

I κ B α -SR 유전자이입이 Cisplatin, Paclitaxel에 대한 폐암세포주의 감수성에 미치는 영향

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 서울대학교 의학연구원 폐연구소

이석영, 설자영, 박경호, 박근민, 황용일, 김철현, 장승훈,
권성연, 유철규, 김영환, 한성구, 심영수, 이춘택

= Abstract =

The Effect of I κ B α -SR Gene Transfer on the Sensitivity of
Human Lung Cancer Cell Lines to Cisplatin and Paclitaxel

Seok Young Lee, M.D., Ja Young Seol, M.S., Kyung Ho Park, M.S.,
Gun Min Park, M.D., Yong Il Hwang, M.D., Cheol Hyeon Kim, M.D.,
Seung Hun Jang, M.D., Sung-Youn Kwon, M.D., Chul-Gyu Yoo, M.D.,
Young Whan Kim, M.D., Sung Koo Han, M.D., Young-Soo Shim, M.D.,
and Choon-Taek Lee, M.D.

*Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine,
and Lung Institute Medical Research Center, Seoul National University, Seoul, Korea*

Background : Some chemotherapeutic drugs induce NF- κ B activation by degrading the I κ B α protein in cancer cells which contributes to anticancer drug resistance. We hypothesized that inhibiting I κ B α degradation would block NF- κ B activation and result in increased tumor cell mortality in response to chemotherapy.

Methods : The "superrepressor" form of the NF- κ B inhibitor was transferred by an adenoviral vector (Ad-I κ B α -SR) to the human lung cancer cell lines (NCI H157 and NCI H460). With a MTT assay, the level of sensitization to cisplatin and paclitaxel were measured. To confirm the mechanism, an EMSA and Annexin V assay were performed.

*이 논문은 보건 의료기술 연구개발사업 (HMP-98-B-3-0017)의 지원으로 이루어졌음.

Address for correspondence :

Choon-Taek Lee, M.D.

Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine
28 Yongon-Dong, Chongno-Gu, Seoul 110-744, Korea

Phone : 02-760-2634 Fax : 02-762-9662 E-mail : ctlee@snu.ac.kr

Results : EMSA showed that I κ B α -SR effectively blocked the NF- κ B activation induced by cisplatin. Transduction with Ad-I κ B α -SR resulted in an increased sensitivity of the lung cancer cell lines to cisplatin and paclitaxel by a factor of 2~3 in terms of IC₅₀. Annexin-V analysis suggests that this increment in chemosensitivity to cisplatin probably occurs through the induction of apoptosis.

Conclusion : The blockade of chemotherapeutics induced NF- κ B activation by inducing Ad-I κ B α -SR, increased apoptosis and increasing the chemosensitivity of the lung cancer cell lines tested, subsequently. Gene transfer of I κ B α -SR appears to be a new therapeutic strategy of chemosensitization in lung cancer. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2001, 51 : 122-134)

Key words : Lung cancer, NF- κ B, I κ B α , adenovirus, cisplatin, paclitaxel, chemosensitization.

서 론

폐암이 최근 빈도 및 사망률에 있어 급격히 증가하고 있으며 국내의 높은 흡연률을 감안해보면 앞으로도 유병률이 더욱 증가할 것으로 예상된다. 폐암 중 대다수를 차지하는 비소세포폐암인 경우 근치적 수술이 가장 좋은 치료법으로 알려져 있으나 많은 경우에 재발이 일어나서 그 동안 항암 화학 요법이나 방사선 치료 등에 대한 많은 연구가 이루어졌지만 초기에는 치료에 반응을 보이다가 나중에 결국 악성 세포가 항암제에 대하여 저항을 보이므로써 실패하는 경우가 많다.

비소세포폐암이 항암제에 내성을 나타내는 기전은 아직 밝혀지지 않은 상태이나, 최근 분자 생물학적인 방법을 통한 연구의 결과로 악성 세포의 발생은 세포의 성장이나 분화에 관련된 유전자들의 조절작용에 불균형이 발생함으로써 일어난다는 사실이 알려지게 되었으며, NF- κ B는 이러한 세포의 성장에 영향을 미칠 수 있는 전사인자로 생각되어 지는 물질이다. 비소세포폐암조직 및 세포주에서 NF- κ B중의 subunit인 p50의 발현이 증가되어 있다는 보고가 있으며¹, NF- κ B의 활성 증가가 apoptosis에 대한 저항과 연관이 있다는 보고와 연관지어보면 폐암세포나 세포주에서의 항암 치료에 대한 내성에 NF- κ B의 활성이 관여할 가능성이 있다.

NF- κ B는 처음에는 쥐의 B 림프구에서 kappa light chain 발현을 조절하는 전사인자로 발견되었으며², 이후에 다양한 세포들에서 특히 면역 및 염증반

응에서 중요한 전사인자로 확인되면서 관심이 집중되어 왔다. 정상적인 상태에서 NF- κ B는 세포질 내에서 I κ B라는 단백질과 결합되어 존재하고 있으며³ 세포가 NF- κ B를 활성화하는 자극을 받게 되면 I κ B kinase에 의하여 I κ B α 의 32번과 36번의 serine residue가 인산화되고⁴, 인산화된 I κ B α 는 proteasome에 의하여 즉시 분해된다⁵. I κ B α 의 분해에 의해 자유로워진 NF- κ B는 세포핵 내로 이동하여 특이 유전자의 promoter region에 결합함으로써 해당 유전자의 전사를 촉진한다^{6,7}.

I κ B α 는 NF- κ B의 활성을 유발하는 어떤 자극에 의해서도 즉시 분해되어 NF- κ B가 활성화되거나 I κ B 유전자 자체가 또한 promoter region에 κ B를 인식할 수 있는 부위를 가지고 있어서 세포핵 내로 들어온 NF- κ B에 의해 I κ B α 의 합성이 촉진되며 합성된 I κ B α 는 세포질 내에서 NF- κ B와 결합하여 NF- κ B의 활성을 억제한다. 또한 일부의 I κ B α 는 세포핵 내로 이동하여 promoter region에 결합하고 있는 활성화된 NF- κ B를 제거하여 활성화된 NF- κ B의 활동이 한시적으로 일어나도록 조절한다^{8,9}. I κ B α 단백질들은 N-terminal부위에 serine residue쌍을 가지고 있으며 I κ B α 는 32번과 36번 아미노산에 serine residue를 가지고 있고 돌연변이에 의해 serine이 인산화되지 않는 alanine으로 치환된 I κ B α mutant는 proteasome에 분해되지 않고 계속 NF- κ B와 결합됨으로써 지속적으로 NF- κ B의 활성을 저해하여 super-repressor로 불린다.

NF- κ B와 항암제 내성과 연관성에 대해서는 많이 연구되어 있다. 쥐의 macrophage와 fibroblast, 인간의 fibroblast와 lymphoma cell line, bladder carcinoma cell line을 이용한 실험에서 super-repressor mutant $I\kappa B\alpha$ 의 삽입으로 NF- κ B의 활성을 억제하여 apoptosis에 대한 저항을 극복하였다^{10,11}. 또한, TNF- α 에 의한 apoptosis에 저항을 보이는 human fibrosarcoma 세포주에 super-repressor $I\kappa B\alpha$ 를 발현시켜 NF- κ B의 활성을 억제시켰을 때 이 세포주에서 TNF- α 에 의한 apoptosis가 증가하며, apoptosis를 유발하는 ionizing radiation이나 항암 치료제인 daunorubicin의 효과도 역시 증대되어 NF- κ B가 apoptosis에 대한 저항에 역할을 한다고 주장한 보고도 있다¹².

폐암세포주에 대해서도 같은 사실이 확인되면 폐암의 치료에 있어서 새로운 전기가 될 수 있다고 생각된다. 본 연구에서는 비소세포폐암 세포주인 NCI H157, NCI H460 세포주에 외부에서 super-repressor mutant $I\kappa B\alpha$ 유전자를 adenovirus를 이용하여 삽입하여 NF- κ B의 활성을 억제하였을 때 폐암세포주가 항암제에 대한 감수성이 증가되는지를 확인하였다.

대상 및 방법

1. 연구 재료

폐암세포주 NCI H157, NCI H460은 미국 국립 암연구소(NCI)의 Frederic J. Kaye 박사로부터 제공받았고, $I\kappa B\alpha$ 는 32번과 36번의 serine이 alanine으로 치환된 super-repressor $I\kappa B\alpha(I\kappa B\alpha$ -SR)로 미국 North Carolina 대학의 Albert S Baldwin교수에게 제공받았으며, adenoviral shuttle vector에 삽입한 Ad- $I\kappa B\alpha$ -SR를 만들어 사용하였다^{13,14}.

2. 세포배양

실험에 사용한 폐암세포주 NCI H157, NCI H460은

10% 우태혈청, penicillin (30 μ g/ml), streptomycin(50 μ g/ml)이 포함된 RPMI 1640을 이용해 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

3. Ad- $I\kappa B\alpha$ -SR의 제작

$I\kappa B\alpha$ -SR cDNA가 삽입되어 있는 pCMV4- $I\kappa B\alpha$ -SR와 adenoviral shuttle vector pAC-CMVpLpA를 BamHI과 HindIII로 각각 자른 후 1% agarose gel에서 전기영동하여 $I\kappa B\alpha$ -SR cDNA와 pAC-CMVpLpA를 분리하였고, 이를 T4 ligase를 이용하여 16 $^{\circ}$ C에서 결합한 후 E.coli DH5 α 에 삽입하여 배양하였다. 생성된 colony에서 plasmid를 분리하였고 이를 BamHI과 HindIII로 잘라 pAC-CMV- $I\kappa B\alpha$ -SR의 존재를 확인하였다.

이후 pAC-CMV-SR- $I\kappa B\alpha$ 와 pJM17을 293세포에 calcium phosphate방법으로 동반 이입시켰다¹⁴. 1% 우태혈청이 포함된 RPMI 1640으로 293세포를 2~3주간 배양하여 유전자재조합을 통해 Ad- $I\kappa B\alpha$ -SR가 생성되어 이에 의한 세포독성 효과가 생기는지를 관찰하였고, 세포독성이 관찰된 plate의 세포를 freezing/thawing을 통해 용해한 후 이 세포 용해액에서 DNA를 분리하여 DNA 염기서열을 분석하여 확인하였다. $I\kappa B\alpha$ 의 생산은 anti- $I\kappa B\alpha$ antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 이용하여 Western blot을 시행하여 확인하였다.

4. Adenovirus의 세포내 이입(transduction)

NCI H157, NCI H460 폐암세포주를 trypsin처리 후 배양접시에서 세포를 분리하여 96well plate에 분주하였고 Ad- $I\kappa B\alpha$ -SR, AdLacZ을 20moi가 되게 RPMI에 희석하여 세포 위에 고루 뿌린 후 1시간 동안 배양 후 용액을 제거하고 완전 배지를 넣은 다음 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 배양기에 48시간동안 배양하였다.

5. 항암제의 투여

Cisplatin(Sigma, St Louis, MO), paclitaxel(Sigma, St Louis, MO)을 사용하였으며 cisplatin은 차광된 상태로 실온에서 paclitaxel은 4°C에서 냉장 보관하였으며 cisplatin은 0, 0.3, 1, 3, 10, 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, paclitaxel은 0, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 완전 배지로 희석하였고 5% 이산화탄소, 37°C 배양기에서 72시간동안 배양하였다.

6. MTT assay

Phosphate Buffered Saline에 최종 농도가 5mg/ml가 되도록 녹인 MTT용액을 2 μm 의 filter막에 여과시켜 멸균시킨 후, 96well plate의 각 well에 MTT농도가 0.5mg/ml가 되도록 첨가하였다.

37°C에서 4시간동안 incubation 한 후 배양액을 제거하고 100% DMSO 50 μl 을 첨가하여 590nm에서 ELISA 판독기로 광학밀도를 측정하였다.

7. Western 분석법

세포 내의 총 단백을 Whole Lysis Buffer(0.1% Nonidet P40, 5mM EDTA, 50mM Tris, pH 7.5-8.0, 250 mM NaCl, 50mM NaF)로 추출한 후 bicinchoninic acid법으로 단백질 농도를 측정하였다. 30 μg 의 단백을 10% SDS-PAGE로 전기영동하고 Nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 5% skim-milk에 1:1000으로 희석한 rabbit polyclonal anti-p65 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)나 rabbit polyclonal anti- $I\kappa B\alpha$ -antibody를 membrane과 실온에서 밤새 반응시킨 후 PBS로 15분씩 3번 세척하였다. Membrane을 5% skim-milk에 1:2000으로 희석한 goat-anti-rabbit HRP-coated antibody (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)로 1시간 동안 반응시킨 후 PBS로 15분씩 3번 세척하였고

ECL kit를 이용해 발색시켰다.

8. EMSA

추출된 핵단백질 10 μg 을 NF- κ B consensus binding site를 가진 ^{32}P -labeled oligonucleotide probe (5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3')와 함께 binding buffer(4% glycerol, 1mM MgCl_2 , 0.5mM EDTA, 0.5mL DTT, 50mM NaCl, 10mM Tris-HCl(pH7.5) poly(dI-dC) poly(dI-dC))에서 20분간 상온에 반응시킨다.

상기 혼합물을 4% non denaturing polyacrylamide gel에서 전기영동한 후 -70°C에서 현상하였다.

9. Annexin-V assay

NCI H157, NCI H460 폐암세포주를 100mm 배양 접시에 분주하고 Ad- $I\kappa B\alpha$ -SR 혹은 AdLacZ로 감염시킨 다음 24시간 후 cisplatin으로 처리한 후 세포를 분리하였으며 세포수가 1×10^6 개가 되도록 배양 튜브에 담아서 원심분리 후 세포를 침전시켰다. 침전된 세포에 annexin V 및 propidium iodide를 넣어 부유시키고 빛을 차단한 상태에서 30분간 유지한 다음 Flow cytometry(Becton Dickinson사, San Jose, CA)로 분석하였다.

10. 통계처리

NCI H157, NCI H460 폐암세포주에 Cisplatin 또는 paclitaxel만 투여한 군, 항암제와 함께 AdLacZ을 투여한 군, 항암제와 함께 Ad- $I\kappa B\alpha$ -SR 투여한 군 사이의 IC_{50} 변화를 one-way analysis of variance (ANOVA)로 분석하였으며 세 군 사이에 유의한 차이가 나온 경우에는 Tukey법으로 다중비교를 하였고, $p < 0.05$ 인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 보았다.

결 과

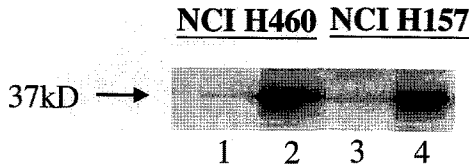
1. 비소세포폐암 세포주 NCI H157, NCI H460에서 Adenoviral vector를 이용한 I κ B α -SR의 유전자 이입 효율

NCI H157, NCI H460세포에 β -galactosidase가 coding된 adenovirus vector(AdLacZ)를 이입시킨 후 β -galactosidase염색을 하여 효율을 알아보았다. 20moi (multiplicity of infection)로 adenovirus를 주었을 때 90% 이상의 세포가 β -galactosidase를 발현하였다.

I κ B α -SR가 coding된 Ad-I κ B α -SR를 20moi로 준 후 48시간 후에 I κ B α 에 대하여 Western blot을 시행하여 알아보았다. I κ B α -SR가 이입된 세포는 대조군 세포에 비해 매우 많은 양의 I κ B α 단백질이 발현되고 있음을 알 수 있었다(Fig. 1).

2. Ad-I κ B α -SR의 이입에 의한 NF- κ B 단백질의 발현 양상(EMSA)

NCI H157세포주에 각각 AdLacZ 20moi 단독, Ad-I κ B α -SR 20moi 단독, AdLacZ 20moi이입 후 cisplatin 3 μ g/ml, Ad-I κ B α -SR 20moi 이입 후



1,3: Ad-LacZ, 2,4: Ad-I κ B α SR

Fig. 1. Overexpression of exogenous I κ B α -SR.

NCI H157 and NCI H460 cells were infected with AdLacZ or Ad-I κ B α -SR at 20moi. Forty eight hours after infection, whole cell extracts were separated by 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes, and I κ B α was detected by rabbit polyclonal I κ B α antibody.

cisplatin 3 μ g/ml를 투여한 후 핵단백을 추출하여 NF- κ B에 대한 EMSA를 시행하였다. 대조 바이러스인 AdLacZ 20moi를 이입한 후 cisplatin 3 μ g/ml를 투여한 군에서는 핵내로 NF- κ B의 이동이 관찰되나, Ad-I κ B α -SR를 이입 후 cisplatin을 투여한 군에서는 NF- κ B의 핵내 이동하여 활성화되는 것이 억제되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 2).

3. Ad-I κ B α -SR의 이입이 NCI H157, NCI H460의 항암제 감수성에 미치는 효과

우선 Ad-I κ B α -SR와 AdLacZ 20moi를 단독으로 감염시 세포 성장에 미치는 영향을 본 결과 NCI H157, NCI H460 세포에 모두에서 두 종류의 adenovirus감염 자체는 세포 성장에 유의한 변화를 일으키지는 않았다(Fig. 3).

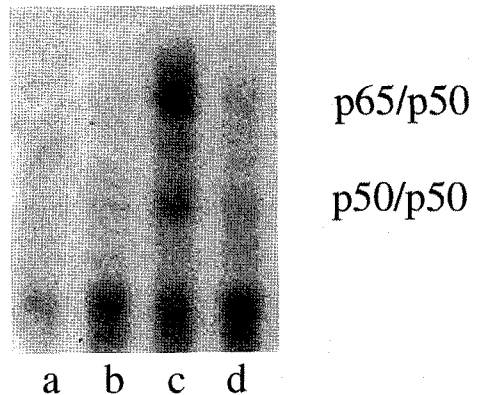


Fig. 2. EMSA showed NF- κ B activation by cisplatin that was effectively blocked by Ad-I κ B α SR in NCI H157 cancer cell lines.

Cells were treated with AdLacZ alone(a) or with cisplatin (Ad-LacZ/cisplatin)(c), adenovirus-I κ B α SR alone(b) or with cisplatin(Ad-I κ B α SR/cisplatin)(d). The EMSA of nuclear protein extracts of NCI H157 cells shows the activation of NF- κ B (p65/p50)(c lane) However, pretreatment with Ad-I κ B α SR completely inhibited the activation of NF- κ B(p65/p50)(d lane).

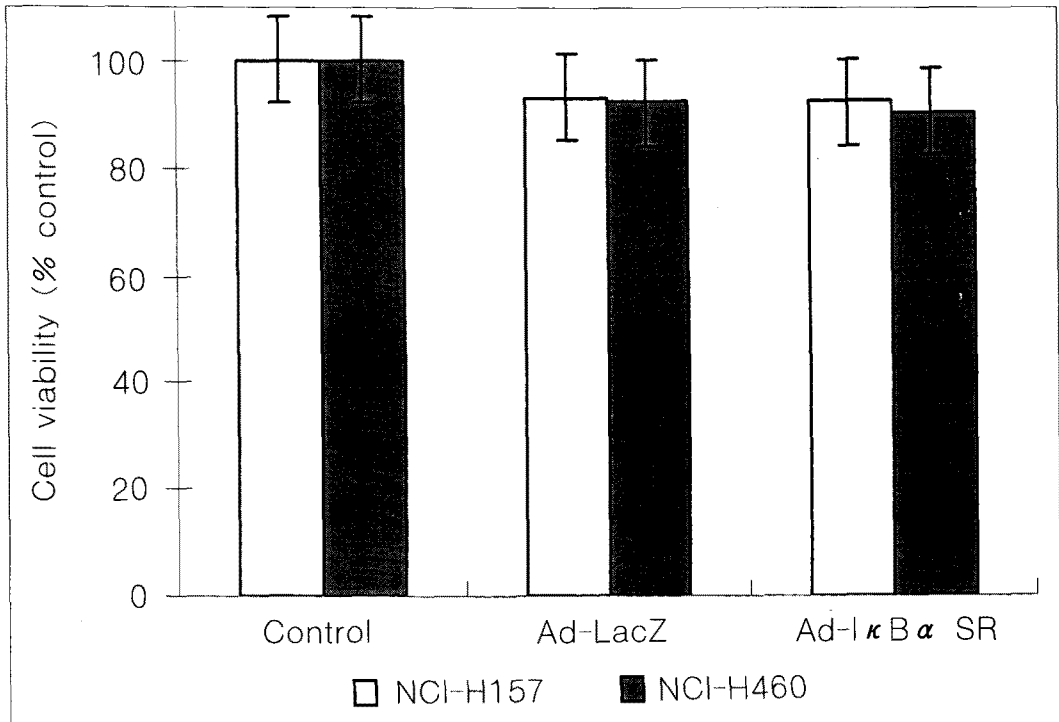


Fig. 3. Effects of adenovirus infection on the cell viability.

Cell viabilities of non-infected, Ad-LacZ-infected, and Ad-I κ B α -SR-infected NCI H157 and NCI H460 cells were evaluated by MTT assay after 5 days of incubation. Data are shown as mean percentage of control \pm standard deviation. No significant differences were found between parental (non-infected), Ad-LacZ infected and Ad-I κ B α SR infected cell lines.

다음 Ad-I κ B α -SR와 AdLacZ 20moi를 각각 NCI H157, NCI H460 세포에 감염시킨 후 cisplatin, paclitaxel을 농도별로 처리한 군과 cisplatin, paclitaxel을 단독으로 처리한 군을 서로 비교하여 I κ B α -SR의 투여가 항암제에 대한 NCI H157, NCI H460 폐암세포주의 감수성에 어떤 영향을 미치는지 알아보았다.

Cisplatin과 paclitaxel의 적정 투여 농도를 구하기 위하여 각 농도별로 72시간 동안 세포를 배양한 후, 세포 생존율(항암제를 투여하지 않은 세포의 농도를 100으로 하여 각 농도의 항암제 투여한 세포의 농도를 상대적으로 계산함)을 보았을 때 cisplatin의 경우는 0~30 μ g/ml, paclitaxel의 경우는 0~3 μ g/ml의

범위가 적절한 범위임을 알 수 있었다(Fig. 4).

다음으로, I κ B α -SR의 투여가 항암제에 대한 감수성을 높이는 지 여부를 MTT assay를 이용한 IC₅₀을 기준으로 비교하였다. Cisplatin의 경우는 NCI H157에서 대조군(virus 처리를 안한 세포주)의 IC₅₀이 Ad-I κ B α -SR 처리를 안한 폐암세포주에서는 11.3 μ g/ml 이었으나, 20moi로 Ad-I κ B α -SR transduction을 한 군에서는 IC₅₀이 5.1 μ g/ml로 낮아져 cisplatin에 대한 감수성이 약 2배 정도 증가함을 관찰 하였으며 이는 통계적으로 유의한 차이를 보였다. AdLacZ를 20moi로 transduction한 군에서는 IC₅₀이 9.7 μ g/ml로 cisplatin만 처리한 군과 통계적 유의성은 없었다. NCI H460에서는 대조군의 경우

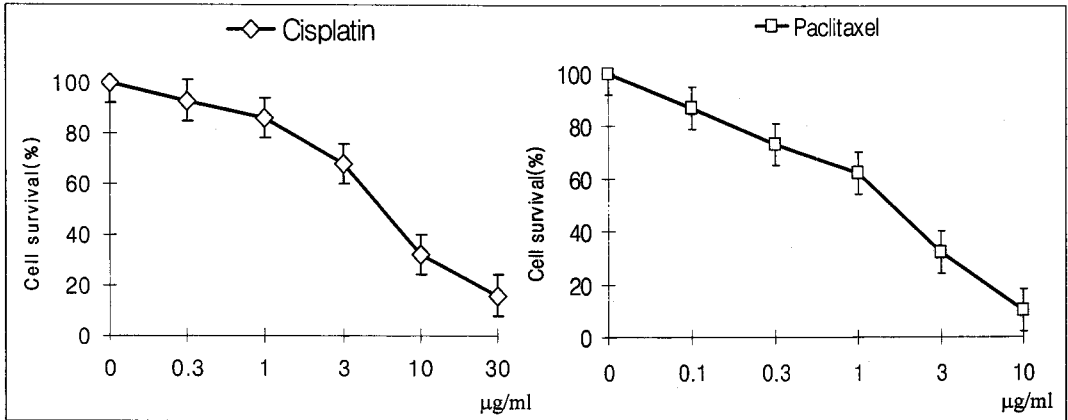


Fig. 4. Dose-dependent effects of cisplatin and paclitaxel on the cell viability of NCI H157. NCI H157 cells were treated with cisplatin(0, 0.3, 1, 3, 10, 30 µg/ml) and paclitaxel(0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 µg/ml) for 72hours. Cell viability was evaluated by MTT assay. We can deduce the ranges of concentrations of cisplatin and paclitaxel from these data. Data are shown as mean ± standard deviation.

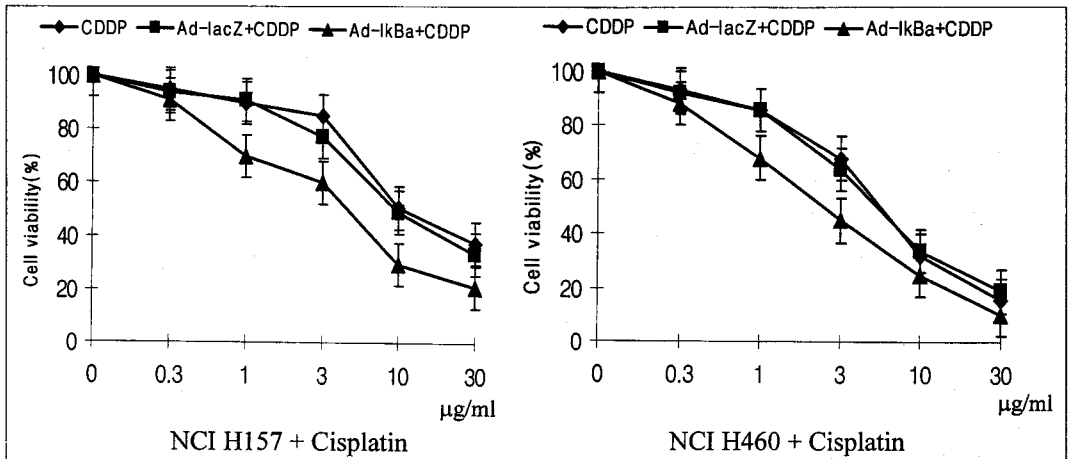


Fig. 5. Effects of adenovirus-IκBα-SR transduction on sensitivity of lung cancer cell line to cisplatin. NCI H157 and NCI H460 cells were infected with Ad-LacZ or Ad-IκBα-SR at 20moi for 48hours and then incubated with various doses of cisplatin(0, 0.3, 1, 3, 10, 30 µg/ml) for 72hours. Cell viability was evaluated by MTT assay. Data are shown as mean percentage of control ± standard deviation. IC₅₀ of Ad-IκBα-SR transduced NCI H157 and NCI H460 was significantly lower than those of others(p<0.05).

cisplatin의 IC₅₀이 7.1 µg/ml에서 Ad-IκBα-SR를 20moi로 transduction하였을 때는 2.4 µg/ml로 감소함을 보여 cisplatin에 대한 감수성이 약 3배정도

증가함을 관찰하였으며 이는 통계적으로 유의한 차이를 보였고, AdLacZ를 20moi로 transduction한 경우에는 IC₅₀이 6.5 µg/ml로 나와 cisplatin만 처치한

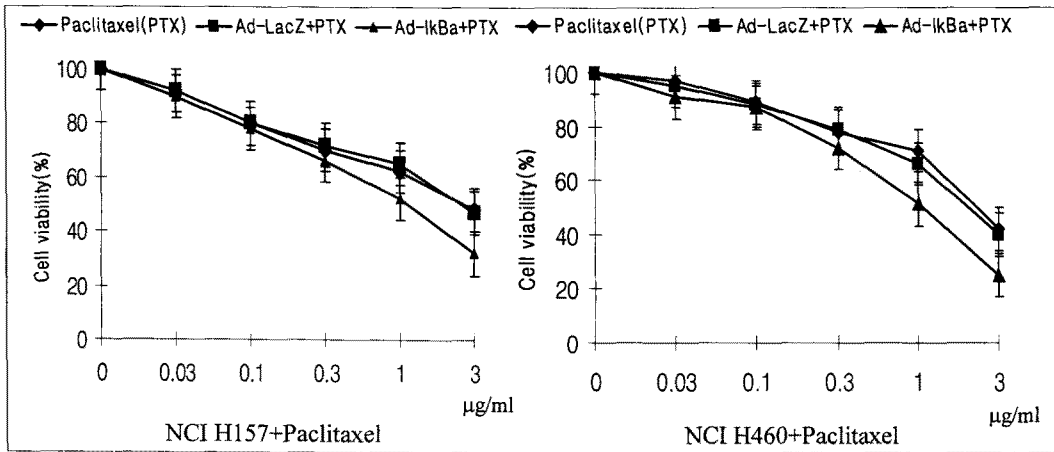


Fig. 6. Effects of adenovirus-I κ B α -SR transduction on sensitivity of lung cancer cell line to paclitaxel.

NCI H157 and NCI H460 cells were infected with Ad-LacZ or Ad-I κ B α -SR at 20moi for 48hours and then incubated with various doses of paclitaxel(0, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 μ g/ml) for 72hours. Cell viability was evaluated by MTT assay. Data are shown as mean percentage of control \pm standard deviation. IC₅₀ of Ad-I κ B α -SR transduced NCI H157/NCI H460 was significantly lower than those of others(p<0.05).

군과 별 차이가 없었다(Fig. 5).

Paclitaxel의 경우는 NCI H157에서 대조군의 IC₅₀이 3.0 μ g/ml에서 adenovirus-I κ B α -SR를 20moi로 transduction한 군에서는 1.6 μ g/ml로 낮아져 paclitaxel에 대한 감수성이 역시 2배정도 증가함을 관찰하였고 이는 통계적으로 유의한 차이를 보였으며, AdLacZ를 20moi로 transduction한 군에서는 IC₅₀이 2.9 μ g/ml이었다. NCI H460은 대조군은 paclitaxel의 IC₅₀이 2.5 μ g/ml이었고 여기에 Ad-I κ B α -SR를 20moi로 transduction한 후 paclitaxel을 처치한 경우는 IC₅₀이 1.2 μ g/ml로 낮아져 paclitaxel에 대한 감수성이 2배정도 증가함을 관찰하였다. AdLacZ를 처치한 경우에는 IC₅₀이 2.3 μ g/ml로 paclitaxel의 경우와 별 차이가 없었다(Fig. 6).

4. Ad-I κ B α -SR의 이입으로 인한 NCI H157, NCI H460의 항암제에 대한 감수성의 증대와 apoptosis와의 연관성

Ad-I κ B α -SR의 이입으로 인해서 폐암세포주의 항암

제에 대한 감수성이 증대된 것이 과연 apoptosis를 증가시킴으로 인한 것인지를 확인하기 위해 Annexin-V assay를 시행하였다. NCI H460 세포주에 아무 처치도 하지 않은 군, cisplatin 3 μ g/ml를 처치한 군, AdLacZ 20moi 이입군, AdLacZ 20moi 이입 후 cisplatin 3 μ g/ml를 처치한 군, Ad-I κ B α -SR 20moi 이입군, Ad-I κ B α -SR 20moi 이입 후 cisplatin 3 μ g/ml를 처치한 군에서 각각 flow cytometry로 apoptosis정도를 확인 해 본 결과, cisplatin만 처치한 군과 AdLacZ 이입 후 cisplatin을 처치한 군에서는 apoptosis로 인한 세포변형이 전체의 21%, 20%를 차지하였으나, Ad-I κ B α -SR 이입 후 cisplatin을 처치한 군에서는 26%를 차지해 약하지만 apoptosis의 증대를 보여주었다(Fig. 7).

고 찰

최근에 악성세포의 발생은 세포의 성장이나 분화에 관련된 유전자들의 조절작용에 불균형이 발생됨으로써 유발된다는 견해가 이루어졌다. 최초로 B림프구에서

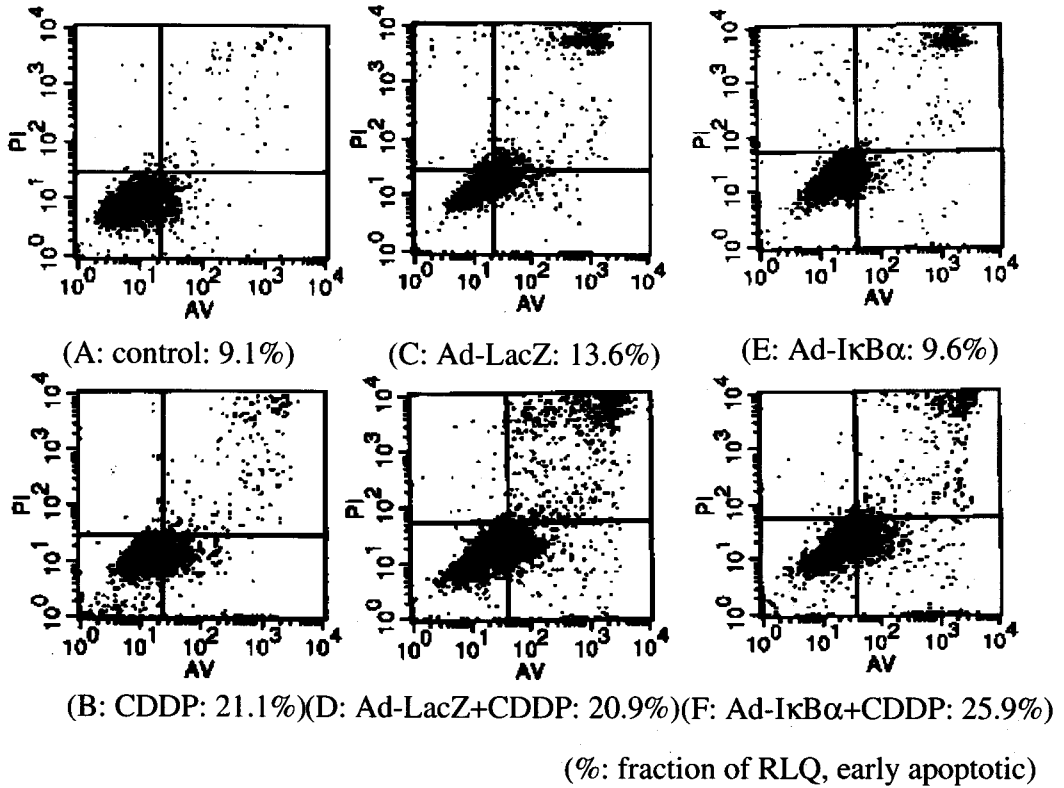


Fig. 7. Annexin-V assay of NCI H460 cells.

NCI H460 cells were treated with none(a), cisplatin 3μg/ml(b), AdLacZ 20moi(c), AdLacZ 20moi with cisplatin 3μg/ml(d), Ad-IκBα-SR 20moi(e), and Ad-IκBα-SR 20moi with cisplatin 3μg/ml(f). Right lower quadrant portion of the graph denotes the early apoptotic portion. There is more considerable increase of the early apoptotic portion between the 'e'(9.6%) and 'f'(25.9%) than 'a'(9.1%) and 'b'(21.1%) or 'c'(13.6%) and 'd'(20.9%). This result implies that the increase of chemosensitivity is probably through the enhancement of apoptosis.

발견되어 면역반응의 조절에 중요한 역할을 하는 전사 인자로 주목받았던 NF-κB는 이 후 수많은 종류의 세포에서 발견되어 최초로 주목받았던 면역 반응이외에도 급성기 반응, 세포 주기의 조절, 후천성 면역 결핍 증 바이러스를 비롯한 바이러스의 증식 등에 관련되어 중요한 역할을 수행하고 있는 것으로 알려졌고 최근에 들어서 암의 발생 및 세포의 apoptosis에 대한 내성에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다^{15,16}.

NF-κB p65/Rel A 유전자가 없는 mice의 발생기간에 광범위한 apoptosis가 발생하며¹⁷ 항암치료에 사

용되는 많은 약제들(daunorubicin, etoposide, vincristine)과 방사선 치료가 종양세포에 apoptosis를 유발함으로써 효과를 발휘하며, 종양세포는 또한 apoptosis에 대한 저항을 통하여 항암치료에 내성을 보인다¹⁸. 실제로 항암 치료제인 etoposide를 투여하면 NF-κB의 활성이 일어나며^{19,20}, daunorubicin의 항암 치료효과가 NF-κB의 활성을 억제하였을 때 증가되었다¹².

본 연구에서는 비소세포폐암에 대한 항암치료시 발생하는 항암제에 대한 내성의 기전으로 생각되는 NF

- κ B의 활성을 I κ B α 의 삽입으로 억제시키고 이로 인해 항암제에 대한 폐암세포주의 감수성이 증가하는지 여부와 이러한 현상이 apoptosis의 증가에 의한 것인지를 밝혀보고자 하였다.

항암제는 백금 화합물로서 DNA 염기내의 guanine과 결합하여 DNA chain의 교차결합을 초래하여 세포독작용을 일으키는 cisplatin과 microtubule system의 이상을 초래하여 G2 phase에서 M phase로의 진행을 막는 paclitaxel을 사용하였고 비소세포 폐암세포주로는 NCI H157, NCI H460세포주를 이용하였다. Ad-I κ B α -SR의 이입이 NF- κ B의 활성을 억제시키는지 확인하기 위하여 NCI H157세포주에 AdLacZ, Ad-I κ B α -SR의 이입 후 cisplatin을 처치한 다음 핵 단백을 추출하여 NF- κ B에 대한 EMSA를 시행하였다. 대조 바이러스인 AdLacZ의 이입후에 cisplatin을 처치한 경우 핵 내에서 NF- κ B의 활성이 증가되었으며 Ad-I κ B α -SR 삽입 군에서는 NF- κ B의 활성이 억제되어 있어서 삽입된 I κ B α -SR에 의해 NF- κ B의 핵내 이동이 차단됨을 확인하였다 (Fig. 2).

이렇게 삽입된 I κ B α -SR에 의해 NF- κ B의 핵내 이동이 억제됨으로 폐암세포주의 항암제에 대한 감수성이 증가하는지 여부를 알아보았다. NCI H157, NCI H460세포주에 각각 cisplatin, paclitaxel만 처치한 군, 20moi의 AdLacZ을 transduction한 후 cisplatin, paclitaxel을 처치한 군, 20moi의 Ad-I κ B α -SR transduction후 cisplatin, paclitaxel을 처치한 군으로 나누었으며 cisplatin의 농도는 0, 0.3, 1, 3, 10, 30 μ g/ml, paclitaxel은 0, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 μ g/ml로 증가시키면서 투여하였다. 각 군의 세포 생존율을 IC₅₀으로 비교해 보았을 때, Ad-I κ B α -SR를 transduction한 후 cisplatin, paclitaxel을 처치한 군에서 IC₅₀이 통계적으로 유의하게 낮아짐을 관찰할 수 있었다. cisplatin, paclitaxel만 처치한 군과 AdLacZ을 transduction후 cisplatin, paclitaxel을 처치한 군 사이에는 IC₅₀의 통계적으로 유의한 차이를 관찰할 수 없어서 바이러스 삽입 자체는 항암제 감수

성에 별 영향을 미치지 않는 것으로 보인다(Fig. 5, 6).

이는 I κ B α 가 NF- κ B를 세포질에서 붙잡고 있음으로 해당 유전자의 전사를 억제하고, 핵내에 들어간 I κ B α 는 핵내의 NF- κ B와 결합해서 NF- κ B의 DNA binding을 억제하고 핵내의 NF- κ B를 끌고 세포질로 나와서 NF- κ B의 활성을 억제시킴을 고려해볼 때 cisplatin, paclitaxel에 의해 활성화된 NF- κ B가 I κ B α -SR의 transduction으로 인해 활성이 억제됨으로 폐암세포주인 NCI H157, NCI H460의 cisplatin, paclitaxel에 대한 감수성이 증가한 것으로 생각할 수 있겠다.

다음으로 이러한 NF- κ B의 억제로 인한 세포사멸의 증가가 apoptosis의 유도에 의한 것인지를 알아보기 위해 Annexin-V assay를 시행하였다.

아무 처치도 않은 군과 cisplatin 3 μ g/ml를 처치한 군 사이에서의 apoptosis변화율을 AdLacZ 20moi를 이입한 군과 동량의 AdLacZ를 이입 후 cisplatin 3 μ g/ml를 처치한 군 사이에서의 apoptosis변화율과 비교해 보면 별 차이가 없음을 알 수 있다. 그러나, Ad-I κ B α -SR를 20moi로 이입한 군과 20moi의 Ad-I κ B α -SR를 이입 후 cisplatin을 3 μ g/ml로 처치한 군에서의 apoptosis변화율은 상기 변화율보다 더욱 증가되었음을 알 수 있다.

이상의 결과는 비소세포폐암 세포주에 외부에서 I κ B α -SR를 삽입하여 NF- κ B의 활성을 억제하였을 때 NCI H157, NCI H460 폐암세포주의 cisplatin에 대한 내성이 I κ B α -SR의 삽입으로 apoptosis의 과정을 통하여 극복된다는 것을 보여주는 소견이다. 향후 Paclitaxel에 대한 검사도 시행될 예정이다.

그렇지만 현재까지 NF- κ B의 활성과 apoptosis의 관계에 대해서는 서로 상반된 보고들이 있다. I κ B α -SR의 발현으로 NF- κ B의 활성을 억제시킨 human fibrosarcoma cell line에서 TNF- α , ionizing radiation, 그리고 daunorubicin에 의한 apoptosis가 증가되고 이 세포주에 다시 NF- κ B의 subunit인 p50과 Rel A를 발현시켰을 때 다시 TNF- α 에 의한 세

포사멸이 감소하였고¹², human fibroblast cell line HT 1080에서 daunorubicin을 투여시 NF- κ B의 activation으로 apoptosis가 억제되고, HT1080 cell에 NF- κ B의 natural inhibitor인 I κ B α 를 topoisomerase I inhibitor인 CPT-11과 함께 처치시 apoptosis가 항진됨을 보고하였다²¹. 따라서 위의 연구들은 NF- κ B의 활성이 anti-apoptosis와 연관되어 있음을 뒷받침하고 있다.

이와는 반대로 ataxia telangiectasia 환자의 fibroblast에 mutant I κ B α 를 삽입하여 NF- κ B의 활성을 억제시켰을 때 radiation에 의한 apoptosis가 오히려 감소하며²², 293세포주에 serum starvation으로 apoptosis를 유도하였을 때 dominant negative Rel A mutant 삽입으로 NF- κ B 활성을 억제시킨 세포주에서 apoptosis가 감소하여²³ NF- κ B의 활성 증가가 apoptosis를 오히려 항진시킨다는 보고들도 있다.

한편, human breast carcinoma MCF7 cell line에 mutant I κ B α 를 삽입한 뒤에 TNF- α 를 처치하였을 때 대조군과 비교하여 생존율이 차이가 없었고²⁴, dominant negative form의 I κ B α 를 표현하는 HPB lymphoid T cell, HCT116 (human colon carcinoma cell), OVCAR-3 (ovarian carcinoma cell) 등에서 TNF- α , 항암제 투여시 NF- κ B의 활성의 감소를 가져 왔으나 대조군과 mutated I κ B α 를 표현하는 군 사이에 생존율에는 차이가 없었음을 보고하여²⁵ NF- κ B의 활성과 apoptosis가 무관하다는 주장도 있다.

비소세포폐암 세포주 NCI H157, NCI H460을 대상으로 한 본 실험에서는 본 연구실에서 개발된 Adenovirus-I κ B α -SR의 투여²⁶로 NF- κ B의 활성억제를 통하여 cisplatin에 의한 apoptosis의 증가가 관찰되었고 폐암세포주를 대상으로 외부에서 도입한 I κ B α -SR 유전자에 의하여 항암제에 의해서 유발된 apoptosis의 증가현상이 일어나는 지를 확인한 것은 의의가 있다고 할 수 있으며, 이러한 면에서 Ad-I κ B

α -SR transduction은 항암제에 대한 폐암세포주의 감수성을 증가시킴으로 앞으로 폐암을 치료하는데 있어 새로운 치료 방법이 될 수 있을 것으로 보인다.

요 약

연구배경 :

종양 세포들이 항암제에 대하여 저항을 나타내는 기전인 'apoptosis에 대한 저항'에 NF- κ B의 활성이 중요한 역할을 하리라 생각되고 있다. 즉, NF- κ B가 종양 세포의 apoptosis를 억제하는 작용을 일으킴으로써 종양 세포의 생존에 유리하게 작용하고 있음이 제시되고 있다.

방 법 :

본 연구에서는 비소세포폐암에 대한 항암 치료의 내성에 대하여 외부 자극으로 분해되지 않는 I κ B α -SR의 삽입으로 NF- κ B의 활성을 억제시키고 이로 인해 항암제에 대한 폐암세포주의 감수성이 증가하는지 여부를 밝혀 보고자 하였다.

결 과 :

비소세포폐암 세포주로 NCI H157, NCI H460 세포주를 이용하였고, Ad-I κ B α -SR를 transduction 한 후 cisplatin을 처치한 군에서 NF- κ B의 핵 내로의 이동이 억제되었으며 대조군과 비교시 IC₅₀이 2-3배 정도 유의하게 낮아짐을 관찰하였다. 또한 paclitaxel의 경우에도 Ad-I κ B α -SR로 감염된 폐암세포주는 대조군과 비교시 IC₅₀이 2배 정도 유의하게 낮아짐을 관찰하였다. 이러한 항암제에 대한 감수성의 증가의 기전으로 cisplatin의 경우는 I κ B α -SR의 도입이 NF- κ B의 활성을 억제함으로 인한 apoptosis의 증대 때문인 것으로 보인다.

결 론 :

폐암세포주에서 Ad-I κ B α -SR transduction은 cisplatin, paclitaxel에 대한 폐암세포주의 감수성을 증가시킴으로 앞으로 폐암을 치료하는데 있어 새로운 치료 방법이 될 수 있을 것으로 보인다.

참 고 문 헌

1. Mukhopadhyay T, Roth JA, Maxwell SA. Altered expression of the p50 subunit of the NF- κ B transcription factor complex in non-small cell lung carcinoma. *Oncogene* 1995;11:999-1003.
2. Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986;46:705-16.
3. Baldwin AS Jr. The NF- κ B and I κ B α proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14:649-83.
4. Cohen L, Henzel WJ, Baeuerle PA. IKAP is a scaffold protein of the I κ B kinase complex. *Nature* 1998;395:292-6.
5. DiDonato J, Mercurio F, Rosette C, Wu-Li J, Suyang H, Ghosh S, Karin M. Mapping of the inducible I κ B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol* 1996;16:1295-304.
6. Kieran M, Blank V, Logeat F, Vandekerckhove J, Lottspeich F, Le Bail O et al. The DNA binding subunit of NF- κ B is identical to factor KBF1 and homologous to the rel oncogene product. *Cell* 1990;62:1007-18.
7. Cross SL, Halden NF, Lenardo MJ. Mechanism of expression and role in transcriptional control of the protooncogene NF- κ B-2/LYT-10. *Oncogene* 1994;9:923-33.
8. Arenzana-Seisdedos F, Thompson J, Rodriguez MS, Bachelier F, Thomas D, Hay RT. Inducible nuclear expression of newly synthesized I κ B α negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF- κ B. *Mol Cell Biol* 1995;15:2689-96.
9. Zabel U, Baeuerle PA. Purified human I κ B α can rapidly dissociate the complex of the NF- κ B transcription factor with its cognate DNA. *Cell* 1990;61:255-65.
10. Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF- κ B in preventing TNF α -induced cell death. *Science* 1996;274:782-4.
11. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF α -induced apoptosis by NF- κ B. *Science* 1996;274:787-9.
12. Wang C-Y, Mayo MW, Baldwin AS Jr. TNF α and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF- κ B. *Science* 1996;274:784-7.
13. Becker TC, Noel RJ, Coats WS, Gerard R, Newgaard S. Use of recombinant adenovirus for metabolic engineering of mammalian cells. *Protein expression in animal cells. Methods Cell Biol* 1994;43:161-88.
14. Lee CT, Wu S, Gabrilovich D, Chen H, Nadaf-Rahrov S, Ciernik IF, Carbone DP. Antitumor effects of an adenovirus expressing antisense insulin-like growth factor I receptor on human lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1996;56(13):3038-41.
15. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994;12:141-79.
16. Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF- κ B. *Annu Rev Cell Biol* 1994;10:405-55.
17. Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF- κ B. *Nature* 1995;13:167-70.
18. Fisher DE. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell* 1994;26:539-42.
19. Slater AF, Kimland M, Jiang SA, Orrenius S. Constitutive nuclear NF kappa B/rel DNA-bind-

- ing activity of rat thymocytes is increased by stimuli that promote apoptosis, but not inhibited by pyrrolidine dithiocarbamate. *Biochem J* 1995; 312:833-8.
20. Bassho R, Matsubara K, Kubota M. 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. Cusack JC Jr, Liu R, Baldwin AS Jr. Inducible chemoresistance to 7-ethyl-10 carbonyloxycamptothecin(CPT-11) in colorectal cancer cells and a xenograft model is overcome by inhibition of nuclear factor-kB activation. *Cancer Res* 2000; 60:2323-30.
22. Jung M, Zhang Y, Lee S, Dritschilo A. Correction of radiation sensitivity in ataxia telangiectasia cells by a truncated I κ B α . *Science* 1995;268: 1619-21.
23. Grimm S, Baeuerle PA. The inducible transcription factor NF- κ B : structure-function relationship of its protein subunits. *Biochem J* 1993;290: 297-308.
24. Cai Z, Korner M, Tarantino N, Chouaib S. I κ B α overexpression in human breast carcinoma MCF7 cells inhibits nuclear factor-kB activation but not tumor necrosis factor- α -induced apoptosis. *J Biol Chem* 1997;272:96-101.
25. Bentires-Alj M, Hellin AC, Ameyar M, Chouaib S, Merville MP, Bours V. Stable inhibition of nuclear factor kB in cancer cells does not increase sensitivity to cytotoxic drugs. *Cancer Res* 1999; 59:811-5
26. Kim JY, Lee S, Hwangbo B, Lee CT, Kim YW, Han SK, Shim YS, Yoo CG. NF-kB activation is related to the resistance of lung cancer cells to TNF- α induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Comm* 2000;273:140-6