

□ 원 저 □

## A549 폐암세포주의 방사선-유도성 세포사에서 NF- $\kappa$ B 활성화 및 cIAP 발현

단국대학교 의과대학 내과학교실, 생화학교실\*

이계영, 박상준\*

=Abstract=

### NF- $\kappa$ B Activation and cIAP Expression in Radiation-induced Cell Death of A549 Lung Cancer Cells

Kye Young Lee, M.D. and \*Shang-June Kwak, M.D.

*Department of Internal Medicine and \*Department of Biochemistry, College of Medicine,  
Dankook University, Cheonan, Korea*

**Background** : Activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B has been shown to protect cells from tumor necrosis factor- $\alpha$ , chemotherapy, and radiation-induced apoptosis. NF- $\kappa$ B-dependent cIAP expression is a major antiapoptotic mechanism for that. NF- $\kappa$ B activation and cIAP expression in A549 lung cancer cells which is relatively resistant to radiation-induced cell death were investigated for the mechanism of radioresistance.

**Materials and methods** : We used A549 lung cancer cells and Clinac 1800C linear accelerator for radiation. Cell viability test was done by MTT assay. NF- $\kappa$ B activation was tested by luciferase reporter gene assay, Western blot for I $\kappa$ B $\alpha$  degradation, and electromobility shift assay. For blocking NF- $\kappa$ B, MG132 and transfection of I $\kappa$ B $\alpha$ -superrepressor plasmid construct were used. cIAP expression was analyzed by RT-PCR and cIAP2 promoter activity was performed using luciferase assay system.

**Results** : MTT assay showed that cytotoxicity even 48 hr after radiation in A549 cells were less than 20%. Luciferase assay demonstrated weak NF- $\kappa$ B activation of  $1.6 \pm 0.2$  fold compared to PMA-induced  $3.4 \pm 0.9$  fold. Radiation-induced I $\kappa$ B $\alpha$  degradation was observed in Western blot and NF- $\kappa$ B DNA binding was confirmed by EMSA. However, blocking NF- $\kappa$ B using MG132 and I $\kappa$ B $\alpha$ -superrepressor transfection did not show any sensitizing effect for radiation-induced cell death. The result of RT-PCR

---

본 연구는 2000학년도 단국대학교 연구비 지원에 의해 이루어졌음.

Address for correspondence :

**Shang-June Kwak, M.D.&Ph.D.**

Department of Biochemistry, College of Medicine, Dankook University

San 29 Anseo-dong Cheonan, Korea 330-714

Phone : 82-41-550-3860 Fax : 82-41-5550-3905 E-mail : ftpn2100@dankook.ac.kr

for cIAP1 & 2 expression was negative induction while TNF- $\alpha$  showed strong expression for cIAP1 & 2. The cIAP2 promoter activity also did not show any change compared to positive control with TNF- $\alpha$ .

**Conclusions :** We conclude that activation of NF- $\kappa$ B does not determine the intrinsic radiosensitivity of cancer cells, at least for the cell lines tested in this study. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2003, 55:488-498)

**Key words :** Radiation, Cell Death, NF- $\kappa$ B, cIAP1 & 2.

## 서 론

NF- $\kappa$ B는 면역 및 염증 반응 조절에 중요한 역할을 하는 전사인자로 알려져 있지만 최근 세포사에 있어서도 중요한 항아포프토시스 인자로 관여함이 잘 알려져 있다<sup>1</sup>. TNF- $\alpha$ , 항암화학요법제들, 그리고 방사선 등 주요 아포프토시스 유도 자극 물질들에 의해 NF- $\kappa$ B가 활성화되며, 이들에 의해 활성화되는 NF- $\kappa$ B를 억제하면 항암효과를 향상시킬 수 있다고 보고되고 있고 이러한 항 NF- $\kappa$ B 전략은 새로운 암치료 전략의 일환으로 연구되고 있다<sup>2-5</sup>.

cIAP는 NF- $\kappa$ B에 의해 유도되는 대표적인 항아포프토시스 유전자로서 Baculovirus IAP(Inhibitor of Apoptosis) Repeat(BIR)와 RING domain을 가지고 있어서 이들 사이에 caspase recruit domain이 존재함으로써 caspase 활성을 직접적으로 차단하여 아포프토시스를 억제하며 cIAP1과 cIAP2 두가지가 존재함이 알려져 있다<sup>6,7</sup>. 특히 cIAP2는 TNF receptor-associated factor(TRAF)인 TRAF1과 TRAF2와 관련되어 TNF 수용체에 동원되는 단백질로서 TNF- $\alpha$  신호매개와 관련된 세포사를 억제하는 것으로 알려져 있으며, caspase 3, 7, 9와 직접 결합하여 caspase 활성을 억제한다<sup>8-10</sup>. 그리고 최근 cIAP2 유전자 promoter 부위에 두개의 NF- $\kappa$ B 결합부위가 존재하는 것이 밝혀짐으로써 cIAP2 발현 조절에 있어서 NF- $\kappa$ B는 가장 중요한 역할을 하는 전사인자로 생각되고 있다<sup>11</sup>.

한편 방사선 조사에 의해서도 NF- $\kappa$ B가 활성화된

다는 사실은 잘 알려져 있으나 NF- $\kappa$ B가 유도하는 주요 항아포프토시스 유전자인 cIAP에 대해서는 아직 보고된 바가 없다. 이에 저자들은 방사선에 비교적 내성을 보이는 A549 폐암세포주에서 발생하는 방사선-유도성 세포사에서 NF- $\kappa$ B의 역할과 cIAP2 발현을 조사하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

## 연구 방법

### 1. 세포주 배양 및 방사선 조사

A549 폐암세포주를 RPMI 1640(GibcoBRL) 배지에 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 그리고 1% penicilline/streptomycin 등을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 방사선 조사는 Varian 사의 Clinac 1800C 선형가속기를 이용하였으며 조사량은 10 Gy를 사용하였다.

### 2. Construct 및 유전자 주입

NF- $\kappa$ B 의존성 전사활성을 평가하기 위하여는 IgG $\kappa$  chain 유전자의 NF- $\kappa$ B binding site인 IgG $\kappa$ -NF- $\kappa$ B site(sequence 5-GGGGACTTTC-3) oligonucleotide가 minimal IL-8 promoter(position -67 to +44)의 상류(upstream)에 위치하도록 구축된 luciferase reporter gene construct를 이용하였으며, I $\kappa$ B $\alpha$ -superrepressor plasmid construct는 스탠포드 의대 Glenn D. Rosen교수로부터 제공받았

다. cIAP2 promoter의 전사 활성도를 평가하기 위하여 NF- $\kappa$ B binding site를 포함하는 cIAP2 유전자 5' flanking region(1.4 kb)을 pGL2-H3 luciferase vector에 cloning 한 construct를 사용하였으며 연세대학교 이태호 교수로부터 제공받았다.

유전자 주입 실험은 lipofectamine plus(Gibco-BRL)를 이용하여 protocol instruction에 따라 시행하였다.

### 3. MTT assay

방사선 조사에 대한 Cell viability를 보기 위해 MTT assay를 시행하였다. 간단히 요약하면, 96-well 세포배양접시에 A549 세포 주를 10,000개씩 분주한 후 정해진 시간 후에 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 5mg/ml 용액 20 $\mu$ l를 첨가하고 2시간동안 37°C 5% CO<sub>2</sub>incubator에서 incubation한 후 0.1N acidified CH<sub>3</sub>Cl-HCl를 첨가하고 세포들을 용해시킨 후 ELISA plate reader 590nm에서 흡광도를 측정하여 Cell viability를 결정하였다.

### 4. Luciferase Reporter Gene Assay

실험하고자 하는 조건에 따라 harvest 시점에서 0.1 ml의 lysis buffer(0.1 M HEPES, pH 7.6, 1% Triton-X, 1 mM DTT and 2 mM EDTA)를 직접 첨가하여 cell lysate를 harvest한 후 섭씨 4도에서 10분간 14,000 rpm으로 원심분리하여 세포 단백을 얻었다. Bradford assay(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)를 이용하여 단백질 농도를 측정한 후 20  $\mu$ g의 단백질을 luciferase assay mix(25 mM glycylglycine, 15 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mg/ml bovine serum albumin(BSA), 5 mM ATP and 1 mM D-luciferin (Analytical Luminescence Laboratory, San Diego, CA))에 첨가한 후 Monolight 2010 (Analytical Luminescence Laboratory)을 이용하여

20초간 luminescence를 3회 반복 측정하여 평균값을 얻어 결정하였다.

### 5. Western blot

각 세포주를 60 mm 배양접시에서 80-90%의 confluency가 되도록 배양한 후 적절한 조건 하에 처치한 후 Trypsin/EDTA로 harvest하여 lysis 용액(1% SDS, 1 mM sodium vanadate, 10 mM Tris-HCl pH 7.4)으로 whole cell lysate를 획득한 후 5분간 4°C 14,000 rpm에서 원심분리하여 단백추출을 얻었다. Bradford assay로 단백질 농도를 측정하고 3분간 가열하여 denaturation 시킨 후 SDS-PAGE로 전기영동하여 nitrocellulose에 transfer한다. Blot을 blocking buffer(4% milk, 1% BSA, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20)에서 1시간 incubation한 후 일차 항체를 4% milk, 1% BSA, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20 등을 포함한 4% milk 용액에 1:1000 희석하여 1시간 동안 실온에서 incubation 하고 10분씩 3회 세척한 후 horseradish peroxidase conjugated 이차항체를 1:5000 희석된 blocking buffer로 2차항체 반응을 1시간 거친 후 역시 3회 세척한 후 ECL(Amersham, Arlington Heights, IL) 검출하였다.

### 6. Electromobility Shift Assay (EMSA)

세포주를 100 mm dish에서 80-90%의 confluency 되게 배양한 후 대조군과 방사선 조사 2시간 후 Trypsin/EDTA로 harvest 하였다. 100  $\mu$ l Buffer A(10 mM HEPES(pH 7.9), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.2 % NP-40 with protease inhibitors)를 첨가한 후 25 gauge 주사바늘로 5-6회 통과시켜 세포막을 파괴시키고 섭씨 4도에서 15분간 14,000 rpm으로 원심분리하여 세포핵 pellet을 얻은 후, 100  $\mu$ l Buffer C (20 mM HEPES(pH 7.9),

25% glycerol, 0.42 M NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA plus protease inhibitors)를 첨가하여 핵막을 파괴시키고 4°C에서 30분간 stirring 하였다. 4°C에서 15분간 14,000 rpm으로 원심분리하여 chromatin을 pellet시켜 핵추출(nuclear extraction) 성분을 얻은 후 4°C에서 Buffer D(20 mM HEPES (pH 7.9), 20% glycerol, 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 1 mM dithiothreitol(DTT))로 6시간 투석하여 핵단백을 획득한 후 Bradford assay로 단백질 농도를 측정하였다.

EMSA는 추출된 핵단백 7.5  $\mu$ g을 1  $\mu$ g의 poly (dI-dC):poly(dI:dC)와 2.5 pg의 [32- $\alpha$ P]-labeled oligonucleotide probe( $1 \times 10^5$  cpm)이 포함된 20  $\mu$ l의 binding buffer(25 mM HEPES(pH 7.6), 0.1 mM EDTA, 10 % glycerol, 50 mM KCl, 0.05 mM DTT)에 첨가하여 4°C에서 30분간 반응시킨 후 0.5 $\times$ Tris-Borate EDTA(pH 8.3) buffer에서 4% nondenaturing polyacrylamide gel 을 전기영동하여 단백질-DNA 복합체를 분리하여 autoradiography로 결과를 얻었다. 사용된 oligonucleotide probe는 IgG kappa chain 유전자의 5 flanking 부위의 NF- $\kappa$ B site(5' tcgaGTCGGGGACTTTCCT CTGA)를 사용하였고 이에 대한 상보적 strand를 5' 쪽에 네 개의 염기 overhang을 갖도록 고안하여 annealing한 후 [ $\alpha$ -32P] dCTP (Amersham, Arlington Heights, IL)와 non-radioactive dA/T/GTPs, 그리고 Klenow DNA polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA)를 이용하여 제조하였다. Cold competition은 250 pg (100 $\times$ )의 cold oligonucleotide probe를 radio-labeled probe와 반응시키기 5분전에 먼저 반응시켰다.

## 7. 역전사-중합효소연쇄반응(RT-PCR)

60 mm 세포배양 접시에서 주어진 조건 하에 처리

한 후 배양액을 제거한 후 Trizol(Gibco BRL, Gaithersburg) 1 ml을 첨가하였다. 이를 eppendorf tube에 옮긴 후 chlorform을 넣고 진탕혼합한 뒤 2-3분 뒤에 4°C, 13,000 rpm에서 원심분리하였다. 조심스럽게 RNA가 포함된 상층액을 얻은 뒤 isopropyl alcohol을 넣고 얼음에서 10분간 반응시키고 4°C 13,000 rpm에서 원심분리한 후 상층액을 제거하여 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA의 농도를 분광광도계(OD 260/280에서 흡광도 측정, Beckman, CA)를 이용하여 측정하였다. 2  $\mu$ g의 RNA를 oligo(dT)에 첨가하여 65°C에서 5분간 결합반응(annealing)시킨 후 First strand buffer, 0.1 M DTT, 2.5 mM dNTP, RNAase inhibitor, reverse transcriptase(RT)를 다시 첨가하여 42°C에서 1시간 반응시켜 cDNA를 얻었다.

cDNA는 10 $\times$  PCR buffer [500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl(pH 8.3), 15 mM MgCl<sub>2</sub>], 2.5 mM dNTP, Taq DNA polymerase(TaKaRa TaqTM, TaKaRa, Shiga, Japan)의 반응액에서 증폭하였다. DNA thermal cycler(Gene Amp PCR system 9600, Perkin Elmer)에서 94°C 1분(denaturation), 55°C 1분(annealing), 그리고 72°C 1분(extension)으로 25 cycle 반복하였다. PCR 반응 후에 1.5% agarose gell electrophoresis 하고,  $\beta$ -actin을 같은 방법으로 실험하여 보정하였다. 사용한 oligonucleotide는 주문 제작(Bioneer, 충북 청원)하였으며 염기서열(base sequence)은 아래와 같다.

cIAP1 sense :

5'-ATGCAGACACATGCAGCTCG-3'

cIAP1 antisense :

5'-ATGTTGGCCGCAGCATTTCC-3'

cIAP2 sense :

5'-AGGAGTCTTGCTCGTGCTGG-3'

cIAP2 antisense:

5'-TCCTGGGCTGTCTGATGTGG-3'

$\beta$ -actin sense;

5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'

$\beta$ -actin antisense;

5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3'

## 결 과

### 1. A549 폐암세포주에서의 방사선-유도성 세포 독성

A549 폐암세포주의 방사선 조사에 대한 감수성을 확인하기 위하여 배양된 A549 세포주를 96 well plate에 분주한 후 10 Gy 방사선 조사 후 각각 24 시간 및 48시간 후 MTT assay로 세포생존율을 조사한 결과 24시간 후에는  $89.2 \pm 2.3$  %, 48시간 후에는  $82.3 \pm 6.4$  %의 세포 생존율의 결과를 보여 A549 폐암세포주가 방사선에 대해 비교적 내성을 보이는 세포주임을 확인하였다(Fig. 1).

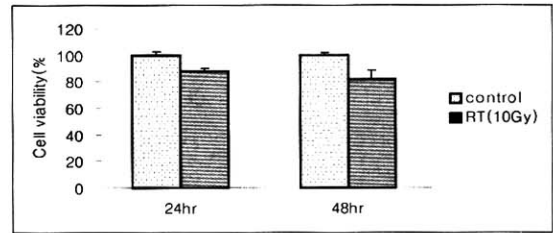


Fig. 1. Effect of radiation on A549 lung cancer cell line viability by MTT assay.

### 2. A549 폐암세포주에서 방사선-유도성 NF- $\kappa$ B 활성화

방사선 조사에 대해 비교적 저항적인 A549 폐암세포주에서 방사선-유도성 NF- $\kappa$ B의 활성화가 발생 하는지를 확인하기 위하여 luciferase assay를 이용한 전사활성 측정, Western blot을 이용한 I $\kappa$ B  $\alpha$  분해, 그리고 EMSA를 이용하여 NF- $\kappa$ B의 핵이동 및 DNA 결합을 확인하였다. Luciferase assay에서

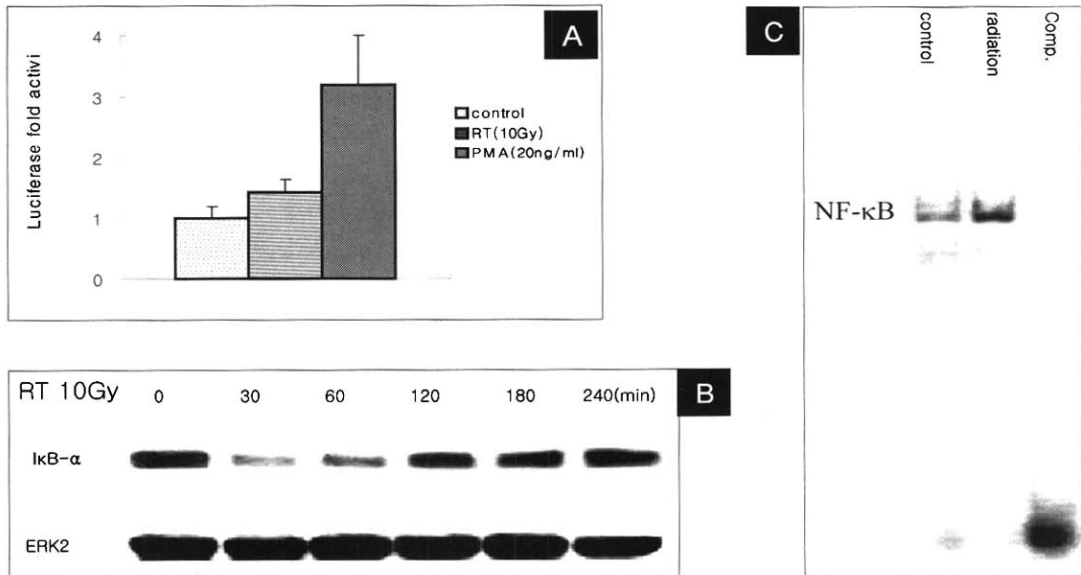
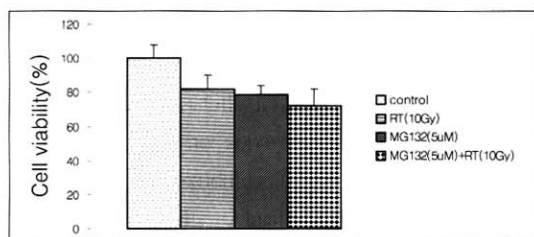


Fig. 2. Radiation-induced NF- $\kappa$ B activation in A549 cell line. (A) luciferase reporter gene assay; (B) Western blot for I $\kappa$ B  $\alpha$  degradation; (C) electromobility shift assay (EMSA) for NF- $\kappa$ B DNA binding.



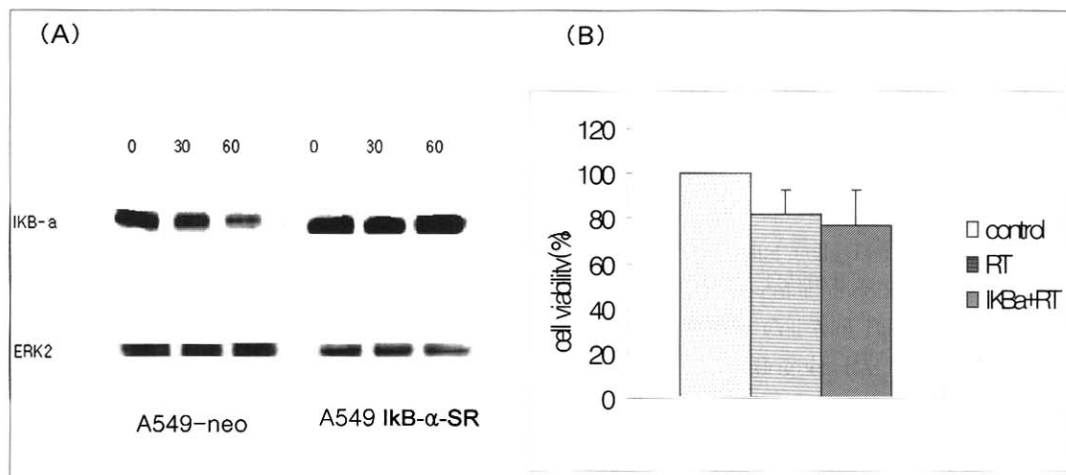
**Fig. 3.** Proteasome inhibitor MG132 dose not sensitizes A549 cells to Radiation-induced cytotoxicity by MTT assay.

NF- $\kappa$ B 활성화에 대한 양성 대조 물질로 사용된 PMA (20 ng/ml)가  $3.4 \pm 0.9$  배의 luciferase 활성도를 증가시킨 반면 방사선(10 Gy)은 PMA 보다는 미약하지만 대조군에 비해  $1.6 \pm 0.2$  배의 의미 있는( $p < 0.05$ ) luciferase 활성도의 증가를 나타내었다(Fig. 2A). NF- $\kappa$ B 활성 과정 중의 주요 단계인 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 분해를 확인하기 위하여 방사선 조사 후 각 30, 60, 120, 180, 및 240 분 시점에서 Western blot을 시행한 결과 30분에서 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 분해가 관찰되기 시작하여 180분 시점에서 다시 회복하는 경

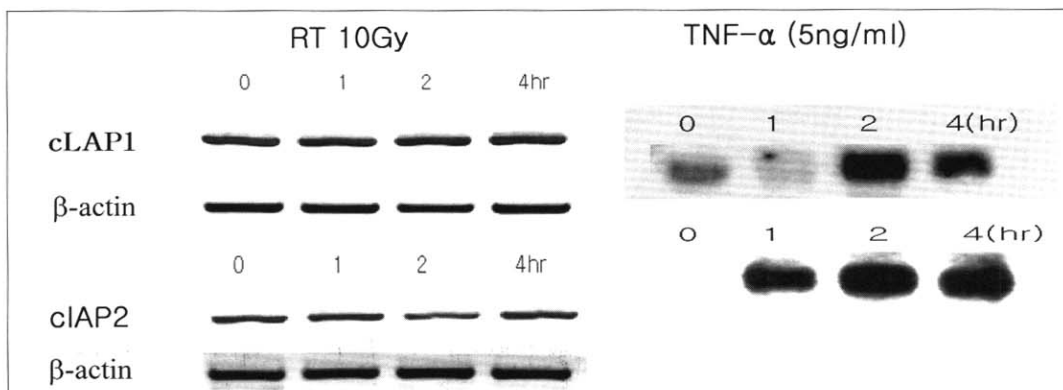
향을 관찰하였다(Fig. 2B). I $\kappa$ B $\alpha$  분해 후 발생하는 NF- $\kappa$ B의 핵이동 및 DNA 결합을 확인하기 위하여 시행한 EMSA에서 방사선 조사에 의한 lane 2에서 NF- $\kappa$ B band가 유의하게 증가함을 보여주었고 이는 cold competition에 의해 소실되는 것으로 보아 NF- $\kappa$ B band 임을 확인할 수 있었다(Fig. 2C).

### 3. Proteasome inhibitor MG132 전처치의 효과

방사선에 대해 내성을 보이는 A549 폐암세포주에서 항아포토시스 전사인자인 NF- $\kappa$ B가 활성화됨을 Fig. 2에서 확인하였기에 NF- $\kappa$ B 억제에 의해 방사선에 대한 감수성이 증가되는 지를 확인하기 위하여 proteasome 억제제로서 대표적인 NF- $\kappa$ B 억제제로 알려져 있는 MG132(5  $\mu$ M)를 전처치한 후 방사선 조사를 시행하였으나 MG132는 A549 세포주의 방사선 감수성에 대해 아무런 영향을 미치지 못하였다(Fig. 3).



**Fig. 4.** (A) Characterization of A549-I $\kappa$ B $\alpha$ -SR cell lines by Western blot; (B) Stable overexpression of I $\kappa$ B $\alpha$ -SR dose not sensitize A549 cells to radiation-induced cell Death.



**Fig. 5.** RT-PCR shows no change in both cIAP1 and cIAP2 expression when A549 cells are exposed to 10 Gy radiation, while TNF- (5 ng/ml) induces strong expression of cIAP1 and cIAP2 both.

#### 4. $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -superrepressor 유전자주입이 미치는 효과

비선택적 NF- $\kappa\text{B}$  억제제인 MG132로서 방사선 감수성에 대한 효과를 관찰하지 못하였기에 NF- $\kappa\text{B}$ 에 특이적이고 선택적인 억제제를 통하여 A549 세포주의 방사선 감수성에 미치는 영향을 조사하기 위하여  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -superrepressor( $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 가 인산화되어 분해되는데 중요한 역할을 하는 Ser-32 및 -34에 대한 돌연변이 유도체로서 지속적으로 NF- $\kappa\text{B}$ 를 포획하고 있어서 그 활성을 억제함)를 안정적으로 유전자 주입한 A549- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -SR 세포주를 제작하여 A549-neo 세포주와 방사선 감수성을 비교하였으나 이 역시 의미 있는 변화를 보여주지 못하였다(Fig. 4B). Fig. 4A는 제작된 A549- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -SR 세포주의 NF- $\kappa\text{B}$  억제 효과를 확인하기 위하여 A549-neo 세포주와 비교하기 위하여 방사선 조사 후  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  분해를 Western blot으로 확인한 그림이다.

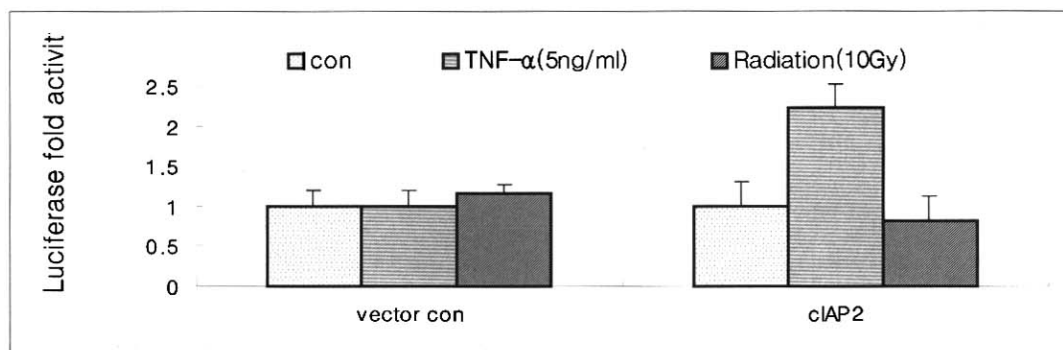
#### 5. A549 세포주에서 방사선 조사에 의한 cIAP 발현 변화

A549 세포주에서 방사선이 NF- $\kappa\text{B}$ 를 활성화 시키지

만 NF- $\kappa\text{B}$  억제로 방사선 감수성에 아무런 영향을 미치지 않는다는 사실을 확인한 후 방사선이 NF- $\kappa\text{B}$ 에 의해 유도발현되는 주요 항아포토시스 유전자인 cIAP 발현에 영향을 미치는 지를 평가하기 위하여 RT-PCR을 시행하였다. 양성대조물질로 사용한 TNF- $\alpha$ 에 의해서는 cIAP1 및 cIAP2 모두 유의하게 발현 유도가 관찰되지만 방사선 조사에 의해서는 cIAP 발현에 전혀 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 5).

#### 6. cIAP2 promoter 실험 결과

이어서 방사선이 cIAP2 promoter 활성화에 미치는 영향을 평가하기 위하여 cIAP2 유전자의 5' flanking 부위 (1.4 kb)를 pGL2-basic luciferase reporter construct에 주입한 plasmid를 A549 세포주에 유전자 주입한 후 각각 TNF- $\alpha$ 와 방사선조사 후 luciferase assay를 시행한 결과 TNF- $\alpha$ 에 의해서는  $2.4 \pm 0.4$  배의 활성 증가가 관찰된 반면 방사선에 의해서는  $1.2 \pm 0.1$  배로 그 효과가 미미하였다(Fig. 6). 이상의 결과를 종합해 볼 때 A549 세포주에서 방사선에 의해 NF- $\kappa\text{B}$ 가 활성화되지만 그 정도는 미미하여 항아포토시스 유전자인 cIAP를 유도할 정도는 아닌 것으로 생각되며 방사



**Fig. 6.** Radiation has no significant effect on cIAP2 promoter activity measured by luciferase assay, while TNF- $\alpha$  increases more than two fold activation of cIAP2 promoter activity.

선 내성을 보이는 A549 세포주에서 NF- $\kappa$ B는 중요한 내성 인자가 아닐 것으로 사료된다.

## 고 찰

방사선 조사에 따른 세포 반응에 있어서 전사인자인 AP1 혹은 NF- $\kappa$ B가 활성화됨으로써 방사선 내성 획득에 관여하는 특이적 유전자 발현과 단백질 합성을 유도한다는 연구 결과들이 보고되고 있다<sup>12-14</sup>. NF- $\kappa$ B가 아포토시스 신호전달 체계에 있어서 중요한 역할을 담당하고 있다는 사실은 주지의 사실로서 TRAF, cIAP, P21 등 항아포토시스 유전자들을 전사 유도함으로써 세포들을 세포사로부터 보호한다<sup>15,16</sup>. 방사선 조사에 의해 활성화된 NF- $\kappa$ B는 TNF- $\alpha$ 나 daunomycin 등 항암제 등에 의해 활성화된 NF- $\kappa$ B와 같이 암세포의 생존 신호로 작용하고 따라서 NF- $\kappa$ B 억제를 통해 항암효과를 증대시키려는 치료적 전략이 제시되고 있다<sup>2,5</sup>. 그러나 방사선 조사에 의해 활성화된 NF- $\kappa$ B가 방사선에 의해 유도되는 암세포 살상능력에 미치는 영향에 대해서는 상반된 결과가 보고된 경우도 있는 바 PC3 prostate cancer cells과 HD-MyZ Hodgkin's lymphoma cells을 이용한 실험 연구를 보면 NF- $\kappa$ B 억제를 통해 방사선 감수성에 아무런

영향을 미치지 못한다는 보고가 있다<sup>17</sup>.

이러한 배경에서 본 연구에서는 비교적 방사선에 내성을 보이는 A549 폐암세포주를 이용하여 방사선 조사에 따르는 NF- $\kappa$ B 활성화를 확인하고 이러한 NF- $\kappa$ B 활성화를 차단하였을 때 방사선 감수성의 변화를 관찰하고 NF- $\kappa$ B에 의해 유도되는 주요 항아포토시스 유전자인 cIAP의 발현 변화와 cIAP2 전사활성을 조사하고자 하였다. 본 연구에서 방사선-유도성 세포독성이 있어서 비교적 내성을 보이는 것으로 확인된 A549 세포주에서 방사선 조사에 의해 NF- $\kappa$ B가 활성화됨은 일관성 있게 확인되었다. Reporter gene assay로 전사활성을 확인하였고, Western blot에 의해 NF- $\kappa$ B 활성화의 주요 단계인 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 분해를 분석하였으며 EMSA에 의해 NF- $\kappa$ B의 DNA 결합을 증명하였다. 하지만 NF- $\kappa$ B 활성도는 전형적인 NF- $\kappa$ B 활성 자극 물질인 PMA나 TNF- $\alpha$ 의 활성도에 비해 전반적으로 미약한 것으로 나타나 적어도 A549 폐암세포주에서는 방사선 조사에 의해 유도되는 NF- $\kappa$ B 활성도는 그렇게 강력하지 않은 것으로 평가되며 이는 A549 세포주에서 나타나는 방사선 내성의 원인인 자로서의 NF- $\kappa$ B 역할이 그다지 중요하지 않을 것이라는 추측이 가능하였다. 실제로 NF- $\kappa$ B 억제에 의한 방사선-유도성 세포사의 감작효과를 확인하

고자 실행한 실험에서 MG132 전처리 및  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  superrepressor 유전자 주입에 의해 방사선-유도성 세포사에는 아무런 영향을 미치지 못하였다.

저자들은 이렇게 NF- $\kappa\text{B}$  억제에 의해 방사선-유도성 세포사에 대한 감작 효과가 관찰되지 않는 이유로서 방사선 조사에 의해 NF- $\kappa\text{B}$ 가 활성화 되기는 하지만 활성화된 NF- $\kappa\text{B}$ 가 항아포프토시스 작용을 하는데 있어서 중요한 역할을 한다고 알려진 IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) 가족군의 중요한 일원인 cIAP1과 cIAP2 유전자의 발현 변화를 관찰하였으나 TNF- $\alpha$ 에 의해 유도되는 것과는 달리 방사선에 의해서는 cIAP가 유도발현되지 않았으며 cIAP2의 promoter 활성을 확인한 실험에 의해서도 특별한 변화를 확인할 수 없었다. 이는 TNF- $\alpha$  신호전달 체계에 있어서 발생하는 NF- $\kappa\text{B}$  의존성 cIAP2 유도발현에 의한 세포사 억제 효과가<sup>18</sup> 방사선에 의해서는 발생하지 않음을 의미하며, 방사선에 의해 유도되는 NF- $\kappa\text{B}$  활성화는 그 정도가 경미할 뿐 아니라 cIAP 유도 발현에 이은 세포사 억제 효과에 있어서도 그다지 중요한 역할을 하지 않는다는 사실을 시사하는 바라고 생각된다.

본 연구 결과는 A549 단일 세포주에서만 확인된 사실로서 일반화 하기에는 다른 세포주들을 이용한 실험으로 확장하여 확인할 필요가 있다고 생각되며, 세포사 측면에서 방사선-유도성 NF- $\kappa\text{B}$  활성화는 주요 작용기전이 아니며, 방사선-유도성 NF- $\kappa\text{B}$  활성화가 갖는 분자생물학적 의미를 파악하는데 있어서 추가 실험 및 연구가 이어져야 할 것으로 생각된다.

## 요 약

### 연구배경 :

세포에 방사선을 조사하면 세포사멸과 함께 AP-1, NF- $\kappa\text{B}$ 와 같은 여러 전사인자가 활성화 되는 것으로 알려져 있다. 이중 염증과 면역반응의 중요한

전사인자인 NF- $\kappa\text{B}$ 는 항아포프토시스의 기능이 있으며 NF- $\kappa\text{B}$  활성화를 차단함으로써 TNF- $\alpha$ 나 daunorubicine 등에 의한 항암효과를 상승시킬 수 있음이 밝혀져 있다. NF- $\kappa\text{B}$ 의 항아포프토시스 기전은 NF- $\kappa\text{B}$  의존성 단백질인 cIAP1, 2의 전사발현 유도에 의한 것으로 cIAP1, 2는 caspase 3, 7, pro-caspase-9의 활성을 차단함으로써 아포프토시스를 억제하는 것으로 알려져 있다. 이에 저자들은 방사선 유도성 세포사멸에 비교적 내성을 보이는 A549 세포주에서 방사선에 의한 NF- $\kappa\text{B}$  활성화와 그에 따른 cIAP 발현유도를 조사하고 NF- $\kappa\text{B}$  활성화를 차단하여 방사선 유도성 세포사멸의 감작 효과를 확인하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

### 방 법 :

세포주는 A549 폐암세포주를 이용하였고, 방사선 조사는 Varian사의 Clinac 1800C 선형가속기를 이용하였으며 조사량은 10GY를 사용하였다. 세포독성검사는 MTT Assay를 이용하였고, NF- $\kappa\text{B}$  활성화 검사는 luciferase reporter gene assay, electrophoresis mobility shift assay,  $\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$  degradation에 대한 western blot을 이용하였다. NF- $\kappa\text{B}$ 활성을 차단하기 위하여 proteasome inhibitor인 MG132와  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -superrepressor plasmid를 transfection한 안정적 세포주 A549- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -superrepressor를 이용하였다. cIAP의 발현은 RT-PCR을 이용하였고, cIAP2 promoter 활성은 NF- $\kappa\text{B}$  site를 포함한 cIAP2 유전자 5' flanking region(1.4kb)을 pGL2-Basic luciferase vector에 cloning 한 construct를 사용하여 transfection 후 luciferase assay를 시행하였다.

### 결 과 :

A549 cell에서 10Gy 방사선 조사에 의한 세포독성은 24hr, 48hr 에 각각  $10.82 \pm 3\%$ ,  $17.7 \pm 6.4\%$ 로 비교적 내성이 있음을 확인하였다. 방사선에 의한 NF- $\kappa\text{B}$ 의 활성은  $\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$  분해에 대한 western blot과 EMSA로 확인하였으며 luciferase assay에서도 약 1.6 배 정도의 NF- $\kappa\text{B}$  활성화가 있었다.

NF- $\kappa$ B활성을 차단하기 위해 사용한 MG132는 방사선 유도성 세포사멸에 영향을 주지 않았으며 A549-I $\kappa$ B $\alpha$ -superrepressor 세포주에서도 세포사멸의 감작효과는 없었다. 또한 RT-PCR 결과 방사선에 의한 cIAP1,2 mRNA 발현유도는 관찰되지 않았고 cIAP2 promoter luciferase assay에서도 cIAP2 전사활성 유도는 없었다.

#### 결 론 :

A549 폐암세포주에서 방사선에 의해 NF- $\kappa$ B의 활성화는 확인하였으나 활성화 정도가 미약하였고 NF- $\kappa$ B 의존성 항아포프토시스 유전자인 cIAP가 방사선에 의해 발현유도 되지 않았으며, NF- $\kappa$ B 활성을 차단함에도 세포독성에 감작효과가 없었으므로 A549 폐암세포주에서 방사선 유도성 세포사멸에 내성을 보이는 기전에는 NF- $\kappa$ B의 역할이 미미하리라고 사료된다.

#### 참 고 문 헌

1. Baichwal, V. R., and Baeuerle, P. A. Activate NF-kappa B or die? *Curr. Biol.* 1997;7:R94-R96
2. Beg, A. A., and Baltimore, D. An Essential Role for NF-kappa B in Preventing TNF- $\alpha$ -Induced Cell Death *Science* 1996;274:782-4
3. Liu, Z. G., Hsu, H., Goeddel, D. V., and Karin, M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death *Cell* 1996;87:565-76
4. Van Antwerp, D. J., Martin, S. J., Kafri, T., Green, D. R., and Verma, I. M. Suppression of TNF- $\alpha$ -Induced Apoptosis by NF-kappa B *Science* 1996;274:787-9
5. Wang, C. Y., Mayo, M. W., and Baldwin, A. S., Jr. TNF-and Cancer Therapy-Induced Apoptosis: Potentiation by Inhibition of NF-kappa B *Science* 1996;274:784-7
6. Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. The cIAP1 and cIAP2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 1997;16:6914-25
7. Yang Y, Fang S, Jensen JP, Weissman AM, Ashwell JD. Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* 2000;288:874-7
8. Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeda JE, Mackenzie A, Korneluk RG. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NIAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 1996;379:349-53
9. Chu ZL, McKinsey TA, Liu L, Gentry JJ, Malim MH, Ballard DW. Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis cIAP2 in under NF-kappa B control. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1997;94:10057-62
10. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. NF-kappa B Antiapoptosis: Induction of TRAF1 and TRAF2 and cIAP1 and cIAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998;281:1680-3
11. Hong SY, Yoon WH, Park JH, Kang SG, Ahn JH, Lee TH. Involvement of two NF-kappa B binding elements in tumor necrosis factor- $\alpha$ -, CD40-, and Epstein-Barr Virus latent membrane protein 1-mediated induction of the cellular inhibitor of apoptosis protein 2 gene. *J Biol Chem* 2000;275:18022-8

12. R.E. Wilson, S.L. Taylor, G.T. Atherton *et al.*, Early response gene signalling cascades activated by ionising radiation in primary human B cells. *Oncogene* 8 (1993), pp. 3229–37
13. N. Mohan and M.L. Meltz, Induction of nuclear factor kappa B after low-dose ionizing radiation involves a reactive oxygen intermediate signaling pathway. *Radiat Res* 140 (1994), pp. 97–104
14. N. Yamagishi, J. Miyakoshi and H. Takebe, Enhanced radiosensitivity by inhibition of nuclear factor kappa B activation in human malignant glioma cells. *Int J Radiat Biol* 1997;72:157–62.
15. C.Y. Wang, M.W. Mayo, R.G. Korneluk *et al.*, NF-kappaB antiapoptosis: Induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998;281:1680–93.
16. B. Kaltschmidt, C. Kaltschmidt, T.G. Hoffmann *et al.*, The pro- or anti-apoptotic function of NF-kappaB is determined by the nature of the apoptotic stimulus. *Eur J Biochem* 2000;267:3828–35.
17. Pajonk, K. Pajonk and W.H. McBride, Inhibition of NF-kappaB, clonogenicity, and radiosensitivity of human cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1956–60.
18. Chu ZL, McKinsey TA, Liu L, Gentry JJ, Halim MH, Ballard DW. Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis cIAP2 is under NF-kB control. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94: 10057–62