



인체 전립선 암세포에서 Alkylating Agent인 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine에 의한 Apoptosis 유발

박철^{1,2} · 최병태³ · 이원호² · 최영현¹

¹동의대학교 한의과대학 생화학교실, ³해부학교실 및 한의학연구소
²부산대학교 자연과학대학 생물학과

Induction of Apoptosis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, an Alkylating Agent, in Human Prostate Carcinoma Cells

Cheol Park^{1,2}, Byung Tae Choi³, Won Ho Lee² and Yung Hyun Choi¹

¹Department of Biochemistry, ³Department of Anatomy, Dong-Eui University College of Oriental Medicine, and Research Institute of Oriental Medicine, Busan 614-052, Korea

²Department of Biology, Busan National University, Busan 609-735, Korea

Received March 20, 2003; Accepted May 23, 2003

ABSTRACT. Alkylating agents form alkylated base adducts in the DNA and cause DNA lesions leading to cell killing. In this study, we investigated the mechanism of apoptosis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) in PC-3 and DU145 human prostate carcinoma cell lines. MNNG treatment resulted in the inhibition of cell proliferation in a concentration-dependent manner to a similar extent in both cell lines. This anti-proliferative effect of PC-3 and DU145 cells by MNNG was associated with morphological changes such as membrane shrinking, cell rounding up and formation of apoptotic bodies. MNNG treatment also induced a proteolytic cleavage of specific target proteins such as poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and β -catenin proteins in DU145 cells but in PC-3 cells. Furthermore, we observed an increase of pro-apoptotic protein Bax family expression and a decrease of anti-apoptotic protein Bcl-2 family by MNNG treatment in a concentration-dependent manner. MNNG also induced a proteolytic activation of caspase-3 and -9, which is believed to play a central role in the apoptotic signaling pathway.

Keywords: MNNG, Apoptosis, Bcl-2/Bax, Caspase.

서 론

세포사멸은 necrosis와 apoptosis로 구분되며, 이는 세포의 형태적 및 생화학적 특성에 의하여 구분된다. Ne-

crisis는 생리적, 화학적인 외상에 의한 세포의 죽음이고, apoptosis는 개체의 정상적인 발달과 분화에 관여하며, 태아의 형태형성, 난자의 배란, 신경세포의 시냅스 형성 등과 연관된 체내 비정상적인 세포들을 제거하는 기전이다(Searle *et al.*, 1982; Lieberthal *et al.*, 1998; Zimmermann *et al.*, 2001). 특히 apoptosis에는 세포질 및 염색질 응축, 세포막 수포화 현상, DNA 단편화 등이 수반되는데 이러한 현상은 세포내부의 정교한 신호전달에 의해 조절된다(Wyllie *et al.*, 1980; Schulze-Osthoff *et al.*, 1998). Apoptosis 유발에 관여하는 유전자 중 apoptosis 기전을 억제하는 Bcl-2 단백질 및 apoptosis 기전을 촉진하는 Bax 단백질이 중요하다고 보고되었다(Chiarugi *et al.*, 1994; Jurgensmeier *et al.*, 1998;

Correspondence to: Yung Hyun Choi, Department of Biochemistry, Dong-Eui University College of Oriental Medicine, and Research Institute of Oriental Medicine, Busan 614-052, Korea
E-mail: choiyh@dongeui.ac.kr

Abbreviations: MNNG, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine; PARP, poly(ADP-ribose) polymerase; IAP, inhibitor of apoptosis proteins; MTT, tetrazolium bromide salt; DMSO, dimethylsulfoxide; PI, propidium iodide; PBS, phosphate-buffered saline; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; ECL, enhanced chemiluminescence; PCR, polymerase chain reaction; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Antonsson and Martinou, 2000). 이들 두 단백질은 서로 dimer를 형성하면서 cytochrome c와 같은 apoptosis 유발에 관여하는 인자들을 조절한다(Jurgensmeier *et al.*, 1998; Lenaz *et al.*, 1999). 또한 caspases라고 이름 붙여진 ICE/CED-like protease family 역시 apoptosis 유발에 중요한 역할을 하는데, 이들은 정상적으로 성장 중인 세포에서는 proenzyme 형태로 존재한다. 이들은 apoptosis 유도를 활성화시키는 신호에 의해 활성화된 cysteine-related proteases로 되어 직접 또는 간접적으로 세포 내 존재하는 poly(ribose-ADP) polymerase (PARP)나 β -catenin 등과 같은 많은 표적 단백질의 분해에 관여한다(Kaufmann *et al.*, 1993; Lazebnik *et al.*, 1994; Fukuda, 1999; Rowlands *et al.*, 2000; Wijnhoven *et al.*, 2000). Apoptosis에 관여하는 여러 인자들 중 최근 밝혀진 또 다른 class인 "inhibitor of apoptosis proteins(IAPs)"에 속하는 유전자 산물은 곤충세포에서 바이러스 감염에 의한 apoptosis를 억제하기 위한 baculoviral 단백질 군들로서 외부 신호에 의한 세포 내 anti-apoptotic 활성을 지닌다. 그리고 이들 중 몇 가지 IAPs는 caspases와의 직접적인 결합을 통하여 그들의 apoptotic 활성을 억제할 수 있을 것으로 밝혀져, IAP family들의 잠재적인 역할에 대한 관심이 높아지고 있다(Holcik *et al.*, 2001; Salvesen and Duckett, 2002; Hussein *et al.*, 2003).

최근 진행성 전립선암의 화학요법에 alkylating agent의 사용이 시도되면서(Kreis, 1995) 항암제로서 새로이 중요한 위치를 차지하고 있는 alkylating agent는 DNA의 산소 또는 질소원자에 alkyl group을 전이시켜 여러 가지 유전적 변이를 일으키며(Hall and Tilby, 1996; Wassermann, 1994), 이러한 손상은 mismatch 수선 또는 base-excision 수선과정을 통하여 회복하는 것으로 알려져 있다(Kat *et al.*, 1993; Carethers *et al.*, 1996). 그중 monofunctional DNA alkylating agent에 속하는 N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)은 인체 암세포를 포함한 다양한 종류의 세포들에서 세포주기 G2/M arrest에 의한 성장억제 및 apoptosis를 유발하는 것으로 보고되어지고 있다(Fang *et al.*, 2001; Narayan *et al.*, 2001; Rasmussen *et al.*, 2000; Khan and Dipple, 2000; Carethers *et al.*, 1996; Shin *et al.*, 1996; Hawn *et al.*, 1995; Yang and Duerksen-Hughes, 2001). 인체 대장암세포를 이용한 선행연구에서 MNNG는 mismatch 수선에 중요한 기능성 단백질 복합체들의 존재 하에서 중앙억제 유전자 p53 단백질의 인산화를 유도함이 밝혀졌다(Duckett *et al.*, 1999; Hickman and Samson, 1999; Adamson *et al.*, 2002). 이 결과는

MNNG에 의한 DNA 손상에 따른 세포주기 특이적 성장억제나 apoptosis 유발의 초기단계에 mismatch 수선계가 관여함을 보여주는 것으로 사료된다(Adamson *et al.*, 2002; Jaiswal and Narayan, 2002). 그 외 MNNG에 의한 최근 몇 가지 연구결과들이 발표되고 있으나 인체 암세포의 성장억제 기전 해석을 위한 분자생물학적 접근이 매우 미흡한 상태이다.

본 연구에서는 MNNG의 암세포 성장억제 효과에 관한 기전 해석의 시도를 위하여 인체 전립선 암세포의 생존을 억제, 이로 인한 핵의 형태적 변화를 조사하였고, apoptosis의 유발과 연관성을 가지는 몇 가지 유전자 산물의 발현 변화를 조사하였다. 본 연구의 결과에 의하면 MNNG의 처리 농도 의존적으로 조사된 두 종류 인체 전립선암세포의 성장이 유사하게 억제되었으며, 핵 내 apoptotic body의 형성과 sub-G1 군의 증가현상으로 apoptosis의 과정에 의하여 암세포의 사멸이 유도되는 것임을 알 수 있었다. 아울러 Bax의 발현 증가 및 Bcl-2의 발현 변화에 따른 caspase의 활성이 apoptosis 유발에 주요한 요인으로 작용함을 알 수 있었다.

재료 및 방법

재료 및 세포배양

MNNG는 Sigma Chemical Co.(St. Luis, MO, USA)에서 구입하였으며 1 mg/ml의 농도로 증류수에 용해하여 -20°C 에 보관하였고, 처리 전 배지에 희석하여 사용하였다. 실험에 사용한 DU145 및 PC-3 인체 전립선 암세포는 생명공학연구소(KRIBB, Taejeon, Korea)에서 분양 받았으며, Choi *et al.*(2000)의 방법에 준하여 배양하였다.

MTT assay를 이용한 세포 생존율의 측정

준비된 암세포를 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 후, MNNG를 농도별로 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt(MTT, Sigma) 시약을 0.5 mg/ml 농도가 되도록 성장배지로 희석하여 2 ml씩 분주하여 3시간 동안 배양한 다음, MTT 시약을 제거하고 dimethylsulfoxide(DMSO, Sigma)를 첨가하여 well에 생성된 formazin을 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(Choi, 2001).

DNA Flow Cytometry에 의한 sub-G1의 측정

Apoptosis 유발의 정량적인 분석을 위한 세포주기 sub-G1의 분포도에 미치는 MNNG의 영향을 조사하기 위하여 정상 및 MNNG가 함유된 배지에서 자란 세포들

을 DNA intercalating dye인 propidium iodide(PI, concentration, 50 $\mu\text{g/ml}$; Sigma)로 염색한 후, phosphate-buffered saline(PBS)로 수세하고 RNase(Sigma)를 처리하여 4°C 암 하에서 1시간 동안 반응시켰다. 이들 세포를 DNA flow cytometry(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) 및 Modifit LT(Becton Dickinson) 프로그램 사용하여 정량적 분석을 하였다(Choi *et al.*, 2000).

DAPI Staining

MNNG 처리에 의한 apoptosis 유발의 확인을 위한 암 세포 핵의 형태적 변화 관찰을 위하여 정상 및 48시간 동안 MNNG가 처리된 두 종류의 암세포주를 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI, Sigma) 용액으로 염색한 후, 형광 현미경($\times 400$)을 이용하여 MNNG 처리에 따른 핵의 형태변화를 관찰하였다(Choi *et al.*, 2001).

Western Blot Analysis

정상 및 MNNG가 처리된 배지에서 자란 세포들을 lysis buffer로 용해한 후, 고속원심분리기로 세포 내 잔사물을 분리시킨 다음 동량의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane(Schleicher & Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting 시킨 후, 10% skim milk가 함유된 PBS-T(0.1% Tween 20 in PBS)를 이용하여 상온에서 2시간 정도 반응시켜 비특이적인 단백질을 blocking시켰다. 특정 단백질에 대한 항체를 membrane에 처리하여 항원항체반응을 일으킨 후, PBS-T로 충분히 세척하고 특정항체에 대한 이차항체를 처리한 후, Enhanced ChemiLuminescence(ECL, Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA) 용액을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 발현 정

Table 1. Sequences of primer used for RT-PCR

Gene name	Sequence
Bax	Sence 5'-ATG-GAC-GGG-TCC-GGG-GAG-3' Antisence 5'-TGG-AAG-AAG-ATG-GGC-TGA-3'
Bcl-2	Sence 5'-CAG-CTG-CAC-CTG-ACG-3' Antisence 5'-GCT-GGG-TAG-GTG-CAT-3'
Bcl-X _L	Sence 5'-CGG-GCA-TTC-AGT-GAC-CTG-AC-3' Antisence 5'-CTT-CAA-CCG-CTG-GTT-CCT-GA-3'
GAPDH	Sence 5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3' Antisence 5'-AGC-CTT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3'

도를 분석하였다(Choi *et al.*, 1997). 실험에 사용된 항체 들은 Santa Cruz Biotechnology Inc.(Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem(Cambridge, MA, USA)에서 구입 하였고 이차항체로 사용된 peroxidase-labeled sheep anti-mouse 및 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin은 Amersham Life Science Corp.에서 구입하였다.

RT-PCR

동일한 조건으로 준비된 암세포를 대상으로 RNAzol B (TEL-TEST, INC., Texas, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량 후, Choi(2001)의 방법에 준하여 oligo dT primer와 AMV reverse transcriptase를 이용하여 2 μg 의 RNA에서 ss cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 template로 사용하여 Table 1에 나열된 유전자를 중심으로 polymerase chain reaction(PCR) 방법으로 증폭하였다. 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) 유전자를 포함하여 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide(EtBr, Sigma)을 이용하여 염색한 후 UV 하에서 확인하였다.

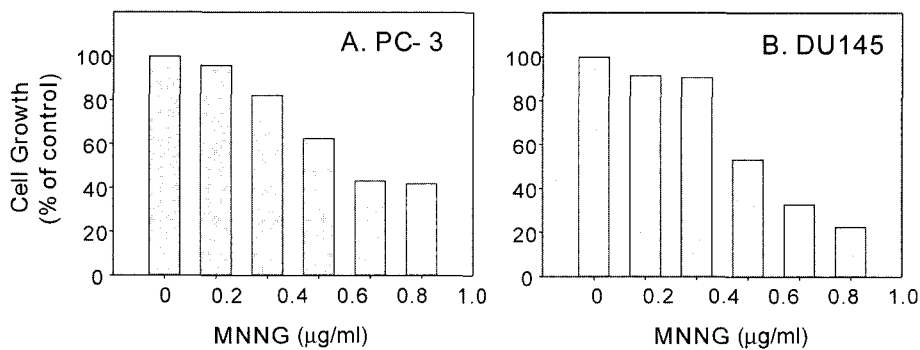


Fig. 1. Growth inhibition by MNNG treatment in PC-3 (A) and DU145 (B) human prostate carcinoma cells. Cells were seeded as described in Materials and Methods, and MTT assay was performed after MNNG treatment for 48. Results are expressed as percentage of the untreated control obtained from two separate experiments.

결과 및 고찰

MNNG가 암세포의 생존율에 미치는 영향

PC-3 및 DU145 인체 전립선 암세포의 생존율에 미치는 MNNG의 영향을 알아보기 위하여 MTT assay에 준하여 조사한 결과는 Fig. 1에서 나타난 바와 같다. 본 실험에 사용한 전립선 암세포주는 모두 androgen-independent한 세포주이나, DU145 세포는 p53 유전자가 정상인데 비하여 PC-3 세포는 p53 유전자가 존재하지 않는 세포주이다(van Bokhoven *et al.*, 2001). Fig. 1의 결과에서 알 수 있듯이 MNNG의 처리농도 의존적으로 암세포의 생존율이 감소하였으며, 본 실험에 사용된 두 세포주에 따른 차이점은 크게 나타나지 않았다. 즉 MNNG 처리에 따른 세포 내 반응에서 p53의 인산화가 중요함에도 불구하고(Parra *et al.*, 2001; Adamson *et al.*, 2002), 정상 p53 유전자가 결손된 세포에서도 동일한 경향성을 보인다는 것은 Yang과 Duerksen-Hughes(2001)의 결과와 동일함을 알 수 있었다. 또한 동일 전립선 암세포이지만 androgen-dependent한 세포주에서는 훨씬 감수성이 높았던 결과(Rasmussen *et al.*, 2000)로 보아 p53이 MNNG에 의한 암세포의 성장억제에는 큰 영향이 없는 것으로 사료된다.

MNNG 처리에 의한 apoptosis의 유발

MNNG의 처리에 의한 인체 전립선 암세포의 생존율 감소가 apoptosis 유발과 연관성이 있을 것으로 기대되어 DNA flow cytometry를 이용하여 sub-G1기에 속하는 세포들의 빈도를 조사하였다. Fig. 2에서 볼 수 있듯이 PC-3 세포에서 DU145 보다 다소 apoptosis 유발의 정도가 높은 것으로 나타났으나 큰 차이점은 없었으며, MNNG의 처리 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 sub-G1기에 속하는 세포들의 빈도가 증가되었다. 다음은

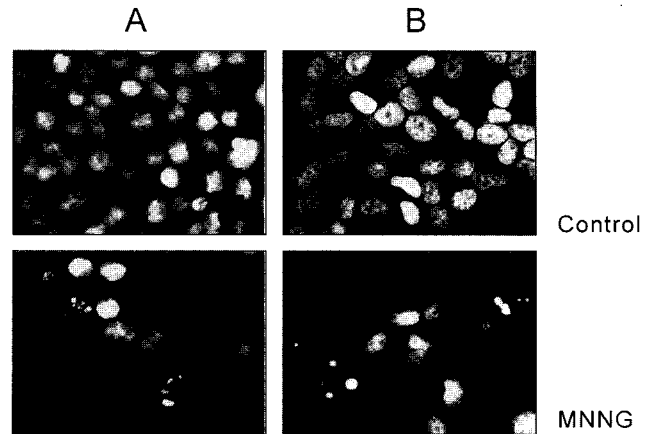


Fig. 3. Formation of apoptotic bodies by MNNG treatment in PC-3 (A) and DU145 (B) human prostate carcinoma cells. Cells were incubated with MNNG for 48 h, and then stained with DAPI. After 10 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescence microscope using blue filter. Magnification, x400.

MNNG의 처리에 의한 apoptosis 유발의 직접적인 증거를 제시하기 위하여 정상 및 MNNG가 함유된 배지에서 배양된 암세포를 대상으로 핵의 형태적인 변화를 조사하였다. Fig. 3A 및 B는 DAPI 염색에 의한 핵의 형태에 미치는 MNNG의 영향을 나타낸 결과로서, MNNG가 처리된 배지에서 자란 암세포의 경우 정상배지에서 자란 세포들에서 관찰할 수 없는 apoptosis 유발 특이적인 핵 내 DNA 단편화에 의한 apoptotic body의 출현(Zimmermann *et al.*, 2001; Lieberthal *et al.*, 1998)을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과는 MNNG의 처리에 의한 전립선 암세포의 성장 억제는 apoptosis 유발과 밀접한 연관성이 있음을 보여 주는 것으로 사료된다. 또한 생존율에 미치는 영향의 결과(Fig. 1)에서와 유사하게 정상 p53 유전자의 유무에 관계없이 apoptosis 유발에 유사한 결과를

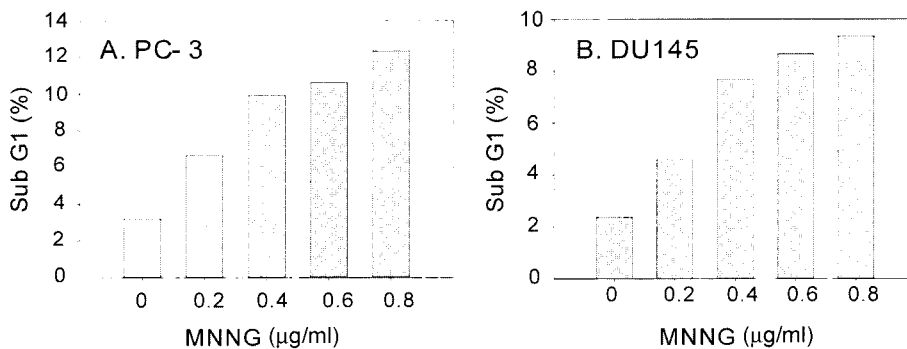


Fig. 2. Induction of apoptotic cell death by MNNG treatment in PC-3 (A) and DU145 (B) human prostate carcinoma cells. Cells were treated with MNNG for indicated concentrations for 48 h. Cells were then fixed and stained with PI. Apoptotic sub-G1 cells were determined by a DNA flow cytometry. Data are means average of two separate experiments.

보여줌으로서 MNNG에 의한 apoptosis의 유발은 본 연구에서 사용된 전립선 암세포에서 p53 비의존적임을 알 수 있었으며, 이는 섬유아 세포 및 림프구에서 보고된 선행 연구결과(Yang Duerksen-Hughes, 2001; Strasser *et al.*, 1994)와 유사하였다.

PARP 및 β -catenin의 발현에 미치는 MNNG의 영향

잘 알려진 바와 같이 특정 내·외부 자극에 의하여 apoptosis가 일어나면 PARP 단백질이 부분적으로 잘리는 분해과정이 나타난다. 정상세포의 경우는 116 KDa의 분자량을 가지지만 apoptosis가 일어난 경우는 85 KDa 크기의 단편을 관찰 할 수 있다(Kaufmann *et al.*, 1993; Lazebnik *et al.*, 1994). PARP는 정상세포의 DNA repair나 genomic stability의 유지에 중요한 역할을 하며 (Tewari *et al.*, 1995), apoptosis 과정 중 caspase의 활성화에 의해 단백질 분해가 일어나면 PARP의 역할은 상실되어 정상적인 repair기능이 상실된다(Nagata, 1997). 한편 catenin family 단백질은 세포질 단백질로서 E-cadherin과 결합하여 세포 연결기능에 중요한 역할을 한다 (Jonson, 1999; Wijnhoven *et al.*, 2000). 그 중 β -catenin은 세포 내 골격유지와 부착성 세포의 전사조절 및 세포유착과 관계된 apoptosis 조절과 관련이 있다 (Rowlands *et al.*, 2000; Wijnhoven *et al.*, 2000). 정상세포의 경우 92 KDa의 크기를 가지나 세포 유착성 apoptosis가 일어나면 62~72 KDa으로 단편화가 일어난다(Fukuda, 1999; Steinhilber *et al.*, 2000).

본 연구에서 MNNG에 의한 전립선 암세포의 apoptosis 유발과 PARP 및 β -catenin의 발현에 상관성이 있는지를 조사한 결과, PARP 단백질의 경우 Fig. 4A 및 B에서 나타난 바와 같이 PC-3 세포에서는 아무런 변화가 관찰되지 않았지만 DU145 세포의 경우는 처리농도가

증가할수록 85 KDa 위치의 band의 발현이 증가되어 MNNG 처리농도 의존적인 암세포의 성장억제가 apoptosis의 유발과 직접적인 관련이 있다는 것을 잘 나타내어 준다. β -catenin의 경우 DU145에서는 정상배지에서 자란 세포들의 경우 92 KDa인 주 band의 발현이 강하였지만 MNNG 농도 의존적으로 단편화된 band의 축적을 관찰할 수 있었다. 본 연구에 사용된 전립선 암세포 모두에서 MNNG의 처리에 따른 전체적인 세포의 형태적 변이에 따른 apoptosis가 유발되었지만 β -catenin의 발현이 크게 감소하지 않았거나 현저한 단편화 현상이 나타나지 않아 이에 관한 추가적인 연구가 필요한 것으로 사료된다. 한편 Halappanavar *et al.*(1999)에 의한 PARP의 발현에 따른 MNNG의 영향 비교에서 PARP(-/-)인 세포주가 정상 세포주에 비하여 저농도의 MNNG에서도 감수성이 매우 높았으며, PARP(+/+) 세포주에서는 MNNG의 처리에 따른 PARP 단백질의 단편화가 일반적인 apoptosis 유발 세포에서 관찰되는 현상에 비하여 그 정도가 약했다는 점은 본 연구의 결과와 유사하다고 할 수 있다.

MNNG가 Bcl-2/Bax family의 발현에 미치는 영향

Apoptosis 현상을 매개하는 대표적 유전자인 Bcl-2/Bax family 중 apoptosis 유발을 억제하는 anti-apoptotic 분자인 Bcl-2 및 apoptosis 유발을 촉진하는 pro-apoptotic 분자인 Bax는 밀접한 연관성을 가지고 있다 (Jurgensmeier *et al.*, 1998; Antonsson and Martinou, 2000). 이들 두 유전자는 mitochondria로부터 cytochrome c를 유리시켜 중앙 억제 유전자인 p53, caspase 및 DNA 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성을 조절한다(Antonsson and Martinou, 2000; Reed, 1998; Rosse *et al.*, 1998). 이들 유전자는 서로 dimer를 이루고 있는데 발현 수준의 변화가 일어나면 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다(Antonsson and Martinou, 2000; Lenaz *et al.*, 1999). 따라서 MNNG에 의한 인체 전립선 암세포의 apoptosis 유발과정에 Bcl-2/Bax family의 관련 여부를 조사하였다. Fig. 5A에 나타난 바와 같이 PC-3 세포에서의 경우 조사된 Bax 및 Bax family에 속하는 Bad, Bcl-2 및 Bcl-2 family에 속하는 및 Bcl-XS/L 단백질의 변화에서 Bcl-2의 발현 감소만이 두드러진 현상이었으며, 나머지 단백질의 발현에는 큰 영향을 주지는 않았다. 그러나 DU145 세포에서의 경우는 Bax 및 Bad의 단백질 발현이 MNNG의 처리 농도 증가에 따라 다소 증가되었으며, Bcl-2 역시 농도 의존적으로 감소되는 경향성을 보여 주었다(Fig. 5B). 그러나 RT-PCR에 의한 전사 수준에서 이들 유전자의 발현에 미치는 MNNG의 영향을 조사해 본 결과, PC-3 세포주에서 Bcl-2 family에 속하는

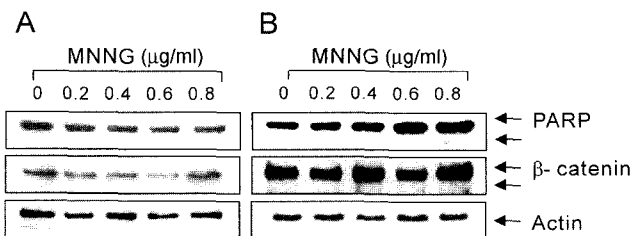


Fig. 4. Effects of MNNG on the levels of PARP and β -catenin protein in PC-3 (A) and DU145 (B) human prostate carcinoma cells. Cells were incubated with MNNG for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 8% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-PARP and anti- β -catenin antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

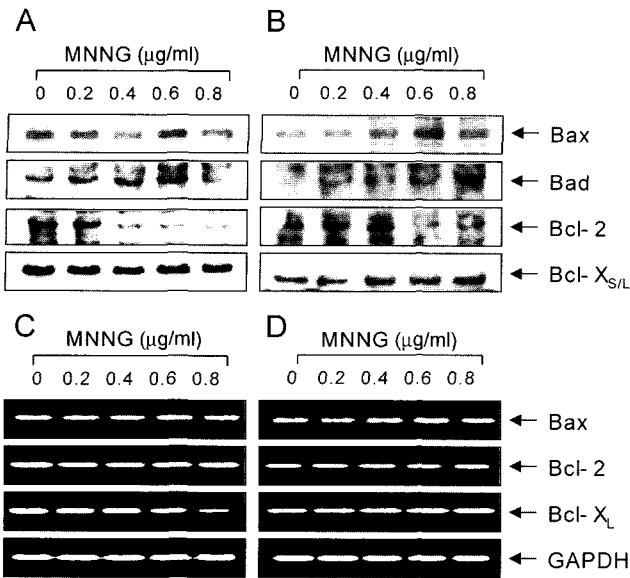


Fig. 5. Effects of MNNG on the levels of Bcl-2/Bax family protein (A and B) and mRNA (C and D) in PC-3 (A and C) and DU145 (B and D) human prostate carcinoma cells. (A and B) Cells were incubated with MNNG for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. (C and D) Cells were incubated with MNNG for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using specific primers described in Materials and Methods. GAPDH was used as a house-keeping control gene.

Bcl-XL 유전자의 전사 수준만 감소되었을 뿐 나머지 유전자들의 발현에는 큰 변화가 없었다(Fig. C & D). 이상의 결과는 세포주의 종류에 따른 약간의 차이는 있으나, 부분적으로 Rasmussen *et al.*(2000)의 결과와 유사하였다.

Caspase 및 cIAPs의 발현에 미치는 MNNG의 영향

Apoptosis 유발에 핵심적인 역할을 하는 caspase는 핵과 mitochondria의 외막에 불활성 형태로 존재하다가 apoptosis를 유도하는 자극에 의하여 활성화되고(Reed, 1998), 활성도는 Bcl-2/Bax family의 발현정도 및 p53에 의존적인 경우도 있다(Kluck *et al.*, 1997). 한편 caspase의 활성화와 연관된 조절인자로서 IAP 단백질들은 caspase와의 직접적인 결합을 통하여 그들의 활성을 억제할 수 있다(Holicik *et al.*, 2001; Salvesen and Duckett 2000; Hussein *et al.*, 2003).

따라서 MNNG에 의한 인체 전립선암세포의 apoptosis 유발과 연관된 caspases 및 IAPs의 관련 여부를 조사한 결과는 Fig. 6에 나타난 바와 같다. 먼저 caspase-3의 경우 PC-3 세포에서는 활성형의 발현을 관찰할 수 없었지

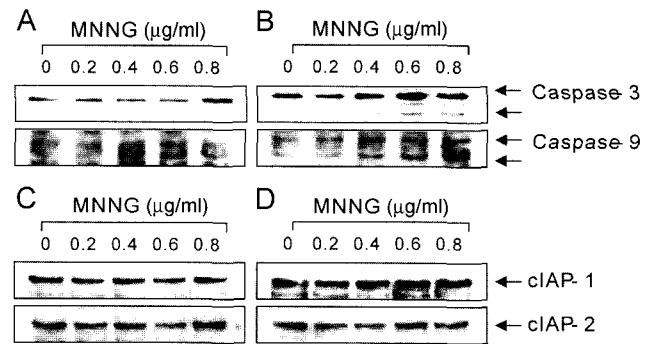


Fig. 6. Proteolytic cleavage of caspase-3 and caspase-9 protein by MNNG treatment without alteration of cIAPs expression in PC-3 (A and C) and DU145 (B and D) human prostate carcinoma cells. Cells were incubated with MNNG for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system.

만 DU145 세포에서는 활성형인 17 및 19 KDa 분자량을 가지는 단백질의 발현이 MNNG 처리농도 의존적으로 증가하였다. 이는 Halappanavar *et al.*(1999)에 의해 이미 발표된 결과와 유사하였다. 또한 caspase cascades 신호 전달계에서 caspase-3의 상위에 존재하는 caspase-9 단백질을 측정된 결과 PC-3 및 DU145 모두에서 활성형인 단백질의 발현이 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 6A & B). 그러나 MNNG 처리 후 조사된 두 가지 종류(cIAP-1 및 cIAP-2)의 IAP family 단백질 발현은 PC-3 및 DU145 모두에서 아무런 변화가 없었다(Fig. 6C & D).

결론

본 연구에서는 monofunctional alkylating agent인 MNNG에 의한 인체 전립선 암세포의 apoptosis 유발에 관한 기전해석을 시도하였다. MNNG의 처리에 의하여 조사된 PC-3 및 DU145 전립선 암세포 모두에서 농도 의존적으로 생존율이 감소하였으며, 두 세포주 사이의 유의적인 차이점은 없었다. 이러한 MNNG의 암세포 성장 억제 효과는 sub-G1기의 증가 및 apoptotic body 형성 등으로 확인된 것처럼 apoptosis 유발과 밀접한 연관성이 있었으며, 두 세포주에서 apoptosis 유발에도 유사한 경향성을 보였다. DU-145 세포에서는 PARP와 β -catenin 단백질의 단편화현상이 관찰되었으나 PC-3 세포에서는 큰 변화가 없었다. Western blotting 및 RT-PCR의 방법에 의한 Bcl-2/Bax family에 속하는 몇 가지 유전자의 발현에 미치는 MNNG의 영향을 조사한 결과 세포주에 따른 약간의 차이점은 있었으나 Bcl-2 계열 유전자의 발현이

다소 감소되는 경향성을 보여주었다. 또한 caspase의 활성형도 MNNG 처리 농도 의존적으로 증가되었으나 조사된 clAPs의 발현에는 변화가 없었다. 따라서 MNNG에 의한 암세포의 성장억제에 따른 apoptosis의 유발은 p53 유전자의 발현과는 무관하였으며, Bcl-2/Bax family의 발현 변화에 따른 caspase의 활성이 주된 경로임을 확인할 수 있었다.

감사의 말씀

이 연구는 2002년 동의대학교 교내연구비 지원에 의하여 이루어졌음.

참고문헌

- Adamson, A.W., Kim, W.J., Shangary, S., Baskaran, R. and Brown, K.D. (2002): ATM is activated in response to N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced DNA alkylation. *J. Biol. Chem.*, **277**, 38222-38229.
- Antonsson, B. and Martinou, J.C. (2000): The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell. Res.*, **256**, 50-57.
- Carethers, J.M., Hawn, M.T., Chauhan, D.P., Luce, M.C., Marra, G., Koi, M. and Boland, C.R. (1996): Competency in mismatch repair prohibits clonal expansion of cancer cells treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *J. Clin. Invest.*, **98**, 199-206.
- Chiarugi, V., Magnelli, L., Cinelli, M. and Basi, G. (1994): Apoptosis and the cell cycle. *Cell Mol. Biol. Res.*, **40**, 603-612.
- Choi, Y.H. (2001): Research technics for the cell cycle study. *Exp. Mol. Med.*, **33**, S15-36.
- Choi, Y.H., Im, E.O., Suh, H.S., Jin, Y.E., Lee, W.H., Yoo, Y.H., Kim, K.W. and Kim, N.D. (2001): Apoptotic activity of novel bile acid derivatives in human leukemic T cells through the activation of caspases. *Int. J. Oncol.*, **18**, 979-984.
- Choi, Y.H., Lee, S.J., Nguyen, P., Jang, J.S., Lee, J., Wu, M.L., Takano, E., Maki, M., Henkart, P.A. and Trepel, J.B. (1997): Regulation of cyclin D1 by calpain protease. *J. Biol. Chem.*, **272**, 28479-28484.
- Choi, Y.H., Lee, W.H., Park, K.Y. and Zhang, L. (2000): p53-independent induction of p21 (WAF1/CIP1), reduction of cyclin B1 and G2/M arrest by the isoflavone genistein in human prostate carcinoma cells. *Jpn. J. Cancer Res.*, **91**, 164-173.
- Duckett, D.R., Bronstein, S.M., Taya, Y. and Modrich, P. (1999): hMutSalph- and hMutLalpha-dependent phosphorylation of p53 in response to DNA methylator damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 12384-12388.
- Fang, M.Z., Mar, W.C. and Cho, M.H. (2001): Cell cycle was disturbed in the MNNG-induced initiation stage during in vitro two-stage transformation of Balb/3T3 cells. *Toxicology*, **163**, 175-184.
- Fukuda, K. (1999): Apoptosis-associated cleavage of β -catenin in human colon cancer and rat hepatoma cells. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **31**, 519-529.
- Halappanavar, S.S., Rhun, Y.L., Mounir, S., Martins, L.M., Huot, J., Earnshaw, W.C. and Shah, G.M. (1999): Survival and proliferation of cells expressing caspase-un-cleavable Poly(ADP-ribose) polymerase in response to death-inducing DNA damage by an alkylating agent. *J. Biol. Chem.*, **274**, 37097-37104.
- Hall, A.G. and Tilby, M.J. (1992): Mechanisms of action of, and modes of resistance to, alkylating agents used in the treatment of haematological malignancies. *Blood Rev.*, **6**, 163-173.
- Hawn, M.T., Umar, A., Carethers, J.M., Marra, G., Kunkel, T.A., Boland, C.R. and Koi, M. (1995): Evidence for a connection between the mismatch repair system and the G2 cell cycle checkpoint. *Cancer Res.*, **55**, 3721-3725.
- Hickman, M.J. and Samson, L.D. (1999): Role of DNA mismatch repair and p53 in signaling induction of apoptosis by alkylating agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 10764-10769.
- Holcik, M., Gibson, H. and Korneluk, R.G. (2001): XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis*, **6**, 253-261.
- Hussein, M.R., Haemel, A.K. and Wood, G.S. (2003): Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. *J. Pathol.*, **199**, 275-288.
- Jaiswal, A.S. and Narayan, S. (2002): SN2 DNA-alkylating agent-induced phosphorylation of p53 and activation of p21 gene expression. *Mutat. Res.*, **500**, 17-30.
- Johnson, J.P. (1999): Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.*, **8**, 345-357.
- Jurgensmeier, J.M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D. and Reed, J.C. (1998): Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 4997-5002.
- Kat, A., Thilly, W.G., Fang, W.H., Longley, M.J., Li, G.M. and Modrich, P. (1993): An alkylation-tolerant, mutator human cell line is deficient in strand-specific mismatch repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 6424-6428.
- Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E. and Poirier, G.G. (1993): Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.*, **53**, 3976-3985.
- Khan, Q.A. and Dipple, A. (2000): Diverse chemical carcinogens fail to induce G(1) arrest in MCF-7 cells. *Carcinogenesis*, **21**, 1611-1618.
- Kluck, R.M., Bossy-Wetzell, E., Green, D.R. and Newmeyer, D.D. (1997): The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, **275**, 1132-1136.
- Kreis, W. (1995): Current chemotherapy and future directions in research for the treatment of advanced hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Invest.*, **13**, 296-312.
- Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G. and Earnshaw, W.C. (1994): Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*, **371**, 346-347.
- Lenaz, G., Bovina, C., Formiggini, G. and Castelli, G.P.

- (1999): Mitochondria, oxidative stress, and antioxidant defences. *Acta Biochim. Pol.*, **46**, 1-21.
- Lieberthal, W., Koh, J.S. and Levine, J.S. (1998): Necrosis and apoptosis in acute renal failure. *Semin. Nephrol.*, **18**, 505-518.
- Nagata, S. (1997): Apoptosis by death factor. *Cell*, **88**, 355-365.
- Narayan, S., Jaiswal, A.S., Multani, A.S. and Pathak, S. (2001): DNA damage-induced cell cycle checkpoints involve both p53-dependent and -independent pathways: role of telomere repeat binding factor 2. *Br. J. Cancer*, **85**, 898-901.
- Parra, M., Jardí, M., Koziczak, M., Nagamine, Y. and Munoz-Canoves, P. (2001): p53 Phosphorylation at serine 15 is required for transcriptional induction of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene by the alkylating agent N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *J. Biol. Chem.*, **276**, 36303-36310.
- Rasmussen, L.J., Rasmussen, M., Lutzen, A., Bisgaard, H.C. and Singh, K.K. (2000): The human cyclin B1 protein modulates sensitivity of DNA mismatch repair deficient prostate cancer cell lines to alkylating agents. *Exp. Cell Res.*, **257**, 127-134.
- Reed, J.C. (1998): Bcl-2 family proteins. *Oncogene*, **17**, 3225-3236.
- Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B. and Borner, C. (1998): Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature*, **391**, 496-499.
- Rowlands, T.M., Symonds, J.M., Farookhi, R. and Blaschuk, O.W. (2000): Cadherins: crucial regulators of structure and function in reproductive tissues. *Rev. Reprod.*, **5**, 53-61.
- Salvesen, G.S. and Duckett, C.S. (2002): IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **3**, 401-410.
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S. and Peter, M.E. (1998): Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem.*, **254**, 439-459.
- Searle, J., Kerr, J.F. and Bishop, C.J. (1982): Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol. Annu.*, **17**, 229-259.
- Shin, K.H., Tannyhill, R.J., Liu, X. and Park, N.H. (1996): Oncogenic transformation of HPV-immortalized human oral keratinocytes is associated with the genetic instability of cells. *Oncogene*, **12**, 1089-1096.
- Steinhusen, U., Badock, V., Bauer, A., Behrens, J., Wittman-Liebold, B., Dorken, B. and Bommert, K. (2000): Apoptosis-induced cleavage of β -catenin by caspase-3 results in proteolytic fragments with reduced transactivation potential. *J. Biol. Chem.*, **275**, 16345-16353.
- Strasser, A., Harris, A.W., Jacks, T. and Cory, S. (1994): DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2. *Cell*, **79**, 329-339.
- Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvesen, G.S. and Dixit, V.M. (1995): Yama/ CPP32 β , a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell*, **81**, 801-809.
- van Bokhoven, A., Varella-Garcia, M., Korch, C., Hessels, D. and Miller, G.J. (2001): Widely used prostate carcinoma cell lines share common origins. *Prostate*, **47**, 36-51.
- Wassermann, K. (1994) Intragenomic heterogeneity of DNA damage formation and repair: a review of cellular responses to covalent drug DNA interaction. *Crit. Rev. Toxicol.*, **24**, 281-322.
- Wijnhoven, B.P., Dinjens, W.N. and Pignatelli, M. (2000): E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br. J. Surg.*, **87**, 992-1005.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F. and Currie, A.R. (1980): Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, **68**, 251-306.
- Yang, J. and Duerksen-Hughes, P.J. (2001): Activation of a p53-independent, sphingolipid-mediated cytolytic pathway in p53-negative mouse fibroblast cells treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *J. Biol. Chem.*, **276**, 27129-27135.
- Zimmermann, K.C., Bonzon, C. and Green, D.R. (2001): The machinery of programmed cell death. *Pharmacol. Ther.*, **92**, 57-70.