약학회지 제 55 권 제 6 호 466~472 (2011)
*Yakhak Hoeji* Vol. 55, No. 6

藥學會誌

# Nrf2 영구 넉다운 난소암 세포주의 Proteasome 저해 항암제 Bortezomib에 대한 감수성 증가

이상환† · 최보현† · 곽미경*,#
영남대학교 약학대학, *가톨릭대학교 약학대학
(Received September 30, 2011; Revised November 9, 2011; Accepted November 18, 2011)

# Enhanced Sensitivity to Proteasome Inhibitor Bortezomib in Nrf2 Knockdown Ovarian Cancer Cells

Sanghwan Lee†, Bo-Hyun Choi† and Mi-Kyoung Kwak*,#
*Yeungnam University, College of Pharmacy, Gyeongsan-si 712-749, Korea*
**The Catholic University of Korea, College of Pharmacy, Bucheon 420-743, Korea*

**Abstract** — NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a master regulator of antioxidant genes in animals, has been associated with the resistance of cancer cells to several cytotoxic chemotherapeutics. Bortezomib, a reversible inhibitor of the 26S proteasome, is a novel class anti-cancer therapeutics approved for the treatment of refractory multiple myeloma. However, the molecular mechanism of drug-resistance remains elusive. In the present study, bortezomib sensitivity has been investigated in Nrf2 knockdown ovarian cancer cells. When Nrf2 expression is stably repressed using interfering RNA expression, bortezomib-induced apoptosis and cell death were significantly enhanced compared to nonspecific RNA control cells. Knockdown cells showed elevated expression in the catalytic subunit PSMB5, PSMB6, and PSMB7 compared to the control, and failed to induce heme oxygenase-1 expression following bortezomib treatment. These indicate that differential proteasome levels and altered expression of stress-response genes could be underlying mechanisms of bortezomib sensitization in Nrf2-inhibited ovarian cancer cells.

**Keywords** □ Bortezomib, 26S proteasome, Nrf2, PSMB5, Ovarian cancer

26S proteasome계는 세포 내 단백질 분해 및 제거에 핵심적인 역할을 담당하여 세포의 생존, 세포주기, DNA 손상 복구, 단백질 합성 조절 등 세포 생리 및 기능유지에 중요한 기능을 담당한다. 26S proteasome은 19S 및 20S proteasome으로 구성되는데, 19S proteasome은 ubiquitin으로 표식된 단백질을 인식하고 3차 구조를 풀어 20S proteasome 으로의 진행을 가능케 한다.[1,2] 원통형 구조를 가지는 20S proteasome은 내부에 chemotrypsin-, caspase- 및 trypsin-유사 효소활성을 담당하는 catalytic subunit인 PSMB5, PSMB6 및 PSMB7을 포함하며 19S proteasome을 통해 들어온 단백질을 분해하는 역할을 담당한다. 따라서 proteasome 계를 타겟으로 하는 저해제에 노출된 세포는 세포주기 관련 단백질 및 전사인자들의 적절한 분해가 이루어지지 않아 정상 세포생리를 상실하게 되며, 과도하게 축적된 단백질들로 인한 세포독성 및 세포사멸을 나타낸다.[3] 이러한 proteasome의 기능에 근거하여 Millennium Pharmaceuticals에서 개발한 bortezomib는 20S proteasome 효소활성의 rate-limiting 단계를 담당하는 PSMB5에 대한 가역적인 저해제로서 지난 2006년 새로운 계열의 항암제로서 승인되어 다발성 골수종을 중심으로 사용되고 있다.[4,5] 그러나 최근 연구결과들은 bortezomib가 투여된 대다수의 환자에서 내성이 발달되며 경우에 따라 치료를 중단해야 할 정도로 심각함을 보고하고 있다. 몇몇 보고들은 이러한 내성이 bortezomib의 저해 타겟인 PSMB5의 발현 수준과 관계할 가능성을 보여준 바 있으나, 감수성을 결정하는 인자에 대한 정확한 분자적 기전은 알려진 바가 없다.[6,7]

Erythroid NF-E2 계열의 bZIP 전사인자인 Nrf2는 자극을 받지 않는 세포에서 세포질 내 존재하는 Keap1 단백질에 결합되어 26S proteasome 계를 통하여 분해됨으로써 낮은 수준 및 활

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-2164-6532 (팩스) 02-2164-4059
(E-mail) mkwak@catholic.ac.kr
†Co-first authors: 이상환, 최보현

성을 유지한다. 반면 자극을 받는 상태에서 Nrf2는 Keap1으로부터 분리되어 핵 내로 이동하고 small Maf 등의 타 bZIP 단백질과 함께 다양한 유전자 프로모터 상의 antioxidant response element(ARE)에 결합한다.[8-10] ARE의 활성화를 통해 발현이 증가하는 유전자군은 catalase 및 glutathione(GSH) peroxidase 등 활성산소종 제거 효소들, GSH 및 thioredoxin(TXN) 등 thiol 함유인자들, NAD(P)H: quinine oxidoreductase-1(NQO1) 및 glutathione-S-transferases(GSTs) 등 약물 해독화 효소들을 포함한다.[11,12] Nrf2를 통한 이들 하위 유전자군들의 발현증가로 인해 세포는 다양한 친전자성 물질 및 활성산소종들을 빠르게 제거하고 세포 내 환원능을 유지하여 환경성 유해인자들로부터 보호될 수 있는 자체 방어기전을 획득하는 것으로 해석된다. 그러한 최근의 몇몇 연구들은 Nrf2 시스템이 암세포의 항암제 저항성 및 증식촉진에 기여함으로써 부정적으로 측면을 가짐을 보여주고 있다.[13] 이러한 결과는 당초 암세포 및 종양 조직을 대상으로 수행된 Nrf2 및 Keap1의 유전자 변이 분석과정에서 제시되었다. 즉 몇몇 폐암세포주 및 폐암의 종양 조직에서는 Keap1의 체세포돌연변이가 발견되었고 이러한 변이가 Nrf2를 억제하는 Keap1의 기능을 소실시킴으로써 Nrf2의 과도한 활성화 현상을 야기함이 확인되었다.[14,15] 이후 여러 연구들을 통하여 암세포에서 증가한 Nrf2 활성이 세포독성 항암제의 해독화에 관여하는 GSH 양의 증가를 이끌고 GST 등 해독화 효소 발현 증가를 통해 항암제 내성을 유발할 수 있음이 보여졌다.[16-19] 이러한 보고들은 암세포의 항암제 내성을 조절할 수 있는 타겟으로서 Nrf2 시스템이 제시될 수 있음을 제시한다.

본 연구에서는 새로운 그룹의 항암제로서 대두되는 proteasome 저해제인 bortezomib에 대한 암세포 반응성에서 Nrf2 시스템의 역할을 살펴보았다. 즉 간섭 RNA 도입기법을 이용하여 난소암 세포주인 SK-OV3에 비특이적 shRNA 또는 Nrf2 특이적인 shRNA를 발현시켜 영구 세포주를 얻고 이들 세포가 나타내는 bortezomib 반응성을 비교하였다. 연구 결과 Nrf2가 영구적으로 억제된 난소암 세포주는 bortezomib에 대해 대조군에 비해 더 높은 정도의 세포독성 및 세포사멸 현상을 나타냄을 확인하였다. Proteasome 구성인자들의 발현 정도를 분석한 결과 Nrf2 넉다운 난소암 세포주에서 PSMB5를 비롯한 subunit 발현이 대조군에 비해 높음이 확인 되었으며, bortezomib 처치 후 heme oxygenase-1(HO-1)의 발현증가 현상이 대조군에서와 달리 넉다운 세포에서 소실됨을 관찰하였다.

## 실험방법

### 시약

Bortezomib(PS-341)는 Selleckchem사(TX, USA)에서 구입하였다. 세포배양을 위한 배지 및 시약들은 Chembrex사(MD, USA) 또는 Hyclone사(Utah, USA)에서 구입하였으며, RT-PCR 분석용 시약 및 효소들은 Invitrogen사(CA, USA) 및 Epicentere사(WI, USA)에서 구입하였다. MG132 등 그 외 시약들은 Sigma-Aldrich사(MO, USA)에서 구입 하였다.

### 세포배양 및 Nrf2 넉다운 세포주

사람의 난소암 세포주 SK-OV3(Korean Cell Line Bank, Republic of Korea)는 10% fetal bovine serum(FBS, Hycone)과 penicillin/streptomycin 을 첨가한 RPMI 1640배지(Chembrex Bio Science)를 이용하여 배양하였다. Nrf2 넉다운 세포주는 Manandhar *et al.*[20]과 같이 확립하였다. 간단히 설명하면, 비특이적인 shRNA(5'-CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCGCTCTAGCGAGGGCGACTTAACCTTAGG-3') 또는 Nrf2 shRNA(5'-CCGGGCTCCTACTGTGATGTGAAATCTCGAGATTTCACATCACAGT-AGGA-3')를 포함하는 pLKO.1 벡터를 Mission™ Lentiviral Packaging Mix(Sigma-Aldrich)와 함께 HEK293 세포주에 도입하여 viral particle을 얻고 SK-OV3 세포주에 감염시켰다. 이후 puromycin을 포함한 배지에서 4주간 배양하여 shRNA를 발현시키는 영구 세포주를 확립하였다.

### MTT 분석

$5\times10^3$ cells/well의 숫자로 96 well plate에서 배양한 세포에 bortezomib 또는 MG132를 24시간 동안 처리 후 MTT 용액(2 mg/m*l*)을 가하고 4시간 동안 추가 배양하였다. MTT 용액을 제거한 뒤, 100 μ*l*의 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 가하고 Versamax microplate reader(Sunnyvale, CA, U.S.A.)를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

### 세포사멸 분석

6-well plate에서 FBS가 없는 배지를 이용하여 하룻밤 배양한 세포에 bortezomib를 반응시켰다. 그 후 세포를 RNase A가 포함된 20 μg/m*l* propidium iodide(PI; Sigma Aldrich) 용액에 20분간 반응시키고 sub-G1 기의 세포 분획을 flow cytometry (FACSCalibur, BD Bioscience, NJ, USA) 방법을 이용하여 측정하고 CellQuest(BD Bioscience)로 분석하였다.

### RNA 추출 및 RT-PCR 분석

분석을 위한 RNA는 Trizol(Invitrogen, CA, USA) 용액을 이용해 추출하였으며 역전사효소를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 생성된 cDNA를 이용하여 PCR 분석을 수행하였으며(BioRad, CA, USA) 이 때 사용된 primer는 Bioneer사(Daejeon, Republic of Korea)에서 합성하였다. 각 유전자 발현 측정을 위해 사용한 primer 염기배열은 다음과 같다. HPRT1, 5'-AGATGTCATGAAGGAGATGG-3와 5'-TACAGTAGCTCTTCAGTCTG-3;

Nrf2, 5'-GAACTGTAGGAAAAGGAAGC-3와 5'-GAGTATTC-ACTGGGAGAGTA-3'; PSMB5, 5'-TTGGCTCGGCAGTGTC-GAATCTAT-3'와 5'-ACACCATGTTAGCGAGCAGTTTGG-3'; PSMB6, 5'-TGCAGTTCACTGCCAATGCTCTC-3'와 5'-TGGC-AACGTGGCAATGGTGA-3'; PSMB7, 5'-CGTCCATTCTCAG-TGCCCAACA-3'와 5'-TATCCAACCACCCACAGCACCA-3'; PSMA1, 5'-TGCTGGTTGCACTGAAGAGAGC-3'와 5'-AATC-CAAACACTCCTGGCGCA-3'. 증폭된 DNA는 Visi Doc-ItTM Imaging system(UVP, CA, USA)을 이용하여 디지털 이미지화 하였다. Real-time PCR 분석은 Takara SYBR Premix ExTag system(Otsu, Japan)을 이용하여 Roche Light Cycler(Mannheim, Germany)로 시행하였다.

### Proteasome 활성 측정

배양한 세포로부터 세포균질액을 준비하고 기질로서 50 μM의 Suc-LLVY-AMC(succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amino-4-methyl-coumarin) 또는 Z-ARR-AMC(Z-Ala-Arg-Arg-7-amino-4-methyl-coumarin)(Calbiochem, CA, USA)을 가하고 Tris-HCl(pH 7.8), 20 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$ 및 1 mM DTT를 포함하는 용액에서 20분간 반응시켰다. 반응 후 유리된 AMC에서 유래하는 형광을 360 nm(excitation) 및 460 nm(emission)에서 측정하였다.

### 통계처리

통계적 유의성 검증은 Student *t*-test 또는 One-way ANOVA - Student-Newman-Keuls 분석을 통하여 이루어졌다(GraphPad Prism, CA, USA).

## 실험결과 및 고찰

### Nrf2 넉다운 난소암 세포주의 bortezomib에 대한 세포독성 증가

최근 다수의 그룹 연구자들이 암세포 및 종양조직에서 Keap1 및 Nrf2의 체세포돌연변이가 발생되며, 이러한 변이 결과 Nrf2 활성이 증가하는 결과를 낳음을 보여주었다.[14,15,17] 암세포에서 증가한 Nrf2 활성은 종종 항암제 내성에 관여할 가능성이 제기되었다. 본 연구자 그룹에서도 Nrf2가 소실된 마우스 유래 fibroblast에서는 정상 fibroblast에 비해 항암제인 cisplatin에 의한 세포사가 증가되며, cisplatin 내성을 가진 세포주에서 간섭 RNA를 통한 Nrf2 발현 억제가 cisplatin 감수성 증가 현상을 이끔을 보여준 바 있다.[21] 그 외에도 Nrf2와 항암제 감수성과의 상관관계는 doxorubicin 등 anthracyclin 류 항암제, 5-fluorouracil 등 세포분열 저해제 및 docetaxel 등의 taxol 계열 항암제 등에서도 보여졌다.[16-20] 이는 Nrf2 발현상태에 따른 GSH 및 제2상 대사효소들의 발현 수준이 세포독성 항암제의 해독화 정도를 결정한다는 면에서 예측되는 현상이나, 그 외 taxol 류에서 보여지는 감수성과의 상관성은 다양한 분자적 기전이 관여할 가능성을 암시한다.

본 연구에서는 Nrf2 시스템이 proteasome을 저해하는 기전을 새로운 작용방식으로 가지는 항암제인 bortezomib 내성에 관여할 가능성을 알아보았다. Bortezomib는 타 항암제에 내성을 가지는 다발성 골수종을 중심으로 혈액암에 적용하고 있으나, 현재 고형암에의 적용 가능성을 타진하기 위하여 고형암의 bortezomib 반응성 탐색 및 내성에 관여하는 인자 규명 등의 노력이 이루어지고 있다. 특히 bortezomib 투여 환자의 대다수에서 내성이 발달되는 문제가 대두되면서 새로운 항암제인 proteasome 저해제에 대한 세포 내성을 결정하는 인자를 찾기 위한 노력이 활발하다. 연구를 위하여 bortezomib에 내성을 보이는 난소암 세포주인 SK-OV3을 선택하고 proteasome 저해제에 대한 반응성이 Nrf2 발현을 억제시킴으로써 어떻게 변화하는지 살펴보았다. Nrf2가 영구 억제된 SK-OV3 세포주는 이전 연구에서와 같이 확립되었으며 Nrf2 발현이 80% 이상 억제되고 그 결과 GSH 합성 효소인 GCLC 등 하위 유전자들의 발현이 50% 이상 감소함을 확인한 바 있다. 본 난소암 세포주에 bortezomib를 24시간 동안 반응시킨 후 세포독성을 MTT 분석을 통하여 관찰한 결과, 200 및 400 nM의 bortezomib 처치 후 비선택적인 shRNA를 발현시키는 대조군 세포는 각각 90% 및 66%의 세포가 생존하였으나 Nrf2가 억제된 세포는 56% 및 36% 만이 생존하였다(Fig. 1A). 이러한 반응성의 차이를 통계적으로 분석하였을 때 Nrf2 넉

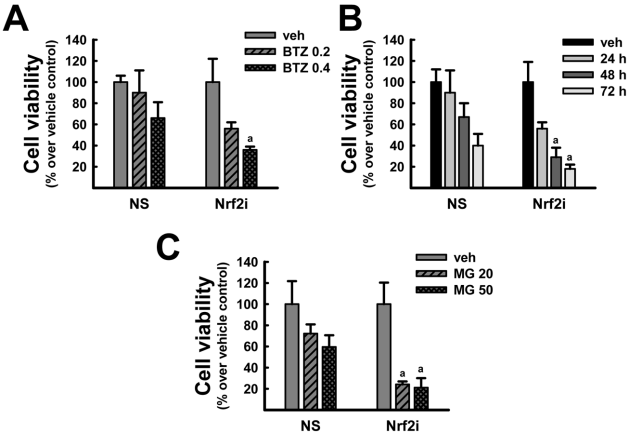


**Fig. 1** – Cell viability following bortezomib treatment in Nrf2 knockdown cells. (A) Nonspecific shRNA (NS) or Nrf2 shRNA expressing SK-OV3 cells (Nrf2i) were incubated with vehicle (DMSO) or bortezomib (BTZ, 0.2 and 0.4 μM) for 24 h and cell viability was monitored by MTT analysis. (B) Cells were treated with 0.2 μM bortezomib for 24, 48 or 72 h, and viability was assessed. (C) Cells were treated with MG132 (20 and 50 μM) for 24 h and cell viability was measured by MTT analysis. Values are means±S.E. from 8 sampled wells. $^{a}P<0.05$ compared with NS of each treatment.

다운은 800 nM bortezomib에 대해서 대조군인 비선택적 shRNA 발현군에 비해 유의성 있는 감수성 증가를 보였다. 그러나 400 nM의 bortezomib에 대해서는 통계적 유의성이 관찰되지는 않았다. 이러한 결과는 bortezomib의 반응 시간을 달리한 실험에서도 확인되어 48시간 및 72시간의 반응 후 생존한 세포의 수는 Nrf2 넉다운 세포주에서 더 많은 정도로 감소하였다(Fig. 1B). 다음으로 관찰된 bortezomib 반응성을 다른 종류의 proteasome 저해제에서도 확인하기 위하여 같은 세포주에 20 및 50 μM의 MG132를 24시간 동안 반응시키고 MTT 분석을 시행하였다. 그 결과 bortezomib에서와 유사하게 Nrf2 넉다운 세포주는 MG132에 대해 증가된 세포독성을 보였다. 즉 20 μM의 MG132 처치 후 대조군 세포는 72%가 생존하였으나 Nrf2 넉다운 SK-OV3는 단지 24%만이 생존하였다(Fig. 1C). 이러한 결과는 Nrf2의 억제가 난소암세포에서 bortezomib및 MG132와 같은 proteasome 저해제에 대한 반응성을 증가시킴을 보여주고 있다.

**Nrf2 넉다운 세포주에서 bortezomib에 의한 세포사멸 증가**

앞서 Nrf2를 억제한 난소암 세포주에서 bortezomib 처치 후 생존 세포수가 현저히 감소함을 확인하였으므로 다음에는 감소한 생존 세포수가 bortezomib에 의한 세포사멸 차이에서 기인하는지 확인하고자 하였다. 즉 대조군 및 Nrf2 넉다운 세포주에 bortezomib 400 nM을 24시간 동안 반응시키고 세포를 PI 염색 후 G1기 이하에 머물러 있는 세포의 비율을 측정함으로써 세포사멸 정도를 측정하였다. 그 결과 bortezomib의 24시간 처치는 대조군 세포에서 세포사멸을 이끄는 것으로 나타났다. 대조군의 4%에 비해 sub-G1기의 세포는 bortezomib 처치 후 21%로 증가하였다. 동시에 세포사멸 비율을 Nrf2 넉다운 세포주에서도 관찰한 결과 bortezomib 처치는 더 높은 정도의 세포사멸을 이끄는 것으로 나타났다. Sub-G1기에 머물러 있는 세포는 36%로서 bortezomib 처치에 대해 Nrf2 넉다운 세포주가 증가된 세포사멸을 보임을 확인하였다(Fig. 2A, 2B). 이러한 결과는 Nrf2 발현의 억제가 bortezomib에 대한 세포사를 촉진할 수 있는 방법임을 제시하고 있다.

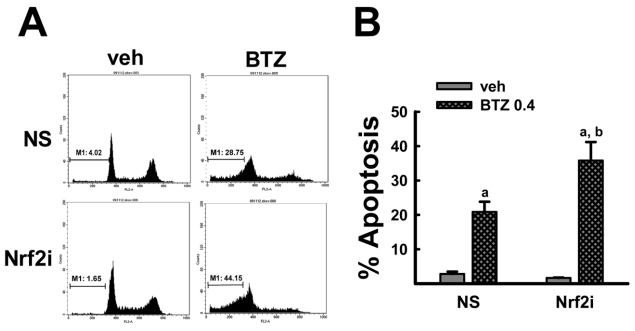


**Fig. 2** – Apoptotic cell measurement following bortezomib treatment. (A) Flow cytometric analysis of sub-G1 phase following PI staining. Cells with nonspecific shRNA (NS) or Nrf2 shRNA expression plasmid (Nrf2i) were incubated with bortezomib (BTZ, 0.4 μM) for 24 h. (B) Apoptotic cells were determined by measuring the cell fraction in sub-G1 phase. Values are means±S.E. from 3 experiments. [a]P<0.05 compared with each vehicle-treated group. [b]P<0.05 compared with bortezomib-treated NS group.

**Nrf2 넉다운 난소암 세포주는 증가된 proteasome 구성 단백질 발현을 보임**

기존 보고들에 의하면 bortezomib에 대한 내성을 보이는 종양세포에서 proteasome 발현 변화 또는 변이가 발견되며 이들이 내성의 원인으로 작용할 가능성이 제시되었다.[22] 인위적으로 bortezomib 내성을 유발시킨 골수성 단핵구 세포를 이용한 연구에서 PSMB5의 bortezomib 결합부위에서 변이가 발견되었으며 이와 함께 PSMB5의 발현이 증가함을 보였다.[23] 이는 proteasome의 발현 수준의 변화가 bortezomib 반응성에 영향을 미칠 가능성을 제시한다. 또한 몇몇 연구에서는 bortezomib 반응성을 세포주별로 비교하고 이들 세포주에서 PSMB5의 발현 수준을 비교한 결과 PSMB5의 발현 수준이 낮은 세포주가 bortezomib 내성을 가진다는 사실을 관찰하기도 하였다.[24] 이러한 결과들은 PSMB5의 발현 변화가 bortezomib 반응성을 결정하는 중요한 인자임을 제시하나, 실제 발현정도가 어떤 방식으로 반응성과 연계되는지는 세포 타입마다 또한 내성의 발달 상황에 따라 다를 가능성을 제시하고 있다.

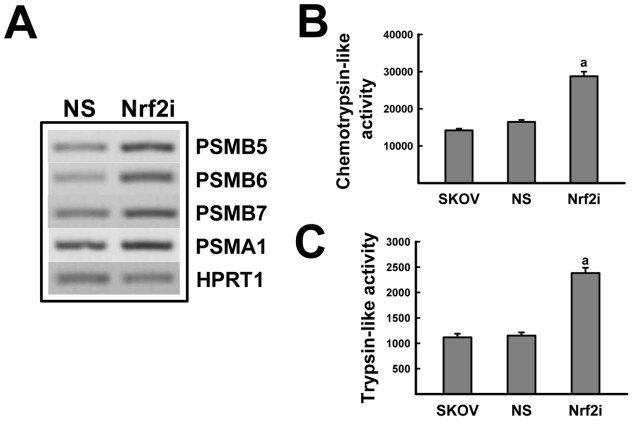


**Fig. 3** – Levels of the proteasome in Nrf2 knockdown cells. (A) Transcript levels for PSMB5, PSMB6, PSMB7, and PSMA1 were determined by RT-PCR analysis in nonspecific shRNA (NS) or Nrf2 shRNA (Nrf2i) expressing cells. (B~C) Chemotrypsin-like (B) and trypsin-like peptidase activities (C) were assessed in unmodified SKOV3 (SKOV), nonspecific shRNA expressing SKOV3 (NS) and Nrf2 knockdown SKOV3 (Nrf2i) using Suc-LLVY-AMC or Z-ARR-AMC as specific substrate peptides. Values are mean±S.E. from 3 experiments. [a]P<0.05 compared with NS group.

이러한 결과에 근거하여 다음에는 bortezomib에 대한 감수성이 증가한 Nrf2 넉다운 SK-OV3 세포주에서 proteasome 구성인자들의 발현변화를 관찰하여 보았다. 즉 대조군 및 Nrf2 억제 세포주에서 catalytic subunit인 PSMB5, PSMB6, PSMB7 그리고 구성인자인 PSMA1의 발현 수준을 RT-PCR 방법으로 분석한 결과, Nrf2가 억제된 SK-OV3 세포에서 PSMB5를 포함하는 catalytic subunit 및 PSMA1 발현이 대조군에 비해 증가하여 있음을 확인하였다(Fig. 3A). 이어 유전자 발현 차이는 proteasome 효소 활성의 변화로 이어지는 것으로 나타났다. 대조군 및 Nrf2 넉다운 세포주에서 proteasome 효소활성을 반영하는 chemotrypsin- 및 trypsin-유사 효소 활성을 측정한 결과 Nrf2 억제 세포주가 대조군에 비해 유의적으로 높은 proteasome 효소 활성을 가짐을 관찰하였다(Fig. 3B, 3C). 현재 이러한 proteasome 발현 차이가 어떤 방식으로 bortezomib 반응성 증가에 기여하였는지 설명할 수는 없으나, proteasome 구성인자들의 발현 정도가 bortezomib 반응성을 결정한다는 본 결과는 타 그룹의 결과들과 함께 bortezomib 반응성에서 PSMB5의 발현이 중요한 변수로 작용함을 암시한다.

**Nrf2 넉다운 난소암 세포주는 bortezomib에 대한 스트레스 반응 인자인 HO-1 유도 발현능을 소실함**

일부 결과들은 proteasome의 억제제 처치가 Nrf2 분해를 저해하여 Nrf2 경로를 활성화시키고 이어 하위 유전자 발현을 증가시킴을 보고하였다.[25,26] 이러한 산화적 스트레스 반응 유전자들의 변화는 proteasome 기능이 억제되는 스트레스 상황에서 세포 생존을 도모하는 시스템으로 작용할 가능성이 예상된다. 앞서 Nrf2 넉다운 난소암 세포주가 bortezomib에 대해 높은 세포사멸 반응성을 가짐을 관찰하였으므로 다음에는 이러한 차이가 Nrf2 하위 유전자들의 유도발현능 억제에서 기인하는지 알아보고자 하였다. 이를 위하여 대조군 및 Nrf2 넉다운 세포주에 200 nM bortezomib를 24시간 처치하고 변화하는 Nrf2 하위 유전자 발현을 RT-PCR 분석을 통하여 관찰하였다. 먼저 Nrf2 넉다운 세포주에서는 Nrf2 mRNA 수준이 대조군에 비해 80% 이상 감소함을 확인하였으며, bortezomib의 처치가 Nrf2 mRNA 수준에는 큰 영향을 미치지 않음을 관찰하였다(Fig. 4A). 다음으로 몇 가지 Nrf2 하위 유전자 발현을 분석한 결과, NQO1의 발현은 bortezomib 처치로 증가하지 않음을 확인하였다(Fig. 4B). 유사하게 GCLC, UDP-glucuronosyltransferase 1A6 등 추가적인 Nrf2 하위유전자 발현 분석에서도 bortezomib 처치가 Nrf2 하위 유전자 발현에 큰 영향을 미치지 않음을 확인하였다(Data 생략함). 이는 200 nM bortezomib 조건의 SK-OV3 세포에서는 Nrf2 경로의 활성화 현상이 나타나지 않음을 의미하고 있다. 그러나 주목할 만한 유전자 변화는 스트레스 반응성 유전자인 HO-1의 발현 변화이다. SK-OV3 및 대조군 세포주에서 bortezomib 처치

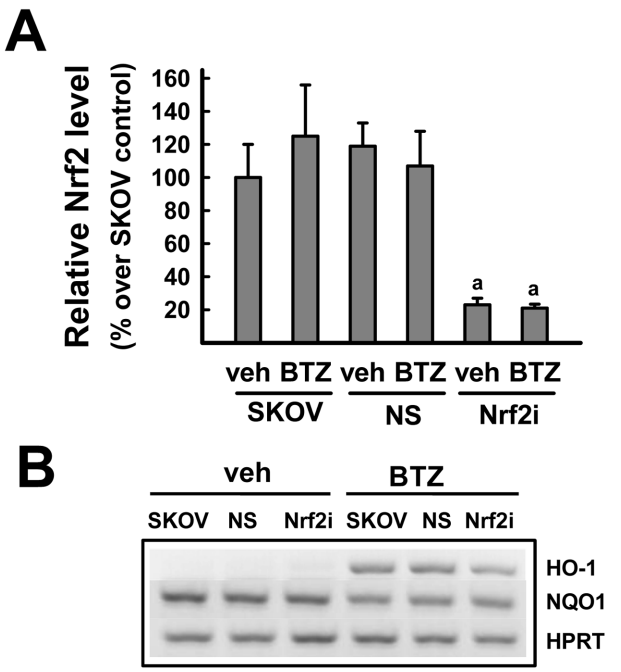


**Fig. 4** – Levels of Nrf2 and antioxidant gene expression following bortezomib treatment for 24 h. (A) Transcripts for Nrf2 were monitored using real-time PCR analysis in bortezomib (BTZ, 0.2 μM)-treated unmodified SKOV3 (SKOV), nonspecific shRNA expressing SKOV3 (NS) and Nrf2 knockdown SKOV3 (Nrf2i). Values are mean±S.E. from 3 experiments. [a]$P<0.05$ compared with NS group. (B) Transcript levels for HO-1 and NQO1 were determined by RT-PCR analysis in bortezomib (BTZ, 0.2 μM)-treated cells.

로 HO-1의 발현 수준이 크게 증가한 반면, Nrf2 넉다운 세포주에서는 이러한 증가가 적은 정도로 이루어졌다. HO-1의 발현은 산화적 스트레스, 종양 촉진인자, 중금속 노출 등 다양한 스트레스 상황에서 빠르게 이루어지며, 이들 상황에서 세포의 생존을 도모하는 중요한 기능을 수행한다.[27] 타 보고들에서도 proteasome 억제제인 MG132가 RAW264.7, astrocytes 및 신경세포에서 HO-1 발현을 증가시키며, 이러한 HO-1의 증가는 heme, 6-hydroxydopammine에 대한 세포보호에 중요한 것으로 밝힌 바 있다.[28-30] 이러한 점에서 볼 때 Nrf2 넉다운 세포주에서 bortezomib에 의한 HO-1 유도발현이 감소한 것은 bortezomib에 대해 높은 세포사멸 반응을 보인 것과 관계가 있을 것으로 예측된다.

## 결 론

새로운 계열의 항암제로서 주목 받고 있는 proteasome 저해제인 bortezomib는 최근 내성발생이 문제시되면서 내성의 분자적 기전을 규명하고 극복할 수 있는 방법을 찾고자 하는 노력이 활발하다. 산화적 스트레스에 반응하여 다양한 유전자 발현을 조

절함으로써 손상을 방지하고 복구를 유도하는 세포 대응계의 핵심 조절자인 Nrf2는 정상세포에서의 긍정적인 기능과 달리 암세포에서는 종종 과발현되어 항암제 내성 발달에 관여하는 것으로 알려진다. 본 연구에서는 bortezomib에 대한 저항성을 보이는 난소암 세포주에서 Nrf2의 영구적인 억제가 bortezomib에 대한 세포사멸 증가를 이끔을 관찰하였다. 이러한 proteasome 저해제에 대한 감수성 변화의 분자적 기전은 향후 세밀히 연구되어져야 할 부분이나, Nrf2 넉다운 세포에서 증가한 PSMB5 등 proteasome 구성 subunit들의 발현 및 HO-1 유도 발현의 억제 등이 관여할 가능성이 제시된다. 결론적으로 암세포에서 Nrf2의 넉다운은 proteasome 저해 항암제에 대한 감수성을 증가시키기 위한 방법으로 제시될 수 있으며, 이는 이전 연구를 통해 밝혀진 cisplatin, doxorubicin 등 세포독성 항암제 및 taxol 항암제에 대한 감수성 증가 현상과 함께 Nrf2 넉다운이 다양한 항암제에 대한 세포 반응성을 조절하는 데 있어 중요한 타겟이 될 수 있음을 제시하고 있다.

## 감사의 말씀

이 논문은 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(2011-0017977, 2011-0003619).

## 참고문헌

1) Glickman, M. H. and Ciechanover, A. : The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* **82**, 373 (2002).
2) Voges, D., Zwickl, P. and Baumeister, W. : The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 1015 (1999).
3) Nalepa, G., Rolfe, M. and Harper, J. W. : Drug discovery in the ubiquitin-proteasome system. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **5**, 596 (2006).
4) Richardson, P. G. and Mitsiades, C. : Bortezomib: proteasome inhibition as an effective anticancer therapy. *Future. Oncol.* **1**, 161 (2005).
5) Roccaro, A. M., Hideshima, T., Richardson, P. G., Russo, D., Ribatti, D., Vacca, A., Dammacco, F. and Anderson, K. C. : Bortezomib as an antitumor agent. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **7**, 441 (2006).
6) Kraus, M., Ruckrich, T., Reich, M., Gogel, J., Beck, A., Kammer, W., Berkers, C. R., Burg, D., Overkleeft, H., Ovaa, H. and Driessen, C. : Activity patterns of proteasome subunits reflect bortezomib sensitivity of hematologic malignancies and are variable in primary human leukemia cells. *Leukemia* **21**, 84 (2007).
7) Richardson, P. G., Barlogie, B., Berenson, J., Singhal, S., Jagannath, S., Irwin, D., Rajkumar, S. V., Srkalovic, G., Alsina, M., Alexanian, R., Siegel, D., Orlowski, R. Z., Kuter, D., Limentani, S. A., Lee, S., Hideshima, T., Esseltine, D. L., Kauffman, M., Adams, J., Schenkein, D. P. and Anderson, K. C. : A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N. Engl. J. Med.* **348**, 2609 (2003).
8) Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M. and Nabeshima, Y. : An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**, 313 (1997).
9) Kobayashi, M. and Yamamoto, M. : Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid. Redox. Signal.* **7**, 385 (2005).
10) Li, W. and Kong, A. N. : Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol. Carcinog.* **48**, 91 (2009).
11) Hayes, J. D., McMahon, M., Chowdhry, S. and Dinkova-Kostova, A. T. : Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the Keap1-Nrf2 pathway. *Antioxid. Redox. Signal.* **13**, 1713 (2010).
12) Kwak, M. K. and Kensler, T. W. : Targeting NRF2 signaling for cancer chemoprevention. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **244**, 66 (2010).
13) Hayes, J. D. and McMahon, M. : NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends. Biochem. Sci.* **34**, 176 (2009).
14) 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).
15) 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).
16) Shibata, T., Kokubu, A., Gotoh, M., Ojima, H., Ohta, T., Yamamoto, M. and Hirohashi, S. : Genetic alteration of Keap1 confers constitutive Nrf2 activation and resistance to chemotherapy in gallbladder cancer. *Gastroenterology* **135**, 1358 (2008).
17) Shibata, T., Ohta, T., Tong, K. I., Kokubu, A., Odogawa, R., Tsuta, K., Asamura, H., Yamamoto, M. and Hirohashi, S. : Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 13568 (2008).
18) Shim, G. S., Manandhar, S., Shin, D. H., Kim, T. H. and Kwak,

M. K. : Acquisition of doxorubicin resistance in ovarian carcinoma cells accompanies activation of the NRF2 pathway. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 1619 (2009).

19) Singh, A., Boldin-Adamsky, S., Thimmulappa, R. K., Rath, S. K., Ashush, H., Coulter, J., Blackford, A., Goodman, S. N., Bunz, F., Watson, W. H., Gabrielson, E., Feinstein, E. and Biswal, S. : RNAi-mediated silencing of nuclear factor erythroid-2-related factor 2 gene expression in non-small cell lung cancer inhibits tumor growth and increases efficacy of chemotherapy. *Cancer. Res.* **68**, 7975 (2008).
20) Manandhar, S., Choi, B. H., Ryoo, I. G., Kang, S. J., Kim, J. A., Choi, H. G., Park, P. H. and Kwak, M. K. : NRF2 inhibition represses ErbB2 signaling in ovarian carcinoma cells: Implications for tumor growth retardation and docetaxel sensitivity. *(Submitted).*
21) 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).
22) Fuchs, D., Berges, C., Opelz, G., Daniel, V. and Naujokat, C. : Increased expression and altered subunit composition of proteasomes induced by continuous proteasome inhibition establish apoptosis resistance and hyperproliferation of Burkitt lymphoma cells. *J. Cell. Biochem.* **103**, 270 (2008).
23) Oerlemans, R., Franke, N. E., Assaraf, Y. G., Cloos, J., van Zantwijk, I., Berkers, C. R., Scheffer, G. L., Debipersad, K., Vojtekova, K., Lemos, C., van der Heijden, J. W., Ylstra, B., Peters, G. J., Kaspers, G. L., Dijkmans, B. A., Scheper, R. J. and Jansen, G. : Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit beta5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood* **112**, 2489 (2008).
24) Busse, A., Kraus, M., Na, I. K., Rietz, A., Scheibenbogen, C., Driessen, C., Blau, I. W., Thiel, E. and Keilholz, U. : Sensitivity of tumor cells to proteasome inhibitors is associated with expression levels and composition of proteasome subunits. *Cancer.* **112**, 659 (2008).
25) Nguyen, T., Sherratt, P. J., Huang, H. C., Yang, C. S. and Pickett, C. B. : Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome. *J. Biol. Chem.* **278**, 4536 (2003).
26) Sekhar, K. R., Soltaninassab, S. R., Borrelli, M. J., Xu, Z. Q., Meredith, M. J., Domann, F. E. and Freeman, M. L. : Inhibition of the 26S proteasome induces expression of GLCLC, the catalytic subunit for gamma-glutamylcysteine synthetase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**, 311 (2000).
27) Maines, M. D. : The heme oxygenase system: update 2005. *Antioxid. Redox. Signal.* **7**, 1761 (2005).
28) Chen, J. and Regan, R. F. : Increasing expression of heme oxygenase-1 by proteasome inhibition protects astrocytes from heme-mediated oxidative injury. *Curr. Neurovasc. Res.* **2**, 189 (2005).
29) Wu, W. T., Chi, K. H., Ho, F. M., Tsao, W. C. and Lin, W. W. : Proteasome inhibitors up-regulate haem oxygenase-1 gene expression: requirement of p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) activation but not of NF-kappaB (nuclear factor kappaB) inhibition. *Biochem. J.* **379**, 587 (2004).
30) Yamamoto, N., Izumi, Y., Matsuo, T., Wakita, S., Kume, T., Takada-Takatori, Y., Sawada, H. and Akaike, A. : Elevation of heme oxygenase-1 by proteasome inhibition affords dopaminergic neuroprotection. *J. Neurosci. Res.* **88**, 1934 (2010).