

## ORIGINAL ARTICLE

## 유방암 조직과 세포주에서 열충격단백질 60 kDa의 발현

유병철 · 박승연 · 이영돈 · 이정남 · 황유진<sup>1</sup> · 박흥규가천의과대학 의과전문대학원 외과학교실 · <sup>1</sup>분자생물학교실

## The Expression of Heat Shock Protein 60 kDa in Tissues and Cell Lines of Breast Cancer

Byung Chul You, Seung Yeon Park, Young Don Lee, Jung Nam Lee, Yu Jin Hwang<sup>1</sup>, Heung Kyu ParkDepartments of Surgery, <sup>1</sup>Molecular Biology, Gachon University of Medicine and Science, Incheon, Korea

**Purpose:** Breast cancer has been reported as the most common cancer of women in the United States, Western Europe and Korea and about 210,000 and 10,000 women in United States and Korea every year, respectively are diagnosed with it. Breast cancer is curable with an early diagnosis, and many researchers have made efforts to find a marker for this malady, heat shock protein (HSP) consists of 6 groups, it is highly preserved throughout both the prokaryotic and eukaryotic cells and it acts as a molecular chaperone that's involved in protein folding. HSPs have been recently reported to be related with breast cancer. In this study, we investigated the changes of expression of HSP60 in tissues and cell lines of breast cancer.

**Methods:** We obtained breast cancer tissues and normal tissues from breast cancer patients, and we purchased several cancer cell lines from American tissue culture correction. We treated the tissues and the cell lines of human breast cancer with heat shock protein. Proteins and mRNAs were isolated from the tissues and the cells and then we performed Western blotting, reverse transcriptase-Polymerase chain Reaction and fluorescence activated cell sorter analysis on them.

**Results:** On Western blot, HSP60 was more overexpressed

in the tissues and the cell lines of breast cancer than in the normal breast tissues and cell lines. The expression of HSP60 showed 2 types of molecular weight differences in the tissues and cell lines of breast cancer, and specifically, low HSP60 was over-expressed in the cancer tissues. There was no difference between the breast cancer cell lines and the normal cell lines in the expressions of HSP60 mRNA, according to the treatment with heat shock. Also, there was no relationship between phosphorylation and the structural difference of HSP60 protein, according to HSP60 protein's molecular weight. The expression of HSP60 has been mostly reported at the mitochondria; however, in this study, it was more predominantly detected at the cytoplasm than at the mitochondria in the breast cancer cell lines.

**Conclusion:** We conclude that HSP60 may be used as a diagnostic marker for breast cancer. Detailed investigation of the usefulness and significance of the HSP60 expression as a prognostic factor is required in further studies.

**Key Words :** Heat shock protein 60 (HSP60, Chaperonin), Breast cancer, Breast cancer cell lines, Chaperone

**중심단어 :** 열충격단백질 60 (샤페론), 유방암, 유방암 세포주, 샤페론

## 서론

유방암은 미국 및 서구 여러 나라에서 여성의 가장 흔한 암으로 보고되며 미국의 경우 매년 약 20만 명의 여성이 유방암으로 진단된다.

우리나라의 유방암 발생은 매년 꾸준한 증가를 보여 2003년

책임저자 : 박흥규

405-760 인천광역시 남동구 구월동 1198, 가천의과대학 교 길병원 외과  
유방센터

Tel: 032-460-3244, Fax: 032-460-3247

E-mail : hgih@gilhospital.com

접수일 : 2008년 1월 14일 게재승인일 : 2008년 6월 9일

\*본 논문은 2005년 아시아 유방암학회에서 포스터발표 되었음.

보건복지부의 중앙암등록 보고서에 따르면 전체 여성암 발생비율에서 2001년도 16.1%로 위암을 추월하여 암 발생 1위를 차지하였고, 2002년에는 16.8%로 증가되었으며 서구화되는 생활양식과, 검진사업의 활성화, 출산율 및 수유감소 등에 따라 더욱 증가될 것으로 예상된다.(1)

유방암과 관련되어 밝혀진 세포생물학분야의 많은 연구에서 에스트로겐 수용체, 프로그레스론 수용체, c-erbB2와 p53의 변이 등에 대하여 많은 보고가 되고 있다. 특히 유방암과 밀접한 연관이 있다고 하는 BRCA1과 BRCA2는 Miki 등(2)이 1994년 보고한 이후 유방암과 난소암환자의 중요한 위험인자로 알려져 있다.

유방암 연구가 일부 특정유전자의 변이에 대하여 제한되어 오던 것이 최근 다양한 인자의 발견과 복합적인 요인의 작용에 의한 보고가 있고 검사와 치료에 이용할 수 있는 인자의 연구가 활발하게 진행되고 있다.(3)

열충격단백질(heat shock proteins, HSPs)은 1962년 Rito-ssa(4)에 의하여 처음 초파리의 침샘염색체에서 나타나는 현상을 관찰하여 보고한 이후 1974년 Tissier에 의하여 처음 heat shock protein이라고 명명하였다.(5)

열충격단백질인 HSPs는 외부의 자극 즉 고열, 감염, 자유라디칼, 중금속 등 다양한 스트레스에 세포가 노출되었을 때 세포 내에서 이에 대한 세포의 방어기전으로 유도된다. HSPs의 세포 생존기전과 관련하여 최근 면역학, 생식의학 및 종양학 분야에서 흥미로운 사실들이 밝혀지면서 질병의 발생기작과 진단에 이용 가능한 표식자로서의 유용성, HSP의 발현조절을 이용한 새로운 치료법의 개발과 새로운 백신 개발 분야에서 연구가 이루어지고 있다.(6)

본 연구는 유방암의 세포분화와 세포 내의 단백질의 접힘 및 변형과 관계된 열충격단백질에 대하여 살펴보고자 하였다. 세포에 주어지는 다양한 자극에 의해 발현이 유도되는 열충격단백질은

원핵세포로부터 진핵세포에까지 진화하는 동안 높게 보존되어온 단백질 군집으로, 단백질 접힘에 관여하는 분자적 chaperone으로 작용한다.(7) 열충격 단백질 발현은 스트레스적 상황뿐만 아니라 세포고사(apoptosis)를 이끄는 많은 상황들에 의해 조절되어지고, 다양한 병리학적 상황과도 관련이 있다.(8,9) 열충격단백질들은 분자량에 따라 HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40, small HSP로 크게 6개 군집으로 분류된다(Table 1).(10)

본 연구의 대상인 HSP60은 60 kDa 분자량을 가지는 열충격 단백질의 하나로 세포질에서 합성되어 미토콘드리아로 이동하고 단백질 접힘 기능에 관여한다(Fig 1).(11) HSP60에 대한 이전 연구는 HSP60이 암화과정동안 수반된다는 점에 초점을 두었으며,(12) 세포 주기 조절과 암 증식에 중요한 역할을 한다는 연구가 보고되기 시작하였다.(13) 현재 HSP60은 여러가지 암에서 과발현된다는 가설과 함께 악성종양의 새로운 표지인자로 연구되고 있다.(7)

이에 본 연구는 첫째로, 유방암조직에서 HSP60 단백질의 발현양상과 그 의미를 알아보고자 하였다. 둘째로, 유방암세포주와

Table 1. Heat shock protein (HSP) family

Hsp100	Cytosol	Role in stress tolerance
Hsp90	Cytosol ER	Role in signal transduction, refolds and maintains role in cell cycle and proliferation
Hsp70	Cytosol ER Mitochondria	Autoregulation of the heat shock response, interorganellar transport, antiapoptotic activity
Hsp60	Mitochondria Cytosol	Refolds and prevents aggregation
Hsp40	Cytosol	Essential cochaperone activity with 70
Small hsps	Cytosol	Suppresses aggregation, heat inactivation

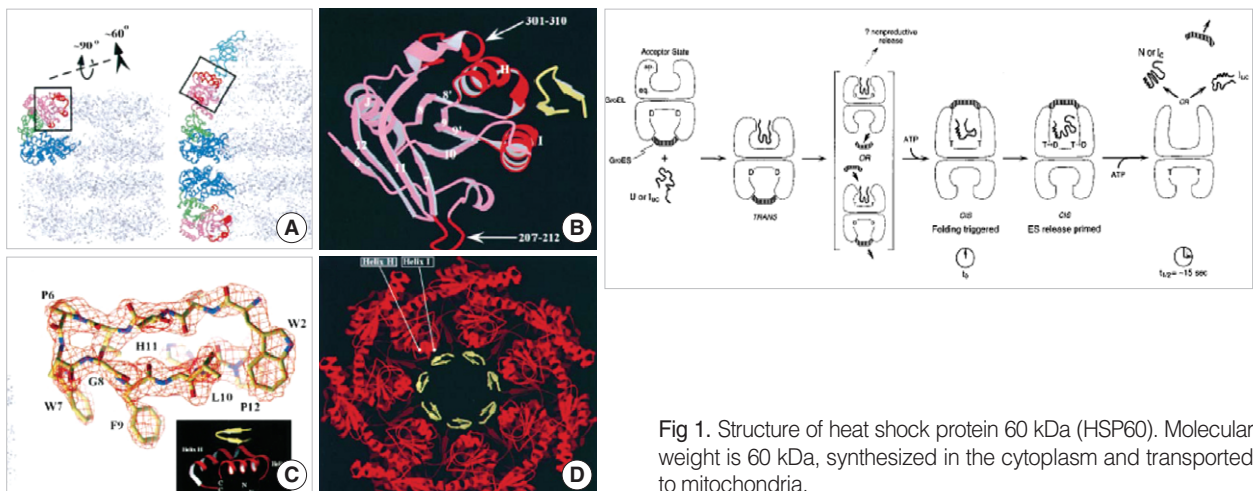


Fig 1. Structure of heat shock protein 60 kDa (HSP60). Molecular weight is 60 kDa, synthesized in the cytoplasm and transported to mitochondria.

유방암조직에서 발현되는 열충격단백질인 HSP60이 유방암 세포 내에서 분포하는 위치와 구조에 대하여 조사하였다. 셋째, 유방암세포 내에서 열충격의 변화에 따라 HSP60 단백질 발현양상에 변화가 있는지를 알아보고, 그 변화를 추적 관찰해보았다.

## 방 법

### 1. 실험 재료

실험에 필요한 조직은 2003년 6월부터 2004년 6월까지 가천 의과대학교 길병원 외과를 내원한 환자들 중에서 조직생검상 유방암으로 진단된 환자 20예에서 얻은 조직을 사용하였으며, 미국 세포주은행 American Tissue Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 유방암 세포주인 MDA-MB-231과 MCF-7와 정상세포주인 CCD-113sk를 ATCC에서 구입하여 사용하였다. MDA-MB-231은 Leibovitz's (JBI, Daegu, Korea) 배지를, MCF-7은 RPMI1640 (JBI) 배지를, CCD-113sk는 IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, JBI) 배지를 사용하여 배양하였고 배지는 10% FBS (JBI)와 1% penicillin/streptomycin (Gibco-BRL, Carlsbad, CA, USA)을 첨가하여 사용하였다. 세포를 실험조건에 맞게 분주한 후 각각의 세포가 70% 정도 자라면 각각 39°C, 41°C, 43°C, 45°C의 온도에서 1시간 동안 열자극을 주었다.

채취한 조직은 즉시 액체질소에서 급속 냉동시킨 후 초저온 (-70°C) 냉동기에 보관하였다가 사용하였다.

### 2. 연구 방법

#### 1) 단백질 추출

약 50 mg의 유방암조직과 대조군 조직에 300  $\mu$ L의 단백질 용해 용액(50 mM Tris-HCl [pH7.5], 0.2 M NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100)을 첨가하고 조직 분쇄기(Tissue Tearor homogenizer, BioSpec product, Inc., Bartlesville, OK, USA)를 사용하여 마쇄하였다. 분쇄된 조직에 300  $\mu$ L의 단백질 용해 용액을 첨가하여 조직과 함께 얼음에서 30분간 배양한 후 15,000 rpm으로 4°C에서 5분간 원심분리(Micro-17R plus, Micro high speed centrifuge, Hanil, Bucheon, Korea)하여 상층액을 새로운 튜브에 담고 -70°C에서 1시간 이상 냉각시켰다. 이를 실온에서 충분히 녹인 후 4°C에서 15,000 rpm으로 15분 동안 원심분리하고 분리된 상층액에 EDTA-free protease inhibitor를 첨가한 후 -70°C에 보관하였다.

배양세포는 petri dish에서 media를 버리고 인산완충식염수(Phosphate-buffered Saline, Gibco, Carlsbad, CA, USA)로 두 번 수세한 후 400  $\mu$ L의 단백질 용해용액(pro-prep, Intron

biothechnology, Suwon, Korea)를 넣고 scraper로 세포를 모았다. 이것을 1.5 mL 시험관에 넣고 4°C에서 30분간 보존한 후 15,000 rpm으로 4°C에서 5분간 원심분리하여 상층액을 얻어 -20°C에 보관하였다.

단백질 정량은 Bradford 방법으로 측정하였다. 분리된 단백질 중에서 1  $\mu$ L를 새 tube에 넣고 4  $\mu$ L의 PBS와 섞어서 1/5로 희석한 다음 150  $\mu$ L의 Bradford reagent (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)와 섞었다. 여기에서 다시 100  $\mu$ L를 얻어 595 nm에서 흡광광도계(spectrophotometer-DU650; Beckman, Somerset, NJ, USA)로 OD값을 측정하여 단백질 정량을 하였다. (14)

#### 2) Phosphatase Alkaline (AP) 처리

정량한 단백질 5 mg에 AP (Roche, Mannheim, Germany)를 처리하였다. 1  $\mu$ L의 10 $\times$  dephosphorylation buffer (Roche, Mannheim, Germany)와 1  $\mu$ L의 AP를 넣고 37°C에서 40분간 반응시켰다. 이들을 이전에 설명한 방법대로 western blot을 수행하였다.

#### 3) Mitochondria 분리

Petri dish에서 media를 버리고 인산완충식염수(Phosphate-buffered Saline)로 두 번 수세한 후 1 mL의 0.25 M sucrose (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany)를 넣고 scraper로 세포를 모았다. 600 g으로 10분간 4°C에서 원심분리하여 핵분획인 침전물을 얻었고 상층액을 8,000 g으로 10분간 4°C에서 원심분리하여 mitochondria인 침전물을 얻었다. 이들을 이전에 설명한 방법대로 단백질을 추출하여 western blot을 하였다.

#### 4) Western blot

정량한 단백질 5  $\mu$ g을 10% acrylamide gel을 이용하여 분리하였다. 유방암조직과 세포주에서 분리된 단백질은 동량의 2 $\times$  SDS-PAGE용 시료 완충용액을 첨가하여 95°C에서 5분간 가열하고 얼음에서 충분히 식혔다. Acrylamide 겔은 사용하기 전에 신선하게 만들었으며, 10%의 separating gel (pH 8.8)과 4%의 stacking gel (pH 6.8)을 이용하였다. 전기영동은 80 V로 20분, 100 V로 1시간 수행하였다. 전기영동한 겔을 transfer buffer (2.5 mM Tris, 6.9 mM Glycine, 20% Methanol)에 미리 적셔둔 porous pad와 3MM paper (Whatman laboratory Products, Maidstone, UK)위에 올려놓고 그 위에 PVDF Membrane (PVDF Western Blotting Membrane, Roche)과 3MM paper (Whatman), porous pad를 공기 방울이 생기지 않게 잘 덮고 transfer cassette (Bio-Rad Laboratories)로 압착하였다.

이것을 electrode transfer kit (Bio-Rad)에 넣고 transfer buffer (2.5 mM Tris, 6.9 mM Glycine, 20% Methanol)에 완전히 잠기게 한 후 전기이동(4°C, 30 mA, 16 hr)하였다. 단백질이 완전하게 전기이동된 membrane을 blocking solution (5% nonfat dry milk in PBS-T (1% Tween 20))에 넣고 8시간 동안 진탕 배양하였다. PBS-T (0.1% Tween 20)로 blocking solution을 30분간 세척한 후 일차항체인 HSP60 (rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, Santacruz, CA, USA)을 PBS-T (0.1% Tween 20)에 1/1,000로 희석하여 넣고 4°C에서 16시간 동안 진탕 배양하였다. PBS-T (0.1% Tween 20)로 membrane을 15분간 4회에 걸쳐 헹구어준 후, 이차항체(Anti-rabbit Ig, horseradish peroxidase linked whole antibody, Amersham Bioscience, Arlington Heights, IL, USA)를 1/1,000로 희석하여 넣고 실온에서 2시간 동안 진탕 배양하였다. PBS-T (0.1% Tween 20)로 membrane을 10분간 3회 헹구어준 후, membrane에 western detection solution (WEST-ZOLTM plus, Intron biotechnology, Seongnam, Korea)을 도포한 후 암실에서 필름(Eastman Kodak, Rochester, NY, USA)에 감광시켜 현상하였다.

### 5) mRNA 추출

약 50 mg의 유방암조직과 대조군 조직 그리고 세포주에서 mRNA를 추출하였다. 배양한 세포주는 petri dish에서 media를 버리고 인산완충식염수(Phosphate-buffered Saline)로 두 번 수세한 후 1 mL의 Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 넣고 scraper로 세포를 모았다. 이를 1.5 mL 시험관에 넣고 상온에서 5분간 보존하고 200  $\mu$ L의 chloroform (Merck, Darmstadt, Germany)을 넣고 10-20회 정도 혼합한 후 4°C에서 12,000 g로 15분 동안 원심분리하여 상층액을 새로운 시험관으로 옮겨담았다. 500  $\mu$ L의 Isopropanol (Merck)을 첨가하여 실온에서 10분간 보존한 후 4°C에서 12,000 g로 10분 동안 원심분리하여 RNA 침전물을 얻었다. 침전물을 75% 알코올 1 mL로 2회 닦아준 후 건조시키고, RNase-free water (DEPC, Sigma, St. Louis, MI, USA)로 전처리한 멸균 증류수로 용해하여 260 nm에서 흡광광도계로 농도를 측정하였다.

### 6) cDNA 합성

분리한 1  $\mu$ g의 mRNA를 사용하여 역전사(reverse transcription)반응을 시행하고 cDNA를 얻었다. 1  $\mu$ g의 RNA에 random 시발제(Promega, Madison, WI, USA) 0.5  $\mu$ L을 넣고 94°C에서 5분 동안 반응시킨 후, 4°C에서 충분히 식혔다. 여기에 5 mM dNTPs, 5 $\times$ M-MLV RT buffer (Promega) M-MLV

(malrony murine leukemia virus)-Reverse transcriptase (Promega) 200 unit/ $\mu$ L, RNase inhibitor (Promega) 40 unit/ $\mu$ L을 첨가하여 전체가 20  $\mu$ L가 되도록 한 후 37°C에서 한 시간 반응시켜 cDNA를 얻었다.

### 7) 효소연쇄증합반응

HSP60을 검출하기 위하여 역전사 효소반응을 통해 만들어진 cDNA 20  $\mu$ L 중 1  $\mu$ L를 사용하여 효소연쇄증합반응을 시행하였다. 한편으로 cDNA의 유무를 확인하기 위하여 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 사용하였다. 효소연쇄증합반응은 10 $\times$ reaction buffer (Bioneer, Seoul, Korea), 2.5 mM dNTP mixtures (Bioneer), 제조한 시발체 Sense primer, Anti-sense primer, Taq DNA polymerase (Bioneer, 2 unit/ $\mu$ L)를 첨가하여 전체가 10  $\mu$ L가 되도록 한 후 시발체가 나타내는 최적의 annealing 온도를 사용하여 PCR cycler (Technique, DC, England)에서 다음과 같이 시행하였다. 처음 변성온도는 95°C에서 5분간 실행하고, 94°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 30초간 30회 반복 시행하고 마지막으로 72°C에서 7분간 두었다.

### 8) 전기영동

효소연쇄증합반응 후 NuSieve GTG agarose (FMC, Rockland, ME, USA)를 이용하여 2.5% 겔을 만들었다. 준비된 시료를 겔 loading buffer (6 $\times$ sample loading buffer; 0.09% Bromophenol blue [BPB], 0.09% Xylene cyanol FF, 60% Glycerol and 60 mM EDTA)와 섞어준 후 한천으로 만든 겔에 전기영동을 하였다. 이때 분자량 표지 용액(phix174/BsuRI [HaeIII], MBI Fermentas, Glen Burnie, MD, USA)으로 그 크기를 비교 확인하였다. 사진 촬영은 폴라로이드 카메라를 사용하여 U.V. 투조기(Vilber Lourmat, Marnela valle cedex, France)위에 겔을 올려놓고 오렌지 필터를 사용하여 촬영하였다.

### 9) Mitofluor을 이용한 Fluorescence activated cell sorter

#### (FACS, 유세포 분석기) 분석

암세포주와 정상세포주를 배양하여 세포가 충분히 배양이 되면 trypsin처리를 하여 세포를 분리하였다. 분리된 세포에 배지를 첨가하여 원심분리하고 침전된 세포를 모아 Mitofluor가 300 nm의 농도가 되게 배지에 첨가하여 37°C에서 약 30분간 염색을 시행하였다.

염색은 살아있는 세포만 염색이 되며 PBS로 4회 반복해서 세척한다. 잔여염색액이 완전하게 세척이 되면 배지를 첨가하여 DAPI 파장에서 FACScan (Beckton Dickinson, Mountain View,



CA, USA)를 시행하였다.

#### 10) 결과분석을 위한 통계학적 처리

유방암조직과 정상조직에서 발현되는 HSP60 단백질의 결과에 대한 모든 통계자료는 통계 프로그램인 StatView II (Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA, USA)를 이용하여 평균±표준오차로 나타내고, 각 군 간의 비교는 ANOVA t-test의 Mann-Whitney 방법으로 시행하였으며,  $p < 0.05$ 를 통계적 유의성이 있는 것으로 하였다.

## 결 과

### 1. 유방암조직과 세포주로부터 분리된 단백질

#### 1) Western blot을 통한 HSP60 단백질의 발현

암조직과 정상조직에서 발현되는 HSP60 단백질은 western blot 결과 두 가지 분자량을 가지는 형태로 나타났다. 즉 암조직에서는 작은 크기의 분자량(low HSP)을 가지고 있는 것이 과발현되는 양상을 보였고, 암조직과 정상조직 모두에서 큰 분자량(high HSP)을 보이는 단백질이 발현되었다. 암조직의 단일세포주로부터 분리된 암세포주에는 작은 분자량을 보이는 단백질만 과발현되는 것을 확인할 수 있었다(Fig 2). 유방암세포주에서는 작은 분자량의 HSP60 단백질이 정상세포주에서 발현되는 것보다 많은 양으로 발현되었고, 유방암조직에서는 조직 내의 단백질이 암세포와 정상세포의 혼합에 의하여 분자량이 다른 단백질의 차이를 구별하기 힘들었으나 자궁경부암조직에서 보이는 차이와 유사하게

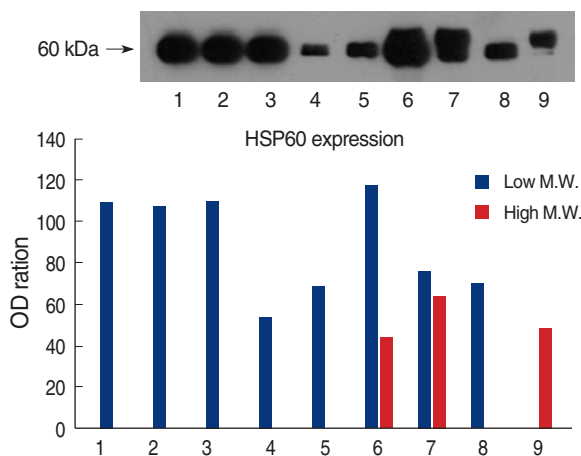


Fig 2. Expression of HSP60 in cell line and tissue by western blot. Lane 1=cancer cell line (37°C); lane 2=cancer cell line (41°C heat shock treatment); lane 3=cancer cell line (45°C heat shock treatment); lane 4=normal cell line (37°C); lane 5=normal cell line (41°C); lane 6=breast cancer tissue; lane 7=breast normal tissue; lane 8=cervix cancer tissue; lane 9=cervix normal tissue.

유방암조직에서 작은 분자량을 가지는 단백질이 정상조직에서 보다 많은 양이 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

유방암세포주인 MDA-MB-231과 MCF-7, 정상세포주인 CCD-1113sk를 배양하여 39°C, 41°C, 43°C, 45°C의 열 자극을 준 후, HSP60의 발현 차이를 확인하기 위하여 western blot을 수행하였다. 실험 결과, MDA-MB-231은 배양 온도 37°C에서 비해 온도가 높아질수록 HSP60의 발현이 증가하는 경향을 관찰할 수 있었다(Fig 3). 같은 암세포주인 MCF-7에서는 온도변화에 따른 HSP60 단백질의 발현차이는 나타나지 않았으나 온도가 증가할수록 HSP60가 감소하다가 43°C 및 45°C에서 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig 4). 암세포주에서 발현되는 HSP60의 발현량은 정상세포주에서 발현되는 양보다 약 두 배 정도의 비율로 증가되어 발현되는 것으로 나타났다. 특히 암세포주와 정상세포주에서 검출되는 마커(High molecular weight)로 HSP60 단백질의 N-말단부위의 28개의 signal sequence로 있는 부분이 절단되면서 나타나는 성숙된 HSP60 단백질이 정상조직에서 많은 양이 발현되는 것으로 나타났고 암조직에서는 적은 양이 발현되는 것으로 나타났다. 정상세포주인 CCD1113sk에서도 특별한 발현차이를 보이지 않았다(Fig 5).  $\beta$ -actin을 사용하여 수행한 단백질 발현은 암세포주와 정상세포주 모두에서 일정한 발현을 보였고, HSP60 단백질의 발현은 HSP60과  $\beta$ -actin과의 발현비율을 가지고 비교하였다(Fig 3-5).

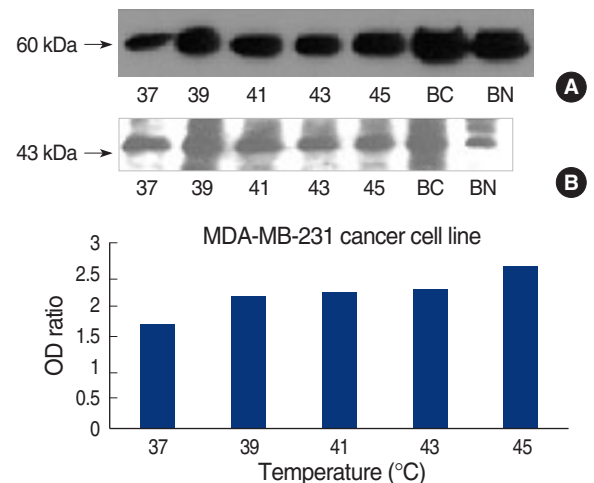


Fig 3. Expression of HSP60 in MDA-MB-231 by western blot. HSP60 was detected by western blotting using heat shock 60 kDa protein 1 (chaperonin) polyclonal antibody. (A) Expression pattern of HSP60 in MDA-MB-231 cell line treated heat shock (37, 39, 41, 43, 45°C). (B) Expression pattern of  $\beta$ -actin in MDA-MB-231 cell line treated heat shock (37, 39, 41, 43, 45°C). BC=Breast Cancer tissue; BN=Breast Normal tissue.

## 2) HSP60 mRNA의 발현

암세포주인 MDA-MB-231과 MCF-7, 정상세포주인 CCD-113sk에서 HSP60 mRNA 발현양상을 살펴보기 위해 39°C, 41°C, 43°C, 45°C의 열자극을 준 후 mRNA를 분리하고 역전사 효소연쇄증합반응(RT-PCR)을 이용하여 HSP60 mRNA 발현을 관찰하였다. MDA-MB-231은 온도가 높아질수록 HSP60

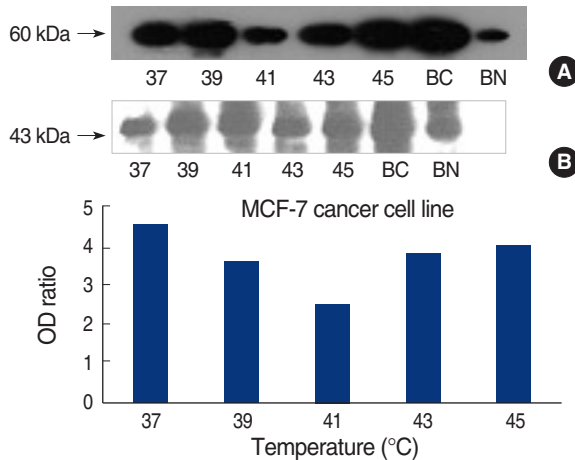


Fig 4. Expression of HSP60 in MCF-7 by western blot. HSP60 was detected by western blotting using heat shock 60 kDa protein 1 (chaperonin) polyclonal antibody. (A) Expression pattern of HSP60 in MCF-7 cell line treated heat shock (37, 39, 41, 43, 45°C). (B) Expression pattern of  $\beta$ -actin in MCF-7 cell line treated heat shock (37, 39, 41, 43, 45°C). BC=Breast Cancer tissue; BN=Breast Normal tissue.

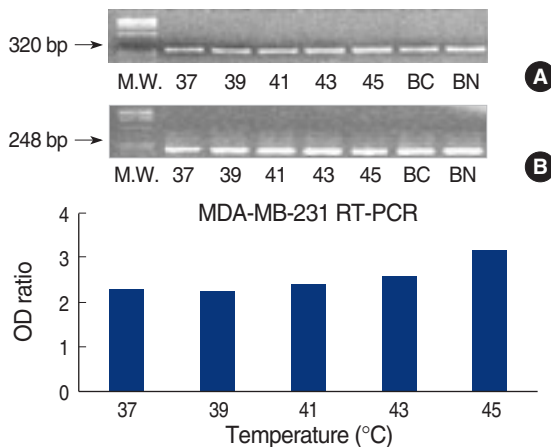


Fig 6. Amplification of HSP60 and GAPDH in MDA-MB-231 by RT-PCR. A 2.5% agarose gel electrophoresis of RT-PCR products of MDA-MB-231 cell line mRNA. RT-PCR was carried out using the primer pair HSP60 and GAPDH. Lane M.W, size marker (phix174/BsuRI [HaeIII]). (A) RT-PCR products of HSP60 in MDA-MB-231 cell line treated with heat shock (37, 39, 41, 43, 45°C). (B) RT-PCR products of GAPDH in MDA-MB-231 cell line treated with heat shock (37, 39, 41, 43, 45°C). BC=Breast Cancer tissue; BN=Breast Normal tissue.

의 발현이 증가하는 양상을 보이지만 유의한 차이는 없으며(Fig 6), MCF-7과 CCD-113sk에서는 별 다른 차이점을 보이지 않았다(Fig 7, 8). 암세포주와 정상세포주에서 HSP60 mRNA의 발현 차이는 세포주의 특성에 따라 각각 다르게 반응하고, 단백질에서 발현되는 형태와 동일하게 MDA-MB-231 세포주는 발현이 증가하는 반면에 MCF-7 세포주와 CCD-113sk 정상세포주는 변

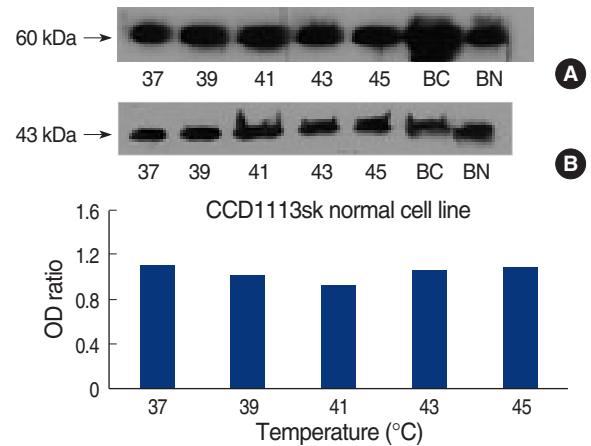


Fig 5. Expression of HSP60 in CCD-113sk by western blot. HSP60 was detected by western blotting using heat shock 60 kDa protein 1 (chaperonin) polyclonal antibody. (A) Expression pattern of HSP60 in CCD-113sk cell line treated heat shock (37, 39, 41, 43, 45°C). (B) Expression pattern of  $\beta$ -actin in CCD-113sk cell line treated heat shock (37, 39, 41, 43, 45°C). BC=Breast Cancer tissue; BN=Breast Normal tissue.

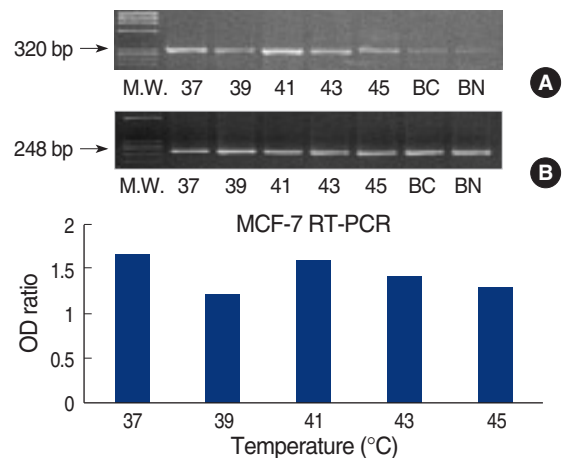
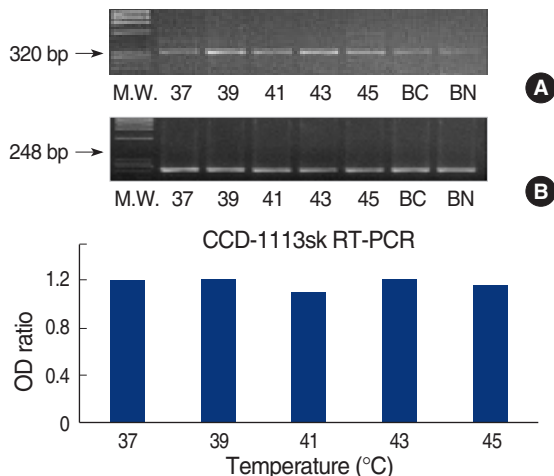


Fig 7. Amplification of HSP60 and GAPDH in MCF-7 cell line by RT-PCR. A 2.5% agarose gel electrophoresis of RT-PCR products of MCF-7 cell line mRNA. RT-PCR was carried out using the primer pair HSP60 and GAPDH. Lane M.W, size marker (phix174/BsuRI [HaeIII]). (A) RT-PCR products of HSP60 in MCF-7 cell line treated with heat shock (37, 39, 41, 43, 45°C). (B) RT-PCR products of GAPDH in MCF-7 cell line treated with heat shock (37, 39, 41, 43, 45°C). BC=Breast Cancer tissue; BN=Breast Normal tissue.

화가 없거나 감소하는 경향을 보였다. 특히 온도가 43°C와 45°C에서 mRNA의 전사는 온도에 의한 작용으로 부분적으로 작은 조각의 밴드가 검출되는 현상을 확인할 수 있었으며, 이 영향으로 인하여 RT-PCR에 의한 검출에서 부분적으로 작은 RT-PCR 밴드가 검출되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 단백질 발현이 고온에서 시간이 경과되면서 온도에 의한 작용으로 변형된 mRNA가 만들어지고 이렇게 만들어진 mRNA에서 단백질이 만들어질 수 있다는 것을 보여주었다. mRNA가 정상적으로 잘 분리되었는가를 확인하기 위한 방법으로 사용한 GAPDH는 모두 고르게 발현되었다(Fig 6-8).

### 3) AP 처리

3개의 cell line을 가지고 HSP60 단백질에 Alkaline phosphatase를 처리한 후 전기영동하고 western blot하여 HSP60 단백질의 phosphorylation 여부를 확인하였다. 단백질에 phosphorylation이 되었을 경우 단백질의 분자량의 크기에 차이를 보여 이것이 HSP60 단백질에서 보이는 크기의 차이를 규명해줄 수 있는지를 알아보았다. 2개의 암세포주와 1개의 정상세포주에서 분리한 단백질에 Alkaline phosphatase를 처리하고 western blot 결과 암세포주와 정상세포주에서 특이한 차이를 구별할 수 없었다(Fig 9). HSP60 단백질의 차이는 phosphorylation과 관계가 없다는 것을 알 수 있었다.

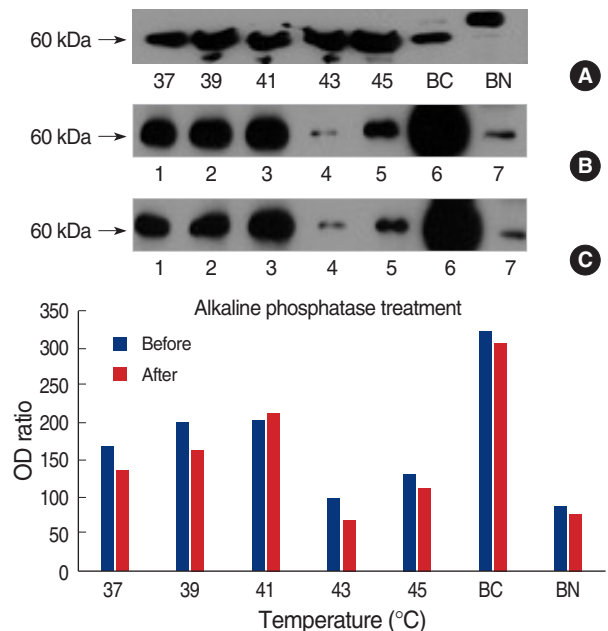


**Fig 8.** Amplification of HSP60 and GAPDH in CCD-1113 by RT-PCR. A 2.5% agarose gel electrophoresis of RT-PCR products of CCD-1113sk cell line mRNA. RT-PCR was carried out using the primer pair HSP60 and GAPDH. Lane M.W., size marker (phix174/BsuRI [HaeIII]). (A) RT-PCR products of HSP60 in CCD-1113sk cell line treated heat shock (37, 39, 41, 43, 45°C). (B) RT-PCR products of GAPDH in CCD-1113sk cell line treated heat shock (37, 39, 41, 43, 45°C). BC=Breast Cancer tissue; BN=Breast Normal tissue.

### 4) Mitochondria 분획 실험

암세포주와 정상세포주에서, 유방암조직과 정상조직에서 각각 세포질과 미토콘드리아를 각각 분리하여 HSP60 단백질 발현을 알아보았다.

분리된 분획에서 각각 발현되는 HSP60은 암세포의 세포질분획에서 가장 강하게 발현되었고, 미토콘드리아에서 가장 약하게 발현되었다. 조직에서 발현되는 것을 함께 비교한 것을 보면 암조직에서 가장 많이 발현되고 정상조직 그리고 정상세포주에서 가장 작은 양이 발현되는 것을 확인할 수 있었다(Fig 10). 암세포의 미토콘드리아에서 발현되는 HSP60 단백질은 정상세포에서 발현되는 HSP60 단백질보다 증가되는 것을 알 수 있으나, 암세포의 세포질 혹은 세포막에서 가장 많은 양의 HSP60 단백질이 존재한다는 것을 알 수 있으며 이것은 암세포에서 HSP60이 미토콘드리아에서 하는 기능과 세포질에서 하는 기능에 대하여 정상세포의 미토콘드리아에서 하는 역할과 차이가 있을 것으로 추측된다.



**Fig 9.** Treatment of alkaline phosphatase (AP). (A) Expression of HSP60 in MDA-MB-231 cell line treated heat shock (37, 39, 41, 43, 45°C) by western blot. (B) Before alkaline phosphatase treatment. Lane 1=cancer cell line (37°C); lane 2=cancer cell line (41°C heat shock treatment); lane 3=cancer cell line (45°C heat shock treatment); lane 4=normal cell line (37°C); lane 5=normal cell line (41°C); lane 6=breast cancer tissue; lane 7=breast normal tissue. (C) After Alkaline Phosphatase treatment. Lane 1=cancer cell line (37°C); lane 2=cancer cell line (41°C heat shock treatment); lane 3; cancer cell line (45°C heat shock treatment); lane 4=normal cell line (37°C); lane 5=normal cell line (41°C); lane 6=breast cancer tissue; lane 7=breast normal tissue.

### 5) Mitofluor을 이용한 FACS 분석

암세포주와 정상세포주에 각각 mitofluor를 염색하여 세포 내의 미토콘드리아의 양상을 관찰하고 이의 차이에 의하여 HSP60의 발현에 차이를 줄 수 있는지에 대해서 알아보려고 하였다.

대조염색을 시행하여 두 그룹 간의 염색을 시행하여 FACS 분석을 시행한 결과 정상세포와 암세포주와 약간의 차이가 보이지만 전체적인 상관관계에 유의한 차이는 없는 것으로 나타났다(Fig 11).

즉 암세포주와 정상세포주에서 미토콘드리아의 차이에 의하여 HSP60의 발현에 차이를 보이지는 않는다는 것과 암세포주에서는 HSP60의 존재가 미토콘드리아에 많이 존재하는 것이 아니고 세포질에 존재하고 있다는 것을 확인할 수 있었다. 즉 미토콘드리아만 순수하게 분리하여 확인한 앞의 실험과 비교하여 살펴보면

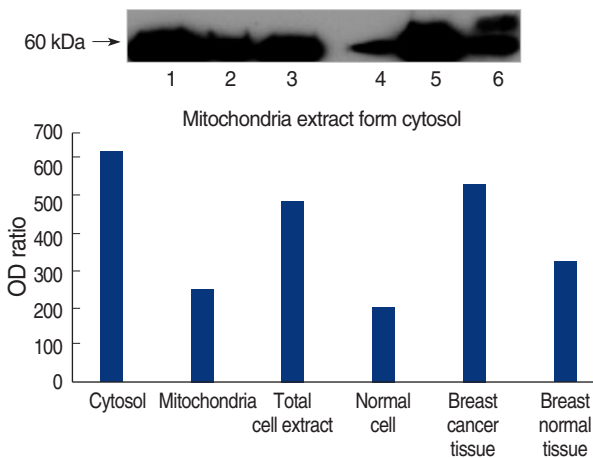


Fig 10. Extraction of cell membrane, nucleus and mitochondria. Lane 1=Nucleus protein extracted in cancer cell line; lane 2=Mitochondria protein extracted in cancer cell line; lane 3=cancer cell line; lane 4=normal cell line; lane 5=breast cancer tissue; lane 6=breast normal tissue.

암세포주에서 세포질에서 가장 많은 발현량을 보인 것과 미토콘드리아에서 적은 양을 발현하는 것으로 보이는 결과와 정상세포에서 적게 발현되는 것을 비교하였을 때, 암세포주의 세포질에 HSP60의 발현이 많이 된 것을 확인할 수 있었다.

### 6) 유방암조직과 정상조직에서 발현되는 HSP60 단백질

유방암조직 20예와 정상조직 6예에서 Western blot을 통한

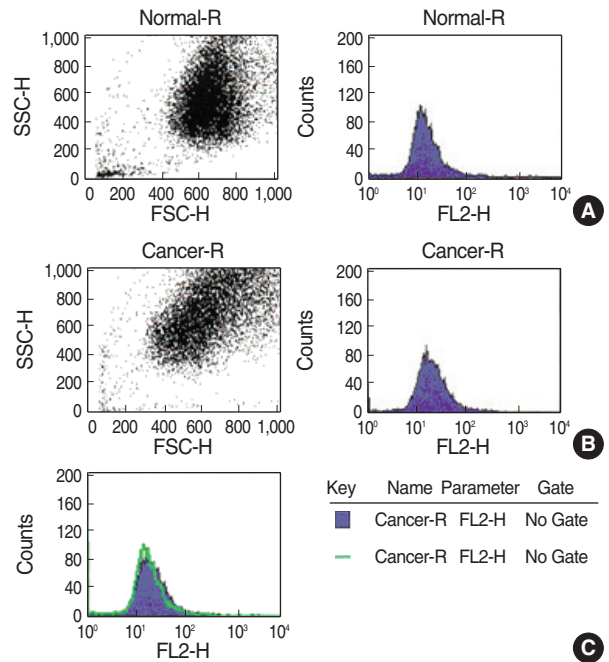


Fig 11. Cytofluorimetric analysis of Mitofluor in living cell. FACS can analysis was performed with an direct method. Samples were acquired using a flow cytometer and data were analyzed with the Lysis II software (FACScan, Becton-Dickinson). (A) Normal, (B) Cancer, (C) compare cancer with normal cell line.

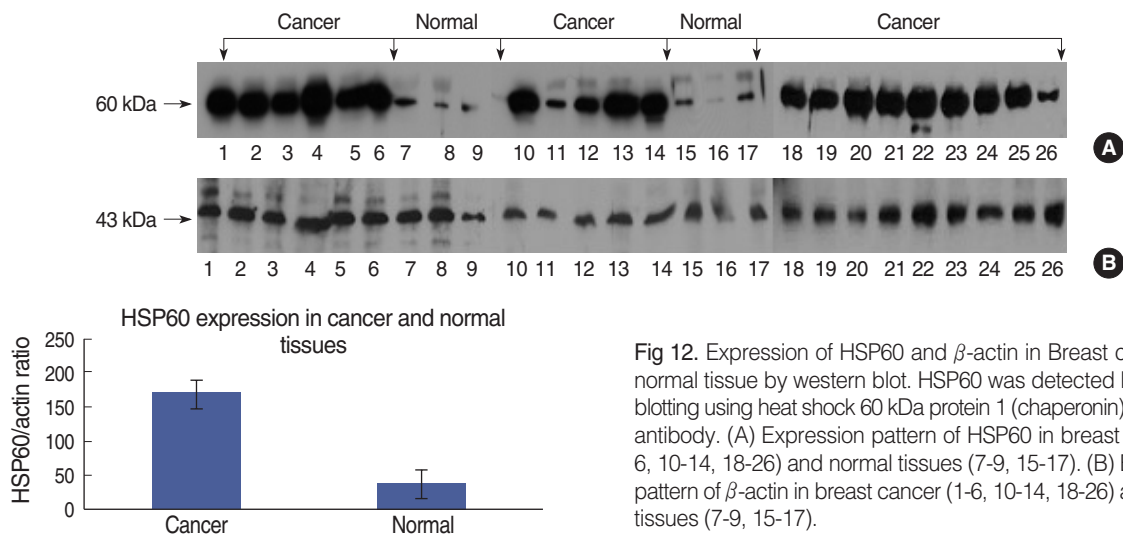


Fig 12. Expression of HSP60 and  $\beta$ -actin in Breast cancer and normal tissue by western blot. HSP60 was detected by western blotting using heat shock 60 kDa protein 1 (chaperonin) polyclonal antibody. (A) Expression pattern of HSP60 in breast cancer (1-6, 10-14, 18-26) and normal tissues (7-9, 15-17). (B) Expression pattern of  $\beta$ -actin in breast cancer (1-6, 10-14, 18-26) and normal tissues (7-9, 15-17).



HSP60 단백질의 발현을 보면 20예의 유방암조직 중 18예는 강하게 발현되었고, 나머지 2예에서 약하게 발현되었다(Fig 12). 정상조직 6예에서는 암조직보다 약하게 발현되었다. 발현된 것을 Image 분석기를 통하여 농도측정을 하여 비교한 결과 유방암조직에서는 약  $171.80 \pm 42.22$ , 정상조직에서는  $41.08 \pm 20.92$ 로 발현되어 약 4.18배 강하게 발현되었고, 각각 발현되는 것을 통계분석에서 ANOVA t-test (Mann Whitney) 방법을 이용하여 분석한 결과 통계적으로 유의성을 나타냈다(Fig 12,  $p < 0.05$ ).

6예의 동일 환자로부터 유래한 유방암조직과 정상조직에서 발현되는 HSP60 단백질은 암조직에서는 약  $207.13 \pm 18.82$ , 정상조직에서는  $41.08 \pm 20.92$ 로 나타나 두 군 간 HSP60의 발현 비율은 약 5배 이상 차이가 있어 유의성이 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig 13) ( $p < 0.0001$ ).

## 고 찰

HSPs는 외부의 물리화학적 자극에 대하여 세포의 방어기작으로 유도되는 단백질이다. 본 실험은 정상 및 유방암조직과 세포주에서 열충격에 의한 HSP60의 반응과 발현되는 양상을 알아보기 위하여 RT-PCR, western blot과 FACS를 시행하였다.

본 연구에서 유방암세포주에서 HSP60의 발현이 정상세포주에서 발현되는 것보다 약 2배 이상 발현되는 양상을 보였고, 암조직에서는 정상조직에서 보다 약 1.6배 이상 과발현되는 것을 확인하였다. 암조직과 암세포주에서의 발현을 비교해 보면 두 그룹

사이에는 차이가 없었다(Fig 2). 최근 Cappello 등(7)의 자궁경부암 조직에 대한 연구에서 HSP60의 발현과 암화과정에 대한 연구 결과 암의 진행정도와 HSP60의 과발현이 밀접한 연관이 있다는 연구 결과와 본 연구에서 정상조직보다 유방암조직과 세포주에서 과발현되는 것이 일치를 보였지만, 분자량이 다른 HSP60 단백질이 발현되는 것과 정상조직에서보다 암조직에서 저분자량의 HSP60이 고분자량의 HSP60보다 더욱 과발현되는 차이는 새로운 결과이다(Fig 2).

유방암조직과 세포주와 정상조직과 정상세포주에서 HSP60 mRNA의 발현차이는 세포주의 특성에 따라 각각 다르게 반응하고, 단백질에서 발현되는 형태와 동일하게 MDA-MB-231 세포주는 발현이 증가하는 반면에 MCF-7 세포주와 CCD-113sk 정상세포주는 변화가 없거나 감소하는 경향을 보이거나 유의한 차이는 없는 것으로 나타났다(Fig 6-8).

대부분의 스트레스 단백질은 스트레스를 받지 않은 상태에서 유의한 양이 합성되어지고 분자적 chaperone으로 기본적인 기능을 수행한다. (15) HSP60 또한 정상적인 환경에서 대부분의 포유동물 세포에 많이 존재한다. (11)

HSP60 단백질이 과발현하는 것은 유방암, 악성육아종증, 골육종 백혈병, 난소암, 전립선암 등 거의 모든 암에서 최근 보고되고 있다. 특히 Franzen 등(16)이 유방암에서 실행한 연구에서는 2-dimensional electrophoresis 분석을 시행하여 암조직에서 tropomyosin-1과 cytokeratin 단백질이 유의하게 변한다는 것이 주요 요자로 발표하였고 HSP60은 단순하게 암조직에서 증

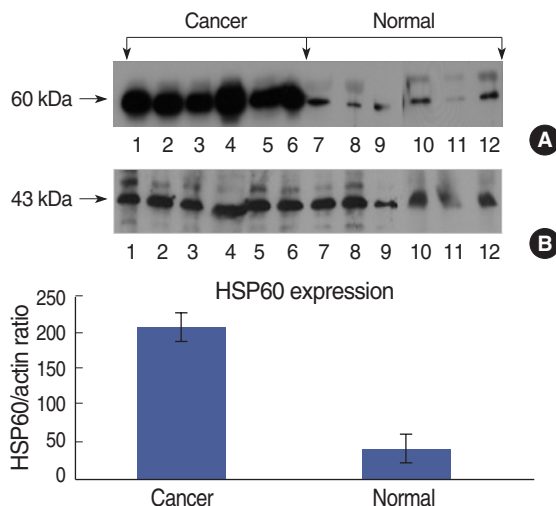


Fig 13. Expression ratio of HSP60 and  $\beta$ -actin in Breast cancer and normal tissue by western blot. HSP60 was detected by western blotting using heat shock 60 kDa protein 1 (chaperonin) polyclonal antibody and  $\beta$ -actin antibody. (A) Expression pattern of HSP60 in breast normal and cancer tissues and (B) is  $\beta$ -actin (ANOVA t test [Mann Whitney],  $p < 0.0001$ ).

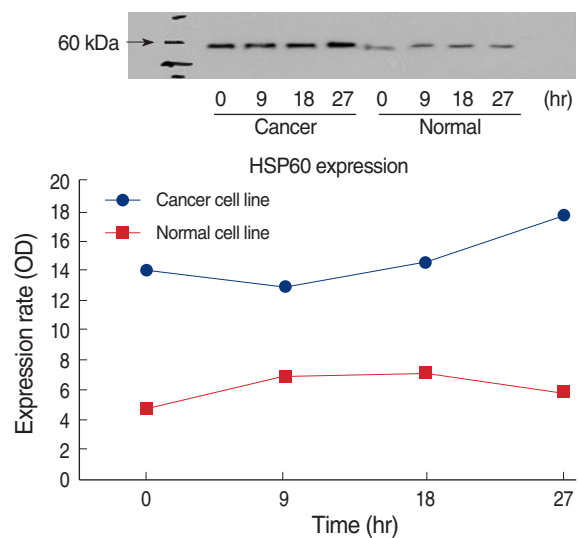


Fig 14. Expression of HSP60 in cancer and normal cell line by western blot. HSP60 was detected by western blotting using heat shock 60 kDa protein 1 (chaperonin) polyclonal antibody; (●) Cancer and (■) Normal cell line.

가된 양상을 보이는 결과로 큰 의미를 가지지 않았다. 이러한 초기 연구는 기본적인 자료를 제공하였지만, 유방암조직과 유방암세포에서 열충격 단백질의 과발현에 대한 분자적 기초연구는 아직 미흡한 형편이다. 암의 병인 즉, 원인 혹은 상호관계에 대한 관련성에 대하여 확실하게 알지는 못하지만 HSP60 과발현은 방어를 위한 상호조절 역할과 유방암에서 BRCA1, 다른 암종에서의 p16과 같이 암화과정동안 변성되었던 단백질을 재접합하는 역할일 수 있으며 다양한 분자적 병인을 가질 것이라 생각할 수 있다. (17)

본 연구에서 새로운 결과는 암조직과 정상조직에서 발현되는 HSP60 단백질의 분자량 차이를 보이는 결과이다. 최근 Itoh 그룹 (18)과 Cicconi 그룹 (19)에서 발표한 것을 보면, HSP60이 처음 세포질에서 분자량이 60 kDa인 단백질로 만들어지며, 이 단백질이 미토콘드리아 내로 들어가기 전에 이 단백질의 N-말단에 있는 signal sequence인 28개 아미노산의 결실이 일어나고 완전하게 만들어진 단백질은 미토콘드리아 내로 들어가 HSP60으로서의 기능을 하는 차이라고 정의하였다. 이러한 차이는 미토콘드리아 특이적인 항체를 이용하여 검사를 하여 세포질 HSP60 단백질은 세포질에서만 검출되고 미토콘드리아 HSP60은 미토콘드리아에서만 검출되는 결과를 보여주었다. 암조직과 암세포주에서 분자량의 차이가 있는 결과를 나타내는 것은 Itoh 등 (18)이 말하는 미토콘드리아에서 발현되는 HSP60과 일치하지만 미토콘드리아에서만 발현되는 HSP60 단백질이 세포질 혹은 세포막에서 과발현되는 것에 대한 결과는 새로운 결과이다 (Fig 10).

본 연구에서 암세포와 정상세포에 존재하는 미토콘드리아의 양에는 약간의 차이가 있지만 유의한 차이를 보이지 않았다 (Fig 11).

정상조직에서 발현되는 HSP60 단백질과 암세포주에서 발현되는 분자량의 차이를 보이는 원인에 대한 것은 앞으로 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 보인다.

세포고사는 세포의 생존에 균형을 유지해 주기 위한 중요한 기작이다. 세포고사는 주로 미토콘드리아에서 많은 기작이 일어나는데 HSP60도 미토콘드리아에 존재하는 하나의 단백질로 미토콘드리아에서 세포고사에 작용하는 Bax와 caspase-3가 HSP60과 관련이 많은 것으로 보고가 되고 있다. (20, 21) HSP60이 암세포와 정상세포에서 시간의 흐름에 따라 발현되고 분해되는 것에 대한 실험을 보면 초기에 만들어지는 HSP60은 암세포에서 약 두 배 많은 양이 만들어지고 시간이 지나면서 정상세포는 분해와 생성이 균형을 이루려고 하는 반면에 암세포에서는 시간이 경과하면서 HSP60이 증가하는 것으로 나타났다 (Fig 14). Jolly 등 (10)은 세포 내에서 일어나는 세포의 죽음에서 열충격 단백질은 세포고사 신호적 경로의 다양한 지점에서 기능을 하여 세포의 생존과 죽음에 대한 끊임없는 균형을 이루어 스트레스 받은 세포의 운명

을 결정할 수 있다고 하였다. 암세포에서 세포고사가 일어나지 않는다는 것은 암세포가 계속 분열하고, 시간이 경과하면서 HSP60이 증가하는 것과 많은 연관성이 있을 것으로 생각되며, 종양세포에서 세포고사가 일어나지 않는 것과 관련이 있을 것으로 시사된다. (20) 또한 분자적 chaperone으로서 HSP60의 비이상적 발현은 종양세포에서 전사인자, 세포신호 분자 등을 포함한 다양한 주요 단백질의 성질을 변경하거나 이들 단백질의 발현에 영향을 주는 것으로 보인다. 따라서, HSP60 발현 변화는 세포성장을 통제하는 역할의 소실과 세포고사를 억제하게 되는 결과를 가져오게 되는 것으로 보인다.

본 연구를 통해 HSP60은 유방암조직과 유방암세포주에서 모두 존재하지만 암화과정을 거쳐 암이 된 조직에서는 차이가 있는 특징적으로 과발현된다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, HSP60이 유방암조직과 유방암세포주에서 분자량이 다른 HSP60 단백질이 다르게 발현한다는 것은 암화과정에 중요한 예후인자가 될 수 있다는 충분한 가능성을 제시하는 것이라 생각된다. 또한 종양세포의 중요한 성질은 세포 죽음에 대한 저항성을 가지고 있는 것이기 때문에, 세포고사로부터 세포를 보호하는 HSP60에 대한 더 많은 연구를 한다면 암의 진단뿐 아니라 치료법을 개발하는 것도 가능할 수 있을 것으로 기대된다.

## 결론

유방암조직과 정상세포 그리고 유방암세포주와 정상세포주에서 HSP60 단백질 발현의 차이를 확인하기 위해서 RT-PCR, western blot과 FACS를 시행한 결과 유방암조직과 유방암세포주에서 약 4배 이상의 차이가 있는 것으로 나타났고, 암조직과 암세포주에서 분리한 단백질을 이용한 western blot에서 분자량이 다르게 발현되는 HSP60 단백질 결과를 얻었다.

온도의 변화에 의하여 작은 분자량을 가지는 HSP60의 변화는 일부 암세포주에서 증가하는 것을 보였지만 다른 암세포주에서는 감소하거나 정상세포주에서는 변화가 없는 것으로 나타났다. 즉 열에 의한 HSP60의 발현변화는 의의가 없었다.

암세포주와 정상세포주에서 미토콘드리아의 양적인 변화는 유의성이 없었지만, 미토콘드리아에서만 발현된다고 하는 미토콘드리아 특이적 HSP60 단백질이 세포질 혹은 세포막에서 많은 양이 발현되고 있으며, 이것이 특이적인 기능을 수행할 것으로 생각되었다.

결론적으로, 유방암조직과 세포주, 정상조직과 세포주에서 HSP60이 모두 존재하지만 암화과정 이후 과발현하는 HSP60 단백질은 유방암에서 새로운 진단 및 예후의 표지인자로서 사용될 수 있으며, 암의 기능연구에 중요한 인자가 될 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. Yun HS. Nationwide Korean Breast Cancer Data of 2002. J Korean Breast Cancer Soc 2004;7:72-83.
2. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science 1994;266:66-71.
3. Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin 2002;52:23-4.
4. Ritossa FA. A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. Experientia 1962;18:571-3.
5. Tissiere A, Mitchell HK, Tracy U. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosomal puffs. J Mol Biol 1974;84:389-98.
6. Bukau, B. Horwich, AL. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. Cell 1998;92:351-66.
7. Cappello F, Bellafiore M, Palma A, Marciano V. Expression of 60-kD heat shock protein increases during carcinogenesis in the uterine exocervix. Pathobiology 2002; 70:83-8.
8. Jaattela M. Heat shock proteins as cellular lifeguards. Ann Med 1999; 31:261-71.
9. Morano KA, Thiele DJ. Heat shock function and regulation in response to cellular stress, growth, and differentiation signals. Gene Expr 1999;7:271-82.
10. Jolly C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. J Natl Cancer Inst 2000; 92:1564-72.
11. Knowlton AA. The role of heat shock proteins in the heart. J Mol Cell Cardiol 1995;27:121-31.
12. Schneider J, Jimenez E, Marenbach K, Romero H, Mark D, Meden H. Immunohistochemical detection of HSP60-expression in human ovarian cancer, correlation with survival in a series of 247 patients. Anticancer Res 1999;19:2141-6.
13. Srivastava PK, Maki RG. Stress-induced proteins in immune response to cancer. Curr Top Microbiol Immunol 1991;167:109-23.
14. Bradford MM. A rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-54.
15. Itoh H, Kobayashi R, Wakui H, Komatsuda A, Ohtani H, Miura AB, et al. Mammalian 60-kDa stress protein (chaperonin homolog). identification, biochemical properties, and localization. J Biol Chem 1995;270:13429-35.
16. Franzen B, Linder S, Alaiya AA, Eriksson E, Fujioka K, Berman AC, et al. Analysis of polypeptide expression in benign and malignant human breast lesions. Electrophoresis 1997;18:582-7.
17. Morimoto RI. Heat shock: the role of transient inducible responses in cell damage, transformation, and differentiation. Cancer Cells 1991;3:295-301.
18. Itoh H, Komatsuda A, Ohtani H, Wakui H, Imai H, Sawada K, et al. Mammalian HSP60 is quickly sorted into the mitochondria under conditions of dehydration. Eur J Biochem 2002;269:5931-8.
19. Cicconi R, Delpino A, Piselli P, Castelli M, Vismara D. Expression of 60 kDa heat shock protein (HSP60) on plasma membrane of Daudi cells. Mol Cell Biochem 2004;259:1-7.
20. Jaattela M. Escaping cell death: survival proteins in cancer. Exp Cell Res 1999;248:30-43.