

## 폐암세포주의 TNF- $\alpha$ 유발 apoptosis에서 NF- $\kappa$ B의 역할

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 의학연구원 폐 연구소

김재열\*, 이승희, 황보빈, 이춘택, 김영환, 한성구, 심영수, 유철규

= Abstract =

### The Role of NF- $\kappa$ B in the TNF- $\alpha$ -induced Apoptosis of Lung Cancer Cell Line

J. Y. Kim, M.D., S. H. Lee, M.D., B. Hwangbo, M.D., C. T. Lee, M.D.,  
O. H. Kim, M.D., S.K. Han, M.D., O. S. Shim, M.D., C. G. Yoo, M.D.

*Department of Internal Medicine and Lung Institute, Seoul National University, College of Medicine*

**Background :** The main reason for the failure of anti-cancer chemotherapy is the build up of resistance by cancer cells to apoptosis. The activation of NF- $\kappa$ B in many cancer cell lines is reported to be underlying mechanism behind the build up of resistance of cancer cells to apoptosis. However, this relationship varied depending on the cells used in the experiments. In this study, the role of NF- $\kappa$ B activation in the TNF- $\alpha$ -induced apoptosis in lung cancer cell line was evaluated.

**Methods :** NCI-H157 cells were used in all experiments. Cells were exposed to a high dose of TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) for 24 or 48 hours with or without blocking NF- $\kappa$ B activation. TNF- $\alpha$ -induced activation of NF- $\kappa$ B was inhibited either by overexpression of I $\kappa$ B $\alpha$ -super repressor (I $\kappa$ B $\alpha$ -SR) or by pre-treatment with proteasome inhibitor. Cell viability and apoptosis were evaluated with MTT assay and Western blot analysis for PARP fragment, respectively.

**Results :** Cell viability of NCI-H157 cells was not affected by TNF- $\alpha$  treatment alone ; however, combined treatment with TNF- $\alpha$  and cycloheximide reduced cell viability significantly, indicating that resistance to TNF- $\alpha$  is mediated by the new proteins synthesized after TNF- $\alpha$  stimulation. To evaluate the role of NF- $\kappa$ B in the

---

<sup>†</sup>본 연구는 1997년도 서울대학교병원 일반연구비(04-97-008) 지원으로 이루어 졌음.

\*현 주소는 중앙대학교 의과대학 내과학교실

Address for correspondence :

Chul-Gyu Yoo, M.D.

Department of Internal Medicine and Lung Institute, Seoul National University, College of Medicine

28 Yongon-dong, Chongno-gu, Seoul 110-744, Korea

Phone : 02-760-3760 Fax : 02-762-9662 E-mail : cgyoo@snu.ac.kr

transcription of anti-apoptotic proteins, delete NF- $\kappa$ B activation was inhibited before TNF- $\alpha$  stimulation, as described above. Ad5I $\kappa$ B $\alpha$ -SR-transduction inhibited TNF- $\alpha$ -induced nuclear translocation of p65. TNF- $\alpha$ -induced cell death and apoptosis increased after inhibition of TNF- $\alpha$ -induced activation of NF- $\kappa$ B by methods.

**Conclusion :** These results suggest that TNF- $\alpha$ -induced activation of NF- $\kappa$ B may be closely related to the acquisition of the resistance to TNF- $\alpha$ -induced apoptosis in lung cancer cells. Therefore, blocking of NF- $\kappa$ B pathway can be a useful therapeutic modality in the treatment of lung cancer. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2000, 48 : 166-179)

**Key words :** Lung cancer, Apoptosis, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$

## 서 론

폐암은 국내에서 암으로 인한 사망의 세 번째 원인을 차지하는 중요한 질환이며 국내의 높은 흡연율을 감안해보면 앞으로 유병율이 더욱 증가될 것으로 예상된다. 폐암의 다수를 차지하는 비소세포폐암은 초기에 발견되어 수술이 가능한 경우는 소수이며, 수술 후에 재발하거나 진행된 병기의 비소세포폐암에 대해 시행하는 고식적 항암제치료나 방사선치료는 종양세포의 항암치료에 대한 내성 때문에 완치를 기대하기가 어렵다. 현재 사용되고 있는 많은 항암제와 방사선은 암세포의 apoptosis를 유도함으로써 암세포를 사멸시키는 것이 주된 작용 기전이며, 항암치료가 실패하는 주된 원인은 암세포의 apoptosis에 대한 내성 획득에 의한 것으로 이해되고 있다.

NF- $\kappa$ B는 처음에는 쥐의 B 림프구에서 kappa light-chain 발현을 조절하는 전사인자로 발견되었으며<sup>1</sup> 이후에 다양한 세포들에서 면역 및 염증반응에서 중요한 역할을 하는 범발적인(ubiquitous) 전사인자임이 확인되었다<sup>2-4</sup>. NF- $\kappa$ B는 세포 내에서 복합체의 형태로 존재하며, p65 (또는 RelA) subunit와 p50 subunit로 알려진 분자량이 각각 65 kDa과 50 kDa인 두 가지 종류의 단백질이 결합한 heterodimer가 가장 흔한 형태이다<sup>3,4</sup>. 최근에 암세포가 apoptosis에 내성을 나타내는 기전에 NF- $\kappa$ B의 활성화가 중요한 역할을 한다는 보고가 잇따르고 있다. Van Antwerp 등<sup>5</sup>은 mutation을 통해 인산화(phosphor-

ylation) 및 분해에 저항을 보이는 transdominant-negative I $\kappa$ B $\alpha$  mutant를 합성한 뒤 이를 human lymphoma cell line에 삽입하여 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제한 이후에 TNF- $\alpha$ 를 주었을 때 세포의 apoptosis가 증가하여 NF- $\kappa$ B의 활성이 TNF- $\alpha$  유발 apoptosis에 대한 저항에 중요한 역할을 한다고 보고하였고, Wang 등<sup>6</sup>에 의하면 TNF- $\alpha$  유발 apoptosis에 저항을 보이는 human fibrosarcoma 세포주에 super repressor I $\kappa$ B $\alpha$ 를 발현시켜 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제시켰을 때 TNF- $\alpha$  유발 apoptosis가 증가하며, ionizing radiation이나 항암치료제인 daunomycin의 치료효과가 증대되었다. 이 세포주에 다시 NF- $\kappa$ B의 subunit인 p50과 RelA를 발현시키자 TNF- $\alpha$ 에 내성이 다시 획득되어, NF- $\kappa$ B 활성이 apoptosis에 대한 저항에 직접적인 역할을 할 것으로 시사되었다. 하지만 일부 세포에서는 NF- $\kappa$ B의 활성화와 apoptosis의 발생이 무관하며<sup>7,8</sup>, 어떤 세포에서는 NF- $\kappa$ B의 활성이 오히려 apoptosis를 촉진시킨다<sup>9,10</sup>.

비소세포폐암세포가 항암치료에 내성을 나타내는 기전은 아직 완전히 밝혀지지 않은 상태이나 비소세포폐암의 신선조직 및 세포주에서 NF- $\kappa$ B의 subunit인 p50의 발현이 증가되어 있으며<sup>11-14</sup>, NF- $\kappa$ B의 활성화가 apoptosis에 대한 저항과 연관이 있다는 보고를 연관지어보면 비소세포폐암세포의 항암치료에 대한 내성에 NF- $\kappa$ B의 활성이 관여할 가능성이 있다. 만약 이 사실이 확인된다면 NF- $\kappa$ B 활성의 억제를 통하여 폐암 치료의 효과를 높일 수 있을 것이다. 지금

까지는 폐암세포주에서 NF- $\kappa$ B의 활성화와 apoptosis와의 관계를 살펴본 연구가 적었음에 착안하여 본 연구에서는 비소세포폐암 세포주인 NCI-H157 세포주에 adenovirus를 이용하여 외부에서 super repressor mutant I $\kappa$ B $\alpha$  유전자를 삽입하거나 proteasome inhibitor인 MG132를 투여하여 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제하였을 때 폐암세포주가 TNF- $\alpha$ 에 대해 나타내는 내성이 극복되는지를 확인함으로써 비소세포폐암의 항암치료에 대한 내성기전을 밝힘과 동시에 폐암치료의 개선에 기여하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 연구재료

실험에 사용한 폐암세포주 NCI-H157은 미국 국립암 연구소 (NCI)의 Frederic J. Kaye 박사로부터 제공 받았다. Adenoviral shuttle vector로 사용한 pAC-CMVpLpA와 adenoviral packaging plasmid로 사용한 pJM17은 미국 Texas 대학의 Robert Gerad 교수로부터 제공받았으며 32번과 36번의 serine이 alanine으로 치환된 I $\kappa$ B $\alpha$ -superrepressor cDNA (I $\kappa$ B $\alpha$ -SR)는 미국 North Carolina 대학의 Albert S Baldwin 교수에게 제공받았다. Recombinant human TNF- $\alpha$ 는 R & D System (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였고 phosphate buffered saline (PBS)에 녹인 후 여러 개로 나누어 사용할 때까지 -70°C에 보관하였다. Rabbit의 polyclonal anti-human I $\kappa$ B $\alpha$ , polyclonal anti-human p65, polyclonal anti-human Poly(ADP-ribose) polymerase 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. Horseradish peroxidase를 붙인 goat anti-rabbit secondary 항체는 Promega (Madison, WI, USA)에서, rhodamine isothiocyanate-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G 항체는 Jackson Immuno-Research (West Grove, PA, USA)에서 각각 구입

하였다.

### 2. 세포배양

실험에 사용한 폐암세포주 NCI-H157은 10 % 우태 혈청, penicillin (30 g/ml), streptomycin (50 g/ml)이 포함된 RPMI 1640를 이용해 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

### 3. Adenovirus의 제작

#### 3-1. Adenovirus-I $\kappa$ B $\alpha$ -SR (Ad5I $\kappa$ B $\alpha$ -SR)의 제작

I $\kappa$ B $\alpha$ -SR cDNA가 삽입되어 있는 pCMV4-I $\kappa$ B $\alpha$ -SR와 adenoviral shuttle vector pAC-CMVpLpA를 BamH I 과 HindIII로 각각 자른 후 1 % agarose gel에서 전기영동하여 I $\kappa$ B $\alpha$ -SR cDNA와 pAC-CMVpLpA를 Wizard DNA Clean-up System (Promega, Madison, WI, USA)을 이용해 각각 분리하였다. 절단된 pAC-CMVpLpA를 calf intestinal phosphatase로 탈인산화하여 자체결찰을 차단한 후 pAC-CMVpLpA와 I $\kappa$ B $\alpha$ -SR cDNA를 T4 ligase로 실온에서 24시간 방치하여 결찰시켰고 이를 E. coli DH5에 삽입하여 ampicillin이 들어있는 LB agar plate에서 12시간동안 배양하였다. 생성된 colony를 따서 5 ml의 LB broth에서 밤새 키운 후 Wizard plus Minipreps (Promega, Madison, WI, USA)로 삽입된 plasmid를 분리하였고 이를 BamH I 과 HindIII로 잘라 pAC-CMV-I $\kappa$ B $\alpha$ -SR의 존재를 확인하였다. I $\kappa$ B $\alpha$ -SR의 삽입된 방향은 DNA 염기서열을 분석하여 확인하였다.

#### 3-2. pAC-CMV-I $\kappa$ B $\alpha$ -SR와 pJM17의 동반이입

pAC-CMV-I $\kappa$ B $\alpha$ -SR 20  $\mu$ g, pJM17 10  $\mu$ g과 2.5 M CaCl<sub>2</sub> 50  $\mu$ l 를 멸균 3차 증류수와 섞어 500  $\mu$ l 로 만든 용액을 500  $\mu$ l 의 2 X HEPES에 공기를 불어넣으며 서서히 넣고 섞은 후 실온에서 30분간 방

차하여 고운 침전물이 생기도록 하였다. 100 mm 배양접시의 60-70%가 찰 때까지 배양한 293 세포에 위의 방법으로 준비한 1 ml의 고운 침전액을 한 방울씩 부드럽게 저으면서 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 1시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거하고 PBS로 한 번 세척한 후 15% glycerol 용액 2 ml를 넣고 1분간 실온에 방치하였다(glycerol stock). PBS로 2번 세척한 후 8% 우태혈청과 100 U/ml의 penicillin/streptomycin이 함유된 RPMI 1640을 10 ml 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 세포가 자라서 배양접시에 100% 차면 1% 우태혈청이 포함된 RPMI 1640로 갈아주었다. 1% 우태혈청이 함유된 RPMI 1640으로 293 세포를 2-3 주간 배양하며 세포가 둥글게 변하고 배양접시에서 떨어지기 시작하는 세포독성효과(cytopathic effect, CPE)가 생기지지를 관찰하였다. 세포독성효과가 전체세포에서 관찰되면 세포를 떼어내 -70°C에서 2 차례 얼리고 녹이는 과정을 반복하여 세포를 용해시켜 adenovirus-I $\kappa$ B $\alpha$ -SR (Ad5I $\kappa$ B $\alpha$ -SR)의 crude 용해액을 얻었다.

### 3-3. Adenovirus DNA의 분리

100 mm 배양접시의 60-70%를 차지할 정도로 배양한 293 세포에 Ad5I $\kappa$ B $\alpha$ -SR의 crude 용해액 100  $\mu$ l를 RPMI 1 ml에 섞어 첨가하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 1시간 동안 감염시킨 후 완전배지로 배양액을 교환하였다. 2-3일 후 세포독성효과가 관찰되면 배양액을 제거하고 PBS로 2번 세척한 후 1 ml의 용해용액(0.6% SDS, 10 mM EDTA, 100  $\mu$ g/ml Proteinase K)을 넣고 1시간 방치하였다. 250  $\mu$ l의 5 M NaCl을 한 방울 떨어뜨려 잘 섞은 후 1시간 얼음 속에 방치한 후 점성 용해액을 1.5 ml eppendorf tube로 옮겨 4°C에서 12,000 g 이상으로 30분간 원심분리를 시행하였다. 상층액을 같은 용적의 phenol/chloroform 용액과 섞은 후 다시 12,000 g에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 분리하여 sodium acetate, pH 5.2와 2배의 ethanol을 넣고 -20

°C에서 viral DNA를 침전시켰다. 침전된 viral DNA를 70% ethanol로 세척한 후 25-50  $\mu$ l TE 용액에 녹여 보관하였다. 이 viral DNA를 제한효소 소화 및 DNA 염기서열분석을 통해 Ad5I $\kappa$ B $\alpha$ -SR임을 확인하였다.

### 3-4. Ad5I $\kappa$ B $\alpha$ -SR의 순수분리(plaque purification assay)

60 mm 배양접시를 완전히 채운 293세포를 PBS로 한 차례 세척한 후 3-2.의 과정에서 얻은 crude 용해액을 10<sup>-2</sup>-10<sup>-9</sup>까지 연속적으로 희석시켜 각각 1 ml씩 배양접시에 넣어 1시간동안 감염시켰다. 44°C의 water bath에서 녹인 1.3% Noble Agar (Difco)와 동량의 2 X RPMI+4% FBS+Penicillin/Streptomycin을 섞어 최종농도가 0.65% Noble Agar+1 X RPMI+2% FBS+penicillin/streptomycin인 배양액을 용액을 부드럽게 제거한 60 mm 배양접시에 6 ml씩 서서히 부었다. 30분간 실온에서 agar가 굳은 후에 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 5-7일 후 agar 밑으로 세포독성효과가 국소적으로 나타나면 구멍이 생기는데(plaque) 이 plaque는 1개의 viable virus particle에 의해 생기므로 이를 이용해 원용액의 virus 농도를 측정하였다. 순수분리를 위해 완전히 분리된 plaque 10개를 Pasteur pipette으로 agar와 함께 채취하여 각각의 plaque를 6 well 배양접시의 293 세포에 감염시켜 viral particle을 증폭시킨 후 3-3.의 방법으로 viral DNA를 분리하여 Ad5I $\kappa$ B $\alpha$ -SR임을 확인하였다. 이상의 plaque 분리과정을 두 차례 반복 시행한 후 Ad5I $\kappa$ B $\alpha$ -SR를 분리하였다(P1 lysate, P2 lysate).

### 3-5. Ad5I $\kappa$ B $\alpha$ -SR의 대량증폭 및 고농도 농축액 준비

Plaque 분리과정을 통해 얻은 순수 Ad5I $\kappa$ B $\alpha$ -SR는 향후 실험을 위해 대량증폭 및 고농도로 농축해야한다. 150 mm 배양접시 30개에 293세포가 각각 80% 이상을 차지하도록 배양한 후 P2 lysate를 10

pfu/cell(multiplicity of infection : MOI)이 되게 넣어 1시간 동안 감염시키고 완전배지를 보충하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 2-3일 후 모든 세포가 용해 직전의 세포독성효과를 보였는데, 이때 세포를 모아 완전히 용해시키고 CsCl 초원심분리를 2차례 시행하여 Ad5I $\kappa$ B $\alpha$ -SR 고농축용액을 얻었다. Plaque assay를 통해 농도를 확인하고 0.1% BSA를 추가하여 여러 개로 나누어 사용할 때까지 -70°C에 보관하였다.

#### 4. Ad5I $\kappa$ B $\alpha$ -SR의 transduction

100 mm 배양접시의 60-70%가 잘 정도로 배양한 NCI-H157 폐암세포주를 PBS로 2차례 세척하고 20 MOI가 되게 1 ml의 RPMI에 희석한 Ad5I $\kappa$ B $\alpha$ -SR 용액을 세포 위에 고루 뿌린 후 1시간동안 자주 배양접시를 흔들어 Ad5I $\kappa$ B $\alpha$ -SR 용액이 세포 위에 고루 퍼지게 하였다. 1시간 후 용액을 제거하고 완전 배지를 넣은 다음 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 배양기에 적정시간 배양 후 실험을 시행하였다.

#### 5. MTT Assay

Phosphate buffered saline (PBS)에 최종 농도가 5 mg/ml가 되도록 녹인 MTT용액을 2  $\mu$ m의 filter 막에 여과시켜 멸균시킨 후 알루미늄 호일로 빛을 차단한 상태로 사용할 때까지 4°C에 보관하였다. 96 well plate의 각 well에 100  $\mu$ l의 배양액을 넣은 후 MTT 용액을 10  $\mu$ l 씩 첨가하여 MTT 최종 농도를 0.5 mg/ml로 맞추었다. 37°C에서 4시간 동안 incubation 한 후 배양액을 제거하고 100% DMSO 50  $\mu$ l 를 첨가하여 590 nm에서 ELISA 판독기로 광학밀도(optical density)를 측정하였다.

#### 6. 면역형광염색

2 well chamber slide에 배양한 세포를 3% formaldehyde로 실온에서 5분간 고정시키고 0.5% Triton

X-100으로 4°C에서 permeabilize시켰다. PBS로 3번 세척한 후 1% bovine serum albumin (BSA)으로 비특이 결합을 차단하였다. 1% BSA에 1 : 100으로 희석한 rabbit polyclonal anti-p65 항체 또는 rabbit polyclonal anti-I $\kappa$ B $\alpha$  항체를 30분간 세포와 반응시킨 후 PBS로 3번 세척하였다. 1% BSA에 1 : 100으로 희석한 rhodamine-isothiocyanate-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G 항체를 넣고 30분간 실온에 방치한 후 50% glycerol로 mounting하여 MRC-100 confocal microscope로 관찰하였다.

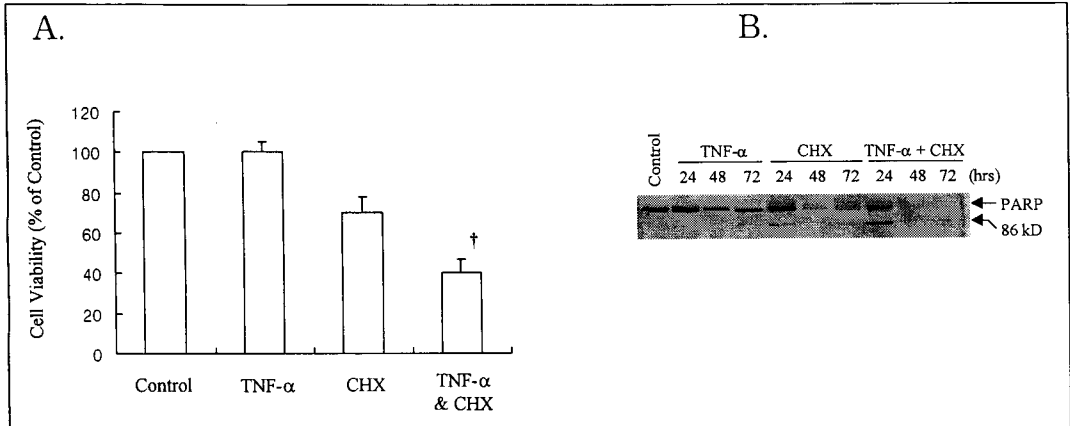
#### 7. Western 분석법

세포내의 총단백을 Whole Lysis Buffer (0.1% Nonidet P40, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 7.5-8.0, 250 mM NaCl, 50 mM NaF)로 추출한 후 bicinchoninic acid 법으로 단백질 농도를 측정하였다. 30 g의 단백질을 10% SDS-PAGE로 전기영동하고 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. Membrane을 PBS로 희석한 5% skim-milk로 1시간 동안 비특이 결합을 차단하였다. 5% skim-milk에 1 : 1,000으로 희석한 rabbit polyclonal anti-p65 항체, rabbit polyclonal anti-I $\kappa$ B $\alpha$  항체, 또는 anti-PARP 항체를 membrane과 실온에서 밤새 반응시킨 후 PBS로 15분씩 3번 세척하였다. Membrane을 5% skim-milk에 1 : 2,000으로 희석한 goat-anti-rabbit HRP-conjugated 항체로 1시간 동안 반응시킨 후 PBS로 15분씩 3번 세척하였고 ECL kit를 이용해 발색시켰다.

### 연구 결과

#### 1. NCI-H157 세포의 TNF- $\alpha$ 에 대한 내성과 cycloheximide가 이에 미치는 영향

NCI-H157 세포에 TNF- $\alpha$  (20 ng/ml)를 투여하고 24시간이 경과한 후의 세포생존율을 MTT assay로



**Fig. 1.** Effect of TNF- $\alpha$  with or without cycloheximide on the cell viability and apoptosis. NCI-H157 cells were treated with media only, TNF- $\alpha$  (20 ng/ml), cycloheximide (CHX, 10  $\mu$ g/ml), or TNF- $\alpha$  and CHX for 24 hours. (A) Cell viability was determined by MTT assay. Data are shown as (the) mean percentage of control  $\pm$  standard deviation. <sup>†</sup>:  $p < 0.05$  compared to TNF- $\alpha$  or CHX. (B) Under the same condition as above, PARP was detected by Western blot analysis with anti-PARP antibody. The degree of apoptosis was determined by the cleavage of PARP and the appearance of 86kD fragment of PARP.

분석하였을 때 TNF- $\alpha$ 를 투여하지 않은 대조군과 세포 생존율에 차이가 없어서 NCI-H157 폐암세포주는 TNF- $\alpha$ 의 세포독성효과에 대해 내성을 보이는 것이 확인되었다. NCI-H157 폐암세포주의 TNF- $\alpha$ 에 대한 내성이 TNF- $\alpha$  자극시 생성되는 새로운 단백질에 의한 것임을 평가하기 위하여 TNF- $\alpha$ 와 단백질합성 억제제인 cycloheximide (10  $\mu$ g/ml)를 동시에 투여하자 TNF- $\alpha$ 나 cycloheximide 단독 투여군에 비해 유의하게 세포생존율이 감소되고(Fig. 1A), apoptosis가 유발되어(Fig. 1B), NCI-H157 폐암세포주의 TNF- $\alpha$ 에 대한 내성은 TNF- $\alpha$  자극시 합성되는 새로운 단백질에 의한 것임을 알 수 있었다.

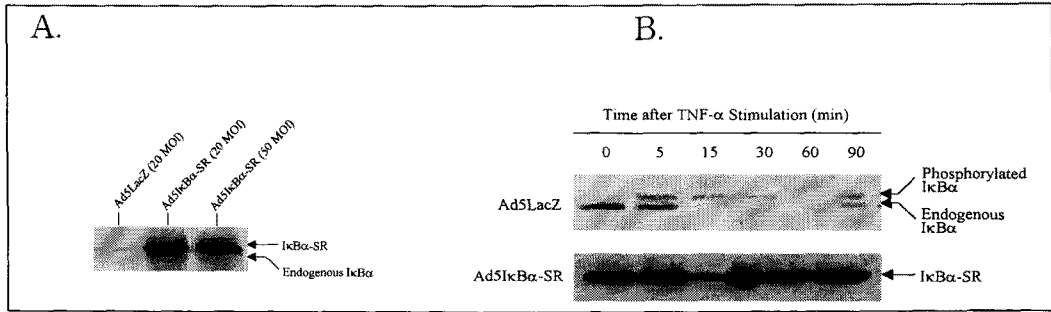
## 2. Ad5I $\kappa$ B $\alpha$ -SR의 이입에 의한 I $\kappa$ B $\alpha$ -SR 단백질의 발현

TNF- $\alpha$  자극시 합성되는 항-apoptosis 단백질이 NF- $\kappa$ B 전사인자에 의해 발현이 증가되는지 여부를 평가하기 위하여, NF- $\kappa$ B 활성화를 차단하고자 하였다.

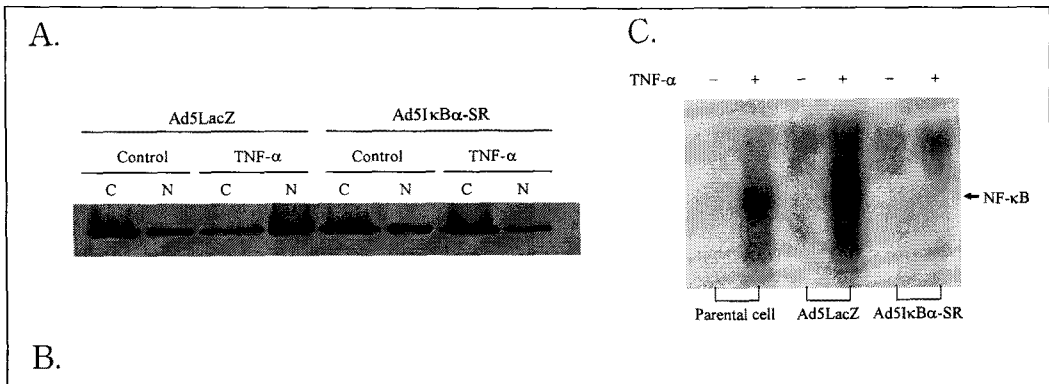
우선 그 첫 번째 방법으로 외부자극으로 분해되지 않는 I $\kappa$ B $\alpha$ -SR를 발현하는 adenovirus vector를 제작하였다. 우선 제작된 adenovirus vector의 이입으로 세포 내에서 I $\kappa$ B $\alpha$ -SR 단백질의 발현이 증가되는지를 평가하였다. Ad5LacZ와 Ad5I $\kappa$ B $\alpha$ -SR를 NCI-H157 세포에 감염시키고 20시간이 경과한 후 Western 분석으로 I $\kappa$ B $\alpha$ -SR 단백질의 발현을 비교하였다. 대조 adenovirus인 Ad5LacZ를 감염시킨 세포에서는 내인성 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 발현만 약하게 관찰되었으나, Ad5I $\kappa$ B $\alpha$ -SR을 감염시킨 세포에서는 I $\kappa$ B $\alpha$ -SR 단백질 강하게 발현되었고(Fig. 2A) TNF- $\alpha$  자극으로 분해되지 않았다(Fig. 2B).

## 3. Ad5I $\kappa$ B $\alpha$ -SR의 이입에 의한 NF- $\kappa$ B 활성화의 억제

I $\kappa$ B $\alpha$ -SR의 과발현으로 TNF- $\alpha$ 에 의해 유발된 NF- $\kappa$ B 활성화를 억제시킬 수 있는지를 평가하였다. Ad5LacZ와 Ad5I $\kappa$ B $\alpha$ -SR를 감염시킨 세포를 TNF



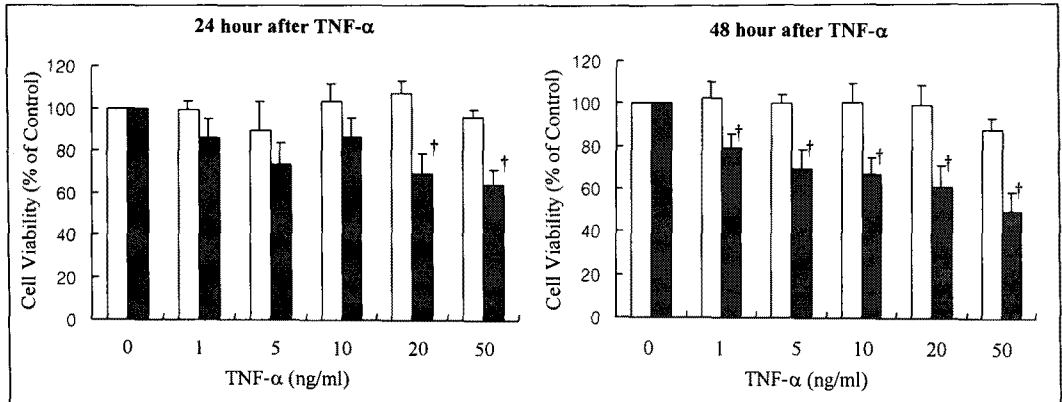
**Fig. 2.** Overexpression of exogenous  $I\kappa B\alpha$ -SR which is resistant to  $TNF-\alpha$  induced degradation. (A) NCI-H157 cells were infected either with respectively. (This relationship is not clear.) Twenty hours after transduction, whole cell extracts were separated with 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes.  $I\kappa B\alpha$  activity was detected with rabbit polyclonal  $I\kappa B\alpha$  antibody. (B) NCI-H157 cells were infected either with AD5LacZ or Ad5 $I\kappa B\alpha$  at 20 MOI for 20 hours and then incubated with  $TNF-\alpha$  (5 ng/ml) for 5, 15, 30, 60 and 90 minutes. Whole cell extracts were assayed for  $I\kappa B\alpha$  by Western blot analysis.



**Fig. 3.** Blocking of  $TNF-\alpha$ -induced nuclear translocation and DNA binding of  $NF-\kappa B$  by exogenous  $I\kappa B\alpha$ -SR. (A) AdLacZ or Ad $I\kappa B\alpha$ -SR-infected NCI-H157 cells were treated with media alone or  $TNF-\alpha$  (5 ng/ml) for 30 minutes. Cytoplasmic (C) and nuclear extracts (N) were extracted separately and analyzed for the presence of p65 by Western blot analysis. (B) Immunofluorescent staining for p65 was done with anti-p65 antibody followed by a rhodamine-conjugated antibody. (C) EMSA using [ $^{32}P$ ]-labeled oligonucleotide probe which is specific for  $NF-\kappa B$ .

$-\alpha$  30분간 자극하고 세포질 단백질과 핵 단백을 각각 분리 추출하여 p65에 대한 Western 분석을 시행하였다. Ad5LacZ를 감염시킨 세포에서는 자극 전에는 주로 세포질에서 관찰되던 p65 단백질이  $TNF-\alpha$  자극 후 핵 내로 이동되는 소견이 관찰되었다. Ad5 $I\kappa B\alpha$ -

SR를 감염시킨 세포에서는  $TNF-\alpha$  자극에 의한  $NF-\kappa B$ 의 핵내 이동이 억제되었다(Fig. 3A). 이 결과는 p65에 대한 면역형광염색으로도 확인되었다. 즉, Ad5LacZ를 감염시킨 세포에서는 기저상태에서 세포질에서 관찰되던 p65가  $TNF-\alpha$  자극 후에는 핵내에

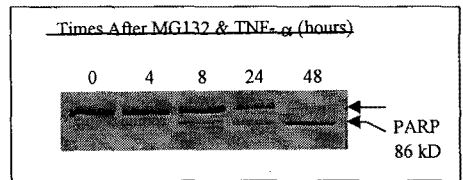


**Fig. 4.** Dose-dependent effect of TNF- $\alpha$  on the cell viability either in AdLacZ or in AdI $\kappa$ B $\alpha$ -SR infected cells. NCI-H157 cells were infected with AdLacZ (open bar) or AdI $\kappa$ B $\alpha$ -SR (solid bar) at 20 MOI for 20 hours and then incubated with various doses of TNF- $\alpha$  (1, 5, 10, 20, 50 ng/ml) for 24 and 48 hours. Cell viability was evaluated by MTT assay. Data were shown as (the) mean percentage of control  $\pm$  standard deviation. †:  $p < 0.05$

서 주로 관찰되었다. 반면에 Ad5I $\kappa$ B $\alpha$ -SR를 감염시킨 세포에서는 TNF- $\alpha$  자극 후에도 p65가 주로 세포질에서 염색되는 양상을 보였다(Fig. 3B). 또한 NF- $\kappa$ B에 specific한 [32P]-labeled oligonucleotide probe를 이용해서 EMSA를 시행하였을 때, Ad5I $\kappa$ B $\alpha$ -SR를 감염시킨 세포에서는 TNF- $\alpha$  자극에 의한 NF- $\kappa$ B DNA binding activity가 억제되었다(Fig. 3C). 이상의 결과로 I $\kappa$ B $\alpha$ -SR의 과발현으로 TNF- $\alpha$  자극에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성화와 핵내이동 그리고 DNA binding이 완전히 차단됨을 알 수 있었다.

#### 4. Ad5I $\kappa$ B $\alpha$ -SR의 이입이 NCI-H157의 TNF- $\alpha$ 내성에 미치는 효과

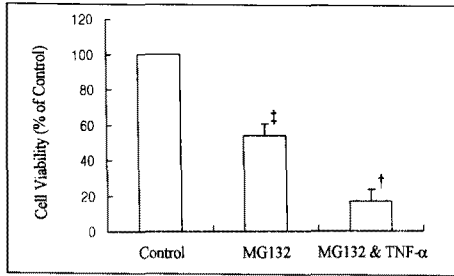
I $\kappa$ B $\alpha$ -SR의 과발현으로 NF- $\kappa$ B 활성을 억제시켰을 때, TNF- $\alpha$  투여 후 세포생존율과 apoptosis의 양상에 변화가 있는지를 평가하였다. Ad5LacZ와 Ad5I $\kappa$ B $\alpha$ -SR를 감염시킨 세포에 TNF- $\alpha$ 의 용량(1, 5, 10, 20, 50 ng/ml)과 반응 시간(24, 48시간)을 달리하면서 세포생존율의 변화를 MTT assay로 확인하였다. Ad5LacZ를 감염시킨 세포에서는 TNF- $\alpha$ 의 용량을 증가시켜도 세포독성이 관찰되지 않았으나



**Fig. 5.** Effect of AdI $\kappa$ B $\alpha$ -SR transduction on TNF- $\alpha$ -induced apoptosis. NCI-H157 cells were infected either with AdLacZ or with AdI $\kappa$ B $\alpha$ -SR at 20 MOI for 20 hours and then incubated with TNF- $\alpha$  (50 ng/ml) for 24 and 48 hours. PARP was detected by Western blot analysis with anti-PARP antibody. The degree of apoptosis was determined by the cleavage of PARP and the appearance of 86 kD fragment of PARP.

Ad5I $\kappa$ B $\alpha$ -SR를 감염시킨 세포에서는 TNF- $\alpha$ 의 용량 증가에 따라 세포의 생존율이 감소되었다(Fig. 4). Ad5I $\kappa$ B $\alpha$ -SR를 감염시킨 NCI-H157 세포에서 TNF- $\alpha$ 에 의한 세포독성이 apoptosis에 의한 것임을 확인하기 위하여 TNF- $\alpha$  투여 후 시간 경과에 따라 PARP에 대한 Western 분석을 시행하였다. Ad5LacZ를 감염시킨 세포에서는 TNF- $\alpha$ 로 자극하





**Fig. 6.** Potentiation of TNF- $\alpha$ -induced cell death with proteasome inhibitor treatment. NCI-H157 cells were treated with media alone, MG132 (50  $\mu$ M), or MG132 & TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) for 24 hours. Does the word 'respectively' belong, since the cells were treated with either MG132 or MB132 & TNF combination?. Cell viability was evaluated by MTT assay. Data are shown as (the) mean percentage of control + standard deviation.

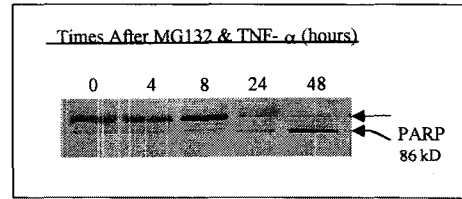
†: p<0.05 compared to MG132

‡: p<0.05 compared to control

고 48시간이 경과한 후 약간의 86 kD 분절이 관찰되었지만 Ad5I $\kappa$ B $\alpha$ -SR를 감염시킨 세포에서는 TNF- $\alpha$  자극 24시간 후부터 86 kD 분절이 관찰되기 시작해 48시간 후에는 PARP보다 86 kD 분절이 더욱 많이 관찰되어 Ad5I $\kappa$ B $\alpha$ -SR를 감염시킨 세포에서 TNF- $\alpha$ 에 의한 세포생존율의 감소는 apoptosis에 의한 것임을 알 수 있었다(Fig. 5).

### 5. Proteasome 억제제 NCI-H157의 TNF- $\alpha$ 내성에 미치는 효과

I $\kappa$ B $\alpha$ 는 인산화와 ubiquitination의 과정을 거쳐 proteasome의 작용으로 분해되기 때문에 proteasome의 작용을 차단하면 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 분해가 억제되고 따라서 외부자극에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성화를 억제할 수 있다. Proteasome 작용의 억제제 TNF- $\alpha$  자극에 의한 세포생존율에 미치는 영향을 평가하기 위하여 NCI-H157 세포에 proteasome 억제제인 MG132 (50



**Fig. 7.** Time-dependent change of TNF- $\alpha$ -induced apoptosis after proteasome inhibitor treatment. NCI-H157 cells were treated with MG132 (50  $\mu$ M) and TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) for 4, 8, 24, and 48 hours. PARP was detected by Western blot analysis with anti-PARP antibody. The degree of apoptosis was determined by the cleavage of PARP and the appearance of 86 kD fragment of PARP.

$\mu$ M)와 TNF- $\alpha$  (20 ng/ml)를 투여하고 24시간 후에 MTT assay를 시행하였다. 대조군에 비해 MG132 단독 투여군에서도 세포생존율이 유의하게 감소하였지만, MG132와 TNF- $\alpha$ 를 같이 투여하였을 때는 세포생존율이 더욱 감소하였다(Fig. 6). MG132와 TNF- $\alpha$ 의 동시 투여에 의한 세포독성이 apoptosis에 의한 것임을 확인하기 위하여 MG132와 TNF- $\alpha$ 를 동시에 투여하고 시간경과에 따라 PARP의 분해 유무를 PARP에 대한 Western 분석으로 관찰하였다. MG132와 TNF- $\alpha$ 를 동시에 투여하고 24시간 후부터 PARP가 감소하고 PARP의 86 kD 분절이 관찰되기 시작해 48시간 후에는 86 kD 분절만이 관찰되었다(Fig. 7).

### 고찰

현대의학의 많은 진보에도 불구하고, 악성종양 특히 고형암의 치료는 종양세포의 항암제에 대한 내성 때문에 치료 성적의 개선이 더딘 형편이다. 폐암은 서양에서는 가장 흔한 악성종양이고 국내에서는 암으로 인한 사망의 세 번째 원인이며, 높은 흡연율과 여성흡연인

구의 증가로 인해 유병률이 증가하고 있다<sup>15</sup>. 폐암의 대다수를 차지하는 비소세포폐암은 초기에 진단되어 수술을 받을 수 있는 경우는 소수이며, 대부분은 수술이 불가능하여 이 경우에는 항암제나 방사선치료를 시행하게 된다. 하지만 폐암세포의 항암치료에 대한 내성 때문에 완치에 이르는 경우는 드물며, 따라서 비소세포폐암에서의 항암치료에 대한 내성기전을 밝히고 이를 극복하는 것이 시급하면서도 절실한 과제이다.

최근에는 악성세포의 발생이 세포의 성장이나 분화에 관련된 유전자들의 조절작용에 불균형이 발생됨으로써 유발된다는 견해가 이루어졌다. 최초로 B 림프구에서 발견되어 면역반응의 조절에 중요한 역할을 하는 전사인자로 주목받았던 NF- $\kappa$ B는 최근에 들어서는 암의 발생 및 암세포의 apoptosis에 대한 내성에도 중요한 역할을 하는 것으로 인식되고 있다. 실제로 NF- $\kappa$ B는 apoptosis를 유발하는 자극에 의하여 활성화되며<sup>3,16</sup>, 최근에는 특히 NF- $\kappa$ B의 활성이 apoptosis 발생을 억제한다는 보고들이 주목을 받고 있다. NF- $\kappa$ B p65/RelA 유전자가 없는 mice의 발생기에 간에 광범위한 apoptosis가 발생하며<sup>17</sup>, 항암치료에 사용되는 많은 약제들(예 ; daunorubicin, etoposide, vincristine)과 방사선치료가 종양세포에 apoptosis를 유발함으로써 효과를 발휘하며, 종양세포는 또한 apoptosis에 대한 저항을 통하여 항암치료에 내성을 보인다<sup>18-20</sup>.

본 연구에서는 NF- $\kappa$ B의 활성이 암세포의 apoptosis에 대한 내성과 연관이 있다는 사실에 착안하여 우선 비소세포폐암세포주에서 NF- $\kappa$ B의 활성화와 항 apoptosis 작용의 연관성을 밝히고, 다음으로 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제하였을 때 항 apoptosis 작용이 극복되는지를 알아봄으로써 궁극적으로 비소세포폐암 치료의 새로운 방법을 모색하고자 하였다. NF- $\kappa$ B의 활성을 억제하기 위해 첫째로 32번과 36번의 serine이 alanine으로 치환되어 proteasome에 의한 degradation에 저항을 보임으로써 지속적으로 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제할 수 있는 super repressor I $\kappa$ B $\alpha$  mutant gene을 아데노바이러스를 이용하여 세포내로

transduction 시키거나 두번째로 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 분해를 막는 proteasome에 대한 억제제인 MG132를 투여하는 방법을 이용하였다.

Sensitive한 세포주는 수 pg/ml의 TNF- $\alpha$  투여로도 거의 모든 세포주가 사멸하고, 10 ng/ml의 농도 이상에서는 모든 세포가 사멸하는데 비해서<sup>7</sup>, 본 연구에서 이용한 비소세포폐암세포주인 NCI-H157 세포는 TNF- $\alpha$ 를 20 ng/ml의 농도로 투여하여도 세포의 사멸이 거의 없어서 TNF- $\alpha$ 의 세포독성효과에 대한 내성을 확인하였다(Fig. 1A). NCI-H157 세포주의 TNF- $\alpha$ 에 대한 내성이 TNF- $\alpha$  자극에 의해 새로 합성된 단백질에 의한 것인지를 확인하기 위하여 TNF- $\alpha$ 와 함께 translation 억제제인 cycloheximide (CHX, 10  $\mu$ g/ml)를 동시에 투여하였을 때 세포생존률이 유의하게 감소되어서(Fig. 1A) NCI-H157 세포주의 TNF- $\alpha$ 에 대한 내성은 TNF- $\alpha$  자극시 합성되는 항-apoptosis 효과를 보이는 새로운 단백질에 의해 발생한다는 사실을 확인하였다. TNF- $\alpha$ 와 CHX의 동시 투여후 24시간 뒤에 PARP에 대한 Western blot analysis를 시행하였을 때, apoptosis 발생시 관찰되는 86 kD fragment의 발현이 증가되어 세포의 사멸이 apoptosis의 과정을 통하여 일어났음을 알 수 있었다(Fig. 1B).

TNF- $\alpha$  자극에 의해 합성되는 항-apoptosis 작용을 나타내는 단백질의 합성에 전사인자인 NF- $\kappa$ B의 발현이 관련되는지를 확인하기 위해 NF- $\kappa$ B의 활성화를 억제한 뒤 세포생존율과 apoptosis의 변화를 살펴 보았다. NF- $\kappa$ B의 활성화를 차단하는 첫 번째 방법으로는 adenovirus를 이용해 I $\kappa$ B $\alpha$ -SR를 과발현 시키는 방법을 사용하였다. I $\kappa$ B $\alpha$ -SR은 32번과 36번의 serine을 인산화되지 않는 alanine으로 치환하여 외부 자극으로 분해되지 않는 돌연변이지만 NF- $\kappa$ B와의 결합능은 wild type과 동일해 지속적으로 NF- $\kappa$ B의 활성화를 억제할 수 있는 특징을 가지고 있다. NCI-H157 세포에 AdI $\kappa$ B $\alpha$ -SR의 삽입하였을 때, I $\kappa$ B $\alpha$ -SR이 과발현되었고(Fig. 2A) 과발현된 I $\kappa$ B $\alpha$ -SR은 TNF- $\alpha$ 의 자극으로도 분해되지 않았다(Fig.

2B). 과발현된  $I\kappa B\alpha$ -SR의 일부는 핵내로 이동됨이 관찰되었는데(data not shown) 이는  $I\kappa B\alpha$ -SR가 세포질내에서 NF- $\kappa B$ 의 핵으로의 이동을 억제할 뿐만 아니라 핵으로 이동된 NF- $\kappa B$ 와 핵내에서 결합하여 다시 세포질내로 끌어내는 효과가 있음을 시사하는 소견이다. Adenovirus를 이용한  $I\kappa B\alpha$ -SR의 삽입 및 과발현이 TNF- $\alpha$  자극에 의한 NF- $\kappa B$ 의 활성화와 핵내 이동 및 DNA 결합을 억제한다는 사실은 다음과 같이 확인하였다. 우선 대조군인 Ad5LacZ를 삽입한 세포와 Ad  $I\kappa B\alpha$ -SR를 삽입한 세포에 대해 TNF- $\alpha$ 로 자극한 후에 각각의 세포에서 세포질과 핵 단백을 분리 추출한 뒤 p65 항체를 이용한 Western blot analysis를 시행하였다. Ad5LacZ를 삽입한 세포는 TNF- $\alpha$ 를 자극한 후에 핵내 단백질에서 p65의 발현이 증가되었는데 반하여, Ad5 $I\kappa B\alpha$ -SR를 삽입한 세포에서는 TNF- $\alpha$  자극 후에도 핵내 단백질에서 p65 발현이 증가되지 않았다(Fig. 3A). 이는 Ad5 $I\kappa B\alpha$ 의 삽입이 NF- $\kappa B$ 의 활성화 및 핵내 이동을 억제하였음을 시사하는 소견이다. p65 항체를 이용한 면역형광염색에서도 같은 소견을 보여서 Ad5 $I\kappa B\alpha$ -SR를 삽입한 세포주는 TNF- $\alpha$ 로 자극하여도 핵내에서 p65 발현이 억제되었다(Fig. 3B). NF- $\kappa B$ 에 특이한 probe를 이용한 EMSA에서도 Ad5 $I\kappa B\alpha$ -SR의 삽입은 NF- $\kappa B$ 의 DNA binding을 억제한다는 사실을 확인할 수 있었다(Fig. 3C). 이상의 소견은 adenovirus를 이용하여  $I\kappa B\alpha$ -SR를 세포 내로 삽입하였을 때 NF- $\kappa B$ 의 활성화와 핵내 이동 및 DNA binding의 억제가 가능하며, 따라서 NF- $\kappa B$ 의 작용으로 발현이 증가되리라 여겨지는 anti-apoptosis 작용을 나타내는 단백질의 합성 억제가 가능함을 시사하는 것이다.

Ad5 $I\kappa B\alpha$ -SR이 삽입된 세포주와 대조군인 Ad5LacZ를 삽입한 세포주에 TNF- $\alpha$ 의 농도를 1 ng/ml부터 50 ng/ml까지 증가시키면서 TNF- $\alpha$  투여 후 24시간과 48시간에 세포생존율을 알아보았을 때, Ad5 $I\kappa B\alpha$ -SR를 삽입한 군에서는 Ad5LacZ를 삽입한 군에 비해 세포생존율이 의미있게 감소하였고

(Fig. 4), PARP에 대한 Western blot analysis를 시행하여 보았을 때, Ad5 $I\kappa B\alpha$ 를 삽입한 세포의 사멸은 apoptosis의 과정을 통하여 일어났음을 알 수 있었다(Fig. 5).

NF- $\kappa B$ 의 활성을 억제하는 두 번째 방법으로 proteasome에 대한 억제제인 MG132를 투여하였다. MG132 투여로 proteasome이 억제되면 endogenous  $I\kappa B\alpha$ 의 분해가 억제되며 따라서 지속적으로 NF- $\kappa B$ 의 활성의 억제가 가능하다<sup>21-23</sup>. MG132 (50  $\mu M$ ) 단독 투여군이 대조군에 비해 의미있게 낮은 세포생존율을 보였으며, 또한 MG132와 TNF- $\alpha$ 를 동시에 투여한 세포주는 MG132를 단독으로 투여한 경우에 비해 유의하게 세포생존율이 감소하였다(Fig. 6). MG132와 TNF- $\alpha$  동시 투여에 의한 세포독성의 증가가 apoptosis 과정을 통해 이루어졌는지를 알아보기 위해 PARP에 대한 Western 분석을 시행하였다. MG132 단독투여군과 MG132와 TNF- $\alpha$  동시투여군 모두에서 apoptosis가 관찰되었으나 특히 동시투여군에서 TNF- $\alpha$  투여 48시간 후에 apoptosis의 발생이 현저하였다(Fig. 7). MG132 단독투여군에서 대조군에 비하여 세포생존율이 감소하였는데 이것은 MG132가 tumor suppressor gene인 p53의 발현을 증가시키는 작용이 있기 때문에 판단되며, MG132와 TNF- $\alpha$ 의 동시투여로 단독투여군에 비해 세포생존율이 더욱 감소한 것은 MG132에 의한 proteasome inhibition 효과 때문으로 생각된다.

이상의 결과에서 NCI-H157 폐암세포주에  $I\kappa B\alpha$ -SR을 삽입하거나 proteasome 억제제를 투여하여 NF- $\kappa B$ 의 활성화를 억제하였을 때 TNF- $\alpha$ 에 대한 내성이 극복되면서 폐암세포들이 apoptosis의 과정을 통해 사멸되는 것을 알 수 있었다. 기존의 연구에서는 NF- $\kappa B$  활성의 억제에 따른 세포생존율의 변화가 연구에 이용된 세포에 따라 서로 다르다고 보고되고 있다. NF- $\kappa B$ 의 활성을 억제하면 어떤 세포들은 apoptosis 과정을 통해 생존율이 감소하지만<sup>5,6</sup>, 어떤 세포들은 세포생존율에 아무런 차이를 보이지

않으며<sup>7,8</sup>, 반면에 apoptosis의 발생이 억제되는 세포들도 있다<sup>10</sup>. 최근에 Batra 등<sup>24</sup>은 본 연구에서 실험에 이용한 세포와 동일한 NCI-H157세포에 Ad5I $\kappa$ B $\alpha$ -SR을 삽입시켜 보았을 때 세포생존율이 감소하였음을 보고한 바 있다. 하지만 그의 연구에서는 세포 생존율만을 살펴보고, 세포의 사멸이 apoptosis의 과정을 통하여 있었는지를 확인하지 않았으며, 또한 본 연구에서는 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제하는 방법으로 Ad5I $\kappa$ B $\alpha$ -SR을 삽입하는 방법 외에 MG132를 투여하는 방법을 추가로 살펴본 점에서 나름대로의 의의가 있다고 생각된다.

본 연구의 제한점으로는 비소세포폐암 세포주인 NCI-H157 세포만을 대상으로 하였기 때문에 이 결과를 모든 비소세포폐암 세포주에 확대 적용하기는 어려우며, 따라서 향후에 많은 세포를 대상으로 한 확인 실험이 필요할 것으로 사료된다. 또한 NF- $\kappa$ B는 다양한 물질의 합성에 필요한 전사인자이므로 항암치료의 목적으로 인체 내에 투여하였을 경우에는 예측할 수 없는 작용이 발생할 가능성이 많다. 따라서 실제 치료에의 이용 가능성에 대해서도 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

NF- $\kappa$ B의 작용에 의해서 활성화되어 anti-apoptosis 작용을 하는 단백질과 이를 생산하는 유전자에 대해서는 아직까지 확실히 밝혀지지 않았다. 최근에 Wu 등<sup>25</sup>은 Jurkat cell line에서 longer immediate-early response gene (IEX-1L gene)이 TNF- $\alpha$ 에 의해서 유도되며, NF- $\kappa$ B활성의 억제에 의하여 전사가 감소되면서 TNF- $\alpha$ 에 의한 apoptosis에 민감해지고, NF- $\kappa$ B활성이 억제된 세포에 IEX-1L을 삽입시켰을 때 TNF- $\alpha$ 에 의한 apoptosis에 다시 저항을 나타내는 점에서 NF- $\kappa$ B에 의하여 유도되어 anti-apoptosis를 나타내는 유전자로 IEX-1L gene의 가능성을 보고하였다. 향후 anti-apoptosis의 역할을 나타내는 이러한 gene들의 규명을 통하여 apoptosis 및 항암치료에 대한 내성 기전의 이해가 더욱 증진될 수 있을 것으로 사료된다.

## 요 약

### 연구배경 :

현재 사용되고 있는 많은 항암제는 암세포의 apoptosis를 유도함으로써 암세포를 사멸시키는 것이 주된 작용 기전이다. 항암제에 의한 치료 실패의 주된 원인은 암세포의 apoptosis에 대한 내성 획득에 의한 것으로 이해되고 있다. 최근의 보고에 의하면 많은 암세포주에서 apoptosis에 대한 내성 획득에 NF- $\kappa$ B의 활성화가 중요한 역할을 한다고 알려져 있지만 일부 세포에서는 상반된 결과를 보이고 있어 apoptosis에 대한 내성 획득과 NF- $\kappa$ B의 활성화와의 관련성은 세포에 따라 차이를 보이고 있다. 본 연구에서는 비소세포폐암 세포주가 TNF- $\alpha$  유발 apoptosis에 저항을 나타내는 기전에서 NF- $\kappa$ B의 역할을 규명하고자 하였다.

### 방 법 :

비소세포폐암세포주인 NCI-H157 세포에 TNF- $\alpha$ , cycloheximide (CHX), TNF- $\alpha$ 와 CHX를 각각 투여하고 24시간 후 MTT assay로 세포생존율을 평가하였고 apoptosis의 발생 유무는 PARP에 대한 Western 분석으로 평가하였다. Ad5LacZ와 Ad5I $\kappa$ B $\alpha$  SR를 20시간 동안 감염시킨 각각의 세포를 1, 5, 10, 20, 50 ng/ml의 TNF- $\alpha$ 로 24, 48시간 자극 후 MTT assay를 시행하였고, 같은 농도의 TNF- $\alpha$ 로 24, 48시간 자극 후 PARP에 대한 Western 분석을 시행하였다. I $\kappa$ B $\alpha$ 의 분해를 억제하는 proteasome inhibitor인 MG132를 전처치하고 TNF- $\alpha$ 로 24, 48시간 자극 후 MTT assay와 PARP에 대한 Western 분석을 시행하였다. Ad5I $\kappa$ B $\alpha$  SR를 감염시킨 세포를 TNF- $\alpha$ 로 자극한 후 NF- $\kappa$ B의 활성화를 EMSA로 평가하였다.

### 결 과 :

1. TNF- $\alpha$  단독 투여로는 세포 생존율의 감소와 apoptosis가 관찰되지 않았고 TNF- $\alpha$ 와 CHX를 같이 투여하였을 때는 세포 생존율의 감소와 함께 apoptosis가 유도되었다. 2. Ad5I $\kappa$ B $\alpha$  SR의 감염으

로  $I\kappa B\alpha$ 가 과발현된 세포와 MG132를 전처리한 세포에서 TNF- $\alpha$  자극에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성화가 억제되었다. 3. Ad5 $I\kappa B\alpha$  SR를 감염시킨 세포와 MG132를 전처리하여 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제한 세포에서 TNF- $\alpha$  자극 후 세포 생존율이 감소하고 apoptosis가 유도되었다.

#### 결론:

비소세포폐암 세포주의 TNF- $\alpha$  유발 apoptosis에 대한 내성은 NF- $\kappa$ B의 활성화에 의해 생성되는 새로운 단백질 발현에 의한 것으로 생각되며, NF- $\kappa$ B 활성화의 억제로 이를 극복할 수 있을 것으로 사료된다.

#### 참고 문헌

1. Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986;46:705-16.
2. Kopp EB, Ghosh S. NF- $\kappa$ B and rel proteins in innate immunity. *Adv Immunol* 1995;58:1-27.
3. Baeuerle PA, Baltimore D. NF- $\kappa$ B : ten years after. *Cell* 1996;87:13-20.
4. Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF- $\kappa$ B. *Annu Rev Cell Biol* 1994;10:405-55.
5. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF $\alpha$ -induced apoptosis by NF- $\kappa$ B. *Science* 1996;274:787-9.
6. Wang C-Y, Mayo MW, Baldwin AS. TNF $\alpha$  and cancer therapy-induced apoptosis : potentiation by inhibition of NF- $\kappa$ B. *Science* 1996;274:784-7.
7. Cai Z, Körner M, Tarantino N, Chouaib S.  $I\kappa B\alpha$  overexpression in human breast carcinoma MCF7 cells inhibits nuclear factor- $\kappa$ B activation but not tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis. *J Biol Chem* 1997;272:96-101.
8. Hehner SP, Hofmann TG, Ratter F, Dumount A, Droge W, Schmitz ML. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced cell killing and activation of transcription factor NF- $\kappa$ B are uncoupled in L929 cells. *J Biol Chem* 1998;273:18117-21.
9. Abbadie C, Kabrun N, Bouali F, Smardova J, Stehelin D, Vandebunder B, Enrietto PJ. High level of c-rel expression are associated with programmed cell death in the developing avian embryo and in bone marrow cells in vitro. *Cell* 1993;75:899-912.
10. Jung M, Zhang Y, Lee S, Dritschilo A. Correction of radiation sensitivity in ataxia telangiectasia cells by a truncated  $I\kappa B-\alpha$  *Science* 1995;268:1619-21.
11. Mukhopadhyay T, Roth JA, Maxwell SA. Altered expression of the p50 subunit of the NF- $\kappa$ B transcription factor complex in non-small cell lung carcinoma. *Oncogene* 1995;11:999-1003.
12. Bose HR. The *Rel* family : models for transcriptional regulation and oncogenic transformation. *Biochem Biophys Acta* 1992;1114:1-17.
13. Bours V, Dejardin E, Goujon-Letawe F, Merville M, Castronovo V. The NF- $\kappa$ B transcription factor and cancer : high expression of NF- $\kappa$ B and  $I\kappa B$ -related proteins in tumor cell lines. *Biochem Pharmacol* 1994;47:145-9.
14. Chang CC, Zhang J, Lombardi L, Neri A, Dalla-Favera R. Mechanism of expression and role in transcriptional control of the protooncogene NFKB/LYT-10. *Oncogene* 1994;9:923-33.
15. 이세일, 박홍길, 안돈희, 박찬용, 고재욱, 서창인. 한국인 암등록 조사자료 분석보고서, 서울, 대한민국 보건복지부, 1996, p18.
16. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF- $\kappa$ B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994;12:141-79.
17. Beg AA, Sha W, Bronson R, Ghosh S, Baltimore D. Embryonic lethality and liver degeneration in

- mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* 1995;13:167-70.
18. Fisher DE. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell* 1994;26:539-42.
19. Slater A, Kimland M, Jiang S, Orrenius S. Constitutive nuclear NF kappa B/rel DNA-binding activity of rat thymocytes is increased by stimuli that promote apoptosis, but not inhibited by pyrrolidine dithiocarbamate. *Biochem J* 1995;15: 833-8.
20. Bessho R, Matsubara K, Kubota M, Kuwakado K, Hirota H, Wakazono Y, Lin YW, Okuda A, Kawai M, Nishikomori R. Pyrrolidine dithiocarbamate, a potent inhibitor of nuclear factor kappa B (NF-kappa B) activation, prevents apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells and thymocytes. *Biochem Pharmacol* 1994;16:1883-9.
21. Giuliano M, Lauricella M, Calvaruso G, Carabillo M, Emanuele S, Vento R, Tesoriere G. The apoptotic effects and synergistic interaction of sodium butyrate and MG132 in human retinoblastoma Y79 cells. *Cancer Res* 1999;59:5586-95.
22. Robertson JD, Datta K, Biswal SS, Kehrer JP. Heat-shock protein 70 antisense oligomers enhance proteasome inhibitor-induced apoptosis. *Biochem J* 1999;344:477-85.
23. Kawakami A, Nakashima T, Sakai H, Hida A, Urayama S, Yamasaki S, Nakamura H, Ida H, Ichinose Y, Aoyagi T, Furuichi I, Nakashima M, Migita K, Kawabe Y, Eguchi K. Regulation of synovial cell apoptosis by proteasome inhibitor. *Arthritis Rheum* 1999;42:2440-8.
24. Batra RK, Guttridge DC, Brenner DA, Dubinett SM, Baldwin AS, Boucher RC. I $\kappa$ B- $\alpha$  gene transfer is cytotoxic to squamous-cell lung cancer cells and sensitizes them to tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated cell death. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;21:238-45.
25. Wu MX, Ao Z, Prasad KV, Schlossman SF. IEX-1L, An apoptosis inhibitor involved in NF-kappaB-mediated cell survival. *Science* 1998;14: 998-1001.