

자궁 경부암 세포주에서 5-fluorouracil 투여에 의한 증식 억제 효과의 Proteomic analysis

¹가톨릭 의대 산부인과학교실, ²가톨릭의대 생명공학연구센터
³세종대학교 생명과학화
김찬주¹·임은경²·이근호¹·노덕영¹·배준상²·박태철¹·남궁성은¹·엄수종³·박종섭^{1,2}

Proteomic Analysis of Anti-Proliferative Effects by Treatment of 5-Fluorouracil in Cervical Cancer Cells

Chan-Joo Kim¹, Eun-Kyoung Yim², Keun-Ho Lee¹, Duck Yeong Ro¹,
Jun Sang Bae², Tae-Chul Park¹, Sung-Eun Namkoong¹, Soo-Jong Um^{3*}, Jong-Sup Park^{1,2,*}
¹Department of Medical Bioscience, Graduate School of Catholic University, ²Division of Gynecologic Oncology,
Department of Obstetrics and Gynecology, Catholic University Medical College,
505 Banpo-dong, Seocho-gu, Seoul, 137-040, Republic of Korea

Objective : We investigated the effects of 5-fluorouracil (FU) to the cervical cancer cell lines with HPV in the aspect of the apoptosis and HPV.

Methods : The effects of 5-FU on apoptosis was studied using a proteomic method based on a two dimensional gel electrophoresis and MALDI-TOF-MS using peptide mass fingerprinting.

Results : More than 50 proteins showed a significant change in 5-FU treated cervical carcinoma cells compared to control cells. Among them, 34 proteins have been identified and 22 proteins were up-regulated CIDE-B (cell death inducing DFFA-like effector B), caspase-3, caspase-8 and Apo-1/CD95 (Fas), etc and 12 proteins were down-regulated mitotic checkpoint protein BUB3, myc proto-oncogene protein (c-myc), src substrate cortactin and transforming protein p21A, etc by 5-FU treatment in HeLa cells as determined by spot volume ($P < 0.05$). Our experiments showed that 5-FU engaged the mitochondrial apoptotic pathway involving cytosolic cytochrome *c* release and subsequent activation of caspase-9 and caspase-3 as well as the membrane death receptor (DR)-mediated apoptotic pathway involving activation of caspase-8 with an Apo-1/CD95 (Fas)-dependent fashion. In addition, we could observe reduction of HPV-18 E6/E7 gene expression and activation of p53, pRb and p21^{waf1} proteins by 5-FU treatment in HeLa cells.

Conclusion : we suggest that 5-FU suppresses the growth of cervical cancer cells not only by anti-proliferative effect but also anti-viral regulation. Our findings may offer new insights into the mechanism of anticancer effect affected by 5-FU treatment in cervical cancer cells and its mode of action.

Key Words : 5-Fluorouracil, Apoptosis, HPV-18 E6/E7, MALDI-TOF-MS

서 론

HPV-16, HPV-18등의 고위험 인유두종 바이러스의

감염은 자궁 경부암의 발생과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다.¹ 이런 고위험 인유두종 바이러스의 E6단백은 ubiquitin-의존성 경로를 통하여 p53 종양 억

제 단백질의 분해를 촉진하며, E7단백은 retinoblastoma 종양억제 단백질 pRb를 분해시켜, 세포의 분열화와 암화과정에서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{2,3,4,5}

p53의 기능이 있는 세포는 DNA-손상성 약제에 의해 p53단백과 그 하부에 있는 p21, Bax 단백질 등의 양을 증가시켜, G1단계의 멈춤과 apoptosis를 일으킨다.⁶ E6 단백질은 p53을 불활성화시키므로, anti-apoptotic한 상태를 유발해서 DNA-손상성 약제에 의해 저항성을 보이는 것으로 알려져 있다.^{2,7} 그러나, HPV16 E6, E7의 발현은 keratinocyte에서 다양한 항암제나 방사선에 의한 apoptosis에 대한 감수성을 증가시킨다.^{8,9,10} 또한, HPV-16, -18 양성인 HeLa, C-4II, CaSki세포주 등은 mitomycin C, cisplatin 등의 여러 항암제에 대하여 감수성을 보였다.¹¹ 이들 DNA-손상성 항암제는 p53과 p21 단백을 이들 세포주에서 유도하였다.

5-fluorouracil (FU)는 자궁 경부암에서 좋은 반응과 생존율을 보이는 항암제로서 널리 쓰이는 경구용 prodrug이다.^{12,13} 5-FU는 pyrimidine ring의 5번 위치에 uracil의 fluorination에 의해 만들어진 pyrimidine 유사체로서, 목적하는 암세포의 효소에 의해 분해되어, thymidylate synthetase에 의한 deoxythymidylic acid의 생산을 억제하여 정상 RNA기능을 저해하여, 세포독성 효과를 보이게 된다. 그러나, 아직 HPV양성인 자궁 경부암에서의 효과에 대한 분자생물학적 분석은 불명확하다. 다른 암세포에 대한 연구에 의하면, 5-FU는 *Fas*, *Bax* 등의 p53-의존성 pro-apoptotic gene의 up-regulation과, anti-apoptotic genes인 Bcl-2 family의 down-regulation에 의하여, caspase family를 유도를 통하여 apoptosis의 효과를 보이게 된다.^{14,15,16}

일반적으로 apoptosis는 mitochondrial-매개성 경로와 membrane DR (death receptor)-매개성 경로라는 두 가지 다른 방법에 의해 조절된다. Mitochondria내의 cytochrome *c*가 세포질내 방출되는 단계가 caspase-3, caspase-9, endonucleases 등의 활성화에 rate-limiting step으로 알려져 있다.¹⁷ Caspase-8은 Fas, TNF- α , 다른 TNF 관련성 apoptosis-유도ligand등을 사용하는 DR-mediated apoptotic pathway에서 결정적인 역할을 하는 proximal caspase이다.¹⁸

저자들은 5-FU가 HPV-18을 가진 HeLa 자궁 경부암 세포주의 성장을 억제하는 효과를 proteomic methods로 분석하였다. 또한, 5-FU가 HPV-관련성 자궁 경부암 세포의 치료에 mitochondria 매개성, membrane DR-

매개성 경로를 통하여 apoptosis를 유발함을 알 수 있었다. 5-FU는 HPV E6, E7유전자의 발현을 down-regulation하여, p53, pRb단백의 활성화를 통하여 apoptosis를 강화시키는 것을 알 수 있었다.

연구 대상 및 방법

1. 세포주 배양 및 세포 독성 검사 (Cytotoxicity Assay)

HPV-18양성인 HeLa 세포주를 10% FBS를 첨가한 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)으로 37°C, 5% CO₂하에서 배양하였다. 세포독성 실험은 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma, St. Louis, MO) 를 이용하여 약물의 농도에 따른 증식 억제의 비율로 나타내었다. 96well에서 HeLa cells (1x10⁴/well) 을 각기 다른 농도의 5-FU (Sigma)와 24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 120시간동안 배양하였다. MTT substrate (20 mg/ml)와 배양하여 4시간이 경과한 뒤, 배양액을 버리고, DMSO를 첨가하였다. 세포독성은 IC₅₀ value에 준하여 검사하였다. 각 검사는 세번씩 시행하였다.

2. Two-dimensional gel electrophoresis and image analysis

HeLa세포주를 5M 5-FU와 배양하여 24시간 뒤 trypsinization하여 수거하였다. 세포 침전물은 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CAHPS 용해제(lysis buffer)로 녹였다. 초음파 용해(sonication)후에 전체 단백질 0.05 mg을 immobilized pH 3-10 (linear) IPG strip (Amersham Bioscience, Arlington Heights, IL)에 Ettan IPG phor (Amersham Bioscience)를 사용하여 20°C에서 옮기고, IPG strip을 다시 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 45 mM DTT, 0.5% IPG buffer, 400 mM Tris에 녹인 후 사용 직전에 약간의 bromophenol blue를 첨가하였다. IEF(Isoelectric Focusing)을 100 V, 50 VH; 300 V, 150 VH; 600 V, 300 VH; 1,000 V, 500 VH; 3,000 V, 1,500 VH; 6,000 V, 36,000 VH에서 시행하였다. 이 젤은 SDS-PAGE 하기 전에 20°C에 저장하였다. equilibration solution (50 mM Tris-Cl, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, 0.002% BPB)과 100 mg/ml DTT 에서 약 15분간 처리한 뒤, equilibration buffer와 25 mg/ml iodoacetamide에서 15분간 두었다. 그 뒤에 SDS-PAGE buffer (25 mM Tris-Cl, 192 mM glycine, 0.1% SDS)로 씻어낸 뒤,

단백질은 silver staining에 의해 검출하였다. 염색된 2D gels은 Bio-Rad Scanner (Bio-Rad, Philadelphia, PA)를 이용하여 젤의 이미지를 디지털화시킨 후, 이미지 분석을 하였다. PDQuest software 6.2.1 (Bio-Rad)를 이용하여, 2D gel proteome database를 이용하여 spot을 분석하였다. mass spectrometry에 의한 단백질의 분석과 spot의 정확한 위치를 정하기 위하여, analytical silver-stained gel과 preparative gels간의 matching을 시행하였다.

3. MALDI-TOF-MS

Silver 염색된 단백질들 중 원하는 부위에 대하여 digestion을 시행하였다. 염색이 끝난 뒤, gel slab을 물에서 10분간 2회 씻어낸 뒤, scalpel로 원하는 부위를 잘라내어, 1.5 ml 튜브에 담았다. 25 mM ammonium bicarbonate buffer, pH 8.0/50% acetonitrile (1:1) (Sigma)를 gel이 들어 있는 튜브에 넣은 뒤, 15분간 실온에 두었다. 액체는 버리고, 몇 번 씻어내었다. 100% Acetonitrile에 의해 탈수반응을 일으키고, Speed-Vac을 사용하여 1시간 동안 건조시킨 후 15 μ l의 trypsin solution (10 μ g/ml in 25 mM ammonium bicarbonate buffer, pH 8.0)으로 녹인 후, 37 $^{\circ}$ C에서 12-14시간 동안 반응시켰다. Trypsin으로 잘라낸 peptide는 50% Acetonitrile/5% TFA로 추출하며, Speed-Vac에서의 원심분리로 acetonitrile을 제거하였다. Peptide는 C18Zip-Tip (Millipore Corp., Bedford, MA)을 사용하여 농축시킨 후, 100% acetonitrile 2 μ l로 녹인 뒤, 직접 MALDI-TOF-MS의 sample에 넣었다. 마지막으로, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (0.5 μ l of 10 mg/ml)를 각 spot에 넣어 공기중에서 spot을 건조시킨다. MALDI-TOF에 의한 peptide mass profiles은 MS-FIT, Mascot로 분석하였다. Peptide mass는 SWISS-PROT, NCBI data banks에 있는 이론상의 염기서열과 비교 분석하였다.

4. Western-blot

검체는 Laemmli's loading buffer와 섞은 후, 5분간 끓인 뒤, 12% SDS-PAGE에서 130 V로 전기 영동한 후 80 volt에서 2시간동안 electroblotting하였다. Membrane은 실온에서 5% skim milk를 가진 TBS로 block한 뒤, anti-CIDE-B (1:500) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-BUB3 (1:300) (BD Bioscience, San Diego, CA), anti-caspase-1 (1:200) (Santa Cruz Biotechnology), anti-cytochrome C (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology),

anti-caspase-3 (1:200) (Santa Cruz Biotechnology), anti-caspase-8 (1:100) (Santa Cruz Biotechnology), anti-caspase-9 (1:200) (Santa Cruz Biotechnology), anti-fas (1:500) (Santa Cruz Biotechnology), anti-p53 (1:150) (Novocastra Lab, UK), p21 (1:100) (Calbiochem, La Jolla, CA), anti-pRb (BD Bioscience) and anti- β -actin (Sigma) 등의 1차 항체를 반응시켰다. Membranes을 씻어낸 뒤, horseradish peroxidase-conjugated 2차 항체 (1:2,000) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)를 반응시켰다. 2차 항체 반응 후, membrane을 씻어낸 뒤, 붉은 항체를 ECL hyperfilm으로 chemiluminescence를 관찰하였다.

5. RT-PCR

전체 RNA는 RNeasy[®] Mini kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 추출하였다. 전체 RNA의 농도를 spectrophotometry로 측정한 뒤, 역전사(reverse transcription)와 첫번째 증폭을 Titan system (Roche, Mannheim, Germany)을 이용하여 시행하였다. 0.2 mM dNTPs, 10 pmol씩의 forward-primer, reverse-primers, 5 mM dithiothreitol (DTT), 5 U RNase inhibitor, 추출된 RNA로 Mix 1을 25 μ l로 만들었다. Deionized water (14 μ l)와 10 μ l 5x RT-PCR buffer, 1.5 mM magnesium chloride, 1 μ l enzyme으로 Mix 2를 만들고, 냉동시킨 뒤, 사용 직전에 vortexing, centrifugation하여 사용하였다. RT는 50 $^{\circ}$ C에서 30 min, 94 $^{\circ}$ C에서 2 분간 한 뒤, 첫번째 PCR은 95 $^{\circ}$ C에서 1분, 56 $^{\circ}$ C에서 1분, 68 $^{\circ}$ C에서 1분씩 30 cycle을 반복한 뒤, 68 $^{\circ}$ C에서 7분간 연장반응을 시켰다. 여기에 사용된 Primer는 다음과 같다.

HPV-18 E6/E7

Forward primer : 5'-TTCTGCTGGATTCAACGGT-3'
Reverse primer : 5'-AAGGCATAACCGAAATAGG-3'

Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)

Forward primer : 5'-CCATGTTTCGT CATGGGTG
TGAACCA-3'
Reverse primer : 5'-GCCAGTAGAGGCAGGGATG
ATGTTC-3'

마지막 PCR 산물을 1.5% agarose gels에 넣어 전기 영동한 뒤, UV하에서 관찰하였다. GAPDH 유전자의 발현 정도를 기준으로 시료의 cDNA 양을 정량하였다.

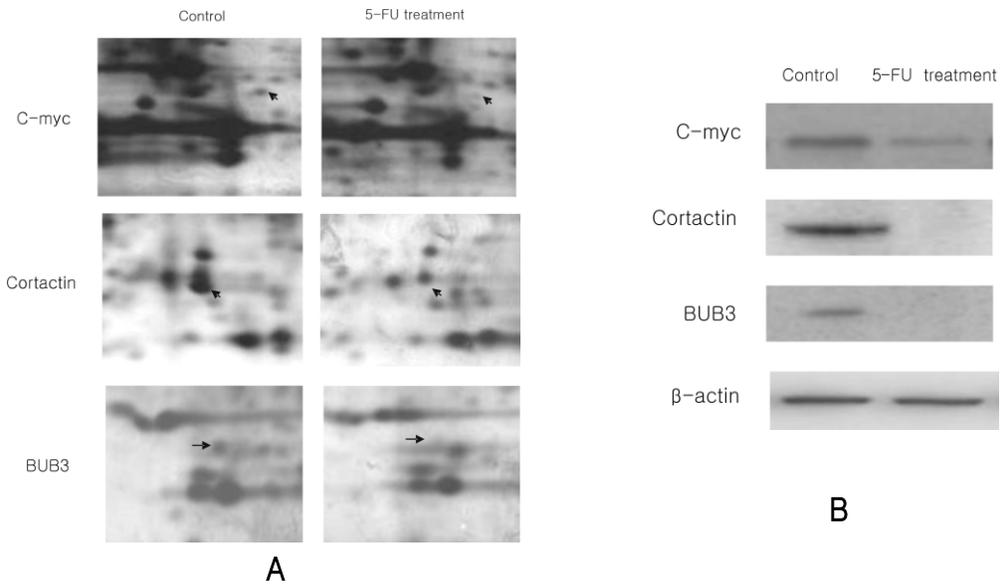


Fig. 1. (A) Comparison of the high resolution 2-D pattern gel electrophoresis obtained from HeLa and 5-FU treated HeLa cells. The differentially expressed proteins (c-myc, cortactin, BuB3 and β -actin) are marked with an arrow and named. (B) Western blots of differentially expressed proteins identified from proteomic analysis.

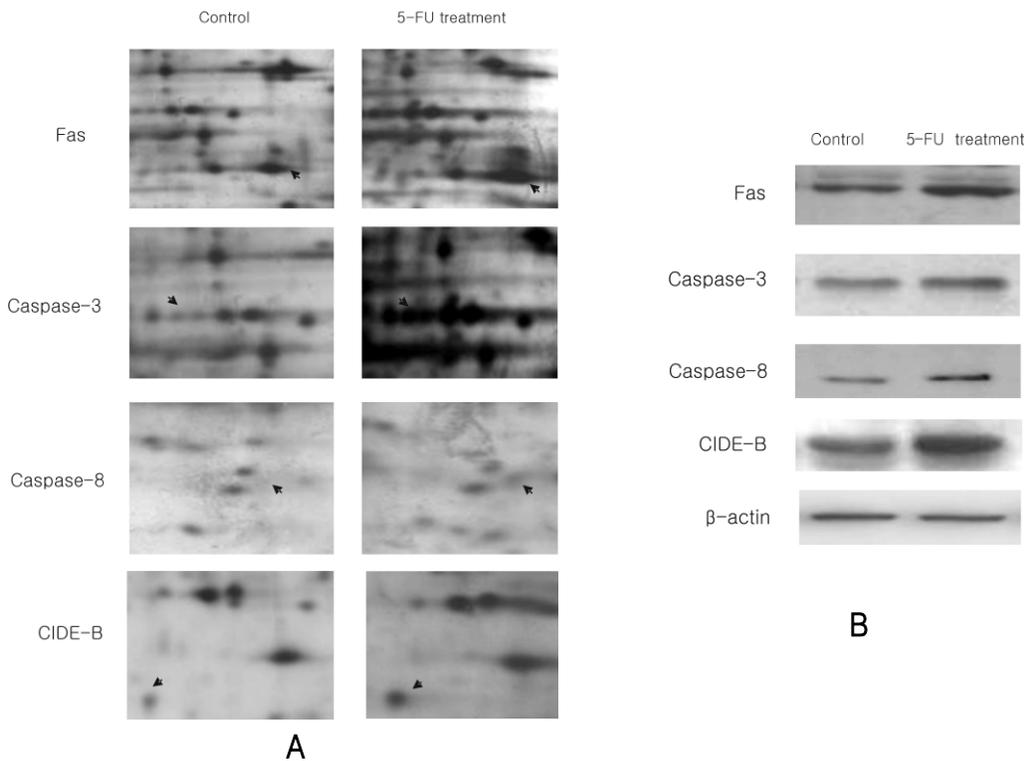


Fig. 2. (A) Comparison of the 2-D pattern obtained from HeLa and 5-FU treated HeLa cells. The differentially expressed proteins (Fas, caspase-3, caspase-8, CIDE-B, and β -actin) are marked with an arrow and named. (B) Western blots of differentially expressed proteins identified from proteomic analysis.

결 과

1. 자궁 경부암 세포주(HeLa)에 대한 5-FU투여에 의해 발현이 증가되는 단백질을 Proteomic analysis법으로 동정
5-FU투여에 의한 기전을 분석하기 위하여, 자궁경부암 세포주의 증식 억제에 중요한 target-specific protein을 proteomic analysis법으로 시행하여 보았다. 고강도 2차원 젤 영동(high-resolution two-dimensional gel electrophoresis) 후, HeLa세포주에서 단백질의 발현양상을 약제를 투여하지 않은 세포주에서의 전체 단

백현황(master expression profile map) 변화를 비교하여 보았다. 약제에 의한 세포괴사(apoptosis)의 실제적인 상위 부분의 기전을 알아보기 위하여 이에 관계되는 중요한 단백질들을 동정하고 기능을 규명하기 위하여 시행하였는데, 각 젤에서 800개 이상의 spot이 발견되었으며, 이중 48개의 단백질이 5-FU투여 후에 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다 (Fig. 1A, 2A). 단백질 spot 크기로 비교한 결과, 이 중 31개의 단백질은 증가된 상태였고, 17개는 감소된 상태였다 ($P < 0.05$) (Table 1, 2). 34개의 단백질은 MALDI-TOF-MS결과를 database와 비교하여 성공적으로 동정이 되었다. 이 실험에서

Table 1. Up-regulated protein spots by treated with 5-FU in HeLa cell

Accession	Protein identified	Function	Mr(Da)/pI
P30711	Glutathione s-transferase theta-1	Displays glutathione peroxidase activity with cumene hydroperoxide	27335/7.0
O15264	Mitogen-activated protein kinase 13	Regulation of protein translation by phosphorylating and inactivating EEF2K	42090/8.5
P48728	Amino-methyltransferase	Degradation of glycine	43946/8.9
O15372	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 3	Binds to the 40s ribosome and promotes the binding of methyl-tRNA and mRNA	39931/9.1
Q15056	Eukaryotic translation initiation factor 4H	Stimulates protein translation	27385/6.7
P42655	Protein kinase C inhibitor protein-1	Probably a multifunctional regulator of the cell signaling processes mediated by both kinases	29174/4.6
P07010	hnRNP C1/C2	pre-mRNA processing and mRNA metabolism	33688/5.0
Q9UMQ3	Homeobox protein BarH-like 2	Transcription factor	28249/6.4
Q9UBK9	UXT protein	Ubiquitously expressed transcript protein	18246/7.0
Q9UHD4	Cell death activator CIDE-B	Activates apoptosis	24678/9.0
O95299	NADH-ubiquinone oxidoreductase 42kDa subunit	Transfer of electrons from NADH to the respiratory chain	40751/8.7
Q14914	NADP-dependent leukotriene B4 12-hydroxy dehydrogenase	Catalyzes the conversion of Leukotriene B4 into its biologically less active metabolite	35870/8.4
Q13442	PDGF-associated protein	Enhances PDGFA-stimulated cell growth	20630/8.8
Q08209	Serine threonine protein phosphatase 2B catalytic subunit	Calcium-dependent,, calmodulin-stimulated protein phosphatase	58688/5.6
P30520	Adenylosuccinate synthetase	Purine nucleotide biosynthesis	50098/6.1
P28330	Acyl-coA dehydrogenase	Energy metabolism	47670/7.3
Q15554	Telomeric repeat binding factor 2	Plays a role in cell division cycle	55552/9.2
P16402	Histone H1.3	Necessary for the condensation of nucleosome	22350/11.0
P20645	Cation-dependent mannose 6 phosphate receptor	Transport of phosphorylated lysosomal enzyme	30994/5.6
P25445	Apo-1/CD95 (Fas)	Receptor for TNFSF6/FASL	37733/8.3
NP11678	Caspase-3	Cleavage and activation caspases 6, 7 and 9	34532/10.3
NP203520	Caspase-8	Programmed cell death induced by Fas and various apoptotic stimuli	20836/11.0

Table 2. Down-regulated protein spots by treated with 5-FU in HeLa cell

Accession NO	Protein identified	Function	Mr(Da)/pI
P39023	60S ribosomal protein L3	A component of the large subunit of cytoplasmic ribosomes	57943/10.2
O43684	Mitotic checkpoint protein BUB3	Cell cycle regulator	37155/6.4
Q9H1E3	Nuclear ubiquitous casein and cyclin dependent kinase substrate	Cell cycle regulator	27297/5.0
O43739	Cytohesin 3 (ARF nucleotide-binding site opener 3)	Promotes the activation of ARF through replacement of GDP with GRP	46349/5.3
P49770	Translation initiation factor eIF-2B, beta subunit	Catalyzes the exchange of eukaryotic initiation factor 2-bound GDP for GTP	38990/5.8
P01106	Myc proto-oncogene protein (c-myc)	Activate the transcription of growth-related genes	48804/5.3
Q9Y5H7	Protocadherin alpha 5 precursor	Potential calcium-dependent cell-adhesion protein	102049/5.3
Q16533	snRNA activating protein complex 43kDa subunit	Complex required for the transcription of both RNA polymerase II and III small-nuclear RNA genes	42995/9.5
Q02338	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase	Energy metabolism	38157/9.1
P30040	Endoplasmic reticulum protein ERp29 precursor	Processing of secretory proteins within the ER	28994/6.8
Q14247	Src substrate cortactin (oncogene EMS1)	Cellular growth regulation and transformation	61637/5.2
P01116	Transforming protein P21A (c-K-ras).	Bind GDP/GTP and possess intrinsic GTPase activity	21656/6.3

단백질 spot 크기로 비교한 결과 5-FU 투여 후에 22개의 단백질은 증가되었으며 (Table 1), 12개의 단백질은 감소하였다 (Table 2) ($P < 0.05$). 단백질 spot 크기로 비교한 결과, 이 중 31개의 단백질은 증가된 상태였고, 17개는 감소된 상태였다 ($P < 0.05$) (Table 1, 2). 동정된 증가 단백질은 glutathione s-transferase -1, mitogen-activated protein (MAP) kinase 13, amino-methyltransferase, eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 3 and 4H, protein kinase C inhibitor protein-1, hnRNP C1/C2, homeobox protein BarH-like 2, UXT protein (ubiquitously expressed transcript protein), cell death activator CIDE-B, NADH-ubiquinone oxidoreductase, PDGF-associated protein, serine-threonine protein phosphatase 2B catalytic subunit, adenosylsuccinate synthase, acyl-CoA dehydrogenase, telomeric repeat binding factor 2, histone H1.3, cation-dependent mannose-6-phosphate receptor, Apo-1/CD 95 (Fas), caspase-3, caspase-8, NADP-dependent leukotriene B4 12-hydroxy dehydrogenase 등이었다. 감소된 단백질은 mitotic checkpoint protein BUB3, 60S ribosomal protein L3, nuclear ubiquitous casein and cyclin dependent kinase substrate, cytohesin 3, myc proto-oncogene protein (c-myc),

endoplasmic reticulum protein ERp29 precursor, translation initiation factor eIF-2B, D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, protocadherin alpha 5 precursor, snRNA activating protein complex 43 kDa subunit, Src substrate cortactin, transforming protein P21A 등이었다. 이 단백질 실험 결과의 재현성을 검사하기 위하여, 실험은 HeLa 세포주에서 5-FU 투여를 한 군과 하지 않은 군을 대상으로 6 웰에서 반복하였다.

2. 자궁 경부암 세포주(HeLa)에 대한 5-FU 투여 후 세포 성장 억제 효과

5-FU 투여에 의한 세포 증식 억제의 효과는 MTT assay 방법으로 측정하였다. 약물의 농도 증가에 따른 증식 억제의 비율을 관찰하였는데, 2 μM 농도부터 성장 억제가 나타나기 시작하여 IC₅₀ value인 5 μM에서는 현저한 증식 억제가 나타났다. 5-FU 투여 후 proteome analysis에 의해 발견된 증가된 apoptosis-관련 단백을 확인하기 위하여 western blot을 시행하였다. Cell death activator CIDE-B, Fas와 caspase family 단백질들인 caspase-3, caspase-8 등이 증가되었다 (Fig. 1B, 2B). Apoptosis-관련성 단백질들은 모두 mitochondrial-매개

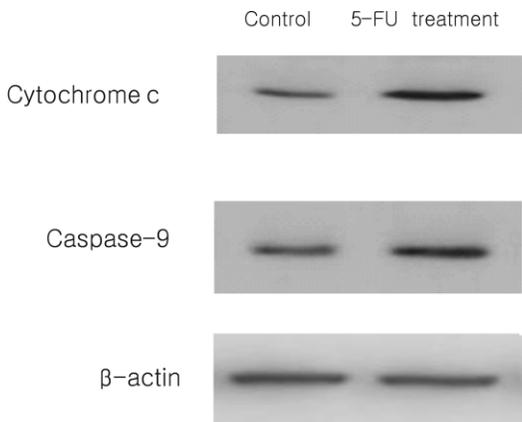


Fig. 3. Cytosolic cytochrome *c* protein and caspase-9 expression are induced by treatment with 5-FU. Cells were incubated with drugs for 24 hr, 5 μ M and both floating and attached cells were collected for western blot analysis.

성 경로와 membrane DR-매개성 경로가 증가되어 있음을 알 수 있었다. Cytosolic cytochrome *c* 단백질과 caspase-9 단백질 발현은 5-FU를 투여한 HeLa세포주의 세포질 단백질을 추출하여 western blotting하여 동정하였다 (Fig. 3). 5-FU를 투여한 HeLa세포주에서 cytochrome *c* 발현이 유도됨을 알 수 있었고 (Fig. 3), dATP 존재하에서 Apaf1과 결합하여 procaspase-9을 활성화시킨다. 이 단계의 후속으로, caspase-9 활성화가 일어나 (Fig. 3), caspase-3를 포함한 하부의 효과를 발휘하는 caspase들의 활성화로 apoptosis를 유발함을 알 수 있었다. 이들 활성화된 caspase가 apoptosis에 관계된 단백질 분해성 (proteolytic cleavage) 사건들을 수행하게 된다. membrane DRs은 각각의 ligand에 의해 활성화되며, procaspase-8를 활성화시키는 것으로 알려져 있는데, 5-FU 투여에 의해 자궁 경부암 HeLa 세포주에서 caspase-8, caspase-3의 활성화가 일어나며, 이는 Fas-의존성으로 활성화가 증가됨을 알 수 있었다 (Fig. 2B). 이 경로를 통하여 apoptosis가 가속화됨을 관찰할 수 있었다. Proteome analysis 자료에 의하면, 세포 증식 관련성 단백질인 c-myc, Src substrate cortactin, mitotic checkpoint Bub3등이 감소함을 알 수 있었다. western blot 실험을 통하여, c-myc, Src substrate cortactin, mitotic checkpoint Bub3 proteins이 5-FU 투여에 의해 감소됨을 알 수 있었다 (Fig. 1B).

5-FU투여에 의해 HeLa자궁 경부암 세포주는 cytosolic cytochrome *c* 분리를 촉진하는 mitochondrial apoptosis

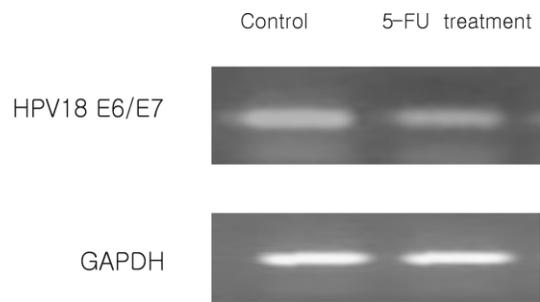


Fig. 4. HPV-18 E6/E7 mRNA expression measured by RT-PCR analysis. GAPDH mRNA level was used as control.

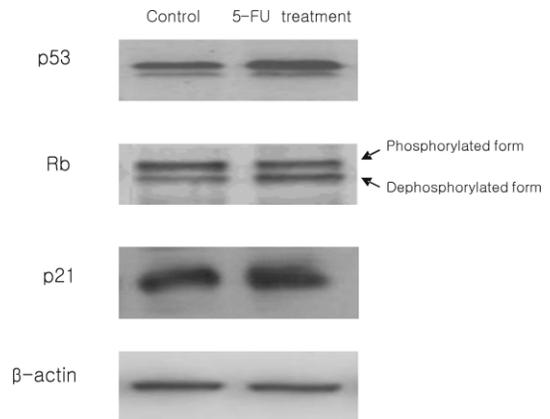


Fig. 5. Differential expression of p53, p21^{wal1} and pRb proteins by treatment of 5-FU. Two forms of pRb were shown by phosphorylated form (upper arrow) and dephosphorylated form (lower arrow).

경로에 관여하며, 상위의 caspase-9활성화와 하부의 caspase-3 활성화에 관여함을 알 수 있었다. 또한 Apo-1/CD95 (Fas)-의존성으로 일어나는 caspase-8의 활성화를 포함한 membrane DR-매개성 apoptotic 경로도 관여됨을 알 수 있었다(Fig. 2, 3). 이와 같은 western blot 결과는 proteomic analysis와 비교하여 일치함을 관찰하였다(Fig. 2A, 2B).

3. Anti-viral effects of 5-FU in HeLa cervical cancer cells

5-FU 5 μ M을 HeLa 자궁 경부 세포주에 투여한 뒤, RT-PCR법으로 하여 HPV-18 E6/E7 유전자의 발현이 감소함을 알 수 있었다 (Fig. 4). 5-FU가 p53에 미치는 영향을 알아보기 위하여 western blotting을 시행하였다. 5-FU-의존성으로 E6 발현 정도가 정상 대조군에

비하여 감소함을 알 수 있었다 (Fig. 4, 5). 5-FU성 E6 정도의 감소가 HeLa세포주에서 p53 단백질 발현 정도의 회복과 관련있음을 알 수 있었다. 또한 p21^{waf1}에 대하여, western blot을 시행하였다. 5-FU 투여에 의해, p53의 유도에 의해 p21^{waf1} 단백질이 증가함을 알 수 있었다. 또한, dephosphorylated Rb 단백질이 증가하고, phosphorylated Rb 단백질이 감소함을 알 수 있었다 (Fig. 5). HPV-18 E7 유전자의 하향 조절과 p21의 유도는 세포 주기 조절의 E2F 기능의 주요 조절 인자인 Rb 단백질의 dephosphorylation과 관계가 있었다.

고 찰

5-FU는 자궁 경부, 위장관, 유방암과 폐암 등에 널리 쓰이는 항암제이다. 그러나 5-FU의 항암 기전은 대사에 의해 5-fluorouridine-5'-triphosphate (5-FUTP)로 변환된 뒤, RNA에 들어가, 5-fluoro-2'-deoxyuridine 5'-monophosphate (5-FdUMP)를 형성하며, 이 물질은 thymidylate synthetase의 잘 알려진 inhibitor이다.¹⁹ 게다가 5-FU는 wild-type p53 종양 억제 유전 인자 (tumor suppressor gene)의 발현을 유도하여, 세포의 성장을 억제한다.^{20,21} p53 단백질은 G1/S 세포주기의 checkpoint를 조절하는 인자로 작용하며, DNA-손상성 약제에 노출된 세포의 apoptosis 유발인자로 작용한다.^{22,23} 5-FU는 세포주에서 bax²⁴, Fas-ligand²⁵, Fas-associated death domain protein (FADD)²⁶ 등의 proapoptotic 유전자들을 사용하는 실험적 암치료에서 caspase-3, -6, -8, -9등을 유도하여 좋은 성적이 보고 되었다.²⁷

2차원 젤 영동법은 전반적이며, 비교분석적인 면에서 유용한 방법으로 사용되고 있는 방법으로, 한 개의 젤에서 수천개의 단백질 밴드를 보여 줄 수 있는 해상도를 가지고 있었다. 2차원 젤의 어려운 점은 재현성이 가능하게 단백질을 분리하고 정량하는 과정이다. 이 논문에서 단백질 분석을 통하여 자궁 경부 세포주에서 5-FU에 의한 증식 억제 효과가 apoptosis-관련 단백질임을 알 수 있었다. 이 실험에서 22 가지 단백질이 증가하였고, 12가지 단백질이 5-FU투여에 의해 감소가 관찰되었다($P < 0.05$). 흥미롭게도 5-FU 투여에 의해 CIDE-B (cell death inducing DFFA-like effector B) 단백질의 증가가 관찰되었다. pro-apoptotic CIDE-B 단백질은 N-terminal (CIDE-N) domain과 C-terminal (CIDE-C) domain의 서로 다른 2개의 domains으로 나눌 수 있다. CIDE-N domain은 nuclease와 inhibitor인 DFF40, DFF45

의 N-terminal regions과 homology가 있다. CIDE-B C-terminal 부위는 CIDE 단백질 원래의 apoptotic activity를 나타내기 위해 필요하고 충분한 부위이다. CIDE-B (cell death inducing DFFA-like effector B) 단백질은 apoptosis를 활성화시키며, apoptotic pathway의 positive effector로써 작용한다. CIDE 단백질에 의해 유도되는 apoptosis는 DNA fragmentation과 apoptosis를 보이는 유착 세포를 counting함으로써 알 수 있기는 하지만, 이 효과에 대한 분자생물학적 기전은 완전하게 밝혀지지 않았다.²⁸ CIDE-B homodimerization의 필요성과 apoptosis유도를 위한 mitochondria에의 localization이 최근에 제시되었다.²⁹

5-FU는 cytosolic cytochrome c 방출과 upstream caspase-9, downstream caspase-3활성화를 포함한 mitochondria에서의 apoptotic pathway와 세포의 apoptosis를 위해서는 ligand-receptor interactions이 필요한 membrane DR-mediated apoptotic pathway에 동시에 작용한다.

5-FU 투여에 의한 apoptosis의 유도는 Fas-의존성 경로를 통하여 일어난다. Fas ligand가 Fas/APO-1/CD95 cell-surface death receptor에 결합하여 caspase-8의 활성화를 유도하며, 직접적으로 procaspase-3를 잘라 활성화된 모양으로 만든다.³⁰ 활성화된 caspase-3는 inhibitory chaperone protein DFF45와 DFF40 nuclease로 구성된 heterodimeric protein complex DNA fragmentation factor (DFF)를 목표로 한다. Protease에 의한 DFF45의 분해는 억제된 상태에서 DFF40의 방출을 일으켜, apoptosis의 최종단계인 nucleosomal DNA degradation을 일으킨다. DNA fragmentation factor complex의 두 단백질은 모두 CIDE-N (cell death-inducing DFF45-like effector) domain에서의 homologous region을 공유한다. 이 부위는 DFF40과 DFF45간의 상호관계에 관여하며, apoptosis activator로 작용하는 novel CIDE family에서도 발견된다. 비록 caspase가 apoptosis로 가게 되어 있는 세포의 운명에 결정적인 역할을 하지만, CIDE-B를 포함한 단백질이 이 과정에 포함되는 것으로 추정된다.

또한, 이 실험에서 5-FU에 의한 HeLa 자궁 경부암 세포주에서의 두가지 apoptotic pathway로서, 1) cytochrome c-의존성 apoptotic pathway: cytochrome c방출 → caspase-9 활성화 → caspase-3 활성화 → apoptosis, 2) membrane DR-의존성 apoptotic pathway: membrane DR (Fas/APO-1/CD95 cell-surface death receptor) → caspase-8 활성화 → caspase-3 활성화 → CIDE-B 활성화 → apoptosis.의 두가지 과정으로 추정된다.

고위험 HPV아형의 E6와 E7 단백질은 종양 억제 단백질인 P53과 Rb의 활성화를 감소시켜, 세포 증식을 조절하는 것으로 알려져 있다. E6 단백질은 p53과의 결합에 의해 ubiquitin-dependent degradation을 조절하므로, 5-FU를 투여한 HeLa자궁 경부 세포주에서 HPV-18 E6 발현의 감소는 p53 발현의 증가를 일으킨다. 5-FU 투여에 의해, p53의 증가는 항-증식 단백질인 p21^{waf1} 단백질 증가함을 알 수 있었다. P53유도의 결과는 p21^{waf1} promoter의 활성화이다. 또한, 5-FU 투여에 의해 HeLa 자궁경부암 세포주에서 Dephosphorylated Rb 단백질의 증가와 phosphorylated Rb 단백질의 감소를 관찰할 수 있었다. 5-FU에 의한 p21의 유도과, HPV-18 E7 정도의 감소는 HeLa 세포주에서 dephosphorylated, 활성화된 Rb의 축적을 증가시켜, E2F의 기능을 방해하여, G₁-S transition을 막는다. 본 실험에서 HPV양성인 자궁 경부암 세포주에서 5-FU매개성 apoptosis에 대한 기전의 이해를 넓혀주었고, 또한, 현재의 치료법 외에 새롭고, 예민한 항암제의 개발에 기여할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Zur Hausen H. Cervical carcinoma and human papillomavirus: on the road to preventing a major human cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000;93:252253.
2. Scheffner M, Whitaker NJ. Human papillomavirus-induced carcinogenesis and the ubiquitinproteasome system. *Semin Cancer Biol* 2003;13:5967.
3. Scheffner M, Munger K, Byrne JC, Howley PM. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88(13):5523-7.
4. Lechner MS, Laimins LA. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J Virol* 1994; 68(7):4262-73.
5. Storey A, Massimi P, Dawson K, Banks L. Conditional immortalization of primary cells by human papillomavirus type 18 E6 and EJ-ras defines an E6 activity in G0/G1 phase which can be substituted for mutations in p53. *Oncogene* 1995;11(4):653-61.
6. Colman MS, Afshari CA, Barrett JC. Regulation of p53 stability and activity in response to genotoxic stress. *Mut Res* 2000;462:17988.
7. zur Hausen H, Papillomavirus and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* 2002;2: 34250.
8. Hawkins DS, Demers GW, Galloway DA. Inactivation of p53 enhances sensitivity to multiple chemotherapeutic agents. *Cancer Res* 1996;56:89289.
9. Liu Y, McKalip A, Herman B. Human papillomavirus type 16 E6 and HPV-16 E6/E7 sensitize human keratinocytes to apoptosis induced by chemotherapeutic agents: roles of p53 and caspase activation. *J Cell Biochem* 2000;78: 33449.
10. Simbulan-Rosenthal CM, Veleno A, Veldman T, Schlegel R, Rosenthal DS. HPV-16 E6/E7 immortalization sensitizes human keratinocytes to ultraviolet B by altering the pathway from caspase-8 to caspase-9-dependent apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2002;277:24709716.
11. Butz K, Geisen C, Ullmann A, Spitkovsky D, Hoppe-Seyler F. Cellular responses of HPV-positive cancer cells to genotoxic anti-cancer agents: repression of E6/E7-oncogene expression and induction of apoptosis. *Int. J. Cancer* 1996;68:50613.
12. Morris M, Eifel. PJ, Lu J, Grigsby PW, Levenback C, Stevens RE, Rotman M, Gershenson DM, Mutch DG. Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. *N Engl J Med.* 1999;340:113743.
13. Thomas GM. Concurrent chemotherapy and radiation for locally advanced cervical cancer: the new standard of care. *Semin Radiat Oncol.* 2000;10, 4450.
14. Harris CC. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88:144255.
15. Yang X, Hao Y, Pater M, Tang SC, Pater A. Enhanced expression of anti-apoptotic proteins in human papillomavirus-immortalized and cigarette smoke condensate-transformed human endocervical cells: correlation with resistance to apoptosis induced by DNA damage. *Mol Carcinog.* 1998; 22:95101.
16. Hengstermann A, Linares LK, Ciechanover A, Whitaker NJ, Scheffner M. Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *Proc Natl Acad Sci. U S A* 2001;98(3): 1218-23.
17. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 1998;281:1309-12.
18. Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11:225-60.
19. Parker WB, Cheng YC. Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil. *Pharmacol. Ther.* 1990;48: 38195.
20. Nabeya Y, Loganzo F Jr, Maslak P. The mutational status of p53 protein in gastric and esophageal adenocarcinoma cell lines predicts sensitivity to chemotherapeutic agents. *Int J Cancer.* 1995;64:3746.
21. Pickard M, Dive EC, Kinsella AR. Differences in resistance to 5-fluorouracil as a function of cell cycle

- delay and not apoptosis. *Br J Cancer* 1995;72:138996.
22. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 1991;51:630411.
 23. Fritche M, Haessler C, Brandner G. Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNAdamaging agents. *Oncogene* 1993;8:30718.
 24. Coll JL, Negoescu A, Lpuis N. Antitumor activity of bax and p53 naked gene transfer in lung cancer: in vitro and in vivo analysis. *Hum Gene Ther.* 1998;9:2063-74.
 25. Arai H, Gordon D, Nabelli EG. Gene transfer of Fas ligand induces tumor regression in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:13862-67.
 26. Kondo S, Ishizaka Y, Okada T. FADD gene therapy for malignant gliomas in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther.* 1998;9:1599-608.
 27. Wu XX, Kakehi Y, Mizutani Y, Lu J, Terachi T, Orawa O. Activation of caspase-3 in renal cell carcinoma cells by anthracyclines or 5-fluorouracil. *Int J Oncol.* 2001;19(1): 19-24.
 28. Inohara N, Koeki T, Chen S, Wu X, Nunez G. CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *EMBO J.* 1998;17:2526-33.
 29. Chen Z, Guo K, Toh SY, Zhou Z, Li P. Mitochondria localization and dimerization are required for CIDE-B to induce apoptosis. *J Biol Chem.* 2000; 275: 22619-22.
 30. Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell.* 1997;89:175-84.

국문초록

목적 : 자궁 경부암 세포주에 대하여 5-Fluorouracil (FU)의 효과를 apoptosis와 HPV의 관점에서 분석하였다.

연구방법 : apoptosis관점에서 5-FU의 영향을 2차원적 젤 전기 영동법과 peptide mass fingerprinting을 하는 MALDI-TOF-MS법으로 분석하였다.

결과 : 자궁 경부암 세포주에서 5-FU의 투여는 대조군에 비하여 50가지 이상의 단백질이 현저한 변화를 보였다. 이중 34 종류의 단백질이 분석되었는데, CIDE-B (cell death inducing DFFA-like effector B), caspase-3, caspase-8 and Apo-1/CD95 (Fas) 등의 22가지 단백질이 증가하였고, mitotic checkpoint protein인 BuB3, myc proto-oncogene protein (c-myc), src substrate cortactin, transforming protein p21A 등의 12가지 단백질이 5-FU투여에 의해 감소되었다 ($P < 0.05$). 또한 5-FU는 cytosolic cytochrome *c* 분비와 관련된 apoptotic pathway에 관여하며, 순차적으로 caspase-9, caspase-3의 활성화와 Apo-1/CD95 (Fas)-의존성 caspase-8의 활성화를 포함한 membrane death receptor (DR)-매개성 apoptotic pathway에 관여하였다. 또한 5-FU투여에 의해 HeLa 자궁 경부암 세포주에서 HPV-18 E6/E7 유전자 발현의 감소와 p53, pRb, p21^{waf1} protein 등의 발현 증가를 관찰할 수 있었다.

결론 : 5-FU의 투여는 자궁 경부암 세포주의 성장을 항증식 효과로서 억제할 뿐만 아니라, 항 바이러스성 조절로서도 억제한다. 위 실험은 자궁 경부암 세포주에서 또한 5-FU투여에 의한 항종양 효과에 대한 기전 분석에 큰 도움이 될 것이다.