

인체 폐암세포주에서 NF- κ B p50/p65 Complex의 활성화

지방공사 강남병원 내과*, 서울대학교 의과대학 내과학교실 및 의학연구원 폐연구소

최형석*, 유철규, 이춘택, 김영환, 한성구, 심영수

= Abstract =

Activation of the NF- κ B p50/p65 Complex in Human Lung Cancer Cell Lines

Hyung-Seok Choi, M.D.*, Chul Gyu Yoo M.D., Choon-Taek Lee, M.D.,
Young Whan Kim, M.D., Sung Koo Han, M.D., Young-Soo Shim, M.D.

*Department of Internal Medicine, Kangnam General Hospital Public Corporation,
Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine and
Lung Institute, SNUMRC, Seoul, Korea*

Background : NF- κ B is a characteristic transcriptional factor whose functional activity is determined by post-translational modification of protein and subsequent change of subcellular localization. The involvement of the NF- κ B family of the transcription factors in the control of such vital cellular functions as immune response, acute phase reaction, replication of certain viruses and development and differentiation of cells has been clearly documented in many previous studies. Several recent observations have suggested that the NF- κ B might also be involved in the carcinogenesis of some hematological and solid tumors. Investigating the possibility that members of the NF- κ B family participate in the molecular control of malignant cell transformation could provide invaluable information on both molecular pathogenesis and cancer-related gene therapy.

Method : To determine the expression patterns and functional roles of NF- κ B family transcription factors in human lung cancer cell lines NCI-H792, NCI-H709, NCI-H226 and NCI-H157 were analysed by western blot, using their respective antibodies. The nuclear and the cytoplasmic fraction of protein extract of these cell lines were subsequently obtained and NF- κ B expression in each fraction was again determined by western blot analysis. The type of NF- κ B complex present in the cells was determined by immunoprecipitation. To detect the binding ability of cell-line nuclear extracts to the κ B consensus oligonucleotide, electrophoretic mobility shift assay(EMSA) was performed.

Results : In the cultured human lung cancer cell lines tested, transcription factors of the NF- κ B family, namely the p50 and p65 subunit were expressed and localized in the nuclear fraction of the cellular extract by western blot analysis and immunocytochemistry. Immunoprecipitation assay showed that in the cell, the p50 and p65

subunits made NF- κ B complex. Finally it was shown by Electrophoretic Mobility Shift Assay(EMSA) that nuclear extracts of lung cancer cell lines are able to bind to NF- κ B consensus DNA sequences.

Conclusion : These data suggest that in human lung cancer cell lines the NF- κ B p50/p65 complex might be activated, and strengthen the hypothesis that NF- κ B family transcription factors might be involved in the carcinogenesis of human lung cancer. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1999, 46 : 185-194)

Key words : Lung cancer, Cell line, NF- κ B, Transcription factor, Carcinogenesis.

서 론

NF- κ B는 전사 인자의 일종으로서 면역 글로불린의 kappa light chain 유전자의 intronic enhancer에 존재하는 11개의 nucleotide로 구성된 oligonucleotide에 결합하는 특이단백질로서 1986년 Sen과 Baltimore에 의하여 처음 발견되었다¹⁾. NF- κ B 전사인자군은 여러가지 subunit로 구성된 homo- 또는 heterodimeric 이중합체들로서 특징지워진다²⁻⁴⁾.

이 군에 속하는 전사인자들은 모두 *v-rel* viral oncoprotein과 그 cellular homologue인 *c-rel*에 구조적으로 연관되며 또한 DNA에의 결합과 이중합체 형성에 필요한 domain을 가진다는 공통점을 갖는다⁵⁻⁸⁾. 활성화된 NF- κ B는 p50와 p65로 불리는 두 가지 하위구조 단백질로 구성된 이중합체가 가장 대표적으로 알려져 있다. 또한 그 활성화는 세포내에서의 위치관계(subcellular localization)에 의하여 결정된다. 이 물질은 세포질내에서 억제인자인 I κ B 단백질과 결합한 비활성화형태(dormant complex)로 존재하며^{9,10)} 여러가지 다양한 세포외의 자극에 의하여 활성화되어 I κ B가 분리되고 나서 유리된 NF- κ B복합체의 형태로 세포핵내로 이동하여 NF- κ B에 결합하는 특이 DNA sequence(κ B motif)에 결합함으로써 목표유전자(target gene)의 전사 활성을 조절하게 된다. 현재까지의 여러 연구로부터 NF- κ B는 광범위하게 존재하며 여러가지 다양한 세포활동을 조절한다는 사실이 알려져 있는데 인체에서 NF- κ B가 결합하여 결과적으로 조절하게 되는 유전자로는 면역 반응, 급성기 반응(acute phase response), 세포 주기의 조

절, 바이러스의 증식등이 있다¹¹⁻¹⁵⁾. 최근의 몇몇 연구들은 NF- κ B/Rel 군의 전사인자들이 어떤 종류의 암의 발생에도 관련이 되리라는 사실들을 제시하고 있다. NF- κ B의 p105와 p50 단백질이 대장암 및 난소암 세포주에서 과발현된 사실이 알려졌고 이러한 현상이 아마도 암의 발생과 관련이 될수 있다는 사실이 제시되었다¹⁶⁾. 어떤 종류의 인체 T임파종세포에서 NF- κ B-2 유전자의 재배열이 관찰되었으며¹⁷⁾ 또한 NF- κ B가 종양유전자인 *c-myc*나¹⁸⁻²⁰⁾ *p53*유전자의 강력한 활성화인자라는 사실이 알려졌다²¹⁾. 인체 유방암 세포주에서 과발현된 p100/p52 단백질이 다른 종류의 NF- κ B 단백질을 세포질내에 sequester함으로써 p100/p52 단백질이 인체 유방암의 발생에 기여할것이라고 알려졌다²²⁾. 최근 다른 한 연구에서는 비소세포 폐암의 신선 조직 및 세포주에서 NF- κ B의 p50 subunit의 발현이 정상 폐조직에 비하여 현저하게 증가되어 있다는 사실이 관찰되어 NF- κ B 단백질의 비정상적인 변화가 비소세포 폐암의 발생 이전에 어떤 역할을 할 것이라고 하였다²³⁾. 이러한 일련의 연구 결과들에 비추어 볼때 NF- κ B 활성화의 비정상적인 변화(dysregulation)가 폐암의 발생과정(pathogenesis)에 어떤 역할을 할 수 있을 것이라고 추론할수 있다. 본 연구에서는 배양된 인체 폐암세포주에서 NF- κ B 전사인자 단백질의 발현양상을 각 단백질에 대한 antibody를 이용하여 western blot를 시행하여 그 발현을 관찰하고 발현된 NF- κ B의 세포내 위치(subcellular localization)가 어디인지를 알아보기 위하여 western blot과 immunocytochemistry를 시행하였다. 세포에 존재하는 NF- κ B의 형태를 알기위해

immunoprecipitation을 시행하였다. 존재하는 NF- κ B 전사 인자의 전사 증강 작용이 과연 일어 날 수 있는지를 관찰하기 위해서 세포핵 단백추출물이 consensus κ B oligonucleotide와 결합하는 지를 Electrophoretic Mobility Shift Assay로 확인하였다.

대상 및 방법

1. 사용한 세포주 및 NF- κ B subunit에 대한 antibody

실험에 사용하였던 세포주는 확립된 인체 폐암 세포주로서 NCI-H792, NCI-H709, NCI-H157, NCI-H226 세포주들이었다²⁴⁾.

실험에 사용된 NF- κ B subunit에 대한 antibody는 모두 rabbit polyclonal immunoglobulin antibody로서 Santa-Cruz Biotechnology사(California, USA)로 부터 구입하여 사용하였다. 이들은 p50의 amino acid 350-363에 대한 anti-peptide antibody(Cat. No. sc-114)와 p65의 amino acid 531-550에 대한 antibody(Cat. No. sc-372)이었다.

2. 세포주에서 단백질의 추출

배양된 세포주에서 총단백질을 추출하는 방법은 주로 DeJardin등이²²⁾ 사용한 방법을 이용하였다. 먼저 "western" Lysis Buffer를 0.1% NP-40 (nonidet, Sigma사), 5 mM EDTA, 50 mM Tris Hydrochloride(pH 7.5-8.0), 250 mM NaCl, 50 mM Sodium Fluoride의 조성으로 만들어 준비하였다. 여기에 사용 직전에 protease inhibitor인 1mM의 PMSF(phenylmethylsulfonylfluoride), 10 μ g/ml의 aprotinin, 10 μ g/ml의 leupeptin을 첨가하여 사용하였다. 배양된 세포들을 lysis buffer에 작용시킨 후 원심분리하고 supernatant만을 새 tube에 옮기고 단백질 정량을 시행하고 이후 실험에 사

용할때까지 -70°C 냉장고에서 보관한다. 단백질 정량은 Bio-Rad Assay방법으로 시행하였는데 Bovine Serum Albumin 표준 용액을 사용하여 시행하였다.

3. 세포질 분획과 세포핵 분획에서의 단백질의 분리 추출

단백질의 분리 추출은 Dignam등의²⁵⁾ 방법으로 시행하였다. Lysis Buffer(250 mM sucrose, 5 mM Sodium Azide, 2 mM EGTA의 용액에 사용직전 protease inhibitor인 200 μ M PMSF, 1 μ M leupeptin, 1 μ M aprotinin를 첨가한다.)로 배양된 세포를 용해시킨후 세포액을 1ml Pasteur pipette으로 회수하여 cell solution을 Dounce Homogenizer의 pestle B로 20번 stroke하여 세포막을 분쇄하고 원심분리한다. 결과로 생긴 supernatant가 cytosolic fraction이며 이를 따로 흡인하여 -70°C에서 보관한다. pellet에 lysis buffer를 넣어 용해시킨후 원심분리를 시행하고 남은 pellet으로부터 nuclear fraction을 얻었다.

4. Western Blot

세포에서의 단백질 추출물로부터 p50와 p65의 발현정도를 관찰하기 위하여 Mukhopadhyay등의²²⁻²³⁾ 방법으로 western blot를 시행하였다. 단백추출물 100 μ g을 8% SDS-polyacrylamide gel로 전기영동을 시행하였고 nitrocellulose membrane에 전이시켰다. 각 단백질 분획은 각각의 NF- κ B 항체를 1:1000의 농도로 작용시켜 immunoblot를 시행하였다. Immunoreactivity의 검출은 horseradish peroxidase conjugated secondary antibody를 이용한 Amersham ECL detection system을 사용하였다. p50 발현의 subcellular localization을 결정하기 위해서 해당 항체를 이용하여 각각의 세포질과 세포핵 추출물에서 western blot를 시행하였다.

5. Immunoprecipitation

Immunoprecipitation은 Anderson등의 방법을 이용하였다²⁶⁾. 즉 precipitating antibody 10 μ l 를 500 μ g 의 세포 단백질 추출물에 western lysis buffer로 용해시켰다. 이 혼합물을 4℃의 cold room에서 rocking platform 위에서 1시간-4시간 동안 incubate하였다. 보관된 Protein A-Sepharose bead를 꺼내어 시료에 첨가한 다음 1시간동안 rocking platform에서 다시 incubation하였다. 비특이적인 단백질을 제거하기 위하여 세척을 시행하였다. 결과로 얻어진 immunoprecipitate를 ice-chilling한후 이를 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis시킨후 western blot으로 detection하였다.

6. Immunocytochemistry

먼저 배양된 폐암세포주인 H792 세포를 sterile glass cover slip에 있는 chamber에서 37℃에서 이틀 동안 배양하였다. PBS로 3분씩 세번 세척한 후 1% formalin in PBS에서 10분간 담가 cell을 fix시켰다. IgG의 nonspecific binding을 없애기 위하여 1.5% normal blocking serum in PBS(LSAB kit, Cat. No. K681, DAKO사 제품)에 30min 동안 specimen을 incubate하였다. Primary antibody인 anti-p65 antibody를 1:100의 희석농도로 blocking serum에서 희석하여 specimen에 가하여 실온에서 2시간동안 incubation한 후 PBS로 3번 세척하였다.

Biotin-conjugated secondary antibody(LSAB kit, DAKO사)로 30분간 incubation한 후 PBS로 3번 씻었다. 그후 avidin biotin enzyme reagent로 30분동안 incubation하였다. specimen slide를 diaminobenzidine solution(DAB kit, ZYMED Laboratories, Inc., California, U.S.A)에 incubation하면서 현미경으로 관찰하여 갈색의 발색반응이

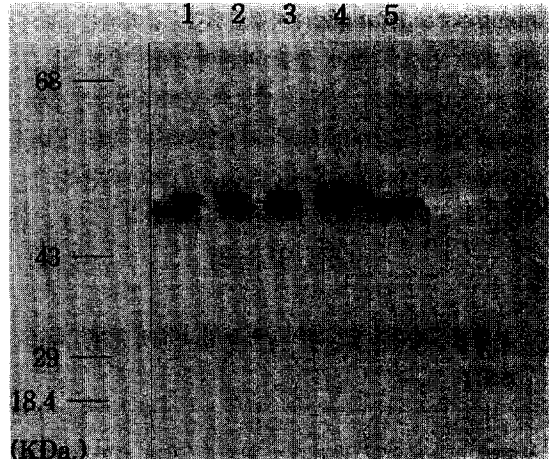


Fig. 1. The expression of the NF- κ B p50 protein in human lung cancer cell lines was demonstrated by Western blot analysis. Lane 1: Total cellular extract of NCI-H709 cell line was applied and western blot using antibody against p50 subunit was performed as described in the 'Materials and Methods' section; Lane 2: NCI-H226 cell line; Lane 3: NCI-H157p16 cell line; Lane 4: NCI-H157C cell line; Lane 5: NCI-H792 cell line. In each lane, 100 μ g of protein was applied and p50 expression was observed. Smaller bands just above p50 were nonspecific ones.

뚜렷하게 관찰되는 시점까지 1분간 incubation하였다. Hematoxylin으로 대조염색을 시행하였다. 염색이 끝난 후 permanent mounting medium으로 coverslip을 mount하고 광학현미경으로 관찰하였다.

7. Electrophoretic Mobility Shift Assay

Electrophoretic Mobility Shift Assay(EMSA)는 Duyao등²⁷⁾의 방법을 이용하였으며 BandShift kit (Pharmacia Biotech Inc., U.S.A)를 사용하였다. 즉 NF- κ B consensus oligonucleotide(Santa Cruz Biotechnology, Cat. No. sc-2505, Santa Cruz, California, U.S.A.)를 T4 polynucleotide kinase를



Fig. 2. The expression of NF- κ B p65 protein in the same cell lines was also demonstrated; experimental procedures were as above (Fig. 1). The primary antibody used was antibody against p65 subunit of the NF- κ B; p65 expression was observed in each cellular extract.

사용하여 [γ^{32} P] ATP로 radiolabelling을 시행하고 purify하였다. 4% polyacrylamide gel을 만들고 pre-electrophoresis를 30분간 시행하였다. 2 μ l oligonucleotide probe, 2 μ l nuclear protein extract, 500 mM NaCl, 5 mM dithiothreitol, 2 mM EDTA, 5% glycerol, 1 μ g poly(dI-dC), 0.05% Nonidet P-40, 0.05 mg/ml bovine serum albumin을 총량 20 μ l 가 되게 혼합한 다음 실온에서 20분간 반응시켰다. 이후 electrophoresis를 시행하고 gel을 건조시킨후 -70°C에서 autoradiography를 시행하였다.

결 과

1. 세포주에서의 NF- κ B 전사 인자 subunit의 발현 양상

폐암 세포주에서 NF- κ B 전사 인자의 subunit인

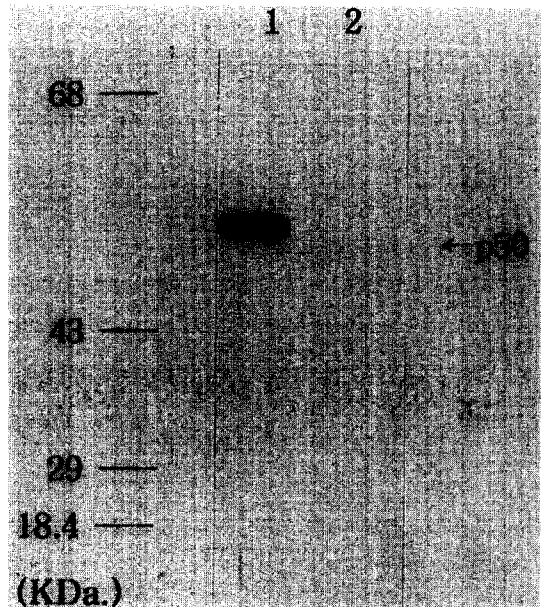


Fig. 3. The expression of NF- κ B p50 protein in the cytoplasmic and nuclear fraction of protein extract of H792 cell line was demonstrated by western blot analysis. Each fraction was obtained by the method previously described in the 'Materials and Methods' section and each protein fraction underwent western blot, using antibody against p50 subunit. Lane 1: nuclear extract, Lane 2: cytoplasmic extract. High levels of p50 subunit activity were observed mainly in the nuclear fraction.

p50 단백질의 발현을 anti-p50 antibody를 사용한 western blot 으로 검출한 결과 각 세포주에서 발현됨을 보였다(Fig. 1). p65 subunit의 경우에서도 비슷하게 발현됨을 보였다(Fig. 2).

2. NF- κ B 전사 인자 발현의 subcellular localization 양상

다음 단계로 배양된 폐암 세포주에서 세포질내의 단백질과 세포핵내의 단백질을 분리하여 추출하여 각각의 단백질 추출물 분획에서 p50 단백질의 발현이 어떤

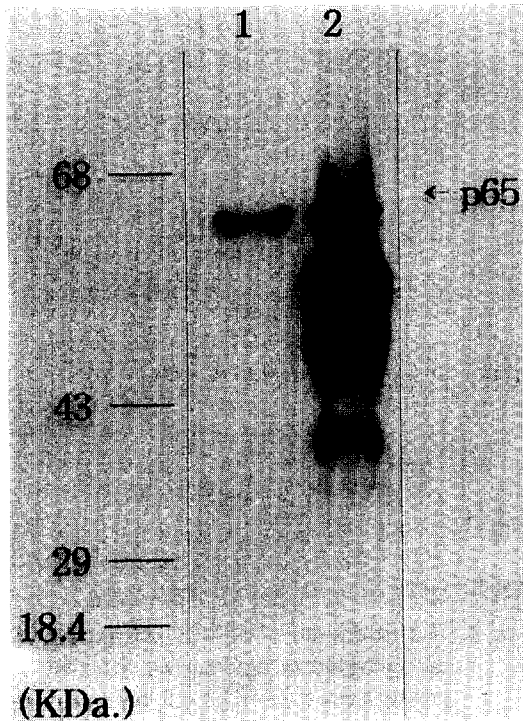


Fig. 4. Immunoprecipitation Analysis demonstrated the presence of the p50/p65 complex in lung cancer cell line NCI-H792 (lane 2). Lane 1 : Using western blot with anti-p65 antibody, expression of p65 subunit of NF- κ B was directly detected in the cellular protein extract of cell line NCI-H792 without immunoprecipitation procedure (positive control for p65). Lane 2 : Cellular protein extract of NCI-H792 cells was immunoprecipitated with anti-p50 antibody and subsequently detected by western blot using anti-p65 antibody ; the band of p50/p65 complex was detected.

양상을 보이는 지를 anti-p50 antibody를 사용한 western blot으로 관찰하였다. H792 세포주와 H226 세포주에서 각각 p50의 발현은 주로 세포핵 단백질 분획에서 관찰되었다(Fig. 3). 그러므로 배양된 인체 폐암 세포주에서 NF- κ B 단백질의 발현은 주로 세포핵내에 국한되어 있음을 알 수 있었다.



Fig. 5. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) was performed using a BandShift assay kit(Pharmacia Biotech.), as described previously in the 'Materials and Methods' section. A : NF- κ B bound to DNA ; B : free(unbound) DNA ; Lane 1 : No nuclear extract was applied to the binding reaction ; lane 2 : Nuclear extract of NCI-H792 cell line was applied ; lane 3 : As a competition assay, unlabelled target oligonucleotide was also applied and the same binding reaction was performed. The binding of NF- κ B to κ B oligonucleotide was reduced ; lane 4 : unrelated oligonucleotide (Ebstein-Barr virus nuclear antigen DNA) was also added to the binding mixture as a competition assay. The binding reaction was unaffected, and therefore considered to be specific for the NF- κ B complex.

H792 세포주에서 anti-p65 antibody를 이용하여 immunocytochemistry를 시행하였을때 p65 subunit가 강하게 발현되었으며 또한 이는 주로 세포핵에

서 존재하는 것이 관찰되었다(data not shown).

3. NF- κ B complex의 존재 형태의 관찰

폐암 세포주에서 존재하는 NF- κ B 복합체의 형태를 알기 위하여 H792 세포주의 세포핵 단백질을 추출물에서 먼저 anti-p50 antibody로 immunoprecipitation을 시행하여 p50 단백질을 포함한 단백질을 분리하고 이를 anti-p65 antibody에 대한 western blot으로 검출하여 관찰하였다. 그 결과 폐암세포주에서 p50 단백질은 세포핵내에서 p65 단백질과 결합하여 p50/p65 복합체를 이루고 있음이 관찰되었다(lane 2, Fig. 4). 이는 폐암 세포주내에서 활성화된 p50/p65 complex가 존재한다는 사실을 의미한다.

4. 세포 단백질 추출물내의 NF- κ B complex와 consensus κ B oligonucleotide의 결합

세포핵 단백질추출물에서 κ B oligonucleotide로 시행한 Electrophoretic Mobility Shift Assay의 결과 세포핵 단백질추출물내의 NF- κ B complex는 κ B oligonucleotide와 결합함을 보여주었다(lane 2, Fig. 5). 이러한 결합 반응의 특이성은 competition assay에 의하여 확인되었다(lane 3 and 4, Fig. 5).

고 찰

최근의 여러 가지 다양한 연구들은 NF- κ B나 I κ B 단백질이 정상 세포가 종양 세포로의 형질변환을 하는데 있어 어떤 기여를 할 것이라는 사실을 시사하고 있다. NF- κ B oligonucleotide에 대한 anti-sense로 처리한 생쥐에서는 이식된 HTLV-1 tax 단백질 유발성 섬유육종이 급속히 사멸하는 현상이 관찰되었으며²⁸⁾ antisense RNA construct로 I κ B regulation을 교란시켰을 경우 NIH3T3세포의 malignant transformation을 일으키는 사실이 관찰되었다²⁹⁾. 또한 I κ B repressor로 NF- κ B activity를 억제하였을 경우

programmed cell death가 증진되는 사실이 관찰되었고³⁰⁾ NF- κ B의 활성화는 세포의 apoptosis를 억제한다는 사실이 제시되었다³¹⁻³²⁾. 이러한 많은 연구 결과들은 NF- κ B 전사인자의 활성화도의 변화가 어떤 종류의 암세포의 발생에 기여할것이라는 사실을 제시한다.

본 연구에서는 인체에서 유래한 폐암 세포주에서 western blot를 시행한 결과 NF- κ B의 p50와 p65 단백질의 발현이 관찰되었다. 최근 인체의 비소세포 폐암 세포를 대상으로 p50의 발현을 관찰한 연구에서는 조사한 폐암 조직에서 p50 단백질의 발현이 정상 대조군에 비하여 증가되어 있었다고 하며²³⁾ 이 사실은 인체 폐암에서 정상적인 NF- κ B regulation pathway의 변화가 종양 형성에 있어 어떤 역할을 할 것이라는 사실을 의미한다고 할 수 있다.

한편 NF- κ B의 functional activity가 그 세포내의 위치관계(subcellular localization)에 의하여 결정된다는 사실은 잘 확립되어 있는 사실이다³³⁾. 본 연구에서는 분리된 세포질과 세포핵 분획에 대하여 각각 western blot를 시행하였고 또한 immunocytochemistry를 통하여 그 세포내 NF- κ B expression의 localization을 알아보았다. western blot의 결과 그 발현이 강하게 관찰되었고 주로 세포핵내에 국한되어 관찰되었다. NF- κ B 발현의 세포핵에서의 존재는 immunocytochemistry를 통해서 역시 확인되었다. 이전의 연구들에서 NF- κ B의 가장 흔한 형태는 50 kD의 단백질(p50 subunit)과 65 kD의 단백질(p65 subunit, Rel-A라고도 불림)이 이루는 이중합체(heterodimer)라는 사실이 잘 알려져 있다. p50 subunit와 p65 subunit가 배양된 인체 폐암 세포주에서 결합하여 중합체를 이루고 있는지를 알아보기 위하여 본 연구에서는 immunoprecipitation을 시행하였다. 결과 두 단백질이 결합하고 있음을 알 수 있었고 이는 이들 NF- κ B 중합체가 기능적으로 active하다는 사실을 시사하였다. 배양된 인체 폐암세포의 세포핵 추출물내의 NF- κ B complex가 DNA와 결합하고 있음은 electrophoretic mobility shift

assay를 시행하여 확인할 수 있었다.

활성화된 NF- κ B complex가 정확하게 어떤 기전에 의하여 암의 생성에 기여하는지는 현재로는 알려져 있지 않다. κ B DNA sequence에의 결합과 그 결과인 활성화에 의해서 여러가지 다양한 유전자가 조절되는데 이중 종양 유전자로는 대표적인 것이 *c-myc* 유전자이며^{3,18)} 인체 폐암에서도 이 유전자는 암의 발생에 관련되는 것으로 알려져 있다. 인체폐암에서는 대부분 이 종양 유전자가 과발현되는 것이 알려져 있으므로³⁴⁾ 활성화된 NF- κ B complex는 이 유전자나 또는 아직 알려지지않은 다른 종양유전자를 활성화시켜 암의 발생에 기여하리라고 생각된다. 또는 활성화된 NF- κ B가 세포의 apoptosis를 차단하는 단백질을 만들어냄으로써 결과적으로 암의 유발에 기여한다고 생각된다.

결론적으로 본 연구는 인체 폐암세포주에서 p50/p65 complex가 transcriptionally activated되어 있다는 사실을 보여주며 이러한 사실은 NF- κ B family transcriptional factors가 인체 폐암의 생성에 관련된다는 가설을 더욱 뒷받침하리라고 생각된다.

요 약

연구배경 :

NF- κ B는 단백질이 생성된 후의 변형(post-translational modification)과 세포내에서의 위치 변화(subcellular localization)에 따라 그 작용이 결정되는 특성을 가진 전사 인자로서 최초에는 면역반응에 있어 중요한 역할을 하는 사실이 알려졌으나 그후 이러한 작용이외에도 급성기 염증 반응, 바이러스의 증식, 세포의 발생과 분화에 있어 중요한 작용을 한다는 사실이 알려지게 되었다. 최근의 연구들에서 NF- κ B 전사 인자가 정상 세포로부터 암세포로의 형질전환에 있어서도 어떤 기능을 할 것이라는 사실들이 알려지게 되었다. NF- κ B가 암세포로의 형질 전환, 나아가 암세포의 생성에 어떤 역할을 제공한다면 이러한 사실은

나아가 향후의 암치료에 있어서도 유용한 지식이 될 수 있다. NF- κ B 전사 인자가 인체 암세포에 있어서 세포의 형질 변환에 연관될 수 있다는 사실은 몇몇 암종에서 알려져 있으나 폐암에서의 NF- κ B 전사 인자의 종양 생성기능에 있어서는 아직 연구된 바가 없다.

방 법 :

본 연구에서는 배양된 인체 폐암세포주에 있어서 NF- κ B family 전사 인자들의 발현정도를 western blot를 이용하여 관찰하고 과발현된 NF- κ B 전사 인자의 세포내 위치가 세포핵인지 세포질내에 존재하는 것인지를 각각의 단백질 분획에서 western blot를 시행하여 관찰하였고 또한 immunocytochemistry를 시행하여 그 발현 양상을 확인하였다. 존재하는 NF- κ B 전사 인자가 어떠한 복합체의 형태인지를 알아보기 위하여 세포주의 단백 추출물에서 NF- κ B family 전사 인자에 대한 항체를 사용하여 immunoprecipitation을 시행하였다. 세포주 단백질추출물의 κ B consensus oligonucleotide에의 결합여부를 보기위하여 electrophoretic mobility shift assay를 시행하였다.

결 과 :

배양된 인체 폐암세포주에서는 NF- κ B family의 p50 subunit, p65 subunit가 발현되어 있었고 p50 subunit의 발현은 세포핵내에 국한하여 위치하고 있음을 western blot와 immunocytochemistry를 통하여 관찰할 수 있었다. immunoprecipitation assay는 세포내에서 p50 subunit가 p65 subunit와 복합체를 이루는 상태로 존재하고 있음을 보여주었다. 폐암세포주의 세포핵 추출물은 NF- κ B consensus oligonucleotide와 결합할 수 있음을 electrophoretic mobility shift assay를 통하여 확인할 수 있었다.

결 론 :

인체 폐암세포주에서 NF- κ B family 전사 인자의 발현이 활성화되어 있으며 NF- κ B family 전사 인자가 인체 폐암 형성에 있어 어떤 역할을 할 가능성을 시사한다.

참 고 문 헌

1. Sen R, Baltimore D : Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46 : 705, 1986
2. Miyamoto S, Verma IM. REL/NF- κ B/I κ B story. *Adv Ca Res* 66 : 255, 1995
3. Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Antwerp DV, Miyamoto S : Rel/NF- κ B/I κ B family : intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* 9 : 2723, 1995
4. Gilmore TD, Morin PJ : The I κ B proteins : members of a multifunctional family. *Trends Genet* 9 : 427, 1993
5. Ballard DW, Walker WH, Doerre S, Sista P, Molitor JA, Dixon EP, Pfeffer NJ, Hannink M, Greene WC : The *v-rel* oncogene encodes a κ B enhancer binding protein that inhibits NF- κ B function. *Cell* 63 : 803, 1990
6. Bose HR : The Rel family : models for transcriptional regulation and oncogenic transformation. *Biochim Biophys Acta* 1114 : 1, 1992
7. Walker WH, Stein B, Ganchi PA, Hoffman JA, Kaufman PA, Ballard DW, Hannink M, Greene WC : The *v-rel* oncogene : insights into the mechanism of transcriptional activation, repression, and transformation. *J Virol* 66 : 5018, 1992
8. Wilhelmssen KC, Eggleton K, Temin HM : Nucleic acid sequences of the oncogene *v-rel* in reticuloendotheliosis virus strain T and its cellular homolog, the proto-oncogene *c-rel*. *J Virol* 52 : 172, 1984
9. Baeuerle PA, Baltimore D : I κ B : A specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor. *Science* 242 : 540, 1988
10. Baeuerle PA, Baltimore D : A 65-kD subunit of active NF- κ B is required for inhibition of NF- κ B by I κ B. *Genes Dev* 3 : 1689, 1989
11. Baeuerle PA, Henkel T : Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12 : 141, 1994
12. Brach MA, Gruss HJ, Kaisho T, Asano Y, Hirano T, Herrmann F : Ionizing radiation induces expression of interleukin-6 by human fibroblasts involving activation of Nuclear Factor- κ B. *J Biol Chem* 268 : 8466, 1993
13. Griffin GE, Leung K, Folks TM, Kunkel S, Nabel GJ : Activation of HIV gene expression during monocyte differentiation by induction of NF- κ B. *Nature(Lond.)* 399 : 70, 1989
14. Hoyos B, Ballard DW, Bohnlein E, Siekevitz M, Greene WC : Kappa B-specific DNA binding proteins : role in the regulation of human interleukin-2 gene expression. *Science* 244 : 457, 1989
15. Iademarco MF, McQuillan JJ, Rosen GD, Dean DC : Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1). *J Biol Chem* 267 : 16323, 1992
16. Bours V, Dejardin E, Goujon-Letawe F, Merville M, Castronovo V. The NF- κ B transcription factor and cancer : high expression of NF- κ B- and I κ B related proteins in tumor cell lines. *Biochem Pharmacol* 47 : 145, 1994
17. Thakur S, Lin HC, Tseng WT, Sushant K, Bravo R, Foss F, Gelinas C, Rabin AB : Rearrangement and altered expression of the NFKB2 gene in human cutaneous T-lymphoma cells. *Oncogene* 9 : 2335, 1994
18. La Rosa FA, Pierce JW, Sonenstein GE : Differential regulation of the *c-myc* oncogene promoter by the NF- κ B/rel family of transcription factors. *Mol Cell Biol* 14 : 1039, 1994
19. Kessler D, Duyao MP, Spicer DB, Sonenshein

- GE : NF- κ B-like factors mediate interleukin-1 induction of *c-myc* gene transcription in fibroblasts. *J Exp Med* 176 : 789, 1992
20. Duyao MP, Kessler DJ, Spicer DB, Sonenshein GE : Binding of NF- κ B-like factors to regulatory sequences of the *c-myc* gene. *Curr Top Microbiol Immunol* 166 : 211, 1990
21. Wu H, Lozano G : NF- κ B activation of p53. A potential mechanism for suppressing cell growth in response to stress. *J Biol Chem* 269 : 20067, 1994
22. Dejardin E, Bonizzi G, Bellahcene A, Castronovo V, Merville M, Bours V : Highly-expressed p100/p52(NF κ B2) sequesters other NF- κ B-related proteins in the cytoplasm of human breast cancer cells. *Oncogene* 11 : 1835, 1995
23. Mukhopadhyay T, Roth JA, Maxwell SA : Altered expression of the p50 subunit of the NF- κ B transcription factor complex in non-small cell lung carcinoma. *Oncogene* 11 : 999, 1995
24. Phelps RM, Johnson BE, Ihde DC, Gazdar AF, Carbone DP, McClintock PR, Linnoila RI, Matthews JL : NCI-Navy Medical Oncology Branch Cell Line Data Base. *J Cell Biochem Suppl* 24 : 32, 1996
25. Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG : Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucl Acids Res* 11 : 1475, 1983
26. Anderson DJ, Blobel G : Immunoprecipitation of proteins from cell-free translations. *Methods Enzymol* 96 : 111, 1983
27. Duyao MP, Buckler AJ, Sonenshein GE : Interaction of an NF- κ B-like factor with a site upstream of the *c-myc* promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 4727, 1990
28. Kitajima I, Shinohara T, Bilakovics J, Brown DA, Xu X, Nerenberg M : Ablation of transplanted HTLV-1 tax-transformed tumors in mice by antisense inhibition of NF- κ B. *Science* 258 : 1792, 1992
29. Beuparlant P, Kwan I, Bitar R, Chou P, Koromilas AE, Sonenberg N, Hiscott J : Disruption of I κ B- α regulation by antisense RNA expression leads to malignant transformation. *Oncogene* 9 : 3189, 1994
30. Wang C-U, Mayo MW, Baldwin AS Jr : TNF- and cancer therapy-induced apoptosis : Potentiation by inhibition of NF- κ B. *Science* 274 : 784, 1996
31. Beg AA, Baltimore D : An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death. *Science* 274 : 782, 1996
32. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM : Suppression of TNF- α -induced apoptosis by NF- κ B. *Science* 274 : 787, 1996
33. Blank V, Kourilsky P, Israel A : NF- κ B and related proteins : Rel/dorsal homologies meet ankyrin-like repeats. *Trends Biochem Sci* 17 : 135, 1992
34. Giaccone G. Oncogene and antioncogene in lung tumorigenesis. *Chest* 109 : 130S, 1996