creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

의학박사 학위논문

췌장암에서 Emodin 및 Inflexinol 과 Gemcitabine 병합요법의 효과

Effects of Combination Therapy with Emodin, Inflexinol and Gemcitabine in Pancreatic Cancer

2013 년 2 월

서울대학교 대학원

임상의과학과 박사과정

안 동 원

A thesis of the Degree of Doctor of Philosophy

Effects of Combination Therapy with Emodin, Inflexinol and Gemcitabine in Pancreatic Cancer

췌장암에서 Emodin 및 Inflexinol 과 Gemcitabine 병합요법의 효과

February 2013

The Department of Clinical Medical Sciences,

Seoul National University

College of Medicine

Dong-Won Ahn

췌장암에서 Emodin 및 Inflexinol 과 Gemcitabine 병합요법의 효과

지도 교수 김 병 관

이 논문을 의학박사 학위논문으로 제출함
2012년 10월

서울대학교 대학원
임상의과학과
안 동 원

안동원의 의학박사 학위논문을 인준함
2012년 12월

위 원 장 _____ (인)
부위원장 _____ (인)
위 원 _____ (인)
위 원 _____ (인)
위 원 _____ (인)

Effects of Combination Therapy with Emodin, Inflexinol and Gemcitabine in Pancreatic Cancer

by
Dong-Won Ahn, M.D.

A thesis submitted to the Department of Clinical Medical Sciences in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in Clinical Medical Sciences at Seoul National University College of Medicine

December, 2012

Approved by Thesis Committee:

Professor _____Chairman
Professor _____Vice chairman
Professor _____
Professor _____
Professor _____

초 록

서론: 췌장암에 대한 표준치료제인 gemcitabine 의 낮은 반응률을 극복하기 위해 최근에는 다양한 천연 화합물을 병합하고자 하는 시도가 이루어지고 있다. 그 중 emodin 과 inflexinol 은 각각 survivin 과 NF-κB 의 억제를 통해 종양 세포의 증식을 억제하는 효과가 있을 것으로 기대되고 있으나 inflexinol 의 췌장암에서의 항암효과에 대해서는 아직 밝혀진 바가 없다. 본 연구에서는 췌장암에서 emodin 및 inflexinol 과 gemcitabine 병합요법이 항암효과에 미치는 영향에 대해서 연구해 보고자 하였다.

방법: 췌장암 세포주 (Panc-1, MiaPaCa-2)에 gemcitabine 과 emodin, inflexinol 을 병합 투여하여 세포 증식 및 세포자멸사에 미치는 영향을 측정하고, 그 기전을 살펴보기 위하여 관련된 단백질의 발현의 변화를 측정하였다. 췌장암 동물 모델에서도 병합치료의 종양 억제 효과와 기전을 측정하였다.

결과: 췌장암 세포주에서 gemcitabine 과 emodin, inflexinol 의 병합 투여는 survivin 과 NF-κB 의 억제와 Bax 의 활성화를 통하여 세포 증식을 억제하고 세포자멸사를 촉진시키는 효과를 보였다. 또한 췌장암 동물 모델에서도 병합 투여는 같은 기전을

통해 종양 증식을 억제하는 효과를 보였다. 하지만, gemcitabine 과 emodin, inflexinol 세 가지 약제의 병합 투여는 gemcitabine 에 emodin 또는 inflexinol 을 병합한 두 가지 약제의 병합 투여에 비해 더 많은 종양 증식의 억제 효과를 보이지는 못했다.

결론: 췌장암에서 emodin 및 inflexinol과 gemcitabine 병합요법은 survivin과 NF-κB의 억제와 Bax의 활성화를 통하여 항암효과를 증진시키는 효과를 보였다.

주요어: 췌장암, gemcitabine, inflexinol, emodin, NF-κB, survivin

학 번: 2011-30642

목 차

초록.....i

목차.....iii

표 및 그림 목록.....iv

서론.....1

실험 재료 및 방법.....4

결과.....12

고찰.....33

참고문헌.....37

초록 (영문).....43

표 및 그림 목록

그림 1 14

그림 2 15

그림 3 16

그림 4 19

그림 5 20

그림 6 24

그림 7 26

그림 8 28

그림 9 30

그림 10 32

서 론

췌장암은 매우 침습적인 악성 종양으로 예후도 매우 불량하여 생존 기간이 평균 6 개월에 불과한 것으로 알려져 있다 (1). 진단 당시 이미 진행된 경우가 많아 수술적 치료를 받을 수 있는 경우는 15-20%에 불과하며, 이중 약 20% 만이 5년까지 생존할 수 있다 (2). 수술적으로 제거할 수 없는 국소 진행암이나 전이암의 경우 치료는 고식적인 목적으로 방사선 치료나 항암치료를 시행하고 있다. 현재까지 췌장암의 전신적 치료의 표준요법은 gemcitabine을 이용한 항암화학요법이나 반응률이 20% 미만이고 생존율의 연장이 수개월에 불과한 것으로 알려져 있다 (3).

그러므로, 췌장암의 치료 성적을 향상 시키려면 조기 진단과 함께 항암치료에 대한 낮은 반응률을 극복하는 것이 요구된다. 분자생물학의 눈부신 발전으로 췌장암은 여러 가지 유전자의 변이가 비교적 잘 밝혀져 있으며, 각종 발암유전자와 종양억제유전자가 대부분의 췌장암에서 관여하는 것으로 알려져 있다. 이러한 분자생물학적 특성을 이용하여 최근 췌장암에서는 matrix metalloproteinase inhibitor (Bay 12-9566) (4), farnesyltransferase inhibitor (tifipanib) (5), anti-epidermal growth factor monoclonal antibody (cetuximab) (6) 등의 분자생물학적 치료제와 gemcitabine 과의 병합요법이 시도되었지만 생존율의 향상은 현재까지 입증되지 못하고 있다. 반면에 자연에 존재하는 천연물 중 암 예방 효과 및 항암효과가 있다고 알려진 물질을 이용한 연구가 시도되고 있으며 기존의 항암제와 병합하는

실험도 진행되고 있다. 그 중 *Rheum palmatum*에서 추출한 자연산의 anthraquinone derivative로 알려진 emodin은 여러 종양 세포에서 세포의 증식을 억제하는 것으로 알려져 있으며 (7-10), 또한, 세포의 증식과 세포자멸사, 종양 세포의 침윤 및 전이와 관련된 유전자를 조절하는 것으로 알려져 있다 (11-16).

또한, 항암효과가 있다고 알려진 천연물로 최근 제시되고 있는 것이 오리방풀이라고 불리는 *Isodon excisus*에서 추출한 kaurane diterpenoid 화합물 중 하나인 inflexinol 이다 (17). Isodon 속의 식물에서 여러 가지 종류의 kaurane diterpenoid 화합물이 추출되고 있는데, 이들은 여러 연구들에서 세포자멸사를 유도하고 (18) NF-κB의 작용을 억제하는 것 (17,19)으로 알려져 있다. NF-κB는 최근 연구들을 통해 특유의 신호전달 체계를 통해 종양의 진행 과정에 긴밀히 관여하는 것으로 알려져 있어 (20,21), kaurane diterpenoid 화합물이 NF-κB의 억제를 통한 잠재적인 항암효과를 가지고 있을 것이라는 가정을 할 수 있게 된다.

대장암 세포주를 이용한 *in vivo* 및 *in vitro* 연구에서 inflexinol의 투여가 NF-κB 활성의 억제를 통해 세포 증식을 억제하고 세포자멸사를 유도하며 대장암 동물 모델에서도 종양의 증식을 억제할 수 있음이 보고되었다 (22). 이 연구는 inflexinol의 종양 세포에 대한 효과를 입증한 유일한 연구로 췌장암을 대상으로 한 연구는 아직 없으며, 더욱이 기존 치료제인 gemcitabine과 병합하였을 경우의 병합효과에 대한 연구 또한 없는 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 첫째, 췌장암에서 gemcitabine에 inflexinol를 병합 투여할 경우 부가적인 항암효과가 있는지를

살펴보고, 둘째, 예전의 연구를 통해 효과가 있음이 밝혀진 gemcitabine과 emodin 병합요법에 inflexinol을 추가적으로 병합할 경우 부가적인 항암효과가 있는지를 살펴보고자 한다. 그리고, 셋째, 만약 부가적인 항암효과가 있다면 그 기전에 대해서도 규명하고자 한다.

실험 재료 및 방법

췌장암 세포주의 배양과 수확

췌장암 세포주로 Panc-1, MiaPaCa-2 세포주를 서울대학교 의과대학 암연구소에서 구입한다. 10% 우태아혈청 (fetal bovine serum)을 포함한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배양액 10 mL을 배양 용기 (10 cm culture dish, Falcon®, Franklin Lakes, New Jersey, USA)에 넣고 5% 농도의 이산화탄소가 유지되는 37 ℃의 배양기에서 배양하였다. 세포의 밀도가 배양용기의 80% 이상이 되면 세포를 수확하여 Nunc® plate (Nunc company, Rochester, New York, USA)에 분주하였다. 배양용기의 배양액을 버리고 우태아혈청으로 세척 후 트립신-EDTA 용액을 2 mL 넣고 세포가 배양용기에서 떨어진 것을 육안으로 확인한 후 원뿔형 원심분리관에 넣고 원심분리하여 상층액을 버리고 침전물에 10% 우태아혈청을 포함한 2 mL의 DMEM 배양액을 넣고 균질화 시켰다. 혈구계 (hemocytometer)를 이용하여 세포의 농도를 측정하여 4 X 10^3 cells/well 농도로 희석하여 96 well plates에 각각 분주하고 37 ℃에서 24 시간 배양하였다.

약제 재료

Gemcitabine은 Ely Lilly (Indianapolis, IN, USA)에서 구입하고

0.9% 생리 식염수로 용해하여 50 g/L stock solution 으로 보관하였고, emodin은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하고 dimethylsulfoxide (DMSO)에 용해하여 0.2 mmol/L stock solution 으로 보관하였다. Inflexinol은 충북대학교 약리학교실에서 공급 받았다.

Emodin, inflexinol과 gemcitabine에 의한 세포 증식 억제 효과 측정

췌장암 세포주를 96 well 용기에 well 당 5 X 10^3 개 분주하고 100 uL 배양액에서 24 시간 배양 후 emodin 을 다양한 농도 (10, 20, 40, 80, 160 uM)로 넣고 24, 48, 72 시간 후 MTS (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) 방법을 이용하여 세포증식 억제 정도를 측정하였다. Inflexinol 을 다양한 농도 (10, 20, 30, 40 uM)로 넣고 24, 48, 72 시간 후 같은 방법으로 세포증식 억제 정도를 측정하였고, gemcitabine 또한 다양한 농도 (0.5, 1, 2, 5, 10 uM)로 넣고 24, 48, 72 시간 후 같은 방법으로 세포증식 억제 정도를 측정하였다. 배양액은 48 시간마다 교환하였다. CellTiter 96®AQueous non-reactive cell proliferation assay kit (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하는데 MTS/PMS 혼합액을 20 uL 각 well 에 분주하고 37 °C, 5% CO_2 환경의 incubator 에서 4 시간 배양 후 spectrophotometer 를 이용하여 490 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 대조군의 흡광도를 1 로하고 이에 대한 상대적인

비율을 계산하여 세포증식 억제 정도를 평가하였다. 72 시간 후 20-25% 세포증식을 억제하는 emodin, inflexinol 과 gemcitabine 의 농도를 구하여 세 가지 약물 병용 투여 시 세포증식 억제 효과를 비교하였다.

Emodin, inflexinol 과 gemcitabine 에 의한 세포자멸사 측정

췌장암 세포주를 6 well 용기에 배양하고 72 시간 후에 15%, 30% 세포증식을 억제하는 emodin, inflexinol 및 gemcitabine 의 농도를 구하여 첨가하고 48 시간 배양 후 세포자멸사 정도를 측정하였다. 부유되어 있는 세포와 plate 에 부착되어 있는 세포를 트립신을 처리하여 모으고 FITC-labeled annexin-V assay 를 이용하여 phosphatidylserine 의 externalization 을 초기 세포자멸사의 지표로 평가하였다. 즉, 트립신처리 된 검체를 원심분리하여 상층액을 버리고 annexin V binding 완충액 1 mL 로 부유시키고 이 중 100 uL 를 취해 FITC-labeled annexin V (Boehringer Ingelheim Bioproduct Partnership, Heidelberg, Germany)와 propodium iodide 를 차례로 첨가하고 실온에서 15 분간 방치 후 annexin V binding 완충액을 첨가하여 flow-cytometry 를 이용한 FACS 분석 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey,

USA)을 이용하여 세포자멸사가 진행 중인 세포의 비율을 정량화하였다.

단백질의 추출과 Western blot 분석

췌장암 세포주를 6 well 용기에 배양하고 48 시간 후에 15%, 30% 세포증식을 억제하는 농도의 emodin, inflexinol, gemcitabin 을 넣고 48 시간 후에 용해 완충액을 이용하여 총 단백을 추출하였다. 용해 완충액은 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% Nonidet P-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1ug/mL, aprotinin, leupeptin and pepsatin, 1 mM Na3VO4, 1mM NaF 을 이용하였다. 4 ℃ 에서 20 분간 세포를 용해하고 14,000 g 에서 10 분간 원심분리하여 단백질을 추출하고 BCA protein assay kit 를 이용하여 ELISA 방법으로 단백질을 정량화하였다. 20 ㎍/lane 의 검체를 젤에 올린 다음 12% SDS polyacrylamide gel 에 전기영동 하였다. 젤을 떼어내고 니트로셀룰로스막을 부착하여 20V, 4 ℃ 에서 하루 밤 동안 전기영동하여 단백질을 젤로부터 니트로셀룰로스막으로 전이시켰다. 1X TBS, 0.1% Tween-20, 1% w/v 탈지분유에 일차항체를 1:1000 의 농도로 희석한 용액에 니트로셀룰로스막을 담고 실온에서 1 시간 동안 서서히 흔들면서 방치한 후 세척하였다. 세포자멸사와 관련된 단백질인 survivin, NF-κB, Akt, Bax 에 대한 항체 (SantaCruz Biotechnology, California, USA)를 일차

항체로 사용하고, 이차항체로는 HRP (horse radish peroxidase) 접합 항묘 혹은 항마우스 immunoglobulin G 를 사용하였다. 이차항체를 1X TBS, 0.1% Tween-20, 1% w/v 탈지분유에 1:2000 으로 희석한 용액에 니트로셀룰로스막을 담그고 실온에서 1 시간 동안 서서히 흔들면서 방치한 후 1X TBS, 0.1% Tween-20 용액으로 5 분씩 4 회 세척하였다. Amersham enhanced chemiluminescence kit (Amersham Bioscience, New Jersey, USA)에 들어있는 용액 1 과 2 를 1:1 로 섞은 후 blot 위에 붓고 1 분 간 실온에 방치하였다. 용액을 제거하고 공기방울을 모두 제거한 후 비닐랩으로 씌워 즉시 카세트에 X-선 필름과 함께 넣고 실온에 방치한 후 현상하였다.

실험동물

4주령의 수컷 BALB/c 누드마우스를 실험에 사용하였다 (오리엔트바이오 주식회사, 경기도, 대한민국). 누드마우스는 실험 시작 1 주전 동안 12 시간 간격의 명암 주기를 가지고 상온으로 유지되는 사육실에서 순응기를 갖게 하였다. 이 기간 동안 사료나 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험동물의 관리와 실험은 서울대학교병원의생명연구원 전임상실험부의 IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인을 획득하고 시행하였다.

종양세포 이식 및 실험

RPMI-1640 0.1 mL에 부유시킨 1 X 10^6 개의 Panc-1 췌장암

세포주를 마우스의 우측 배부에 피내주사 하였다. 주입한 종양 세포의 생착을 촉진 시키기 위해 췌장암 세포주 부유액을 Matrigel (BD Biosciesnces, Bedford, MA)에 4:6의 비율로 섞은 다음에 마우스에 주사하였다.

암세포 주사 2주 후 피하종괴가 관찰되고 촉지되면 25마리 마우스 들을 각각 5마리씩 1개의 대조군과 4개의 치료군으로 무작위로 나누어 약물의 복강 내 투여를 시작하였다. 대조군 (제1군)은 normal saline 0.1 mL를, 4개의 치료군은 gemcitabine (125 mg/kg), emodin (40 mg/Kg), inflexinol (12 mg/Kg)을 조합 (제2군: gemcitabine 단독, 제3군: gemcitabine + emodin, 제4군: gemcitabine + inflexinol, 제5군: gemcitabine + emodin + inflexinol) 하여 1주일에 두 번씩 4주간 복강 내 투여하였다. 매주마다 마우스의 무게를 측정하였고, 종괴의 크기를 캘리퍼로 측정하고 다음과 같은 공식을 이용하여 종양의 부피를 측정하였다. 종양 부피 = (길이 x 넓이^2) x π/6. 복강 내 투여가 끝나는 4주째 실험을 종료하여 각 군의 마우스에서 종괴를 외과적으로 절제한 후 크기를 측정하고 일반염색과 면역화학염색을 위해 포르말린에 고정한 뒤 일부 신선조직은 냉동절편으로 보관한 후에 단백추출 및 immunoblot을 위해 남겨두었다.

면역화학염색 및 TUNEL assay

조직은 4 μm 간격으로 microtome을 이용하여 절개하였다. 종양 세포에서 survivin와 NF-κB의 발현을 평가하기 위해 survivin과 NF-κB에 대한 일차 항체를 적절히 희석해서

면역화학염색을 시행하였다. Survivin과 NF-κB 발현 정도를 평가하기 위해, 발현된 범위에 따라 0, +1, +2, +3 (+1: 0-25%, +2: 25-50%, +3: > 50%)으로 구분하였고, 4 μm 두께의 조직 절편에서 5 개의 무작위적 현미경 시야 (x200)에서 +2 이상을 보인 시야의 비율을 계산해서 정량화 하였다 (23). 세포자멸사의 정도를 평가하기 위해 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling) 염색법을 사용하였으며, 4 μm 두께의 조직 절편에서 10 개의 무작위적 현미경 시야 (x400)에서 100 개의 종양 세포 당 관찰되는 TUNEL 양성 종양 세포의 숫자를 세어 정량화 하였다.

종양 조직 세포핵 단백질 추출

절개된 조직 절편은 30 분 동안 0.5 mL ice-cold buffer (10mmol/L Hepes (pH 7.9), 1.5 mmol/L KCl, 10mmol/L MgCl2, 0.5 mmol/L DTT, 0.1% IGEPAL CA-630, and 0.5 mmol/L PMSF) 배양하였다. 절개된 절편은 Donce homogenizer를 이용하여 4 ℃에서 15 분간 원심 분리하였다. 정제된 핵입자는 200 μlL of buffer B [20 mmol/L Hepes (pH 7.9), 25% glycerol, 1.5 mmol/L MgCL2, 420 mmol/L NaCl, 0.5 mmol/L DTT, 0.2 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L PMSF, and 4 μmol/L leupeptidin에 띄운 후 30 분간 얼음에 배양하였다. 용해된 물질은 4 ℃에서 14,000 rpm으로 15 분간 원심 분리 후 the BCA assay kit 을 이용하여 측정하였다. 핵단백질의 Anti-Rb immunoblotting은 loading contol으로 사용하였다.

통계적 분석

모든 실험 과정은 세 번에 걸쳐 반복하였으며, 종양의 부피를 포함한 자료는 평균+/-표준오차 형태로 제시하였다. 시간에 따른 각 군 간의 종양의 부피의 차이를 분석하기 위해 mixed effects model을 이용한 repeated measure analysis를 시행하였고, 각 군 간의 TUNEL 양성 종양 세포 비율의 비교는 two-tailed Student's t-test for unpaired samples으로 시행하였다. *P* value는 0.05 미만일 때 통계적으로 의미 있다고 판단하였다.

결 과

췌장암 세포주에 대한 emodin 과 inflexinol 의 세포 증식 억제 효과

Panc-1 및 MiaPaCa-2 췌장암 세포주를 각기 다른 농도 (0-80 uM)의 emodin 과 inflexinol 에 48 시간 동안 폭로 시킨 후 MTS assay 를 시행하였을 때, 농도 의존적인 세포 증식 억제 효과가 관찰되었다 (그림 1).

췌장암 세포주에 대한 inflexinol 의 세포자멸사 유도효과

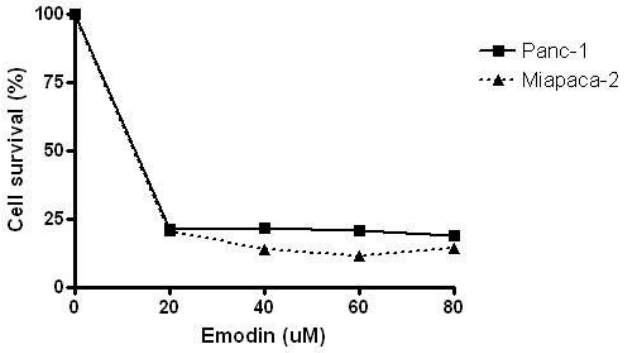
세포자멸사 유도 효과를 살펴보기 위하여 Panc-1 췌장암 세포주를 0-60 uM 의 inflexinol 에 폭로시킨 후 FITC-labeled annexin V assay 를 시행하였을 때 용량 의존적인 세포자멸사 유도 효과가 관찰되었다 (그림 2).

세포자멸사 관련 단백질들의 발현 양상

MiaPaCa-2 췌장암 세포주를 0-60 uM 의 emodin 과 inflexinol 에 폭로시킨 후 세포자멸사와 관련된 단백질의 발현 양상을 살펴보았을 때, 항세포자멸사 단백질인 survivin 과 Akt 의 발현은 대조군에 비해 emodin 처리 후 농도 의존적으로 감소하였으며, 세포자멸사 단백질로 알려진 Bax 는 대조군에 비해

inflexinol 처리 후 농도 의존적으로 증가하였다 (그림 3A). Panc-1 및 MiaPaCa-2 췌장암 세포주를 gemcitabine 과 emodin, inflexinol 을 병합하여 폭로시켰을 때에도 survivin 의 발현은 대조군에 비해 emodin 처리군에서 감소하였고, Bax 의 발현은 대조군에 비해 모든 치료군에서 증가하였다 (그림 3B). Panc-1 세포주를 gemcitabine 과 emodin, inflexinol 을 병합하여 폭로시켰을 때, inflexinol 치료군에서 대조군에 비해 NF-κB 의 활성도가 현저하게 감소되는 소견이 관찰되었다 (그림 3C).

(A)



(B)

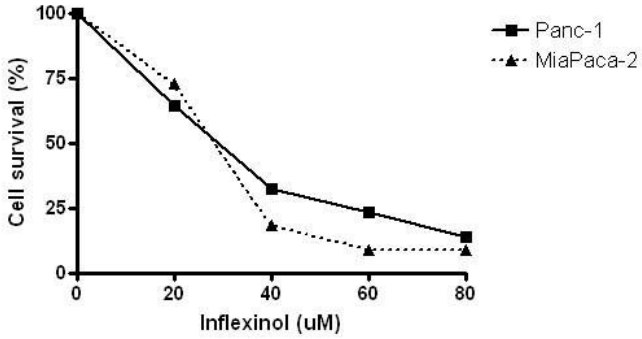


그림 1. Panc-1 (A)과 MiaPaCa-2 (B) 췌장암 세포주에 emodin 과 inflexinol 을 48 시간 동안 처리하고 MTS assay 를 시행한 결과 농도 의존적인 세포 증식 억제 효과가 관찰된다.

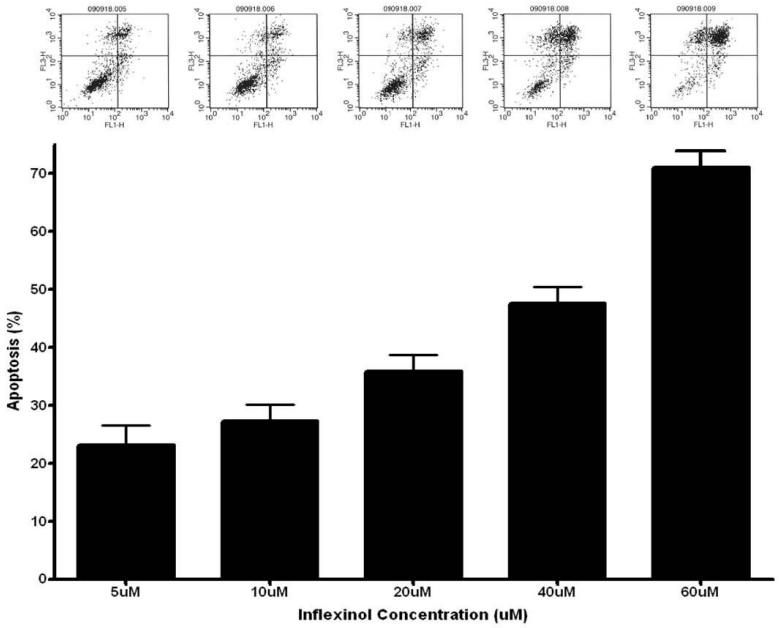
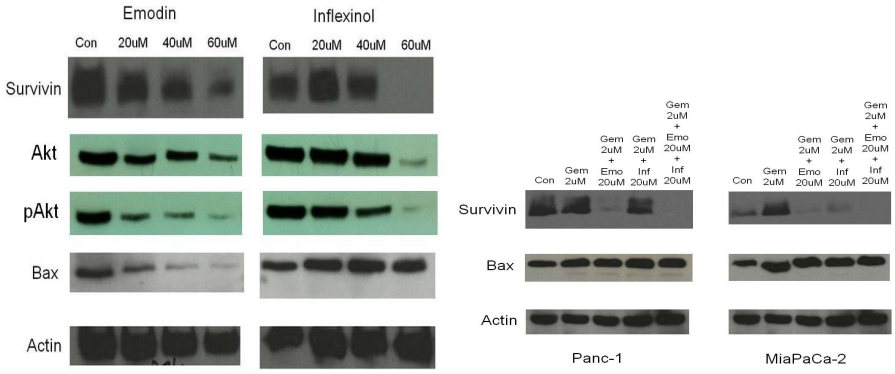


그림 2. Panc-1 췌장암 세포주에 inflexinol 을 처리하고 FITC-labeled annexin V assay 를 시행한 결과 용량 의존적인 세포자멸사 유도 효과가 관찰된다.

(A) (B)



(C)

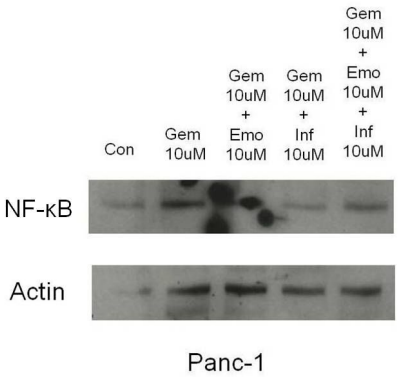


그림 3. Panc-1 과 MiaPaCa-2 췌장암 세포주에 emodin 과 inflexinol 을 처리한 후의 세포자멸사와 관련된 단백질의 발현 양상. (A) Survivin 과 Akt 의 발현은 emodin 처리 후 농도 의존적으로 감소하고 Bax 의 발현은 inflexinol 처리 후 농도 의존적으로 증가하는 소견이 관찰된다. (B) Gemcitabine 과 emodin, inflexinol 을 병합하여 처리할 경우 survivin 의 발현은 대조군에 비해 emodin 처리군에서 감소하고 Bax 의 발현은 대조군에 비해

모든 치료군에서 증가하는 소견이 관찰된다. (C) Gemcitabine 과 emodin, inflexinol 을 병합하여 처리할 경우 inflexinol 치료군에서 대조군에 비해 NF-κB 의 활성도가 현저하게 감소되는 소견이 관찰된다.

췌장암 세포주에서 emodin 과 inflexinol 병합요법의 세포 증식 억제 효과

Panc-1 췌장암 세포주에서 각기 다른 농도의 emodin 10 uM, 20 uM 을 역시 여러 농도의 inflexinol (0-40 uM)과 병합하여 전처치 한 후 48 시간 째에 MTS assay 를 시행한 결과 inflexinol 의 농도 의존적 세포 증식 억제 효과가 emodin 에 의하여 농도 의존적으로 증강되었다 (그림 4).

췌장암 세포주에서 gemcitabine 에 의해 유발된 세포자멸사 유도에 대한 inflexinol 의 영향

Panc-1 및 MiaPaCa-2 췌장암 세포주에서 각기 다른 농도의 gemcitabine 5 uM, 10 uM 을 inflexinol (5 uM)과 병합하여 전처치 한 후 FITC-labeled annexin V assay 를 시행하였을 때 용량 의존적인 세포자멸사 유도 효과가 관찰되었다. Inflexinol 을 병합하였을 경우 gemcitabine 단독으로 투여하였을 때와 비교하여 유의하게 높은 정도의 세포자멸사 유도가 관찰되었다 (그림 5).

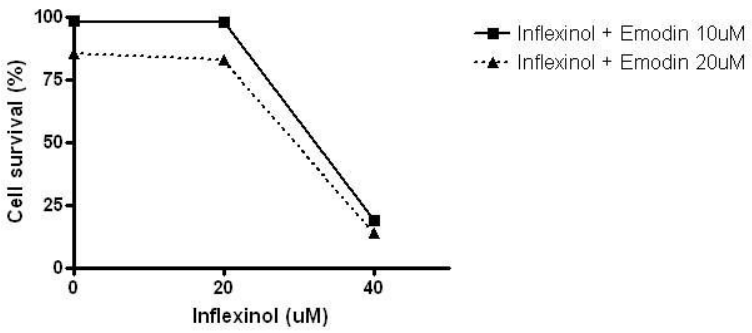
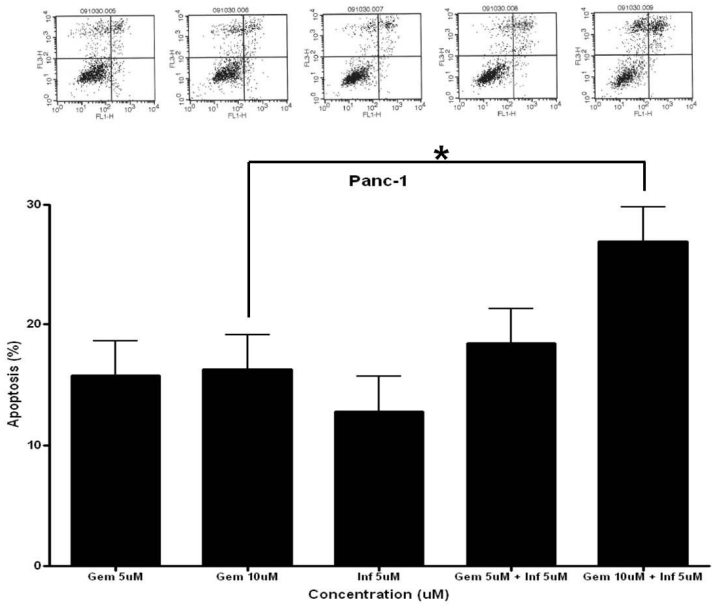


그림 4. Panc-1 췌장암 세포주에 emodin 과 inflexinol 을 병합하여 처리한 후 48 시간 후에 MTS assay 를 시행한 결과 inflexinol 의 농도 의존적 세포 증식 억제 효과가 emodin 에 의하여 농도 의존적으로 증강되는 효과가 관찰된다.

(A)


Panc-1
*
Apoptosis (%)
30
20
10
0
Gem 5uM
Gem 10uM
Inf 5uM
Gem 5uM + Inf 5uM
Gem 10uM + Inf 5uM
Concentration (uM)

(B)

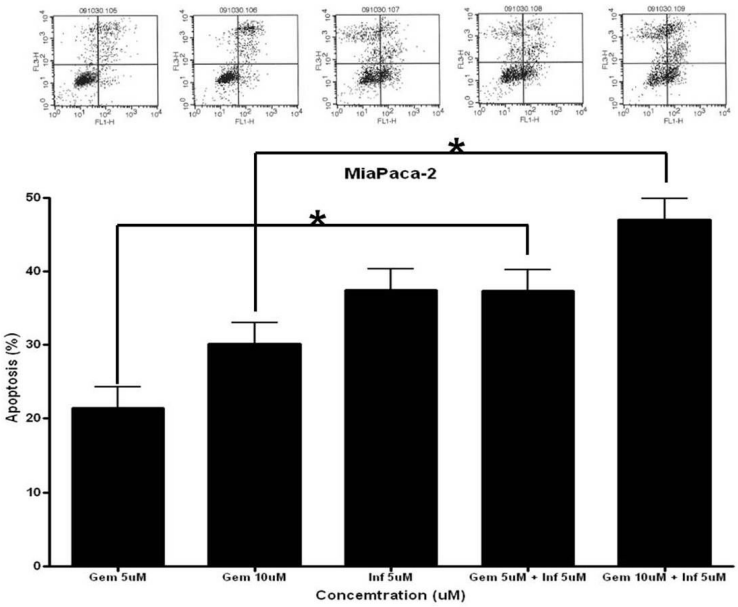

MiaPaca-2
*
*
Apoptosis (%)
50
40
30
20
10
0
Gem 5uM
Gem 10uM
Inf 5uM
Gem 5uM + Inf 5uM
Gem 10uM + Inf 5uM
Concemtration (uM)

그림 5. Panc-1 (A)과 MiaPaCa-2 (B) 췌장암 세포주에 gemcitabine 과 inflexinol 을 병합하여 처리하고 FITC-labeled annexin V assay 를 시행한 결과 inflexinol 을 병합할 경우 gemcitabine 단독으로 투여할 경우와 비교하여 유의하게 높은 정도의 세포자멸사 유도가 관찰된다. 통계적으로 유의한 차이가 있는 경우 '*'로 표시하였다 ($P < 0.05$).

누드마우스를 이용한 췌장암의 이종이식 모델에 있어서 gemcitabine 의 종양 증식 억제 효과에 대한 emodin 과 inflexinol 의 영향

Panc-1 췌장암 세포주를 누드마우스에 피하 접종하여 췌장암을 유발한 후 종양의 부피 변화를 측정하여 gemcitabine 과 emodin, inflexinol 병합 투여의 종양 증식 억제 효과를 살펴보았다 (그림 6A, B). 그 결과 치료군 (2-5 군) 모두에서 대조군 (1 군)에 비해 통계적으로 유의한 종양 증식 억제 효과를 나타내었고, 시간에 따라 각 군 간의 종양 증식 정도의 차이가 다르게 나타났다. 시간 별로 군 간의 차이를 분석하였을 때 병합치료군 (3-5 군)에서 대조군 (1 군)에 비해 통계적으로 유의한 종양 증식 억제 효과를 보였고, gemcitabine 단독치료군 (2 군)과 비교해도 통계적인 유의성은 없었으나 종양 증식 억제 효과가 더 큰 경향을 보였다. 두 가지 약제를 병합한 치료군 (3, 4 군)과 세 가지 약제를 병합한 치료군 (5 군) 사이에는 종양 증식에 있어서 거의 차이를 보이지 않았다 (그림 6A, B). 시간에 따른 마우스의 무게 변화를 분석한 결과 각 군 간에 거의 차이를 보이지 않았다 (그림 6C).

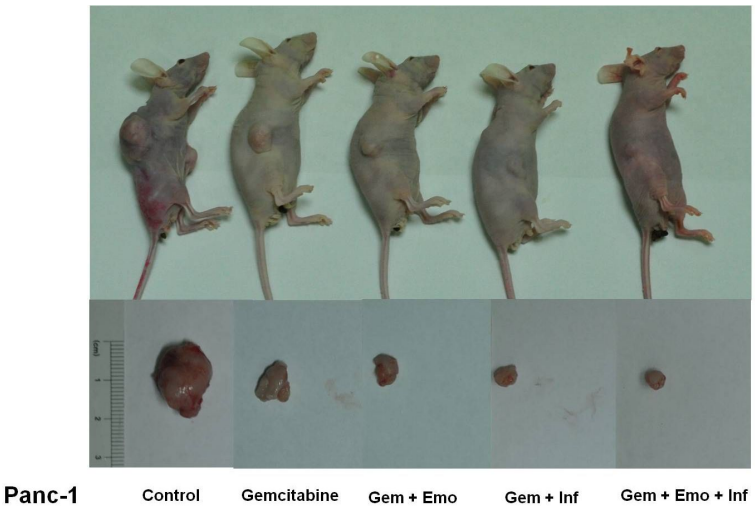
적출한 종양 조직에 대해 면역화학염색을 시행한 결과 survivin 의 발현은 emodin 을 병합한 군 (3, 5 군)에서 gemcitabine 단독치료군 (2 군)에 비해 감소되어 있었고 (그림 7A, B), NF-κB 의 발현은 inflexinol 을 병합한 군 (4, 5 군)에서 gemcitabine 단독치료군 (2 군)에 비해 감소되어 있었다 (그림 8A, B).

종양 세포의 세포자멸사 정도를 확인하기 위해 TUNEL 염색을 시행한 결과 병합치료군 (3-5 군)에서 대조군 (1 군)이나 gemcitabine 단독치료군 (2 군)에 비해 세포자멸사의 정도가 유의하게 증강되어 있었다. 병합치료군 (3-5 군) 사이를 비교하였을 때 세 가지 약제를 병합한 치료군 (5 군)에서 두 가지 약제를 병합한 치료군 (3, 4 군)에 비해 세포자멸사 정도가 약간 높은 경향을 보였지만 통계적인 유의성은 없었다 (그림 9A, B).

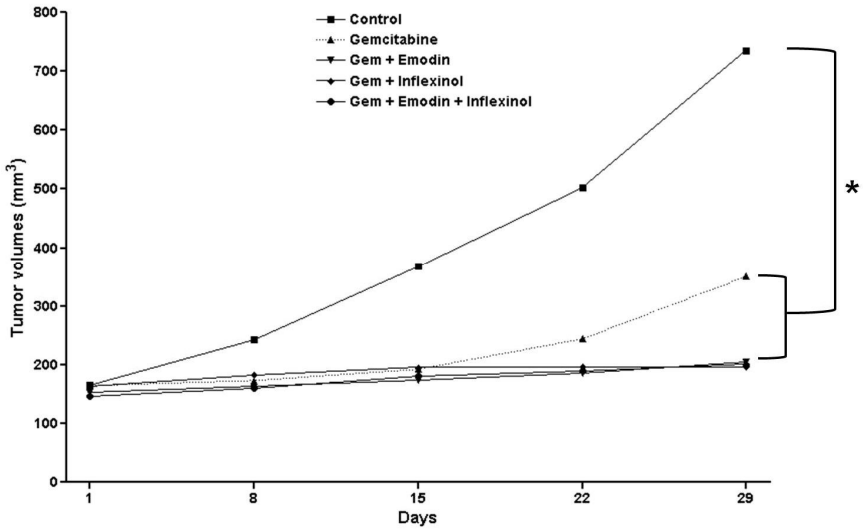
세포자멸사와 관련된 단백질에 대하여 Western blot 을 시행한 결과 gemcitabine 에 의해 활성화된 survivin 의 발현이 emodin 을 병합한 군 (3, 5 군)에서 억제된 소견을 보였고, gemcitabine 에 의해 활성화된 NF-κB 의 발현이 inflexinol 을 병합한 군 (4, 5 군)에서 억제된 소견이 관찰되었다. 세포자멸사 단백질인 Bax 의 발현은 병합치료 군 (3-5 군)에서 증가된 소견을 보였다 (그림 10).

모든 실험 대상 누드마우스는 실험 시작일부터 희생일 까지 생존하였다.

(A)


Panc-1
Control
Gemcitabine
Gem + Emo
Gem + Inf
Gem + Emo + Inf

(B)


Control
Gemcitabine
Gem + Emodin
Gem + Inflexinol
Gem + Emodin + Inflexinol
Tumor volumes (mm3)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
1
8
15
22
29
Days
*

(C)

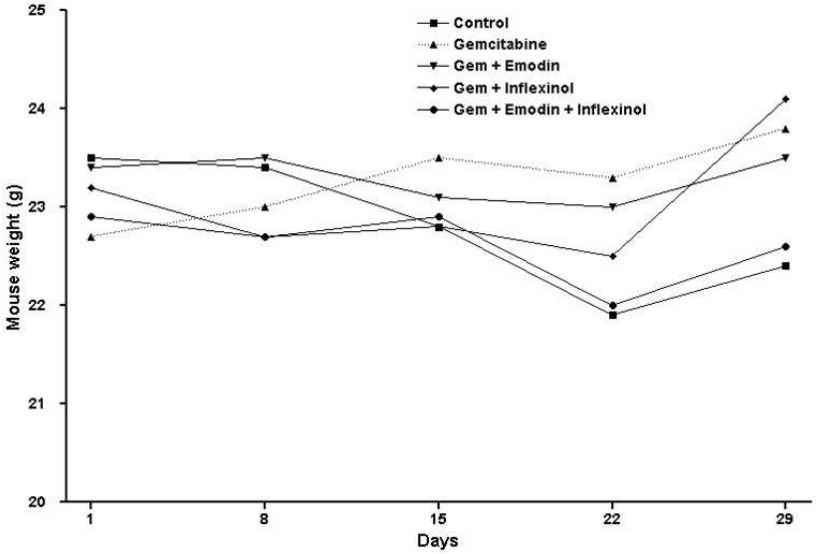
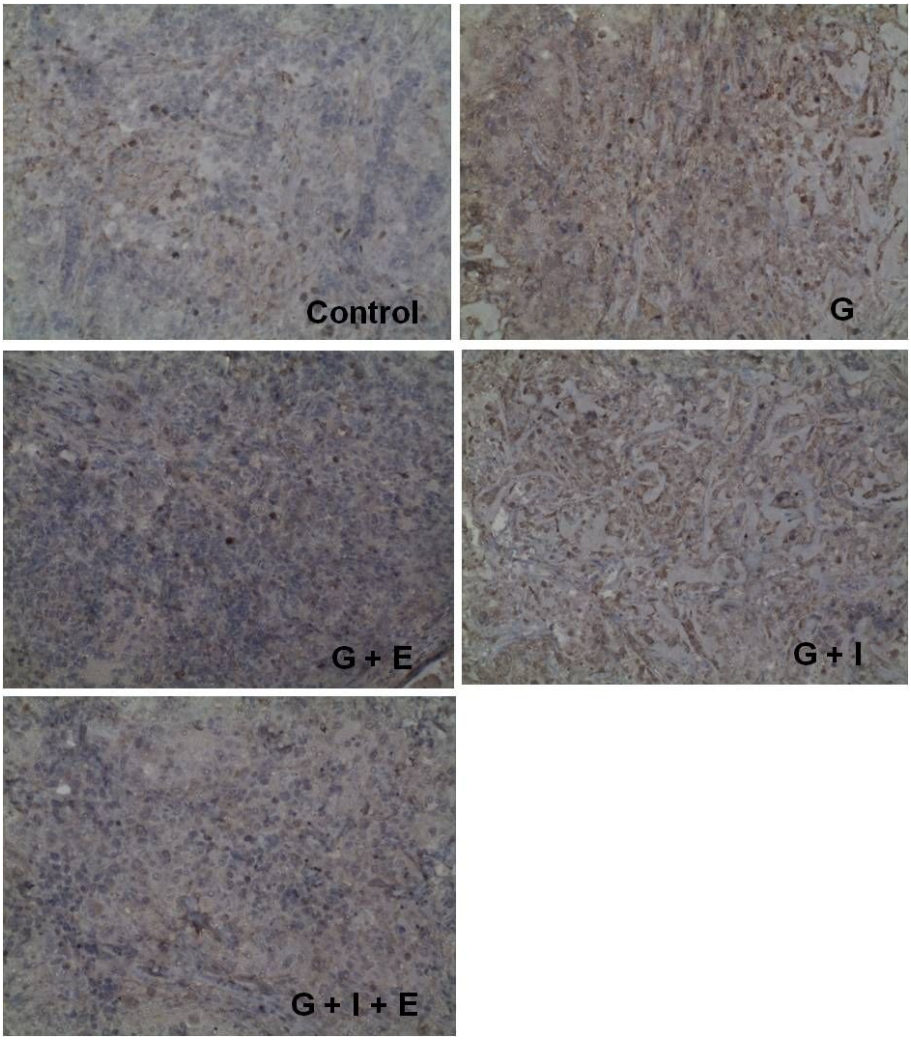


그림 6. 췌장암 세포주를 이용한 누드마우스 모델에서 각 군에서의 마우스와 종양세포의 육안적 소견 (A)과 시간에 따른 종양의 부피 (B) 및 마우스 무게 (C)의 변화. Gemcitabine 과 emodin, inflexinol 병합치료 시 종양 증식 억제 효과가 증강되는 소견이 관찰된다. 통계적으로 유의한 차이가 있는 경우 '*' 로 표시하였다 ($P < 0.05$).

(A)



(B)

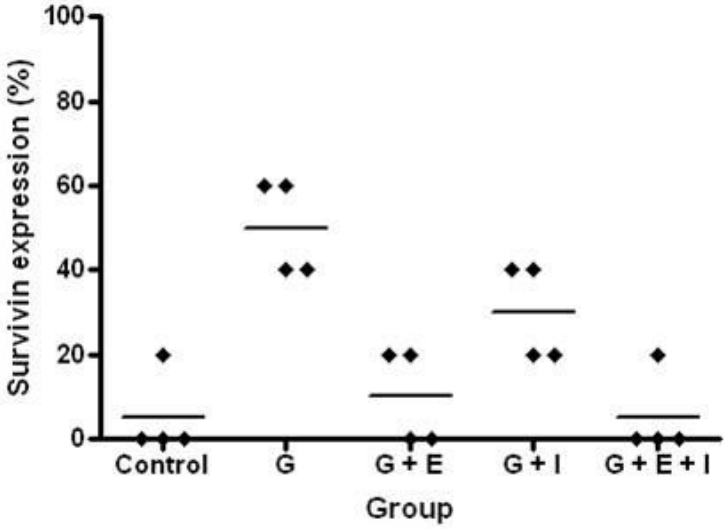
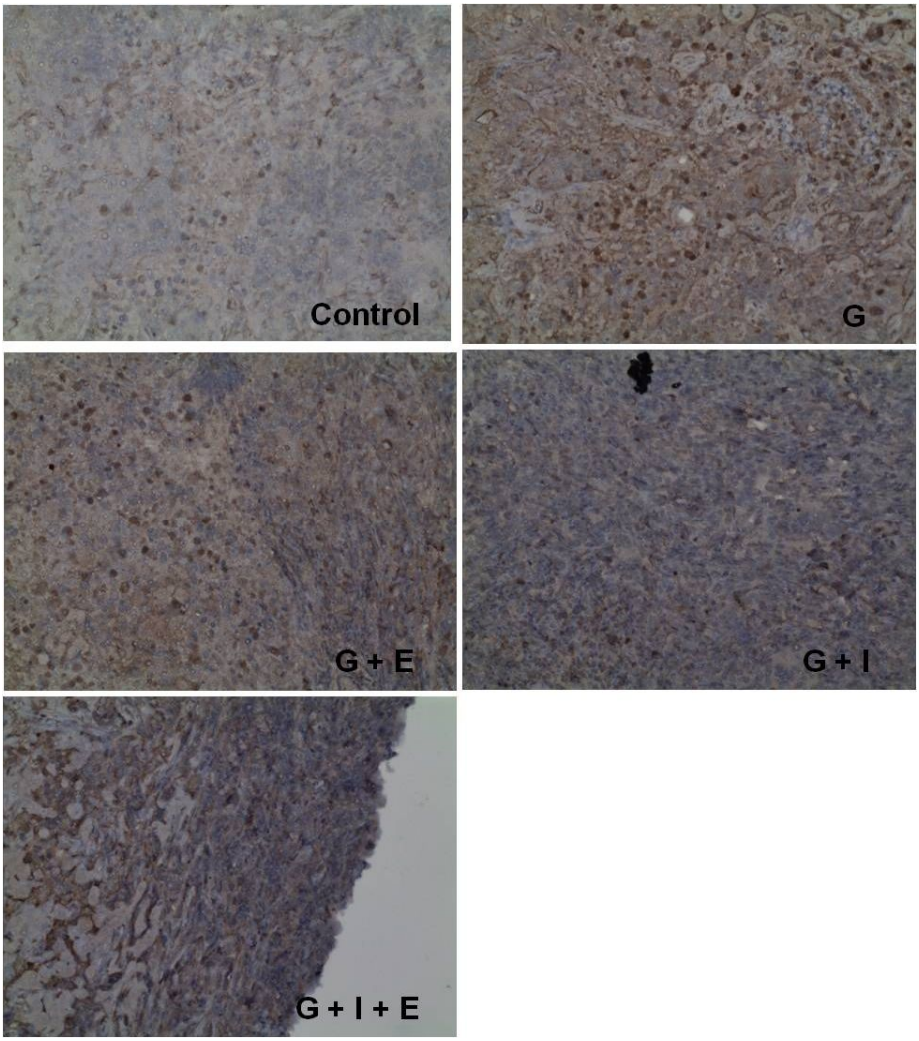


그림 7. 누드마우스에서 적출한 종양 조직에 대한 survivin 면역화학염색 소견. (A) 현미경 소견 (x200), (B) 각 군에서의 survivin 발현 비율. Survivin 의 발현이 emodin 을 병합한 군 (3, 5 군)에서 gemcitabine 단독치료군 (2 군)에 비해 감소되어 있는 소견이 관찰된다. G – gemcitabine, E – emodin, I – inflexinol.

(A)



(B)

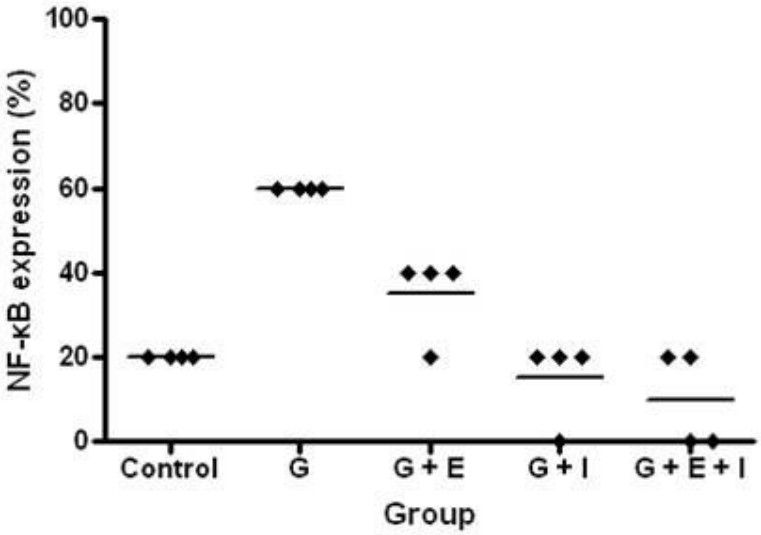
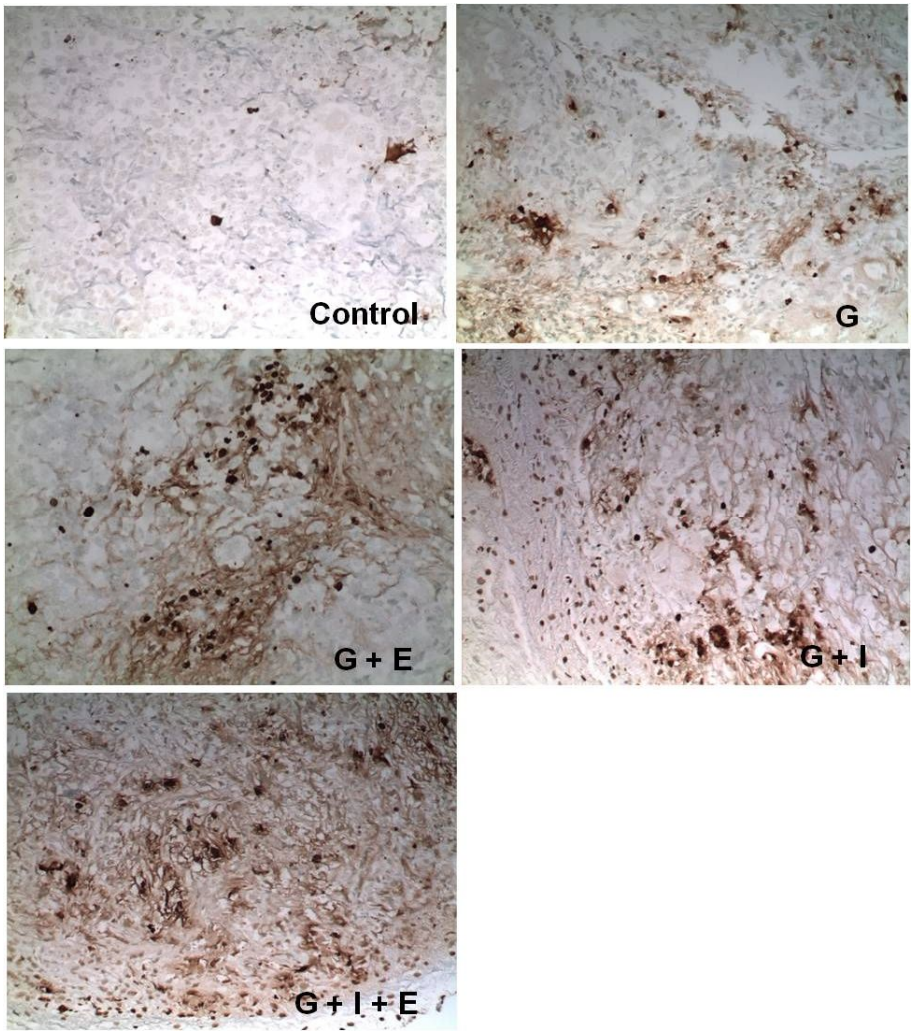


그림 8. 누드마우스에서 적출한 종양 조직에 대한 NF-κB 면역화학염색 소견. (A) 현미경 소견 (x200), (B) 각 군에서의 NF-κB 발현 비율. NF-κB 의 발현이 inflexinol 을 병합한 군 (4, 5 군)에서 gemcitabine 단독치료군 (2 군)에 비해 감소되어 있는 소견이 관찰된다. G – gemcitabine, E – emodin, I – inflexinol.

(A)



(B)

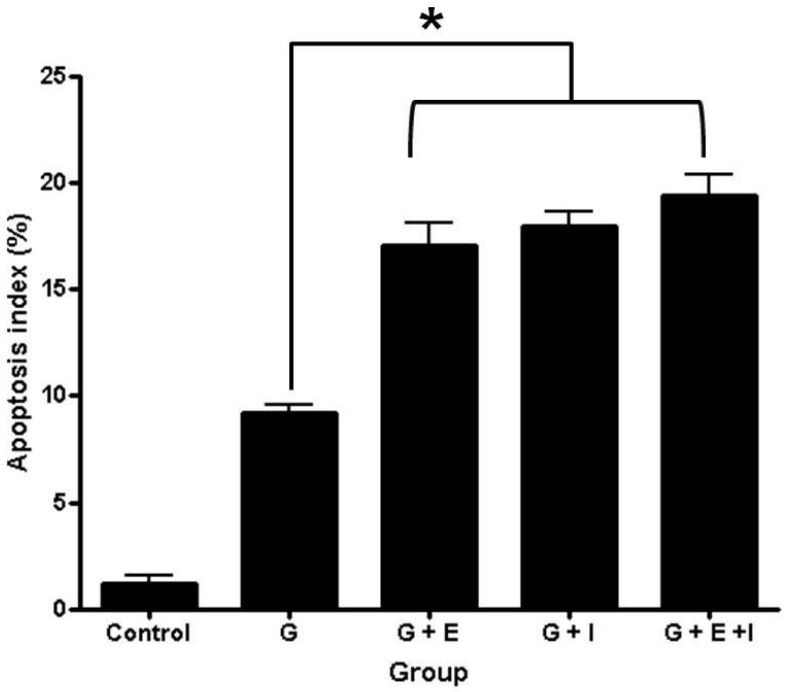


그림 9. 누드마우스에서 적출한 종양 조직에 대한 TUNEL 염색 소견. (A) 현미경 소견 (X200), (B) 각 군에서의 TUNEL 발현의 정량적 소견. 병합치료군 (3~5 군)에서 대조군 (1 군)이나 gemcitabine 단독치료군 (2 군)에 비해 세포자멸사의 정도가 유의하게 증강되어 있는 소견이 관찰된다. 통계적으로 유의한 차이가 있는 경우 '*' 로 표시하였다 ($P < 0.05$). G – gemcitabine, E – emodin, I – inflexinol.

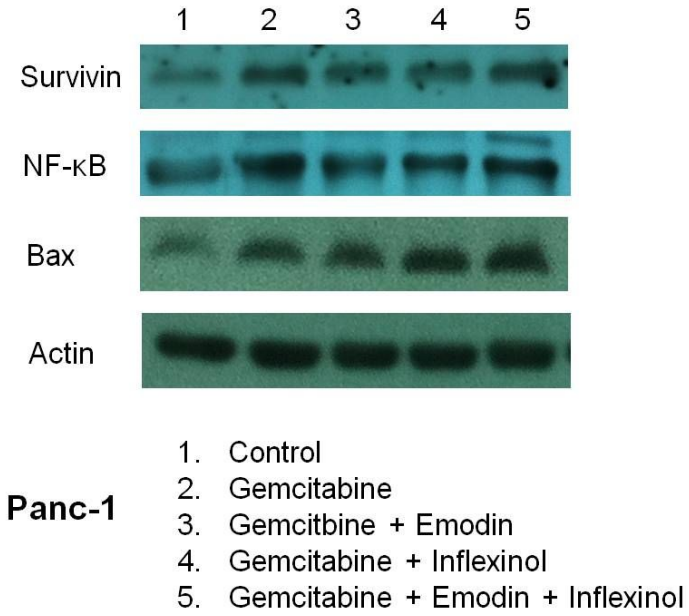


그림 10. 누드마우스에서 적출한 종양 조직에서 단백질을 추출해서 시행한 Western blot 소견. Gemcitabine 에 의해 활성화된 survivin 과 NF-κB 의 발현이 emodin 투여 (3, 5 군)와 inflexinol 투여 (4, 5 군)로 억제되는 소견이 관찰된다. Bax 의 발현은 병합치료 군 (3-5 군)에서 증가되는 소견이 관찰된다.

고 찰

진행성 췌장암 치료에서 gemcitabine 투여는 표준치료로 알려져 있지만 완전 관해는 거의 이룰 수 없고 생존 기간 연장 효과도 미비하여 gemcitabine과 다른 항암제의 병합요법에 대한 많은 임상 연구가 시도 되었다. 그 중 일부 연구에서는 gemcitabine 병합 투여군의 장점이 임상 시험을 통해 입증되고 있으나 (24), 아직까지도 환자의 활동 능력이 양호해야 하며 항암제의 독성을 잘 이겨낼 수 있는 환자군 에서만 유용하며 그 생존율 향상은 미비한 것으로 알려져 있다. 따라서, 이러한 항암제 병합요법의 단점을 극복하기 위해 세포독성이 작고 gemcitabine의 약리 효과를 증강시킬 수 있는 물질의 발견이 필요한 상황이다.

최근에는 자연에 존재하는 천연 물질을 통해 종양 세포의 기존의 항암제에 대한 감수성을 증진시켜 치료 효과를 얻고자 하는 새로운 방법 들이 주목을 받고 있어 췌장암에 대해서도 flavonoid나 curcumin, guggulsterone과 같은 천연 물질을 이용한 연구들이 시행되어 왔다 (25-29). 본 연구는 그 중 emodin과 inflexinol에 주목하여 이들 약제가 세포자멸사 효과를 증진시켜 gemcitabine의 항암효과를 극대화할 수 있다는 가정 하에 시작되었고, 연구 결과 병합요법의 효과를 입증함으로써, 추후 이들 병합요법에 대한 임상 연구를 위한 근거를 마련하였다는 데에 의미가 있다고 하겠다.

Emodin을 gemcitabine과 병합하였을 경우 췌장암에 대한 항암효과에 미치는 영향을 보고한 최근의 연구에서 emodin은 survivin level의 down-regulation을 통해 gemcitabine의

항암효과를 증강시킨다고 보고하였다 (30). Survivin은 세포 분열의 조절과 세포자멸사의 억제에 관여하는 apoptosis gene family 중 하나로 다수의 악성 종양에서 발현되는 것으로 알려져 있고 caspase 활성 및 진행을 방해하여 세포자멸사를 억제하고 궁극적으로 항암제에 대한 내성을 발현하게 하는 것으로 알려져 있다 (31,32). 이 연구에서는 췌장암 세포주에서 gemcitabine에 emodin을 병합할 경우 gemcitabine을 단독 투여하는 경우 보다 세포 증식의 억제 및 세포자멸사의 유도 효과가 유의하게 높다고 보고하였고 gemcitabine 단독 투여 시 증가된 survivin의 발현이 emodin을 병합하게 되면 유의하게 억제됨을 보고하였다. 또한 *in vivo* 연구에서도 같은 기전을 통해 췌장암의 증식을 억제함을 보고하였다 (30).

최근 연구들을 통해 NF-κB는 특유의 신호 전달 체계를 통해 혈관생성과 세포자멸사, 세포 증식, 전이 등의 종양의 진행 과정에 긴밀히 관여하는 것으로 알려져 있어 (20,21), 이러한 NF-κB를 차단하는 것도 항암효과를 극대화하기 위한 새로운 표적으로 각광받고 있다. 본 연구에서 주목한 inflexinol은 여러 연구를 통해 NF-κB를 억제하고 있음이 잘 알려져 있고(17,19) 실제 대장암 세포주를 이용한 *in vitro* 및 *in vivo* 연구에서 inflexinol으로 인해 종양의 증식이 억제됨이 보고되었다 (22). 본 연구는 inflexinol이 췌장암에서도 같은 기전을 통해 효과를 발휘하고 gemcitabine과 병합 투여 시 부가적인 효과가 있음을 보고한 최초의 연구로 그 의미가 크다고 하겠다.

본 연구에서 emodin과 inflexinol은 각각 survivin과 NF-κB의

억제를 통해 세포자멸사를 유도하고 췌장암 세포주의 증식을 억제시켰고 이러한 결과는 누드마우스를 이용한 실험에서도 그대로 재현되었다. 누드마우스 실험에서 emodin이나 inflexinol을 병합하였을 경우 종양 증식의 억제 효과가 증강되었고 이러한 기전은 survivin과 NF-κB의 억제로 인한 세포자멸사의 유도에 의한 것임이 확인되었다.

여러 연구들에서 천연 물질 들이 췌장암의 증식을 억제하는 효과가 있음이 보고되고 있으나 이러한 천연 물질 들 중 임상 시험에서 효과 및 독성이 평가된 경우는 드물다. 또한, 예상치 못한 독성의 가능성을 최소화하면서 항암효과를 극대화 하기 위해서는 가능하면 낮은 용량으로 여러 항암제의 조합을 시도하는 것이 의미가 있을 것으로 보여진다. 따라서, 이러한 점에 주목하여 본 연구에서는 작용 기전이 다른 천연 물질 들을 조합할 경우 항암효과를 극대화 할 수 있다는 가정 하에 기존의 표준치료제인 gemcitabine 항암제에 emodin 과 inflexinol 두 가지의 천연 물질을 함께 병합하는 병합요법을 시도하였다. 본 연구 결과 작용 기전이 다른 emodin 과 inflexinol 을 함께 병합하였을 경우 gemcitabine 단독 투여 시 보다 종양 증식의 억제 효과가 증진되었지만 emodin 이나 inflexinol 중 한 가지만을 병합한 경우와는 큰 차이가 없었다. 하지만, 본 연구의 결과는 두 가지 이상의 천연 물질을 병합하는 병합요법의 효과가 기존의 병합요법에 비해 떨어지지 않는다는 것을 보여주었고, 시간에 따른 마우스의 무게 변화가 각 군 간에 차이가 없어 두 가지 이상의 천연 물질을 병합해도 부작용이 크지 않음을 보여줌으로써,

항암효과는 극대화 하면서 잠재적인 독성을 최소화하기 위한 낮은 용량의 여러 약제의 조합의 가능성을 열었다는 점에서 그 의미가 있다고 하겠다.

결론적으로 gemcitabine과 emodin, inflexinol의 병합 투여는 survivin 및 NF-κB의 억제를 통한 세포자멸사 유도를 통해 췌장암에 대한 항암효과를 증진시키는 효과를 보였다. 본 연구 결과는 여러 약제의 다양한 병합요법에 대한 임상 연구를 위한 근거를 제시하였고 이러한 병합요법이 추후 임상에서 췌장암의 치료에 있어 유용한 치료 전략이 될 수 있음을 보여주고 있다.

참 고 문 헌

1. Lillemoe KD. Current management of pancreatic carcinoma. Ann Surg. 1995 Feb;221:133-48.

2. Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. Pancreatic cancer. Lancet. 2004 Mar;363:1049-57.

3. Burris HA, 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. J Clin Oncol. 1997 Jun;15:2403-13.

4. Moore MJ, Hamm J, Dancey J, Eisenberg PD, Dagenais M, Fields A, et al. Comparison of gemcitabine versus the matrix metalloproteinase inhibitor BAY 12-9566 in patients with advanced or metastatic adenocarcinoma of the pancreas: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. J Clin Oncol. 2003 Sep;21:3296-302.

5. Van Cutsem E, van de Velde H, Karasek P, Oettle H, Vervenne WL, Szawlowski A, et al. Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer. J Clin Oncol. 2004 Apr;22:1430-8.

6. Xiong HQ, Rosenberg A, LoBuglio A, Schmidt W, Wolff RA, Deutsch J, et al. Cetuximab, a monoclonal antibody targeting the epidermal growth factor receptor, in combination with gemcitabine for advanced pancreatic cancer: a multicenter phase II Trial. J Clin Oncol. 2004 Jul;22:2610-6.

7. Chen YC, Shen SC, Lee WR, Hsu FL, Lin HY, Ko CH, et al. Emodin induces apoptosis in human promyeloleukemic HL-60 cells accompanied by activation of caspase 3 cascade but independent of reactive oxygen species production. Biochem Pharmacol. 2002 Dec;64:1713-24.

8. Jing X, Ueki N, Cheng J, Imanishi H, Hada T. Induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines by emodin. Jpn J Cancer Res. 2002 Aug;93:874-82.

9. Srinivas G, Anto RJ, Srinivas P, Vidhyalakshmi S, Senan VP, Karunagaran D. Emodin induces apoptosis of human cervical cancer cells through poly(ADP-ribose) polymerase cleavage and activation of caspase-9. Eur J Pharmacol. 2003 Jul;473:117-25.

10. Zhang L, Lau YK, Xi L, Hong RL, Kim DS, Chen CF, et al. Tyrosine kinase inhibitors, emodin and its derivative repress HER-2/neu-induced cellular transformation and metastasis-associated properties. Oncogene. 1998 Jun;16:2855-63.

11. Cha TL, Qiu L, Chen CT, Wen Y, Hung MC. Emodin down-regulates androgen receptor and inhibits prostate cancer cell growth. Cancer Res. 2005 Mar;65:2287-95.

12. Huang Q, Shen HM, Shui G, Wenk MR, Ong CN. Emodin inhibits tumor cell adhesion through disruption of the membrane lipid Raft-associated integrin signaling pathway. Cancer Res. 2006 Jun;66:5807-15.

13. Kim MS, Park MJ, Kim SJ, Lee CH, Yoo H, Shin SH, et al. Emodin suppresses hyaluronic acid-induced MMP-9 secretion and invasion of glioma cells. Int J Oncol. 2005 Sep;27:839-46.

14. Kwak HJ, Park MJ, Park CM, Moon SI, Yoo DH, Lee HC, et al. Emodin inhibits vascular endothelial growth factor-A-induced angiogenesis by blocking receptor-2 (KDR/Flk-1) phosphorylation. Int J Cancer. 2006 Jun;118:2711-20.

15. Muto A, Hori M, Sasaki Y, Saitoh A, Yasuda I, Maekawa T, et al. Emodin has a cytotoxic activity against human multiple myeloma as a Janus-activated kinase 2 inhibitor. Mol Cancer Ther. 2007 Mar;6:987-94.

16. Shieh DE, Chen YY, Yen MH, Chiang LC, Lin CC. Emodin-induced apoptosis through p53-dependent pathway in human hepatoma cells. Life Sci. 2004 Mar;74:2279-90.

17. Hwang BY, Lee JH, Koo TH, Kim HS, Hong YS, Ro JS, et al. Kaurane diterpenes from Isodon japonicus inhibit nitric oxide and prostaglandin E2 production and NF-kappaB activation in LPS-stimulated macrophage RAW264.7 cells. Planta Med. 2001 Jul;67:406-10.

18. Lee JH, Koo TH, Hwang BY, Lee JJ. Kaurane diterpene, kamebakaurin, inhibits NF-kappa B by directly targeting the DNA-binding activity of p50 and blocks the expression of antiapoptotic NF-kappa B target genes. J Biol Chem. 2002 May;277:18411-20.

19. Nagashima F, Kondoh M, Uematsu T, Nishiyama A, Saito S, Sato M, et al. Cytotoxic and apoptosis-inducing ent-kaurane-type diterpenoids from the Japanese liverwort Jungermannia truncata NEES. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2002 Jun;50:808-13.

20. Nakshatri H, Bhat-Nakshatri P, Martin DA, Goulet RJ, Jr., Sledge GW, Jr. Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth. Mol Cell Biol. 1997 Jul;17:3629-39.

21. Viatour P, Merville MP, Bours V, Chariot A. Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. Trends Biochem Sci. 2005 Jan;30:43-52.

22. Ban JO, Oh JH, Hwang BY, Moon DC, Jeong HS, Lee S, et al. Inflexinol inhibits colon cancer cell growth through inhibition of nuclear factor-kappaB activity via direct interaction with p50. Mol Cancer Ther. 2009 Jun;8:1613-24.

23. Hezel AF, Deshpande V, Zimmerman SM, Contino G, Alagesan B, O'Dell MR, et al. TGF-beta and alphavbeta6 integrin act in a common pathway to suppress pancreatic cancer progression. Cancer Res. 2012 Sep;72:4840-5.

24. Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. J Clin Oncol. 2007 May;25:1960-6.

25. Kunnumakkara AB, Guha S, Krishnan S, Diagaradjane P, Gelovani J, Aggarwal BB. Curcumin potentiates antitumor activity of gemcitabine in an orthotopic model of pancreatic cancer through suppression of proliferation, angiogenesis, and inhibition of nuclear factor-kappaB-regulated gene products. Cancer Res. 2007 Apr;67:3853-61.

26. Lee SH, Ryu JK, Lee KY, Woo SM, Park JK, Yoo JW, et al. Enhanced anti-tumor effect of combination therapy with gemcitabine and apigenin in pancreatic cancer. Cancer Lett. 2008 Jan;259:39-49.

27. Murtaza I, Adhami VM, Hafeez BB, Saleem M, Mukhtar H. Fisetin, a natural flavonoid, targets chemoresistant human pancreatic cancer AsPC-1 cells through DR3-mediated inhibition of NF-kappaB. Int J Cancer. 2009 Nov;125:2465-73.

28. Strouch MJ, Milam BM, Melstrom LG, McGill JJ, Salabat MR, Ujiki MB, et al. The flavonoid apigenin potentiates the growth inhibitory effects of gemcitabine and abrogates gemcitabine resistance in human pancreatic cancer cells. Pancreas. 2009 May;38:409-15.

29. Ahn DW, Seo JK, Lee SH, Hwang JH, Lee JK, Ryu JK, et al. Enhanced antitumor effect of combination therapy with gemcitabine and guggulsterone in pancreatic cancer. Pancreas. 2012 Oct;41:1048-57.

30. Guo Q, Chen Y, Zhang B, Kang M, Xie Q, Wu Y. Potentiation of the effect of gemcitabine by emodin in pancreatic cancer is associated with survivin inhibition. Biochem Pharmacol. 2009 Jun;77:1674-83.

31. Altieri DC. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. Trends Mol Med. 2001 Dec;7:542-7.

32. Thomas S, Shah G. Calcitonin induces apoptosis resistance in prostate cancer cell lines against cytotoxic drugs via the Akt/survivin pathway. Cancer Biol Ther. 2005 Nov;4:1226-33.

Abstract

Introduction: Emodin and inflexinol are natural compounds possessing therapeutic potential against cancer via survivin and NF-κB inhibitory effects, respectively. However, the antitumor effect of inflexinol on pancreatic cancer has not been determined yet. This study was designed to whether the combination therapy with emodin, inflexinol and gemcitabine enhanced antitumor efficacy in pancreatic cancer.

Methods: The effect of combination treatment of emodin, inflexinol and gemcitabine on cell proliferation and apoptosis was examined in pancreatic cancer cell lines (Panc-1 and MiaPaCa-2). And then, the mechanisms responsible for the effect of the combination treatment were investigated. Finally, the xenograft model of pancreatic cancer was employed to notice the effect *in vivo*.

Results: *In vitro*, the combination treatment resulted in more growth inhibition and apoptosis through the down-regulation of survivin and NF-κB with suppression of Akt and through the activation of Bax in pancreatic cancer cell lines (Panc-1, MiaPaca-2). *In vivo*, the combination therapy augmented tumor growth inhibition through the same mechanisms in tumor tissue. However, the triple combination therapy (emodin, inflexinol and gemcitabine) did not show more tumor growth inhibition than the combination therapy with gemcitabine plus emodin or inflexinol.

Conclusions: The combination therapy with emodin, inflexinol and gemcitabine enhanced antitumor efficacy through survivin and NF-κB suppression and Bax activation.

Key words: pancreatic cancer, gemcitabine, inflexinol, emodin, NF-κB, survivin

Student number: 2011 – 30642