

인체폐암세포 A549의 세포주기 조절인자에 미치는 histone deacetylase inhibitor trichostatin A의 영향

황지원 · 김영민¹ · 홍수현 · 최병태² · 이원호³ · 최영현*

동의대학교 한의과대학 생화학교실, ¹한국과학영재학교, ²동의대학교 해부학교실 및 대학원 바이오물질제어학과, ³부산대학교 생물학과

Received July 8, 2005 / Accepted September 2, 2005

Modulation of Cell Cycle Control by Histone Deacetylase Inhibitor Trichostatin A in A549 Human Non-small Cell Lung Cancer Cells. Ji Won Hwang, Young Min Kim¹, Su Hyun Hong, Byung Tae Choi², Won Ho Lee³ and Yung Hyun Choi*. *Department of Biochemistry, ¹Department of Anatomy, Donggeui University College of Oriental Medicine, Department of Biomaterial Control, Donggeui University Graduate School, Busan 614-052, Korea, ²Korea Science Academy, Busan 614-103, Korea, ³Department of Biology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea* – Histone deacetylase (HDAC) inhibitors target key steps of tumor development. They inhibit proliferation, induce differentiation and/or apoptotic cell death, and exhibit potent antimetastatic and antiangiogenic properties in cancer cells *in vitro* and *in vivo*. Although they are emerging as a promising new treatment strategy in malignancy, how they exert their effect on human non-small cell lung cancer cells is as yet unclear. The present study was undertaken to investigate the underlying mechanism of a HDAC inhibitor trichostatin A (TSA)-induced growth arrest and its effect on the cell cycle control gene products in a human lung carcinoma cell line A549. TSA treatment induced the growth inhibition and morphological changes in a concentration-dependent manner. Treatment of A549 cells with TSA resulted in a concentration-dependent increased G1 (under 100 ng/ml) and/or G2/M (200 ng/ml) cell population of the cell cycle as determined by flow cytometry. Moreover, 200 ng/ml TSA treatment significantly induced the population of sub-G1 cells (23.0 fold of control). This anti-proliferative effect of TSA was accompanied by a marked inhibition of cyclins, positive regulators of cell cycle progression, and cyclin-dependent kinases (Cdks) expression and concomitant induction of tumor suppressor p53 and Cdk inhibitors such as p21 and p27. Although further studies are needed, these findings provide important insights into the possible molecular mechanisms of the anti-cancer activity of TSA in human lung carcinoma cells.

Key words – histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, A549 lung cancer cells, cell cycle

DNA와 복합체를 이루는 histone 단백질의 번역 후 modification은 acetylation, methylation, 인산화, ubiquitination 및 ADP-ribosylation 등에 의하여 이루어진다[8,21]. 그중 histone 단백질의 N-말단 부위에 존재하는 lysine을 acetylation 시킴으로서 chromatin의 구조를 변화시키는데 관여하는 것이 histone acetyltransferase (HAT) 복합체이다[15]. 특히 HAT에 의하여 histone 복합체를 이루는 4가지 histone의 lysine 잔기가 acetylation 되지만, N-말단 부위는 histone의 상호작용에 의한 nucleosome 구조 유지에 중요한 영향을 미치지 않는 곳이며 그곳이 hyper-acetylation 되어도 nucleosome 구조의 변화에도 큰 영향이 없다. 그러나 histone의 acetylation에 의하여 chromatin의 구조적 folding이 불안정화 되어 DNA에 RNA polymerase II의 접근이 쉽게 될 수 있도록 하여 전사가 활성화될 수 있도록 하여 준다. 따라서 histone deacetylases (HDACs)에 의한 histone의 deacetylation은 전사활성을 억제한다는 의미가 된다[1,36]. 따라서 HDAC 억제

제의 개발은 항암치료제 개발의 수단으로서 매우 중요한 의미를 가지고 있으며, 현재까지 알려진 HDAC 억제제는 약 20여 가지 정도이고[21], HDAC 억제제의 대부분은 암세포의 세포주기 교란 및 apoptosis 유발과 동물 모델에서 암세포의 증식억제 효과가 있는 것으로 보고되어지고 있다. HDAC 억제제 중, Streptomyces에서 유래된 trichostatin A (TSA)는 항균제로서 개발된 것이었으나 저농도 처리(nanomolar concentration) 조건에서 포유동물 세포 histone 단백질의 acetylation 유도효과가 매우 높았으며, HDAC의 활성 또한 효과적으로 억제하는 것으로 알려진 후 대표적인 HDAC 억제제로 사용되는 물질이다[37]. 선행연구들에서 TSA는 세포의 증식과 생존을 억제하는 유전자들의 전사활성을 유도하여 다양한 암세포의 세포주기 교란 및 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 왔다[10,14,28-30,35,36,38]. 그리고 TSA 및 TSA의 hydroxamate 유도체들은 현재 임상시험에 사용 중이지만[3,30], 아직 인체 폐암세포에 관한 연구는 상대적으로 매우 미비하게 이루어진 편이다.

한편 1983년 세포주기 조절의 양성인자인 cyclin 유전자들이 동정된 후, cyclin의 합성, 인산화 및 분해 연구를 통하여

***Corresponding author**

Tel : +82-51-850-7413, Fax : +82-51-853-4036

E-mail : choiyh@deu.ac.kr

이들이 전 세포주기에 걸쳐 매우 다양하게 존재한다는 것이 알려지게 되었다[27,31]. 그 후 세포주기 특이적인 cyclin-dependent kinases (Cdks)의 기능이 세포주기 진행에 필수적임이 밝혀졌고, 이것이 cyclins에 의해 활성화된다는 것도 밝혀지게 되었다[6,27]. 또한 세포주기 조절에서 중요한 역할을 하는 Cdks의 활성은 Cdk inhibitors에 의해서도 조절되어 지는데, 이들은 선택적인 Cdks와의 결합으로 cyclin/Cdk 복합체의 활성 억제를 통하여 세포주기 특이적인 증식의 억제 및 apoptosis에 의한 세포사를 유도하는 것으로 알려져 있다 [9,18]. 따라서 세포주기 조절관점에서 특정 후보물질의 암세포 증식 억제 현상의 규명은 항암제의 개발이나, 후보물질의 항암작용 규명에 필수적인 과정으로 인식되어지고 있다.

본 연구에서는 대표적인 HDAC 억제제인 TSA의 연구가 거의 이루어져 있지 않은 인체 폐암세포를 대상으로 TSA가 폐암세포의 성장에 미치는 영향을 세포주기 조절인자 중심으로 조사하였다.

재료 및 방법

암세포배양 및 HDAC 억제제 TSA의 처리

본 연구에 사용된 A549 인체 폐암세포는 한국생명공학연구원소에서 분주 받아 사용하였으며, 90%의 RPMI-1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS), 1%의 penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD, USA)이 포함된 배지를 사용하여 배양하였다. TSA는 Sigma Chemical Co. (St. Luis, MO, USA)에서 구입하였으며, dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma)에 용해하여 -20℃에 보관하였고, 매회 처리 전 배지에 희석 후 사용하였다.

MTT assay를 이용한 세포 성장율의 측정 및 세포형태 변화의 관찰

암세포를 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 후, TSA를 적정 농도별로 처리하고 48시간동안 배양하였다. 그 후, 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Amresco, Solon, Ohio, USA) 시약을 0.5 mg/mL 농도가 되게 성장배지로 희석하여 분주하고 3시간 동안 배양 후 MTT 시약을 제거하고 DMSO를 첨가하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 TSA 미처리 배지에서 배양된 세포와 TSA가 처리된 배지에서 배양된 세포들의 성장율을 비교하였다. 세포형태 변화 관찰을 위해서는 세포배양용 petridish에 세포를 24시간동안 안정화시킨 다음 TSA를 농도별로 처리하여 48시간동안 배양한 후, 위상차 현미경하에서 각 농도에 따른 변화를 관찰하였다.

DNA flow cytometry에 의한 세포주기의 분석

세포주기의 분포도에 미치는 TSA의 영향을 조사하기 위

하여 Cycle TEST PLUS kit (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 사용하였으며, TSA 미함유 및 TSA가 함유된 배지에서 48시간 배양된 암세포들을 kit에서 제공된 buffer solution을 이용하여 씻어내고, Cycle TEST PLUS solution A 및 B를 상온에서 각각 10분씩 처리한 후 Cycle TEST PLUS solution C를 처리하여 4℃에서 30분 동안 염색하였다. 이를 nylon mesh로 세포를 하나씩으로 분리시킨 후 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 Modifit LT (Becton Dickinson) 프로그램으로 분석하였다.

RT-PCR에 의한 mRNA 발현의 분석

TSA 미함유 및 TSA가 함유된 배지에서 48시간 배양된 암세포들에 TRIzol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 4℃에서 1시간 동안 처리하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, oligo dT primer와 AMV reverse transcriptase (RT)를 이용하여 2 µg의 RNA에서 ss cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 template로 사용하여 관찰 대상 유전자(Table 1)를 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 증폭하였다. 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr, Sigma)를 이용하여 염색한 후 ultra violet (UV)하에서 확인하였다.

Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석

TSA 미처리 및 TSA가 처리된 배지에서 자란 세포들을 수집하여 적당량의 lysis buffer (40 mM Tris, pH 8.0, 120 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 0.1 mM sodium orthovanadate, 2 µg/ml aprotinin, 2 µg/ml leupeptin, and 100 µg/ml PMSF)를 첨가하여 4℃에서 30분간 반응시킨 후, 14,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 그 상층액을 취하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 측정하였으며, 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 10% skim-milk를 함유한 PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS)에 4℃에서 1시간 이상 배양하면서 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하였다. 그리고 특정 단백질에 대한 항체를 membrane에 적용시켜 항원 항체 반응을 일으킨 후, PBS-T로 씻어내고 특정 항체에 대한 이차 항체 반응을 실시한 후 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액(Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 양을 분석하였다. 본 실험에 사용된

Table 1. Sequences of primers used for RT-PCR

Gene name		Sequence
Cyclin A	Sence	5'-TCC-AAG-AGG-ACC-AGG-AGA-ATA-TCA-3'
	Antisence	5'-TCC-TCA-TGG-TAG-TCT-GGT-ACT-TCA-3'
Cyclin B1	Sence	5'-AAG-AGC-TTT-AAA-CTT-TGG-TCT-GGG-3'
	Antisence	5'-CIT-TGT-AAG-TCC-TTG-ATT-TAC-CAT-G-3'
Cyclin D1	Sence	5'-TGG-ATG-CTG-GAG-GTC-TGC-GAG-GAA-3'
	Antisence	5'-GGC-TTC-GAT-CTG-CTC-CTG-GCA-GGC-3'
Cyclin E	Sence	5'-AGT-TCT-CGG-CTC-GCT-CCA-GGA-AGA-3'
	Antisence	5'-TCT-TGT-GTC-GCC-ATA-TAC-CGG-TCA-3'
Cdc2	Sence	5'-GGG-GAT-TCA-GAA-ATT-GAT-CA-3'
	Antisence	5'-TGT-CAG-AAA-GCT-ACA-TCT-TC-3'
Cdk2	Sence	5'-GCT-TTC-TGC-CAT-TCT-CAT-CG-3'
	Antisence	5'-GTC-CCC-AGA-GTC-CGA-AAG-AT-3'
Cdk4	Sence	5'-ACG-GGT-GTA-AGT-GCC-ATC-TG-3'
	Antisence	5'-TGG-TGT-CGG-TGC-CTA-TGG-GA-3'
Cdk6	Sence	5'-CGA-ATG-CGT-GGC-GGA-GAT-C-3'
	Antisence	5'-CCA-CTG-AGG-TTA-GAG-CCA-TC-3'
p53	Sence	5'-GCT-CTG-ACT-GTA-CCA-CCA-TCC-3'
	Antisence	5'-CTC-TCG-GAA-CAT-CTC-GAA-GCG-3'
p21	Sence	5'-CTC-AGA-GGA-GGC-GCC-ATG-3'
	Antisence	5'-GGG-CGG-ATT-AGG-GCT-TCC-3'
p27	Sence	5'-AAG-CAC-TGC-CGG-GAT-ATG-GA-3'
	Antisence	5'-AAC-CCA-GCC-TGA-TTG-TCT-GAC-3'
GAPDH	Sence	5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3'
	Antisence	5'-AGC-CTT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3'

항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였으며, 이차 항체로 사용된 horseradish peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Corp.에서 구입하였다.

결과 및 고찰

A549 폐암세포의 증식에 미치는 TSA의 영향

A549 인체폐암세포의 증식에 미치는 TSA의 영향을 Fig. 1A에 나타내었다. 48시간 동안 TSA 미처리 배지에서 배양한 A549 세포에 비하여 TSA가 함유된 배지에서 배양한 세포는 TSA의 처리 농도에 의존적으로 증식이 감소하였음을 알 수 있었다(Fig. 1A). 즉 50 ng/ml 농도의 TSA 처리군의 경우 대조군에 비하여 35% 이상 세포증식이 억제되었으며, 100 ng/ml 농도의 처리군에서는 약 70% 정도의 세포증식 억제현상을 관찰할 수 있었다. 또한 200 ng/ml 농도의 처리군에서는 생존율이 18% 정도로 암세포의 대부분이 정상적인 생존을 하지 못하였음을 알 수 있었다. 이상의 결과들은 다양한 인체 암세포에서 관찰된 최근의 선행연구들과 유사한 경향성을 보여주는 것으로[2,10,13,17,23,25], TSA는 폐암세포에서도

다른 암세포에서처럼 유사한 처리 농도 조건에서 비슷한 암세포 증식억제 효능이 있음을 알 수 있었다. 아울러 TSA의 처리가 폐암세포의 형태에 미치는 영향을 Fig. 1B에 나타내었다. TSA 처리 농도 의존적으로 현저한 세포밀도의 감소현상과 다양한 형태적인 변화를 관찰할 수 있었다. 이러한 현상은 인체 자궁경부암 및 간암세포 등에서 관찰된 최근의 선행연구 결과와 유사한 경향성을 보여주는 것이었다[10,17,19,24].

세포주기 분포에 미치는 TSA의 영향

세포의 증식과 연관된 세포주기 조절은 G1, S 및 G2/M기 각 주기별 관여하는 다양한 유전자들에 의해 조절되는데, 기본적으로 세포주기 checkpoint 각 시기에 요구되어지는 양성 조절인자인 cyclins에 의하여 Cdk의 연속적인 활성화와 불활성이 결정되어진다[27,31]. 세포주기 조절의 관점에서 암세포는 세포주기의 비정상화에 기인된 질병으로 정의될 수 있으며, 특정 시기의 세포주기 억제는 세포주기 조절 양성인자의 발현 저하 또는 음성 조절 인자의 과발현과 관계가 있다고 요약될 수 있다[6,27]. 따라서 TSA의 처리에 의한 A549 폐암세포의 증식억제가 세포주기 특정 시기의 교란과 연관성을 지니는지의 여부를 조사하기 위하여 세포주기 분포에 미치는 TSA의 영향을 조사한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. TSA가 함유되지 않은 배지에서 자란 암세포의 경우 전체 조사

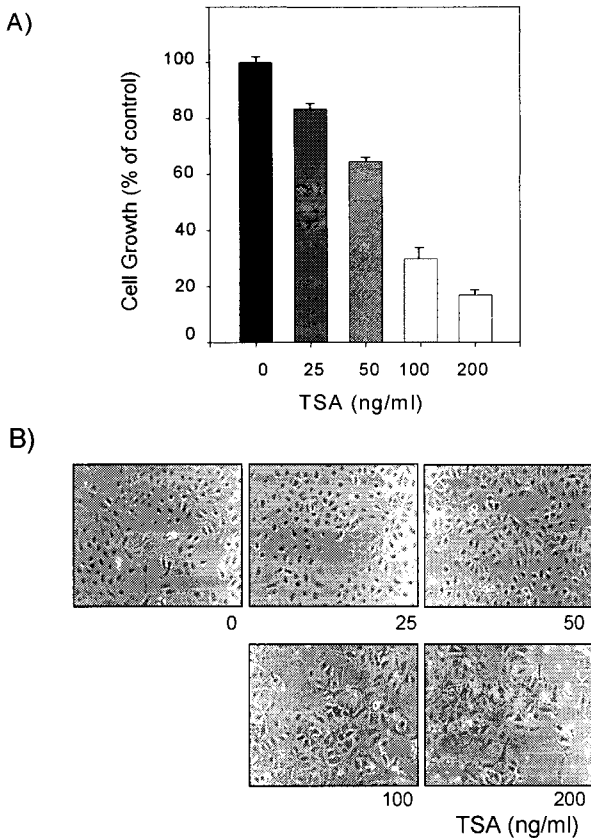


Fig. 1. Anti-proliferative effect and morphological changes of human lung carcinoma A549 cells following incubation with TSA. (A) Cells were seeded as described in materials and methods, and treated with various concentrations of TSA. After 48 h incubation with TSA, MTT assay was performed. Results are expressed as average from two separate experiments. (B) Exponentially growing A549 cells were incubated with TSA for 48 h. Cell morphology was visualized by light microscopy. Magnification, X200.

대상 세포 중 G1, S 및 G2/M기에 해당되는 세포의 빈도는 각각 약 64.99%, 13.03% 및 20.05% 정도였다. 그리고 50 ng/ml 농도의 TSA 및 100 ng/ml 농도의 TSA 처리군의 경우 G1기는 각각 60.27 및 64.40%였으나, 200 ng/ml 농도의 TSA 처리군의 경우 G1기에 해당되는 세포의 빈도는 약 27.14%였다. 그러나 Fig. 2의 결과에서처럼 TSA의 처리 농도가 증가될수록 sub-G1기에 해당되는 세포의 빈도가 대조군에서 2.10%였던 것이 100 ng/ml 농도의 TSA 처리군에서는 15.57%, 그리고 200 ng/ml 농도의 TSA 처리군에서는 48.37%로 크게 증가되어 TSA 처리 농도 의존적으로 A549 폐암세포의 증식 억제는 apoptosis 유발과 직접적인 관련이 있음을 알 수 있었다. 따라서 sub-G1기를 제외한 나머지 세포들을 대상으로 다시 세포주기별 분포 빈도를 조사한 경우, 200 ng/ml 농도의 TSA 처리군에서 G1기에 해당되는 빈도는 약 52.28% (100 ng/ml 처리군의 경우 75.52%)이며, S기 및 G2/M기에 해당

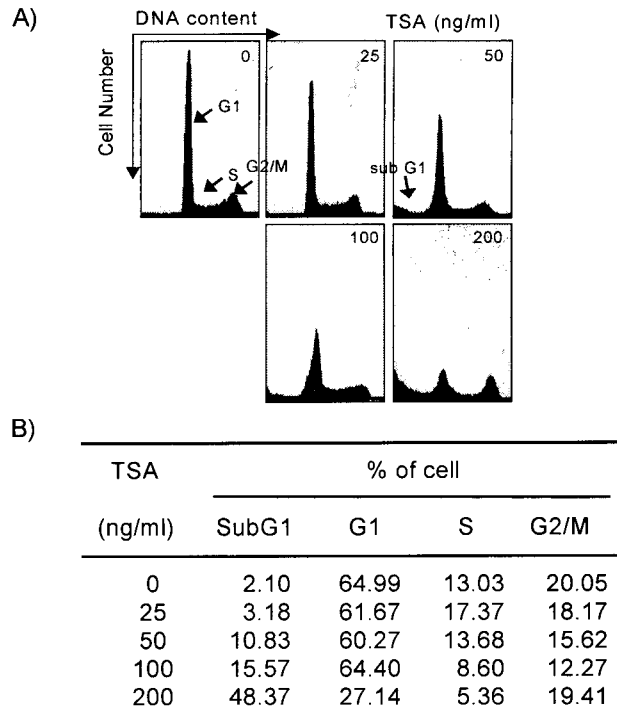


Fig. 2. DNA-fluorescence histogram of human lung carcinoma A549 cell nuclei after treatment with TSA. (A) Exponentially growing cells at 50% confluency were treated for 48 h with indicated concentrations of TSA. Cells were trypsinized and pellets were collected. The cells were fixed and treated by RNase, and then cellular DNA was stained with PI, and analyzed by flow cytometry. (B) Distribution of each cell cycle phase of A549 cells cultured in the presence or absence of various concentrations of TSA. Each phase was analyzed by flow cytometry after 48 h treatment with TSA.

되는 세포의 빈도는 각각 10.32% 및 37.39% (100 ng/ml 농도의 처리군의 경우는 각각 10.09% 및 14.39%)임을 알 수 있다. 따라서 A549 폐암세포의 경우 고농도의 TSA 처리군(200 ng/ml)에서는 G2/M기에 해당되는 세포의 빈도가 다소 증가(1.86배)함을 알 수 있었으나 저농도 처리군(100 ng/ml 이하)에서는 TSA 농도 증가에 따라 G1기의 세포 빈도가 다소 증가하였지만, G1 arrest 유발로 단정하기는 어려울 것 같다. 이와 같은 A549 폐암세포에서 관찰된 TSA 농도에 따른 세포주기 교란 현상은 대장암, 간암세포 유방암, 과골세포종, 자궁경부암 세포주[2,10,13,23,25,37]등에서 관찰된 결과들과도 유사한 것이었다.

Cyclins 및 Cdk의 발현에 미치는 TSA의 영향

진핵세포에서 세포주기의 진행을 위해서는 세포주기 특이적 양성조절인자인 cyclin의 발현 증가가 우선적으로 이루어져야한다. 즉 mid G1에서 D-type cyclin (cyclin D1, D2 및 D3)의 발현을 필요로 하며, late G1에서 S기로의 진입을 위

해서는 cyclin E의 발현이 증가되어야 한다[27,31]. 그리고 S기에서 G2기로의 진입 및 G2기와 M기 진행 동안에는 각각 cyclin A 및 B-type cyclin (cyclin B1 및 B2)의 발현이 증가되어야 한다. 그리고 이들 cyclin들은 특정 Cdk와 특이적인 결합에 의하여 cyclin/Cdk 복합체를 형성하여 세포주기진행을 조절한다[6]. G1기에서는 cyclin Ds가 Cdk4/6와 복합체를 이루고, Cdk2는 cyclin A와 결합하여 S기와 G2기 동안 역할을 하는 반면 Cdc2는 cyclin B1과 결합하면 핵막의 histone H1과 lamin이 인산화에 의해 kinase 활성이 증가하여 핵막의 붕괴 및 염색체의 재배열이 일어나서 M기로 진행이 된다[6,27,31]. 따라서 A549 폐암세포에서 TSA의 처리에 따른 세포주기 조절관련 기전을 조사하기 위하여 cyclins 및 Cdk의 발현에 미치는 TSA의 영향을 RT-PCR 및 Western immunoblotting 방법으로 조사하였다. Cyclins의 경우, Fig. 3A 및 B의 결과에서 알 수 있듯이 조사된 cyclins 단백질의 대부분이 TSA 처리 농도의존적으로 발현이 감소되었음을 알 있었다. 특히 cyclin A의 경우 전사 및 번역 수준에서 동시에 감소되었으나, 전사 수준에서 나머지 cyclins의 발현은 큰 변화가 없는 것으로 보아 TSA 처리에 의한 cyclins 단백질의 발현 감소는 전사 수준 보다는 단백질의 half-life의 감소나 번역 수준에서 더 조절되는 것으로 추정되어진다. 이와 같은 cyclins의 발현에 미치는 TSA의 영향 중 cyclin A의 선택적 발현 저하 현상은 Moore 등[22] 및 Wharton 등[32]에 의한 결과와 매우 유사한 것이었다. 그리고 Cdk의 발현에 미치는 TSA의 영향을 조사한 결과는 Fig. 4A 및 B에 나타낸 바와 같이, Cdk2의 경우 TSA 처리 농도 의존적으로 강하게 전사 및 번역 수준에서 발현이 모두 감소되었으나, Cdk4는 mRNA 및

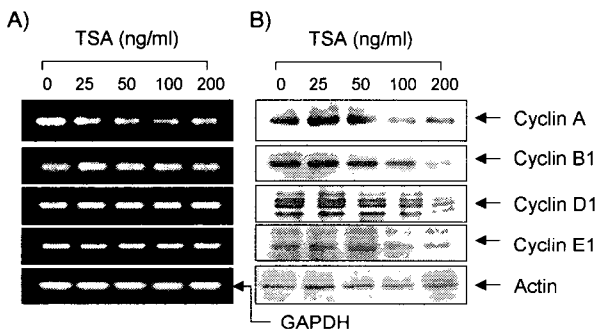


Fig. 3. Effects of TSA treatment on the levels of cyclins in human lung carcinoma A549 cells. (A) Cells were incubated with TSA for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using indicated primers. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) Cells were incubated with TSA for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

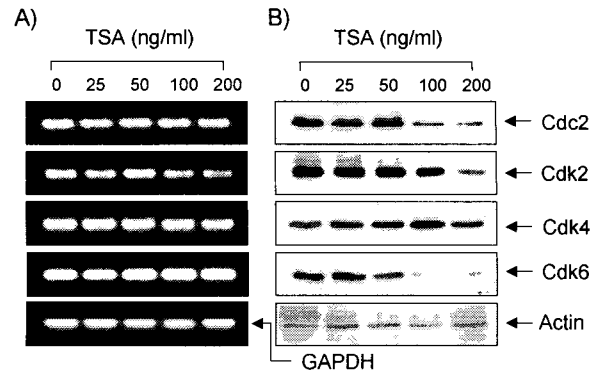


Fig. 4. Effects of TSA treatment on the levels of Cdk in human lung carcinoma A549 cells. (A) Cells were incubated with TSA for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using indicated primers. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) Cells were incubated with TSA for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

단백질 발현 수준에서 모두 큰 변화가 없었다. 한편 Cdc2 및 Cdk6의 경우 TSA 처리에 따라 mRNA 수준에서는 큰 변화가 없었으나, 단백질 발현은 100 ng/ml 농도 이상의 처리군에서는 거의 관찰하기 어려웠다. 따라서 TSA 처리에 따른 A549 폐암세포의 증식억제는 세포주기 양성 조절인자인 cyclins 뿐만 아니라 Cdk 발현 감소와도 직접적인 연관이 있음을 알 수 있었다.

종양억제 유전자 p53 및 Cdk inhibitors의 발현에 미치는 TSA의 영향

Cdk inhibitors는 cyclin/Cdk 복합체와 결합하여 그 활성을 억제하는 것으로 알려져 있는데, 특히 CIP/KIP 군에 속하는 p21은 종양 억제유전자인 p53에 의하여 활성화되어 G1기 뿐만 아니라 G2/M기를 포함한 전체 세포주기의 진행을 억제하는 주요한 조절인자이다[6,27,31]. Cdk inhibitor p21의 전사활성에는 p53이 관여하는 것이 일반적이지만 암세포의 종류나 항암제 및 후보물질의 종류에 따라서 p53 비의존적인 경로를 통하여 p21이 활성화된다고도 알려져 있다[9,34]. 그러나 p16의 경우 일반적으로 G1기 arrest에만 관여하는 것으로 알려져 있으며, p27 역시 G1기 arrest에 중요하지만 부분적으로 G2/M기 arrest에도 관여할 수 있는 것으로 보고되어지고 있다[9]. 따라서 본 연구에서는 TSA의 처리에 의한 인체 폐암세포의 증식억제가 종양 억제유전자인 p53 및 p21 그리고 p27과 같은 Cdk inhibitors들의 관련 여부를 조사하였다. Fig. 5A 및 B의 결과에서 알 수 있듯이 종양 억제유전자인 p53의 경우 전사수준에서의 큰 변화 없이 50 ng/ml 및

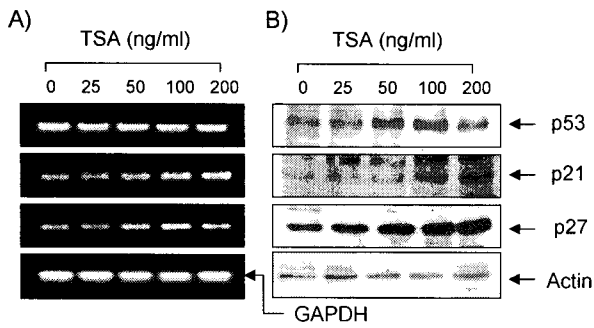


Fig. 5. Induction of Cdk inhibitor p21 and p27 by TSA treatment in human lung carcinoma A549 cells. (A) Cells were incubated with TSA for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using indicated primers. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) Cells were incubated with TSA for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 10% or 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with anti-p53, anti-p21 and anti-p27 antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

100 ng/mlM 처리군에서 부분적인 단백질의 축적 현상을 관찰할 수 있었으나 TSA 처리 농도 의존적으로 발현 자체가 증가하는 것은 아닌 것으로 판단된다. 조사된 Cdk inhibitor 중에서 CIP/KIP 군에 속하는 p27 및 p21의 경우 TSA가 처리된 배지에서 배양된 세포에서 전체적으로 처리 농도 의존적으로 높게 나타났다. 특히 TSA에 의한 p21의 전사 및 번역 수준에서의 발현 증가 현상은 다양한 인체 암세포주를 대상으로 한 선행 연구의 결과[10,11,16,17,20,22,23,25,28,33]와도 유사한 결과였으며, 전사 수준에 관한 연구의 결과들에서 아마도 p21의 promoter 영역 중 전사조절인자 Sp-1의 결합부위가 중요한 조절영역으로 추정되어진다[11,16,28,33]. 아울러 다양한 유전자의 promoter에 존재하는 Sp-1 결합부위의 활성은 세포주기 교란뿐만 아니라 apoptosis 유발에도 중요한 영향을 줄 것으로 추정 되어진다[20,26]. 또한 A549 폐암세포에서 TSA 처리에 의한 p27의 발현 증가 역시 간암세포 등에서 관찰된 것과 유사한 결과였다[4,10]. 본 연구에 사용된 A549 폐암세포주는 Cdk inhibitor의 INK4 군에서 가장 중요한 p16 유전자가 결손된 세포주[7]이므로 TSA에 의한 p16의 발현변화를 조사할 수는 없었지만 대장암세포를 대상으로 한 연구에서 TSA의 처리에 의한 G1 arrest 유발과정에 p16의 발현이 매우 유의적으로 증가되었으며[5], INK4 군에 속하는 Cdk inhibitor 중의 하나인 p15 유전자는 p21이 결손된 암세포주에서 TSA에 의한 대장암 증식억제에 중요한 역할을 한다는 점[12] 등을 고려할 때, TSA 처리에 의한 인체암세포의 증식 억제는 세포주기 전반에 걸쳐 세포증식에 관여하는 유전자들의 발현을 억제시키면서 Cdk inhibitors와 같은 세포 증식 억제 유전자들의 발현 증가를 통하여 암세포의 증식 억제를 유도하는 것으로 생각된다.

요 약

Histone deacetylase (HDAC) 억제제가 새로운 항암치료제 후보물질로서 유용성이 높은 것으로 평가되지만, 아직까지 인체폐암세포에 관한 연구는 상대적으로 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 폐암세포에 미치는 HDAC 억제제의 항암작용 기전을 조사하기 위하여 A549 인체폐암세포주를 대상으로 암세포의 증식에 미치는 대표적인 HDAC 억제제인 trichostatin A (TSA)에 의한 영향을 세포주기 조절관련인자 중심으로 조사하였다. TSA의 처리에 의하여 A549 폐암세포의 증식은 처리 농도 의존적으로 억제되었으며, 심한 형태적 변형을 동반하였다. 저농도 처리군에서는 TSA 농도가 증가할수록 세포주기 G1기의 빈도가 증가하였으나, 고농도 처리군에서는 G2/M기에 속하는 세포의 빈도가 증가되었다. 또한 apoptosis 유발의 간접적인 지표가 되는 sub-G1기에 속하는 세포의 빈도 역시 TSA 처리 농도 의존적으로 매우 증가되었다. 이러한 TSA의 A549 폐암세포 증식억제 효과는 cyclins 및 Cdks의 발현 억제, 종양억제유전자인 p53 및 Cdks 억제제인 p21과 p27의 발현 증가와도 연관성이 있었다. TSA의 항암 기전을 규명하기 위해서는 더 많은 연구가 부가적으로 필요하겠지만, 본 연구의 결과들에 의하면 TSA는 강력한 인체폐암세포의 증식 억제 및 항암작용이 있음을 시사하여 준다고 할 수 있다.

감사의 글

이 논문은 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구의 일부임(R05-2004-000-10672-0)

참 고 문 헌

- Aksan, I. 2002. Chromatin goes global. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 7-8.
- Bordonaro, M., J. M. Mariadason, F. Aslam, B. G. Heerdt and L. H. Augenlicht. 1999. Butyrate-induced apoptotic cascade in colonic carcinoma cells: modulation of the β -catenin-Tcf pathway and concordance with effects of sulindac and trichostatin A but not curcumin. *Cell Growth Differ.* **10**, 713-720.
- Bouchain, G. and D. Delorme. 2003. Novel hydroxamate and anilide derivatives as potent histone deacetylase inhibitors: synthesis and antiproliferative evaluation. *Curr. Med. Chem.* **10**, 2359-2372.
- Chen, J. S. and D. V. Faller. 2005. Histone deacetylase inhibition-mediated post-translational elevation of p27KIP1 protein levels is required for G1 arrest in fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* **202**, 87-99.

5. Chen, Y. X., J. Y. Fang, J. Lu and D. K. Qiu. 2004. Regulation of histone acetylation on the expression of cell cycle-associated genes in human colon cancer cell lines, *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **84**, 312-317.
6. Elledge, S. J. and J. W. Harper. 1994. Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 847-852.
7. Fukuoka, K., J. Adachi, K. Nishio, H. Arioka, H. Kurokawa, H. Fukumoto, T. Ishida, T. Nomoto, H. Yokote, A. Tomonari, N. Narita, J. Yokota and N. Saijo. 1977. p16INK4 expression is associated with the increased sensitivity of human non-small cell lung cancer cells to DNA topoisomerase I inhibitors. *Jpn. J. Cancer Res.* **88**, 1009-1016.
8. Gerber, M and A. Shilatifard. 2003. Transcriptional elongation by RNA polymerase II and histone methylation. *J. Biol. Chem.* **278**, 26303-26306.
9. Harper, J. W. 1997. Cyclin dependent kinase inhibitors. *Cancer Surv.* **29**, 91-107.
10. Herold, C., M. Ganslmayer, M. Ocker, M. Hermann, A. Geerts, E. G. Hahn and D. Schuppan. 2002. The histone-deacetylase inhibitor Trichostatin A blocks proliferation and triggers apoptotic programs in hepatoma cells. *J. Hepatol.* **36**, 233-240.
11. Hirsch, C. L. and K. Bonham. 2004. Histone deacetylase inhibitors regulate p21WAF1 gene expression at the post-transcriptional level in HepG2 cells. *FEBS Lett.* **570**, 37-40.
12. Hitomi, T., Y. Matsuzaki, T. Yokota, Y. Takaoka and T. Sakai. 2003. 5 (INK4b) in HDAC inhibitor-induced growth arrest. *FEBS Lett.* **554**, 347-350.
13. Joung, K. E., D. K. Kim and Y. Y. Sheen. 2004. Antiproliferative effect of trichostatin A and HC-toxin in T47D human breast cancer cells. *Arch. Pharm. Res.* **27**, 640-645.
14. Kim, Y. B., S. W. Ki, M. Yoshida and S. Horinouchi. 2000. Mechanism of cell cycle arrest caused by histone deacetylase inhibitors in human carcinoma cells. *J. Antibiot. (Tokyo)* **53**, 1191-200.
15. Kuo, M. H. and C. D. Allis. 1998. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* **20**, 615-626.
16. Lagger, G., A. Doetzlhofer, B. Schuettengruber, E. Haidweger, E. Simboeck, J. Tischler, S. Chiocca, G. Suske, H. Rotheneder, E. Wintersberger and C. Seiser. 2003. The tumor suppressor p53 and histone deacetylase 1 are antagonistic regulators of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21/WAF1/CIP1 gene. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 2669-2679.
17. Li, H. and X. Wu. 2004. Histone deacetylase inhibitor, Trichostatin A, activates p21WAF1/CIP1 expression through downregulation of c-myc and release of the repression of c-myc from the promoter in human cervical cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324**, 860-867.
18. Li, Y., C. W. Jenkins, M. A. Nichols and Y. Xiong. 1994. Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene* **9**, 2261-2268.
19. Lopatina, N. G., J. C. Poole, S. N. Saldanha, N. J. Hansen, J. S. Key, M. A. Pita, L. G. Andrews and T. O. Tollefsbol. 2003. Control mechanisms in the regulation of telomerase reverse transcriptase expression in differentiating human teratocarcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**, 650-659.
20. Margueron, R., V. Duong, A. Castet and V. Cavailles. 2004. Histone deacetylase inhibition and estrogen signalling in human breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* **68**, 1239-1246.
21. Marks, P. A., V. M. Richon, T. Miller and W. K. Kelly. 2004. Histone deacetylase inhibitors. *Adv. Cancer Res.* **91**, 137-168.
22. Moore, P. S., S. Barbi, M. Donadelli, C. Costanzo, C. Bassi, M. Palmieri and A. Scarpa. 2004. Gene expression profiling after treatment with the histone deacetylase inhibitor trichostatin A reveals altered expression of both pro- and anti-apoptotic genes in pancreatic adenocarcinoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1693**, 167-176.
23. Noh, E. J. and J. S. Lee. 2003. Functional interplay between modulation of histone deacetylase activity and its regulatory role in G2-M transition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **310**, 267-273.
24. Papeleu, P., T. Vanhaecke, G. Elaut, M. Vinken, T. Henkens, S. Snykers and V. Rogiers. 2005. Differential effects of histone deacetylase inhibitors in tumor and normal cells-what is the toxicological relevance? *Crit. Rev. Toxicol.* **35**, 363-378.
25. Roh, M. S., C. W. Kim, B. S. Park, G. C. Kim, J. H. Jeong, H. C. Kwon, D. J. Suh, K. H. Cho, S. B. Yee and Y. H. Yoo. 2004. Mechanism of histone deacetylase inhibitor Trichostatin A induced apoptosis in human osteosarcoma cells. *Apoptosis* **9**, 583-589.
26. Salminen, A., T. Tapiola, P. Korhonen and T. Suuronen. 1998. Neuronal apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **61**, 203-206.
27. Sherr, C. J. 2000. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.* **60**, 3689-3695.
28. Sowa, Y., T. Orita, S. Minamikawa, K. Nakano, T. Mizuno, H. Nomura and T. Sakai. 1997. Histone deacetylase inhibitor activates the WAF1/Cip1 gene promoter through the Sp1 sites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **241**, 142-150.
29. Suzuki, T., H. Yokozaki, H. Kuniyasu, K. Hayashi, K. Naka, S. Ono, T. Ishikawa, E. Tahara and W. Yasui. 2000. Effect of trichostatin A on cell growth and expression of cell cycle- and apoptosis-related molecules in human gastric and oral carcinoma cell lines. *Int. J. Cancer* **88**, 992-997, 2000.
30. Vanhaecke, T., P. Papeleu, G. Elaut and V. Rogiers. 2004. Trichostatin A-like hydroxamate histone deacetylase inhibitors as therapeutic agents: toxicological point of view. *Curr. Med. Chem.* **11**, 1629-1643.
31. Weinberg, R. A. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323-330.
32. Wharton, W., J. Savell, W. D. Cress, E. Seto and W. J. Pledger. 2000. Inhibition of mitogenesis in Balb/c-3T3 cells by Trichostatin A. Multiple alterations in the induction and activation of cyclin-cyclin-dependent kinase complexes. *J. Biol. Chem.* **275**, 33981-33987.
33. Xiao, H., T. Hasegawa and K. Isobe. 1999. Both Sp1 and Sp3 are responsible for p21waf1 promoter activity induced by histone deacetylase inhibitor in NIH3T3 cells. *J. Cell. Biochem.* **73**, 291-302.
34. Xiong, Y., G. J. Hannon, H. Zhang, D. Casso, R. Kobayashi

- and D. Beach. 1993. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366**, 701-704.
35. Yamashita, Y., M. Shimada, N. Harimoto, T. Rikimaru, K. Shirabe, S. Tanaka and K. Sugimachi. 2003. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A induces cell-cycle arrest/apoptosis and hepatocyte differentiation in human hepatoma cells. *Int. J. Cancer* **103**, 572-576.
36. Yoshida, M., R. Furumai, M. Nishiyama, Y. Komatsu, N. Nishino and S. Horinouchi. 2001. Histone deacetylase as a new target for cancer chemotherapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **48 (Suppl 1)**, S20-26.
37. Yoshida, M., M. Kijima, M. Akita and T. Beppu. 1990. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both *in vivo* and *in vitro* by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* **265**, 17174-17179.
38. Yoshida, M., M. Matsuyama, Y. Komatsu and N. Nishino. 2003. From discovery to the coming generation of histone deacetylase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **10**, 2351-2358.