

저산소 환경에서 증가하는 SM22 α 에 의한 IGF1R/Akt 활성화, A549세포의 항암제 및 감마방사선 감수성 변화

김 태 립 · 김 인 규

한국 원자력 연구원

E-mail: trkim@kaeri.re.kr

중심어 : SM22, hypoxia, Cytotoxic drug, IGF-1R β /Akt

서 론

빠른 속도로 성장하는 암세포는 암세포의 중심부가 주변을 둘러싼 혈관으로부터의 거리가 점차 멀어지기 때문에 지속적으로 저산소 환경(hypoxic condition)에 노출된다. 이러한 극심한 저산소 상태(hypoxia)에서 적응하여 살아남은 세포들은, ionizing radiation 또는 항암제에 의해 나타나는 세포사멸에 대해서도 내성을 갖게 된다. 저산소 환경은 다양한 고형암의 암세포들을 더 악성 종양으로 진행하도록 하여 radiotherapy와 chemotherapy에 대한 저항성을 증가시키는 나쁜 예후와 연관이 되어 있다. SM22 α 는 정상적으로 성숙한 척추동물의 평활근 조직에 가장 많이 편재하는 22kDa의 단백질로서, 배발생 과정 동안 평활근 분화의 초기 마커 중 하나인 것으로 알려져 있으며 기능상으로는 초기 배발생 과정이나 분화과정에서 근육조직의 생성에 중요한 역할을 하는 것으로 추측되고 있다. 다양한 암세포에서는 SM22 α 의 발현 정도가 낮은 수준을 보이고 있으며 또한 노화된 세포에서 발현이 증가된다고 알려져 있다. Insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR)는 네 개의 단위체로 구성된 transmembrane receptor tyrosine kinase로써, 정상 인간 조직에서 광범위하게 발현되며 배아발생과 출생 후의 성장에 관여한다. Ligand가 결합하면 IGF-IR의 내재적인 tyrosine kinase activity를 활성화시켜 trans- β subunit이 자가 인산화 된다. 그 결과 IRS-1/PI3k/AKT/mTOR/growth factor receptor binding protein 2/Sos/Ras/MAPK 기작을 포함한 신

호전달체계가 자극을 받아 활성화된다. IGF-IR가 활성화되는 과정은 세포 증식, 생존, 암화, 전이, 신생혈관생성 등을 유도하는데 관여한다는 것이 확인되었다. 암세포에서의 IGF-IR의 발현은 나쁜 예후와 밀접한 관련이 있음이 renal cell carcinoma의 경우에 보고되어 있다.

재료 및 방법

SM22 α 과발현 벡터 구축 방법은 타겟으로 하는 프라이머를 이용하여 연쇄 증합반응을 통해 636bp의 sense SM22 α 유전자를 얻었다. 이 insert를 발현벡터인 pcDNA3.1에 ligation하여 과발현 벡터를 구축하였고 이를 Lipofectamine 2000을 이용해 형질 도입하였다. western blotting에 의한 단백질 발현 확인은 분석대상 세포들을 수거하여 RIPA buffer에 부유시키고, 얼음에 20분 방치하였다가 빠르게 vortexing하는 과정을 연속하여 3회 반복하여 세포분쇄액을 얻었다. 원심분리하고 상층액을 수거한 뒤 단백질양은 Lowry method로 정량하였고, 아크릴아마이드 겔로 분리하여 PVDF 멤브레인에 옮겼다. 단백질이 옮겨진 멤브레인에 1차 항체를 붙인 후 2차 항체[페록시다아제가 표지되어 있는 IgG에 대한 항체]를 붙인 후 ECL detection kit로 관찰하였다. 감마방사선 조사를 위해서는 T25 플라스크에 1X10⁶ 세포로 분주하여 그 다음날 방사선을 조사하였다. 선원은 ⁶⁰Co를 이용하였고 총 선량이 20Gy(선량률 1.333Gy/min)가 되도록 조사하였다. 유성세포 분석을 이용한 세포사멸, 세포주기 분석에는 세포를 차가운 70% 에탄올로 세포를 고정

시키고 프로피디움 아이오다이드(PI)시약으로 염색한 후 분석하였다. SM22a-siRNA는 Lipofectamine RNAi MAX을 이용해 형질 도입하였다. 면역 침강법(IP)은 NP-40 lysis buffer를 이용하여 얻은 단백질을 면역침강용 항체(단백질 100-500 μ g 당 1-2 μ g)와 Protein A beads에 결합시켰다. 원심분리로 얻어진 상층액을 western blotting으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

인간 폐암세포주 A549가 무산소와 1% 저산소 조건에 오래 노출될수록, 또한 다양한 스트레스원에 노출시켰을 때에 SM22a의 발현이 확연히 증가하는 것을 확인하였다. SM22a가 과발현된 세포주를 구축함으로써 SM22a의 방사선 조사나 항암제에 의한 세포 사멸에 대한 저항성이나 내성과 연관된 기능을 확인하였다. 또한 면역침강법을 통해 SM22a 단백질이 IGF-1R 단백질과 직접 결합하여 자발적 인산화를 유도하는 결과를 확인하였다. IGF-1R β 의 활성화와 동시에 하위 유전자로 알려진 AKT의 인산화가 증가되어 있는 것을 확인하였다. IGF-1R 억제제인 AG1024를 처리하였을 때 IGF-1R과 AKT의 인산화가 확연히 감소하는 것으로 보아, SM22a/IGF-1R β /AKT간의 신호기작이 밀접하게 연관되어 있음을 알 수 있다.

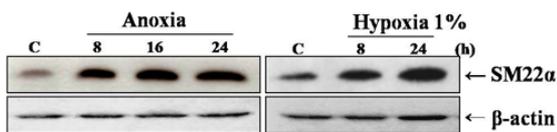


Fig. 1. Comparison of SM22a protein expression levels after hypoxic treatment.

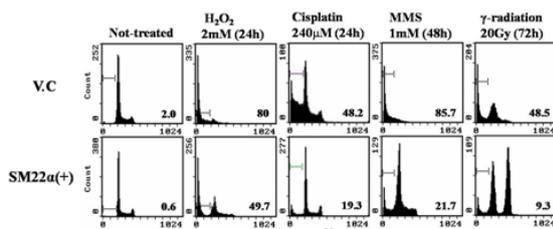


Fig. 2. Flow cytometric DNA analysis of apoptotic cells., Cisplatin, MMS and γ -irradiation(20Gy).

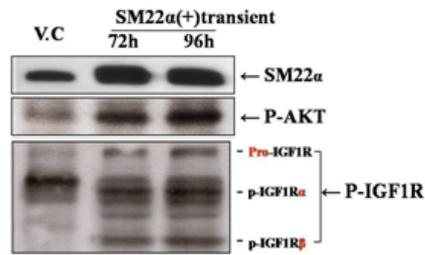


Fig. 3. SM22a overexpression up-regulates p-IGF1R, p-AKT levels in the A549 cell lines.

결론

SM22a 단백질이 폐암세포주의 저산소 환경에서 매우 유의성 있게 증가되고, 감마방사선, 항암제 및 세포독성 물질 등에 대한 저항성을 나타내는 것을 처음 확인하였다. 저산소 환경에서 유도되는 O₂ 항상성 조절의 주요인자이자 전사조절인자인 HIF-1의 활성화와 SM22a의 발현과는 상관관계가 없는 것을 확인함으로써 SM22a가 저산소 환경에서 HIF-1 α 에 비의존적으로 유도될 수 있으며, 새롭고 중요한 저산소 유도 전사 인자로 작용할 수 있는 가능성을 제시하였다. IGF-1R은 약성 종양으로의 형질전환에 있어서도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 항암제 개발에 중요한 타겟으로 떠오르고 있다. SM22a가 IGF-1R과 직접 결합하는 것을 확인함으로써 결론적으로 저산소 환경에 의해 유도되는 SM22a가 IGF-1R β /AKT로 이어지는 신호기작으로 인하여 폐암세포주 A549에서 다양한 화학적 항암제나 스트레스원에 대한 저항성 또는 내성이 유발되는 것과 같은 생물학적 기능과 밀접한 연관이 있는 것으로 사료된다.

참고 문헌

1. M. Hockel, P. Vaupel, *J Natl Cancer Inst.* 93(4), 266-276 (2001)
2. J. P. Lees-Miller, D. H. Heeley and L. B. Smillie, *Biochem J.* 244, 705-709 (1987)
3. H. Zhang, D. Yee, *Expert Opin Investig Drugs.* 13, 1569 - 1577 (2004)