

# CaSki 세포주에 대한 비소화합물의 세포 성장 억제 및 세포자멸사

인제대학교 의과대학 부산백병원 산부인과학교실<sup>1</sup>, 백인제기념임상의학연구소<sup>2</sup>

변정미<sup>1</sup> · 정대훈<sup>1,2</sup> · 이대심<sup>1,2</sup> · 김주란<sup>1,2</sup> · 김영남<sup>1,2</sup> · 정은정<sup>1</sup> · 성문수<sup>1</sup> · 이경복<sup>1</sup> · 김기태<sup>1,2</sup>

## Inhibition of cell growth and apoptosis in CaSki, cervical cancer cell line by arsenic compounds

Jung Mi Byun, M.D.<sup>1</sup>, Dae Hoon Jeong, M.D.<sup>1,2</sup>, Dae Sim Lee, M.S.<sup>1,2</sup>, Joo Ran Kim, Ph.D.<sup>1,2</sup>,  
Young Nam Kim, M.D.<sup>1,2</sup>, Eun Jeong Jeong, M.D.<sup>1</sup>, Moon Su Sung, M.D.<sup>1</sup>,  
Kyoung Bok Lee, M.D.<sup>1</sup>, Ki Tae Kim, M.D.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, <sup>2</sup>Paik Institute for Clinical Research,  
Inje University College of Medicine, Busan Paik Hospital, Busan, Korea

**Objective:** To compare inhibition of cell growth and apoptosis in human cervical cancer cell lines (CaSki) by paclitaxel, cisplatin, arsenic trioxide and tetraarsenic oxide.

**Methods:** Inhibition of cell growth was determined by the water-soluble tetrazolium salts (WSTs) -1 assay. For apoptosis analysis in CaSki cell line treated with single or combination of two agents, CaSki cell line treated with each agent was stained with annexin-V/PI and flow cytometry was performed.

**Results:** Progression of apoptosis in CaSki cell line treated with paclitaxel, cisplatin, arsenic trioxide, and tetraarsenic oxide was time dependent. Inhibition of cell growth in CaSki cell line by paclitaxel, cisplatin, arsenic trioxide, and tetraarsenic oxide was dose and time dependent. Especially, tetraarsenic oxide was more effective in inhibition of CaSki cell growth compared to arsenic trioxide. Group treated with combination of cisplatin and tetraarsenic oxide showed more progressive apoptosis compared to other combination group.

**Conclusion:** Tetraarsenic oxide has more potent anti-tumor effects than other agents on CaSki cell line. We need to consider further study about antitumor effect of tetraarsenic oxide through clinical study.

**Key Words:** Cervical cancer, Paclitaxel, Cisplatin, Arsenic trioxide, Tetraarsenic oxide, Apoptosis

자궁경부암은 전 세계적으로 두 번째로 흔한 여성암으로 2007년에 555,100명의 신환이 발생하였고, 309,800명이 사망하였다.<sup>1</sup> 매년 자궁경부암으로 사망하는 인구의 83% 이상이 개발도상국 환자들인 데 반해, 미국의 경우 2009

년 11,270명의 신환이 발생되었으며 그 중 약 1/3에 해당되는 4,070명이 이 질환으로 사망할 것으로 예상된다.<sup>2</sup> 1943년에 자궁경부 세포검사 시행이 처음 시작된 이후로 자궁경부암의 조기 발견이 가능해졌고, 인간 유두종바이러스 (human papilloma virus, HPV)가 자궁경부암의 유발 인자임이 밝혀진 이후 자궁경부암의 발병률과 사망률이 감소하고 있지만 여전히 자궁경부암으로 진단된 환자의 1/3이 자궁경부암으로 인해 사망하게 되며, 대부분의 개발도상국 환자들은 적절한 치료를 받지 못하고 있는 실정이다.<sup>3</sup>

접 수 일 : 2010. 4. 1.

채 택 일 : 2010. 6. 1.

교신저자 : 김기태

E-mail : obgynkkt@inje.ac.kr

\* 본 논문은 2008년도 인제대학교 학술 연구 조성비 보조에 의해 이루어졌음.

한국 부인암 등록사업조사 보고서에 따르면 국내 자궁경부암의 연도별 발생 동향에서 1991년도에 3,011명, 2004년도에는 3,148명의 신환이 발생하여 발병률에 큰 차이는 보이지 않았고, 발병 당시 stage IIb 이상으로 진행된 상태에서 진단된 경우도 2004년 31.2%로 높은 빈도를 차지하고 있어 광범위한 조기 검진의 필요성은 물론 진행된 상태의 자궁경부암의 치료법에 대한 개발이 필요하다.<sup>4</sup> 발견 당시 진행된 상태의 자궁경부암 환자 즉, 자궁경부암의 전이소견이 있거나 또는 암이 재발된 경우에는 사망률이 높으며, 동시 항암방사선요법 혹은 전신적 항암약물요법으로 치료를 하게 되지만 질병의 완치보다는 증상의 완화와 진행 속도를 늦추는 고식적 의미로 사용되며, 완치에 이르게 하는 효과적인 치료법은 아직 없다.<sup>5</sup> 진행된 자궁경부암이나 재발한 경우 약물치료로 사용할 수 있는 항암제에는 58가지가 있으며, 이들 중 21가지 약물이 15% 이상의 반응률을 보이는 것으로 알려져 있다.<sup>6</sup> 그 중 효과가 있는 것으로 알려진 약물로는 cisplatin, paclitaxel, topotecan, vinorelbien, ifosfamide 등이 있으며 이 약물들을 병합하여 진행된 자궁경부암의 치료제로 사용하고 있다.<sup>7</sup>

비소 및 비소 유도 화합물은 오래 전부터 동양에서 암이나 건선, 류마티스 관절염 등과 같은 여러 질환에 약물로 사용되었다.<sup>8</sup> 1970년대 중국에서 여러 종류의 암에 중국 전통의학에서 사용되어진 삼산화비소 (arsenic trioxide, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)의 투약이 시작되었고, 1992년에 삼산화비소가 재발성 또는 불응성 급성 전골수구백혈병 (acute promyelocytic leukemia, APL)의 완전 관해를 효과적으로 유도함이 보고된 이후에 실험적으로 식도암, 두경부암, 자궁경부암, 방광암, 위암, 신경모세포종 등의 세포주에서 세포자멸사를 유도하는 것으로 보고되고 있다.<sup>9-12</sup> 그러나 현재까지 고형암에서 삼산화비소로 인한 세포자멸사의 분자기전은 확실하게 밝혀지지 않고 있다.

육산화사비소 (Tetraarsenic oxide, As<sub>4</sub>O<sub>6</sub>)는 Chunjisan에서 개발한 비소화합물로 새로운 항 혈관신생 작용과 항전이 (antimetastatic) 화학물질로 보고되고 있는데,<sup>13,14</sup> Yoo 등<sup>15</sup>은 쥐 각막에서 nerve growth factor (NGF)에 의해 유도된 새로운 혈관형성에 대해 육산화사비소는 삼산화비소와 비교하여 혈관신생작용을 억제하는 것으로 보고하였다. 또한, 육산화사비소는 삼산화비소보다 훨씬 낮은 농도에서 U937 백혈병 세포주에서 세포자멸사를 유도하는

새로운 비소화합물로 제안되고 있다.<sup>16</sup>

이에 저자는 기존의 자궁경부암에 사용되는 항암 약물인 paclitaxel, cisplatin과 비소 화합물인 삼산화비소 (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 및 육산화사비소 (As<sub>4</sub>O<sub>6</sub>)를 인간 자궁경부암 세포주인 CaSki 세포주 (HPV-16 양성)에 단독 혹은 병합 투여 (paclitaxel+cisplatin, paclitaxel+As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, paclitaxel+As<sub>4</sub>O<sub>6</sub>, cisplatin+As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, cisplatin+As<sub>4</sub>O<sub>6</sub>)하여 자궁경부암 세포에 대한 성장 억제와 세포자멸사를 비교하고자 하였다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 세포주 및 배양조건

CaSki 세포주를 American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포배양액은 RPMI 1640 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)을 사용하였고 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL, NY, USA), penicillin과 streptomycin (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)을 각각 100 IU/mL와 100 µg/mL의 농도로 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였으며 배양액은 2일마다 교환하였다.

### 2. 약제의 처리

실험에 사용한 약제는 paclitaxel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), cisplatin (Sigma-Aldrich), 삼산화비소 (Sigma-Aldrich)로 각각 구입하여 사용하였고, 육산화사비소는 연구목적으로 기증받은 것을 사용하였다. 각 약제의 농도는 기존의 보고된 논문에서 세포성장 억제를 일으키는 농도로 알려진 것을 참고하여 사용하였다.<sup>17-20</sup> Paclitaxel의 경우 0.001 µM, 0.01 µM, 0.1 µM, 1 µM, 10 µM의 농도로, cisplatin의 경우 10 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM의 농도로, 삼산화비소의 경우 1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM의 농도로, 육산화사비소의 경우는 0.5 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM의 농도로 희석하여 사용하였다.

### 3. 세포생존율 측정

각각의 약물 처리 시 CaSki 세포주에 대한 세포성장 억

제를 검사하기 위해 WST-1 (EZ-CyTox enhanced cell viability assay kit; DaeiLab Service, Seoul, Korea) assay를 이용하여 세포생존율을 측정하였으며 각 실험당 3회 반복하여 검체를 분석하였다. CaSki 세포주를 96 well plate에  $5 \times 10^3$  cells/well로 배양한 후 농도별로 조제된 각각의 약제를 well당 100  $\mu$ L씩 분주하여 약물 처리하지 않은 control well과 함께 24시간, 48시간, 72시간 배양 후 EZ-CyTox enhanced cell viability assay kit 20  $\mu$ L (10% v/v)를 각 well에 첨가하였다. 37°C에서 6시간 반응시킨 후 BIO-TELM (EL-800)을 이용하여 흡광도 (파장 480 nm)를 측정하였으며 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도를 % survival로 환산하여 세포의 성장을 50% 억제할 수 있는 농도 (IC<sub>50</sub>; The inhibitory concentration to achieve 50% cell death)를 산출하였다. 각 실험에서 모든 분석은 세 번 반복했고 모든 자료는 독립된 실험의 평균값으로 나타내었다.

#### 4. 세포 형태 변화 관찰

CaSki 세포주를 100 mm 배양 접시에  $2 \times 10^3$ 개로 분주하고 배양액을 첨가하여 배양한 후 각각의 약물을 처리한 후 12시간, 24시간, 48시간 후의 세포의 형태학적 변화를 도립현미경 (CK2; Olympus Optical Co., LTD, Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

#### 5. 세포자멸사 분석

CaSki 세포주를 6 well plate에  $2 \times 10^5$  cells/well로 24시간 배양하여 각각의 약제를 IC<sub>50</sub> 농도로 단독 혹은 두 가지 약제를 병합하여 처리하였다. 12, 24, 48시간 후에 세포는 single cell로 만들기 위해서 trypsin-EDTA (Gibco,

BRL)를 처리하고, FACS tube (BD Bioscience, CA, USA)에 모아서 1,500 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 그 뒤에 상층액은 제거하고, 1X binding buffer (10 mM HEPES, NaOH [pH 7.4], 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, Store at 2~8°C) 1 mL를 넣고 세포를 풀어 준 뒤 1,500 rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거한 뒤 3  $\mu$ L Annexin V-FITC (BD Bioscience)과 10  $\mu$ L propidium iodide 용액 (100  $\mu$ g/mL) (BD Bioscience)을 첨가한 후 실온에서 15분간 반응시켰다. 그 후 300  $\mu$ L FACS buffer (1% FBS, 0.1% NaN<sub>3</sub>)를 넣고 흐름 유세포 분석기 (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA)로 분석하였다. 각 약제를 투여한 후 3회 반복 실험하였다.

#### 6. 통계 처리

각각의 실험에서 평균치 비교는 MedCalc program (ver. 10.0, Frank Schoonjans, University Gent, Zwijnaarde, Belgium)의 Student's *t*-test와 one-way ANOVA를 사용하여 *P*-value 0.05 미만일 때 통계적 유의성이 있는 것으로 해석하였다.

## 결 과

#### 1. 자궁경부암 세포의 성장 억제

CaSki 세포주에 paclitaxel, cisplatin, 삼산화비소와 육산화사비소를 농도별로 투여하여 24시간, 48시간, 72시간 동안 배양한 후 각각의 약물 농도 및 시간에 따른 세포성장 억제를 분석한 결과 paclitaxel은 0.001  $\mu$ M 이상의 농도에서 서서히 세포성장이 억제되었고, 24시간, 48시간 72시간 배양 후 확인한 결과 시간이 지남에 따라 세포성장

**Table 1.** Inhibition of cell growth in CaSki cell line by paclitaxel

| Time (hr) | Cell viability |              |             |           |            |
|-----------|----------------|--------------|-------------|-----------|------------|
|           | Molarity (%)   |              |             |           |            |
|           | 0.001 $\mu$ M  | 0.01 $\mu$ M | 0.1 $\mu$ M | 1 $\mu$ M | 10 $\mu$ M |
| 24        | 81.7±20.7      | 74.1±15.1    | 70.1±13.4   | 65.9±13.4 | 73.6±13.7  |
| 48        | 64.5±20.0      | 48.4±15.9    | 38.8±12.7   | 37.5±10.8 | 43.4±14.2  |
| 72        | 48.3±15.8      | 34.8±10.3    | 28.3±5.3    | 30.2±4.4  | 30.6±4.8   |

Cell viability showed as % control (*P*<0.05).

이 억제되었음을 관찰할 수 있었다 ( $P<0.05$ ) (Table 1). Cisplatin은 10  $\mu\text{M}$ 의 농도에서 세포성장이 서서히 감소하였으나 50  $\mu\text{M}$  이상의 농도에서는 세포성장이 급속히 감소하였고 24시간, 48시간, 72시간 배양 후 확인한 결과 시간이 지남에 따라 세포성장이 억제되었음을 관찰할 수 있었다 ( $P<0.05$ ) (Table 2). 삼산화비소는 1  $\mu\text{M}$ 에서는 오히려 세포가 성장하는 듯이 보였으나 10  $\mu\text{M}$  이상의 농도에서는 급격하게 세포성장이 억제되는 것을 관찰할 수 있었고, 24시간, 48시간, 72시간 배양 후 확인한 결과 시간이 지남에 따라 세포성장이 억제되었음을 관찰할 수 있었다 ( $P<0.05$ ) (Table 3). 육산화사비소는 삼산화비소처럼 0.5  $\mu\text{M}$  농도에서 오히려 세포가 성장하는 듯이 보였으나 5  $\mu\text{M}$  이상의 농도에서는 급격하게 세포성장이 억제되는 것을 관찰할 수 있었고, 24시간, 48시간, 72시간 배양 후 확인한 결과 시간이 지남에 따라 세포성장이 억제되었음을 관찰할 수 있었다 ( $P<0.05$ ) (Table 4). 특히, 육산화사비소는 삼산화비소와 비교해 볼 때, 동일한 농도에서 세포성장을 더 많이

억제시키는 것으로 관찰되었다 ( $P<0.05$ ). 이상의 결과, CaSki 세포주에서 paclitaxel, cisplatin, 삼산화비소와 육산화사비소는 농도와 처리 시간에 의존적으로 세포성장을 억제하는 것으로 확인할 수 있었다.

## 2. 각 약제에 대한 IC<sub>50</sub>

CaSki 세포주에 각 약제를 투여하고 48시간 배양 시 대조군에 비해 50% 세포 성장이 억제된 약물의 농도를 각 약물의 IC<sub>50</sub> 값으로 결정하였다. 각 약물의 IC<sub>50</sub>의 농도는 paclitaxel 0.009  $\mu\text{M}$ , cisplatin 29.74  $\mu\text{M}$ , 삼산화비소 6.99  $\mu\text{M}$ , 육산화사비소 3.72  $\mu\text{M}$ 였다 (Table 5).

## 3. 세포 형태 변화

CaSki 세포주에 paclitaxel, cisplatin, 삼산화비소와 육산화사비소를 농도별로 투여하여 12시간, 24시간, 48시간 동안 배양한 후 각각의 약물 농도 및 시간에 따라 발

**Table 2.** Inhibition of cell growth in CaSki cell line by cisplatin

| Time (hr) | Cell viability   |                  |                   |                   |                   |
|-----------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|           | Molarity (%)     |                  |                   |                   |                   |
|           | 10 $\mu\text{M}$ | 50 $\mu\text{M}$ | 100 $\mu\text{M}$ | 250 $\mu\text{M}$ | 500 $\mu\text{M}$ |
| 24        | 84.8±16.7        | 40.0±6.7         | 25.1±3.4          | 20.3±4.2          | 20.3±4.2          |
| 48        | 60.0±23.6        | 11.4±2.0         | 11.3±2.3          | 11.9±2.9          | 13.4±3.1          |
| 72        | 86.6±16.0        | 10.7±0.9         | 10.5±0.7          | 11.8±0.8          | 12.8±1.2          |

Cell viability showed as % control ( $P<0.05$ ).

**Table 3.** Inhibition of cell growth in CaSki cell line by arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)

| Time (hr) | Cell viability  |                 |                  |                  |                  |
|-----------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|
|           | Molarity (%)    |                 |                  |                  |                  |
|           | 1 $\mu\text{M}$ | 5 $\mu\text{M}$ | 10 $\mu\text{M}$ | 25 $\mu\text{M}$ | 50 $\mu\text{M}$ |
| 24        | 146.8±12.9      | 93.9±11.3       | 85.0±8.1         | 75.1±8.1         | 77.7±4.6         |
| 48        | 133.7±6.9       | 57.4±9.1        | 38.9±1.7         | 19.2±1.5         | 15.3±2.2         |
| 72        | 127.4±9.3       | 54.5±10.0       | 20.7±3.0         | 10.6±0.3         | 9.6±0.5          |

Cell viability showed as % control ( $P<0.05$ ).

**Table 4.** Inhibition of cell growth in CaSki cellline by tetraarsenic oxide (As<sub>4</sub>O<sub>6</sub>)

| Time (hr) | Cell viability    |                 |                 |                  |                  |
|-----------|-------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|
|           | Molarity (%)      |                 |                 |                  |                  |
|           | 0.5 $\mu\text{M}$ | 1 $\mu\text{M}$ | 5 $\mu\text{M}$ | 10 $\mu\text{M}$ | 25 $\mu\text{M}$ |
| 24        | 114.4±11.1        | 95.0±5.8        | 58.6±10.1       | 56.5±1.0         | 48.7±1.6         |
| 48        | 121.2±9.1         | 96.7±10.9       | 29.6±3.0        | 18.3±1.5         | 12.1±1.3         |
| 72        | 104.6±5.2         | 97.8±6.5        | 19.8±1.3        | 11.6±0.6         | 10.1±0.1         |

Cell viability showed as % control ( $P<0.05$ ).

생하는 세포자멸사를 세포형태학적 변화로 관찰한 결과 시간이 지남에 따라 세포자멸사가 일어나는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1).

**4. Paclitaxel, cisplatin, 삼산화비소와 육산화비소의 단독 투여에 의한 CaSki 세포주의 세포자멸사 유도**

Paclitaxel, cisplatin, 삼산화비소와 육산화비소의 단독 투여에 의한 CaSki 세포주의 세포자멸사 유도를 알아보기 위해 각각의 약물을 IC<sub>50</sub> 농도로 CaSki 세포주에 투여한 후 12시간, 24시간, 48시간 후 annexin V와 propidium iodide (PI)로 이중 염색하여 염색 정도를 흐름 유세포 분석기로 조사하였다 (Fig. 2). 초기단계의 세포자멸사 세포는 annexin V (+)/PI (-) 소견을 보이며 후기 세포자멸사 세포는 annexin V (+)/PI (+) 소견을 나타낸다.

Paclitaxel 투여 12시간 후의 대조군과 처치군에서 발생한 세포자멸사의 변화는 생존세포/초기 세포자멸사 세포/

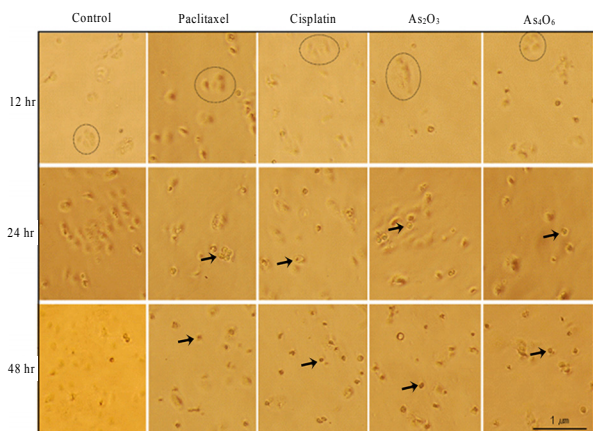
후기 세포자멸사 세포 및 괴사가 진행 중인 세포의 구성이 각각 84.12/8.21/2.27%와 74.9/17.45/3.53%로 나타나 세포자멸사가 발생하기 시작함을 알 수 있었다. 만 24시간 후에는 대조군과 처치군에서 각각 88.29/6.05/2.65%와 69.49/21.32/5.81%였고, 만 48시간 후에는 대조군과 처치군에서 각각 83.75/2.92/5.77%와 47.2/11.75/27.07%로 나타나 시간이 지남에 따라 세포자멸사의 진행을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2).

Cisplatin 투여 12시간 후의 대조군과 처치군에서 발생한 세포자멸사의 변화는 각각 84.12/8.21/2.27%와 81.71/12.14/2.7%로 나타나 세포자멸사가 발생하기 시작함을 알 수 있었다. 만 24시간 후에는 대조군과 처치군에서 각각 88.29/6.05/2.65%와 65.83/21.87/9.37%였고, 만 48시간 후에는 대조군과 처치군에서 각각 83.75/2.92/5.77%와 40.09/2.97/44.72%로 나타나 시간이 지남에 따라 세포자멸사의 진행을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2).

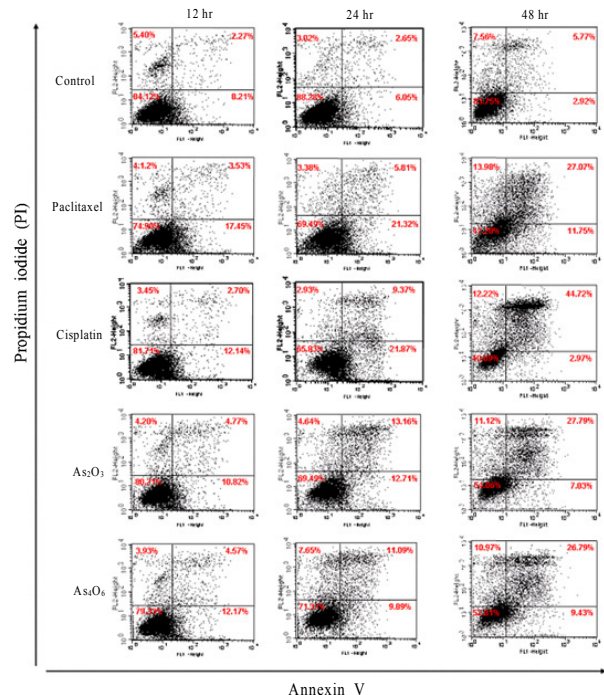
삼산화비소 투여 12시간 후의 대조군과 처치군에서 발

**Table 5.** The IC<sub>50</sub> concentration of paclitaxel, cisplatin, arsenic trioxide, and tetraarsenic oxide in CaSki cell line.

| Agent              | IC <sub>50</sub> (μM) |
|--------------------|-----------------------|
| Paclitaxel         | 0.009                 |
| Cisplatin          | 29.74                 |
| Arsenic trioxide   | 6.99                  |
| Tetraarsenic oxide | 3.72                  |



**Fig. 1.** Microscopic findings of CaSki cells treated with each single drug (paclitaxel, cisplatin, arsenic trioxide [As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>], tetraarsenic oxide [As<sub>4</sub>O<sub>6</sub>]). Circles indicate normal CaSki cells. Arrows indicate apoptotic cells (×100).



**Fig. 2.** Induction of apoptosis in CaSki cell line treated with paclitaxel, cisplatin, arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), and tetraarsenic oxide (As<sub>4</sub>O<sub>6</sub>). CaSki cells were double stained with Annexin V and propidium iodide (PI) followed by FACS analysis. The data are represented as % cell population. Induction of apoptosis in CaSki cell line treated with each agent was increased by time.

생한 세포자멸사의 변화는 각각 84.12/8.21/2.27%와 80.21/10.82/4.77%로 나타나 세포자멸사가 발생하기 시작함을 알 수 있었다. 만 24시간 후에는 대조군과 처치군에서 각각 88.29/6.05/2.65%와 69.49/12.71/13.16%였고, 만 48시간 후에는 대조군과 처치군에서 각각 83.75/2.92/5.77%와 54.06/7.03/27.79%로 나타나 시간이 지남에 따라 세포자멸사의 진행을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2).

육산화사비소 투여 12시간 후의 대조군과 처치군에서 발생한 세포자멸사의 변화는 각각 84.12/8.21/2.27%와 79.1/12.17/4.57%로 나타나 세포자멸사가 발생하기 시작함을 알 수 있었다. 만 24시간 후에는 대조군과 처치군에서 각각 88.29/6.05/2.65%와 71.37/9.89/11.09%였고, 만 48시간 후에는 대조군과 처치군에서 각각 83.75/2.92/5.77%와 52.81/9.43/26.79%로 나타나 시간이 지남에 따라 세포자멸사의 진행을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2). Caski 세포주에 각 약제를 단독 투여하고 각각 24시간, 48시간 경과 후 세포자멸사의 관찰을 3회 반복 실험한 결과, cisplatin 투여군이 paclitaxel 투여군에 비해 시간이 경과함에 따라 세포자멸사가 통계적으로 유의하게 증가하는 것을 관찰할 수 있었고 ( $P=0.028$ ,  $P=0.0017$ ), 삼산화비소와 육산화사비소를 각각 투여한 군에 비해 시간이 지남에 따라 세포자멸사가 의미 있게 증가되는 것을 관찰할 수 있었다 ( $P=0.021$ ,  $P=0.018$ ) (Fig. 5A).

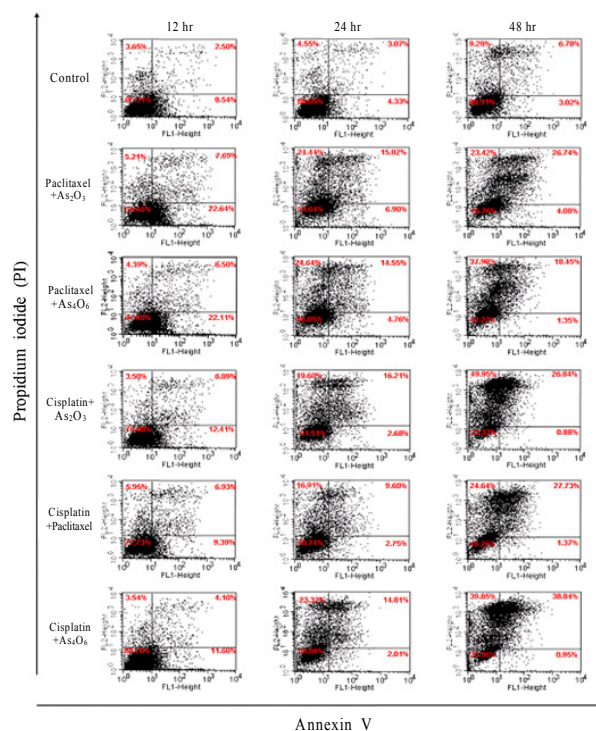
### 5. Paclitaxel, cisplatin, 삼산화비소와 육산화사비소의 병합 투여에 의한 CaSki 세포주의 세포자멸사 유도

Paclitaxel과 cisplatin을 병합 투여한 경우 12시간 후의 대조군과 처치군에서 발생한 세포자멸사의 변화는 각각 86.31/8.54/2.5%와 77.73/9.39/6.93%로 나타나 세포자멸사가 발생하기 시작함을 알 수 있었다. 만 24시간 후에는 대조군과 처치군에서 각각 88.05/4.33/3.07%와 70.74/2.75/9.6%였고, 만 48시간 후에는 대조군과 처치군에서 각각 80.91/3.02/6.78%와 46.26/1.37/27.73%로 나타나 시간이 지남에 따라 세포자멸사의 진행을 관찰할 수 있었다 (Figs. 3, 4).

Paclitaxel과 삼산화비소를 병합 투여한 경우 12시간 후의 대조군과 처치군에서 발생한 세포자멸사의 변화는 각각 86.31/8.54/2.5%와 64.46/22.64/7.69%로 나타나 세포자

멸사가 발생하기 시작함을 알 수 있었다. 만 24시간 후에는 대조군과 처치군에서 각각 88.05/4.33/3.07%와 53.64/6.9/15.02%였고, 만 48시간 후에는 대조군과 처치군에서 각각 80.91/3.02/6.78%와 45.76/4.09/26.74%로 나타나 시간이 지남에 따라 세포자멸사의 진행을 관찰할 수 있었다 (Figs. 3, 4).

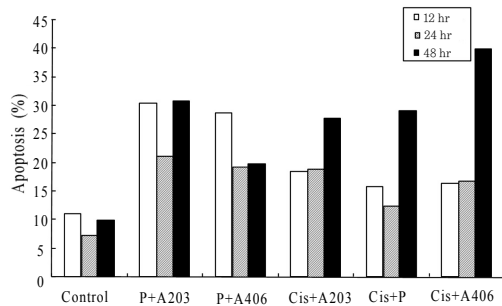
Paclitaxel과 육산화사비소를 병합 투여한 경우 12시간 후의 대조군과 처치군에서 발생한 세포자멸사의 변화는 각각 86.31/8.54/2.5%와 67.00/22.11/6.5%로 나타나 세포자멸사가 발생하기 시작함을 알 수 있었다. 만 24시간 후에는 대조군과 처치군에서 각각 88.05/4.33/3.07%와 56.05/4.76/14.55%였고, 만 48시간 후에는 대조군과 처치군에서 각각 80.91/3.02/6.78%와 42.22/1.35/18.45%로 나타나 시간이 지남에 따라 세포자멸사의 진행을 관찰할 수 있었다 (Figs. 3, 4). 이러한 결과 paclitaxel과 삼산화비소 또는 육산화사비소를 병용 투여한 경우, 협동적 세포



**Fig. 3.** Induction of apoptosis in CaSki cell line treated with two agents (paclitaxel+cisplatin, paclitaxel+arsenic trioxide [As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>], paclitaxel+tetraarsenic oxide [As<sub>4</sub>O<sub>6</sub>], cisplatin+arsenic trioxide [As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>], cisplatin+tetraarsenic oxide [As<sub>4</sub>O<sub>6</sub>]). CaSki cells were double stained with Annexin V and propidium iodide (PI) followed by FACS analysis. The data are represented as % cell population.

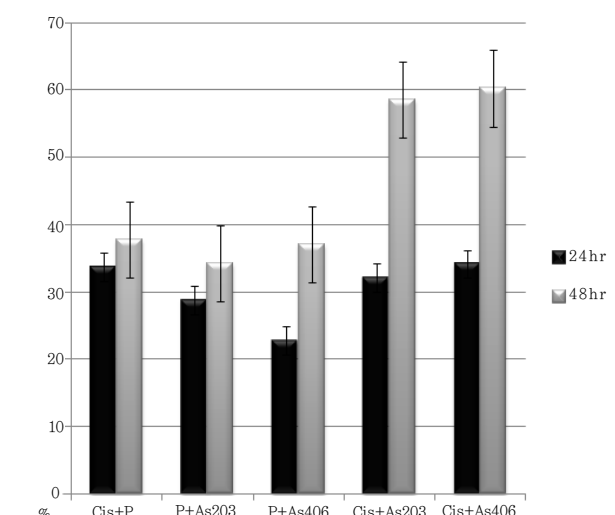
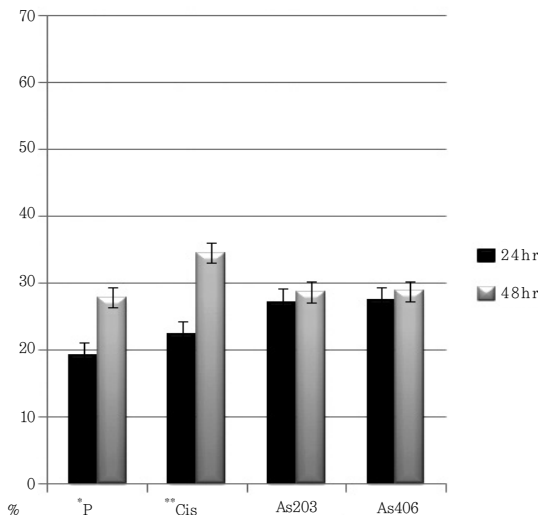
자멸사가 유도되는 것을 알 수 있었다.

Cisplatin과 삼산화비소를 병합 투여한 경우 12시간 후의 대조군과 처치군에서 발생한 세포자멸사의 변화는 각각 86.31/8.54/2.5%와 78/12.41/6.09%로 나타나 세포자멸사가 발생하기 시작함을 알 수 있었다. 만 24시간 후에는 대조군과 처치군에서 각각 88.05/4.33/3.07%와 61.51/2.68/16.21%였고, 만 48시간 후에는 대조군과 처치군에서 각각



**Fig. 4.** Apoptosis in CaSki cell line treated with two agents (paclitaxel+cisplatin, paclitaxel+arsenic trioxide [As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>], paclitaxel+tetraarsenic oxide [As<sub>4</sub>O<sub>6</sub>], cisplatin+arsenic trioxide [As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>], cisplatin+tetraarsenic oxide [As<sub>4</sub>O<sub>6</sub>]). Apoptosis in CaSki celline treated with cisplatin and tetraarsenic oxide (As<sub>4</sub>O<sub>6</sub>) was increased more significantly than with two agents.

80.91/3.02/6.78%와 22.33/0.88/26.84%로 나타나 시간이 지남에 따라 세포자멸사의 진행을 관찰할 수 있었다 (Figs. 3, 4). Cisplatin과 육산화사비소를 병합 투여한 경우 12시간 후의 대조군과 처치군에서 발생한 세포자멸사의 변화는 각각 86.31/8.54/2.5%와 80.76/11.6/4.10%로 나타나 세포자멸사가 발생하기 시작함을 알 수 있었다. 만 24시간 후에는 대조군과 처치군에서 각각 88.05/4.33/3.07%와 69.86/2.01/14.81%였고, 만 48시간 후에는 대조군과 처치군에서 각각 80.91/3.02/6.78%와 20.36/0.95/38.84%로 나타나 시간이 지남에 따라 세포자멸사의 진행을 관찰할 수 있었다 (Figs. 3, 4). 이러한 결과 cisplatin과 삼산화비소 또는 육산화사비소를 같이 투여한 경우 역시, 협동적 세포자멸사가 유도되는 것을 알 수 있었다. 특히, cisplatin과 육산화사비소를 투여한 군에서 다른 병용 투여군 (paclitaxel+cisplatin, paclitaxel+삼산화비소, paclitaxel+육산화사비소, cisplatin+삼산화비소)보다 시간이 지남에 따라 세포자멸사가 더 증가함이 관찰되었다 (Figs. 3, 4). 각 약제의 병합 투여 후 CaSki 세포주의 세포자멸사를 3회 반복 실험한 결과 역시 cisplatin과 삼산화비소를 투여한 군이 다른 병용투여군 (paclitaxel+cisplatin, paclitaxel+



**Fig. 5.** (A) Apoptosis in CaSki cell line treated with single agent (paclitaxel, cisplatin, arsenic trioxide [As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>], tetraarsenic oxide [As<sub>4</sub>O<sub>6</sub>]). The same experiment was repeated three times. The apoptosis was observed after 24 hours and 48 hours, (B) Apoptosis in CaSki cell line treated with two agents (paclitaxel+cisplatin, paclitaxel+arsenic trioxide [As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>], paclitaxel+tetraarsenic oxide [As<sub>4</sub>O<sub>6</sub>], cisplatin+arsenic trioxide [As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>], cisplatin+tetraarsenic oxide [As<sub>4</sub>O<sub>6</sub>]). Apoptosis in CaSki celline treated with cisplatin and tetraarsenic oxide (As<sub>4</sub>O<sub>6</sub>) was increased more significantly than with two agents. \* Paclitaxel, \*\* Cisplatin.

삼산화비소, paclitaxel+육산화사비소)에 비해 시간이 경과함에 따라 세포자멸사가 통계적으로 유의하게 증가하였고( $P=0.022$ ,  $P<0.0001$ ,  $P<0.0001$ ), cisplatin과 육산화사비소를 투여한 군 역시 다른 병용투여군(paclitaxel+cisplatin, paclitaxel+삼산화비소, paclitaxel+육산화사비소)보다 시간이 지남에 따라 세포자멸사가 의미 있게 증가하는 것을 관찰할 수 있었다 ( $P=0.019$ ,  $P<0.001$ ,  $P<0.001$ ). 또한 cisplatin과 육산화사비소를 병용투여한 군에서 cisplatin과 삼산화비소를 병용투여한 군보다 세포자멸사가 증가하였고 이는 통계적 유의성을 나타냈다 ( $P=0.03$ ) (Fig. 5B).

## 고 찰

Paclitaxel은 유사분열방추 억제자 (mitotic spindle inhibitor)로 미세소관 (microtubule)에 결합하여 미세소관을 안정화시키고 이로 인하여 세포분열이 G2/M기에서 정지하여 세포자멸사가 유도되는 것으로 알려져 있다.<sup>21,22</sup> 백금 제제인 cisplatin은 alkylating 제제로 DNA 염기배열에 직접적인 손상을 야기하여 종양억제유전자인 p53의 발현을 유도하고 순차적으로 세포자멸사 관련 단백질 (apoptosis related protein)인 p21WAF 단백질을 발현시키면서 G1/S기의 check point에 작용하여 G1기를 정지에 들어가게 하는 것으로 알려져 있다.<sup>23,24</sup> 본 연구에서는 세포주기 분석이 이루어지지 않았지만, paclitaxel과 cisplatin은 자궁경부암 세포주 (CaSki)에서 농도와 처리 시간에 의존적으로 세포성장을 억제시키는 것이 확인되었으며, 시간이 지남에 따라 세포자멸사가 유도되어 진행되는 것을 관찰할 수 있었다.

삼산화비소는 조혈성 악성 종양에서처럼 고형 종양으로부터 유래한 다양한 인간 암세포의 증식을 억제하고 세포자멸사를 유도함으로써 항암효과를 나타내는 것으로 알려져 있는데,<sup>10,25-27</sup> 특히 G1기 또는 G2/M기에서 세포주기가 진행되는 것을 억제함으로써 종양 세포에 대한 증식 억제 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다.<sup>26,28,29</sup> 반면 육산화사비소는 새로운 항혈관신생 작용과 항전이 (antimetastatic) 화학물질로 알려져 있고 G2/M기에서 세포주기의 정지를 유도하고 matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) 분비를 억제함으로써 항 혈관신생 기전을 통해 항암효과를

나타내는 것으로 보고되고 있다.<sup>13,14</sup> Chang 등<sup>30</sup>이 HPV16 양성인 SiHa 자궁경부암 세포주에서 삼산화비소와 육산화사비소의 항암효과를 비교한 보고에 의하면, 육산화사비소가 삼산화비소보다 동일한 농도에서 더 효과적으로 SiHa 세포 성장을 억제하며 세포자멸사를 유도하는 것으로 보고되었다. 본 연구에서는 HPV16 양성인 CaSki 자궁경부암 세포주에서 삼산화비소와 육산화사비소의 세포자멸사 효과를 비교하였으며 삼산화비소와 육산화사비소는 CaSki 세포주에서 농도와 처리 시간에 의존적으로 세포성장을 억제하였고 시간이 경과함에 따라 세포자멸사를 유도하여 진행되는 것을 관찰할 수 있었다. 특히, 육산화사비소가 삼산화비소보다 동일한 농도에서 더 효과적으로 세포성장을 억제하는 것을 관찰할 수 있었다. 각 약제의 IC<sub>50</sub> 농도로 CaSki cell line에 투여한 후 시간이 지남에 따라 세포자멸사를 살펴본 결과 대조군에 비해 세포자멸사가 증가하여 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 하지만 삼산화비소와 육산화사비소가 기존의 항암약제인 paclitaxel과 cisplatin보다 세포자멸사가 더 증가하지는 않았다. 약제의 단독 투여시 cisplatin이 paclitaxel, 삼산화비소나 육산화사비소에 비해 세포자멸사가 가장 의미 있게 증가하는 것을 관찰할 수 있었다 ( $P=0.0017$ ,  $P=0.021$ ,  $P=0.018$ ).

자궁경부암에서 가장 흔히 사용하는 항암제인 paclitaxel과 cisplatin을 삼산화비소 혹은 육산화사비소와 병용 투여하여 항암효과를 비교한 논문은 아직까지 없다. 따라서 본 연구에서는 자궁경부암이 재발한 환자에게서 사용하도록 허가된 기존의 약물치료인 paclitaxel과 cisplatin을 병용 투여하여 CaSki 자궁경부암 세포주의 세포자멸사를 관찰한 결과를 paclitaxel과 삼산화비소 혹은 육산화사비소를 병용 투여한 군 및 cisplatin과 삼산화비소 혹은 육산화사비소를 병용 투여한 군에서의 나타나는 세포자멸사와 서로 비교하였다. 그 결과 cisplatin과 육산화사비소를 병용 투여한 군이 다른 병용 투여 군 (paclitaxel+cisplatin, paclitaxel+삼산화비소, paclitaxel+육산화사비소, cisplatin+삼산화비소)보다 시간이 지남에 따라 세포자멸사가 더 증가함이 관찰되었다. 이러한 결과는 육산화사비소가 삼산화비소보다 자궁경부암의 치료에 더 효과적일 수 있다는 것을 의미하며, 특히 cisplatin과 육산화사비소를 병합 투여할 경우 현재 자궁경부암이 재발한 환자에게 널리 사용되고 있는 paclitaxel과 cisplatin을 병합 투여한 것보다



더 효과적일 수 있다는 것을 의미한다. 그러나 본 연구는 하나의 단일 세포주에서 시행된 결과로 본 연구 결과의 타당성을 입증하기 위해서는 다른 자궁경부암 세포주에서도 동일한 실험으로 유사한 결과가 나타나야 할 것이다.

육산화사비소는 강력한 항종양제이지만 정확한 기전은 아직 명확하게 알려져 있지 않다. 하지만, Woo 등<sup>14</sup>은 육산화사비소가 cyclin A, CDC2, CDC25C를 분해함으로써 인간 제대정맥내피세포의 증식을 억제하고, CDK2와 CDK1을 불활성화시킴으로써 나타나는 세포자멸사가 육산화사비소의 종양 세포 성장 억제 기전으로 가능성이 있음을 제

시하였다. 또한, Chang 등<sup>30</sup>은 세포증식인자 PCNA의 발현과 항세포자멸 단백질인 Bcl-XL의 발현이 육산화사비소에 의해 감소되고 Bax와 p21과 같은 세포자멸사와 관련된 단백질의 발현이 육산화사비소에 의해 증가됨을 관찰하면서 육산화사비소는 세포자멸사를 유도함으로써 항종양 효과를 나타내는 것으로 보고하였다. 그러나 앞으로 정확한 육산화사비소의 항암효과의 기전에 대한 연구가 이루어져야 하며 향후 동물실험과 임상시험을 통해 육산화사비소의 항종양효과에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

### 참고문헌

- Garcia M, Jemal A, Ward EM, Center MM, Hao Y, Siegel RL, Thun MJ. Global Cancer Facts & Figures 2007 [Internet]. Atlanta, GA: American Cancer Society 2007 [cited 2008 Jan 26] [about 3p. Figure 3]. Available from: URL: [http://www.cancer.org/downloads/STT/Global\\_Cancer\\_Facts\\_and\\_Figures\\_2007\\_rev.pdf](http://www.cancer.org/downloads/STT/Global_Cancer_Facts_and_Figures_2007_rev.pdf).
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 225-49.
- Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, Alvarez FB, et al. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med* 2002; 347: 1645-51.
- Lee HP. Annual report of Gynecologic Cancer Registry Program in Korean for 2002 (Jan. 1st, 2002 - Dec. 31st, 2002). *Korean J Obstet Gynecol* 2007; 50: 28-78.
- Tao X, Hu W, Ramirez PT, Kavanagh JJ. Chemotherapy for recurrent and metastatic cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2008; 110: S67-71.
- Thigpen T. The role of chemotherapy in the management of carcinoma of the cervix. *Cancer J* 2003; 9: 425-32.
- Long HJ 3rd. Management of metastatic cervical cancer: review of the literature. *J Clin Oncol* 2007; 25: 2966-74.
- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1: 27-31.
- Sun HD, Ma L, Hu XC, Zhang TD. Treatment of acute promyelocytic leukemia by Ailing-1 therapy with use of syndrome differentiation of traditional Chinese medicine. *Chin J Comb Trad Chin Med West Med* 1992; 12: 170-1.
- Soignet SL, Maslak P, Wang ZG, Jhanwar S, Calleja E, Dardashti IJ, et al. Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. *N Engl J Med* 1998; 339: 1341-8.
- Wang ZY. Arsenic compounds as anticancer agents. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001; 48(Suppl 1): S72-6.
- Akao Y, Yamada H, Nakagawa Y. Arsenic-induced apoptosis in malignant cells in vitro. *Leuk Lymphoma* 2000; 37: 53-63.
- Park MJ, Park IC, Bae IJ, Seo KM, Lee SH, Hong SI, et al. Tetraarsenic oxide, a novel orally administrable angiogenesis inhibitor. *Int J Oncol* 2003; 22: 1271-6.
- Woo SH, Park MJ, An S, Lee HC, Jin HO, Lee SJ, et al. Diarsenic and tetraarsenic oxide inhibit cell cycle progression and bFGF- and VEGF-induced proliferation of human endothelial cells. *J Cell Biochem* 2005; 95: 120-30.
- Yoo MH, Kim JT, Rhee CH, Park MJ, Bae IJ, Yi NY, et al. Reverse effects of tetraarsenic oxide on the angiogenesis induced by nerve growth factor in the rat cornea. *J Vet Med Sci* 2004; 66: 1091-5.
- Park IC, Park MJ, Woo SH, Lee HC, An S, Gwak HS, et al. Tetraarsenic oxide induces apoptosis in U937 leukemic cells through a reactive oxygen species-dependent pathway. *Int J Oncol* 2003; 23: 943-8.
- Smith JA, Ngo H, Martin MC, Wolf JK. An evaluation of cytotoxicity of the taxane and platinum agents combination treatment in a panel of human ovarian carcinoma cell lines. *Gynecol Oncol* 2005; 98: 141-5.
- Huh CY, Lim MC, Suh BS. Study on measure of chemosensitivities to topotecan, cisplatin and taxol therapy in ovarian cancer cell lines: relationship with p53 and bcl-2 expression and apoptosis. *Korean J Obstet Gynecol* 2003; 46: 1368-77.
- Kim J, Bae SM, Lim DS, Kwak SY, Lee CK, Lee YS, et al. Retraction: tetraarsenic oxide-mediated apoptosis in a cervical cancer cell line, SiHa. 2007; 39: 48.
- Bae SM, Eu JY, Lee YJ, An WS. Apoptosis-induced cell growth inhibitory effects of a novel compound, As4O6 in a cervical cancer cell line, siHa in vitro. *J Korean Assoc Cancer Prev* 2006; 11: 39-45.
- Horwitz SB, Cohen D, Rao S, Ringel I, Shen HJ, Yang CP. Taxol: mechanisms of action and resistance. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1993; 55-61.
- Wang TH, Wang HS, Soong YK. Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer* 2000; 88: 2619-28.
- Fisher DE. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell* 1994; 78: 539-42.
- Eastman A. Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system. *Cancer Cells* 1990; 2: 275-80.
- Li X, Ding X, Adrian TE. Arsenic trioxide inhibits proliferation and induces apoptosis in pancreatic cancer cells. *Anticancer Res* 2002; 22: 2205-13.
- Park WH, Seol JG, Kim ES, Hyun JM, Jung CW, Lee CC, et al. Arsenic trioxide-mediated growth inhibition in MC/CAR myeloma cells via cell cycle arrest in association with induction of cyclin-dependent kinase inhibitor, p21, and apoptosis. *Cancer Res* 2000; 60: 3065-71.
- Shen ZX, Chen GQ, Ni JH, Li XS, Xiong SM, Qiu QY, et al. Use of arsenic trioxide (As2O3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. *Blood* 1997; 89: 3354-60.
- Bazarbachi A, El-Sabban ME, Nasr R, Quignon F, Awaraji C, Kersual J, et al. Arsenic trioxide and interferon-alpha synergize to induce cell cycle arrest and apoptosis in human T-cell lymphotropic virus type I-transformed cells. *Blood* 1999; 93: 278-83.
- Ma DC, Sun YH, Chang KZ, Ma XF, Huang SL, Bai YH, et al. Selective induction of apoptosis of NB4 cells from G2+M phase by sodium arsenite at lower doses. *Eur J Haematol* 1998; 61: 27-35.
- Chang HS, Bae SM, Kim YW, Kwak SY, Min HJ, Bae IJ, et al. Comparison of diarsenic oxide and tetraarsenic oxide on anticancer effects: relation to the apoptosis molecular pathway. *Int J Oncol* 2007; 30: 1129-35.

**= 국문초록 =**

**목적:** Paclitaxel, cisplatin, 삼산화비소, 육산화사비소를 단독 혹은 병합 투여하여 CaSki 자궁경부암 세포주에 대한 성장 억제와 세포자멸사를 비교해 보고자 하였다.

**연구 방법:** 약물 농도 및 시간에 따른 세포 성장 억제 정도를 각 약물을 투여한 후 water-soluble tetrazolium salts (WSTs) -1 assay로 측정하여 비교하였다. 각 약물을 단독 혹은 병합 투여한 후 세포를 annexin V/PI 염색한 후 그 정도를 흐름 유세포 분석기를 이용하여 세포자멸사 정도를 분석하였다.

**결과:** Paclitaxel, cisplatin, 삼산화비소, 육산화사비소는 농도와 처리 시간에 의존적으로 CaSki 세포성장을 억제하였다. 특히, 육산화사비소는 삼산화비소보다 세포성장을 더 많이 억제시켰다. Paclitaxel, cisplatin, 삼산화비소와 육산화사비소는 시간이 지남에 따라 세포자멸사를 진행시켰다. Cisplatin과 육산화사비소를 병용 투여한 군에서 다른 병용 투여군보다 세포자멸사가 더 많이 진행하였다.

**결론:** 육산화사비소는 CaSki 자궁경부암 세포주에 대해 다른 제제보다 더 강력한 항종양 효과를 나타내었다. 임상시험을 통해 육산화사비소의 항종양효과에 대한 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

**중심단어:** 자궁경부암, Paclitaxel, Cisplatin, 삼산화비소, 육산화사비소, 세포자멸사

---