

## Doxorubicin 매개 세포독성에 대한 Nrf2 경로의 역할

조정민 · 박현민 · 곽미경<sup>#</sup>

영남대학교 약학대학

(Received December 21, 2007; Revised February 11, 2008)

### Sensitization to Doxorubicin by Inhibition of the Nrf2-Antioxidant System

Jeong-Min Cho, Hyun-Min Park and Mi-Kyoung Kwak<sup>#</sup>

College of Pharmacy, Yeungnam University, 214-1 Dae-dong, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do 712-749, Korea

**Abstract** — The use of doxorubicin, which is one of the most effective anticancer agents, is often limited by occurrence of acquired resistance in tumor cells. GSH has been shown to be involved in the development of this drug resistance. Transcription factor Nrf2 governs the expression of GSH synthesizing glutamylcysteine ligase (GCL), as well as multiple phase 2 detoxifying enzymes. Here we show that Nrf2 is one of factors determining doxorubicin sensitivity. *Nrf2*-deficient fibroblasts (murine embryonic fibroblasts, MEF) were more susceptible to doxorubicin-mediated cell death than wild-type cells. Doxorubicin treatment elevated levels of Nrf2-regulated genes including NAD(P)H: quinone oxidoreductase (Nqo1) and GCL in wild-type fibroblasts, while no induction was observed in *nrf2*-deficient cells. Doxorubicin resistance in human ovarian SK-OV cells was reversed by treatment with *L*-buthionine-sulfoxamine (BSO), which is depleting intracellular GSH. Finally, transfection of SK-OV cells with Nrf2 siRNA resulted in exacerbated cytotoxicity following doxorubicin treatment compared to scrambled RNA control. These results indicate that the Nrf2 pathway, which plays a protective role in normal cells, can be a potential target to control cancer cell resistance to anticancer agents.

**Keywords** □ chemoresistance, Nrf2, doxorubicin, siRNA

항암약물 요법에 있어 약물내성의 발달은 풀어야 할 문제로 남아 있다. 특히 항암제 중 많은 부분을 차지하는 알킬화성 항암제 등과 같은 산화적 스트레스 유발 관련 물질들의 경우 암세포에서 내성유발은 약물의 사용을 제한하는 주된 요인이다. 이들 약물내성의 분자적 기전으로서 제시되는 것은 약물의 세포내 수송 억제, DNA 수복 활성의 증가, 약물의 해독화 관련 단백질의 증가 및 세포내 약물의 세포 외 배출증가 등이 있다.<sup>1,2)</sup> 이들 중 특히 glutathione(GSH) 등 thiol기 함유 분자의 증가 또는 일군의 해독화 효소의 증가는 산화적 스트레스를 경유하여 암세포를 죽이는 기전을 공유하는 항암제들의 해독을 촉진함으로써 약물에 대한 반응성을 감소시키는 결과를 낳는다.<sup>3,4)</sup> 특히 난소암의 경우 doxorubicin은 cisplatin 등 백금함유 항암제 및 알킬화성 항암제와 흔히 병용되어 사용되나, 빈발하는 약물내성은 이들 항

암제의 적용에 있어 가장 큰 장애로 작용한다. Doxorubicin과 cisplatin에 대한 세포 반응성은 세포 내 GSH 총량과 반비례하는 현상이 보고되고 있다.<sup>3,4)</sup>

Erythroid NF-E2 계열의 bZIP 전사인자인 Nrf2는 small Maf 및 다른 bZIP 단백질과 이중결합체 상태로 다양한 해독화 효소 및 thiol 단백질들의 조절에 관여한다. Nrf2가 동물에서 항산화 단백질 발현에 결정적인 인자라는 사실은 *nrf2* 유전자가 소실된 마우스를 이용한 일련의 연구를 통해 증명되고 있다. 즉 *nrf2* 녹아웃 마우스는 해독화 효소(glutathione S-transferase, NAD(P)H: quinone oxidoreductase)를 포함한 다양한 항산화 효소, thiol 단백질군(thioredoxin, peroxiredoxin), GSH 합성 및 유지 관련 효소(GCL) 및 catalase 등의 유도 발현능을 소실하거나 낮은 반응성을 보인다는 사실이 증명되고 있다.<sup>5,6)</sup> Nrf2에 결합하여 핵내로의 이동을 막고 동시에 proteasome 시스템에 의한 분해를 촉진함으로써 Nrf2의 억제 단백질로 기능을 하는 Keap1은 Nrf2 전사인자의 기능 조절하는 억제 단백질이다. 즉 *Keap1* 유전자가 소실된 마우스는 정상보다 많은 Nrf2 단백질을 축적하고 있으며

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 053-810-2823 (팩스) 053-810-4654  
(E-mail) mkwak@yumail.ac.kr

그에 따라 Nrf2 타겟의 항산화 단백질들의 발현 수준이 정상 마우스보다 현저히 많다는 사실이 밝혀져 있다.<sup>7,8)</sup> 현재 Nrf2는 항산화 시스템의 유지 및 스트레스 상황에서의 증가를 주도함으로써 정상세포에서는 환경성 위해 물질의 해독 기능을 담당하고 산화적 스트레스 상황에서 세포보호에 있어 주된 기능을 담당하는 것으로 받아들여지고 있다.<sup>6,9,10)</sup> 그러나 암세포에서 Nrf2 증가 현상은 하위 해독화 시스템의 증가를 이끌고 항암제 내성을 유발하는 인자로 작용할 가능성이 제기되고 있다. 특히 최근 사람의 폐암조직 및 세포주를 대상으로 행한 연구결과 이들 세포에서 Keap1 유전자의 체세포 돌연변이가 높은 빈도로 발견되었으며 이들 돌연변이는 Keap1 단백질의 Nrf2에 대한 억제적 기능 소실로 이어질 수 있다는 사실이 보고된 바 있다.<sup>11,12)</sup> 즉 이러한 보고는 암세포가 보여주는 항암제에 대한 노출을 포함하는 주변 스트레스 환경에 대한 생존능이 Nrf2 시스템의 증가현상과 관련이 있음을 시사하고 있다. 따라서 암세포에서 Nrf2의 기능적인 억제가 암세포의 항암제 내성을 감소시킬 수 있는 새로운 방법이 될 수 있음이 기대된다. 본 연구에서는 항암제 내성과 Nrf2 시스템과의 관계를 증명하기 위하여 Nrf2의 유전적 또는 기능적 억제가 항암제에 대한 세포 반응을 어떻게 변화시키는지 살펴 보았다. 이를 위하여 anthracycline 계열의 항암제인 doxorubicin에 대한 세포생존을 정상 및 Nrf2 녹아웃 마우스에서 유래한 fibroblast 및 사람의 난소암 세포주에서 각각 살펴보았다. Doxorubicin에 대한 세포생존은 GSH 소실상태 및 Nrf2 기능 억제 시 감소하였으며 이는 doxorubicin 처치에 따른 해독화 시스템의 증가에서 기인할 가능성이 있다. Doxorubicin 처치로 정상 MEF에서는 GSH 생성 효소와 Nqo1의 발현증가 현상이 관찰되었으나 Nrf2 녹아웃 MEF에서는 이러한 해독화 효소 증가현상의 결핍과 함께 doxorubicin에 대한 낮은 생존률이 관찰되었다. 또한 doxorubicin에 대해 높은 저항성을 보이는 난소암 세포주인 SK-OV-3 세포에 Nrf2 siRNA의 도입은 doxorubicin에 대한 감수성을 증가시켰다. 이러한 결과는 Nrf2의 선택적인 억제가 항암제 투여에 대해 감수성을 증가시키기 위한 새로운 방법으로 제시하고 있다.

## 재료 및 방법

### 시약

Doxorubicin, L-buthionine-[S,R]-sulfoximine(BSO)를 Sigma사에서 구입을 하였으며, Ambion사를 통해 Nrf2 siRNA와 negative control siRNA를 구입하였다.

### 세포배양

Nrf2 유전자가 소실된 마우스 태아에서 유래한 fibroblast (MEF: murine embryonic fibroblast) 세포와 정상 세포를 10%

fetal bovine serum, 4 mM L-glutamine, HEPES 그리고 1% penicillin/streptomycin 조성을 가진 IMDM 배지를 Hyclone사에서 구입해 T-flask에서 배양하였다.<sup>13)</sup> SK-OV-3 난소암 세포주는 한국 세포주 은행에서 분양 받아 L-glutamine, HEPES, 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin 조성을 가진 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 이들 각 세포에 doxorubicin과 BSO를 처치하고 세포생존 및 유전자 발현수준을 비교하였다.

### 세포 생존율 측정(MTT assay)

MEF와 SK-OV 세포를  $5 \times 10^3$  cells/well의 농도로 96well plate에서 24시간 동안 배양하였다. Doxorubicin을 24시간 동안 처리한 뒤 70  $\mu$ l의 MTT 용액(2 mg/ml)을 각각의 well에 가하고 4시간 동안 배양했다. MTT 용액을 제거한 뒤, 100  $\mu$ l의 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 가하고 Versamax microplate reader(Sunnyvale, CA, U.S.A.)를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.<sup>14)</sup>

### RNA 추출 및 RT-PCR 분석

Doxorubicin(0.5, 1.0  $\mu$ M)을 24시간 동안 반응시킨 후 Trizol (Invitrogen) 용액을 이용해 RNA를 추출하였다. cDNA를 합성하기 위해서 100 ng/20  $\mu$ l 농도의 RNA를 사용하였으며 생성된 cDNA를 이용하여 PCR분석을 수행하였다. PCR은 30s-95°C, 30s-56°C and 40s-72°C에서 27~30 cycles의 조건으로 이루어졌다. 다음과 같은 primer들을 Integrated DNA Technology사(Coralville, Iowa)와 Bioneer사(Daejeon, South Korea)를 통해 합성하여 사용하였다. Catalytic subunit of mouse GCL(GCLC), 5'-ATGATGCCAACGAGTCTGAC-3', 5'-CGCCTTTGCAGATGTCTTTC-3'; modifier subunit of mouse GCL(GCLM), 5'-AGGAGCTTCGGGACTGTATT-3', 5'-TGGGCTTCAATGT-CAGGGAT-3'; mouse glutathione reductase(GR), 5'-GGCAT-GATAAGGTACTGAGA-3', 5'-TTCGTCTACTAGGATGTGGC-3'; mouse Nqo1, 5'-ATCCTCCGAGTCATCTCTA-3', 5'-CAACGAATCTTGAATGGAGG-3'; mouse beta-actin, 5'-GCA-GAAGGAGATTACTGCTC-3', 5'-CTAGAAGCACTTGCGGT-GCA-3'; human Nqo1, 5'-GATATTGTGGCTGAACAA-3', 5'-TGCTATATGTCAGTTGAG-3'; human GCLC, 5'-AGACAT-TGATTGTCGCTG-3', 5'-TGGTCAGACTCATTAGCA-3'. Visi Doc-It<sup>TM</sup> Imaging system을 이용하여 이미지를 얻었다.

### 난소암 세포에 Nrf2 siRNA의 도입

Nrf2의 siRNA(5'-GCUUUUGGCGCAGACAUCt-3' 및 5'-GAAUGUCUGCGCCAAAAGCt-3')를 AMBION사를 통해서 구입하였다. 6 well에  $1.5 \times 10^4$  cells/well의 농도로 SK-OV 암세포를 항생제가 없는 배지에서 24시간 동안 배양한 뒤,

Lipofectamine™2000 reagents(Invitrogen)를 이용해서 siRNA를 도입했다. 5  $\mu$ l의 siRNAs를 Opti-MEM I Reduced Serum Medium(Invitrogen) 250  $\mu$ l에 희석하여, 5  $\mu$ l의 Lipofectamine이 포함된 희석 용액과 섞은 뒤 20분간 배양하였다. 각각의 well에 2 ml의 Opti-MEM I 배지가 있는 상태에서, 500 ml의 Transfection mixture를 가해 72시간 또는 96시간 반응시켰다. Transfection 후 배지를 제거 후 세포주의 일반배지를 가하여 8시간 안정화시킨 후 RNA를 추출 또는 doxorubicin을 처치하였다.

## 실험결과 및 고찰

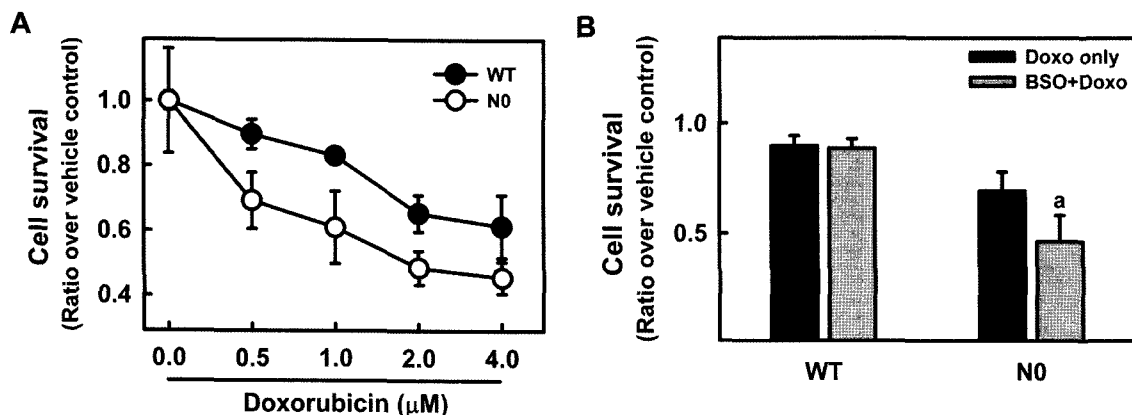
### Nrf2 유전자의 소실로 인한 doxorubicin에 대한 감수성 증가현상

Doxorubicin은 혈액암 및 고형암에 널리 사용되는 강력한 세포독성을 보여주는 항암제이다.<sup>15)</sup> 특히 난소암의 경우 doxorubicin은 cisplatin 등 백금함유 항암제 및 알킬화성 항암제와 흔히 병용되어 사용된다. 그러나 이러한 처치방법에 대해 빈발하는 약물내성은 이들 항암제의 적용에 있어 가장 큰 장애로 작용한다. 본 연구에서는 doxorubicin이 유발하는 세포독성에 대한 Nrf2의 작용을 알아보기 위해서, 정상 및 Nrf2 유전자가 소실된 마우스에서 유래한 MEF(murine embryonic fibroblasts) 세포를 이용하였다. MTT 측정법을 통해서 두 종류의 세포 생존율을 살펴본 결과 doxorubicin(0.5, 1.0, 2.0, 4.0  $\mu$ M)을 24시간 동안 처치 시 Nrf2 소실 세포(N0)는 정상세포에 비해 낮은 세포 생존율을 나타냈다(Fig. 1A). 즉 측정된 IC<sub>50</sub> 값을 비교하였을 때, 정상세포는 1.04  $\mu$ M의 IC<sub>50</sub> 값을 가지는 한편 N0 세포는 0.59  $\mu$ M의 IC<sub>50</sub> 값을 가지는 것으로 나타났다. Doxorubicin에 대한 약물내성이 세포 내 GSH 양과 깊은 연관성을 가진다는 것은 주지의 사실이다. Nrf2는 GSH 수준을 조절하는 생합성 효소(GCL) 및 재생효

소(glutathione reductase)의 발현을 조절하는 전사인자로 알려져 있다. 이러한 이유로 N0 세포에서는 세포 내 총 GSH 양이 정상세포의 40% 수준임을 이전결과에서 관찰한바 있다.<sup>16)</sup> 따라서 N0 세포가 보여주는 doxorubicin에 대한 낮은 세포 생존율은 GSH 양의 감소와 관계가 있을 가능성이 있다. 다음에는 세포 내 GSH 양의 감소가 doxorubicin 독성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 정상 및 N0 세포에 BSO를 전처리 후 doxorubicin 독성을 관찰하였다. BSO는 GSH 생합성 효소인 GCL의 효소저해제로서 GSH의 생합성을 차단하여 고갈시키는 작용을 이끌어 doxorubicin 등의 항암제 적용 시 약물내성을 완화시키는 chemosensitizer로서 사용되기도 한다. BSO를 12시간 전처리 한 뒤 doxorubicin을 반응시킨 결과 doxorubicin 단독 투여군에 비해 30% 낮아진 세포생존율이 N0 MEF에서 확인되었다(Fig. 1B). 이러한 결과는 정상세포에서는 BSO 전처리가 doxorubicin에 의한 세포 생존율에 차이를 나타내지 않는 것과 대조된다(Fig. 1B). 즉 Nrf2 유전자의 소실로 인해서 GSH 생합성 능력에 한계가 있는 것으로 보이며, 부족한 GSH 양은 doxorubicin에 의해 유발되는 세포독성에 대항하여 세포가 효율적인 해독화 과정을 거치지 못하게 함으로써 낮은 세포 생존율을 보이는 것으로 판단된다.

### Doxorubicin 투여와 Nrf2 하위 유전자들의 발현

앞서 N0 세포에서 관찰된 doxorubicin에 대한 낮은 세포 생존율은 doxorubicin의 세포 내 해독화 관련 효소들의 유도 발현능과 관계 있을 가능성이 제기된다. Doxorubicin은 quinone 모핵을 포함하는 anthracycline 계열의 항암제로서 암세포에서 나타내는 세포독성 기전 중 하나는 활성산소균 생성증가에 의한 작용으로 설명된다. 즉 doxorubicin에 의한 산화적 스트레스 상태가 Nrf2 경로를 증가시키고 이러한 현상이 후천적인 약물내성 발달에 기



**Fig. 1** – Cell survival measured in wild-type and *nrf2*-disrupted cells following treatment with BSO and doxorubicin. (A) MEF cells from wild-type (WT) and *nrf2*-disrupted (N0) mice were maintained in medium containing 10% FBS for 24 h. and followed by incubation with doxorubicin (0.5, 1, 2, and 4  $\mu$ M) for 24 h. Cell survival was monitored by MTT analysis. Values are mean $\pm$ SD from 8 measurements. (B) Wild-type (WT) and *nrf2*-disrupted cells (N0) were pretreated with 0.5 mM of BSO for 12 h and followed by incubation with doxorubicin. (Doxo, 1.0  $\mu$ M) for 24 h. Surviving cell numbers were measured by MTT analysis. Values are mean $\pm$ SD from 8 measurements. <sup>a</sup>,  $P < 0.05$  compared with doxorubicin only group.

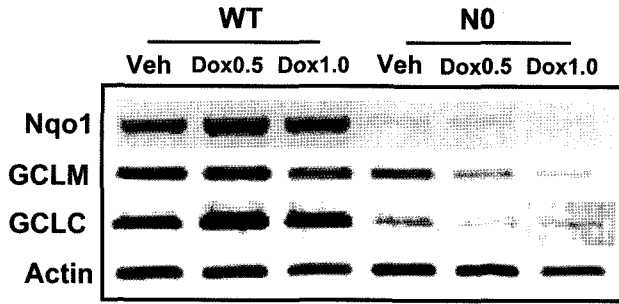


Fig. 2 – Doxorubicin treatment elevated the expression of Nrf2-regulated genes in wild-type cells. (A) MEF cells from wild-type (WT) and *nrf2*-disrupted (N0) mice were incubated with vehicle or doxorubicin (Doxo, 0.5 and 1.0  $\mu$ M) for 24 h. Transcript levels for Nqo1, GCLC, GCLM, and beta-actin were monitored by RT-PCR analysis.

여할 가능성이 있다. 이러한 가능성을 확인하기 위하여 doxorubicin을 처치 후 정상 및 N0 세포에서 Nrf2에 의해 조절되는 Nqo1 및 GSH 생성 효소의 mRNA 수준을 RT-PCR 분석법을 통해 측정하였다. 그 결과 정상세포에서는 doxorubicin을 24시간 동안 반응시켰을 때 Nqo1과 GCLC 발현이 증가하는 현상을 이 끌었으나 N0 세포에서는 관찰되지 않았다(Fig. 2). 이러한 결과는 Nrf2가 소실로 인해 세포는 doxorubicin에 대한 방어체계 즉 GSH 생합성 증가 및 quinine 해독화 효소 Nqo1의 발현 증가능을 잃게 되고 따라서 doxorubicin에 대해 낮은 저항성을 보이게 되는 것으로 해석된다. 또한 약물의 반복적인 투여와 함께 나타나 문제시 되는 후천적인 약물내성의 발달의 기전 중 doxorubicin 투여에 의한 Nrf2 경로 증가와 동반되는 해독화 시스템의 증가 현상이 기여할 가능성을 제시하고 있다.

#### 사람의 난소암 세포주에서의 약물 내성과 GSH의 역할

사람의 난소암 세포주인 SK-OV 세포는 세포 내 GSH의 양은 MEF 세포보다 25배 정도 높은 것으로 나타난 바 있다.<sup>16)</sup> SK-OV 세포 내 증가한 GSH 양은 다양한 외인성 스트레스에 대해 암세포주가 높은 세포 저항성을 가지게 되는 원인 중 하나로 생각되며 특히 세포독성 유발 항암제에 대해서도 역시 저항성을 나타낼 것으로 예측할 수 있다. 실제로 SK-OV 세포는 cisplatin 및 doxorubicin 등에 대해 매우 높은 내성을 가지고 있다.<sup>16)</sup> SK-OV 세포가 가지는 높은 농도의 GSH가 doxorubicin에 대한 약물 내성기전을 유발하는 인자로 작용하는지 확인하기 위해 먼저 BSO를 전처리 후 doxorubicin을 24시간 동안 반응시키고 세포 생존율을 MTT 분석을 통해 관찰하였다. 실험 결과 doxorubicin 40  $\mu$ M을 BSO 전처리 후 반응시킨 경우 단독 투여에 비해 doxorubicin에 대해 50% 이상 높은 감수성을 보여주었다(Fig. 3). 이러한 결과는 SK-OV 세포 내의 GSH 수준이 doxorubicin의 해

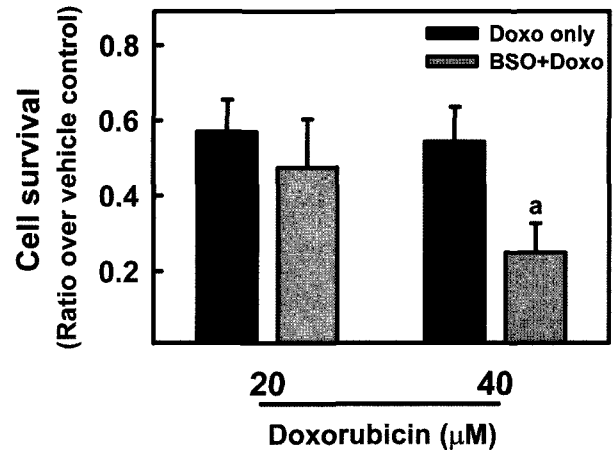
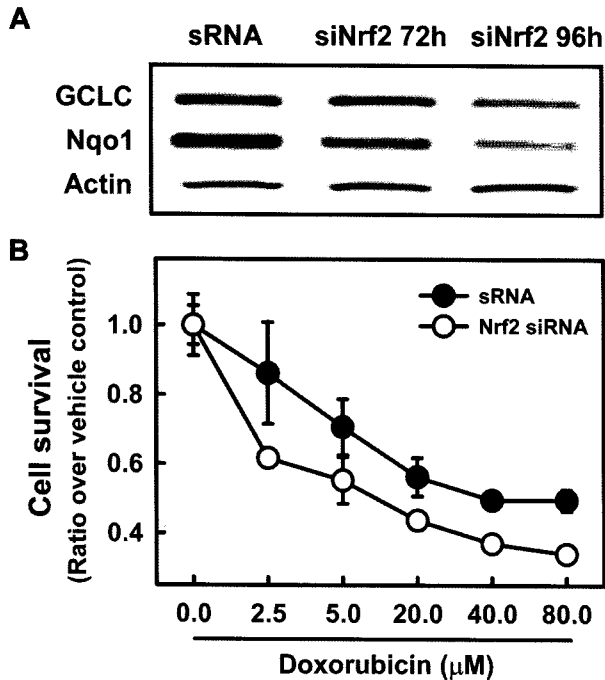


Fig. 3 – Resistance of human ovarian cancer SK-OV cells to doxorubicin is associated with cellular levels of GSH. SK-OV cancer cells were pretreated with vehicle or BSO (0.5 mM) for 16 h and then incubated with doxorubicin (20 and 40  $\mu$ M) for 24 h. Surviving cell numbers were determined by MTT assay. Values are mean  $\pm$  SD from 8 measurements. <sup>a</sup>  $P < 0.05$  compared with doxorubicin only group.

독화에 관여함으로써 doxorubicin 감수성을 지배하는 중심적인 인자임을 확인하는 것이다.

#### Nrf2의 기능적 억제를 통한 doxorubicin에 대한 감수성 증가 현상

Nrf2는 GSH 생합성 효소의 구성효소인 GCLC의 상위조절인자로 알려져 있으며, 앞서 GCLC의 낮은 수준과 함께 소실된 유도 발현능으로 인해 N0 세포는 정상세포와 비교하였을 때 doxorubicin에 대해 낮은 세포 생존율을 나타냄을 확인하였다. 다음으로는 실제 SK-OV 세포에서도 Nrf2가 doxorubicin에 대한 감수성을 조절하는 인자로 작용할 수 있는지 확인하기 위하여 Nrf2의 기능적인 억제 시스템을 도입하였다. Nrf2의 기능적 억제는 Nrf2 siRNA 도입을 통하여 시도되었다. SK-OV 세포에 대조군 RNA(scrambled RNA) 및 Nrf2 siRNA를 72 또는 96시간 동안 transfection 시켜 Nrf2 및 하위경로를 억제하고자 하였다. 그 결과 두 시간대에서 Nrf2 mRNA 수준 및 하위 GCLC와 Nqo1 수준이 대조 RNA군에 비해 현저히 감소되어 있음을 관찰하였다(Fig. 4A). 각기 다른 transfection 시간에 대해 억제효과를 비교하였을 때 96시간 동안 transfection 시킨 경우 Nqo1과 GCLC의 발현이 현저히 감소하였다. 이와 함께 세포 내 GSH 양은 Nrf2 siRNA 도입으로 인하여 30% 정도 감소하였다(Data not shown). 이러한 결과는 Nrf2 siRNA 도입 방법이 효과적으로 Nrf2 경로를 억제하는 방법이 될 수 있음을 확인하고 있다. 다음으로 대조군 세포 및 Nrf2 기능이 억제된 세포에 doxorubicin을 처치하고 나타내는 세포독성을 생존율을 측정함으로써 알아보았다. 먼저



**Fig. 4** – SK-OV cells can be sensitized to doxorubicin by transfection of Nrf2 siRNA. (A) SK-OV cells were transfected with scrambled siRNA (sRNA) or Nrf2 siRNA (siNrf2) for 72 or 96 h and total RNAs were extracted. Transcript levels for Nqo1, GCLC, and beta-actin were measured by using RT-PCR analysis. (B) SK-OV cells were transfected with scrambled siRNA (sRNA) or Nrf2 siRNA (siNrf2) for 96 h and stabilized for 12 h. Cells were incubated with vehicle or doxorubicin (2.5, 5.0, 20, 40, and 80  $\mu$ M) for 24 h. The number of surviving cells was measured by MTT assay. Values are mean  $\pm$  SD from 8 measurements.

SK-OV 세포는 doxorubicin에 대해 매우 높은 저항성을 나타내 148.21  $\mu$ M의 IC<sub>50</sub> 값을 보였다(data not shown). Nrf2 siRNA를 도입하여 Nrf2 및 하위 유전자의 mRNA 발현을 억제 시킨 상태에서는 doxorubicin에 대한 세포독성의 IC<sub>50</sub> 값이 1.53  $\mu$ M이었으나, 반면에 대조 RNA가 도입된 세포에서의 IC<sub>50</sub> 값은 10.49  $\mu$ M이었다(Fig. 4B). SK-OV 세포에 scrambled RNA를 도입하는 처치 자체가 doxorubicin에 대한 IC<sub>50</sub> 값을 유의성 있게 변화시키는 결과를 보였는데 이는 세포에 96시간 동안 transfection reagent를 처치하는 반응 과정에서 상당량의 GSH을 소실시키기 때문으로 사료된다. 결과적으로 본 실험을 통하여 암조직에서 흔하게 발견되는 doxorubicin에 대한 내성이 Nrf2 경로를 억제함으로써 조절될 가능성을 확인할 수 있었다.

## 결론

Nrf2 경로는 세포가 산화적 스트레스에 대응하여 방어시스템을 증가시키는데 있어 핵심적인 기능을 담당하고 있다. 따라서

Nrf2 경로는 정상세포에 대해서는 내인성 및 외인성 산화적 스트레스 유발 인자에 대하여 생존을 촉진함으로써 조직을 보호하고 발암을 조절하는데 기여한다.<sup>6,9,10</sup> 그러나, 최근의 몇몇 보고에서 보여주듯이 종양조직에서 Nrf2 경로 증가현상이 나타나고 이것이 암세포의 생존능에 관여할 가능성을 배제할 수 없다. 특히 Nrf2의 세포질 내 억제 단백질인 Keap1의 돌연변이가 현상이 사람의 폐암조직 및 암세포주에서 확인된 바 있다.<sup>11,12</sup> 현재 이들 Keap1 단백질의 체세포 돌연변이는 결과적으로 Nrf2 억제 기능 수행에 결함을 유도하는 것으로 해석되고 있으며, 따라서 Nrf2 단백질이 핵 내에 축적되어 있는 과발현 상태를 이끄는 것으로 제시되고 있다. 또한 다른 그룹의 결과에서도 head and neck squamous cell carcinoma(HNSCC) 조직에서 Nrf2 발현 수준이 증가해 있다는 사실을 보고한 바 있다.<sup>17</sup> 단순한 관련 인자의 돌연변이가 현상 외에도 암세포에서 비정상적으로 증가하는 내인성 Nrf2 활성인자들이 Nrf2 경로를 과도하게 증가시킬 가능성 역시 제시된다. 이전연구에서 암세포에서 흔히 증가하여 암세포의 성장을 촉진하는 세포 대사체인 spermine, spermidine 등의 polyamine 류들이 배양세포 조건에서 Nrf2 활성화 작용을 가지는 acrolein으로 대사될 가능성이 제시된 바 있다.<sup>18</sup> 이러한 결과는 암세포에서 특징적으로 증가하는 대사체들이 Nrf2 하위 항산화 단백질들의 적극적 증가에 관여하고 암세포의 생존에 원인으로 작용할 가능성을 역시 제시하고 있다. 종양조직에서 증가한 Nrf2 경로는 상대적으로 산화적 스트레스가 심한 상태인 암세포가 생존을 도모하고 각종 세포독성 유발 항암제 노출에 대해 그 해독화를 촉진함으로써 약물내성에 관여할 가능성이 높다. 이러한 보고에 비추어 종양조직에서 선택적으로 Nrf2 경로를 억제하는 방법은 암세포의 생존을 방해함과 함께 항암제에 대한 감수성을 증가시키는 효과적인 방법이 될 수 있을 것으로 사료된다. 본 연구결과는 매우 효과적이지만 약물내성으로 인한 사용의 제약이 문제시되는 doxorubicin의 세포독성 작용에 대해 Nrf2 경로의 억제가 doxorubicin 세포독성을 증가시킬 수 있는 방법이 될 수 있음을 증명하고 있다. 암세포에서 과도하게 발현될 가능성이 높은 Nrf2 및 하위 항산화/해독화 단백질의 발현을 억제하고 유도발현을 차단하는 방법은 doxorubicin에 대해 암세포가 매우 취약한 상태를 이끌고 세포사를 이끌 것으로 기대된다. 이는 기존에 이미 chemosensitizer로서 사용되는 BSO의 경우 다양한 암세포 내 보완경로 발달에 의해 역시 내성이 생기는 문제에 비교하여 다변화 인자를 공통으로 조절하는 master 인자를 억제하는 방법을 취함으로써 내성발달에 있어서도 잇점을 보일 가능성이 기대된다.<sup>19,20</sup> 결론적으로 본 연구는 항암제 약물내성을 조절할 수 있는 표적으로서 Nrf2를 제시하며, 암세포에서 억제된 Nrf2 경로는 산화적 스트레스 환경, 항암제 노출 및 방사선요법 등에서 효과적으로 세포사를 이끌 것으로 기대된다.

## Abbreviations

NAD(P)H:quinine oxidoreductase 1, Nqo1; GCL, glutamate cysteine ligase catalytic subunit; GCLC, glutamate cysteine ligase modifier subunit, GCLM; L-buthionine-sulfoxamine, BSO; 5',5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), DTNB; 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT; Antioxidant Response Element, ARE; Multi-drug Resistance Proteins, MRP

## 감사의 말씀

이 논문은 2007년도 정부(과학기술부)의 재원으로 한국과학재단의 지원을 받아 수행된 연구임(R01-2007-000-10890-0).

## 문헌

- 1) Brozovic, A. and Osmak, M. : Activation of mitogen-activated protein kinases by cisplatin and their role in cisplatin-resistance. *Cancer Lett.* **251**, 1 (2007).
- 2) Siddik, Z. H. : Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene.* **22**, 7265 (2003).
- 3) Kartalou, M. and Essigmann, J. M. : Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res.* **478**, 23 (2001).
- 4) Fojo, T. and Bates, S. : Strategies for reversing drug resistance. *Oncogene.* **22**, 7512 (2003).
- 5) Kobayashi, M. and Yamamoto, M. : Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid Redox Signal.* **7**, 385 (2005).
- 6) Kensler, T. W., Wakabayashi, N. and Biswal, S. : Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **47**, 89 (2007).
- 7) Wakabayashi, N., Itoh, K., Wakabayashi, J., Motohashi, H., Noda, S., Takahashi, S., Imakado, S., Kotsuji, T., Otsuka, F., Roop, D. R., Harada, T., Engel, J. D. and Yamamoto, M. : Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. *Nat. Genet.* **35**, 238 (2003).
- 8) Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J. D. and Yamamoto, M. : Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* **13**, 76 (1999).
- 9) Kwak, M. K., Wakabayashi, N. and Kensler, T. W. : Chemoprevention through the Keap1-Nrf2 signaling pathway by phase 2 enzyme inducers. *Mutat. Res.* **555**, 133 (2004).
- 10) Cho, H. Y., Reddy, S. P. and Kleeberger, S. R. : Nrf2 defends the lung from oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* **8**, 76 (2006).
- 11) Singh, A., Misra, V., Thimmulappa, R. K., Lee, H., Ames, S., Hoque, M. O., Herman, J. G., Baylin, S. B., Sidransky, D., Gabrielson, E., Brock, M. V. and Biswal, S. : Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLoS Med.* **3**, e420 (2006).
- 12) Padmanabhan, B., Tong, K. I., Ohta, T., Nakamura, Y., Scharlock, M., Ohtsuji, M., Kang, M. I., Kobayashi, A., Yokoyama, S. and Yamamoto, M. : Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer. *Mol. Cell.* **21**, 689 (2006).
- 13) Kwak, M. K., Wakabayashi, N., Greenlaw, J. L., Yamamoto, M. and Kensler, T. W. : Antioxidants Enhance Mammalian Proteasome Expression through the Keap1-Nrf2 Signaling Pathway. *Mol. Cell Biol.* **23**, 8786 (2003).
- 14) Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, J. B. : Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**, 936 (1987).
- 15) Lewandowicz, G. M., Britt, P., Elgie, A. W., Williamson, C. J., Coley, H. M., Hall, A. G. and Sargent, J. M. : Cellular glutathione content, *in vitro* chemoresponse, and the effect of BSO modulation in samples derived from patients with advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* **85**, 298 (2002).
- 16) Cho, J. M., Manandhar, S., Lee, H. R., Park, H. M. and Kwak, M. K. : Role of the Nrf2-antioxidant system in cytotoxicity mediated by anticancer cisplatin: Implication to cancer cell resistance. *Cancer Lett.* **260**, 96 (2008).
- 17) Stacy, D. R., Ely, K., Massion, P. P., Yarbrough, W. G., Hallahan, D. E., Sekhar, K. R. and Freeman, M. L. : Increased expression of nuclear factor E2 p45-related factor 2 (NRF2) in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck.* **28**, 813 (2006).
- 18) Kwak, M. K., Kensler, T. W. and Casero, R. A. Jr. : Induction of phase 2 enzymes by serum oxidized polyamines through activation of Nrf2: effect of the polyamine metabolite acrolein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **305**, 662 (2003).
- 19) Rappa, G., Gamcsik, M. P., Mitina, R. L., Baum, C., Fodstad, O. and Lorico, A. : Retroviral transfer of MRP1 and gamma-glutamyl cysteine synthetase modulates cell sensitivity to L-buthionine-S,R-sulphoximine (BSO): new rationale for the use of BSO in cancer therapy. *Eur. J. Cancer.* **39**, 120 (2003).
- 20) Iida, T., Kijima, H., Urata, Y., Goto, S., Ihara, Y., Oka, M., Kohno, S., Scanlon, K. J. and Kondo, T. : Hammerhead ribozyme against gamma-glutamylcysteine synthetase sensitizes human colonic cancer cells to cisplatin by down-regulating both the glutathione synthesis and the expression of multidrug resistance proteins. *Cancer Gene Ther.* **8**, 803 (2001).