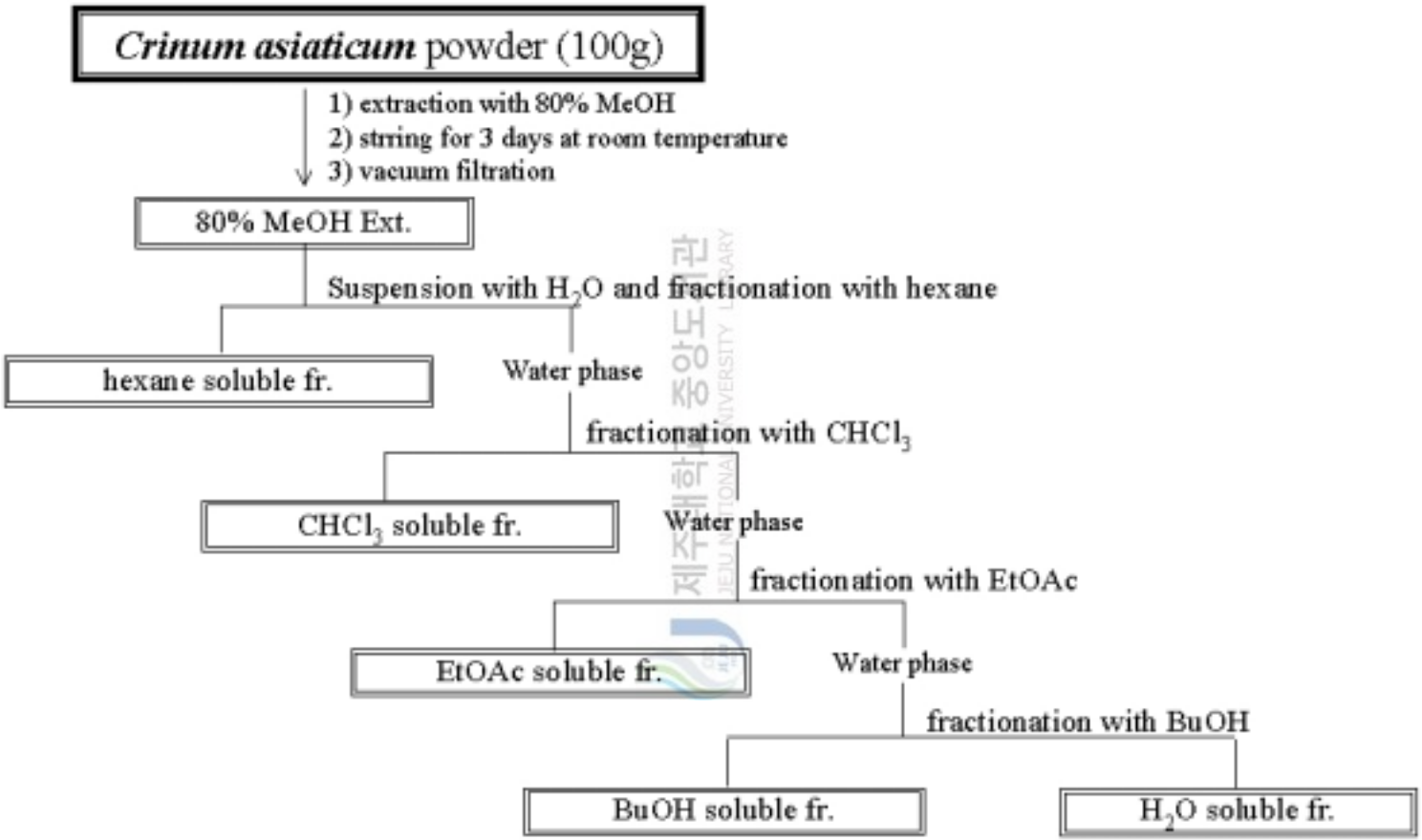
8. MX accumulation

세포 밖으로 약물을 배출함으로써 약물의 축적을 감소시키는 세포막 이동능을 유세포 분석기 (Flow Cytometer, Coulter, Miami, FL, USA)를 이용하여 간접적으로 측정하였다. HL-60/MX2 세포 (1.0×10^6 cells/㎖)를 무혈청 배지와 microtube에 넣고 문주란 분획물을 20, 50 및 100 ㎍/㎖의 농도로 처리하였다. 3

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

7℃, 5% CO_2 항온기에서 30분 동안 배양한 후 5 μM mitoxantrone이 되도록 처리하고 40분 동안 재배양 하였다. 세포 부유액을 차가운 PBS 용액으로 3번 세척한 후 500 ㎕ PBS로 부유한 다음 유세포 분석기로 형광을 나타내는 세포를 측정하였다. 또한 20 μM cyclosporin A (CsA), 10 μM verapamil (Vrp) 및 2 mM sulfinpyrazone (Sul)이 되도록 처리하고 문주란 분획물을 20, 50 및 100 ㎍/㎖의 농도가 되도록 같이 처리하여 37℃, 5 % CO_2 항온기에서 30분 동안 배양한 후 5 μM mitoxantrone을 처리하고 40분 동안 재배양 하였다. 세포 부유액을 차가운 PBS 용액으로 3번 세척한 후 500 ㎕ PBS에 세포를 부유한 다음 유세포 분석기로 형광을 나타내는 세포를 측정하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY



Scheme 1. Procedure for solvent extraction of *Crinum asiaticum*

Table 1. The sequences of primers and the expected sizes of the RT-PCR products

Gene		Primer sequences	Fragment size(bp)
Bcl-2	F	5'-TGCACCTGACGCCCTTCAC-3'	292
	R	5'-AGACAGCCAGGAGAAATCAAACAG-3'	
Bax	F	5'-ACCAAGAAGCTGAGCGAGTGT-3'	364
	R	5'-ACAAAGATGGTCACGGTCTGCC-3'	
MDR1	F	5'-CTGGTTTGATGTGCACGATGTTGG-3'	295
	R	5'-TGCCAAGACCTCTTCAGCAGCTACTG-3'	
MRP	F	5'-GACGGGAGCTGGGAATGC-3'	326
	R	5'-ACAACCTACTCCGGTGCC-3'	
BCRP	F	5'-GTCAGCTGTGGAGCTGTTCGTAG-3'	485
	R	5'-CACAAGTGCTGTTGTCCGTTACA-3'	
*** β_2-MG**	F	5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3'	114
	R	5'-AAGGAAGGCTGGAAAAAGAGC-3'	

* β_2-MG : β_2-microgrobulin

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 2. PCR conditions of Bcl-2, Bax, MDR1, MRP, BCRP and β_2-MG

Gene	No. of cycle	Hot start	Denaturation	Annealing	Extension
Bcl-2	35	94℃. 12min	94℃. 30sec	55℃. 45sec	72℃. 1min
Bax	35			55℃. 45sec	
MDR1	36			65℃. 12min	
MRP	32			53℃. 12min	
BCRP	22			53℃. 12min	
β_2-MG	22			53℃. 12min	

Ⅲ. 결　　과

1. 문주란의 세포 증식 억제 효과

문주란 분획물을 이용한 HL-60 세포와 HL-60/MX2 세포 증식에 대한 억제 효과는 MTT assay를 이용하여 검색하였다. 살아있는 세포의 mitochondria 탈수소 효소작용에 의하여 수용성의 노란색 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]가 환원되어 자주색을 띠는 비수용성의 formazan이 형성되며, 이를 microplate (ELISA) reader로 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 80 % MeOH 분획물을 비롯한 각각의 분획물을 20, 50 및 100 ㎍/㎖의 농도로 HL-60 세포에 처리한 결과, 50 ㎍/㎖의 농도를 기준으로 BuOH 분획물은 약 83 %로 가장 높은 세포 증식 저해 효과를 보였고, $CHCl_3$, EtOAc, H_2O, 80 % MeOH, hexane 분획물 순으로 효과를 보였다 (Table 3-A). HL-60/MX2 세포에서도 같은 방법과 농도로 처리한 결과 50 ㎍/㎖의 농도에서 BuOH 분획물은 약 53 %의 세포 증식 저해 효과를 보였고 $CHCl_3$ 분획물은 약 38 %의 효과를 보였다 (Table 3-B). 정상 세포에서의 세포 증식 억제 효과를 알아보기 위하여 HEL-299 세포로 실험한 결과 50 ㎍/㎖ BuOH, $CHCl_3$ 분획물에서 약 20 %의 세포 증식 저해 효과를 보였다 (Table 4).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2. 문주란의 HL-60 세포 apoptosis 유도 효과

문주란 80 % 메탄올 추출물 및 용매 분획물에 의한 HL-60 세포 증식 억제 작용이 apoptosis 유도에 의한 것인지 기전을 알아보기 위하여, apoptosis 유도에 의하여 나타나는 DNA 분절현상을 전기영동으로 관찰하였다. 문주란 80 % MeOH 추출물 및 용매 분획물을 HL-60 세포에 각각 50 ㎍/㎖ 농도로 24시간 동안 처리하였을 때, 문주란 $CHCl_3$, BuOH, H_2O 분획물에서 뚜렷한 DNA 단편화 현상을 관찰할 수 있었고, EtOAc 분획물에서도 약간의 DNA 분절현상을 관찰할 수 있었다 (Figure 1). 또한 문주란 추출물에 의한 apoptosis 유도에 의하여 sub-G1 hypodiploid 세포가 증가하는지 DNA에 결합하여 형광을 나타내는 물질인 PI를 처리한 뒤, 유세포 분석기로 분석하였다. 문주란 분획물을 50 ㎍/㎖의 농도로 24시간 처리하였을 때, 문주란 $CHCl_3$, BuOH, EtOAc, H_2O 분획물에서

sub-G1 hypodiploid 세포가 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 2).

Apoptosis에 중심적인 역할을 하는 bcl-2 family의 bcl-2와 bax의 발현 양상의 변화를 RT-PCR을 이용하여 조사한 결과 $CHCl_3$, BuOH 분획물에서 bcl-2가 감소하고 bax가 증가 발현되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 3).

3. 문주란의 HL-60/MX2 세포 다약물내성 극복 효과

3.1 문주란의 HL-60/MX2 세포 apoptosis 유도 효과

문주란 80 % 메탄올 추출물 및 용매 분획물에 의한 HL-60/MX2 세포 증식 억제 작용이 apoptosis 유도에 의한 것인지 기전을 알아보기 위하여, apoptosis 유도에 의하여 나타나는 DNA 단편화 현상을 전기영동으로 관찰하였다. 문주란 80 % MeOH 추출물 및 용매 분획물을 HL-60/MX2 세포에 각각 100 ㎍/㎖ 농도로 48시간 동안 처리하였을 때, $CHCl_3$와 BuOH 분획물에서 DNA 분절현상을 관찰할 수 있었다 (Figure 4). 또한, 문주란 추출물에 의한 apoptosis 유도에 의하여 sub-G1 hypodiploid 세포가 증가하는지 DNA에 결합하여 형광을 나타내는 물질인 PI를 처리하여 유세포 분석기로 분석하였다. 문주란 분획물을 100 ㎍/㎖의 농도로 48시간 처리하였을 때, sub-G1 hypodiploid 세포가 BuOH는 65.7 %, $CHCl_3$ 분획물 처리에 의해 57.4 %로 증가하는등 변화를 보였다 (Figure 5). Apoptosis에 중심적인 역할을 하는 bcl-2 family의 bcl-2와 bax의 발현 양상의 변화를 RT-PCR을 이용하여 조사한 결과 $CHCl_3$, BuOH, H_2O 분획물에서 bcl-2 발현이 감소하고 bax 발현이 증가하는 것을 확인하였다 (Figure 6).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

3.2 문주란의 HL-60/MX2 세포 다약물내성 조절제 효과

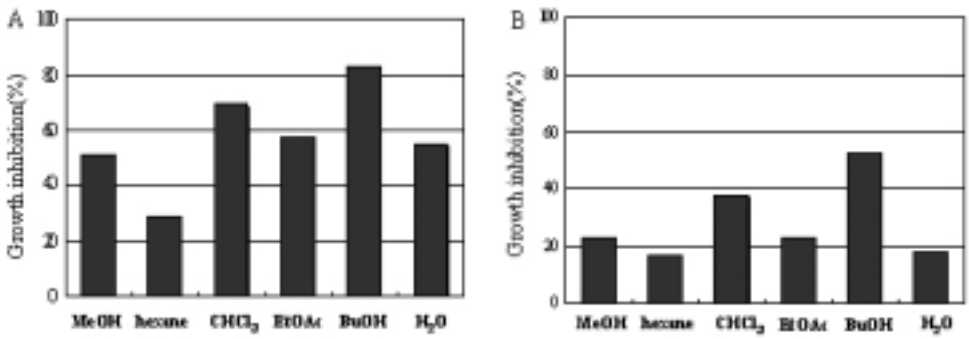
ATP-binding cassette (ABC) 약물 수송단백의 과발현에 의해 발생하는 다약물내성 관련 인자인 MDR1, MRP 및 BCRP의 발현에 대한 문주란의 효과를 RT-PCR을 이용하였다. P-glycoprotein을 만들어 내는 MDR1은 HL-60/MX2 세포에서 발현되지 않는 것을 확인하였고, MRP와 BCRP 발현을 확인하여 살펴보았다. 문주란 BuOH, $CHCl_3$ 분획물 처리에 의해 MRP와 BCRP 발현이 억제되었다. 또한 문주란 H_2O 분획물 처리에 의해 BCRP 발현이 감소함을 확인하였다 (Figure 7). 또한, 문주란 80 % 메탄올 추출물 및 용매 분획물 50 ㎍/㎖과 5 μM의 mitoxantrone이 되도록 처리하여 문주란에 의한 세포 내 MX 축적 정도를 유세포 분석기로 측정하였다. 문주란 80 % MeOH, hexane, $CHCl_3$, BuOH, H_2O 분

획물에서 약물 축적 증가를 확인하였고, 특히 $CHCl_3$ 분획물 처리에 의해 뚜렷한 변화를 확인하였다 (Figure 8).

또한 문주란 80 % 메탄올 추출물 및 용매 분획물과 다약물내성 억제제로 알려진 CsA, Sul 및 Vrp을 같이 처리하여 문주란의 다약물내성 조절제로써의 효능을 측정한 결과, 각각의 약물의 HL-60/MX2 세포에 대한 다약물내성 억제 효과는 볼 수 없었으며, 문주란과 같이 처리 시에도 문주란 80 % 메탄올 추출물 및 용매 분획물에 의한 MX 축적은 증가하였지만 CsA, Sul 및 Vrp와의 상승효과는 확인할 수 없었다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 3. Inhibitory effects of the 80 % MeOH extract or several solvent fractions from *C. asiaticum* on the growth of HL-60 cells and HL-60/MX2 cells.



concentration (μg/mℓ)	Inhibition(%)					
	80% MeOH	hexane	$CHCl_3$	EtOAc	BuOH	H_2O
HL-60/WT						
20	30.0±3.7	23.8±3.8	36.5±5.0	24.3±6.9	74.8±2.2	33.7±2.8
50	50.6±4.2	28.7±2.5	69.5±2.1	57.7±2.2	82.7±1.1	54.5±3.2
100	63.0±3.8	37.9±4.2	87.1±2.0	83.3±2.0	85.7±1.3	57.7±2.2
HL-60/MX2						
20	9.4±4.7	5.6±4.6	15.7±0.7	9.9±1.4	25.4±3.8	8.5±3.9
50	23.0±1.2	16.9±3.7	38.3±1.9	23.4±2.2	52.5±1.8	18.2±3.5
100	39.7±3.4	22.6±2.0	53.4±1.9	32.4±3.1	73.2±1.4	23.2±3.2

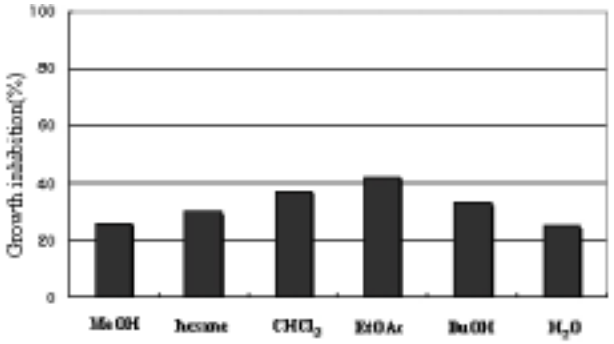
제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

HL-60 cells (2.5×10^5 cells/mℓ) and HL-60/MX2 cells (2.5×10^5 cells/mℓ) were treated with 20, 50 and 100 μg/mℓ of 80 % MeOH extract or solvent fractions from *C. asiaticum* for 4 days and measured for viability by MTT assay. All experiments were performed in triplicate. Data were presented as means ± SD from three separate experiments.

A: HL-60 cells were treated with 50 μg/mℓ of 80 % MeOH extract or solvent fractions.

B: HL-60/MX2 cells were treated with 50 μg/mℓ of 80 % MeOH extract or solvent fractions.

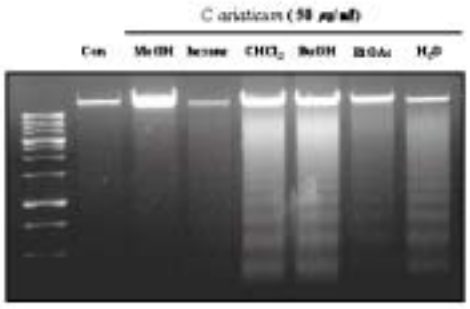
Table 4. Inhibitory effects of the 80 % MeOH extract or several solvent fractions from *C. asiaticum* on the growth of HEL-299 cells.



concentration (㎍/㎖)	Inhibition(%)					
	80% MeOH	hexane	$CHCl_3$	EtOAc	BuOH	H_2O
20	7.5±1.5	8.1±1.5	11.1±1.6	7.2±0.8	15.6±2.6	15.8±1.4
50	10.5±1.4	5.6±1.8	19.8±1.4	15.4±1.7	22.6±0.6	17.6±0.5
100	26.3±3.2	29.9±3.0	37.3±2.1	41.7±3.2	32.6±2.0	24.5±1.6

HEL-299 cells (1.5×10^5 cells/㎖) were treated with 20, 50 and 100 ㎍/㎖ of the 80 % MeOH extract or solvent fractions from *C. asiaticum* for 4 days and measured for viability by MTT assay. All experiments were performed in triplicate. Data were presented as means ± SD from three separate experiments.

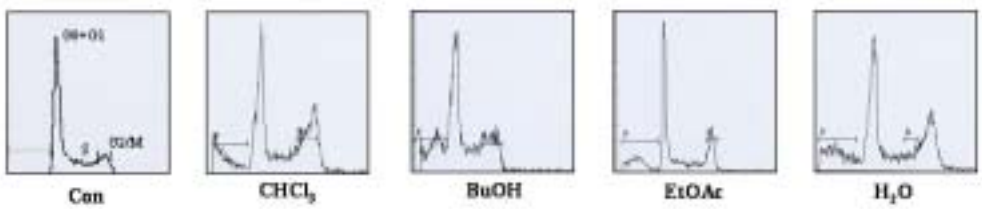
Figure 1. DNA fragmentation by the 80 % MeOH extract or several solvent fractions from *C. asiaticum* in HL-60 cells.



HL-60 cells (2.5×10^5 cell/㎖) were treated with 50 ㎍/㎖ of the 80 % MeOH extract or solvent fractions from *C. asiaticum* for 24 hours. Analysis for DNA fragmentation were performed as described in materials and methods.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

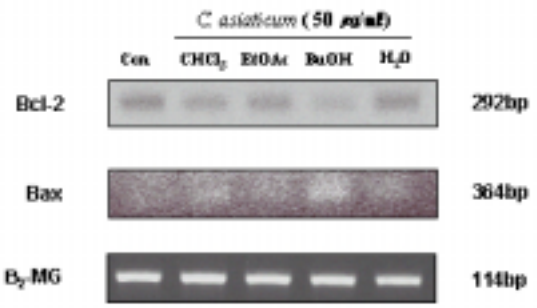
Figure 2. The degree of apoptosis represented as the DNA content measured by flow cytometric analysis in HL-60 cells.



HL-60 cells (2.5×10^5 cells/㎖) were treated with 50 ㎍/㎖ of $CHCl_3$, BuOH, EtOAc and H_2O fraction of *C. asiaticum* for 24 hours. For the measurement of the sub-G1 hypodiploid cells, the flow cytometric analysis was performed as described in materials and methods.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

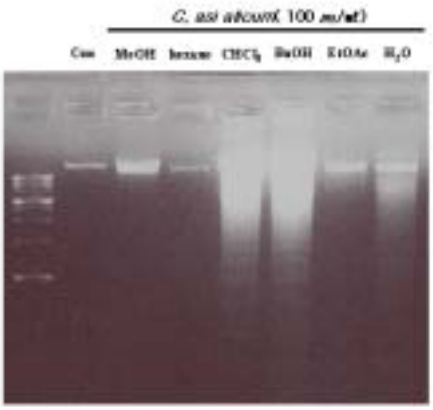
Figure 3. RT-PCR analysis of Bcl-2 and Bax expression in the HL-60 cells treated with several solvent fractions from *C. asiaticum*.



HL-60 cells (2.5×10^5 cells/㎖) were treated with 50 ㎍/㎖ of $CHCl_3$, EtOAC, BuOH and H_2O fraction of *C. asiaticum* for 24 hours. RT-PCR analysis of BCL-2 and Bax were performed after synthesizing the cDNA as described in the materials and method.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 4. DNA fragmentation by the 80 % MeOH extract or several solvent fractions from *C. asiaticum* in HL-60/MX2 cells.



HL-60/MX2 cells (2.5×10^5 cells/㎖) were treated with 100 ㎍/㎖ of the 80 % MeOH extract or solvent fractions from *C. asiaticum* for 48 hours. Analysis for DNA fragmentation were performed as described in materials and methods.

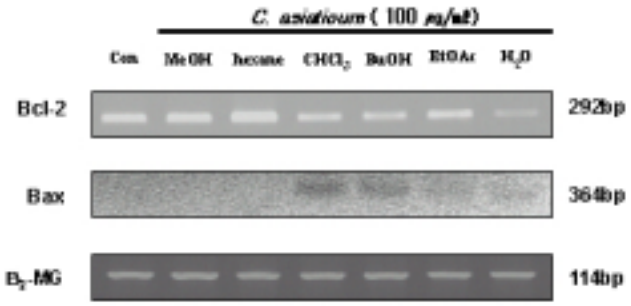
제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 5. The degree of apoptosis represented as the DNA content measured by flow cytometric analysis in HL-60/MX2 cells.

HL-60/MX2 cells (2.5×10^5 cells/㎖) were treated with 100 ㎍/㎖ of $CHCl_3$ fraction, BuOH fraction of *C. asiaticum* for 24 hours. For the measurement of the sub-G1 hypodiploid cells, the flow cytometric analysis was performed as described in materials and methods.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

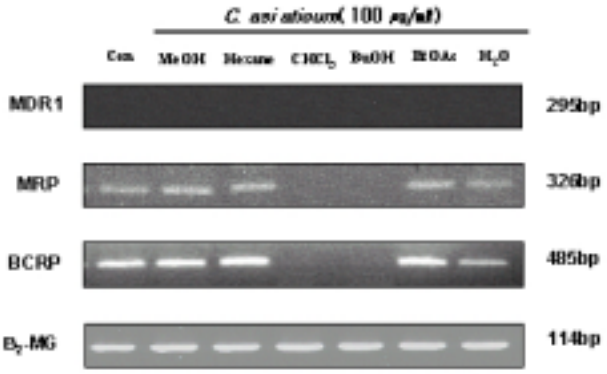
Figure 6. RT-PCR analysis of Bcl-2 and Bax expression in the HL-60/MX2 cells treated with 80 % MeOH extract or several solvent fractions from *C. asiaticum*.



HL-60/MX2 cells (2.5×10^5 cells/㎖) were 100 ㎍/㎖ of 80% MeOH extract or solvent fractions of *C. asiaticum* for 48 hours. RT-PCR analysis of BCL-2 and Bax were performed after synthesizing the cDNA as described in the materials and method.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

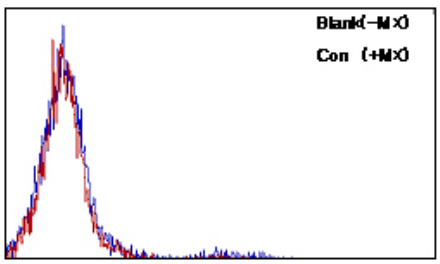
Figure 7. RT-PCR analysis of MDR-1, MRP and BCRP expression in the HL-60/MX2 cells treated with 80 % MeOH extract or several solvent fractions from *C. asiaticum*.

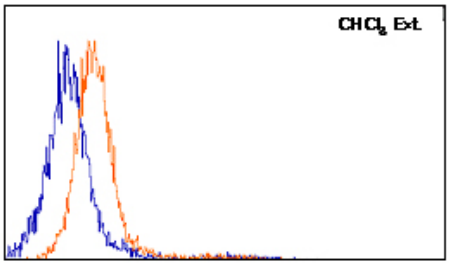


HL-60/MX2 cells (2.5×10^5 cells/㎖) were treated 100 ㎍/㎖ of the 80 % MeOH extract or solvent fractions from *C. asiaticum* for 48 hours. RT-PCR analysis of MDR-1, MRP and BCRP were performed after synthesizing the cDNA as described in the materials and method.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 8. Flow cytometry analysis of mitoxantrone accumulation by the 80 % MeOH extract or several solvent fractions of *C. asiaticum* in HL-60/MX2 cells.



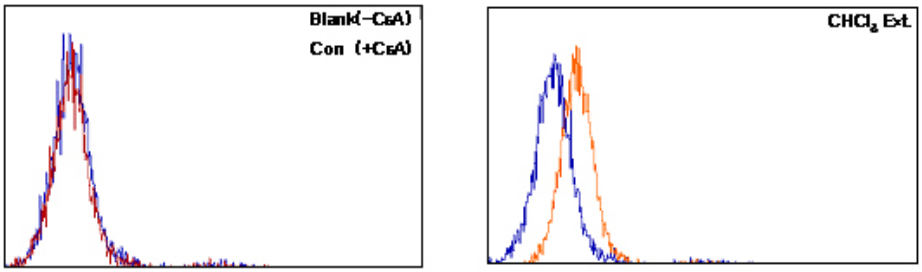


concentration (μg/mℓ)	Cell count						
	Con	80% MeOH	hexane	$CHCl_3$	EtOAc	BuOH	H_2O
20	1433	1878	2409	4416	1504	1584	1471
50	1433	2058	2392	4492	1458	2377	1385
100	1433	3329	3098	4512	1628	4287	1453

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

HL-60/MX2 cells (2.5×10^5 cells/mℓ) were treated with 20, 50 and 100 μg/mℓ of 80 % MeOH extract or solvent fractions from *C. asiaticum*

Figure 9. Flow cytometry analysis of mitoxantrone accumulation by cyclospolin A and the 80 % MeOH extract or several solvent fractions of *C. asiaticum* in HL-60/MX2 cells.

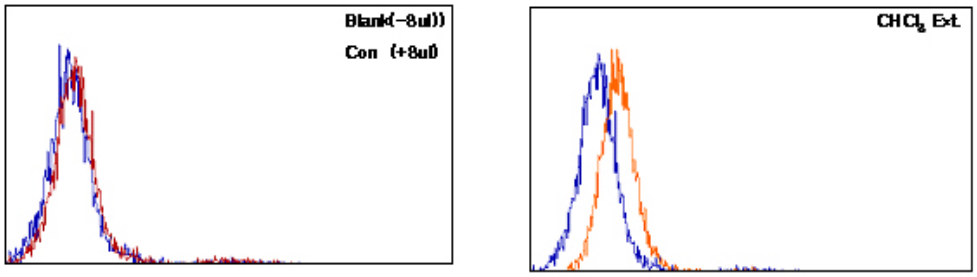


concentration (μg/mℓ)	Cell count						
	Con	80% MeOH	hexane	$CHCl_3$	EtOAc	BuOH	H_2O
20	1757	2143	2405	2865	1690	1900	1564
50	1757	2617	2634	3862	1813	2612	1662
100	1757	3661	3230	4415	1857	4265	1549

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

HL-60/MX2 cells (2.5×10^5 cells/mℓ) were treated with 20, 50 and 100 μg/mℓ of 80 % MeOH extract or solvent fractions from *C. asiaticum* and cyclospolin A

Figure 10. Flow cytometry analysis of mitoxantrone accumulation by sulfinpyrazon and the 80 % MeOH extract or several solvent fractions of *C. asiaticum* in HL-60/MX2 cells.

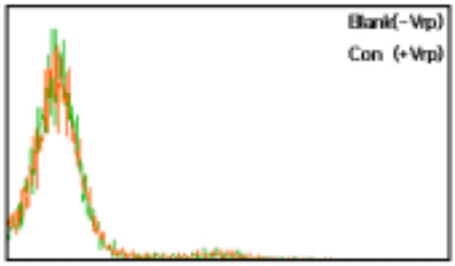


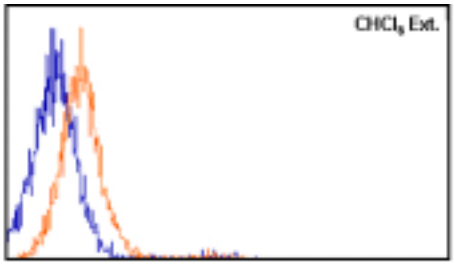
concentration (μg/㎖)	Cell count						
	Con	80% MeOH	hexane	$CHCl_3$	EtOAc	BuOH	H_2O
20	1708	2124	2218	4133	1644	1696	1388
50	1708	2053	2855	4330	1618	2356	1500
100	1708	2856	2794	5084	1667	4429	1554

HL-60/MX2 cells (2.5×10^5 cells/㎖) were treated with 20, 50 and 100 μg/㎖ of 80 % MeOH extract or solvent fractions from *C. asiaticum* and sulfinpyrazon

제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 11. Flow cytometry analysis of mitoxantrone accumulation by verapamil and the 80 % MeOH extract or several solvent fractions of *C. asiaticum* in HL-60/MX2 cells.





concentration (μg/mℓ)	Cell count						
	Con	80% MeOH	hexane	$CHCl_3$	EtOAc	BuOH	H_2O
20	1058	1108	1654	2685	903	2185	824
50	1058	1316	1914	2978	1003	2460	833
100	1058	1623	2301	3108	1400	2856	1231

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

HL-60/MX2 cells (2.5×10^5 cells/mℓ) were treated with 20, 50 and 100 μg/mℓ of 80 % MeOH extract or solvent fractions from *C. asiaticum* and verapamil

Ⅳ . 고 찰

본 연구에서는 문주란 추출물을 이용하여 급성 전골수성 백혈병 세포 HL-60 세포 증식 억제 효과를 조사하고, 세포 증식 억제 작용이 apoptosis 유도에 의한 것인지 알아보았다. 또한 HL-60에서 백혈병 치료제로 알려진 mitoxantrone (MX)에 의해 내성이 유도된 세포인 HL-60/MX2 세포에서 문주란 추출물에 의한 세포의 성장을 억제 효과를 조사하고, 세포 증식 억제 작용이 apoptosis 유도에 의한 것인지 살펴보았으며, 또한 다약물내성 조절제의 효과를 나타내는지 연구하였다.

문주란 추출물에 의한 HL-60 세포 증식 억제 효과를 측정하기 위하여 MTT assay를 이용하였다. 문주란 80 % MeOH 추출물 및 분획물을 20, 50 및 100 ㎍/㎖의 농도로 처리하여 growth inhibition(%)을 계산한 결과, Table 3에서와 같이 20 ㎍/㎖의 농도를 처리하였을 때 BuOH 처리군이 74.8 %로 높은 세포 증식 억제 효과를 보였고, 50 ㎍/㎖ 농도에서는 BuOH, $CHCl_3$, EtOAc, H_2O, 80 % MeOH 분획물 순으로 hexane 분획물을 제외하고 모두 50 % 이상의 세포 증식 억제 효과를 보였다. 문주란 추출물에 의한 HL-60/MX2 세포 증식 억제 효과는 문주란 50 ㎍/㎖ 농도로 처리하였을 때 HL-60 세포에서와 마찬가지로 BuOH 분획물이 52.5 %로 가장 높은 세포 증식 억제 효과를 보였고, $CHCl_3$, 분획물은 38.3 %의 세포 증식 억제 효과를 보였다 (Table 3). 또한 정상세포 HEL-299 (human embryonic lung lymphocytes fibroblast)에 같은 방법으로 문주란을 처리하여 정상세포에 대한 세포 증식 억제 효과를 확인한 결과, 50 ㎍/㎖ 이하의 농도에서는 20 % 이하의 세포 증식 억제 효과를 보였고, 100 ㎍/㎖의 농도에서 EtOAc, $CHCl_3$, BuOH 분획물에서 30-40 %의 세포 증식 억제 효과를 보이는 것으로 보아 100 ㎍/㎖ 이상의 농도에서는 독성을 갖고 있는 것으로 보인다 (Table 4). 이러한 결과를 토대로 문주란 추출물 중 HL-60와 HL-60/MX2 세포에서 증식 억제 효과를 보인 분획물이 apooptosis 유도 작용에 의한 것인지 알아보았다. DNA 분절현상은 세포가 apoptosis로 들어가는 원인이 되는데 chromatin을 nucleosome으로 절단하기 위해 endonuclease를 생산되어 DNA가 분해된다. 이러한 현상을 agarose gel에서 ladder형태로 관찰할 수 있다. HL-60 세포에 문주란 80 % MeOH 추출물 및 분획물을 50 ㎍/㎖의 농도로 24시간 동안 처리하여 DNA ladder를 확인한 결과,

제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 1에서와 같이 $CHCl_3$, BuOH, H_2O 분획물에서 뚜렷한 DNA 분절현상을 관찰 할 수 있었고, EtOAc 분획물에서도 희미하게 단편화 현상을 관찰할 수 있었다. DNA ladder가 확인된 $CHCl_3$, BuOH, EtOAc, H_2O 분획물을 50 ㎍/㎖의 농도로 24시간 동안 처리한 다음 DNA에 결합하여 형광을 나타내는 물질인 PI를 처리하여 세포주기에서 apoptotic 세포, 즉, sub-G1 hypodiploid 세포의 증가를 유세포 분석기로 확인하였다. 그 결과 $CHCl_3$ 분획물에서 sub-G1 hypodiploid 세포가 증가하는 것을 확인하였고 BuOH, EtOAc, H_2O 분획물에서는 necrosis도 일어나는 것으로 보아 apoptosis와 necrosis가 함께 유도되는 것으로 보인다 (Figure 2). Apoptosis의 분자적 기전을 밝히기 위해 anti-apoptosis 유전자로 알려진 Bcl-2와 pro-apoptosis 유전자로 알려진 Bax의 발현을 보았다. Apoptosis가 일어나는 경우에 Bcl-2 발현이 감소되괴고 Bax 발현이 증가가 관찰되는 경우가 많다. Figure 3에서 보는 바와 같이 $CHCl_3$, BuOH, EtOAc, H_2O 분획물을 50 ㎍/㎖의 농도로 24시간 동안 처리하고, RT-PCR 방법을 이용하여 Bcl-2와 Bax 발현 변화를 관찰한 결과, $CHCl_3$, BuOH 분획물 처리군에서 Bcl-2 발현이 감소하는 것을 확인하였으며, Bax 발현은 $CHCl_3$, BuOH 분획물에서 뚜렷하게 증가되는 것을 확인하였고, EtOAc, H_2O 분획물에서도 Bax 발현이 됨으로써 apoptosis가 유도됨을 확인할 수 있었다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

문주란 추출물의 HL-60/MX2 세포 성장 억제 작용이 apoptosis 유도에 의한 것인지 알아보기 위하여 100 ㎍/㎖의 농도로 24시간과 48시간 동안 처리하여 DNA 단편화 현상을 관찰한 결과, 24시간에서는 DNA ladder를 확인 할 수 없었고, 100 ㎍/㎖의 농도로 48시간 동안 처리하였을 때, $CHCl_3$, BuOH 분획물에서 DNA 단편화 현상을 관찰 할 수 있었다 (Figure 4). 세포주기에서 apoptotic 세포, 즉, sub-G1 hypodiploid 세포의 증가를 유세포 분석기로 확인하기 위하여 100 ㎍/㎖ 농도로 $CHCl_3$, BuOH 분획물을 48시간 동안 처리한 결과, $CHCl_3$ 분획물 및 BuOH 분획물 처리에 의하여, sub-G1 hypodiploid 세포가 증가하는 것을 확인하였다(Figure 5). Bcl-2와 Bax 발현 변화 양상을 살펴 본 결과, $CHCl_3$, BuOH, H_2O 분획물 처리군에서 Bcl-2의 감소를 확인하였고, $CHCl_3$, BuOH 분획물에서 Bax의 발현 증가가 나타났다. H_2O 분획물 처리군에서 Bcl-2 mRNA의 발현이 감소하였으며, Bax mRNA 발현은 증가하지 않아 Bcl-2와 Bax 기전 이외에 다른 분자적 기전이 존재하는 것으로 추정된다 (Figure 6). 이러한 결과로 HL-60/MX2 세포에서 $CHCl_3$, BuOH, H_2O 분획물이 apoptosis를 유도함을 알 수 있었다.

문주란의 HL-60/MX2 세포에서의 다약물내성 조절제로써의 효능을 알아보기 위하여 다약물내성 관련 유전자로 알려진 MDR1, MRP, BCRP의 발현을 조사 한 결과, P-gp와 연관된 MDR1 gene는 HL-60/MX2 세포에서 발현되지 않는 것을 확인하였다. 문주란 80 % MeOH 추출물 및 분획물을 100 ㎍/㎖의 농도로 24시간 동안 처리하여 MRP 및 BCRP 발현 변화 양상을 확인한 결과, $CHCl_3$, BuOH 분획물 처리에 의하여 MRP 및 BCRP의 발현이 현저히 감소하는 것을 확인하였고, H_2O 분획물에서도 MRP 및 BCRP의 발현이 감소되는 것을 확인하였다.

문주란 추출물이 내성을 역전하여 항암제에 대해 감수성을 보이도록 하는 화학감작제로의 효능을 알아보기 위하여 문주란 추출물에 의한 HL-60/MX2 세포에서의 MX accumulation 측정하였다. 문주란 추출물 20, 50 및 100 ㎍/㎖의 농도로 HL-60/MX2 세포에 30분 동안 처리한 다음 자체 형광을 갖는 5 ㎛M mitoxantrone을 처리하였다. 유세포 분석기를 이용하여 세포의 MX 축적을 측정한 결과, Figure 8에서 보는 바와 같이 80 % MeOH 추출물 및 $CHCl_3$, BuOH 분획물의 그래프가 control 보다 오른쪽으로 이동되고 MX 축적이 증가하는 것으로 보아 화학감작제로의 효능이 있다고 보여진다. Hexane, EtOAc, H_2O 분획물에선 MX 축적이 증가하지 않고 그래프 이동도 없는 것으로 보아 화학감작제로의 효능은 없는 것으로 보인다. 다약물내성 억제제로 알려져 있는 CsA, Vrp, 및 Sul과 문주란의 HL-60/MX2 세포에 대한 상승 (Synergism)효과를 알아보기 위하여 20 ㎛M CsA, 2 mM Sul 및 10 ㎛M Vrp 각각을 문주란 80 % MeOH 추출물 및 분획물 20, 50 및 100 ㎍/㎖의 농도와 같이 처리한 다음 자체 형광을 갖는 5 ㎛M mitoxantrone을 처리하였다. 유세포 분석기를 이용하여 MX 축적을 측정한 결과, 20 ㎛M CsA만을 처리했을 때 세포내 MX accmulation이 변화가 2% 정도에 그치는 것으로 보아 CsA로 인한 MX 축적 증가가 보이지 않았고 문주란 80 % MeOH 추출물 및 분획물을 같이 처리했을때, 80 % MeOH 추출물 및 hexane, $CHCl_3$, BuOH 분획물에서 농도 의존적인 MX 축적 증가는 보였지만 CsA와의 상승효과는 보이지 않았다(Figure 9). 2 mM Sul과 10 ㎛M Vrp의 경우, CsA와 마찬가지로 각각에 대한 MX 축적 변화는 보이지 않았고 문주란 80% MeOH 추출물 및 분획물을 같이 처리했을 때, $CHCl_3$, BuOH 분획물에서 MX 축적 증가는 보였으나 Sul과 Vrp와의 상승효과는 보이지 않았다 (Figure 10, 11). 이러한 결과는 다약제내성 억제제로 사용되고 있는 CsA, Sul 및 Vrp이 다약물내성 극복 방법 중 P-gp에 작용하여 MDR을 억제하면서 다약물내성을 역전 시키는 효과를 가지고 있는데,

실험에 사용된 HL-60/MX2 세포에서 MDR 발현이 나타나지 않는 것으로 보아 P-gp 억제제의 효과가 보이지 않고 80 % MeOH 추출물 및 분획물과의 상승효과도 나타나지 않는 것으로 보인다.

결론적으로 문주란의 HL-60 세포와 HL-60/MX2 세포의 apoptosis를 유도하여 이들 암세포의 증식을 억제하였으며, HL-60/MX2 세포의 다약물내성 극복하는 효과를 나타내었다. 이와 같은 연구 결과는 문주란 80 % MeOH 추출물 및 분획물이 부작용이 적고 효과가 강력한 항암제와 다약물 내성 조절제로 사용 될 수 있는 가능성의 근거를 제시하는 것이다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅴ. 참 고 문 헌

강윤구, 1996. 항암제 약제내성 및 그 극복. 대한의사협회지. 39(6):669-74.

박미현. 2000. 문주란의 화학성분과 생물 활성. 충남대학교.

최철호 2002. 다약물내성 기전으로서 ABC transporter와 화학감작제의개발. 생화학뉴스.

A. Fojo, K. Ueda, D. I. Slamon, D. G. Poplack, M. M. Gottesman and I. Pastan. 1987. Expression of a multidrug resistant gene in human tumors and tissues. Proc Natl Acad Sci USA **84**: 265-269.

A. H. Wyllie. 1992. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissue; an overview. Cancer and Metastsis Reviews **11**: 95.

A. H. Wyllie, J. F. Kerr and A. R. Currie. 1980. Cell death: The significance of apoptosis. Int Rew Cytol. **68**:251-603.

A. R. Safa and C. T. glover. 1978. Identification of multidrug resistance related membrane glycoprotein as an acceptor for calcium channel blockers. J Biol Chem. **262**:7884-7888.

B. Robaye, R Mosselmans, W. Fiers, J. E. Dumont and P. Galand. Tumor necrosis factor induces apoptosis in normal endothelial cells in vitro. 1991. Am J Pathol. **138**:447-453.

B. Winiger, L. Italiano, J. P. Beck, J. Bastida, S. Bergonon, C. Codina, A. Lobstein and R. Anton. 1995. Cytotoxic Activity of Amaryllidaceae

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Alkaloids. Planta Medica. 61:77-79.

C. J. Chen, J. E. Chin, K. Ueda, C. P. Clark, I. Pastan and M. M. Gottesman. 1986. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug resistant human cell. Cell 47:381-394.

C. Ramachandran, W. You and A. Krishan. 1997. An attempt to isolate novel genes for clinical drug resistance [abstract]. Proc Am Assoc Cancer Res. 38:389.

D. D. Ross, J. Karp and W. Yang. 1998. Expression of breast cancer resistance protein(BCRP) in bleast cells from patients with acute myeloid leukemia(AML) [abstrate]. Blood. 92S:396a.

D. D. Ross, P. J. Wooten, R. Sridhara, J. V. Ordonez and E. J. Lee. C. A. chiffer. 1993. Enhancement of daunorubicin accumulation, retention and cytotoxicity by verapamil or cyclosporin A in Blast cells from patients with previously untreatel acute myeloid leukemia. Blood. 82:1288-1299.

D. M. Bradshaw and R. J. Arcei. 1999. Clinical relevance of transmembrane drug efflux as a mechanism of multidrug resistance. J Clin Oncol 16:3674-90.

D. W. Shen, A. Fojo, J. E. Chin, I. B. Roninson, N. Richert and I. Pastan. 1986. Human multidrug-resistant cell lines: increased mdr1 expression can precede gene amplification. Science. 232(4750):643-5.

D. W. Shen, S. Goldenberg, I. Pastan and M. M. Gottesman. 2000. Decreased accumulation of [14C]carboplatin in human cisplatin-resistant cells results from reduced energy-dependent uptake. J Cell Physiol.

183:108-16.

E. G. Schuetz, W. T. Beck and J. D. Schuetz. 1996. Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells. Mol Pharmacol. 49(2):311-8.

E. Schneider, J. K. Horton, C. H. Yang, M. Nakagawa and K. H. Cowan. 1994. Multidrug resistance-associated protein gene overexpression and reduced drug sensitivity of topoisomerase II in a human breast carcinoma MCF7 cell line selected for etoposide resistance. Cancer Res. 54:152-8.

G. L. Scheffer, M. Maliepaard, A. C. Pijnenborg, M. A. van Gastelen, M. C. de Jong and A. B. Schroeijers. Breast cancer resistance protein is localized at the plasma membrane in mitoxantrone- and topotecan-resistant cell lines. Cancer Res. 60(10):2589-93.

G. J. Zaman, C. H. Versantvoort, J. J. Smit and E. W. Eijdems. 1993. Analysis of the expression of MRP, the gene for a new putative transmembrane drug transpoter, in human multidrug resistant lung cancer cell lines. Cancer Res.

G. T. Williams. 1991. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. Cell. 65(7), 1097-1098.

I. Pastan, M. M. Gottesman. 1991. Multidrug resistance. Annu Rev Med. 42:277-286.

K. Endo, Y. Maehara, Y. Ishiyoshi, T. Kusumoto, Y. Sakaguchi, S. Ohno and K. Sugimachi. 1996. Multidrug resistance-associated protein expression

제주대학교 중앙도서관

in clinical gastric carcinoma. 77:1681-1687.

L. A. Doyle, W. Yang, L. V. Abruzzo, T. Krogmann, Y. Gao and A. K. Rishi et al. 1998. A multidrug resistance transpoter from human MCF-7 breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci USA. 95(26):13033-7.

L. M. Slater, P. Sweet, M. Stupecky and S. Gupta. 1986. Cyclosporin A reverses vincristine and daunorubicin resistance in acute lymphatic leukemia in vitro. J Clin Invest 77(4):1405-1408.

M. A. AbdElHagiz, M. A. Ramadan, M. L. Jung, J. P. Beck, R. Anton. 1991. Cytotoxic Activity of Amaryllidaceae Alkaloids from Crinum augustum and Crinum bulbispermum, Planta Medica. 57:437-439.

M. J. Arends, R. G. Morris, A. H. and Wyllie. 1990. Apoptosis: The role of the endonuclease. American J Pathology. 136(3): 593-608.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

M. Kartalou and J. M. Essigmann. 2001 Mechani느 of resistance to cisplastin. Mutation Res. 478:13-43.

M. Mazel, P. Clair, C. Rousselle, P. Vidal, J. M. Scherrmann, D. Mathieu and J. Temsamani. 2001. Doxorubicin-peptide conjugates overcome multidrug resistance. Anticancer Drugs 12(2):107-116.

M. M. Gottesman and I. Pastan. 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. Ann Rev Biochem. 62:385-427.

M. M. Gottesman, T. Fojo and S. E. Bates. 2002. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. Nat Rev Cancer. 2(1):48-58.

M. R. abbaszadegan, B. W. Fustscher and W. T. Klmecki. 1994. Analysis of multidrug resistance-associated protein(MRP) messenger RNA in normal and malignant hematopoietic cell. Cancer Res. **54**:4676-4679.

M. Raderer and W. Scheithaner. 1993, Clinical trials of agents that reverse multidrug resistance. Cancer **72**:3553-63.

N. E. Nooter, D. R. G. Brutel and M. P. Look. 1997. The prognostic significance of expression of the multidrug resistance-associated protein(MRP) in primer breast cancer. Br J Cancer. **73**:550-4.

N. Kartner, J. R. Riordan and V. Ling. 1983. Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistence in mammalian cell lines. Science. **23**:1285-8.

N. Krishnamachary and M. S. Center. 1993. The MRP gene associated with a non-p-glycoprotein multidrug resistance encodes a 190-kDa membrane bound glycoprotein. Cancer Res. **53**:3658-3661.

J. D. Allen, A. van Loevezijn, J. M. Lakhai, M. van der Valk, O. van Tellingrn, G. Reid, J. H. Schellens, G. J. Koomen and A. H. Schinkel. 2002. Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. Mol Cancer Ther **1**:417-425.

J. H. Gerlach, J. A. Endicott, P. F. Juranka, G. Henderson, F. Sarangi, K. L. Deuchars and V. Ling. 1986. Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests model for multidrug resistance. Nature. **324**:485-489.

J. J. Cohen. 1993. Apoptosis. Immunol. Today. **14**:126

J. R. Riordan, K. Deuchars, N. Kartner, N. Alon, J. Trent and V. Ling. 1985. Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. Nature. **316**:817-819.

P. Gros, J. Croop and D. Housman. 1986. ammalian drug resistance gene: complete cDNA sequence indicates a strong homology to bacterial transport proteins. Cell **47**:371-80.

P. Sonneveld and E. Wiemer. 1997. Assays for the analysis of P-glycoprotein in acute myeloid leukemia and CD34 substrate of AML blasts. Leukemia. **11**:1160-1165.

R. Dahlgren, M. T. Clifford and P. F. Yeo. 1985. In the Families of the Monocotyledons, Springer-Berlag. Berlin.

R. J. Scheper, H. J. Broxterman, G. L. Scheffer, P. Kaaijk, W. S. Dalton and T. H. Heijningen, et al. 1993. Overexpression of a M(r) 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein- mediated multidrug resistance. Cancer Res. **1**:1475-9.

J. H. Gerlach, J. A. Endicott and P. F. Juranka. 1986, Homology between p-glycoprotein and a bacterial hemolysin transport protein suggest a model for multidrug resistance. Nature **324**:485.15.

J. L. Biedler, H. Reihm, R. H. F. Peterson and B. A. Spengler. 1975, Membrane-mediated drug resistance and phenotypic reversion to normal growth behavior of Chinease hamster cells. J Natl Cancer Inst **55**:671-80.

J. P. McGrath and A. Varshavky. 1989. The yeast STE6 gene codes a homologue of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein.

Nature **340**:400-4.

R. Perez-Soler, N. Neamati, Y. Zou, E. Schneider, L. A. Doyle, M. Andreeff, W. Priebe and Y. H. Ling. 1997. Annamycin circumvents resistance mediated by the multidrug resistance-associated protein (MRP) in breast MCF-7 and small-cell lung UMCC-1 cancer cell lines selected for resistance to etoposide. Int J Cancer **71**(1):35-41.

S. E, Salmon, T. M, Grogan, T, Miller, R, Scheper and W. S, Dalton. 1989. Prediction of doxorubicin resistance in vitro in myeloma, lymphoma, and breast cancer by p-glycoprotein staining. J Natl Cancer Inst **81**:696-702.

S. Goto, K. Kamada, Y. Soh, Y. Ihara and T. Kondo. 2002. Significance of nuclear glutathione S-transferase pi in resistance to anti-cancer drugs. Jpn J Cancer Res. **93**(9):1047-56.

제주대학교 중앙도서관

S. K. Rabindran, D. D. Ross, L. A. Doyle, W. Yang and L. M. Greenberger. 2000. Fumitremogin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. Cancer Res **60**:47-50.

S. P. Cole, G. Bhardwaj, J. H. Gerlach and J. E. Mackie. 1992. Overexpression of transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. Science. **258**:1650-1654.

S. Sen, Ld. Teeter and T. Kuo. 1987. Specific gene amplification associated with consistant chromosomal abnormality in independently established multidrug resistant chinese hamster ovary cells. Chromosoma. **95**:117-125.

T. A. Brooks, H. Minderman, K. L. O'Loughlin, P. Pera, I. Ojima and Mr. Baer. 2003. Taxane-based reversal agents modulate drug resistance

mediated by Pglycoproteinn, multidrug resistance protein, and breast cancer resistance protein. Mol Cancer Ther. 2(11):1195-205.

T. Skovsgaard. 1978. Mechanism of resistance to daunorubicin in Ehrlich acutes tumor cells. Cancer Res. 38:1785-1791.

T. Tsuruo, H. Ilda, H. Kawabata. 1984. High calcium content of pleiotropic drug-resistant P388 and K562leukemia and chinese hamster ovary cells. Cancer Res. 44 ; 5095-5099.

T. Tsuruo, H. Ilda, S. Tsukagoshi and Y. SakuraiY. 1981. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. Cancer Res. 41(5):1967-1972.

U. Consoli, W. Priebe, Y. H. Ling, R. Mahadevia, M. Griffin and S. Zhao. 1996. The novel anthracycline annamycin is not affected by P-glycoprotein-related multidrug resistance: comparison with idarubicin and doxorubicin in HL-60 leukemia cell lines. Blood 88(2):633-644.

V. Ling and L. H. Thompson. 1974. Resuced permeability of CHO cells as a mechanism of resistance to chichicine. J cell Physiol. 83:103-116.

W. T. Beck and W. S. Dalton. 1997. Mechanisms of drug resistance. In: Devita V. T Jr, Hellman S, Rosenberg S. A. Cancer: Principles and practice of oncology, 5th ed. Philadelphia: J. B Lippincott.

Y. Urasaki, G. S. Laco, P. Pourquier, Y. Takebayashi, G. Kohlhagen and C. Gioffre. 2001. Characterization of a novel topoisomerase I mutation from a camptothecin-resistant human prostate cancer cell line. Cancer Res. 61(5):1964-9.