

Etoposide 처리에 의한 CaSki 자궁경부암 세포에서의 단백질 발현 양상

가톨릭대학교 의생명과학¹, 가톨릭대학교 의과대학 산부인과학교실², 세종대학교 생명공학과³
이승백¹ · 배준상¹ · 김정진¹ · 동서연¹ · 임은경¹ · 이근호² · 김찬주² · 엄수종³ · 박종섭^{1,2}

목적 : Etoposide 처리 후 시험관내 자궁경부암 세포(CaSki 세포; HPV-16 positive)에서 나타나는 다양한 약리적 단백질 발현의 변화를 프로테오믹 분석(proteomic analysis)을 통해 확인하고자 하였다.

연구 방법 : Etoposide 처리 후 변화한 CaSki 자궁경부암 세포의 단백질을 이차원 전기영동을 통해 확인하고, Matrix-Associated Laser Desorption/ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS)로 단백질 동정을 하였다. MTT assay와 Propidium iodide (PI) staining, DNA fragmentation assay, Fluorescein diacetate (FDA), Fluorescence activated cell sorter (FACS), western blot 분석 등을 통해 자궁경부암 세포내 일어나는 다양한 세포사멸 변화를 확인하였다.

결과 : CaSki 세포는 Etoposide 농도에 의존적으로 세포 증식이 억제되었고, IC₅₀ 농도 값은 2μM였다. Etoposide는 CaSki 세포에 대해 DNA 분절과 G2/M기 정지를 유도되었으며, 단백질 상에서는 Fas (Apo-1/CD95), p53와 pRb, caspase-3 등의 세포사멸 단백질의 증가와 bcl-2와 caspase-3 전구체 단백질의 감소를 보였다. 그리고 미토콘드리아 연관 세포 사멸 단백질인 세포질내 cytochrome c와 활성화된 caspase-9의 단백질 발현 증가도 보였다. 끝으로 프로테오믹 기법을 통해 연구 대상 사이 단백질 발현의 차이를 보이는 17개의 단백질을 동정하였는데, etoposide 처리 후 감소한 단백질 (XAP-5, serine/threonine protein phosphatase 2B catalytic subunit, G2/mitotic-specific cyclin B1, T-box transcription factor TBX20, diacylglycerol kinase, amiloride-sensitive amine oxidase, HEF-like protein, ras-related protein Rab-20) 8개와 증가하는 단백질(RNA 3'-terminal phosphate cyclase-like protein, late endosomal/lysosomal Mpl interacting protein, glia maturation factor, replication protein A 14 kDa subunit, mago sashi protein homolog, 14 kDa phosphohistidine phosphatase, protein C14 or f48, cyclin-dependent kinase 4 inhibitor A, retinoic acid-binding protein II) 9개를 동정하였다.

결론 : 본 연구에서 etoposide는 CaSki 자궁경부암 세포에서 항증식, 세포사멸 효과가 있음을 확인하였으며, 프로테오믹 기법으로 새롭게 찾은 특이 단백질들은 자궁경부암 세포를 억제하는데 중요한 약리학적 자료로 제공될 수 있을 것이다.

중심단어 : Etoposide, 자궁 경부암, Apoptosis, Proteomics analysis

서 론

자궁경부암은 우리나라에서 발생하는 여성 암 중 5위를 차지하며, 1년에 5,000여명이 새로운 환자로 진단되는 호발암으로서 국민 보건에 심각한 문제가 되고 있는 질환이다.¹ 자궁경부암의 주된 발생 요인은 인유두종 바이러스(human papillomavirus; HPV)로서 이 중 HPV-16, HPV-18은 자궁경부암에서 자주 발생하는 고위험군 바이러스

이러므로 알려져 있으며,² HPV-16은 전체 자궁경부암 감염률의 60%를 차지한다.³ HPV 감염에 의한 발암 기전은 HPV E6와 E7 단백질이 각각 p53, Rb 종양 억제 단백질을 불활성화하여 악성화 변성, 불멸화를 유발시킨다.⁴⁻⁷ HPV E6의 과발현은 p53 단백질과 결합, 분해를 통해 p53의 암 억제 기능을 소멸시키고, HPV E7은 Rb 단백질과 결합함으로써 E2F 전사 인자를 유리시켜서 Rb 고유의 암 억제 기능을 저해한다.

자궁경부암은 수술과 방사선 요법이 주된 치료법이지만 etoposide, cisplatin, adriamycin, cyclophosphamide, paclitaxel 등 항암제가 소개되면서 항암요법에도 비교적 효과가 있는 고형암이며, 이들 항암제는 종양 세포에서

논문접수일 : 2005년 9월 13일

교신저자 : 박종섭, 137-701 서울시 서초구 반포동 505

가톨릭대학교 의과대학 산부인과학교실

전화 : 02) 590-2596 · 전송 : 02) 595-8774

E-mail : jspark@catholic.ac.kr

세포주기 정지(cell cycle arrest)와 세포사멸(apoptosis)을 유도한다.^{7,8} Etoposide는 topoisomerase II의 주요 기능인 DNA 이중가닥의 일시 풀림(breakage)과 가닥 통과(strand-passage), 재형성(reunion)을 방해하여 세포의 DNA 복제를 막도록 하는 topoisomerase II 저해제이다.⁹ 또한 이 약제는 전사와 DNA 합성, 세포 분열 등에도 간섭하여 세포사멸을 유도한다.^{9,10} 자궁경부암 세포 중 HeLa 세포에서는 etoposide가 DNA 분절과 G2기 정지, p53 단백질 활성으로 인해 세포사멸로 유도한다.¹¹⁻¹³

이차원 전기영동(two-dimension electrophoresis; 2-DE)은 단백질의 분자량과 등전점(pI)을 이용하여 단백질 고유의 위치를 이차원에서 분리해 놓음으로써 연구 대상 간의 변화된 특이적 단백질을 구별하며, 발견해 낼 수 있는 프로테옴 기법이다.¹⁴ 단백질 반점(spot)의 분리는 strip 상의 전하량에 따라 일차원적으로 단백질을 분리, 배열하고, 전기영동 장치로 단백질들을 gel 상에 이차원적으로 얻는다. 현재까지 차이가 나타나는 단백질들은 단백질 분해효소를 처리하여 peptide로 만든 후, Matrix-Associated Laser Desorption/ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) 분석을 이용하여 각각 peptide에 대한 분자량을 구한다. 여러 개의 분자량들은 database search를 통해 Peptide mass fingerprinting으로 각각 단백질로서 동정한다.

본 연구자들은 선행연구를 통하여 HeLa 자궁경부암 세포에 대한 특정 항암제의 항증식 효과를 프로테옴 기술로 제시함으로써 이 기법을 이용한 데이터베이스 구축이 중요함을 입증한 바 있다.¹⁵ 따라서 본 연구에서는 CaSki 자궁경부암 세포에 etoposide 처리 후 변화하는 단백질의 양상을 프로테옴 기법으로 접근하여 이에 변화하는 관련 단백질을 더욱 포괄적으로 찾고자 한다. 이와 같은 방법으로 새롭게 탐색한 단백질을 기능에 따라 분류한 후 항암제 표적 단백질을 발굴하고, 항암 기전을 규명하고자 한다.

연구 대상 및 방법

1. 세포주 배양과 세포 증식 검사(MTT assay)

자궁경부암 세포주인 CaSki (HPV-16)와 HeLa (HPV-18) 세포를 10% fetal bovine serum이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)(Gibco BRL, Grand

Island, NY) 배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다. 각 자궁경부암 세포가 etoposide (Sigma, Steinheim, Germany)의 대한 세포의 증식 반응을 알아보기 위하여 적정수의 세포를 10% FBS가 함유된 DMEM 배지에 부유시켜 96 well plate에 배양하였다. HeLa 세포는 1×10³ cell, CaSki 세포는 0.5×10³ cell로 분주하였으며, etoposide의 농도(0, 0.2, 0.4, 0.8, 1, 2, 4, 6, 8, 10μM)를 달리하여 각 배양기의 well에 첨가하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 간격으로 3일 동안 배양한다. 여기에 0.2 mg/ml MTT (Sigma, St. Louise, MO)를 각 well에 50μl 첨가하여 4시간 반응시켜 formazan을 형성시킨 후, 상등액을 제거하고 DMSO를 100μl/well 가한다. Formazan을 녹인 다음 microplate reader로 550 nm에서 흡광도를 측정한다.

2. Propidium iodide (PI) 염색 및 형광 현미경 관찰

Cover glass가 포함된 6 well plate 2×10⁴ cell CaSki 세포를 etoposide로 처리하고, 시간별로 1×PBS로 세척한 뒤, 3.7% Paraformaldehyde (Sigma)로 5분 고정시켰다 (4°C). 1×PBS로 세척하고, 0.1 mg/ml PI (Sigma, Steinheim, Germany) 500μl로 염색하고(상온, 30 초), 건조시킨 후 -20°C로 보관하였다. 형광 현미경으로 세포핵을 관찰하였다.

3. DNA fragmentation assay

100 mm dish에 2×10⁵ cell을 분주한 뒤 24시간 후 etoposide를 처리하였다. 약제 처리 24, 48, 72시간 후 700 μl 용해 완충액(500 mM Tris, 100 mM EDTA, 0.5% SDS)과 17.5μl proteinase K (Roche, Indianapolis, IN)(20 mg/ml)로 첨가한 후 phenol 용액 700μl를 첨가하여 12,000 rpm에서 7분 원심분리하였다. 상층액을 수거하여 3 M NaOAc (pH 7.0)을 첨가하고 -20°C에서 2시간 후 12,000 rpm에서 10분 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 70% ethanol로 세척하여 건조시키고 100μl TE buffer에 RNase A를 넣고 pellet을 녹였다. 추출한 DNA를 정량하여 3μg을 1.0% agarose gel에서 전기영동 후 UV 하에서 DNA ladder를 관찰하였다.

4. Fluorescein diacetate (FDA) analysis

Etoposide 2μM 농도에서 48시간, 72시간 후 배양 세포를 Trypsin-EDTA (Gibco)로 모은 뒤 1×PBS를 1 ml를

첨가하여 세척하였다. 2 μ l 1 M FDA를 첨가한 후 37°C에서 15분 배양시켰다. 20 μ l 0.1 mg/ml PI를 첨가한 후 37°C에서 5분 반응시킨 후 FACS (fluorescence activated cell sorter; Becton-Dickinson Immunocytometer System, San Jose, CA)로 분석하였다.

5. Fluorescence activated cell sorter (FACS) analysis

Etoposide 처리 후 24 시간에 세포를 모아서 원심 분리하여 상등액을 분리해 버렸다. 차가운 90% ethanol을 떨어뜨려 고정시키고 4°C에서 2시간 보관하였다. 원심분리한 뒤 남은 pellet에 500 μ l washing buffer (RNase A (Sigma), 10 mg/ml)를 넣고, 30분 후 500 μ l PI를 넣고, mesh filter로 균일하게 세포를 수거하여 FACS로 세포주기를 관찰하였다.

6. Western Blot

72시간 etoposide를 처리한 세포를 모아 용해액[1 M Tris (pH 7.5), 5 M NaCl, 0.5 M EDTA (pH 8.0), 1% Triton X-100, 50 \times PI, 100 mM PMSF, 1 M DTT, 100 mM NaF, 100 mM Na₃VO₄]으로 세포를 용해시켰다. Lysate를 원심분리(12,000 rpm, 5 min, 4°C)한 후, 상등액을 수거하여 단백질을 정량하였다. SDS-PAGE는 1 mm 또는 1.5 mm 두께의 8%, 12%, 15% gel을 만들어 Bio-Rad Protean II 전기영동장치를 사용하였다. 전기 영동된 gel로부터 단백질의 membrane으로 이동시키는데, 전사는 Bio-Rad Transblot cell을 사용하여 100 V에서 60-90분 실시하였다 (4°C). 전사된 membrane은 1 \times TBS-T (0.1% Tween 20) buffer로 5% skim milk을 제작하여 blocking (2 h, 37°C)하고, ECL nitrocellulose membrane (Amersham Life Science, Little Chalfort, UK)에 항체를 확인하고자 하는 단백질에 사용하는데, 1차 항체는 24시간, 4°C에서 반응시키고, 2차 항체는 1 \times TBS-T로 3번 세척한 후 45분 동안 반응시켰다(37°C). 사용한 항체는 다음과 같다; caspase-3 (1 : 1,000, 3% skim milk), caspase-9 (1 : 500), caspase-8 (1 : 500, 1% skim milk), Fas (1 : 300), Bcl-2 (1 : 500) (Santa Cruz, CA), Bax (1 : 800), Rb (1 : 400)(BD Bioscience, San Diego, CA), p53 (1 : 200)(Novocastra Lab, Newcastle upon Tyne, UK), p21 (1 : 500)(Calbiochem, La Jolla, CA), β -actin (1 : 1,000)(Sigma), peroxidase-conjugated mouse (1 : 2,000), rabbit (1 : 5,000), goat (1 :

10,000) anti-IgG (Santa Cruz, CA).

7. Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and image analysis

프로테옴 분석은 단계별로 1) Sample preparation, 2) Iso-electric focusing (IEF), 3) SDS-PAGE, 4) Visualization, 5) Image analysis, 6) Protein identification으로 진행하였다.

1) Sample preparation

CaSki 세포를 원심분리하여 수거한 후, 1 \times PBS buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄)로 3회 세척하였다. Pellet에 protease inhibitor cocktail이 첨가된 2-DE sample buffer (7 M Urea, 2 M thiourea, 65 mM DTT, 4% CHAP, 0.5% IPG buffer, 40 mM Tris, 0.002% BPB)를 가하여 상온에서 30분 반응시키고, 원심분리하여 상등액을 취하여 프로테옴 분석용 단백질 시료로 사용하였다.

2) Isoelectric focusing (IEF)

IPG strip holder에 시료를 넣고, IPG strip (Amersham bioscience)을 올려놓은 후 DryStrip CoverFluid (Amersham bioscience)를 위에 얹어 20°C, 12시간 rehydration시키고, 20°C, 100 V, 0.5시간, 300 V, 0.5시간, 600 V, 0.5시간, 1,000 V, 0.5시간, 3,000 V, 0.5시간, 6,000 V, 8 시간 동안 isoelectrofocusing을 수행하였다.

3) SDS-PAGE

IEF가 끝난 IPG strip은 SDS-PAGE 용액 시스템과 맞추기 위해 equilibration buffer (6 M Urea, 2% SDS, 1 \times SDS running buffer, 20% glycerol, 5 mM TBP, 2.5% acrylamide)를 strip당 10 ml 가하여 15분 shaking하고, 증류수로 strip을 씻어낸 다음, 여과지에 올려놓아 과잉의 수분을 제거하였다. 이 후, second dimension으로 옮겨 SDS-PAGE상에서 5 mM 1시간, 10 mM 16시간 동안 분자량에 따라 분리하였다.

4) Visualization

Gel은 Bio-Rad silver stain plus kit을 사용하여 단백질 spot을 검출하였다.

5) Image analysis

Bio-Rad Scanner를 사용하여 gel의 이미지를 디지털화시켰다. PDQuest 6.2.1 software를 통해 spot 수를 산출하고, 여러 gel을 동시에 비교·분석하여 gel 사이에서 차이가 나는 spot를 검출하였다.

8. MALDI-TOF-MS (Protein identification)

1) In-gel digestion

Silver로 염색한 단백질들 중 원하는 단백질을 잘라 1 mm³로 조각을 낸 후, eppendorf tube에 옮겨 탈염색하였다. 10 mM DTT/25 mM ammonium bicarbonate buffer (pH 8.0) 처리하여 56°C에서 1시간 반응시켰다. 원심분리하여 상등액을 제거하고 남아있는 gel에 55 mM iodoacetamide/25 mM ammonium bicarbonate buffer (pH 8.0)를 처리하여 상온에서 30분 반응시켰다. Speed-Vac을 사용하여 1시간 건조시킨 후, trypsin solution (10 µg/ml in 25 mM ammonium bicarbonate buffer, pH 8.0)을 처리하여 37°C에서 12-14시간 반응시켰다. Trypsin digestion 후, 상등액을 수거하여 Speed-Vac으로 건조시켰다.

2) Matrix-Associated Laser Desorption/ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) analysis

50% acetonitrile/0.1% TFA buffer에 녹인 matrix와 시료

를 섞어 target probe에 loading한다. 시료가 건조되면, MALDI-TOF-MS에 장치하여, 표준 peptide를 측정하여 질량 교정을 수행하고, 시료를 분석한다. 얻어진 질량을 근거로 database에 등록되어 있는 단백질을 찾아 동정하였다.

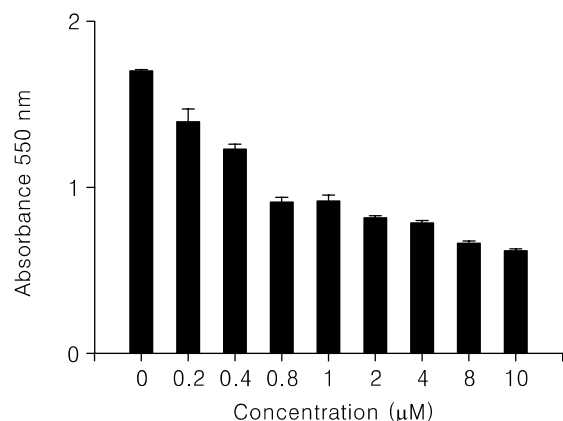


Fig. 1. Effects of etoposide on cell proliferation in CaSki cells. CaSki cells were seeded at 0.5×10^3 cells per well (0.2 ml) in 96-well flat-bottomed plates and incubated overnight at 37°C. The cells were treated with various doses (0, 0.2, 0.4, 0.8, 1, 2, 4, 8, 10 µM) of etoposide for 72 h, and the cell viability was measured by MTT assay. Results shown are the mean \pm S.D. of four independent experiment.

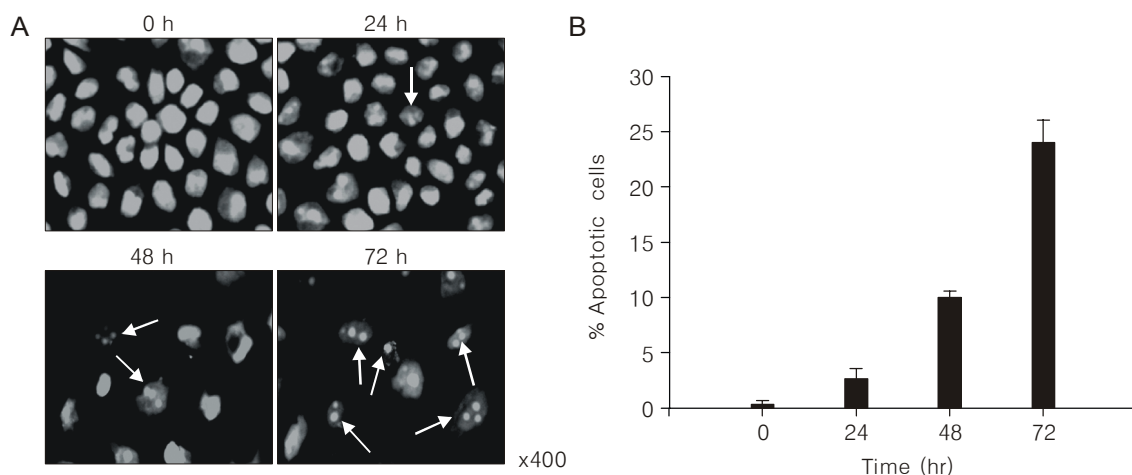


Fig. 2. Nuclear model changes as apoptotic body and chromatin condensation in CaSki cervical carcinoma cell lines (400 \times). Nuclear morphology of PI stained cells was examined by fluorescence microscopy. Cell apoptotic bodies and nuclear chromatin condensation in CaSki cells treated with etoposide were observed. (A) Arrows: apoptotic bodies and nuclear chromatin condensation. (B) Bar chart showing the proportion of apoptotic bodies and nuclear chromatin condensation. Data are shown mean \pm S.D. (n=5).

결 과

1. Etoposide의 자궁경부암 세포 성장 억제

Etoposide에 의한 세포 성장 억제를 알아보기 위해 MTT assay를 실시하였다. CaSki 세포에 etoposide를 농도별로 처리하고 그 변화를 관찰하였을 때, etoposide의 농도에 의존적으로 세포 성장이 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 1). 시간별로 etoposide 농도를 달리하여 세포 성장 억제를 확인 한 후, 3일째 농도별 세포 성장 곡선에서 CaSki 세포의 etoposide에 대한 IC_{50} 값은 $2\mu M$ 로서 50%의 세포 성장억제를 관찰할 수 있었다. HeLa 세포에서도 etoposide 농도에 의존적으로 세포성장이 억제되었고 $1\mu M$ 의 IC_{50} 값을 보였다(Date not shown).

2. 세포의 형태학적 변화

Etoposide에 의해 변화되는 세포의 형태를 관찰하기 위해 DNA를 PI로 염색하였다. Etoposide을 $2\mu M$ 로 처리 후 0, 24, 48, 72시간 후 세포의 형태학적 변화를 관찰하였다(Fig. 2). CaSki 세포는 apoptotic body, chromatin condensation, chromatin fragmentation이 약제 처리 후 24, 48, 72시간이 지남에 따라 2.6, 10, 24배로 시간 의존적으로 증가하는 양상을 보였다.

3. DNA 분절과 세포 고사 확인

Etoposide를 처리한 CaSki 세포에서 세포 고사에 의한 DNA fragmentation을 의미하는 DNA ladder가 유도되는지 확인하였다(Fig. 3). 약제의 농도는 $2\mu M$ 로 처리하였

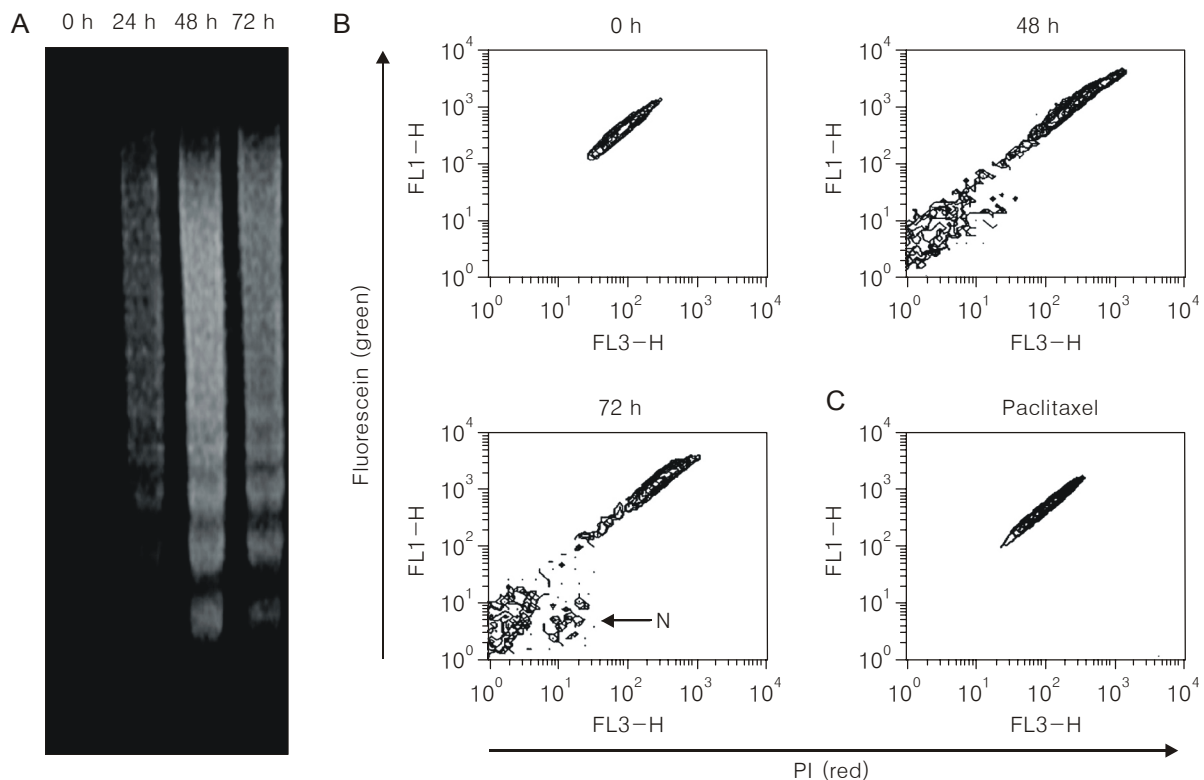


Fig. 3. (A) Analysis of molecular weight DNA fragments and internucleosomal DNA cleavage. Time-dependent effect of etoposide on DNA fragmentation assay. DNA was extracted and electrophoresed in parallel on the same agarose gel with ethidium bromide staining. Lane 0 h is DNA fragmentation in untreated cells, Lanes 48 h and 72 h was showed that both agent cause a 'ladder' of internucleosomal DNA fragments at ~ 200 bp intervals. **(B)** Flow cytometry. Exclusion of Propidium iodide combined with hydrolysis of fluorescein diacetate. A short incubation with PI and FDA results in fluorescent labelling in green (fluorescein) of live and early apoptotic cells, which can exclude PI (because of the existence of charge in live and early apoptotic cells), whereas necrotic or mechanically broken cells, as well as isolated nuclei, were stained red (PI). FL3-H indicates red color intensity, while FL1-H shows green color intensity. Arrows: necrosis, broken DNA and isolated nuclei. **(C)** Paclitaxel was used as a positive control to induce apoptosis. Early apoptotic cells and live cells, is shown.

으며, 0, 24, 48, 72시간에 확인한 결과, 24, 48, 72시간에서 DNA ladder를 관찰하였다. 24시간에서는 DNA ladder가 거의 드물게 관찰되었으며, 72시간째 수거한 DNA ladder에서는 48시간에서 나타났던 200 bp band가 나타나지 않았다. Etoposide가 농도와 관련하여 어떤 세포 사멸에 영향이 있는 지에 대해 Fluorescein diacetate (FDA) hydrolysis 분석을 실시하였다. FDA hydrolysis 분석은 살아있는 세포를 비롯한 early apoptotic cell들을 FDA의 esterases 작용으로 녹색의 형광 빛을 내게 하고, necrotic cell, broken cell, 분리된 핵 조각(isolated nuclei)을 PI의 적색으로 구분해 주는 분석법이다.¹⁶ FDA hydrolysis 분석 결과, 48시간에서 apoptotic DNA가 분석되었고, 72시간에서는 apoptotic DNA 뿐 아니라 necrotic cell과 broken cell, 그리고 분리된 핵 조각들이 관찰되었다.

4. 세포 주기 분석

Etoposide에 의해 CaSki 세포에서 일어나는 세포 주기의 변화를 정량화하기 위해 FACS analysis를 시행하였다 (Fig. 4). Etoposide를 2 μ M 농도로 처리한 CaSki 세포는

0, 24, 48, 72시간 간격으로 세포 주기를 확인하였다. Sub G1 시기의 DNA 양은 0.82%였던 것이 24시간에는 1.85%, 48시간에는 2.11%, 72시간에는 3.69%로서 4.5배 증가하였다($p < 0.05$). G1 시기는 시간에 따라 감소되고, G2/ M 시기는 72시간 후 2.2배 증가하였다($p < 0.05$).

5. Western blot 분석

CaSki 세포에서 etoposide에 의해 유도되는 세포 사멸 기전을 확인하기 위해 western blot을 실시하여 분석하였다 (Fig. 5). HPV-16를 갖고 있는 CaSki 세포에서 Rb 단백질은 etoposide에 의해 활성화 Rb 단백질(hyperphosphorylation form; 120 kDa)이 감소되고, 비활성화 Rb 단백질(hypophosphorylation form; 115 kDa)이 증가되는 것을 확인하였다. HPV-16 E6과 반응하여 소멸되는 p53 단백질은 etoposide 투여 후 p53 단백질 양이 증가되었으며, p53 단백질에 의해 전사 유도되는 p21 단백질 발현도 증가되는 것을 확인할 수 있었다. Etoposide가 세포 사멸과 연관된 기전을 관찰하기 위하여 Fas 수용체 단백질을 비롯해서 세포질 내에 있는 caspase-8과 caspase-3의 caspase

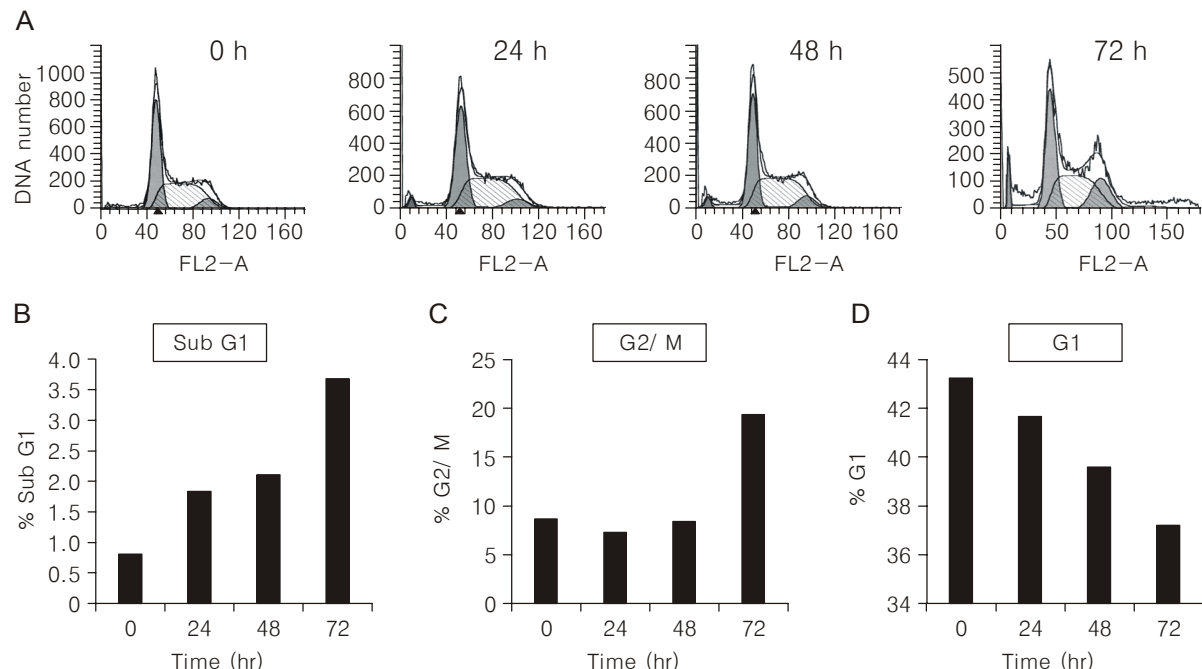


Fig. 4. Cell cycle progression of CaSki cells treated with etoposide. (A) Cell content of fixed and PI-stained cells was measured by flow cytometry and cell cycle was analyzed. FL2-A indicates red color intensity. **(B, C, D)** The percentage of apoptotic cells increased as etoposide concentration increased. **(B)** The percentage of sub G1 phase CaSki cells treated with etoposide. With increase in etoposide concentration, the percent of sub G1 phase cells was increased as detected. **(C)** % of G2/M. **(D)** % of G1.

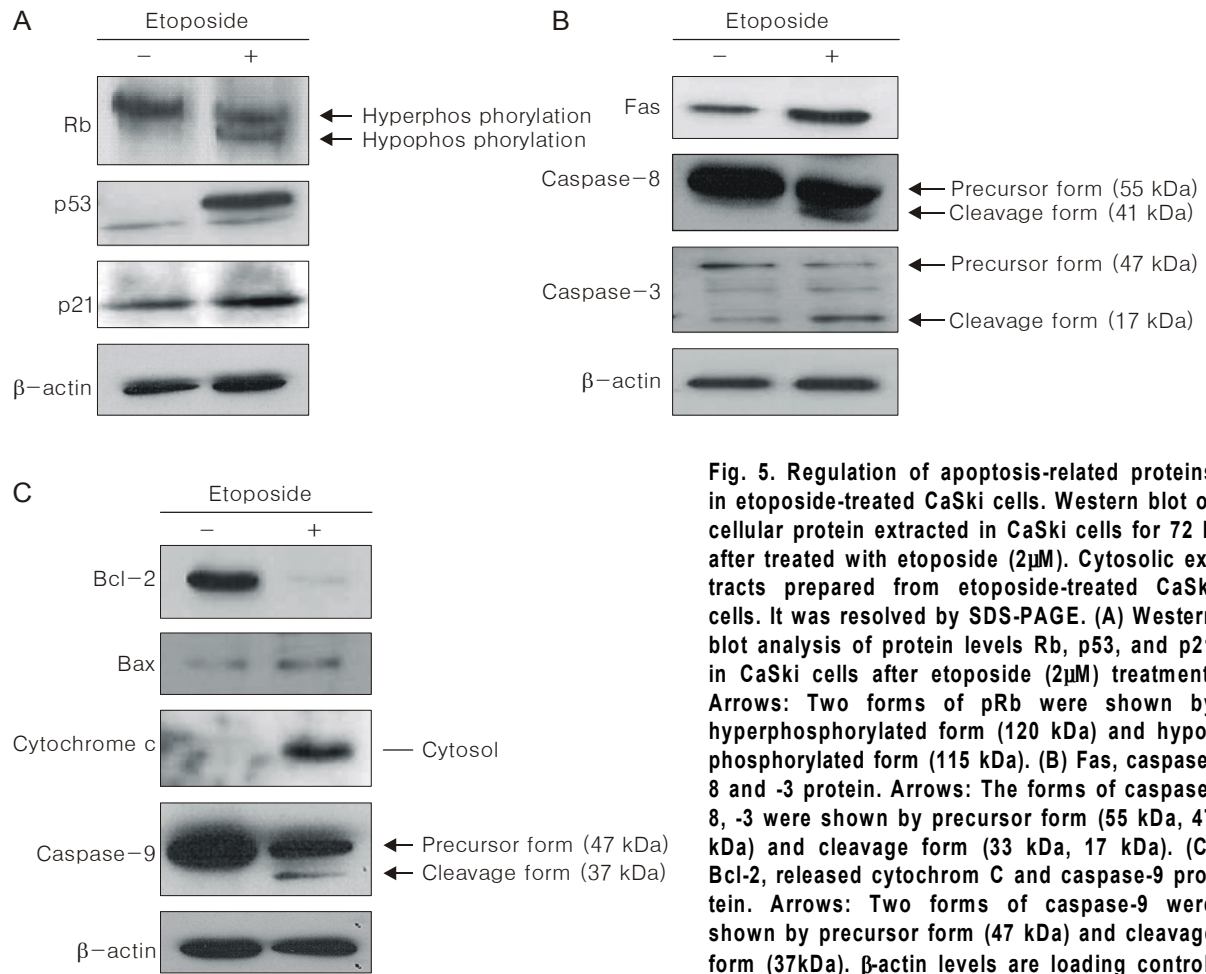


Fig. 5. Regulation of apoptosis-related proteins in etoposide-treated CaSki cells. Western blot of cellular protein extracted in CaSki cells for 72 h after treated with etoposide (2 μ M). Cytosolic extracts prepared from etoposide-treated CaSki cells. It was resolved by SDS-PAGE. (A) Western blot analysis of protein levels Rb, p53, and p21 in CaSki cells after etoposide (2 μ M) treatment. Arrows: Two forms of pRb were shown by hyperphosphorylated form (120 kDa) and hypophosphorylated form (115 kDa). (B) Fas, caspase-8 and -3 protein. Arrows: The forms of caspase-8, -3 were shown by precursor form (55 kDa, 47 kDa) and cleavage form (33 kDa, 17 kDa). (C) Bcl-2, released cytochrome C and caspase-9 protein. Arrows: Two forms of caspase-9 were shown by precursor form (47 kDa) and cleavage form (37kDa). β -actin levels are loading control.

family를 확인해 보았다. Fas 단백질은 실험 대조군에 비해 일정량 단백질 양이 증가하였고, 하위 단계인 caspase-8 단백질의 precursor form (55 kDa)은 0.5배 감소하며, cleavage form (41 kDa)은 증가하여 발현됨을 확인하였다. Caspase-3 단백질 역시 precursor form (47 kDa) 단백질이 감소되었고, cleavage form (17 kDa)은 증가하여 세포막 연관 세포 사멸(membrane-related apoptosis) 기전이 관련됨을 알 수 있었다. 또한, 미토콘드리아 연관 세포 사멸(mitochondria-related apoptosis) 단백질인 bcl-2와 bax, cytochrome c, caspase-9의 단백질 발현의 변화를 확인한 결과 etoposide 처리군 단백질의 변화에서는 anti-apoptosis인 bcl-2 단백질은 20배 감소되었으며, pro-apoptosis인 bax 단백질은 2.5배 증가하였다. 한편 미토콘드리아 막간 공간에서 세포질로 이행되는 cytochrome c 단백질의 발현이 많아지는 것을 확인할 수 있었다. 하위단계인 caspase-9 단백질의 precursor form (47 kDa)는 1.5 배

감소되는 반면, cleavage form (37 kDa)은 강하게 발현됨을 확인하였다. 각각 단백질 양이 동량임을 β -actin으로 보여 주었다.

6. 프로테오믹 분석 (Proteomic analysis)

Etoposide 처리 시 일어나는 세포내 단백질 발현의 차이를 알아보기 위해 이차원 전기영동(2-DE)을 실시하였으며, 대조군에 비해 2배 이상 변화된 단백질 900개 spot을 찾았다. 단백질 시료를 Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS)을 통해 분석한 뒤, 얻어진 질량값을 근거로 database에 등록되어 있는 단백질에 비교·분석하여 동정한 결과 특이적 단백질 17 종류를 찾을 수가 있었다 (Fig. 6). 대조군에 비해 실험군에서 etoposide의 투여에 의하여 발현이 감소되는 단백질은 XAP-5 protein (HXC-36 protein), serine/threonine protein phosphatase 2B cataly-

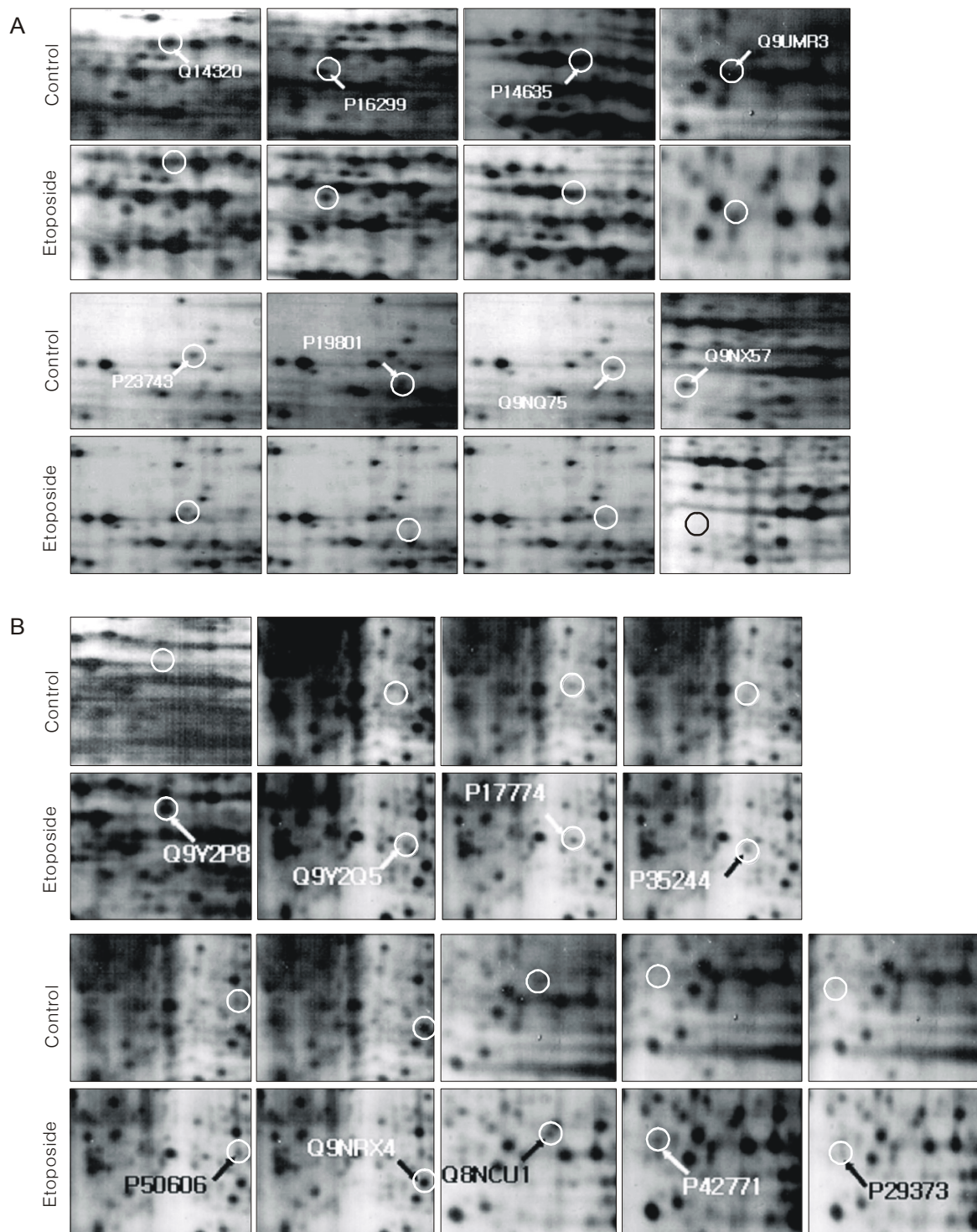


Fig. 6. 2-DE and differential protein expression analysis by etoposide treatment. 2-DE was stained protein spots by silver dye solutions. Proteins spots marked on the maps were considered differently expressed. (A) The down-regulated protein spots (arrows) in etoposide-treated CaSki cell. (B) The up-regulated protein spots (arrows) in etoposide-treated CaSki cell.

Table 1. MS identification of the down-regulated protein spots in etoposide-treated CaSki cervical carcinoma cells

Accession NO.	Protein	Mass (Da)/pI	Function
Q14320	XAP-5 protein (HXC-26 protein)	40242/6.4	May be a DNA-binding protein of transcriptional factor
P16299	Serine/threonine protein phosphatase 2B catalytic subunit, isoform	59025/5.6	This subunit may have a role in the calmodulin activation of calcineurin
P14635	G2/mitotic-specific cyclin B1	48338/7.1	Essential for the control of the cell cycle at the G2/M (mitosis) transition
Q9UMR3	T-box transcription factor TBX20	28212/7.3	Probable transcriptional regulator involved in developmental processes
P23743	Diacylglycerol kinase (Diglyceride kinase)	82673/6.3	Upon cell stimulation converts the second messenger diacylglycerol into phosphatidate, initiating the synthesis of phosphatidylinositols and attenuating protein kinase C activity
P19801	Amiloride-sensitive amine oxidase	85364/6.6	Catalyzes the degradation of compounds such as substances involved in allergic and immune response, cell proliferation, tissue differentiation, tumor formation, and possibly apoptosis
Q9NQ75	HEF-like protein	87145/6.7	Possible docking protein
Q9NX57	Ras-related protein Rab-20	26277/6.1	Play a role in apical endocytosis/recycling

tic subunit과 G2/mitotic-specific cyclin B1, T-box transcription factor TBX20, diacylglycerol kinase, amiloride-sensitive amine oxidase, HEF-like protein, ras-related protein Rab-20 등 8 종류를 동정하였다(Table 1). 이와 반대로 실험군에서 etoposide의 투여에 의하여 발현이 증가되는 단백질은 RNA 3'-terminal phosphate cyclase-like protein (HSPC 338), late endosomal/ lysosomal Mp1 interacting protein (p14)(HSPC003), glia maturation factor, replication protein A 14 kDa subunit (replication factor-A protein 3), mago sashi protein homolog, 14 kDa phosphohistidine phosphatase, protein C14 or f48, cyclin-dependent kinase 4 inhibitor A (CDK4I), retinoic acid-binding protein II (CRABP-II) 등 9개를 동정하였다(Table 2).

고 찰

Etoposide는 폐 소세포암, 악성 림프종, 급성 백혈병, 고환 종양, 방광암 등 여러 암에 널리 사용되고 있는 식물성 알칼로이드계의 항암제로서 세포내 topoisomerase

를 억제하고 DNA 나선 파괴를 초래하여 세포의 성장을 방해하는 topoisomerase II 저해제이다.^{9,10} Etoposide는 Rat fibroblast와 mouse thymocyte 모델에서 p53 단백질의 활성화로 p21의 단백질에 신호를 주는데 이 때 활성을 갖는 p21은 Rb의 탈인산화를 증가시켜 전사 촉진인자인 E2F와의 결합을 유도한다.⁷ 이는 결국 caspase-3라는 apoptosome를 형성하여 세포사멸을 초래한다. 그러나 Human leukemia CCRF-CEM (CEM) 세포와 Jurkat 및 Chinese hamster ovary (CHO) 세포에서의 etoposide 세포 사멸 기능은 막 사멸 수용체(membrane death receptor) 조절 경로를 갖는다.⁹ 막 사멸 수용체에 관련된 Fas (APO-1/CD95) 수용체 단백질이 활성화가 되면, 이는 caspase-8와 -3의 활성화를 유도하여 세포사멸을 이르게 한다. 미토콘드리아 세포사멸 경로는 human myeloid leukemia HL-60 cell에서 많이 제시되어졌는데, etoposide를 처리할 경우 pro-apoptosis인 bax 단백질의 증가와 anti-apoptosis인 bcl-2 단백질의 감소로 미토콘드리아 내 막간 공간에 위치한 cytochrome c이 세포질로 유도되고, apaf-1과 dATP와의 결합으로 인해 결국 caspase-9로 가는 세

Table 2. MS identification of the up-regulated protein spots in etoposide-treated CaSki cervical carcinoma cells

Accession NO.	Protein	Mass (Da)/pI	Function
Q9Y2P8	RNA 3'-terminal phosphate cyclase-like protein (HSPC338)	40871/9.4	Plays a role in 40S-ribosomal-subunit biogenesis in the early pre-rRNA processing steps
Q9Y2Q5	Late endosomal/lysosomal Mp1 interacting protein (p14) (HSPC003)	13508/5.3	May act as a modulator of MAPK kinase signaling
P17774	Glia maturation factor (GMF-)	16713/5.2	Inhibition of proliferation of tumor cell
P35244	Replication protein A 14 kDa subunit (Replication factor-A protein 3 initiation)	13569/5.0	It participates in a very early step in
P50606	Mago nashi protein homolo	17164/5.7	Unknown
Q9NRX4	14 kDa phosphohistidine phosphatase	13833/5.7	Exhibits phosphohistidine phosphatase activity
Q8NCU1	Protein C14 or f48	15808/6.1	Unknown
P42771	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor A (CDK4I) (Multiple tumor)	16533/5.5	Interacts strongly with CDK4 and CDK6. Inhibits their ability to interact with cyclins D. Could act as a negative regulator of the proliferation of normal cells
P29373	Retinoic acid-binding protein II, cellular (CRABP-II)	15693/5.4	Cytosolic CRABPs may regulate the access of retinoic acid to the nuclear retinoic acid receptors. -FUNCTION: CRABP-II may participate in a regulatory feedback mechanism to control the action of retinoic acid on cell differentiation

포사멸을 일으킨다.^{17,18} 본 연구에서는 CaSki 세포내에서 다양한 세포사멸의 변화를 확인해 보았으며, 세포막 사멸 수용체 조절 경로와 미토콘드리아 세포사멸 경로를 통하여 세포사멸이 유도됨을 실험을 통해 확인할 수 있었다. 또한 FACS 분석을 통해 G2/M기에서 세포주기가 정지됨도 확인할 수가 있었다.

본 연구에서는 CaSki 세포에서 etoposide에 의해 변화되는 새로운 특이 단백질들을 찾기 위해 프로테옴 분석법을 실시하였고, 그 결과 17개의 변화된 단백질들을 동정하였다. Etoposide 처리 군에서 증가한 단백질 중 p14 (late endosomal/lysosomal Mp1 interacting protein)을 동정할 수가 있었는데, 이 단백질은 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) signal을 조절해주는 주요 조절인자 (modulator)이다.¹⁹ p14 단백질은 MP1 (MEK partner 1)과 complex로 형성하여 late endosome/lysosome membrane에 위치해 있다가 MAPK signaling에 관여한다.²⁰⁻²² Adaptor 단백질의 역할을 하는 p14 단백질은 endocytosis 과정에서 late endosome이 세포질 방향 세포막 내에 위치하며, 이때 MP1 단백질과 직접 결합하여 ERK MAP kinase 신호자인 p14/ MP1-MEK1-ERK1 scaffolding complex를 형성

한다.²³ 그러나 흥미롭게도 본 실험에서는 암세포의 항증식 약물로 알려져 있는 etoposide를 처리한 실험군에서 오히려 p14 단백질이 증가하는 결과를 얻었다. 본 연구의 FDA hydrolysis 분석 결과, etoposide 처리 후 72시간에서 apoptotic DNA 뿐만 아니라 necrotic cell과 broken cell, 분리된 핵 조각(isolated nuclei)들도 동반하여 발현됨을 확인한 바 있다. Gozuacik 등에 따르면 세포 죽음 (cell death)을 크게 세 가지 작용으로 나뉘는데, 첫째는 apoptotic body와 caspase와 연관된 세포사멸(apoptotic cell death) 작용이며, 둘째는 late endosome/lysosome과 미토콘드리아, 소포체 일부 막과 결합하여 이중 또는 다중 막(double- or multi-membrane cytoplasmic vesicle) 등 자가포식체(autophagosome)를 형성하는 자가포식 작용(auto-phagic cell death)이다. 마지막인 셋째는 아직까지 자세하게 알려지지 않은 nonlysosomal vesiculate degradation으로 구분된다.²⁴ 이 중 자가포식 작용(auto-phagy)은 항상성 유지 작용(homeostasis)으로 세포내 도입되는 식균/식포작용(endocytosis)에 관련된 물질, 또는 잘못 만들어진 단백질이나 낡은 세포소기관(organelle)들을 산성 가수분해 효소로 분해하는 작용을 말하는데, 이때 p14 단백

질이 위치해 있는 late endosome/lysosome이 과발현된다. 이러한 연구 보고들을 토대로 본 연구 결과를 분석해 보면, p14 단백질이 아마도 자가포식 신호로 인해 과발현되어 caspase-independent programmed cell death인 자가포식 작용이 일부 일어난 것으로 추측되어진다. 최근 보고에서 oncogenic Ras와 JNK/p38, p53, ERK signaling pathway들이 자가포식 작용에 연관됨이 밝혀져 있다.²⁵⁻²⁷ 본래의 Ras 작용 기작은 cAMP-dependent protein kinase (PKA) signaling에 작용할 때에 자가포식 작용의 초기 단계에 직접적으로 저해를 시키지만²⁸ oncogenic Ras의 경우에는 p53의 활성 없이 oncogenic Ras-induced cell death을 가진다.²⁵ Human glioma와 gastric 암세포에 oncogenic Ras를 유도하였을 때 programmed cell death가 일어나는데, 이 때 late lysosome인 cytoplasmic vacuole들이 다량으로 관찰되며 이는 autophagic degeneration이라는 type 2 physiological cell death라고 제시하고 있다. 또한 자가포식 작용은 sustained ERK 활성으로 자가포식 소낭을 형성하는 역기능적 미토콘드리아에 신호를 주기도 하는데,²⁹ 세포사멸의 신호 자극이 장기간으로 이루어질 때는 미토콘드리아내 cytochrome c의 과도한 소모를 줄이기 위해 JNK/p38과 p53 등 단백질들이 자가포식 신호를 가지는 것으로 알려져 있다.^{26,27} CaSki 세포내 Ras의 돌연변이는 이미 밝혀진 바^{30,31} 이런 정황을 미루어 보아 etoposide의 작용은 p14 단백질의 증가를 촉진시키고 이는 oncogenic Ras의 하위단계와의 결합을 촉진함으로써 크게 나타나지 않던 자가 포식 작용의 활성이 일부 증가된 것으로 미루어 짐작해 볼 수가 있었다. 또한 본 연구의 western blot을 통해, 약제처리 후 72시간동안 방출되어진 다량의 cytochrome c의 유출은 아마도 p53과 JNK/p38 과발현을 도와 자가포식 신호가 유도된 것으로 추측된다. MAPK signaling pathway가 세포사멸을 유도한다는 보고는 자궁경부암 세포에서 이미 알려진 바 있다.^{32,33} HeLa 세포에서 etoposide를 처리하게 되면 MAPK signaling인 cdk2의 활성이 촉진되어 세포 사멸을 유도하며, 또한 stress-activated MAPK와 JNK/p38 신호를 받기도 하는데 이 역시 세포사멸을 유도한다. 자가포식 작용과 세포사멸 작용의 상관관계는 조직 혹은 세포 특이적으로 차이를 보이고 있다. Malignant glioma cell line의 경우 자가포식작용과 세포사멸은 antagonist로 작용하여 arsenic trioxide를 처리시 자가포식 작용이 세포사멸보다

선행되어 나타나나 추가로 자가포식 소낭(autophagic vesicle)을 저해하는 bafilomycin A1를 넣어주면 자가포식 소낭은 없어지고 그 자리에 세포사멸이 대신한다는 보고가 있다.²⁴ 이와 반대로 신경 세포나 HeLa 세포, CHO 세포에서는 약제 처리시 세포사멸로의 선행이 두드러지는데 pan-caspase 저해제를 처리한 뒤 동일한 약제를 처리하였을 경우에는 오히려 자가포식 작용이 촉진된다는 상반된 결과도 보고된 바 있다. 따라서 본 FDA 분석과 DNA fragmentation 분석법을 통해 나타난 CaSki 세포내 자가포식 작용은 세포사멸 작동 후 일정한 시간이 경과 한 뒤 부차적으로 일어나는 세포죽음으로서 죽음의 신호전달계내에서 세포사멸에 대해 열등하게 작용하는 것으로 예측된다. 따라서 향후 실험에서는 p14의 기능을 MAPK signaling 만의 한정된 연구보다는 자가포식 작용에 대한 상호 관련된 연구도 추가 수행할 예정이다. 또한 최근 보고에서 세포사멸과 세포증식 관련 단백질들에 대해 기존에 알려진 고유한 기능 외에 또 다른 기능이 존재함을 많이 밝혀진바,^{26,27,33} p14 단백질은 그에 부합된 단백질이므로 이를 바탕으로 한 실험적 접근도 필요할 것 같다.

그밖에 우리가 동정하여서 찾은 단백질 중에는 세포 전사(transcription)에 관계한 단백질 XAP-5,³⁴ TBX 20³⁵과 세포 주기 조절에 관련된 단백질인 serine/threonine protein phosphatase 2B catalytic subunit과 G2/mitotic-specific cyclin B1, 세포 신호와 관계한 단백질인 diacylglycerol kinase과 ras-related protein Rab-20, 세포사멸에 관련된 단백질인 Amiloride-sensitive amine oxidase,³⁶ 그리고 그 기능이 잘 알려지지 않은 단백질 HEF-like protein 등 발현이 감소한 8개의 단백질을 동정할 수 있었다. 또한 단백질 발현이 증가하는 9개 단백질은 replication protein A 14kDa subunit인 세포 전사 단백질과 단백질 합성에 관계한 단백질인 RNA 3'-terminal phosphate cyclase-like protein, 세포 주기 조절에 관련된 단백질인 cyclin-dependent kinase 4 inhibitor A (CDK4I),³⁷ 세포 신호와 관계한 단백질 14 kDa phosphohistidine phosphatase, 세포 증식에 관련된 단백질 glia maturation factor (GMF-),³⁸ 세포 분화와 관련된 단백질 retinoic acid-binding protein II (CRABP-II), 기능이 잘 알려지지 않은 단백질 mago sashi protein homolog, protein C14 or f48 등을 동정하였다.

본 연구에서 단백질학 분석을 통해 HPV-16을 함유한 CaSki 자궁경부암 세포에 etoposide 항암제를 처리하여 변화하는 17개 단백질을 새롭게 발견하였다. 이 동정된 단백질은 아직까지 암화 과정 및 암 전이 등 종양 생물학적으로 그 가치를 인정받지 못하였으나 지금까지 보고된 자료들을 바탕으로 그 단백질의 기능을 좀 더 연구해 볼 가치가 있을 것으로 생각된다. 더 나아가 이러한 단백질들 간의 상호 작용을 새롭게 밝히고, 세포사멸 과정과 자가포식 작용(autophagy)간의 새로운 세포사 기전 규명 연구도 필요하다. 본 연구에서 새롭게 발굴한 단백질들은 그 단백질에 의한 항암 작용 기전을 규명하여 향후 자궁경부암 치료제 개발에 중요한 약리학적 표적으로 제공될 수 있기를 기대한다.

참고문헌

1. Korea center cancer registry, Ministry of health and welfare, Korea (2002).
2. Tervahauta AI, Syrjanen SM, Vayrynen M, Saastamoinen J, Syrjanen KJ. Expression of p53 protein related to the presence of human papillomavirus (HPV) DNA in genital carcinomas and precancer lesions. *Anticancer Res* 1993; 13: 1107-11.
3. Lorincz AT, Temple GF, Kurman RJ, Jenson AB, Lancaster WD. Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. *J Natl Cancer Res* 1987; 79: 671-7.
4. Furumoto H, Irahara M. Human papilloma virus (HPV) and cervical cancer. *J Med Invest* 2002; 49: 124-33.
5. Mougin C, Humbey O, Gay C, Riethmuller D. Human papillomaviruses, cell cycle and cervical cancer. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2000; 29: 13-20.
6. Lin WC, Lin FT, Nevins JR. Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes Dev* 2001; 15: 1833-44.
7. Wagner S, Roemer K. Retinoblastoma protein is required for efficient colorectal carcinoma cell apoptosis by histone deacetylase inhibitors in the absence of p21Waf. *Biochem Pharmacol* 2005; 69: 1059-67.
8. Cho JW, Suh MH. Expression of cell cycle regulation and apoptosis-related proteins in etoposide-treated human skin fibroblast. *J Korean Cancer Assoc* 2001; 33: 77-83.
9. Mo YY, Beck WT. DNA damage signals induction of fas ligand in tumor cells. *Mol Pharmacol* 1999; 55: 216-22.
10. Downes CS, Clarke DJ, Mullinger AM, Gimenez-Abian JF, Creighton AM, Johnson RT. A topoisomerase II-dependent G2 cycle checkpoint in mammalian cells. *Nature* 1994; 372: 467-70.
11. Loike JD, Horwitz SB. Effect of VP-16-213 on the intracellular degradation of DNA in HeLa cells. *Biochemistry* 1976; 15: 5443-8.
12. Lock RB, Galperina OV, Feldhoff RC, Rhodes LJ. Concentration-dependent differences in the mechanisms by which caffeine potentiates etoposide cytotoxicity in HeLa cells. *Cancer Res* 1994; 54: 4933-9.
13. Reddy VG, Khanna N, Singh N. Vitamin C augments chemotherapeutic response of cervical carcinoma HeLa cells by stabilizing P53. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282: 409-15.
14. Shaw AC, Rossel Larsen M, Roepstorff P, Holm A, Christiansen G, Birkelund S. Mapping and identification of HeLa cell proteins separated by immobilized pH-gradient two-dimensional gel electrophoresis and construction of a two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis database. *Electrophoresis* 1999; 20: 977-83.
15. Lee KH, Kim CJ, Namkoong SE, Um SJ, Park JS. Proteomic analysis of anti-cancer effects by paclitaxel treatment in cervical cancer cells. *Gynecol Oncol* 2005; 98: 45-53.
16. Barnett MJ, McGhee-Wilson D, Shapiro AM, Lakey JR. Variation in human islet viability based on different membrane integrity stains. *Cell Transplant* 2004; 13: 481-8.
17. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001; 292: 727-30.
18. Perkins C, Kim CN, Fang G, Bhalla KN. Overexpression of Apaf-1 promotes apoptosis of untreated and paclitaxel- or etoposide-treated HL-60 cells. *Cancer Res* 1998; 58: 4561-6.
19. Wunderlich W, Fialka I, Teis D, Alpi A, Pfeifer A, Parton RG, et al. A novel 14-kilodalton protein interacts with the mitogen-activated protein kinase scaffold mp1 on a late endosomal/lysosomal compartment. *J Cell Biol* 2001; 152: 765-76.
20. Teis D, Wunderlich W, Huber LA. Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction. *Dev Cell* 2002; 3: 803-14.
21. Kurzbauer R, Teis D, de Araujo ME, Maurer-Stroh S, Eisenhaber F, Bourenkov GP, et al. Crystal structure of the p14/MP1 scaffolding complex: how a twin couple attaches mitogen-activated protein kinase signaling to late endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 10984-9.
22. Lunin VV, Munger C, Wagner J, Ye Z, Cygler M, Sacher M. The structure of the MAPK scaffold, MP1, bound to its partner, p14. A complex with a critical role in endosomal map kinase signaling. *J Biol Chem* 2004; 279: 23422-30.
23. Qian C, Zhang Q, Wang X, Zeng L, Farooq A, Zhou MM. Structure of the adaptor protein p14 reveals a profilin-like fold with distinct function. *J Mol Biol* 2005; 347: 309-21.
24. Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 2004; 23: 2891-906.
25. Chi S, Kitanaka C, Noguchi K, Mochizuki T, Nagashima Y, Shirouzu M, et al. Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase-independent cell death program in human cancer cells. *Oncogene* 1999; 18: 2281-90.

26. Gomez-Santos C, Ferrer I, Santidrian AF, Barrachina M, Gil J, Ambrosio S. Dopamine induces autophagic cell death and alpha-synuclein increase in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Neurosci Res* 2003; 73: 341-50.
27. Xue L, Fletcher GC, Tolkovsky AM. Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution. *Mol Cell Neurosci* 1999; 14: 180-98.
28. Budovskaya YV, Stephan JS, Reggiori F, Klionsky DJ, Herman PK. The Ras/cAMP-dependent protein kinase signaling pathway regulates an early step of the autophagy process in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2004; 279: 20663-71.
29. Zhu JH, Guo F, Shelburne J, Watkins S, Chu CT. Localization of phosphorylated ERK/MAP kinases to mitochondria and autophagosomes in Lewy body diseases. *Brain Pathol* 2003; 13: 473-81.
30. Pelisson I, Soler C, Pechoux C, Chignol MC, Viac J, Euvrard S, et al. c-myc and c-Ha-ras cellular oncogenes and human papillomaviruses in benign and malignant cutaneous lesions. *J Dermatol Sci* 1992; 3: 56-67.
31. Chan WK, Chong T, Bernard HU, Klock G. Transcription of the transforming genes of the oncogenic human papilloma-virus-16 is stimulated by tumor promoters through AP1 binding sites. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 763-9.
32. Boldt S, Weidle UH, Kolch W. The role of MAPK pathways in the action of chemotherapeutic drugs. *Carcinogenesis* 2002; 23: 1831-8.
33. Kim YU, Koo KT, Choi JS, Jin YH, Yim HS, Oh YT, et al. Analysis of cyclin-dependent kinase 2-regulated phosphorylation of stathmin in etoposide-induced apoptotic hela cells by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *J Health Sci* 2005; 51: 224-32.
34. Sedlacek Z, Munstermann E, Dhorne-Pollet S, Otto C, Bock D, Schutz G, et al. Human and mouse XAP-5 and XAP-5-like (X5L) genes: identification of an ancient functional retroposon differentially expressed in testis. *Genomics* 1999; 61: 125-32.
35. Plageman TF Jr, Yutzey KE. T-box genes and heart development: putting the "T" in heart. *Dev Dyn* 2005; 232: 11-20.
36. Novotny WF, Chassande O, Baker M, Lazdunski M, Barbry P. Diamine oxidase is the amiloride-binding protein and is inhibited by amiloride analogues. *J Biol Chem* 1994; 269: 9921-5.
37. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999; 13: 1501-12.
38. Utsuyama M, Shiraishi J, Takahashi H, Kasai M, Hirokawa K. Glia maturation factor produced by thymic epithelial cells plays a role in T cell differentiation in the thymic microenvironment. *Int Immunol* 2003; 15: 557-64.

Differential protein expression of etoposide-treated CaSki cervical carcinoma cells

Seung-Baek Lee¹, Jun-Sang Bae¹, Jung-Jin Kim¹, Seo-Yun Tong¹, Eun-Kyoung Yim¹,

Keun-Ho Lee², Chan-Joo Kim², Soo-Jong Um³, Jong-Sup Park^{1,2}

Department of Medical Bioscience¹, Division of Gynecologic Oncology²,

Department of Obstetrics and Gynecology, The Catholic University of Korea College of Medicine,

Department of Bioscience and Biotechnology³, Sejong University, Seoul, Korea

Objective : This study was designed to examine the pharmaco-dynamic pattern of proteomic expression in cervical carcinoma cells (CaSki cell line; HPV-16 positive) after in vitro treatment by the etoposide.

Methods : We analyzed proteomic profiling in cervical carcinoma cells after etoposide treatment using two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) with MALDI-TOF-MS used for protein identification. Then, we tested the several experimental methods for verification and functional identification, including MTT assay, PI staining, DNA fragmentation assay, FDA, FACS and Western blot analysis.

Results : Etoposide inhibited the CaSki cervical cancer cell growth in a dose-dependent manner and the optimal concentration of etoposide is 2 μ M (IC₅₀) in the CaSki cervical cancer cells. The etoposide induced apoptosis, as determined by DNA fragmentation assay, FACS, and Western blot. The etoposide increased the protein expression of Fas (Apo-1/CD95), p53, pRb and caspase-3, but decreased the level of Bcl-2 and caspase-3 precursor and subsequently triggered the mitochondrial apoptotic pathway (release of cytochrome c and activation of caspase-9). To this end, we analyzed CaSki cancer cells using 2-DE. Eight proteins (XAP-5, HXC-36, serine/threonine protein phosphatase 2B catalytic subunit, G2/mitotic-specific cyclin B1, T-box transcription factor TBX20, diacylglycerol kinase, amiloride-sensitive amine oxidase, HEF-like protein, ras-related protein Rab-20) were down-regulated and nine proteins (RNA 3'-terminal phosphate cyclase-like protein, late endosomal/lysosomal Mp1 interacting protein, glia maturation factor, replication protein A 14 kDa subunit, mago sashi protein homolog, 14 kDa phosphohistidine phosphatase, protein C14 or f48, cyclin-dependent kinase 4 inhibitor A, retinoic acid-binding protein II) were up-regulated in etoposide-treated CaSki cells when compared with non-treated cells.

Conclusion : Our results clearly indicate that etoposide induced cell death by apoptosis. These findings may provide insights into the mechanisms underlying the apparent anti-tumoral effects of etoposide.

Key Words : Etoposide, Cervical cancer, Apoptosis, Proteomics
