

# THE EFFECT OF CISPLATIN ON ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS OF HUMAN CERVICAL CANCER CELLS

Hun-Young Kim, MD, PhD<sup>1</sup>, Byoung Ryun Kim, MD<sup>1</sup>, Gang-Deuk Kim, MD<sup>2</sup>, Hyung-Jin Kim, MD<sup>3</sup>

Departments of <sup>1</sup>Obstetrics and Gynecology, <sup>2</sup>Radiology, Institute of Wonkwang Medical Science, Wonkwang University School of Medicine; <sup>3</sup>Department of Microbiology, Vestibulocochlear Research Center, Wonkwang University School of Medicine, Iksan, Korea

## Objective

Cis-diamminedichloroplatinum (cisplatin) is a widely used chemotherapeutic agent. A number of evidences in cytotoxic mechanism of cisplatin, including perturbation of redox status, increase in lipid peroxidation, formation of DNA adduct, have been suggested. The author hypothesized that cisplatin would mediate apoptosis via endoplasmic reticulum (ER) stress in human cervical cancer cell.

## Methods

Human cervical cancer cell line (Hela cells) were treated with cisplatin and then ER stress-related response were performed using western blot, Flow cytometry and fluorescence analysis.

## Results

After addition of cisplatin to Hela cells, the author observed an expression of ER stress response genes through a gradual increase of nitric oxide and cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration. Cisplatin-induced apoptosis can be inhibited by the inducible nitric oxide synthase inhibitor, 1400 W, and intracellular  $Ca^{2+}$  chelator, 1, 2-bis-(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetra-(acetoxymethyl) ester (BAPTA-AM). These inhibitors also reduced mitochondrial apoptotic signals, such as mitochondrion membrane potential disruption, cytochrome c release and eventually reduced the death of Hela cells.

## Conclusion

Taken together, ER would seem to contribute to cisplatin-induced apoptosis via both the early release of  $Ca^{2+}$  and the late amplification of mitochondria-mediated apoptotic signals.

**Keywords:** Cisplatin, Endoplasmic reticulum stress, Cervical cancer cells

소포체(endoplasmic reticulum, ER)는 분비물, 세포막, 골지체와 lysosome이 유기적으로 연관된 지정된 단백질의 합성과 폴딩(folding)에 중요한 부위이다. 소포체는 핵막으로부터 뿜어 나와 가지를 친 것 같은 막성분의 구조로서 세포 내 단백질의 약 1/3이 조면소포체에서 전령 RNA (messenger RNA, mRNA)에서 단백질로 번역 후 폴딩과 조립(assembly), 당화(glycolation) 및 이황화결합(disulfide bond) 등의 수정 과정을 통해 활성형 단백질 구조가 된다[1]. 그러나 생리적 혹은 병리적 환경에 의해 소포체가 처리할 수 있는 능력 이상의 미성숙 단백질이 소포체 내로 유입이 되거나 소포체 내 칼슘이 고갈되면 소포체기능에 장애가 발생하는데 이러한 상태를 소포체 스트레스(ER stress)라고 한다[2]. 소포체 스트레스 경로는 소포체 기능을 보존하기 위한 세포의 중요한 보상기전으로 다양한 세포성 스트레스에서 세포를 보호하기 위하여 활성화되고, 스트레스가 심하면 손상된 세포를 제거하기 위해 세포사멸을 유도한다. 소포체 스트레스 반응은 소포체 막에 존재하는 세 가지의 신호전달체계인 pancreatic ER kinase (PERK), inositol-requiring 1 $\alpha$

(IRE-1 $\alpha$ )/X-box binding protein 1 (XBP-1) 및 activating transcription factor 6 (ATF6)에 의해 매개된다. 스트레스가 없는 상태에서는 소포체 샤페론 BiP는 3개의 감지기의 소포체 내강의 도메인에 결합되어 있다. 폴딩되지 않았거나 잘못 폴딩된 단백질이 소포체 내에 축적되면, 소포

Received: 2010.10.11. Revised: 2010.12. 8. Accepted: 2010.12.27.  
Corresponding author: Hun-Young Kim, MD, PhD  
Department of Obstetrics & Gynecology, Wonkwang-Gunsan Medical Center, 29-1 Jigok-dong, Gunsan 573-713, Korea  
Tel: +82-63-472-5050 Fax: +82-63-855-2386  
E-mail: vaginakim@hanmail.net

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2011. Korean Society of Obstetrics and Gynecology

체 스트레스 감지기에서부터 BIP가 분리되어 비정상적인 단백질에 결합하면서 소포체스트레스 감지기의 활성화를 유도한다[3-6]. 이러한 소포체 스트레스 감지기의 활성화는 새로운 단백질의 합성을 감소시키거나 폴딩되지 않거나 잘못 폴딩된 단백질을 분해하는 과정을 거치며 이러한 과정으로도 극복하지 못하는 소포체 스트레스는 세포사멸 경로는 활성화하여 손상된 세포를 제거한다[7,8].

자궁경부암은 매우 높은 발생빈도를 보이는 종양으로서 수술요법 이외에 항암화학요법이 시행되어 왔다.

시스플라틴은 다양한 암의 치료에 널리 사용되고 있는 유용한 항암제로 암세포들의 세포사멸을 유도함이 잘 알려져 있다[9]. 하지만 시스플라틴이 이러한 항암효과를 나타내는 기작으로는 활성산소종의 증가, DNA의 손상 및 미토콘드리아의 기능저하들만의 연구에 대부분 국한되어 왔으며 소포체에 미치는 영향은 아직까지 분명히 밝혀져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 시스플라틴에 의한 자궁경부암 세포의 세포사멸에 있어 소포체 스트레스가 관여여부와 소포체와 미토콘드리아의 상호 작용에 미치는 시스플라틴의 영향을 조사하고 이에 대한 기전을 연구하였다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 세포주

인간 자궁경부암 세포주인 Hela 세포는 한국세포주은행(Korean Cell line Bank, Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 실험에 사용하였다.

#### 2) 시약

Dulbecco's modified essential medium (DMEM), 항생제, trypsin 및 우태아 혈청은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA) 제품을, 배양용기(24 well plate와 10 cm dish)는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. JC-1은 Molecular probe사(Eugene, OR, USA)에서 구입하여 사용하였고, 시스플라틴, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma사(St. Louis, Missouri, USA)에서, anti-inducible nitric oxide synthase (iNOS), anti-XBP1, anti-ATF6, anti-CHOP (C/EBP homologous protein) 및 anti- $\beta$ -actin antibody는 Santa cruz biotechnology Inc. (California, CA, USA)로부터 구입하였으며 기타 사용된 모든 시약은 분석 등급으로 Sigma와 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다.

### 2. 방법

#### 1) Hela 세포주 배양 및 시약처리

인간 자궁경부암 세포주인 Hela 세포는 10% 우태아 혈청이 포함된 DMEM 세포배양액으로 5% CO<sub>2</sub>, 95% 대기공기 및 37°C 조건의 세포배

양기에서 배양하였으며 2-3일 간격으로 계대 배양하여 log phase에 있는 세포에 시스플라틴을 처리한 뒤 세포자멸사 현상과 이에 연관된 생화학적 실험을 수행하였다.

#### 2) 세포생존율 측정

세포생존율은 MTT 방법으로 측정하였다. 세포( $1 \times 10^5$ /mL)는 세포 배양판(24-well plate)에 0.5 mL씩 분주하여 12시간 이상 CO<sub>2</sub> 세포 배양기에서 부착시킨 후, 시료를 각각의 조건에 따라 처리하였다. 이들 동안 배양한 후 여기에 MTT 용액(5 mg/mL in phosphate buffered solution [PBS])을 배양액 최종부피의 1/100이 되도록 첨가하였다. 반응 4시간 후 상층액을 제거한 후 바닥에 부착된 불용성의 보라색 formazan을 완전히 건조시킨 후 여기에 500  $\mu$ L의 DMSO로 용해시킨 다음 분광광도계(ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 정상 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

#### 3) Western blot

시스플라틴이 처리된 세포를 용해한 다음 단백질을 블레드포드 방법에 따라 정량하고 50  $\mu$ g을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis로 분리한 다음 transfer solution (20% methanol, 25 mM Tris, 192 mM glycine, pH 8.3)을 이용해 nitrocellulose membrane에 분리된 단백질을 전사시켰다. 비특이반응을 제거하기 위해서 5% 비지방 skim milk가 함유된 Tris-buffered saline (TBS)로 4°C에서 2시간 이상 충분히 흔들면서 방치하였다. 그 후 0.05% (v/v)의 tween-20이 함유된 TBS (TBS-T)로 3회 세척하고 iNOS, ATF6, XBP-1, CHOP,  $\beta$ -actin에 대한 항체를 TBS-T에 1:1,000으로 희석 주입하여 3시간 실온에서 반응한 후 충분히 세척하고 horse radish peroxidase가 부착된 anti-goat IgG (1:2000)을 주입하고 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. Membrane은 TBS-T로 충분히 세척하고 통상적인 enhanced chemiluminescence kit (ECL kit, Amersham, Buckinghamshire, England)를 이용하여 현상하였다.

#### 4) Flow cytometry 분석

세포 내 칼슘 농도를 측정하기 위하여 시스플라틴을 처리한 세포에 Fluo-3 AM (5  $\mu$ M)을 처리한 후 실온에서 45분간 반응시킨 다음 유식세포분석기(Facial Action Coding System [FACS] antage flow cytometry; Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA)를 이용하여 형광의 세기를 측정하였다. 또한 시스플라틴에 의한 세포자멸사 현상의 확인을 위해 수집한 세포에 propidium iodide (PI) 용액 (0.1% Triton X-100, 20  $\mu$ g/mL PI, 200  $\mu$ g/mL RNase)을 600  $\mu$ L를 넣고 20분간 반응한 후  $1 \times 10^5$  세포를 유식세포분석기로 sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>으로 나타나는 세포자멸사를 분석하였다. 유식세포분석에서 얻은 정보 분석은 Cell Quest software (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하였다.

## 5) DNA 추출 및 전기영동

DNA 분절현상을 조사하기 위한 genomic DNA 추출은 Wizard Genomic DNA purification kit를 이용하였다. 먼저 시스플라틴을 처리한 세포를 수집하고 nuclear lysis buffer (100 mM NaCl<sub>2</sub>, 40 mM Tris-HCl, 20 mM ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA], 0.5% SDS)와 반응시켜 세포를 파쇄한 후 RNase를 37°C에서 5분 처리하여 RNA를 제거하였다. 단백질을 침전용 완충용액으로 단백질을 제거한 핵 추출물은 isopropanol 침전을 이용하여 DNA를 응축한 후 70% 에탄올에 세척하여 실온에서 건조하였다. DNA 정량은 응축된 DNA pellet에 TE 완충용액(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)을 첨가하여 용해한 후 260 nm와 280 nm 파장의 spectrophotometer (Beckman, Du-7 Model, Palo Alto, CA, USA)를 이용한 흡광도 측정으로 결정하였다. DNA 5 µg은 1.8% agarose gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV 등을 이용하여 DNA 분절을 관찰하였다.

## 6) DAPI 및 TUNEL 염색

세포핵의 형태적 변화를 조사하기 위하여 Hela 세포에 시스플라틴을 처리한 후 PBS, pH 7.4로 2회 세척하였다. 그 다음 세포를 4% formaldehyde 용액에 고정시킨 후 10 µM 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)로 10분 염색하였다. 또한 시스플라틴에 의한 세포자멸사를 확인하기 위하여 *in situ* apoptosis detection kit (ApopTag; Oncor Inc. Gaithersburg, MD, USA), fluorescein (Roche Molecular Biochemical, France)을 사용하여 Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) 염색을 시행하였다. Hela 세포에서 TUNEL 염색을 시행하기 위하여 enzyme solution과 label solution을 1:50의 비율로 45분간 형광 발색하였다. 발색이 종료되면 PBS로 세척하고 counting media로 봉입하고 형광현미경하에서 관찰하였다.

## 7) 미토콘드리아 막전위 측정

세포 내 소기관의 하나인 미토콘드리아의 막전위(membrane potential)의 변화를 조사하기 위하여 JC-1 염색을 시행하였다. 시스플라틴이 처리된 세포들을 PBS로 2회 세척한 후 JC-1 (10 µg/mL)을 각각 DMEM 배지에 희석한 후 20분간 37°C, CO<sub>2</sub> 배양기에서 반응시킨 다음 형광현미경으로 관찰하였다.

## 8) 통계 처리

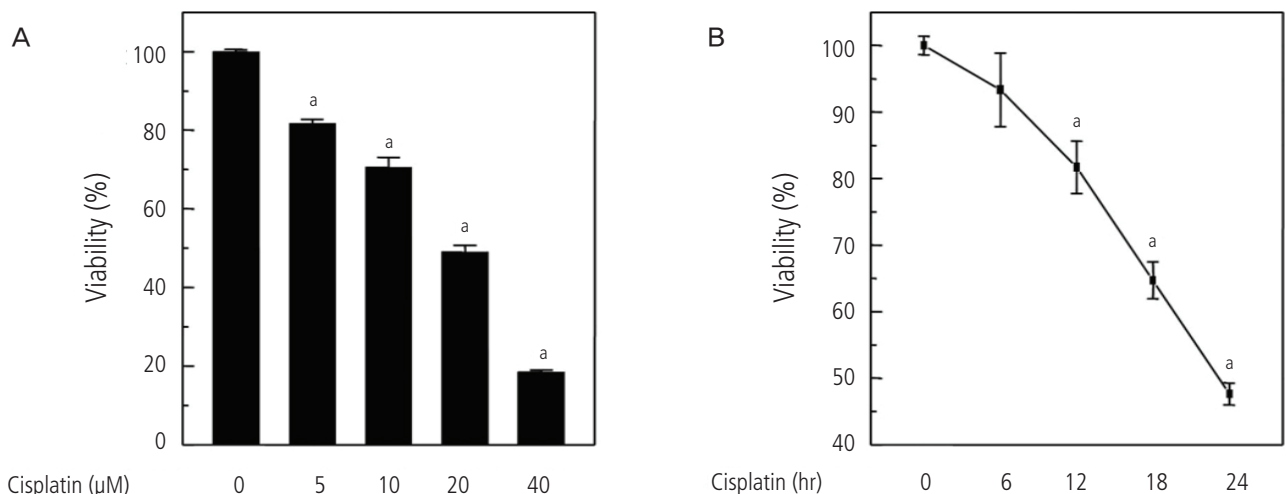
표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이며, 이들의 평균(mean)과 표준편차(standard deviation, SD)를 산출하여 결과를 표시하였다. 실험결과의 통계처리는 Student's *t*-test에 준하여 처리하였으며 *P*-value가 최대치 0.05 (*P* < 0.05) 미만인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

## 결 과

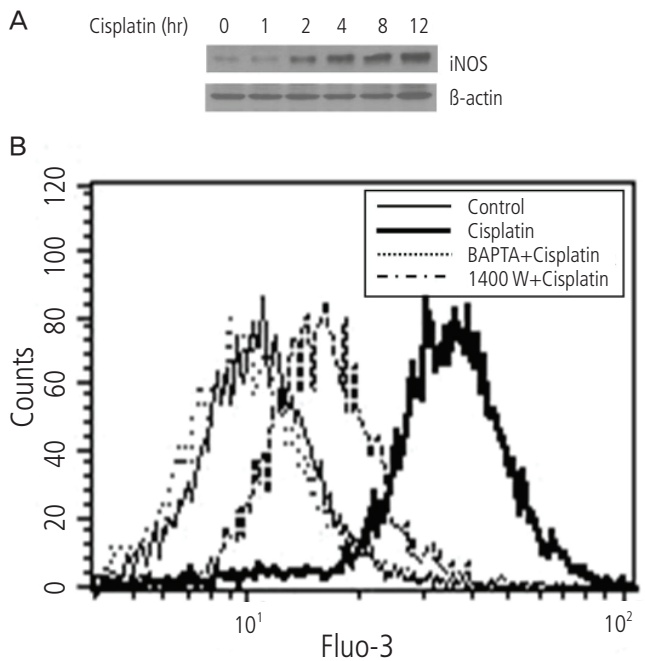
## 1. 시스플라틴이 Hela 세포의 생존율에 미치는 영향

암치료를 널리 사용되고 있는 항암제인 시스플라틴의 항암효능기전을 알아보기 위하여 본 실험에서는 일차적으로 인간 자궁경부암 세포인 Hela 세포를 이용하여 시스플라틴에 의한 세포독성을 확인하였다. 먼저 다양한 농도의 시스플라틴을 24시간 동안 처리 후 세포 생존율을 MTT 방법으로 조사한 결과 시스플라틴은 농도 의존적으로 Hela 세포의 생존율을 저하시켰으며 20 µM 농도에서 약 50% 정도의 세포사멸을, 40 µM 농도에서는 약 80% 정도의 세포 사멸을 유도하였다(Fig. 1A).

또한 20 µM 농도의 시스플라틴을 다양한 시간대별로 처리할 경우 시간 의존적으로 Hela 세포의 생존율이 감소했으며 약 18시간 동안 시스플라틴을 첨가한 세포에서 약 50% 정도의 세포사멸이 유도되었다(Fig.



**Fig. 1.** Cisplatin decreased the viability of Hela cells in a dose- and time-dependent manner. Cells were treated with various concentrations of cisplatin for 24 hr (A) and with 20 µM cisplatin for various periods (B). Then, cell viability was determined by 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Data represents the mean±standard deviation of three independent experiments. <sup>a</sup>*P*<0.05 compared with control.

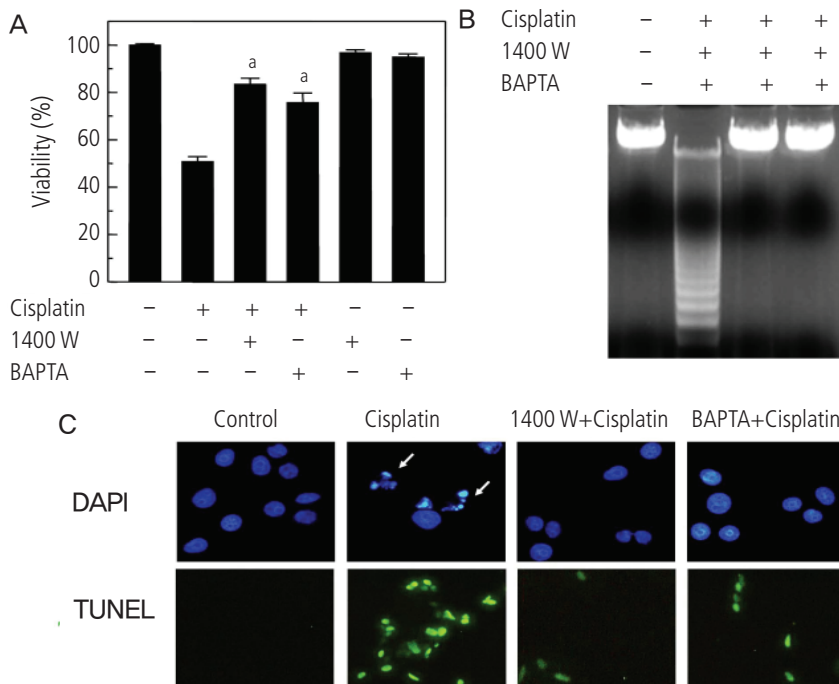


**Fig. 2.** Cisplatin increased intracellular nitric oxide and Calcium concentration in Hela cells. Cells were treated with cisplatin for various times. Then, western blot analysis was performed with specific antibodies for inducible nitric oxide synthase and  $\beta$ -actin (A). Cells were treated with cisplatin in the absence or presence of 1, 2-bis-(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetra-(acetoxymethyl) ester (BAPTA-AM) and 1400 W. Then, the cells were incubated with Fluo-3AM and subjected to flow cytometry (B).

1B). 이상의 결과에서 시스플라틴은 Hela 세포에서 처리 농도 및 시간의 존적으로 세포독성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

## 2. 시스플라틴이 iNOS의 발현과 세포 내 칼슘농도에 미치는 영향

소포체는 세포 내 칼슘이온 저장소로서 칼슘이온 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 한다. 하지만, 과량의 산화질소 등에 의해 세포 내 칼슘 농도가 높아지면 소포체 칼슘이온의 항상성이 파괴되어 소포체 기능이 저하된다. 이와 같이 소포체의 기능의 장애 시 세포는 생존을 위하여 세포사멸을 초래한다[10]. 따라서, 시스플라틴이 산화질소를 증가시키는지 확인하기 위하여 Hela 세포에 20  $\mu$ M의 시스플라틴을 시간별로 처리한 후 세포 내 iNOS의 단백질 발현을 western blot으로 조사하였다. 그 결과 시스플라틴 처리에 의하여 12시간대까지 시간의존적으로 iNOS의 발현이 증가됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2A). 또한, 시스플라틴에 의한 산화질소의 증가가 세포 내 칼슘 농도의 증가와 관련이 있는지를 확인하기 위하여 시스플라틴을 6시간 동안 처리한 후 Fluo-3AM을 이용하여 염색한 후 유식세포분석기로 세포 내 칼슘이온의 농도를 측정하였다. 그 결과 시스플라틴 처리에 의하여 Hela 세포 내의 칼슘이온의 농도가 증가하였으며 이러한 현상은 iNOS의 특이적 활성억제제인 1400 W (1  $\mu$ M)와 세포 내 칼슘이온 소거제인 1, 2-bis-(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetra-(acetoxymethyl) ester (BAPTA-AM), 5  $\mu$ M을 30분 전처리한 세포들에서 억제되었다(Fig. 2B). 따라서, 시스플라틴이 과량의 산화질소를 초기 시간대에 유도하고 그에 따라 세포 내 칼슘이온의 농도를 증가시킴을 확인할 수 있었다.



**Fig. 3.** Effects of nitric oxide and calcium on cisplatin cytotoxicity. Cells were treated with cisplatin in the absence or presence of 1, 2-bis-(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetra-(acetoxymethyl) ester (BAPTA-AM) and 1400 W. Cell viability was determined by 3-(4, 5-dimethylthiazolyl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (A). DNA fragmentation was determined by agarose-gel electrophoresis. Extracted DNA was stained with ethidium bromide and visualized under ultraviolet (UV) light (B). After stimulation, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and then stained with 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL). Cells were observed under a fluorescent microscope, magnification  $\times 100$  (C). <sup>a</sup> $P < 0.05$  compared with control.



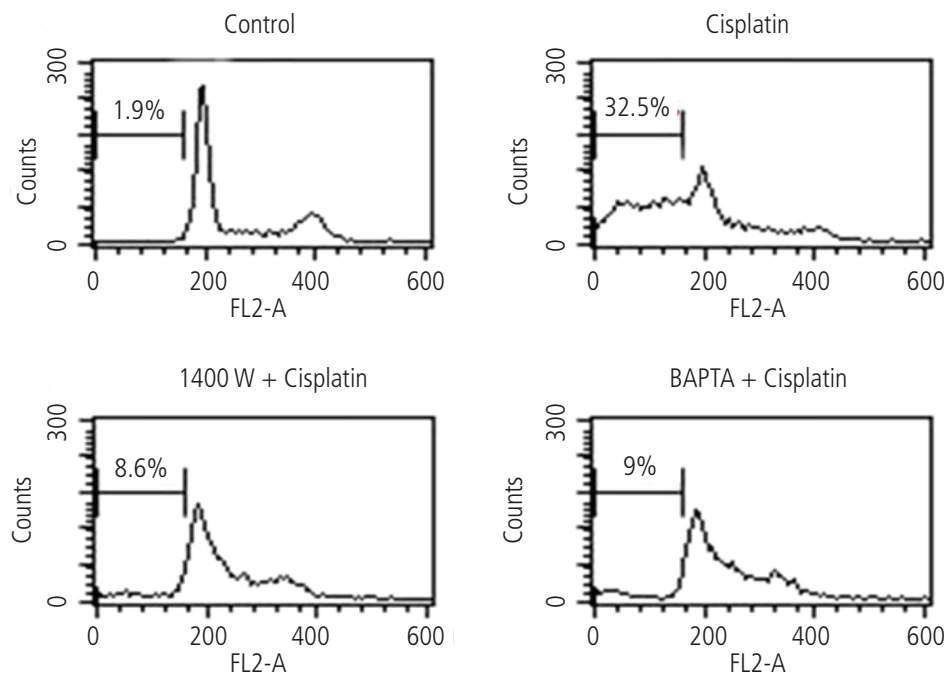
### 3. 산화질소와 칼슘이 시스플라틴에 의한 세포죽음에 미치는 영향

Hela 세포에서 시스플라틴의 독성이 과량의 산화질소와 그에 따른 세포 내 칼슘이온의 농도를 증가와 관련이 있는지를 확인하기 위하여 iNOS의 특이적 활성억제제인 1400 W와 세포 내 칼슘이온 소거제인 BAPTA-AM를 전처리한 후 시스플라틴에 의한 세포독성을 MTT 방법으로 측정하였다. 그 결과, 시스플라틴에 의한 세포독성이 iNOS의 특이적 활성억제제인 1400 W (iNOS inhibitor) (1  $\mu$ M) 와 세포 내 칼슘이온 소거제인 BAPTA-AM (5  $\mu$ M)를 전처리한 세포에서 통계적으로 유의성 있게 억제됨을 확인하였다(Fig. 3A). 시스플라틴에 의한 세포 죽음이 세포 고사 기전에 의한 것인지를 형태학적으로 관찰하기 위하여 Hela 세포의 genomic DNA를 분리하여 agarose gel에 전기영동한 결과 시스플라틴을 처리하지 않은 실험군에서는 세포고사의 전형적 특징인 사다리 모양의 DNA 분절(ladder-pattern fragmentation)이 관찰되지 않은 반면 20  $\mu$ M의 시스플라틴을 24시간 처리한 실험군에서는 사다리 모양의 DNA 분절이 관찰되었다. 시스플라틴에 의한 이러한 DNA 분절현상은 1400 W와 BAPTA-AM을 전처리한 세포에서 현저히 억제되었다(Fig. 3B). 또한 Hela 세포의 핵을 DAPI로 염색 시 대조군의 세포핵은 타원형의 균질한 형광 염색을 나타내었으나 시스플라틴 처리군의 세포핵은 여러 조각으로 분절된 형광 절편이 관찰되었으며 TUNEL 염색에 있어서도 다수의 TUNEL 양성세포들이 시스플라틴 처리군에서 관찰되었다. 이러한 현상들은 다시 1400 W와 BAPTA-AM을 전처리한 세포에서 현저히 감소되었다(Fig. 3C). 1400 W나 BAPTA-AM만을 처리한 세포에서는 DNA 분절과 TUNEL 양성세포들이 관찰되지 않았다(데이터 보여주지 않음). 시스플라틴의 세포독성이 과량의 산화질소와 그에 따른 세포 내 칼슘이온의 농도를 증가와 관련이 있는지를 확인하기 위하여 시스플라틴으로 자극되어진 세포들을 PI로 염색하여 유식세포분석기로 측정하였다. 그 결

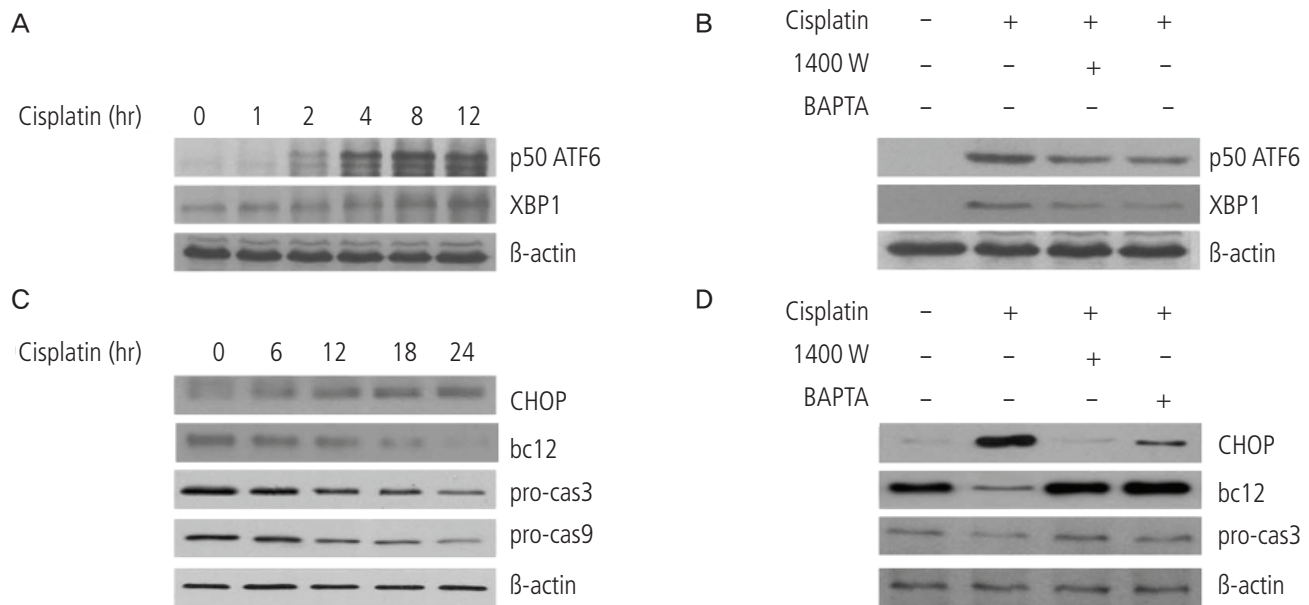
과 대조군의 sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> DNA 분획은 1.9%이었으나 20  $\mu$ M의 시스플라틴을 24시간 처리한 실험군에서는 32.5%로 현저히 증가하였으며 iNOS의 특이적 활성억제제인 1400 W를 전처리한 세포(8.6%)와 세포 내 칼슘이온 소거제인 BAPTA-AM를 전처리한 세포(9%)에서는 세포생존율과 유사하게 감소되었다(Fig. 4). 이상의 결과들을 볼 때 시스플라틴에 의한 과량의 산화질소와 그에 따른 세포 내 칼슘이온의 농도 증가가 Hela 세포의 세포고사를 유도함을 알 수 있다.

### 4. 시스플라틴이 소포체 스트레스에 미치는 영향

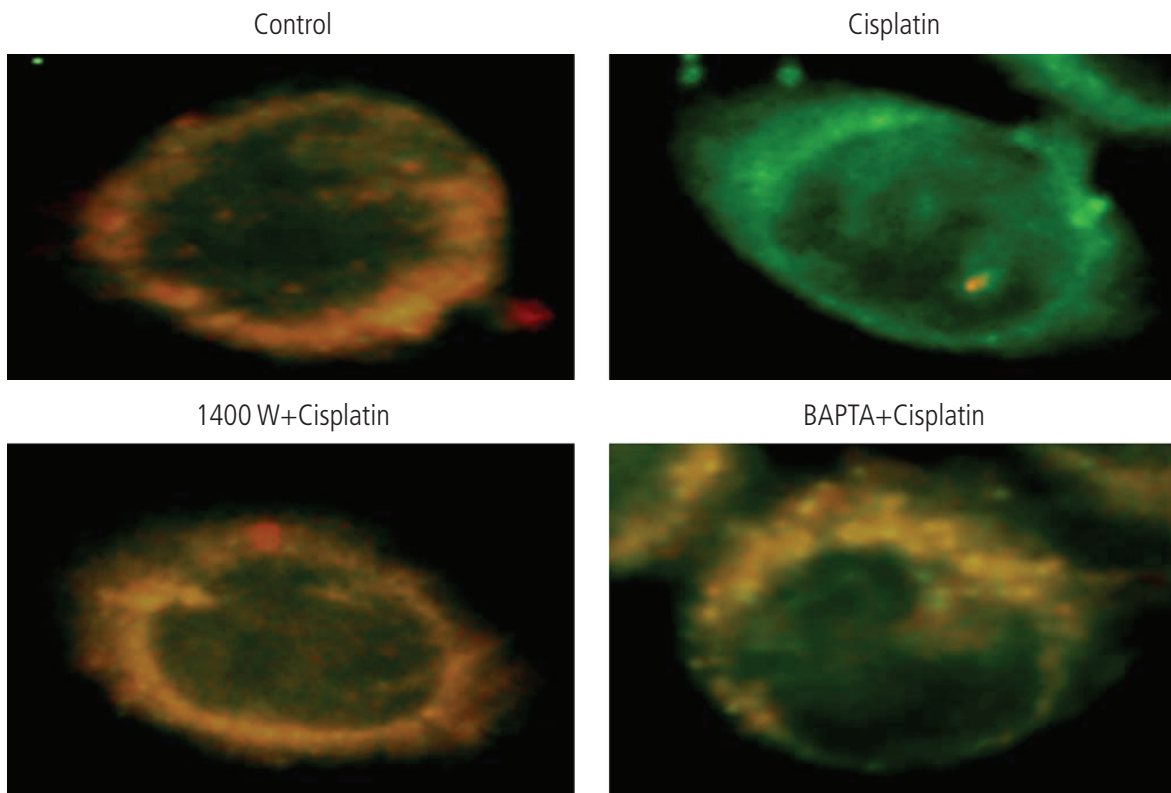
과량의 산화질소는 소포체 칼슘 이온의 항상성을 방해함으로써 소포체 스트레스를 유도한다. 소포체 스트레스 반응과정은 소포체 기능을 회복하고 유지하기 위해 활성화되며 여기에는 3개의 소포체 스트레스 감지기(Ire1, ATF6, PERK)가 관여한다[11-13]. 따라서, 시스플라틴에 의한 산화질소와 세포 내 칼슘의 증가가 소포체 스트레스 감지기를 활성화시키는지를 확인하기 위하여 3개의 소포체 스트레스 감지기의 활성화를 시스플라틴을 처리한 세포에서 Western blotting 방법을 이용하여 확인해 보았다. 그 결과 20  $\mu$ M의 시스플라틴을 시간별(1시간에서 12시간)로 처리한 결과 2시간대부터 활성형 ATF6 (p50 ATF6)의 발현이 증가하였고 12시간까지 시간의존적으로 증가됨을 확인하였다(Fig. 5A). 그러나, 다른 소포체 스트레스(ER stress) 감지기인 Ire1과 PERK의 활성화는 관찰되지 않았다(데이터 보여주지 않음). 또한 ATF6의 활성화에 의해 발현이 증가된다고 알려진 활성형 XBP-1의 발현도 시스플라틴 처리 후 8시간대부터 12시간까지 현저하게 증가됨을 확인하였다(Fig. 5A). 이러한 활성형 ATF6와 XBP-1의 발현의 증가가 시스플라틴에 의한 과량의 산화질소와 세포 내 칼슘이온의 농도 증가와 관련이 있는지를 확인하기 위하여 iNOS의 특이적 활성억제제인 1400 W와 세포 내 칼슘이



**Fig. 4.** Effects of nitric oxide and calcium on cisplatin induced apoptotic population. Cells were treated with cisplatin in the absence or presence of 1, 2-bis-(o-aminophenoxy)ethane-N,N',N'-tetraacetic acid tetra-(acetoxymethyl) ester (BAPTA-AM) and 1400 W. Then, cells were stained with propidium iodide staining solution and analyzed by flow cytometry.



**Fig. 5.** Effects of nitric oxide and calcium on cisplatin induced endoplasmic reticulum (ER) stress. Cells were treated with cisplatin for various times. Then, Western blot analysis was performed with specific antibodies for activating transcription factor 6 (ATF6), X-box DNA-binding protein 1 (XBP1) (A), and C/EBP homologous protein (CHOP), B-cell lymphoma 2 (Bcl2), pro-caspase-3 and pro-caspase-9 (C). Cells were treated with cisplatin in the absence or presence of 1, 2-bis-(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetra-(acetoxymethyl) ester (BAPTA-AM) and 1400 W. Then, Western blot analysis was performed with specific antibodies for ATF6, XBP-1 (B), and CHOP, Bcl2, pro-caspase-3 (D).



**Fig. 6.** Effects of nitric oxide and calcium on cisplatin induced the mitochondrial membrane potential transition. Cells were treated with cisplatin in the absence or presence of 1, 2-bis-(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA-AM) and 1400 W. Then, cells were stained with 5,5',6,6'-tetra chloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1) for 30 min at 37°C. Membrane potential transition was visualized under a fluorescent microscope ( $\times 200$ ).

온 소거제인 BAPTA-AM를 전처리한 후 ATF6와 XBP-1의 발현 양상을 조사하였다. 그 결과 시스플라틴에 의해 증가된 활성형 ATF6와 XBP-1의 발현의 증가가 1400 W와 BAPTA-AM를 전처리한 세포에서 현저히 감소되었다(Fig. 5B). C/EBP homologous protein (CHOP)/growth arrest and DNA damage inducible proteins (GADD153)은 생리적 상태에서는 저농도로 발현되나, 세포 스트레스 반응에서는 전사단계에서 발현이 증가되어 세포사멸을 유도한다. 특히 과량의 CHOP 발현은 anti-apoptotic molecule Bcl-2 발현을 하향조절하고, 세포질로부터 미토콘드리아 내에 세포사멸 신호를 전달한다고 보고되었다[14]. 따라서, 시스플라틴에 의한 CHOP과 Bcl-2 발현 양상을 Hela 세포에서 확인해 본 결과 시스플라틴 처리 후 24시간까지 시간의존적으로 CHOP의 발현은 현저하게 증가되는 반면 Bcl-2 발현은 하향 조절되었다. 또한 비슷한 양상으로 caspase 9과 caspase 3를 활성화시켰다(Fig. 5C). 시스플라틴에 의한 CHOP 발현의 증가와 caspase 9과 caspase 3의 활성화는 다시 iNOS의 특이적 활성억제제인 1400 W와 세포 내 칼슘이온 소거제인 BAPTA-AM를 전처리한 세포에서 감소되었으며 동시에 Bcl-2 발현은 대조군과 비슷하게 상향 조절되었다(Fig. 5D).

### 5. 시스플라틴이 미토콘드리아의 막전위에 미치는 영향

세포 스트레스를 비롯한 다양한 스트레스에 의한 세포고사 신호전달 기전에 있어서 미토콘드리아는 치명적인 손상을 입는다. 미토콘드리아는 세포 자극에 의한 세포죽음의 신호를 감지하고 이를 증폭하여 하방의 세포고사 신호전달 전달계를 활성화시킨다. 미토콘드리아의 세포고사 신호전달에 있어 미토콘드리아의 막전위의 변화가 중요하며, 막전위가 상실되었을 때 세포고사 기전의 활성화가 유도된다. JC-1 염색은 미토콘드리아의 막전위의 변화에 의해 정상세포일 경우 미토콘드리아 내로 들어가서 다복합체를 형성하여 주황색으로 나타나고, 막전위 차에 변화가 오면 세포질에 남아 녹색을 나타낸다. 따라서, 시스플라틴에 의한 Hela 세포의 미토콘드리아 막전위 변화를 확인하기 위해 JC-1 염색을 시행한 후 형광현미경으로 형태학적인 변화를 관찰한 결과 정상대조군의 주황색 형광이 시스플라틴을 처리한 군에서는 녹색형광으로 변화하였다. 또한, iNOS의 특이적 활성억제제인 1400 W와 세포 내 칼슘이온 소거제인 BAPTA-AM를 전처리한 세포에서는 다시 정상대조군과 비슷하게 주황색 형광이 보여지는 것으로 보아 시스플라틴에 의한 산화질소의 증가와 그에 따른 세포 내 칼슘이온의 증가가 직접적으로 미토콘드리아의 막전위 변화에 직접적으로 영향을 미치는 것으로 생각된다(Fig. 6).

## 고 찰

자궁경부암은 우리나라 부인 암 중에서 매우 높은 발생빈도를 보이는 종양으로서 수술요법 이외에 항암화학요법이 시행되어 왔다.

세포는 핵막으로부터 뻗어 나와 가지를 친 것 같은 막성분의 구조로서 리보솜이 붙어있는 조면소포체와 리보솜이 없는 활면소포체(sER)

의 두 가지가 있다. 세포 내 단백질의 약 1/3이 조면소포체에서 전령 RNA (mRNA)에서 단백질로 번역 후 수정되어 활성형 단백질 구조가 된다. 또한 활면소포체는 지질과 스테롤의 합성장소이며 칼슘 저장소로 세포 내 칼슘 농도를 조절하는 데 중요한 역할을 한다. 소포체 내에 비정상적인 단백질이 축적되거나 칼슘이온의 항상성이 파괴되면 소포체 기능이 저하되며 이런 상태를 소포체 스트레스라고 한다[15]. 소포체 스트레스에 의한 세포사멸 경로의 활성화는 혈관질환을 포함한 다양한 질환에서 보고되었다. 저혈당은 단백질의 변형을 방해하고, 저산소증과 허혈성 재관류는 산화환원 의존성 단백질 폴딩 과정을 방해한다[16,17]. 또한 소포체 스트레스 경로는 허혈성 질환에서 활성화되며 산화환원 조절 장애와 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 증가와도 연관이 있다. 소포체에서 많은 cysteine은 S-S 결합을 형성하기 위해 산화된다. 그러나 이 반응에서 생성된 전자는 산소분자로 전달되어 세포의 환원력을 증가시키지 못한다. 게다가 잘못 폴딩된 단백질의 S-S 결합은 세포질로 역전위 되기 전에 환원되어야 하므로 소포체는 많은 양의 환원력을 소모한다. 이와 같이 소포체 기능은 세포 내 산화환원 상태에 매우 의존적이므로 산화적 스트레스는 소포체 스트레스의 가장 중요한 유도인자이며 촉진인자이다[18,19].

본 연구에서 사용한 시스플라틴은 백금원자를 함유하는 무기 착화합물로서 종래의 항암제의 어느 부류에도 속하지 않는 새로운 항암제로 각종 인체암(고환암, 방광암, 전립선암, 난소암, 위암 등)에 대한 뛰어난 효능을 지닌 항암제이다. 시스플라틴은 암세포의 DNA에 비가역적으로 반응하여 guanine residue 사이에 intra, inter-strand crosslink를 형성함으로써 암세포를 죽이거나 반응성 활성산소종을 생성 방출하여 손상을 야기하는 최소 2가지 이상의 손상기전이 작용하고 있다고 보고되었다. 이러한 과정들은 결국 세포고사(apoptosis)를 초래한다[20-22]. 그러나 세포고사를 유도하는 신호전달경로가 명확히 밝혀져 있지 않아 종양 치유의 관점에서 종양 세포의 세포고사 유도인자, 신호전달 경로 그리고 관련된 유전자와 단백질을 연구하여 항암제의 항암 기전을 규명하고자 하는 많은 연구가 이루어지고 있다. 따라서, 본 연구에서는 시스플라틴이 자궁경부암 세포주 Hela 세포에서 세포고사를 유발하는 신호전달 과정에 소포체 스트레스가 관여하는지의 여부를 알아보기 위하여 수행하였다. 먼저 시스플라틴은 Hela 세포주에 농도와 시간의존적으로 세포독성을 나타냈으며, 그 기전이 세포고사 기전에 의해서 매개됨을 핵의 분절, sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> DNA 분획의 증가, TUNEL 양성세포들의 증가 등을 통하여 확인하였다. 또한 iNOS의 특이적 활성억제제인 1400 W와 세포 내 칼슘이온 소거제인 BAPTA-AM를 전처리한 세포들에서는 시스플라틴에 의한 세포독성이 감소됨을 확인하였다. 시스플라틴을 처리한 세포에서 후 소포체 스트레스와 관련된 단백질의 발현 양상을 확인해 본 결과 초기 시간대에 활성형 ATF6의 발현이 증가하였고 그에 따라 활성형 XBP-1의 발현이 증가하였다. 이러한 소포체 스트레스 관련 단백질들의 발현은 소포체 스트레스를 줄이기 위해 비교적 초기 시간대에 발현한다. 이러한 단백질들에 의해서도 소포체 스트레스가 해결되지 못하면 세포는 CHOP 단백질의 발현을 증가시킴으로써 세포사멸을 유도함이 잘 알려져 있다. Hela 세포에서도 시스플라틴 처리에 의해 비교적 늦

은 시간대에 CHOP의 발현이 증가됨을 확인하였다. Xue 등[19]의 연구에 의하면 murine fibrosarcoma L929 세포에서 활성 산소종(ROS)이 축적되면 활성 산소종에 의존적으로 eIF2 $\alpha$  인산화, ATF6, XBP-1 splicing이 증가함을 보여주었다. 이 경우에도 활성 산소종이 특이적으로 소포 스트레스 감지기 중 오직 ATF6만을 활성화시켰다. 본 실험에서도 시스플라틴에 의해 증가된 활성산소종이 ATF6의 활성화만을 유도하였으며 이는 각각의 소포체 스트레스가 특이적으로 하부 소포체 스트레스 신호 전달체계에 영향을 줄 수 있음을 시사한다. 세포고사 중요 작용기전의 하나인 caspase family는 정상적으로 세포 내에 불활성화 형태로 존재하다가 세포고사 유도 시 활성화되어 세포고사의 특징적인 현상을 초래한다. 본 연구에서도 시스플라틴 처리 시 자궁경부암 세포인 Hela 세포에서 CHOP 단백질의 발현과 더불어 후기 시간대에 caspase-9과 caspase-3가 활성화됨을 확인하였다. 이러한 현상들은 다시 iNOS의 특이적 활성억제제인 1400 W와 세포 내 칼슘이온 소거제인 BAPTA-AM를 전처리한 세포들에서는 모두 억제되었다. 따라서, 시스플라틴에 의한 소포체 스트레스와 세포자멸사 현상은 과량으로 생성되는 산화질소와 세포 내 칼슘 이온 농도의 증가에 따른 소포체 내 칼슘이온의 항상성에 문제가 발생하여 발생됨을 확인하였다. Bcl-2 단백질 군은 세포자멸사에서 미토콘드리아의 기능을 조절함으로써 세포고사를 조절하는 것으로 알려져 있다. Bcl-2 단백질의 발현 양 또는 세포질에서 미토콘드리아로의 이동이 미토콘드리아의 막전위에 영향을 주며, 세포자멸사 신호전달에서 이러한 변화가 미토콘드리아의 내막과 외막 사이에 존재하는 cytochrome c의 세포질 내 방출을 유도함으로써 세포자멸사를 활성화시킨다. 시스플라틴에 의한 자궁경부암 세포의 세포자멸사 현상에서도 미토콘드리아의 변화를 관찰할 수 있었다. 시스플라틴은 항세포자멸사 단백질인 Bcl-2의 양을 감소시켰으며 미토콘드리아의 막전위 차를 유도하였다. 시스플라틴에 의한 미토콘드리아의 변화들도 iNOS의 특이적 활성억제제인 1400 W와 세포 내 칼슘이온 소거제인 BAPTA-AM를 전처리한 세포들에서는 모두 대조군과 같은 양상으로 회복됨을 확인하였다. 이러한 결과들을 종합하면, 시스플라틴이 자궁경부암 세포의 세포자멸사를 유도하는 데 있어 과량의 산화질소와 세포 내 칼슘 이온의 항상성이 중요한 역할을 하고 있으며 그에 따른 소포체 스트레스가 매우 밀접한 관련이 있음을 시사한다.

## Acknowledgements

이 논문은 2011년도 원광대학교 교비지원에 의해 수행됨.

## References

1. Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 1999;13:1211-33.
2. Mori K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 2000;101:451-4.
3. Baltzis D, Pluquet O, Papadakis AI, Kazemi S, Qu LK, Koromilas AE. The eIF2 $\alpha$  kinases PERK and PKR activate glycogen synthase kinase 3 to promote the proteasomal degradation of p53. *J Biol Chem* 2007;282:31675-87.
4. Bobrovnikova-Marjon E, Diehl JA. Coping with stress: ATF6 $\alpha$  takes the stage. *Dev Cell* 2007;13:322-4.
5. Gass JN, Jiang HY, Wek RC, Brewer JW. The unfolded protein response of B-lymphocytes: PERK-independent development of antibody-secreting cells. *Mol Immunol* 2008;45:1035-43.
6. Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshoda H, et al. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6 $\alpha$  and XBP1. *Dev Cell* 2007;13:365-76.
7. Endo H, Murata K, Mukai M, Ishikawa O, Inoue M. Activation of insulin-like growth factor signaling induces apoptotic cell death under prolonged hypoxia by enhancing endoplasmic reticulum stress response. *Cancer Res* 2007;67:8095-103.
8. Henshall DC, Murphy BM. Modulators of neuronal cell death in epilepsy. *Curr Opin Pharmacol* 2008;8:75-81.
9. Fram RJ. Cisplatin and platinum analogues: Recent advances. *Curr Opin Oncol* 1992;4:1073-9.
10. Oyadomari S, Araki E, Mori M. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis* 2002;7:335-45.
11. Harding HP, Zhang Y, Ron D. PERK is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* 2000;5:897-904.
12. Wang XZ, Harding HP, Zhang Y, Jolicoeur EM, Kuroda M, Ron D. Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J* 1998;17:5708-17.
13. Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem* 1998;273:33741-9.
14. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 2004;11:381-9.
15. Chami M, Oulès B, Szabadkai G, Tacine R, Rizzuto R, Paterlini-Bréchet P. Role of SERCA1 Truncated Isoform in the Proapoptotic Calcium Transfer from ER to Mitochondria during ER Stress. *Mol Cell* 2008;32:641-51.
16. Qi X, Vallentin A, Churchill E, Mochly-Rosen D. deltaPKC participates in the endoplasmic reticulum stress-induced response



- in cultured cardiac myocytes and ischemic heart. *J Mol Cell Cardiol* 2007;43:420-8.
17. Tajiri S, Oyadomari S, Yano S, Morioka M, Gotoh T, Hamada JI, et al. Ischemia-induced neuronal cell death is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP. *Cell Death Differ* 2004;11:403-15.
  18. Florea SM, Blatter LA. The effect of oxidative stress on  $Ca^{2+}$  release and capacitative  $Ca^{2+}$  entry in vascular endothelial cells. *Cell Calcium* 2008;43:405-15.
  19. Xue X, Piao JH, Nakajima A, Sakon-Komazawa S, Kojima Y, Mori K, et al. Tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) induces the unfolded protein response (UPR) in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion, and the UPR counteracts ROS accumulation by TNFalpha. *J Biol Chem* 2005;280:33917-25.
  20. Feghali JG, Liu W, Van De Water TR. L-n-acetyl-cysteine protection against cisplatin-induced auditory neuronal and hair cell toxicity. *Laryngoscope* 2001;111:1147-55.
  21. Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:1229-35.
  22. Kartalou M, Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res* 2001;478:23-43.

### 자궁경부암 세포에서 시스플라틴이 소포체 스트레스에 미치는 영향

원광대학교 의과대학 <sup>1</sup>산부인과교실, <sup>2</sup>영상의학과교실, <sup>3</sup>전정와우센터 미생물학교실  
 김훈영<sup>1</sup>, 김병륜<sup>1</sup>, 김강득<sup>2</sup>, 김형진<sup>3</sup>

#### 목적

항암제 시스플라틴의 세포독성 기전은 활성산소종과 lipid peroxidation의 증가와 DNA adduct의 형성 등이 알려져 있다. 이 연구에서는 시스플라틴이 자궁경부암 세포인 Hela 세포에서 과량의 NO와 세포 내 칼슘 이온의 농도 증가를 통해 소포체 스트레스 관련 단백질들의 발현을 증가시킴을 확인하고자 하였다.

#### 연구방법

Hela세포는 시스플라틴으로 처리하였고 다음으로 소포체 스트레스 반응은 western blot, Flow cytometry, fluorescence 분석을 이용하여 측정하였다.

#### 결과

시스플라틴에 의해 유도되어지는 세포자멸사 현상은 유도성 NO 합성효소의 특이적 억제제인 1400 W와 세포 내 칼슘이온 소거제인 1, 2-bis-(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetra-(acetoxymethyl) ester에 의해 감소되었다. 이러한 약물들은 또한 미토콘드리아의 막전위를 회복시킴으로써 미토콘드리아에 의한 세포자멸사 신호전달은 억제하였다.

#### 결론

시스플라틴에 의한 세포자멸사 현상은 초기 시간대의 칼슘이온 농도의 증가와 그에 따른 미토콘드리아에 의한 세포자멸사 신호전달체계에 의해 유도되며, 이때 소포체가 중요하게 관여되어 있음을 확인할 수 있었다.

**중심단어:** 시스플라틴, 소포체 스트레스, 자궁경부암 세포