# 전립선암조직의 칼슘민감성 포타슘통로 발현 양상

## Alterations in Calcium-Activated Potassium Channel Expressions in Human Prostate Cancer

**Duk Yoon Kim, Eun Kyoung Yang[1], Jung Wook Kim[1]**

*Department of Urology, Catholic University of Daegu School of Medicine, [1]Department of Physiology, Kyungpook National University School of Medicine, Daegu, Korea*

**Purpose:** Recent studies have shown that potassium ($K^+$) and sodium channels are involved in prostate cell growth. However, a great many of the studies have been done in prostate cancer cell lines and there are only scant studies on prostate cancer and benign prostatic hypertrophy (BPH) tissue. The present study was aimed to evaluate the alterations of the calcium-activated $K^+$ channel ($K_{Ca}$) expression in prostate cancer, and to compare them with the expression profiles in human BPH tissue to understand their potential role in the progression of prostate cancer.
**Materials and Methods:** The prostate tissues obtained from radical prostatectomy (n=10) and transurethral resection of the prostate (n=18) were quickly frozen in liquid nitrogen for the RNA measurements. The protein and mRNA levels of the $K_{Ca}$ subtypes and connexins were measured by performing immunoblot analysis and reverse-transcription polymerase chain reaction, respectively.
**Results:** The mRNA levels of type 2 (SK2) and type 3 (SK3) small-conductance and large-conductance (BK) $K_{Ca}$s in the prostate cancer tissues were decreased more than 50% compared with those in the BPH samples. In addition, the BK and SK2 protein levels in prostate cancer were also significantly lower than those in the BPH. As reported previously, the connexin 26 and 43 transcript signals in the prostate cancer were significantly reduced compared with those in the BPH samples.
**Conclusions:** These results suggest that the impaired expression of $K_{Ca}$s may have a role in tumor progression via aberrant and uncontrolled prostate cell growth. **(Korean J Urol 2006;47:548-552)**

**Key Words:** Prostate cancer, Large-conductance calcium-activated potassium channels, Small-conductance calcium-activated potassium channels

대한비뇨기과학회지
제 47 권 제 5 호 2006

대구가톨릭대학교 의과대학
비뇨기과학교실,
[1]경북대학교 의과대학 생리학교실

김덕윤 · 양은경[1] · 김정욱[1]

접수일자 : 2005년 12월 7일
채택일자 : 2006년 3월 30일

교신저자: 김덕윤
대구가톨릭대학교 의과대학
비뇨기과학교실
대구광역시 남구 대명 4동
3056-6
㉾ 705-034
TEL: 053-650-4663
FAX: 053-623-4660
E-mail: dykim@mail.cu.ac.kr

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원(과제고유번호: A050584)에 의하여 이루어진 것임.

## 서 론

전립선암은 미국에서는 남성에서 흔히 발견될 수 있는 암으로 폐암 다음으로 사망률이 높은 질환이며, 우리나라에서도 식생활습관의 서구화로 증가하는 추세이다. 전립선암은 대부분 전립선의 말초부위에서 시작되며 초기에는 안드로겐 의존적인 세포가 대부분이나 안드로겐 수용체 변형 등으로 호르몬에 반응하지 않는 세포의 성장이 전립선암 환자의 예후를 결정하는 중요한 인자이다.[1,2] 따라서 호르몬 치료에 반응하지 않는 호르몬불응성 전립선암의 치료로 면역치료, 유전자치료, 혈관생성 억제제, 암의 침범 및 전이 억제제, 암세포의 분화에 관여하는 약제, 신호전달과 세포 상호 작용을 막는 약제들에 대한 연구가 있다.[2]

전립선 세포 성장 조절에 막전압 의존성 $K^+$ 통로[3-6]와 막전압 의존성 $Na^+$ 통로[7-9]가 관련있다. 현재 다양한 평활근육계 질환 및 신생 혈관 생성이 많은 암의 치료 목적으로 시도되고 있는 $K^+$ 통로들의 선택적 차단제나 선택적 개방제

들이 신체 전반에 미치는 영향으로 임상적 적용에 한계가 있으므로,[3,10,11] $K^+$ 통로의 분포부위가 상대적으로 제한적인 새로운 표적에 대한 연구가 필요하다. 세포 내 칼슘농도 증가에 의해 열리는 $K^+$ 통로 (calcium activated potassium channel; $K_{Ca}$) 중 중등도 전도도를 가진 $K_{Ca}$ (intermediate-conductance $K_{Ca}$; IK)가 급속히 성장하는 전립선 세포를 식별할 가능성 있는 표지자이다.[12,13] $K_{Ca}$ 아형들은 칼슘에 대한 민감도나 막전압 의존성 여부, 이온 전도도, 그리고 이온통로 차단제에 대한 특이성에 따라 높은 large-conductance $K_{Ca}$ (BK), IK, small-conductance $K_{Ca}$ (SK)로 나눠지며, SK는 다시 SK1, SK2, SK3의 세 가지 아형으로 분류된다.[14] 전립선에서의 $K_{Ca}$의 작용에 대한 대부분의 연구[6,12,13,15]는 전립선암 세포주를 사용한 것으로 전립선비대증 조직이나 전립선암 조직에서의 $K_{Ca}$의 작용에 대한 연구는 드물다.

본 연구는 $K_{Ca}$ 아형들의 mRNA 및 단백 발현 양상을 전립선비대증 조직이나 전립선암 조직에서 비교하여, 전립선암의 발병과 진행에 미치는 $K_{Ca}$의 작용을 알아보고자 하였다. 그리고 connexin (Cx)이 틈새이음을 구성하는 고전적인 작용 외에 암세포의 성장을 조절하여 전이를 줄이는 암 억제인자로 작용할 가능성이 있다는 보고가 있어,[16-19] Cx mRNA 및 단백 발현 양상을 전립선비대증 조직이나 전립선암 조직에서 비교하여, 전립선암의 발병과 진행에 미치는 Cx의 역할 또한 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

근치전립선절제술을 시행받은 환자 10명과 경요도전립선절제술을 시행받은 환자 18명으로부터 얻은 전립선 조직을, 절제 즉시 액체 질소에 담궈 급속 냉각한 다음 mRNA와 단백발현을 측정할 때까지 −70°C에 보관하였다. 전립선암 조직은 육안적으로 전립선암이 의심되는 부위를 분리한 다음, 중심부 조직은 상기 방법으로 저장하여 실험에 사용하였고, 남은 조직은 병리조직검사를 시행하였다.

Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA)를 사용하여 전립선 조직의 총 RNA를 분리하였고, UV/visible spectrophotometer (Pharmacia Biotech., Milwaukee, USA)로 260nm 및 280nm에서의 흡광도를 측정하여 총 RNA의 순도와 농도를 계산하였다. 다음 각 유전자들의 mRNA 발현을 측정하고자 DNA thermal cycler (MJ research, Watertown, USA)를 사용하여 다음의 조건에서 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. 총 RNA 15μg을 oligo (dT) primer와 M-MLV reverse transcriptase로 역전사시켜 얻은 cDNA 주형을 primer (Table 1)와 함께 변성 (95°C, 1분), 붙임 (60°C, 1분), 중합 (72°C, 1분)하는 단계를 27-36회 반복 시행하였다. 증폭된 산물을 1% agarose 겔 상에서 전기영동한 다음 ethidium bromide로 염색시켜 gel documentation system (Biorad, Hercules, USA)으로 영상 분석하였다. Primer 제작에는 Primer3 software[20]를 사용하였다.

전립선 조직을 150mM NaCl, 25mM Tris-HCl (pH 7.4), 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1% Nonidet P-40, protease inhibitor (Roche, Mannheim, Germany)를 포함한 완충액에 담궈 homogenizer로 분쇄한 다음, 12,000rpm, 4°C에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 Bradford 방법으로 단백질을 정량하였다. 추출한 총 단백질 40μg 10% polyacrylamide gel에서 전기영동한 후 polyvinylidene fluoride membrane에 옮긴다. 그리고 3% skim milk를 함유한 tris buffered saline (50mM Tris (pH 7.4), 10mM NaCl)으로 1시간 동안 실온에서 반응시킨 다음, 1:500 또는 1:1,000으로 희석한 $K_{Ca}$ 아형들 (Alomone Labs, Jerusalem, Israel), Cx26, Cx43 (Zymed Laboratories, San Francisco, USA), 그리고 Cx45 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)에 대한 일차항체와 4°C에서 14-16시간 동안 반응시켰다. 이후 membrane을 세척한 다음 과산화효소와 접합된 단클론 이차항체와 반응시킨 후 ECL system (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England)으로 단백질을 확인하였다.

실험결과는 평균과 표준오차로 나타냈다. 두 군 간의 비교

**Table 1.** Polymerase chain reaction (PCR) primer sequences of connexin and $K_{Ca}$ channel subtypes

| Gene | Primer sequence (5'→3') | Product size (bp) |
|---|---|---|
| BK | 5'-GCGGTTAGTGGAAGAAAGCA-3' | 215bp |
| | 5'-TGTGGATTGAGGACGGAAC-3' | |
| IK | 5'-CCATCGTGTGTCTGTGTGTG-3' | 221bp |
| | 5'-CTGGCTCTGGGACTTTTGCT-3' | |
| SK1 | 5'-CTCGTGGTGGCTGTGGTG-3' | 223bp |
| | 5'-CCTGATGGATGGCTTGGA-3' | |
| SK2 | 5'-GCACAACTCCAACAACC-3' | 231bp |
| | 5'-ATGACCACGATGCGAAC-3' | |
| SK3 | 5'-CTAATGCCACCCACAACCA-3' | 201bp |
| | 5'-GCTCGGTCTCTATCACCATAACA-3' | |
| Cx26 | 5'-CTGCAGCTGATCTTCGTGTC-3' | 308bp |
| | 5'-AAGCAGTCCACAGTGTTG-3' | |
| Cx43 | 5'-CTCAGCAACCTGGTTGTGAA-3' | 709bp |
| | 5'-TCGCCAGTAACCAGCTTGTA-3 | |
| Cx45 | 5'-GAGGAGGACAACGAAGAGGA-3' | 234bp |
| | 5'-CACATAAAACGGGTGGACTTG-3' | |
| β-actin | 5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3' | 200bp |
| | 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3' | |

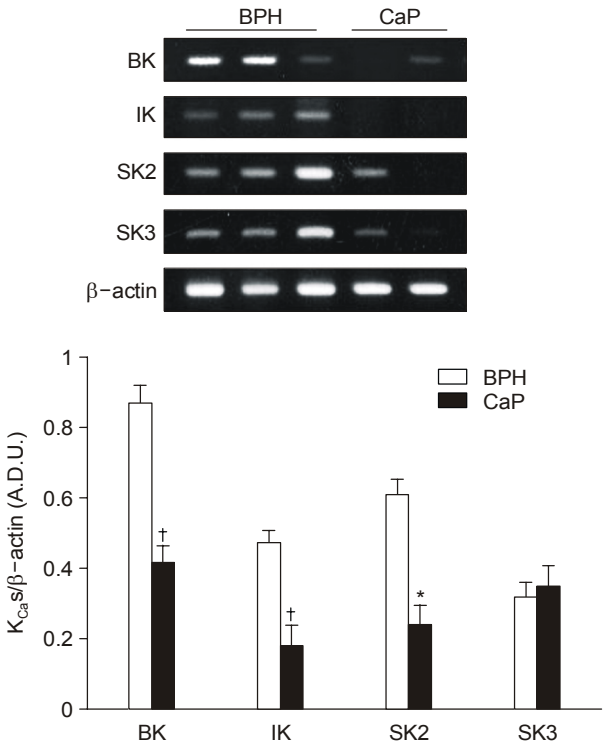


**Fig. 1.** Representative examples (upper panel) and densitometric analyses (lower panel) of the polymerase chain reaction (PCR) products for BK, IK, SK2 and SK3 are corrected with the β-actin in each sample. The values are expressed in arbitrary densitometric units (A.D.U.) as mean±SEM of the human prostate tissue with either benign prostatic hypertrophy (BPH) or prostate cancer (CaP). *$p<0.05$ and †$p<0.01$ compared to BPH (Mann-Whitney test). BK, IK and SK denote large-, intermediate-, and small-conductance calcium activated potassium channels, respectively.

에는 Mann-Whitney test (SPSS 12.0)를 사용하였으며, p값이 0.05 미만일 경우 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

## 결 과

전립선조직에서는 $K_{Ca}$ 아형들 중 BK, IK, SK2, SK3 mRNA (Fig. 1)와 Cx26, Cx43, Cx45 mRNA가 발현되었다 (Fig. 3).

BK, IK, SK2 mRNA 발현은 전립선비대증 조직 (BK, 0.87±0.05, n=7; IK, 0.47±0.03, n=11; SK2, 0.61±0.08, n=11)에 비해 전립선암 조직에서 현저히 낮았으며 (BK, 0.41±0.05, n=6, p=0.002; IK, 0.18±0.06, n=7, p=0.003; SK2, 0.24±0.09, n=6, p=0.020), SK3 mRNA는 두 조직간에 차이를 보이지 않았다 (Fig. 1). 면역탁본법으로 $K_{Ca}$ 아형들의 단백질 발현정도를 측정한 결과, 전립선암 조직에서 BK (0.51±0.05, n=6, p=0.0047)와 SK2 (0.41±0.05, n=6, p=0.0047) 단백 발현이 전

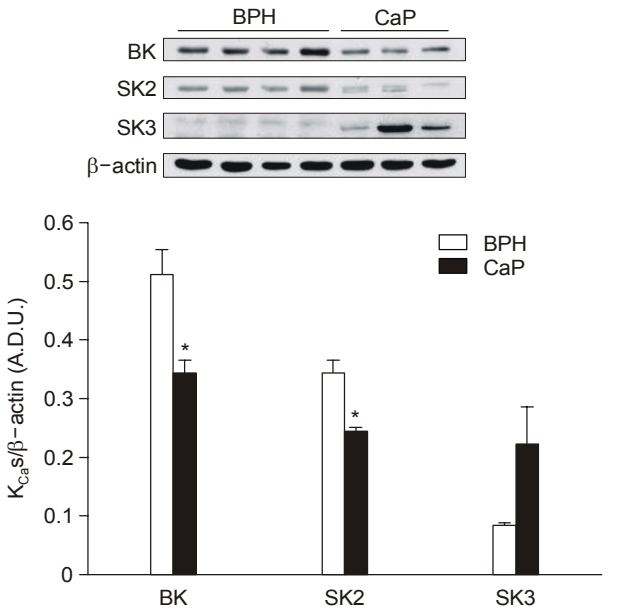


**Fig. 2.** Expressions of BK, SK2 and SK3 proteins corrected for β-actin in each sample. Values are shown in arbitrary units (A.U.) as mean±SEM of the human prostate tissue with either benign prostatic hypertrophy (BPH) or prostate cancer (CaP). *$p<0.01$ vs. BPH (Mann-Whitney test). BK and SK denote the large-and small-conductance calcium activated potassium channels, respectively.

립선비대증 조직 (BK, 0.34±0.021, n=7; SK2, 0.24±0.008, n=7)에 비해 30% 정도 낮았으나 SK3 단백은 두 군 간에 차이가 없어 (Fig. 2), 두 조직에서의 $K_{Ca}$ 아형들의 단백발현과 유전자 발현양상이 일치하였다.

Cx43과 Cx45 mRNA 수준은 전립선비대증 조직 (Cx43, 0.80±0.06, n=10; Cx45, 0.81±0.05, n=11)에 비해 전립선암 조직 (Cx43, 0.36±0.08, n=6, p=0.00025; Cx45, 0.55±0.08, n=6, p=0.027)에서 유의하게 낮았으며, Cx26 mRNA는 차이를 보이지 않았다 (Fig. 3). Cx의 유전자 발현 양상과 단백 발현 양상이 일치하는지 알아보고자 면역탁본법을 사용하여 Cx26과 Cx43의 단백 발현정도를 측정한 결과, 전립선암 조직과 전립선비대증 조직 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다 (Fig. 4).

## 고 찰

본 연구에서 전립선암 조직에서는 전립선비대증 조직에 비해 BK, IK 및 SK2 mRNA 발현과 BK 및 SK2 단백 발현이 낮았으나 SK3 mRNA 및 단백 발현은 두 조직 간에 차이가 없었다. 또한 틈새이음을 이루는 Cx43과 Cx45의 유전자 발현이 낮았으나 단백 발현은 차이가 없었고, Cx26 mRNA와 단백 발현 모두 전립선암과 전립선비대증 조직에서 차이가

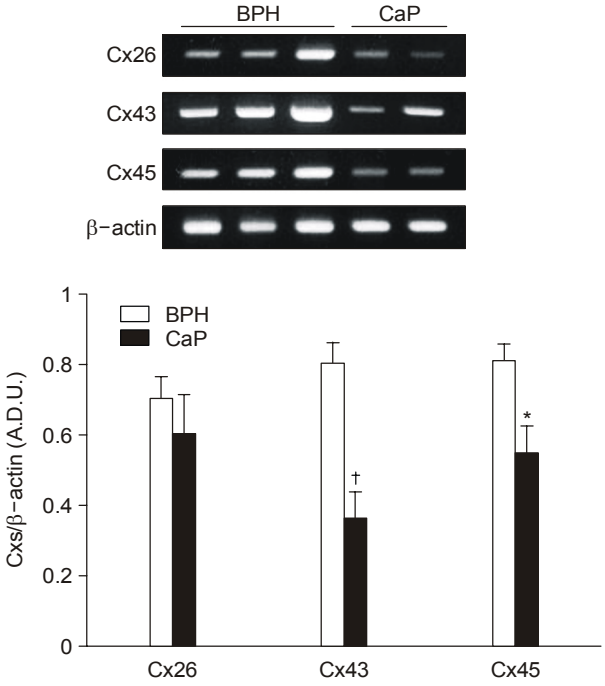


**Fig. 3.** Representative examples (upper panel) and densitometric analyses (lower panel) of the PCR products for connexin (Cx) 26, Cx43 and Cx45 corrected for β-actin in each sample. The values are expressed in arbitrary densitometric units (A.D.U.) as mean± SEM of the human prostate tissue with either benign prostatic hypertrophy (BPH) or prostate cancer (CaP). *$p < 0.05$ and †$p < 0.01$ compared to BPH (Mann-Whitney test).

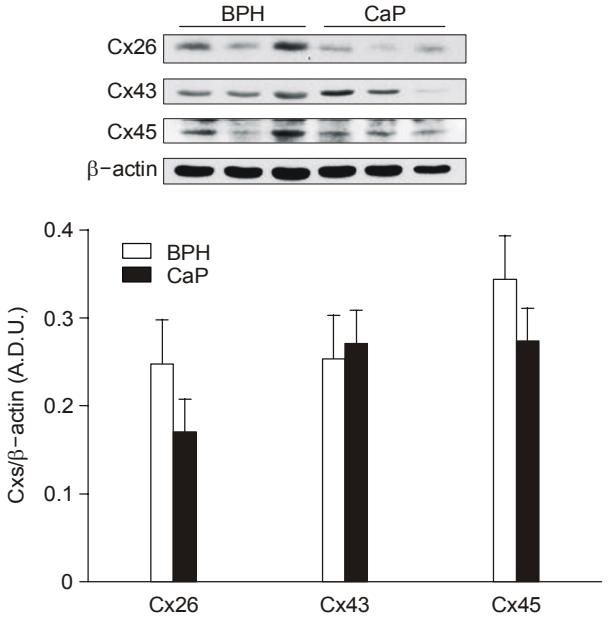


**Fig. 4.** Expressions of connexin (Cx) 26 and Cx43 protein corrected for β-actin in each sample. Values are shown in arbitrary units (A.U.) as mean±SEM of human prostate tissue with either benign prostatic hypertrophy (BPH) or prostate cancer (CaP).

없었다.

전립선암 세포의 종류에 따라 주로 분포하는 $K^+$ 통로의 특성이 다르며, 이는 전립선암 세포들의 서로 다른 전이 능력과 관련되어 있을 가능성이 있다.[4,8] Parihar 등[12]은 riluzole이나 1-ethyl-2-benzimidazolinone으로 안드로겐 의존적 전립선암세포주인 LNCaP와 안드로겐 비의존적 전립선암세포주인 PC3의 증식을 유도한 결과 BK나 SK의 선택적 차단제에 의해서는 크게 영향 받지 않고 IK 차단작용이 있는 clotrimazole이나 charybdotoxin에 의해 억제되어, IK가 전립선비대증과 전립선암에서 보이는 비정상적인 전립선세포의 증식 조절에 관련 있다고 하였다. 저자들의 연구결과 IK. BK, SK2의 mRNA 발현과 단백발현이 전립선비대증 조직에 비해 전립선암 조직에서 현저히 낮아 전립선암의 진행에 IK뿐 아니라 BK와 SK2가 관여할 가능성이 있다. 이들의 정확한 작용기전이나 조직부위별 발현양상의 변화에 대한 추가연구가 필요하다.

틈새이음을 통한 세포 간 신호전달은 조직의 발생과 항상성 유지, 세포의 증식과 사멸에 중요하며,[17,21] 틈새이음을 통한 정상적인 세포 간 신호전달 장애가 암 발생이나 진행에 관련 있다. Mehta 등[22] 형광추적자인 lucifer yellow를 사용하여 진행된 전립선암 세포에서는 정상 전립선세포에 비해 틈새이음을 통한 세포 간 신호전달이 감소되었거나 전혀 측정되지 않음을 보고하였고, Hossain 등[23]은 전립선암 세포에서 나타나는 세포 간 신호전달 감소는 Cx43의 단백발현 감소나 유전암호해독 후 변화과정의 손상에 의하며, 전립선암의 진행의 결정적 단계로 작용할 가능성을 제시하였다. 또한, PC3 세포주에서 Cx의 세포표면으로의 이동 결함이 세포간 신호전달 장애의 주요원인이었다.[24] Tanaka와 Grossman[25]은 adenovirus를 사용하여 유전자전달감염시킨 Cx26에 의해 LNCaP, PC3, 그리고 DU145의 성장이 억제되고 세포사멸이 촉진되었으며, 특히 안드로겐 비의존적인 PC3와 DU145에서는 대표적인 항암제인 doxorubicin을 같이 처치하였을 때 단독으로 처치한 경우에 비해 암세포 성장이 억제되었다. Habermann 등[18]은 전립선암 조직에서 Cx32와 Cx43의 단백 발현이 정상 전립선조직보다 감소되었으며, 이들 Cx의 감소가 세포의 탈분화 (dedifferentiation)와 전립선암의 진행에 관련있다고 하였다. 본 연구에서는 전립선 암조직의 Cx43과 Cx45의 유전자 발현은 전립선비대증 조직에 비해 감소되었으나, 다른 연구들과 달리 Cx 단백발현은 전립선암 조직과 전립선비대증 조직간에 차이가 없었다. 이는 Govindarajan 등[24]의 보고처럼 전립선암에서 세포표면으로의 Cx의 이동에 장애가 있을 경우 Cx이 세포 내에

축적되어 전립선비대증과 차이를 보이지 않은 것으로 추정된다.

## 결 론

전립선암의 표지자로 다른 연구에서 보고된 바 있는 IK와 더불어 BK와 SK2의 유전자와 단백 발현 양상의 이상 변화가 전립선의 비정상적인 성장과 전립선암의 진행에 관여할 가능성이 있다.

## REFERENCES


1. Gleave M, Miyake H, Chi K. Beyond simple castration: targeting the molecular basis of treatment resistance in advanced prostate cancer. Cancer Chemother Pharmacol 2005;56(Suppl 7):47-57
2. Pienta KJ, Smith DC. Advances in prostate cancer chemotherapy: a new era begins. CA Cancer J Clin 2005;55:300-18
3. Abdul M, Hoosein N. Expression and activity of potassium ion channels in human prostate cancer. Cancer Lett 2002;186: 99-105
4. Laniado ME, Fraser SP, Djamgoz MB. Voltage-gated K(+) channel activity in human prostate cancer cell lines of markedly different metastatic potential: distinguishing characteristics of PC-3 and LNCaP cells. Prostate 2001;46:262-74
5. Rybalchenko V, Prevarskaya N, Van Coppenolle F, Legrand G, Lemonnier L, Le Bourhis X, et al. Verapamil inhibits proliferation of LNCaP human prostate cancer cells influencing K+ channel gating. Mol Pharmacol 2001;59:1376-87
6. Skryma RN, Prevarskaya NB, Dufy-Barbe L, Odessa MF, Audin J, Dufy B. Potassium conductance in the androgen-sensitive prostate cancer cell line LNCaP: involvement in cell proliferation. Prostate 1997;33:112-22
7. Diss JK, Archer SN, Hirano J, Fraser SP, Djamgoz MB. Expression profiles of voltage-gated Na(+) channel alpha-subunit genes in rat and human prostate cancer cell lines. Prostate 2001;48:165-78
8. Fraser SP, Grimes JA, Djamgoz MB. Effects of voltage-gated ion channel modulators on rat prostatic cancer cell proliferation: comparison of strongly and weakly metastatic cell lines. Prostate 2000;44:61-76
9. Grimes JA, Djamgoz MB. Electrophysiological characterization of voltage-gated Na+ current expressed in the highly metastatic Mat-LyLu cell line of rat prostate cancer. J Cell Physiol 1998;175:50-8
10. Gopalakrishnan M, Shieh CC. Potassium channel subtypes as molecular targets for overactive bladder and other urological disorders. Expert Opin Ther Targets 2004;8:437-58
11. Abdul M, Santo A, Hoosein N. Activity of potassium channel-blockers in breast cancer. Anticancer Res 2003;23:3347-51
12. Parihar AS, Coghlan MJ, Gopalakrishnan M, Shieh CC. Effects of intermediate-conductance $Ca^{2+}$-activated $K^+$ channel modulators on human prostate cancer cell proliferation. Eur J Pharmacol 2003;471:157-64
13. Rane SG. The growth regulatory fibroblast IK channel is the prominent electrophysiological feature of rat prostatic cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 2000;269:457-63
14. Ashcroft FM. Ion channels and disease. San Diego: Academic Press; 2000;125-60
15. Day ML, Pickering SJ, Johnson MH, Cook DI. Cell-cycle control of a large-conductance $K^+$ channel in mouse early embryos. Nature 1993;365:560-2
16. Gee J, Tanaka M, Grossman HB. Connexin 26 is abnormally expressed in bladder cancer. J Urol 2003;169:1135-7
17. Carruba G, Stefano R, Cocciadiferro L, Saladino F, Di Cristina A, Tokar E, et al. Intercellular communication and human prostate carcinogenesis. Ann N Y Acad Sci 2002;963:156-68
18. Habermann H, Ray V, Habermann W, Prins GS. Alterations in gap junction protein expression in human benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. J Urol 2002;167:655-60
19. Grossman HB, Liebert M, Lee IW, Lee SW. Decreased connexin expression and intercellular communication in human bladder cancer cells. Cancer Res 1994;54:3062-5
20. van Baren MJ, Heutink P. The PCR suite. Bioinformatics 2004;20:591-3
21. Tsai H, Werber J, Davia MO, Edelman M, Tanaka KE, Melman A, et al. Reduced connexin 43 expression in high grade, human prostatic adenocarcinoma cells. Biochem Biophys Res Commun 1996;227:64-9
22. Mehta PP, Lokeshwar BL, Schiller PC, Bendix MV, Ostenson RC, Howard GA, et al. Gap-junctional communication in normal and neoplastic prostate epithelial cells and its regulation by cAMP. Mol Carcinog 1996;15:18-32
23. Hossain MZ, Jagdale AB, Ao P, LeCiel C, Huang RP, Boynton AL. Impaired expression and posttranslational processing of connexin43 and downregulation of gap junctional communication in neoplastic human prostate cells. Prostate 1999;38:55-9
24. Govindarajan R, Zhao S, Song XH, Guo RJ, Wheelock M, Johnson KR, et al. Impaired trafficking of connexins in androgen-independent human prostate cancer cell lines and its mitigation by alpha-catenin. J Biol Chem 2002;277:50087-97
25. Tanaka M, Grossman HB. Connexin 26 induces growth suppression, apoptosis and increased efficacy of doxorubicin in prostate cancer cells. Oncol Rep 2004;11:537-41