

폐암 세포에서 기저 상태와 TNF- α 자극 시 NF- κ B의 활성화

서울대학교 의과대학 내과학교실¹ 및 의학 연구원 폐 연구소²

황보 빈¹, 이승희¹, 유철규^{1,2}, 이춘택^{1,2}, 한성구^{1,2}, 심영수^{1,2}, 김영환^{1,2}

= Abstract =

Activation of NF- κ B in Lung Cancer Cell Lines in Basal and TNF- α Stimulated States

Bin Hwangbo, M.D.¹, Seunghee Lee¹, Choon-Taek Lee, M.D.^{1,2}, Chul-Gyu Yoo, M.D.^{1,2},
Sung Koo Han, M.D.^{1,2}, Young-Soo Shim, M.D.^{1,2}, and Young Whan Kim, M.D.^{1,2}

*Department of Internal Medicine¹ and Lung Institute²
Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea*

Background : The NF- κ B transcription factors control various biological processes including the immune response, acute phase reaction and cell cycle regulation. NF- κ B complexes are retained in the cytoplasm in the basal state and various stimuli cause a translocation of the NF- κ B complexes into the nucleus where they bind to the κ B elements and regulate the transcription of the target genes. Recent reports also suggest that NF- κ B proteins are involved in oncogenesis, tumor growth and metastasis. High expression of NF- κ B expression was reported in many cancer cell lines and tissues. The constitutive activation of NF- κ B was also reported in several cancer cell lines supporting its role in cancer development and survival. The anti-apoptotic action of NF- κ B is important for cancer survival. NF- κ B also controls the expression of several proteins that are important for cellular adhesion (ICAM-1, VCAM-1) suggesting a role in cancer metastasis. In lung cancer, high expression levels of the NF- κ B subunit p50 and c-Rel were reported. In fact, high expression does not mean a high activity, and the activation pattern of NF- κ B in lung cancer has not been reported.

Methods : In this study, the NF- κ B nuclear binding activity in the basal and TNF- α stimulated states were ex-

Address for correspondence :

Young Whan Kim, M.D.

Department of Internal Medicine, Seoul National University Hospital

28 Yongon-dong, Chongno gu, Seoul, Korea

Phone : 02-760-2865 Fax : 02-762-9662 E-mail : ywkim@snu.ac.kr

amined in various lung cancer cell lines and compared with the normal bronchial epithelial cell line. Twelve lung cancer cell lines including the non-small cell and small cell lung cancer cell lines (A549, NCI-H358, NCI-H441, NCI-H522, NCI-H2009, NCI-H460, NCI-H1229, NCI-H1703, NCI-H157, NCI-H187, NCI-H417, NCI-H526) and BEAS-2B bronchial epithelial cell line were used. To evaluate the NF- κ B expression and DNA binding activity, western blot analysis and an electrophoretic mobility shift assay with the nuclear protein extracts.

Results : The basal expressions of the p65 and p50 subunits were observed in the BEAS-2B cell line and all lung cancer cell lines except for NCI-H358 and NCI-H460. The expression levels of p65 and p50 were increased 30 minutes after stimulation with TNF- α in BEAS-2B and in 10 lung cancer cell lines. In the NCI-H358 and NCI-H460 cell lines, p65 expression was not observed in the basal and stimulated states and the two p50 related protein levels were higher after stimulation with TNF- α . These new proteins were smaller than p50 and are thought to be variants of p50. In the basal state, NF- κ B was nearly activated in the BEAS-2B and all lung cancer cell lines. The DNA binding activity of the NF- κ B complexes was markedly higher after stimulation with TNF- α . In the BEAS-2B and all lung cancer cell lines except for NCI-H358 and NCI-H460, the activated NF- κ B complex was a p65/p50 heterodimer. In the NCI-H358 and NCI-H460 lung cancer cell lines, the NF- κ B complex was variant of a p50/p50 homodimer.

Conclusion : The NF- κ B activation pattern in the lung cancer cell lines and the normal bronchial epithelial cell lines was similar except for the activation of a variant of the p50/p50 homodimer in some lung cancer cell lines. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2002, 52 : 485-496)

Key words : Lung cancer, NF-kappaB, Activation, p50, p65

서 론

Nuclear factor- κ B(NF- κ B)는 여러 가지 세포 활동과 관련이 있는 전사 인자이다. NF- κ B family에 속하는 단백질로는 p50/p105(NF- κ B1), p52/p100(NF- κ B2), c-Rel, RelB, p65(RelA)가 알려져 있고 세포 내에서 homo- 또는 heterodimer의 복합체 형태로 존재한다. 가장 잘 알려진 복합체 형태는 p50/p65 heterodimer이며 이는 I κ B라는 억제인자와 세포질 내에 결합하여 있다가 어떤 자극이 있을 때 핵 내로 들어가 여러 가지 유전자의 전사를 조절한다¹⁻².

NF- κ B는 세포 면역반응, 급성기 반응, 세포 주기 조절 등 다양한 세포활동을 조절하는 것으로 알려져 있는데 NF- κ B에 의해 전사의 조절을 받는 유전자만 도 사이토카인, 성장 인자, 부착물질 등 150 종 이상

이 알려져 있다³. 최근 여러 연구에서는 암의 발생과 증식, 전이에 있어서 NF- κ B의 역할이 주목받고 있다. NF- κ B가 암과 관련이 있다는 것은 c-Rel의 viral homolog 인 v-Rel을 새에 주입하였을 때 악성 임파종이 유발된다는 것에서 확인되었다⁴. v-Rel처럼 암발생에 있어서의 직접적 근거는 미약하나 cellular NF- κ B family에 속하는 5가지 단백질에 대해서도 유전자 재배열 또는 과발현이 여러 암 세포에서 보고 되고 있어 이들 암의 형성과 관련성이 제시되었다⁵. 또한 세포의 암성 변화를 유발하는 단백질인 human T-cell leukemia virus I (HTLV-I) Tax나 Epstein-Barr virus (EBV) 단백질 등은 NF- κ B를 활성화시킴이 관찰되어 암의 발생에 있어 NF- κ B는 중요한 부분을 차지하고 있다고 생각된다⁶⁻⁷. 암의 발생 뿐 아니라 NF- κ B는 항 아포프토시스 작용이 있어

암의 생존 및 증식과 관련이 있는 것으로 밝혀졌다⁸. 이 외에 NF- κ B는 ICAM-1, VCAM-1 등 세포 부착물질의 발현에 영향을 끼쳐 암 전이와의 관련성도 제시되고 있다⁹⁻¹⁰.

NF- κ B가 암 발생과 관련이 있음이 밝혀지면서 암 조직 및 세포주에서 NF- κ B의 발현에 관한 다양한 연구가 이루어졌다. c-Rel은 임파종에서 유전자 재배열 및 과발현이 관찰되었고¹¹⁻¹², p52/p100은 유방암 및 대장암 세포주에서 발현이 증가되어 있음이 알려졌다¹³⁻¹⁴.

NF- κ B 발현의 증가 뿐만 아니라, 자극이 없는 상태에서도 p50/p65가 활성화되어 있음이 여러 암세포에서 보고되었으며¹⁴⁻¹⁸ Budunova 등은 mouse skin carcinogenesis 모델에서 p50/p50 homodimer의 활성화를 관찰하였다¹⁹. 이들 각 암세포에서 NF- κ B의 지속적 활성화의 의미는 명확히 밝혀지지는 않았으나, p50/p65의 지속적 활성화를 차단했을 때 유방암 세포주에서 apoptosis가 유발되고¹⁶, 호즈킨종의 종양 성장이 저해됨이 알려져²⁰, 이들 암세포의 생존 및 성장과 관련이 있음이 제시되었다. 외부 자극이 없이 NF- κ B가 활성화되어 있는 기전은 I κ B α 의 활성도가 떨어져 있거나 *ikb* 유전자의 돌연변이, I κ B를 phosphorylation시켜 분해를 유도하는 효소인 IKK 활성도의 증가 등으로 설명되고 일부 세포에서는 oncogenic *ras*에 의한 NF- κ B의 활성화로 설명되고 있다⁵.

이처럼 NF- κ B와 암과의 관련성이 다양하게 제시되고 있으나 폐암에서의 NF- κ B에 대한 연구는 많지 않다. 비소세포암 조직 및 세포주에서 p50과 c-Rel의 과발현이 보고된 바 있으나²¹ 이들 NF- κ B의 발현에 관한 연구는 세포내의 단백질 수준에서 연구로 암 세포에서 NF- κ B가 활성화되어 있는지에 대한 연구는 부족한 실정이다.

본 연구에서는 NF- κ B 중 가장 잘 알려진 p50/p65 복합체에 중점을 두어 폐암 세포주에서 기저 상태와 자극 시 핵 내의 p50 및 p65의 발현 정도를 살펴보고 단백질 수준에서 발현 뿐 아니라 NF- κ B의

κ B oligonucleotide에 대한 결합능을 알아봄으로써 활성도를 평가하고 이를 정상 기관지 상피 세포주와 비교해보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 세포주

세포주는 인체 폐암 세포주 12종과 기관지 상피세포주인 BEAS-2B를 사용하였다. 인체 폐암 세포주 중 5 종은 선암으로서 A549, NCI-H358, NCI-H441, NCI-H522, NCI-H2009가 이에 해당하였다. 대세포암으로 NCI-H460, NCI-H1299 편평상피세포암 NCI-H1703, 선평형상피세포암 NCI-H157, 소세포암주로 NCI-H187, NCI-H417, NCI-H526을 사용하였다. BEAS-2B는 Keratinocyte-SFM (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD) media로, 다른 세포주는 10 % fetal bovine serum, penicillin(100 U/ml), streptomycin(100 μ g/ml)이 든 RPMI 1640 (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD) media를 이용해 100 mm tissue culture dish에서 37.5 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 배양하였다.

2. 세포주 자극

각 세포주를 TNF- α (5ng/ml)로 자극하였다. 각각의 세포주에서 기저 상태와 자극 30분 후 핵 단백질을 추출하였다.

3. 핵 단백질 추출

배양한 세포를 PBS로 세척한 후 10 mM Tris HCl (pH 7.9), 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT를 포함한 cytoplasmic extraction buffer (CEB)로 5분간 처리하여 평형화시켰다. 이 후 세포에 0.4 % NP 40/CEB/protease inhibitor cocktail(50 μ g/ml antipain, 40 μ g/ml bestatin, 100 μ g/ml

chymostatin, 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ E-64, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatin, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ phosphoramidon, 0.4 mg/ml Pefabloc SC, 0.2 mg/ml EDTA, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)을 5분간 처리하여 세포막을 용해시켰다. 부착 세포는 rubber policeman으로 부드럽게 긁어 2500 rpm에서 5분 간 원심 분리하여 핵 부분인 침전물을 취하였다. 부유 세포는 그대로 2500 rpm에서 5분 간 원심 분리하여 침전물을 취하였다. 침전물을 CEB로 세척한 후 protease inhibitor와 nuclear extraction buffer(NEB)를 처리하여 핵막을 용해시켰다. NEB는 20mM Tris-HCl(pH 7.9), 0.4 M NaCl, 1.5 mM MgCl_2 , 1.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 25% glycerol로 구성되어 있다. Protease inhibitor와 NEB를 처리한 핵 침전물을 최대 속도로 vortexing 후 10분간 얼음에 incubation 후 2500 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 핵 단백질을 포함한 상층액을 취하여 snap frozen 후 -70°C 에 보관하였다.

4. Western Blot

세포핵에서 p50과 p65의 발현 정도를 관찰하기 위해 핵 단백질을 추출물로 western blot을 시행하였다. 핵 단백질 30 μg 을 취하여 SDS-polyacrylamide gel로 전기영동을 시행한 후 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. Membrane을 5% skim milk-PBS/0.1% Tween 20으로 1시간 동안 처리하여 비특이 결합을 차단시켰다. Rabbit polyclonal anti-p65 antibody와 rabbit polyclonal anti-p50 antibody를 각각 1:2000의 농도로 5% skim milk-PBS/0.1% Tween 20으로 희석하여 membrane과 실온에서 밤새 반응시켰다. Membrane을 1 \times PBS/0.1% Tween 20으로 3차례 세척한 후 HRP conjugated 또는 AP-conjugated secondary antibody를 5% skim milk-PBS/0.1% Tween 20으로 1:5000으로 희석하여 membrane과 1시간 동안 반응시켰다. Membrane을 1 \times PBS/0.1% Tween 20으로 3차례

세척한 후 발색시켰다.

5. Electrophoretic Mobility Shift Assay(EMSA)

NF- κB 의 nuclear binding activity를 보기 위해 B cell의 κ light chain enhancer의 NF- κB consensus sequence에 해당하는 NF- κB double stranded oligonucleotide를 이용하여 EMSA를 시행하였다 (5'-ATG TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3'). 이 double stranded oligonucleotide에는 [γ - ^{32}P]ATP와 T4 polynucleotide kinase가 부착되어 있다. Binding buffer(4% glycerol, 1 mM MgCl_2 , 0.5 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), poly(dI-dC)' poly(dI-dC))에 10 μg 의 핵 단백질과 NF- κB oligonucleotide (50,000-200,000 cpm)를 넣어 상온에서 20분간 반응시켰다. 경쟁반응을 위하여 방사성 동위 원소가 부착되어 있지 않은 NF- κB oligonucleotide를 이용하여 binding buffer에서 5분간 반응시켰다. Supershift assay를 위하여 NF- κB oligonucleotide와 핵 단백질을 상온에서 20분간 반응시킨 후에 anti-p65 antibody 또는 anti-p50 antibody를 넣어 상온에서 45분간 반응시켰다. DNA-protein complex를 4% nondenaturing polyacrylamide gel (80 : 1 acrylamide : bisacrylamide)에서 영동시켰다. Gel을 말린 다음 -70°C 에서 자가방사능 여부를 측정하였다.

결 과

1. 기저상태와 TNF- α 로 자극 시 NF- κB 의 핵내 발현

기저 상태의 핵 단백질 추출물에서 NCI-H358과 NCI-H460을 제외한 모든 폐암세포주와 BEAS-2B에서 p65 및 p50이 관찰되었다. TNF- α 로 자극 시 BEAS-2B 및 대부분의 폐암 세포주에서 p65와 p50의 발현이 증가하였다(Fig. 1. A and B).

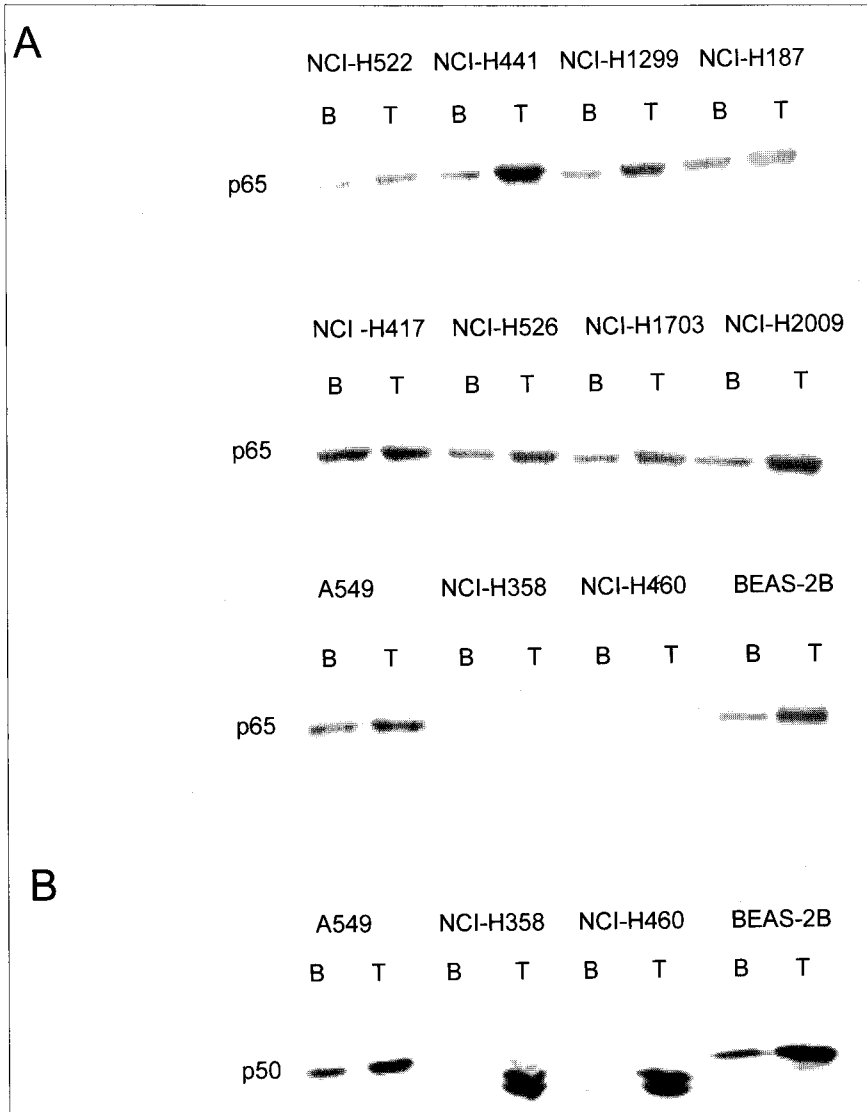


Fig. 1. Expression of the NF- κ B subunits in the nuclear protein extracts of various lung cancer cell lines.

NCI-H358과 NCI-H460 두 세포주는 다른 세포 주와는 차이를 보였다. 즉 기저 상태 및 TNF- α 로 자극 시 p65의 발현을 관찰할 수 없었고(Fig. 1A) TNF- α 로 자극 시 p50보다 분자량이 좀 더 작은 단백질의 발현이 증가하였다. 이 단백질은 크기가 다른 2개의 단백질로 구성되어 있었고 각 단백질은 각 세포

주에서 거의 같은 양으로 발현되었다. Anti-p50 antibody에 의해 검출된 이 단백질은 p50의 변형된 형태로 생각되었다(Fig. 1B). 이상의 결과로 정상 기관지 상피세포주와 대부분의 폐암세포주에서 기저 상태와 TNF- α 로 자극 시 NF- κ B 발현 양상에 차이가 없음을 알 수 있었다.

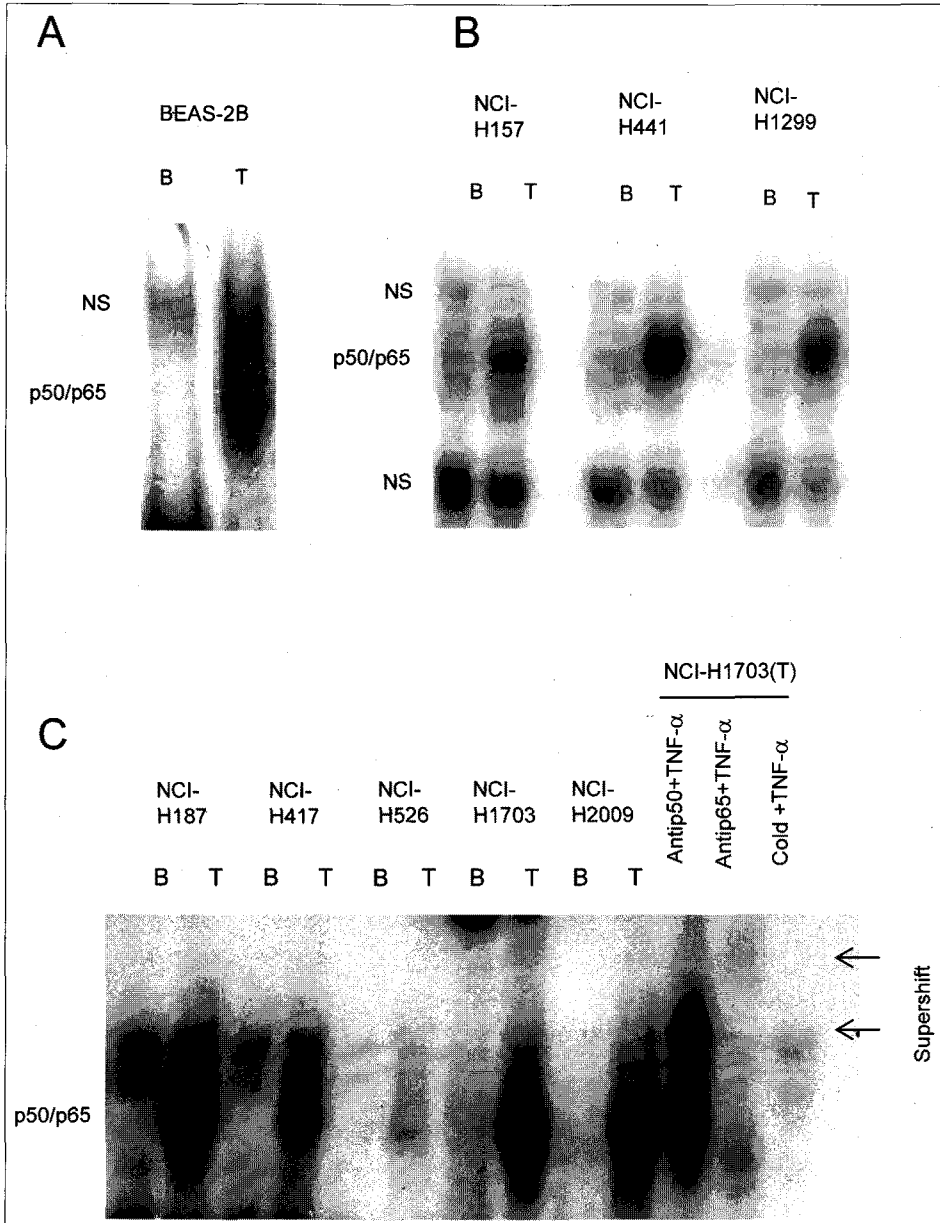


Fig. 2. DNA binding activity of the NF- κ B complexes in various lung cancer cell lines.

2. 기저상태와 TNF- α 자극시 NF- κ B DNA 결합능

NF- κ B의 κ B oligonucleotide에 대한 결합능을 EMSA로 확인하였을 때 BEAS-2B와 모든 폐암 세

포주에서 기저 상태에서 NF- κ B의 활성화는 관찰되지 않았다. TNF- α 로 자극했을 때 BEAS-2B와 모든 폐암 세포주에서 κ B oligonucleotide에 대한 결합능이 증가하여 활성화됨을 알 수 있었다. Supershift

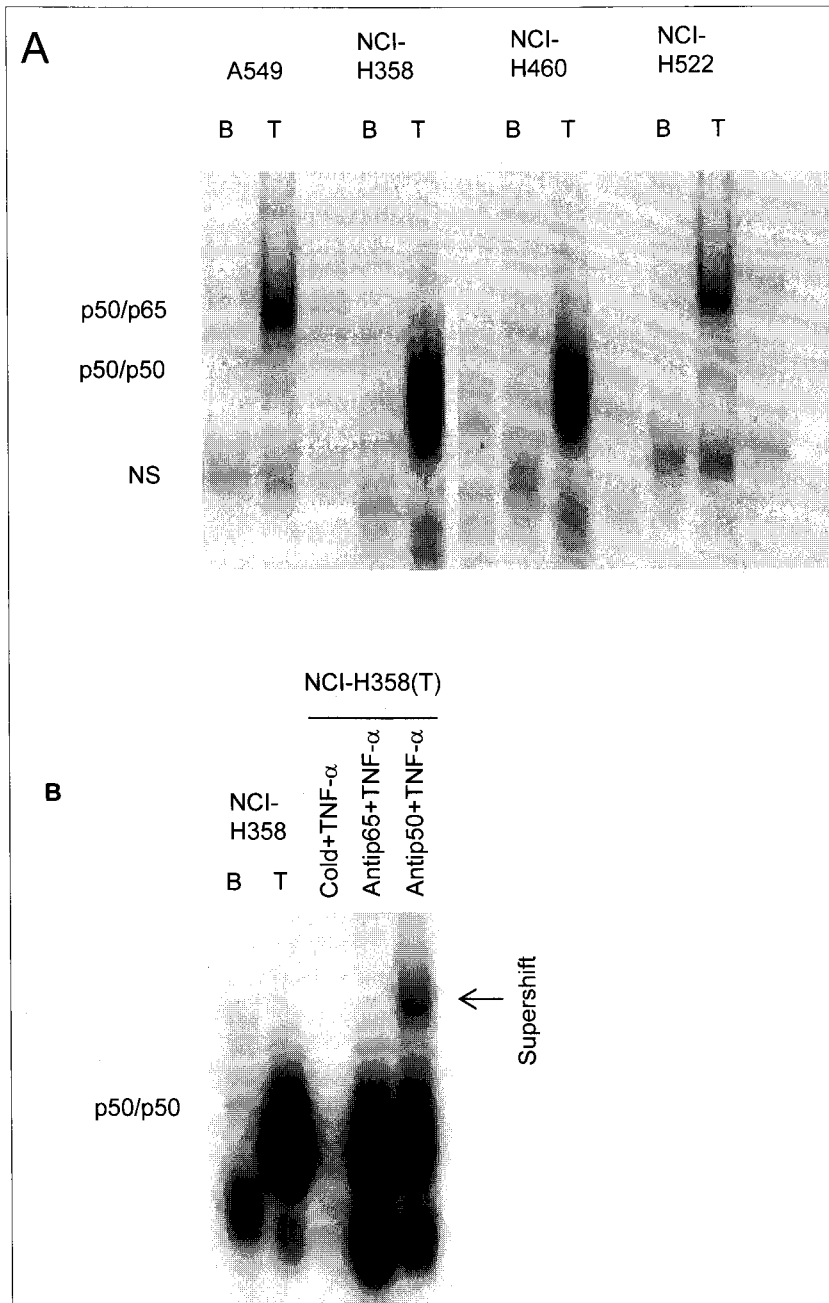


Fig. 3. Activation of a variant of the p50/p50 homodimer in the NCI-H358 and NCI-H460 lung cancer cell lines.

assay를 이용하여 NF- κ B subunit를 분석하였을 때, BEAS-2B와 사용한 대부분의 폐암 세포주에서는 anti-p65 antibody 및 anti-p50 antibody에 대해 shift되어 활성화된 NF- κ B 복합체가 p50/p65 heterodimer임을 확인할 수 있었다(Fig. 2A, B and C, Fig. 3A). NCI-H358과 NCI-H460 세포주에서 활성화된 NF- κ B 복합체는 anti-p50 antibody에 대해서만 supershift 되었다. 이 NF- κ B 복합체는 p50/p50 homodimer보다 약간 크기가 작은 위치에서 검출되었다(Fig. 3 A and B). 이상의 결과로 기저 상태와 TNF- α 로 자극 시 NF- κ B DNA binding activity도 대부분의 폐암 세포주와 정상 기관지 상피 세포주에서 차이가 없음을 알 수 있었다.

고 찰

폐암에서 NF- κ B에 관한 연구는 Mukhopadhyay 등이 11개의 비소세포암 조직 중 9개의 조직에서 정상 조직에 비하여 p50의 발현이 2-20배 증가되어 있음을 보고하였고, 폐암 세포주를 이용한 실험에서도 13개의 세포주 모두에서 p50의 발현이 증가되어 있음을 보고한 바 있다²¹. 그러나 NF- κ B는 전사 인자로 세포질에 있다가 활성화되었을 때는 핵 내에서 DNA와 결합하여 그 작용을 나타내는 바¹⁻² 세포 내에서의 분포가 중요하고, NF- κ B의 과발현이 곧 활성화의 증가를 의미하지는 않는다. 본 연구에서는 NF- κ B의 활성화를 알아보기 위해 기저 상태와 TNF- α 로 자극 시 NF- κ B의 핵 내 발현 정도를 알아보고 NF- κ B의 DNA 결합능으로 활성도를 평가하였다.

본 연구에서는 NCI-H358과 NCI-H460을 제외한 대부분의 폐암 세포주에서 기저 상태에서 핵 내 p50 및 p65의 발현을 관찰할 수 있었다. 그러나 기관지 상피 세포주에서도 p50과 p65의 발현을 관찰할 수 있었고 그 정도에 있어 폐암 세포주와 큰 차이를 보이지 않아 폐암 세포주와 정상 기관지 상피세포주의 NF- κ B의 발현에 있어 큰 차이가 없음을 알 수 있었다. Mukhopadhyay 등의 연구에서도 대조군으로 사

용하였던 기관지 상피세포인 normal bronchial epithelial cell(NHBE)에서 세포내 p50의 발현이 증가되어 있음을 관찰하여 정상 세포를 배양하는 과정 중에 p50의 발현이 증가되어 있는 특정 그룹의 세포가 선택적으로 배양되었을 가능성과 성장 배지에 포함된 성장인자에 의한 현상일 가능성을 언급한 바 있다²². 본 연구에서 핵 내에서 p50 및 p65의 발현에 있어서도 BEAS-2B 세포와 폐암 세포간에 차이가 없어 폐암에서 핵 내 NF- κ B 발현 정도를 언급하는데는 어려움이 있으나 역시 BEAS-2B 세포의 불멸화 과정 중에 생긴 현상일 가능성을 배제할 수는 없다.

본 연구에서는 폐암 세포주에서 기저 상태의 NF- κ B 활성화를 관찰할 수 없었다. 이는 앞서 언급한 지속적인 NF- κ B의 활성화를 보이는 여러 다른 암세포에서의 결과와는 차이를 보이는 소견으로 연구에 사용된 폐암 세포주의 생존에 있어서는 지속적인 NF- κ B의 활성화는 필요치 않은 것으로 판단된다. Mukhopadhyay 연구에서 폐암에서 p50의 과발현이 관찰되기는 하였으나 본 연구에서 기저 상태에서 NF- κ B의 활성화를 관찰할 수 없어 폐암에서 과발현된 p50이 inhibitor protein에 의해 세포질 내 포획되어 있을 가능성이 있다. 활성화되어 있지 않으면서 과발현된 NF- κ B는 외부 자극에 쉽게 대처하는 기전일 수 있으나 과발현된 p50의 역할에 대해서는 연구가 필요하다. 본 연구에서 NF- κ B의 활성화 양상에 있어서도 정상 기관지 상피 세포주와 차이를 보이지 않았다. NF- κ B의 활성화를 보는 방법으로 DNA 결합능을 평가하지만 결국 유전자의 전사를 조절하여 생성되는 물질로 진정한 활성도를 평가할 수 있는 바 최근 연구에서는 NF- κ B의 DNA 결합능에는 변화가 없으면서 NF- κ B의 유전자 전사 물질에 차이를 보인다는 보고도 있어²²⁻²³ 기관지 상피 세포주와 폐암 세포주 간에 NF- κ B의 활성도에 차이가 없다고 단정지을 수는 없다. 그리고 BEAS-2B 세포도 암세포는 아니지만 불멸화 과정을 거친 세포로 암세포와 비슷한 NF- κ B의 활성화 양상을 보일 가능성도 있겠다.

TNF- α 는 처음 발견 당시 종양 괴사를 유발하는 것

으로 알려진 사이토카인이나 이후 대부분의 세포는 TNF- α 에 의한 아포프토시스에 저항이 있는 것으로 밝혀졌다. TNF- α 가 세포 내로 아포프토시스 시그널을 전달할 뿐만 아니라 NF- κ B를 활성화시킨다는 것은 잘 알려진 사실인데^{8,24} 최근 여러 연구에서는 TNF- α 에 의한 아포프토시스에 암세포가 저항하는데 있어 NF- κ B의 활성화가 중요한 역할을 하고 있음이 밝혀졌다²⁵⁻²⁶. 본 연구에 사용하였던 NCI-H157 세포도 TNF- α 에 의한 아포프토시스에 내성을 보이고 이 역시 NF- κ B의 활성화와 관련이 있는 것으로 알려져 있다²⁵. 본 연구에서 TNF- α 로 자극하였을 때 대부분의 세포주에서 p50/p65의 활성화를 관찰할 수 있었다.

이번 연구에서 두 개의 세포주 NCI-H358과 NCI-H460에서는 다른 세포주와는 다른 양상을 보였다. 즉 TNF- α 로 자극 시 p50/p65의 활성화가 일어나지 않고 정상 p50 보다는 분자량이 작은 두 개의 단백질의 발현이 증가되었다. 이 단백질은 p50 antibody에 의해 검출되어 p50의 변형된 형태로 생각되었다. 분자량이 다른 2개의 단백질은 각 세포주에서 자극 시 거의 동량으로 발현되었다. EMSA를 이용한 활성화 실험에서도 κ B oligonucleotide에 대한 강한 결합능을 보였고 anti-p50 antibody에 의해 shift를 보였다. NF- κ B는 homo- 또는 heterodimer를 형성하는 바 동량으로 발현된 두 개의 단백질이 복합체를 이루었을 가능성이 크고 이는 변형된 p50/p50 homodimer로 생각된다.

NF- κ B의 복합체 중 p50/p65는 전사 활성화 기능이 활발하여 여러 유전자의 전사를 조절하는 것으로 알려져 있으며 NF- κ B의 항-아포프토시스 작용에 관한 연구도 p50/p65를 중심으로 이루어졌다^{8,25,26}. 이에 반하여 p50/p50 homodimer의 역할에 대해서는 아직 잘 밝혀져 있지 않다. 알려진 바로는 NF- κ B family의 5가지 단백질 중 c-Rel, RelB, p65 (RelA)는 long transactivation domain을 가지고 있어 이를 포함한 복합체는 전사 활성화 기능이 활발한 반면 p50과 p52는 짧은 C-terminal을 가지고 있

으며 일반적으로 전사 활성화 기능이 없다^{2,27}. p50/p50 homodimer도 κ B motif를 가지고 있는 일부 유전자에 대해서 전사 활성화 기능이 보고되었으나²⁸⁻²⁹ 대부분은 전사 활성화 기능이 없고 일부에서는 다른 NF- κ B의 활성화를 차단하여 오히려 전사 억제 작용을 하는 것으로 보고되었다³⁰. 본 연구에서 관찰된 분자량이 작은 p50/p50 복합체는 일부 유전자의 억제나 활성화를 통해 TNF- α 에 대한 아포프토시스에 저항하는 기전으로 작용할 가능성이 있으나 구체적인 역할에 대해서는 규명이 필요하다.

p50/p50 homodimer의 활성화 기전에 대해서는 잘 밝혀져 있지 않으나 p50은 그 전구물질인 p105가 proteasome에서 processing을 거쳐 만들어지거나 p105와 같이 cotranslation되어 만들어지는 것으로 알려져 있다³¹⁻³². 본 연구에서 확인된 단백질은 *nfkB1* 유전자의 돌연변이에 의해 생겼을 수도 있고 splicing에 의해 만들어졌거나 proteasome에서의 processing 과정 중에 변형되었을 가능성도 있다. *nfkB1* 유전자의 C-terminal coding region의 alternate splicing에 의해 p105가 아닌 p50 precursor isoform p84NF-kappa B1, p98NF-kappa B1 등이 보고된 바 있고³³ Maxwell 등은 비소세포암 세포주에서 exon 6과 7이 없는 spliced p65를 보고하여 비소세포암에서의 역할을 언급한 바 있다³⁴. 본 연구에서 강한 DNA 결합능을 보인 변형된 p50은 정상 p50과는 다른 작용을 할 가능성이 있는 바 이에 대한 연구가 더 필요하다.

결론적으로 12개의 인체 폐암 세포주에서 NF- κ B의 활성화를 관찰하였을 때 사용한 모든 폐암 세포주에서 기저 상태에서 NF- κ B의 활성화를 관찰할 수 없어 사용한 폐암 세포주의 생존에 있어서는 NF- κ B의 지속적 활성화는 필요치 않은 것으로 판단된다. 또한 일부 폐암 세포주에서 외부 자극으로 활성화된 NF- κ B complex의 구성에 차이를 보였으나 대부분의 폐암 세포주는 BEAS-2B 기관지 상피 세포주와 NF- κ B 활성화 양상에 차이를 보이지 않았다.

요 약

연구배경 :

Nuclear factor κ B (NF- κ B)는 면역기능, 급성기 반응, 세포주기 조절 등 다양한 세포활동을 조절하는 전사인자로서 외부 자극에 의해 세포질에 존재하던 NF- κ B가 핵 속으로 이동되어 여러 유전자의 κ B element에 결합하여 그 유전자의 전사를 가져온다. 최근 들어 암의 발생과 증식 및 전이에 있어 NF- κ B의 역할이 주목받고 있다. 즉, 여러 종류의 암세포에서 NF- κ B의 과발현 및 지속적인 활성화가 알려져 NF- κ B와 암의 발생 및 증식과의 관련성이 제시되고 있고, NF- κ B의 항 아포프토시스 기능은 암세포의 생존에서 중요한 역할을 하는 것으로 이해되고 있다. 또한 ICAM-1, VCAM-1 등 세포 부착물질의 발현에 영향을 끼쳐 암 전이와의 관련성도 제시되고 있다. 폐암에서 NF- κ B의 역할에 관한 연구는 많지 않은 상태로 폐암 조직 및 폐암 세포주에서 p50과 c-Rel의 과발현이 보고된 바 있다. 그러나 NF- κ B의 과발현이 NF- κ B의 활성화를 의미하는 것은 아니며 현재까지 폐암 세포에서 NF- κ B의 활성화 유무에 관한 연구는 없는 실정이다.

방 법 :

본 연구에서는 정상 기관지 세포주와 폐암 세포주에서 기저 상태와 외부 자극에 의한 NF- κ B의 활성화를 비교하여 폐암 세포에서 NF- κ B의 활성도를 평가하였다. 정상 기관지 상피세포로는 BEAS-2B 세포주를 사용하였고 폐암 세포주로는 A549, NCI-H358, NCI-H441, NCI-H522, NCI-H2009, NCI-H460, NCI-H1229, NCI-H1703, NCI-H157, NCI-H187, NCI-H417, NCI-H526 등 12종을 실험에 사용하였다. NF- κ B의 활성화는 p65와 p50의 핵내 발현과 electrophoretic mobility shift assay (EMSA)를 이용한 NF- κ B DNA binding activity로 평가하였다.

결 과 :

NCI-H358과 NCI-H460 세포를 제외한 모든 폐암 세포주와 BEAS-2B 세포의 기저상태에서 핵 단백질

내에 p65와 p50의 발현이 관찰되었다. TNF- α 로 자극하고 30분이 경과한 후에는 핵 내 p65와 p50의 발현이 증가하였다. NCI-H358과 NCI-H460 세포에서는 기저 상태와 TNF- α 자극 시 핵 단백질 내의 p65의 발현이 관찰되지 않았고 TNF- α 자극했을 때에도 p65의 발현은 증가하지 않았다. 그러나 이 두 세포주에서는 TNF- α 로 자극 시 p50보다 분자량이 작은 두 종의 단백질의 발현이 증가되어 p50의 변형된 형태로 생각되었다. 기저 상태에서의 NF- κ B의 DNA 결합능은 실험에 사용한 모든 세포주에서 거의 관찰되지 않았고 TNF- α 자극 시 유의하게 증가하였다. TNF- α 자극으로 활성화된 NF- κ B complex는 NCI-H358과 NCI-H460을 제외한 모든 세포주에서는 p50/p65 heterodimer로 확인되었고 NCI-H358과 NCI-H460에서는 변형된 p50/p50 homodimer가 활성화되었다.

결 론 :

이상의 결과로 일부 폐암 세포주에서 외부 자극으로 활성화된 NF- κ B complex의 구성에 차이를 보였지만 전체적으로는 정상 기관지 세포주와 비교해 폐암 세포주에서 NF- κ B 활성화에 있어 큰 차이가 없었다.

참 고 문 헌

1. Baldwin AS Jr. The NF- κ B and I kappa B proteins : new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14:649-83.
2. Gilmore TD. The Rel/NF- κ B signal transduction pathway : introduction. *Oncogene* 1999; 18:6842-4.
3. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene* 1999; 18:6853-66.
4. Gilmore TD. Multiple mutations contribute to the oncogenicity of the retroviral oncoprotein v-Rel. *Oncogene* 1999;18(49):6925-37.
5. Rayet B, Gelinas C. A aberrant rel/nfkb genes and

- activity in human cancer. *Oncogene* 1999;18:6938-47.
6. Yamaoka S, Inoue H, Sakurai M, Sugiyama T, Hazama M, Yamada T, et al. Constitutive activation of NF-kappa B is essential for transformation of rat fibroblasts by the human T-cell leukemia virus type I Tax protein. *EMBO J* 1996;15:873-87.
 7. Laherty CD, Hu HM, Opipari AW, Wang F, Dixit VM. The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kappa B. *J Biol Chem* 1992;267:24157-60.
 8. Barkett M, Gilmore TD. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999;18:6910-24.
 9. Kageshita T, Yoshii A, Kimura T, Kuriya N, Ono T, Tsujisaki M, et al. Clinical relevance of ICAM-1 expression in primary lesions and serum of patients with malignant melanoma. *Cancer Res* 1993;53:4927-32.
 10. Iadecola MF, McQuillan JJ, Rosen GD, Dean DC. Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *J Biol Chem* 1992 ;267:16323-9.
 11. Joos S, Otano-Joos MI, Ziegler S, Bruderlein S, du Manoir S, Bentz M, et al. Primary mediastinal (thymic) B-cell lymphoma is characterized by gains of chromosomal material including 9p and amplification of the REL gene. *Blood* 1996;87:1571-8.
 12. Kabrun N, Bumstead N, Hayman MJ, Enrietto PJ. Characterization of a novel promoter insertion in the c-rel locus. *Mol Cell Biol* 1990;10:4788-94.
 13. Dejardin E, Bonizzi G, Bellahcene A, Castronovo V, Merville MP, Bours V. Highly-expressed p100/p52 (NFKB2) sequesters other NF-kappa B-related proteins in the cytoplasm of human breast cancer cells. *Oncogene* 1995;11:1835-41.
 14. Bours V, Dejardin E, Goujon-Letawe F, Merville MP, 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 ;13;47:145-9.
 15. Dejardin E, Deregowski V, Chapelier M, Jacobs N, Gielen J, Merville MP, et al. Regulation of NF-kappaB activity by I kappaB-related proteins in adenocarcinoma cells. *Oncogene* 1999;18:2567-77.
 16. Sovak MA, Bellas RE, Kim DW, Zanieski GJ, Rogers AE, Traish AM, et al. Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J Clin Invest* 1997;100:2952-60.
 17. Wang W, Abbruzzese JL, Evans DB, Larry L, Cleary KR, Chiao PJ. The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1999;5:119-27.
 18. Sumitomo M, Tachibana M, Nakashima J, Murai M, Miyajima A, Kimura F, et al. An essential role for nuclear factor kappa B in preventing TNF-alpha-induced cell death in prostate cancer cells. *J Urol* 1999 ;161:674-9.
 19. Budunova IV, Perez P, Vaden VR, Spiegelman VS, Slaga TJ, Jorcano JL. Increased expression of p50-NF-kappaB and constitutive activation of NF-kappaB transcription factors during mouse skin carcinogenesis. *Oncogene* 1999;18:7423-31.
 20. Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D, Bommer K, Mapara MY, Arnold W, et al. Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation

- is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest* 1997;100:2961-9.
21. 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.
 22. Finco TS, Westwick JK, Norris JL, Beg AA, Der CJ, Baldwin AS Jr. Oncogenic Ha-Ras-induced signaling activates NF-kappaB transcriptional activity, which is required for cellular transformation. *J Biol Chem* 1997;272:24113-6.
 23. Vanden Berghe W, Plaisance S, Boone E, De Bosscher K, Schmitz ML, Fiers W, et al. p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J Biol Chem* 1998;273:3285-90.
 24. Natoli G, Costanzo A, Guido F, Moretti F, Levrero M. Apoptotic, non-apoptotic, and anti-apoptotic pathways of tumor necrosis factor signalling. *Biochem Pharmacol* 1998;56:915-20.
 25. Kim JY, Lee S, Hwangbo B, Lee CT, Kim YW, Han SK, et al. NF-kappaB activation is related to the resistance of lung cancer cells to TNF-alpha-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273:140-6.
 26. Muenchen HJ, Lin DL, Walsh MA, Keller ET, Pienta KJ. Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in prostate cancer cells through inhibition of nuclear factor-kappaB by an Ikappa-Balpha "super-repressor". *Clin Cancer Res* 2000;6:1969-77.
 27. Matthews JR, Hay RT. Regulation of the DNA binding activity of NF-kappa B. *Int J Biochem Cell Biol* 1995;27:865-79.
 28. Collart MA, Baeuerle P, Vassalli P. Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 1990;10:1498-506.
 29. Fujita T, Nolan GP, Liou HC, Scott ML, Baltimore D. The candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a transcriptional coactivator that activates through NF-kappa B p50 homodimers. *Genes Dev* 1993;7:1354-63.
 30. Franzoso G, Bours V, Park S, Tomita-Yamaguchi M, Kelly K, Siebenlist U. The candidate oncoprotein Bcl-3 is an antagonist of p50/NF-kappa B-mediated inhibition. *Nature* 1992;359:339-42.
 31. Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* 1994;78:773-85.
 32. Lin L, DeMartino GN, Greene WC. Cotranslational dimerization of the Rel homology domain of NF-kappaB1 generates p50-p105 heterodimers and is required for effective p50 production. *EMBO J* 2000;19:4712-4722.
 33. Grumont RJ, Fecondo J, Gerondakis S. Alternate RNA splicing of murine *nfkb1* generates a nuclear isoform of the p50 precursor NF-kappa B1 that can function as a transactivator of NF-kappa B-regulated transcription. *Mol Cell Biol* 1994;14:8460-70.
 34. Maxwell SA, Mukhopadhyay T. A novel NF-kappa B p65 spliced transcript lacking exons 6 and 7 in a non-small cell lung carcinoma cell line. *Gene* 1995;166:339-40.