

폐암세포주에서 Heme Oxygenase-1의 역할†

원광대학교 의과대학 내과학교실

정종훈, 김학렬, 김은정, 황기은, 김소영, 박정현, 김휘정, 양세훈, 정은택

The Role of Heme Oxygenase-1 in Lung Cancer Cells

Jong-Hoon Jung, M.D., Hak-Ryul Kim, M.D., Eun-Jung Kim, B.S., Ki-Eun Hwang, M.D., So-Young Kim, M.D., Jung-Hyun Park, M.D., Hwi-Jung Kim, M.D., Sei-Hoon Yang, M.D. and Eun-Taik Jeong, M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine Wonkwang University, Iksan, Korea

Background : Heme oxygenase-1 (HO-1) is an inducible enzyme that catalyzes the oxidative degradation of heme to form biliverdin, carbon monoxide (CO), and free iron. The current evidence has indicated a critical role of HO-1 in cytoprotection and also in other, more diverse biological functions. It is known that the high expression of HO-1 occurs in various tumors, and that HO-1 has an important role in rapid tumor growth because of its antioxidative and antiapoptotic effects. Therefore, the role of HO-1 was analyzed in human lung cancer cell lines, and especially in the A549 cell line.

Material and Methods : Human lung cancer cell lines, i.e., A549, NCI-H23, NCI-H157 and NCI-H460, were used for this study. The expression of HO-1 in the untreated state was defined by Western blotting. ZnPP, which is the specific HO inhibitor we used, and the viability of cells were tested for by conducting MTT assays. The HO enzymatic activity, as determined via the bilirubin level, was also indirectly measured. Moreover, the generation of intracellular hydrogen peroxide (H₂O₂) was monitored fluorimetrically with using a scopoletin-horse radish peroxidase (HRP) assay and 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). We have also transfected small HO-1 interfering RNA (siRNA) into A549 cells, and the apoptotic effects were evaluated by flow cytometric analysis and Western blotting.

Results : The A549 cells had a greater expression of HO-1 than the other cell lines, whereas ZnPP significantly decreased the viability of the A549 cells more than the viability of the other lung cancer cells in a dose-dependant fashion. Consistent with the viability, the HO enzymatic activity also was decreased. Moreover, intracellular H₂O₂ generation via ZnPP was induced in a dose-dependent manner. Apoptotic events were, then induced in the HO-1 siRNA transfected A549 cells.

Conclusion : HO-1 provides new important insights into the possible molecular mechanism of the antitumor therapy in lung cancer. (*Tuberc Respir Dis* 2006; 60: 304-313)

Key words : Heme oxygenase-1, Lung cancer

서론

폐암은 전세계적으로 증가 추세에 있으며, 국내에 서도 이미 암 사망률 제 1위를 차지하고 있다¹. 폐암 을 정복하기 위한 여러 노력에도 불구하고 전체적으 로 5년 생존율이 14%에 불과할 정도로 폐암의 예후

는 매우 불량하여 기존의 수술, 방사선 요법, 항암화 학요법과 이들을 근간으로 한 병용요법으로는 치료 의 한계를 보여주고 있어² 새로운 제제들을 이용한 다양한 치료방법이 요구되고 있다. 최근에는 종양학 의 분자생물학 분야의 발달로 인해 규명된 새로운 세 포표적을 목표로 하여 암의 전이, 신생혈관형성 및 신 호전달과정에 적용하여 항암효과를 나타내는 치료방 법이 각광받고 있으며 단독치료뿐만 아니라 기존의 치료방법과의 병합요법 등이 시도되고 있다^{3,4}.

Heme oxygenase (HO)는 heme의 분해 대사과정 에 관여하는 속도 조절효소로 heme을 분해하여 bili-verdin, free iron, 및 일산화탄소 등을 생성시킨다⁵. Biliverdin은 즉각적으로 환원효소에 의해 빌리루빈 이 되는데 강력한 항산화작용으로 허혈성 심장질환

† 본 연구는 2004년도 원광대학교 교내 연구비 지원에 의해 이루어짐

Address for correspondence : Hak-Ryul Kim, M.D.,
Department of Internal Medicine, Wonkwang University
Hospital, 344-2 Shinyong-dong, Iksan, Jeonbuk,
570-711, Korea.

Phone : 063-850-1328 Fax : 063-855-2025

E-mail : kshryj@wonkwang.ac.kr

Received : Jan. 2. 2006

Accepted : Feb. 17. 2006

과 산화적 손상 모델에서 세포보호작용을 한다고 밝혀져 있다⁶. HO는 HO-1, HO-2, HO-3라는 3개의 이형체를 가지고 있고^{5,7}, 이들은 서로 다른 유전자에서 발현되고, 이들의 발현은 세포의 형태, 조직의 분포와 그 조절에 의해 각각 다르게 일어난다.

HO-1은 HSP계의 한 종류로 32kDa의 분자량을 갖는 유도성 이형체로서 생리적 상황에서 모든 조직에서 발현되나 특히 간이나 비장에서 높게 발현된다. HO-1의 발현은 저산소상태⁸, UV 방사선⁹, 카드뮴, 납, 수은과 같은 중금속이나^{10,11}, 활성산소종^{12,13} 등의 다양한 스트레스성 자극에 반응하여 생체방어 기능을 갖는 것으로 알려져 있는데 세포성장이나 세포사 특히 세포고사를 조절하는 것으로 보고되고 있다¹⁴⁻¹⁷. 현재 신장암, 전립선암, 간암, 육종 등의 고형암에서 발현됨이 알려져 있고, 실제 HO-1 억제제를 투여했을 때 암성장이 억제됨이 보고되었다^{9,18-20}.

이 연구의 목적은 폐암세포주들에서 HO-1의 발현 유무와 그 역할을 규명하고 나아가 HO-1 억제제의 치료제로서의 가능성을 알아보는데 있다.

재료 및 방법

1. 재 료

A549(선암), NCI-H23(선암), NCI-H157(편평상피암), NCI-H460(대세포암)은 사람의 폐암조직에서 얻은 세포주로서 한국 세포주 은행(Korean cell line bank, 서울대학교)으로부터 분양 받아 계대배양하면서 실험을 실시하였다. 실험에 필요한 RPMI 1640, 항생제, trypsin 및 우태아 혈청(fetal bovine serum: FBS)은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)에서, ZnPP는 Porphyrin Products사(Logan, UT, USA) 제품을 구입하였다. Methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl, tetrazolium bromide(MTT)는 Sigma사(St. Louis, USA)에서, H₂DCF-DA는 Molecular Probes사(Leiden, Netherlands) 제품을 사용하였다. 또한 caspase-3 protease의 기질인 Ac-DEVD-7-amino-4-methylcoumarin(AMC)은 Calbiochem사(San Diego, USA)에서, anti-rabbit IgG conjugated horse-r-

adish peroxidase와 enhanced chemiluminescence kit(ECL kit)는 Amersham사(Buckinghamshire, UK)에서 구입하였다.

2. 방 법

1) 세포배양 및 시약처리

세포배양은 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 10% 우태아 혈청이 포함된 RPMI 1640(GIBCO BRL, UK) 배양액으로 배양하였으며, 24시간 간격으로 배양액을 교체하여 log phase에 있는 세포에 ZnPP를 각각 농도별로 처리한 후에 48시간 후에 세포 생존율을 관찰하였다.

2) 세포 생존율 측정

폐암세포주들의 각각의 세포수는 5X10⁴/mL 정도로서 세포 배양판(24-well plate)에 1mL씩 분주하여 12시간이상 CO₂ 세포배양기 안에서 안정시킨 후, 실험에 필요한 시약을 처리한 다음, MTT 용액(5mg/ml)을 배양액 최종부피의 1/10이 되게 첨가하였다. 4시간 후 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 formazan의 검출은 MTT가 들어있는 배양액을 모두 버리고 DMSO 500μl를 넣어 충분히 녹인 후 96 well plate에 100μl를 넣고 분광광도계(ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, USA)를 이용하여 595nm파장에서 흡광도를 측정하였다.

3) Western blotting

세포를 포집하여 차가운 Hank's balanced salt solution(HBSS, pH 7.4)으로 2회 세척 후, 얻어진 세포는 파쇄용액(50mM HEPES pH 7.4, 150mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1μg/ml aprotinin)과 4°C에서 30분간 반응시켰다. 세포 파쇄액은 13,000rpm에서 20분간 원심분리 한 후 상층액을 BCA 용액을 이용하여 단백질을 정량하였다. 동량의 세포 파쇄액(단백질: 200μg)은 2×sample buffer와 혼합하여 100°C에서 5분간 가열한 후 12.5% SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 semi-dry 방법으로 실온에서 단위 면적당 0.8mA를 2시간 동안 부하시켜 nitrocellulose membrane상에 이

동시켰다. Nitrocellulose membrane은 blocking buffer(5% skim milk)와 상온에서 1시간 반응하여 비특이적 항체결합을 예방하였다. HO-1과 caspase-3에 대한 항체는 0.01%(v/v)의 Tween-20이 포함된 3% skim milk/TBS에 1:1000으로 희석하여 상온에서 3시간 반응 후 이차항체인 anti-mouse IgG conjugated horse-radish peroxidase와 1시간 반응하였다. Nitrocellulose membrane은 TBS로 3번 세척한 후 ECL kit를 사용하여 ECL 필름에 노출하였다.

4) HO-1 효소활성측정

시약처리 되어 포집된 세포로부터 얻어진 microsome들을 NADPH, biliverdine 환원효소의 공급원으로서의 rat liver cytosol, hemin이 포함된 반응성 혼합물에 차광상태로 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 chloroform 1ml를 첨가하였다. 추출된 빌리루빈은 464와 530nm의 흡광도 차이에 의해 계산되었다. HO-1의 효소활성은 시간당 세포단백질의 mg당 형성된 빌리루빈의 양으로 나타내었다.

5) 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성 측정

세포 내 H_2O_2 의 생성은 두 가지 방법을 이용하였다. 먼저 horse radish peroxidase(HRP)에 의한 산화작용 동안에 scopoletin의 형광감소 정도를 측정하였다. 시약처리 한 세포(5×10^4 세포수/mL)의 상층액을 얻어 1U/ml의 HRP를 첨가한 후, 암실에서 scopoletin 5 μ M을 10분간 반응시킨 후, 형광측정기(Molecular Devices Co, U.S.A.)로 350nm(excitation wavelength)와 460nm(emission wavelength)의 파장에서 측정하였다. 또한 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA, Eastman Kodak, NY, U.S.A.)를 이용한 방법으로, 산화체가 존재하면 DCFH가 강한 형광물질인 2',7'-dichlorofluorescein(DCF)로 전환되어 붉은색을 띠게 된다. 시약처리 된 세포는 phenol red가 없는 RPMI 배양액으로 3회 세척하고 여기에 1 ml의 동일 배양액을 넣고 50 μ m의 DCF-DA와 30분간 반응시킨 후 PBS로 세척하여 형광현미경(Leica MPS 60, Germany)으로 관찰하였다.

6) HO-1 small interfering RNA(siRNA) 주입

HO-1의 억제 효과를 관찰하기 위해 HO-1 mRNA 612-630 염기서열을 표적으로 하는 21-nucleotide duplex small interfering RNA(siRNA)를 이용하여 특이적으로 억제하였다. 이용된 ribonucleotide의 순서는 5'-rGACUGCGUCCUGCUCAACdTdT-3'와 5'-rGUUGAGCAGGAACGCAGUCdTdT-3'(Roche 사, Germany)였다. A549세포를 세포 배양판(6-well plate)에 각각 분주한 후 12시간 동안 배양하여 well 전체바닥의 30-50%의 면적을 차지하도록 하였다. 그리고 LipofectAMINE 2000(Introgen, Carlsbad, CA)을 이용하여 제조회사에서 제공하는 방법에 따라서 각 well당 2 μ g siRNA를 세포에 주입하였다. Silencer Negative Control siRNA(Roche, Germany)는 음성대조군으로 사용되었고 같은 방법으로 세포에 주입하였다.

7) 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 통한 HO-1의 확인

A549세포에 HO-1 siRNA의 성공적인 주입은 역전사 중합효소 연쇄반응을 통해 확인하였다. Total RNA는 70°C에서 10분간 변성시킨 후, 4°C에서 급냉 후 사용하였다. 역전사 반응은 total RNA (3-5 μ g), oligo d(T) (1 μ g), 2 μ l dNTP (10mM), MMLV reverse transcriptase (200U), DTT (10mM), RNasin (1 μ l; Promega, USA)을 20 μ l 완충용액(50mM Tris-Cl pH 8.3, 75mM KCl, 3mM MgCl₂)에 용해하여 42°C에서 60분간 반응하였다. 2 μ l 역전사 반응액, 2 μ l dNTP (2.5mM), 3 μ l primer (5 μ M) 및 Taq DNA polymerase (0.6 U; TAKARA)가 함유된 30 μ l 반응액 (20mM Tris-Cl pH 8.0, 100mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1mM DTT)을 94°C에서 5분 전변성(predenaturation) 시킨 후, 변성(denaturation, 94°C, 45초), 결합(annealing, 58°C, 45초), 연장(elongation, 74°C, 60초) 반응을 33회 반복 수행하였다. PCR 반응 후 DNA 존재는 1.5% 아가로스 겔에 전개하여 확인하였다. 이때 사용한 HO-1 유전자에 대한 sense primer는 5'-ACA TCT ATG TGG CCC TGG AG-3'와 antisense primer는 5'-GTT GAG CAG GAA CGC

AGT CT-3'을 사용하였고, PCR 반응여부를 확인하기 위한 내부조건으로 이용한 GAPDH에 대한 sense primer는 5'-CAT GGA GAA GGC TGG GGC TC-3'와 antisense primer는 5'-CAC TGA CAC GTT GGC AGT GC-3' 염기서열 oligonucleotide을 합성하여 사용하였다.

8) 유식세포 분석

세포고사의 현상의 확인을 위해 propidium iodide (PI)로 DNA를 염색한 후 형광의 세기를 측정하였다. A549 세포에 HO-1 siRNA 리포솜을 이용하여 A549 세포에 운반시킨 후 24시간 후에 포집하여 PBS로 두 번 세척하였다. 세척된 세포에 PBS 300 μ l을 넣고 세

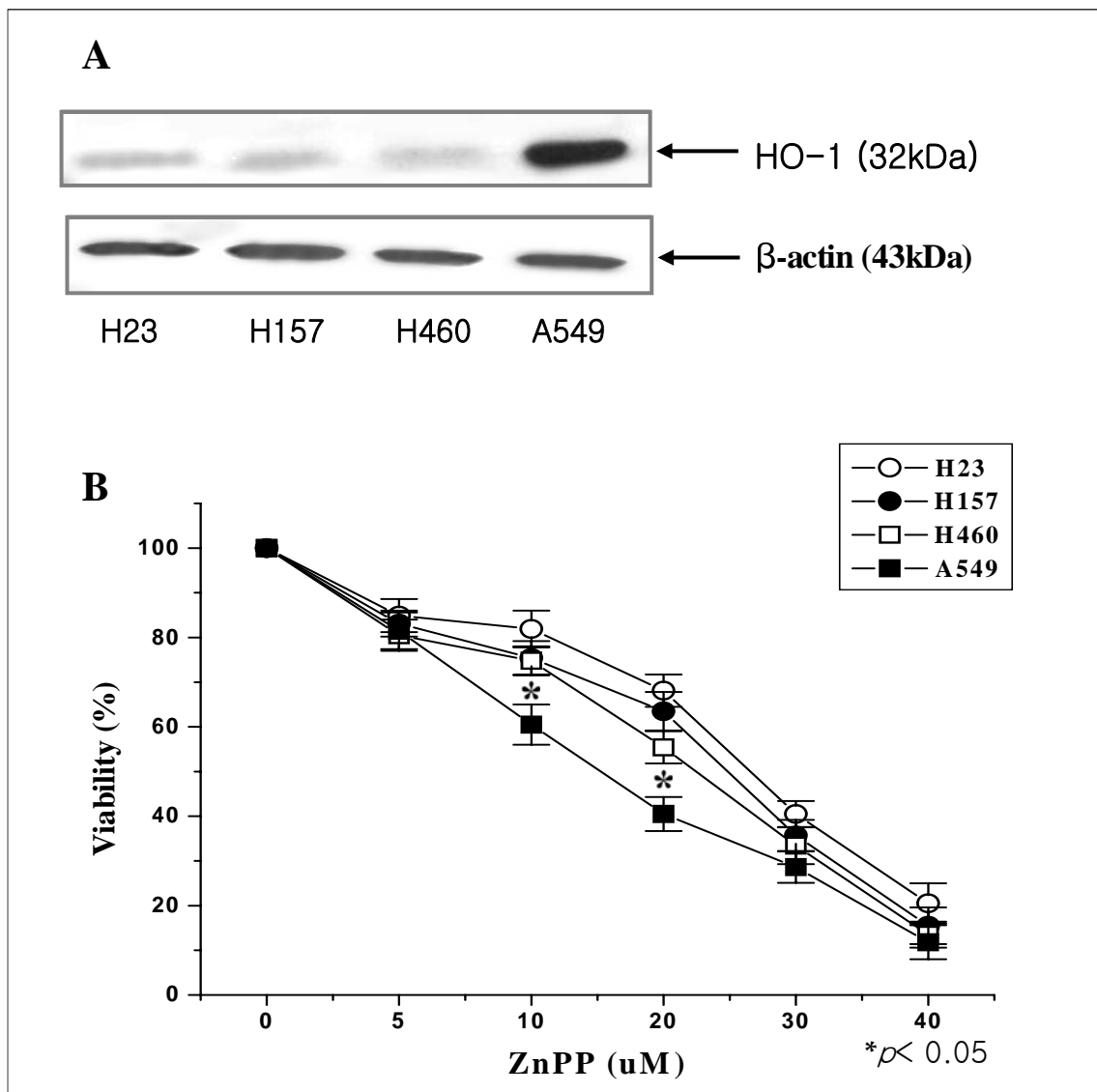


Figure 1. (A) Under endogenous state, HO-1 was expressed highly in A549 cells than other lung cancer cells. Cell lysates of endogenous state were subjected to 12.5% SDS-PAGE to measure the expression of HO-1 protein. (B) ZnPP significantly decreased the viability of A549 cells than other lung cancer cells in a dose-dependent fashion. Cells were treated with different concentrations of ZnPP for 48 hrs, and viability was determined by MTT assay. The data represent the mean \pm S.D. of three independent experiments. *, $p < 0.05$ compared to control.

포의 DNA는 PI solution(0.1% Triton X-100, 20µg/ml PI, 200µg/ml Rnase) 600µl을 넣어 20분간 반응시킨 후 FACS Vantage flow cytometer를 이용하여 sub-G₀/G₁으로 나타나는 세포고사를 분석하였으며, 그 정보의 분석은 Cell Quest software(Becton Dickinson)을 이용하였다.

9) 결과 산출 방법

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이며 이들의 평균(mean)과 표준편차(standard deviation, S.D.)를 산출하여 표시하였다. 실험결과의 통계처리는 Student's *t*-test에 준하여 처리하였다.

결 과

1. 비처리 상태에서 폐암세포주의 HO-1 발현

비처리 상태에서 각각의 폐암세포주의 HO-1 발현

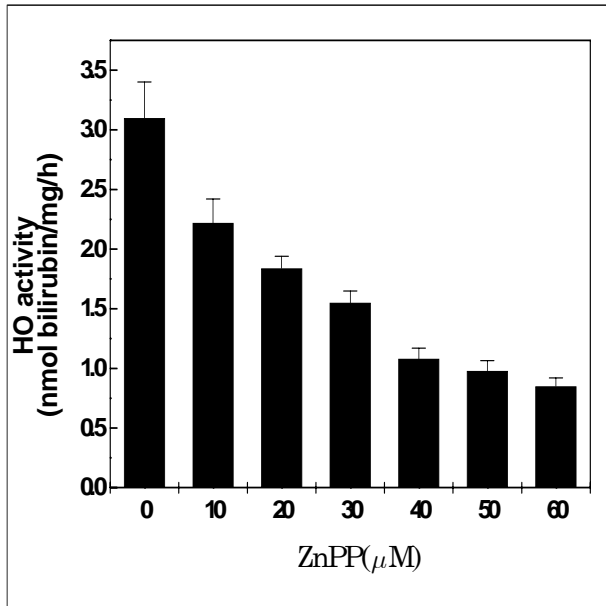


Figure 2. ZnPP significantly decreased the enzymatic activity of HO-1 in A549 cells. Cells were treated with different concentrations of ZnPP for 48 hrs. Microsomal extracts were prepared and assayed for HO activity by measurement of bilirubin generation as described in Materials and Methods. HO activity was expressed as nmol·mg protein⁻¹·h⁻¹. The data represent the mean±S.D. of three independent experiments.

을 Western blot을 통해 확인한 결과 다른 세포주에서 미미하게 발현된 32kDa의 HO-1이 A549 세포주에서 발현이 증가되었다 (Fig. 1A).

2. ZnPP 처리 후 폐암세포주의 생존율 변화

이러한 결과에 근거하여 A549, NCI-H23, NCI-H157, NCI-H460 폐암세포주에서 HO-1 활성억제제인 ZnPP의 농도별 변화에 의한 생존율의 변화를 알아보기 위해 48시간 후에 생존율을 MTT 방법으로 측정하였다. 생존율의 결과는 10µM일 때 NCI-H23, NCI-H157, NCI-H460 세포주에서 각각 81.9%, 75.4%, 74.8%인데 비해 A549 세포주에서 60.5%였고, 20µM일 때 각각 68.1%, 63.5%, 55.4%인데 비해 40.5%로서 ZnPP에 대하여 다른 폐암세포주에 비해 의의 있게 감소됨을 확인하였다 (Fig. 1B).

3. ZnPP 처리 후 A549 세포에서 HO-1 효소활성의 변화

ZnPP처리 후 HO-1의 효소활성 변화를 시간당 세포단백질의 mg당 형성된 빌리루빈의 양으로 측정하였다. 대조군의 빌리루빈 양인 3.10 nmol bilirubin/mg/h을 100%로 하였을 때, ZnPP 10M 71.7%, 20M 59.4%, 30M 50.0%, 40M 34.8%로서 농도 의존적으로 효소활성의 감소가 확인되었다 (Fig. 2).

4. ZnPP 처리 후 A549 세포에서 활성산소종의 생성

ZnPP 처리시의 의미 있는 생존율의 감소가 활성산소종의 생성과 관련이 있는지 알아보기 위해 H₂O₂를 측정하였다. 먼저 HRP에 의한 산화작용 동안에 scopoletin의 형광감소 정도를 측정한 결과 대조군에 비해 ZnPP 10µM 1.3배, 20µM 1.4배, 30µM 1.65배, 40µM 2.2배로 농도 의존적으로 의의 있게 증가된 H₂O₂의 생성을 보였다 (Fig. 3A). 또한 DCF-DA와 반응시켰을 때 세포 내 H₂O₂에 의해 탈아세틸화되어 형광을 나타내는 물질로 전환되어 붉은 색을 띠게 되는데 역시 농도 의존적으로 붉은색의 음영이 증가됨을 확

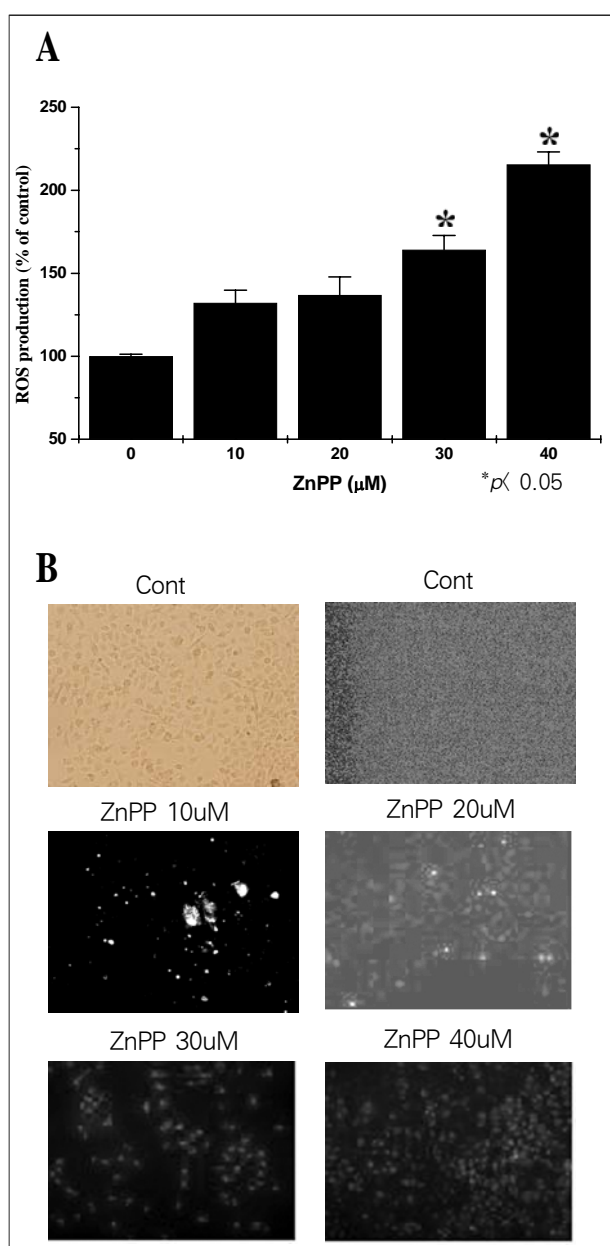


Figure 3. ZnPP induced the generation of intracellular H_2O_2 in A549 cells. (A) Cells were treated with different concentrations of ZnPP for 48 hrs. H_2O_2 generation was determined by monitoring the decrease in fluorescence of scopoletin ($5 \mu M$) during its oxidation catalyzed by HRP ($1 U/ml$). Fluorescence value of scopoletin is representative counts and relative fluorescence values are mean \pm S.D. of three independent experiments. *, $p < 0.05$ compared to control. (B) Cells were treated with different concentrations of ZnPP for 48 hrs, and were harvested, washed with media, and then stained with oxidant-sensitive fluorescence dye DCF-DA ($50 \mu M$) for 30 mins in the dark. After washing unbound dye out, the generation of H_2O_2 were visualized under fluorescent microscope.

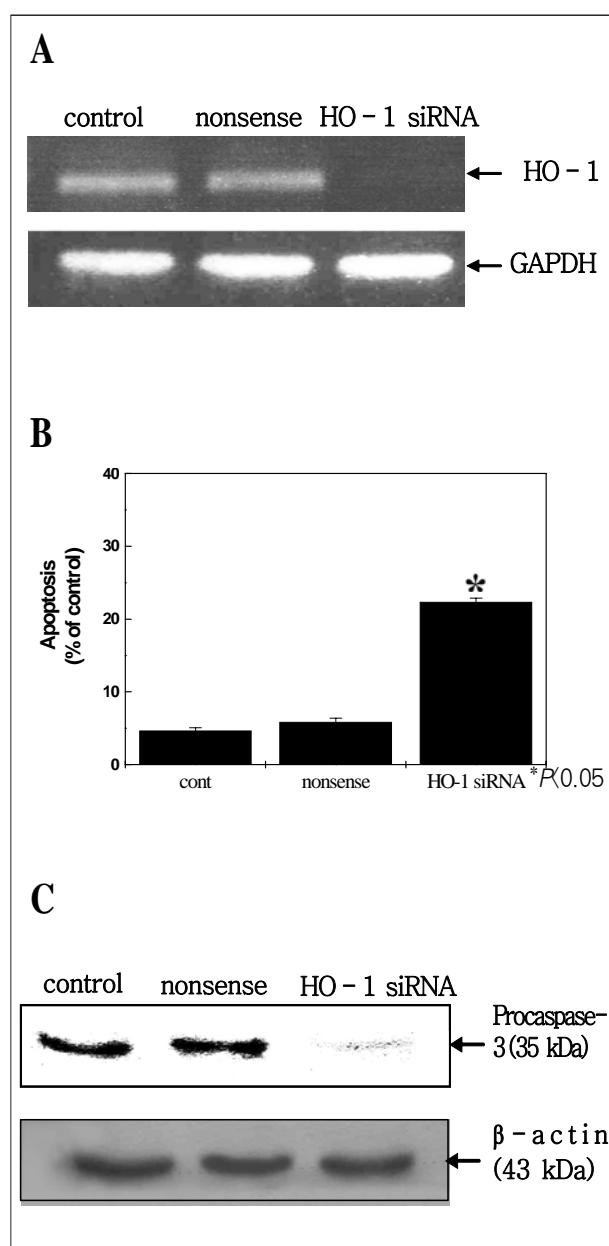


Figure 4. A549 cells were transfected by HO-1 siRNA induced apoptosis. (A) Cells were transfected with siRNA for HO-1 mRNA. The nonsense HO-1 siRNA was used as a negative control. RT-PCR for the HO-1 mRNA shows expression of the cells sense or nonsense siRNA transfection. Total RNA of transfected cells was isolated and HO-1 gene was amplified by RT-PCR detailed in the materials and methods. (B) HO-1 siRNA increased sub-G0/G1 fraction in A549 cells. Cellular DNA were stained with PI staining solution and analyzed by flow cytometry. (C) HO-1 siRNA induced the activation of caspase-3. Cell lysate was subjected to 12.5% SDS-PAGE to measure the expression of pro-caspase-3.

인하였다 (Fig. 3B).

5. A549 세포의 HO-1 siRNA 주입에 의한 세포고사 유도

HO-1 활성억제제인 ZnPP의 효과를 HO-1 siRNA를 이용하여 HO-1 mRNA를 억제시킴으로서 유전자 수준에서의 효과를 측정하였다. HO-1 siRNA를 리포솜을 이용하여 A549 세포주에 운반시킨 후 24시간 후에 성공적인 주입여부는 역전사 중합효소 연쇄반응을 통해 관찰하였다. 비처리군과 음성대조군에서 보이던 HO-1의 발현이 HO-1 siRNA 주입에 의해 HO-1의 knock-down의 발생을 확인하였다 (Fig. 4A). 이때 유식세포분석을 이용하여 세포주기를 분석한 결과 세포고사가 일어난 세포들의 낮은 분자량을 가진 DNA 단편들이 세포막의 변화로 이동하여 G₁ 주기 전에 나타나는 sub-G₀/G₁ DNA 분획은 비처리 A549 세포군은 4.7%였고 nonsense siRNA 군은 5.8%인데 반해 HO-1 siRNA 군에서는 22.4%로 현저하게 증가함을 확인하였다 (Fig. 4B). 또한 세포고사와 관련된 단백질의 발현을 알아보기 위해 caspase-3 protease의 활성을 Western blot을 통해 확인하였다. 35kDa의 procaspase-3가 대조군으로 치료하지 않은 A549 세포군과 nonsense siRNA 군에 비해 HO-1 siRNA군에서 절단되어 감소됨을 관찰하였다 (Fig. 4C).

고 찰

유도성 효소인 HO-1은 산화 스트레스를 증가시키는 조건인 lipopolysaccharides, 저산소증, 과산소증, 산화질소, heat shock, UV 방사선 등에 의해 발현되어 산화 스트레스, 염증반응, 세포고사, 이식거부에 대한 보호기능을 하는 것으로 알려져 있다²¹⁻²³. 호흡기 영역에서 과산소증에 의한 손상에 대해 폐상피세포와 섬유아세포에서 HO-1의 과발현이 보고되었고^{24,25}, HO-1의 유도가 다발성 장기부전에 대한 보호작용을 한다고 하였다²⁶. 또한 HO-1을 knockout시켰을 때 산화 스트레스에 더 민감한 것으로 보고되었다²⁷.

최근의 보고들은 HO-1이 세포성장과 세포의 다양

한 형태의 증식을 자극하는 것으로 알려지고 있다. HO-1의 발현이 표피의 각질세포의 성장을 증가시켰고²⁸, HO-1 유전자를 각막 내피세포에 주입하였을 때 모세양 관상 구조물들이 형성되어 혈관생성의 역할 가능성을 제시하였다²⁹. 또한 HO-1은 가장 빠르게 증식하는 세포인 선암, 간암, 육종, 흑색종, 그리고 상피암세포 등의 다양한 암 세포들에서 광범위하게 발현된다^{9,18,30-32}. Fang 등은 HO-1 활성억제제인 ZnPP를 대장암과 간암에 주입하였을 때 종양의 성장을 의미 있게 억제하여 HO-1이 세포성장 특히 암세포 증식에 중요한 역할이 있음을 제시하였다^{9,33,34}. 이러한 효과는 산화스트레스에 의한 세포고사에 대하여 HO-1의 보호효과 때문인 것으로 알려져 있는데³⁵, 분자생물학적인 기전으로 세포 내 전산화제의 양을 감소시키고 빌리루빈의 양을 감소시키며 일산화탄소의 생성증가가 알려져 있다. Heme은 다양한 활성산소종의 생성을 유도하고, 증가된 세포 내 산화제는 다양한 종류의 세포에서 세포고사를 초래하는데^{36,37}, HO-1은 이러한 heme을 분해시켜 ferritin의 합성을 증가시킴으로써 전산화제의 양을 감소시킨다³⁸. 또한 heme의 대사과정에서 HO과 biliverdin reductase에 의해 생성된 빌리루빈은 강력한 활성산소종의 제거기능을 가져서 세포고사에 대한 보호효과를 보인다.

본 연구에서 비처리 상태에서 A549 세포주는 다른 폐암세포주에 비해 HO-1의 발현이 증가되어 있음을 Western blot을 통해 확인하였다. 또한 HO-1 활성억제제인 ZnPP 처리 후 A549 세포주에서 유의 있는 생존율의 감소를 보여 HO-1이 세포독성에 대한 일부 보호작용이 있을 것으로 추정하였다. 한편 ZnPP 처리에 의한 이러한 효과는 HO-1 활성의 감소를 통해 세포 내 활성산소종의 생성증가와 빌리루빈의 생성 감소를 통한 기전에 의한 것임을 확인하였다. 본 연구에서 A549세포에서 HO-1 활성억제제인 ZnPP의 효과를 HO-1 siRNA를 이용하여 HO-1 mRNA를 knock-down 시켜 유전자 수준에서의 효과를 측정하였는데 HO-1 siRNA가 처리된 세포에서 sub-G₀/G₁ DNA 분획이 현저하게 증가함을 확인하였고, Western blot 방법을 통해 caspase-3 protease의 활성을 증가시켜 세포고사가 유도됨을 확인하였다.

HO-1의 높은 발현이 다양한 암종에서 알려져 있고, 항산화와 항세포고사효과 때문에 빠른 암종의 성장에 중요한 역할이 확인되고 있어 이것을 표적으로 하는 ZnPP 등의 활성억제제나 siRNA를 통한 knock-down방법이 새로운 항암치료로의 이용가능성을 보여주고 있다. 이러한 기전은 HO-1의 억제를 통해 세포 내 활성산소양 증가와 빌리루빈의 생성감소가 세포고사를 유도할 것으로 보인다. 따라서 폐암의 치료에 있어서 항암화학요법과 이들을 근간으로 한 병용요법으로는 치료의 한계를 보여주고 있는 상황에서 이러한 접근은 새로운 표적치료로서 가능성을 보여줄 것으로 기대된다.

요 약

연구배경 :

Heme oxygenase-1 (HO-1)은 heme의 분해 대사 과정에 관여하는 유도성 효소로 heme을 분해하여 biliverdin, free iron, 및 일산화탄소 등을 생성시킨다. HO-1의 발현은 다양한 스트레스성 자극에 반응하여 생체방어 기능을 갖는 것으로 알려져 있는데 세포성장이나 세포사 특히 세포고사를 조절하는 것으로 보고되고 있다. 현재 신장암, 전립선암, 간암, 육종 등의 고형암에서 발현됨이 알려져 있고, 실제 HO-1 억제제를 투여했을 때 암성장이 억제됨이 보고되었다. 저자들은 폐암세포주들에서 HO-1의 발현유무와 그 역할을 규명하고 나아가 HO-1 억제제의 치료제로서의 가능성을 알아보고자 하였다.

방 법 :

비소세포폐암세포주인 A549, H23, NCI-H157, NCI-H460을 이용하였다. 세포독성은 MTT 방법으로 구하였고, HO-1의 발현은 Western blotting으로 확인하였다. HO의 효소활성은 시간당 세포단백질의 mg당 형성된 빌리루빈의 양을 이용하여 측정하였다. 또한 H₂O₂의 생성은 horse radish peroxidase(HRP)와 형광물질인 2',7'-dichlorofluorescein(DCF)를 이용한 두 가지 방법을 이용하였다. A549세포에 HO-1 small interfering RNA(siRNA)을 주입하여 유식세포 분석과 caspase-3에 대한 Western blotting을 통하여

세포고사유무를 확인하였다.

결 과 :

비처리 상태에서 다른 세포주에 비해 A549세포의 HO-1 발현이 증가되었으며 HO-1 활성억제제인 ZnPP를 처리하였을 때 생존율의 의미 있는 감소를 보였다. 이러한 조건과 일치하여 ZnPP는 용량의존적으로 HO의 효소활성 감소와 세포 내 H₂O₂ 생성의 증가를 초래하였다. 또한 HO-1 siRNA로 주입된 A-549세포는 세포고사를 유도하였다.

결 론 :

HO-1은 폐암의 치료에 있어서 새로운 분자생물학적 기전의 가능성을 제시하여 HO-1에 대한 표적치료의 가능성을 보여줄 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. Bae JM, Won YJ, Jung KW, Suh KA, Yun YH, Shin MH, et al. SurvivalKorean cancer patients diagnosed in 1995. *Cancer Res Treat* 2002;34:319-25.
2. Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2002;346:92-8.
3. Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, Scagliotti G, Resell R, Miller V, et al. Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial-INTACT 1. *J Clin Oncol* 2004;22:777-84.
4. Sandler AB, Johnson DH, Herbst RS. Anti-vascular endothelial growth factor monoclonals in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:4258S-62S.
5. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin. *J Lab Clin Med* 1970;75: 410-21.
6. Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:16093-8.
7. McCoubrey WK Jr, Huang TJ, Maines MD. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 1997;247:725-32.
8. Motterlini R, Foresti R, Bassi R, Calabrese V, Clark JE, Green CJ. Endothelial heme oxygenase-1 induction by hypoxia: modulation by inducible nitric-oxide

- synthase and S-nitrosothiols. *J Biol Chem* 2000;275:1-3613-20.
9. Doi K, Akaike T, Fujii S, Tanaka S, Ikebe N, Beppu T, et al. Induction of haem oxygenase-1 nitric oxide and ischaemia in experimental solid tumours and implications for tumour growth. *Br J Cancer* 1999;8-0:1945-54.
10. Elbirt KK, Whitmarsh AJ, Davis RJ, Bonkovsky HL. Mechanism of sodium arsenite-mediated induction of heme oxygenase-1 in hepatoma cells: role of mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 1998; 273:8922-31.
11. Eyssen-Hernandez R, Ladoux A, Frelin C. Differential regulation of cardiac heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor mRNA expressions by hemin, heavy metals, heat shock and anoxia. *FEBS Lett* 1996;382:229-33.
12. Keyse SM, Tyrrell RM. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:99-103.
13. Lautier D, Luscher P, Tyrrell RM. Endogenous glutathione levels modulate both constitutive and UV-A radiation/hydrogen peroxide inducible expression of the human heme oxygenase gene. *Carcinogenesis* 19-92;13:227-32.
14. Wagner M, Cadetg P, Ruf R, Mazzucchelli L, Ferrari P, Redaelli CA. Heme oxygenase-1 attenuates ischemia/ reperfusion-induced apoptosis and improves survival in rat renal allografts. *Kidney Int* 2003;63:15-64-73.
15. Choi BM, Pae HO, Chung HT. Nitric oxide priming protects nitric oxide-mediated apoptosis via heme oxygenase-1 induction. *Free Radic Biol Med* 2003;3-4:1136-45.
16. Amon M, Menger MD, Vollmar B. Heme oxygenase and nitric oxide synthase mediate cooling-associated protection against TNF-alpha-induced microcirculatory dysfunction and apoptotic cell death. *FASEB J* 2003;17:175-85.
17. Ke B, Shen XD, Zhai Y, Gao F, Busuttill RW, Volk HD, et al. Heme oxygenase 1 mediates the immunomodulatory and antiapoptotic effects of interleukin 13 gene therapy in vivo and in vitro. *Hum Gene Ther* 2002;13:1845-57.
18. Goodman AI, Choudhury M, da Silva JL, Schwartzman ML, Abraham NG. Overexpression of the heme oxygenase gene in renal cell carcinoma. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997;214:54-61.
19. Maines MD, Abrahamsson PA. Expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in human prostate: normal, hyperplastic, and tumor tissue distribution. *Urology* 1996;47:727-33.
20. Sahoo SK, Sawa T, Fang J, Tanaka S, Miyamoto Y, Akaike T, et al. Pegylated zinc protoporphyrin: a water-soluble heme oxygenase inhibitor with tumor-targeting capacity. *Bioconjug Chem* 2002;13:1031-8.
21. Pae HO, Oh GS, Choi BM, Chae SC, Kim YM, Chung KR, et al. Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production. *J Immunol* 2004;172:4744-51.
22. Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, et al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 2000;6:422-8.
23. Berberat PO, Katori M, Kaczmarek E, Anselmo D, Lassman C, Ke B, et al. Heavy chain ferritin acts as an antiapoptotic gene that protects livers from ischemia reperfusion injury. *FASEB J* 2003;17:1724-6.
24. Lee PJ, Alam J, Wiegand GW, Choi AM. Overexpression of heme oxygenase-1 in human pulmonary epithelial cells results in cell growth arrest and increased resistance to hyperoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:10393-8.
25. Dennery PA, Sridhar KJ, Lee CS, Wong HE, Shokoohi V, Rodgers PA, et al. Heme oxygenase-mediated resistance to oxygen toxicity in hamster fibroblasts. *J Biol Chem* 1997;272:14937-42.
26. Otterbein L, Chin BY, Otterbein SL, Lowe VC, Fessler HE, Choi AM. Mechanism of hemoglobin-induced protection against endotoxemia in rats: a ferritin-independent pathway. *Am J Physiol* 1997;272:L268-75.
27. Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T, et al. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest* 1999;103:129-35.
28. Clark JE, Green CJ, Motterlini R. Involvement of the heme oxygenase-carbon monoxide pathway in keratinocyte proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;241:215 - 20.
29. Deramaudt BM, Braunstein S, Remy P, Abraham NG. Gene transfer of human heme oxygenase into coronary endothelial cells potentially promotes angiogenesis. *J Cell Biochem* 1998;68:121-7.
30. Tsuji MH, Yanagawa T, Iwasa S, Tabuchi K, Onizawa K, Bannai S, et al. Heme oxygenase-1 expression in oral squamous cell carcinoma as involved in lymph node metastasis. *Cancer Lett* 1999;1-38:53-9.
31. Deininger MH, Meyermann R, Trautmann K, Duffner F, Grote EH, Wickboldt J, et al. Heme oxygenase (HO)-1 expressing macrophages/microglial cells accumulate during oligodendroglioma progression. *Brain Res* 2000;882:1-8.

32. Torisu-Itakura H, Furue M, Kuwano M, Ono M. Co-expression of thymidine phosphorylase and heme oxygenase-1 in macrophages in human malignant vertical growth melanomas. *Jpn J Cancer Res* 2000;9-1:906-10.
 33. Fang J, Sawa T, Akaike T, Akuta T, Sahoo SK, Khaled G, et al. In vivo antitumor activity of pegylated zinc protoporphyrin: targeted inhibition of heme oxygenase in solid tumor. *Cancer Res* 2003;63:3567-74.
 34. Fang J, Akaike T, Maeda H. Antiapoptotic role of heme oxygenase (HO) and the potential of HO as a target in anticancer treatment. *Apoptosis* 2004;9:27-35.
 35. Tanaka S, Akaike T, Fang J, Beppu T, Ogawa M, Tamura F, et al. Antiapoptotic effect of haem oxygenase-1 induced by nitric oxide in experimental solid tumor. *Br J Cancer* 2003;88:902-9.
 36. Dumont A, Hehner SP, Hofmann TG, Ueffing M, Droge W, Schmitz ML. Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CD95-independent, requires the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and the activation of NF-kappaB. *Oncogene* 1999;18:747-57.
 37. Slater AF, Stefan C, Nobel I, van den Dobbela DJ, Orrenius S. Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. *Toxicol Lett* 1995;82/83:149-53.
 38. Vile GF, Tyrrell RM. Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin. *J Biol Chem* 1993;268:14678-81.
-