

폐암 세포주에서 *FHIT* 유전자 이입에 의한 Apoptosis의 기전

원자력병원 내과, 실험치료연구실

유정선, 김철현

=Abstract=

Mechanism of *FHIT*-Induced Apoptosis in Lung Cancer Cell Lines

Jung Sun Yoo, Cheol Hyeon Kim, M.D.

Department of Internal Medicine and Laboratory of Experimental Therapeutics,
Korea Cancer Center Hospital

Background : The *FHIT* (fragile histidine triad) gene is a frequent target of deletions associated with abnormal RNA and protein expression in lung cancer. Previous studies have shown *FHIT* gene transfer into lung cancer cell line lacking *FHIT* protein expression resulted in inhibition of tumor cell growth attributable to the induction of apoptosis and reversion of tumorigenicity. However, the mechanism of the tumor suppressor activity of the *FHIT* gene and the cellular pathways associated with its function are not completely understood.

Methods : To gain insight into the biological function of *FHIT*, we compared the NCI-H358 cell line with its stable *FHIT* transfectants after treatment with cisplatin or paclitaxel. We investigated the effects of *FHIT* gene expression on cell proliferation, apoptosis, and activation of caspase system and Bcl-2 family. The induction of apoptosis was evaluated by using DAPI staining and flow cytometry. Activation of caspases and Bcl-2 members was evaluated by Western blot analysis.

Results : A significantly increased cell death was observed in *FHIT* transfectants after cisplatin or paclitaxel treatment and this was attributable to the induction of apoptosis. Remarkable changes in caspases and Bcl-2 family were observed in the transfected cells as compared with the control cells after treatment with paclitaxel. Activation of caspase-3 and caspase-7 was markedly increased in cells expressing *FHIT*. Expression level of Bcl-2 and Bcl-xL protein was significantly decreased and that of Bax and Bad protein was significantly increased in the transfected cells.

Address for correspondence:

Cheol Hyeon Kim, M.D.

Department of Internal Medicine, Korea Cancer Center Hospital

215-4, Gongneung-Dong, Nowon-Gu, Seoul 139-706, Korea

Phone : 02-970-1209 Fax : 02-970-2401 E-mail : cheol@kcch.re.kr

Conclusion : *FHIT* gene delivery into lung cancer cells results in enhanced apoptosis induced by treatment with cisplatin or paclitaxel. The data suggest that apoptosis in *FHIT*-expressing cells could be related to activation of caspase pathway and Bcl-2 family. (*Tuberculosis and Respiratory Diseases* 2004, 56:450-464)

Key words : Fragile histidine triad (*FHIT*), Apoptosis, Lung neoplasms, Paclitaxel, Cisplatin.

서 론

Chromosome 3p의 deletion이 소세포폐암의 90% 이상에서 그리고 비소세포폐암의 80% 이상에서 발견되는, 폐암에서는 가장 흔하게 나타나는 genetic alteration이라는 것은 널리 알려진 사실이다¹⁻⁴. 또한 hyperplasia나 dysplasia 등의 병변과 carcinoma in situ와 같은 발암 단계의 초기에서도 chromosome 3p의 deletion이 잘 관찰되는 것으로 알려져 있다^{5,6}. 따라서 이 위치에 폐암의 암억제유전자가 존재할 가능성이 매우 높다고 생각되어 과거부터 이에 대한 연구가 활발하게 진행되어오고 있다⁷⁻¹⁰. 하지만 현재까지는 몇몇 후보 유전자들이 밝혀져 있을 뿐, 확실한 암억제유전자를 규명해내지는 못하고 있는 실정이다.

이러한 후보 암억제유전자들 중 최근 Ohta 등이 발표한 3p14.2에 위치하고 있는 *FHIT* 유전자가 주목을 받고 있다¹¹. 식도, 위, 두경부암 등의 여러 종양에서 이 위치의 homozygous deletion이 보고된 바 있으며¹²⁻¹⁵, 서열 분석상 이 유전자가 human genome 중 손상에 가장 취약한 곳 중 하나인 FRA3B fragile site와 가족성 신세포암에서 잘 발견되는 t(3;8)(p14.2;p24) 유전자 전위의 breakpoint를 포함하고 있기 때문이다^{11,16}. *FHIT* 유전자는 chromosome 3p14.2 위치에 있는 약 1 Mb 정도의 genomic DNA로서 10개의 exon으로 구성되어 있으며 이로부터 1.1 kb의 mRNA가 expression 된다¹¹. 10개의 exon중에서도 coding region은 exon 5에서 exon 9까지인데 이로부터 생산되는 16.8 kDa의 단백질은 *Schizosaccharomyces pombe*

가 생산하는, diadenosine 5',5'''-P₁P₄-tetraphosphate (Ap₄A)를 ATP와 AMP로 분해하는 효소인, Ap₄A asymmetrical hydrolase와 69%의 유사성을 보이는 것으로 밝혀졌다^{17,18}. 즉, diadenosine triphosphate hydrolase activity를 가지고 있으며, histidine triad (HIT) gene family에 속하기 때문에 fragile histidine triad gene의 약자로 *FHIT* gene이라 명명되었다.

폐암 세포주와 조직에 대해서 발표된 기존의 연구 결과들을 살펴 보면, *FHIT* 유전자의 homozygous deletion과 이와 관련된 abnormal *FHIT* mRNA expression이 폐암에서 매우 높은 빈도로 관찰되고 있다¹⁹⁻²¹. 한 예로 Sozzi 등의 연구에 의하면 소세포폐암의 80%, 비소세포폐암의 40% 정도에서 *FHIT* mRNA transcripts의 이상이 발견되며 전체의 약 76%에서 *FHIT* alleles의 loss가 발견되었다고 한다¹⁹. 이후 *FHIT* 단백질에 대한 항체를 이용한 면역조직화학염색 실험 결과들이 발표되었는데 이러한 gene abnormality는 단백질의 발현 결손과 일치함이 밝혀졌다²².

이상의 소견들을 바탕으로 현재 *FHIT* 단백질이 실제로 세포 내에서 어떠한 기능을 하는가에 대한 연구가 활발히 진행 중에 있다. 일부 연구에 의하면 *FHIT* 유전자를 세포 내에 이입시키고 그 변화를 관찰하였을 때 apoptosis가 유발되었고, 세포 주기의 이상 소견이 관찰되었으며, 나아가 nude mice에서 폐암세포주의 종양형성 능력이 억제됨이 관찰되었다²³⁻²⁵. 하지만 아직까지 *FHIT* 단백질이 세포내에서 어떠한 기능을 하여 이러한 현상들이 관찰되는지에 대한 지식은 미진한 상태이다.

본 연구에서는 *FHIT* 유전자를 폐암 세포에 이입시켰을 때 유발되는 apoptosis의 기전을 규명하여 *FHIT* 단백질의 기능을 알아보고자 하였다. 이를 위하여 *FHIT* 유전자가 결손된 폐암세포주에 *FHIT* 유전자를 stable transfection 시킨 후 항암제를 가하고 apoptosis가 항진되어 나타나는가를 조사해 보았다. 또한 이 과정에서 나타나는 몇몇 apoptosis 관련 단백질들의 변화를 살펴보았다.

대상 및 방법

1. 세포 배양

폐암 세포주 중 *FHIT* 단백질의 발현이 결손된 것으로 알려져 있는 NCI-H358 세포를 10% fetal bovine serum (FBS), 100 µg/ml의 streptomycin이 첨가된 RPMI 1640 배지에 37°C, 5% CO₂의 조건으로 배양하였다. NCI-H358 세포에 *FHIT* gene을 transfection한 세포는 위와 동일한 조건 하에서 700 µg/ml의 G418 (geneticin)을 첨가하여 배양하였다.

2. 시 약

Paclitaxel, cisplatin, 3-(4, 5-dimethyl thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 용액, 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Rabbit polyclonal anti-*FHIT* 항체는 Zymed (South San Francisco, CA, USA)에서, mouse polyclonal anti-PARP 항체, mouse monoclonal anti-Bcl-2 항체, rabbit polyclonal anti-Bcl-xL 항체, rabbit polyclonal anti-Bad 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서, rabbit polyclonal anti-cleaved caspase-3 (Asp175) 항체, rabbit polyclonal anti-cleaved caspase-7 (Asp178) 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서, rabbit poly-

clonal anti-Bax 항체는 DakoCytomation (Carpenteria, CA, USA)에서 각각 구입하여 사용하였다. ECL Western blotting detection systemTM은 Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA)의 제품이었으며, LipofectamineTM Reagent는 Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)의 제품이었다. Annexin V-FITC, annexin V binding buffer, propidium iodide, mouse monoclonal anti-caspase-8 항체, rabbit polyclonal anti-caspase-9 항체는 PharMingen (San Diego, CA, USA)에서, Z-VAD-FMK는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다.

3. Eukaryotic expression vector의 제작

먼저 human *FHIT* cDNA 중 coding region인 exon 5에서 exon 9에 해당하는 cDNA를 얻기위해 정상 조직에서 뽑은 RNA로부터 이 부위를 cover하는 primer를 이용하여 RT-PCR을 시행하였다. 이때 사용한 primer는 *Xba*I과 *Hind*III의 restriction site를 가지고 있도록 제작하였다¹⁸. Cytomegalovirus (CMV) immediate early gene의 enhancer-promotor sequence와 neomycin resistant gene을 포함하고 있는 eukaryotic expression vector인 pRc/CMV plasmid (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)를 구입하였다. 이 vector 역시 *Xba*I과 *Hind*III의 restriction site를 가지고 있다. *Xba*I/*Hind*III로 digestion 시킨 pRc/CMV vector에 역시 같은 효소로 digestion 시킨 RT-PCR product를 ligation시켰다. 완성된 plasmid (pRc/CMV-*FHIT*)는 sequencing을 시행하여 염기 서열을 확인하였다.

4. 폐암 세포주에 transfection

6-well dish plate에 NCI-H358 세포 1X10⁵개를 분주한 뒤, CO₂ incubator에 37°C에서 18-24시간 정

도 유지하여 세포가 50-80% 정도 confluent해 지도록 하였다. 한편, 아무 것도 첨가되지 않은 RPMI 1640 배지 100 μ l에 *FHIT* DNA 0.8-1.6 μ g를 첨가하고 또 다른 RPMI 1640 배지 100 μ l에 2 mg/ml의 LipofectamineTM Reagent 2-20 μ l를 첨가한 뒤, 두 용액을 부드럽게 혼합하여 실온에 15-45분 정도 유지하였다. 50-80% 정도 confluent해진 세포를 RPMI 1640 배지로 씻어낸 뒤 0.8 ml의 배지로 다시 채우고 여기에 위의 혼합액을 상층으로 가한 뒤 CO₂ incubator에 37°C에서 5시간 동안 유지하였고, 5시간 후 20% FBS가 첨가된 RPMI 1640 배지 1 ml를 첨가하였다. 48시간이 지난 후에 G418 700 μ g/ml이 첨가된 10% FBS RPMI 1640 배지로 교환한 뒤 selection을 시작하였다. 2주간 G418로 selection을 시행한 후 G418-resistant colony를 isolation하여 배양하였다. 형성된 colony는 rabbit polyclonal anti-*FHIT* 항체로 Western blotting을 시행하여 *FHIT* 발현을 확인하였다.

5. Paclitaxel, cisplatin의 처리

폐암 세포주에서 *FHIT* transfection이 paclitaxel이나 cisplatin에 의해 유발되는 apoptosis에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. *FHIT*가 transfected된 세포와 그렇지 않은 세포에 각각 paclitaxel 0-5 μ g/ml 혹은 cisplatin 0-30 μ g/ml을 가하고, 48-72시간 후 세포 생존율을 분석하여 비교해 보았다.

6. MTT assay에 의한 세포 생존율의 측정

3-(4, 5-dimethyl thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 96-well plate에 well당 1×10^4 개의 세포를 분주하고 4-5시간 뒤 항암제를 처리하여 정해진 시간 동안 배양하였다. 배양된 세포

에 5 mg/ml의 MTT 용액을 15 μ l 첨가하고 CO₂ incubator에 37°C에서 5시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거한 후 50 μ l의 DMSO를 첨가하여 녹이고 분광광도계를 이용하여 590 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 4개 well의 성적을 분석하였다.

7. DAPI staining

6-well plate에 well당 1×10^6 개의 세포를 분주하고 4-5시간 뒤에 cisplatin을 5 μ g/ml로, paclitaxel을 0.1 μ g/ml로 처리한 뒤 CO₂ incubator에서 37°C로 48시간 동안 배양하였다. 1200 rpm으로 3분간 원심분리를 하여 pellet을 만들고 이 pellet에 methanol 100-200 μ l를 혼합하여 세포를 고정시켰다. 이 상태로 4°C에서 30분 정도 보관한 후 슬라이드에 고정된 세포를 약 1-2방울 떨어뜨리고 건조시켰다. 여기에 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)를 1 μ g/ml 농도로 가한 후 30분 동안 염색하였다. 3번의 세척 후 형광현미경으로 관찰하였다.

8. Annexin V/propidium iodide staining and flow cytometry (FACS)

6-well plate에 well당 1×10^6 개의 세포를 분주하고 4-5시간 뒤에 cisplatin (5 μ g/ml), paclitaxel (0.1 μ g/ml)을 처리한 뒤 CO₂ incubator에서 37°C로 48시간 동안 배양하였다. Trypsin/EDTA를 처리하여 세포를 수확한 후 차가운 phosphate-buffered saline (PBS)으로 세척한 뒤 1X annexin V binding buffer에 세포를 다시 부유 시켰다. 100 μ l의 부유액을 5 ml culture tube에 옮긴 뒤 5 μ l의 annexin V-FITC와 5 μ l의 propidium iodide를 첨가하였다. 세포를 vortex하고 어두운 실온에 15분간 놔둔 뒤 1X annexin V binding buffer 400 μ l를 첨가하여 한 시간 이내에 flow cytometry 분석을 시행하였다.

9. Western blot 분석

RIPA buffer (1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 0.5% Deoxycholic acid, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.5 mM PMSF, 5 μ g/ml Leupeptin, 5 μ g/ml Aprotinin, 1 mM Na_3VO_4 , 3 mM DTT)를 이용하여 총세포 단백을 추출하였다. 50 μ g의 세포 단백을 10% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동시켰다. 1시간 30분 동안 180 mA의 일정한 전

류로 단백질을 nitrocellulose membrane으로 transfer시키고, 이 membrane을 blocking solution (5% skin milk in 1X PBS/Tween20)으로 30분 동안 block 시킨 후 일차 항체와 12시간 동안 반응시켰다. 일차 항체들의 반응 농도는 rabbit polyclonal anti-*FHIT* 항체가 1:500, mouse polyclonal anti-PARP 항체가 1:1000, rabbit polyclonal anti-cleaved caspase-3 (Asp175) 항체가 1:1000, rabbit polyclonal anti-cleaved caspase-7 (Asp178) 항체가 1:1000, mouse monoclonal anti-caspase-8 항체가 1:500, rabbit polyclonal anti-caspase-9 항체가 1:1000, mouse monoclonal anti-Bcl-2 항체가 1:1000, rabbit polyclonal anti-Bcl-xL 항체가 1:500, rabbit polyclonal anti-Bax 항체가 1:500, rabbit polyclonal anti-Bad 항체가 1:200 이었다. 세척 후 이차 항체를 1:2000-1:10000으로 첨가하여 반응시킨 후 면역신호의 검출은 ECL Western blotting detection systemTM을 이용하였다.

10. 통계 분석

농도별 세포 생존율의 차이는 SPSS for Windows Release 11.0 프로그램의 Mann-Whitney U-test를 이용하여 분석하였다.

결 과

1. 항암제 투여에 따른 폐암 세포의 생존율

NCI-H358 폐암 세포주에 cisplatin을 72시간 동안, paclitaxel을 48시간 동안 농도별로 투여하고 세포의 생존율을 MTT assay로 조사하였다. Cisplatin을 0-30 μ g/ml 농도까지, paclitaxel을 0-5 μ g/ml 농도까지 투여하였을 때, 농도를 증가시킴에 따라 세포의 생존율은 지속적으로 감소함을 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

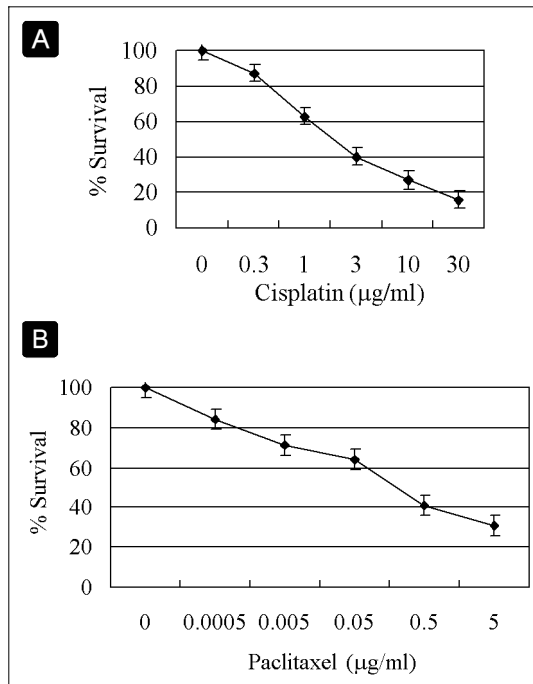


Fig. 1. Cisplatin and paclitaxel decrease cell survival in lung cancer cells. (A) Dose-dependent effect of cisplatin on the cell survival. NCI-H358 cells were incubated with 0, 0.3, 1, 3, 10, 30 μ g/ml of cisplatin for 72 hours. (B) Dose-dependent effect of paclitaxel on the cell survival. NCI-H358 cells were incubated with 0, 0.0005, 0.005, 0.05, 0.5, 5 μ g/ml of paclitaxel for 48 hours. Cell viability was assayed by MTT assay. Data are shown as mean percentage of control \pm standard deviation.

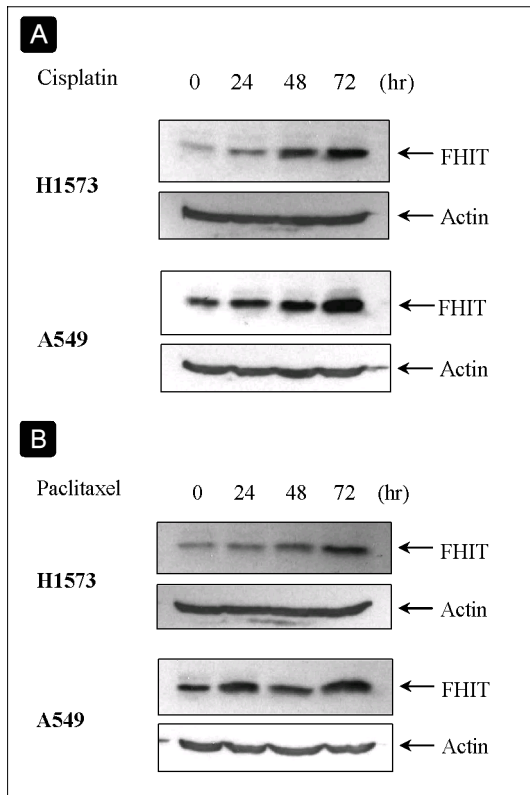


Fig. 2. Expression of *FHIT* increases during cell death induced by cisplatin or paclitaxel. (A) NCI-H1573 and A549 cells were treated with cisplatin (3 μ g/ml) for the indicated times. (B) NCI-H1573 and A549 cells were incubated with paclitaxel (0.1 μ g/ml) for the indicated times. Total cellular extracts were separated by 10% SDS-PAGE and *FHIT* was detected by Western blot analysis.

2. 항암제 투여시 발생하는 세포 사멸에서 *FHIT* 단백질의 발현 증가

항암제를 투여하였을 때 나타나는 세포 사멸 과정 중 혹시 *FHIT* 단백질의 발현에 어떠한 변화가 나타나는지를 알아보기 위해, *FHIT*가 결손되지 않은 세포주인 NCI-H1573과 A549 세포주에 항암제를 투여하고 *FHIT* 발현을 Western blotting으로 관찰

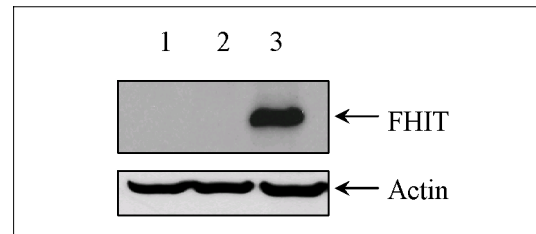


Fig. 3. Western blot analysis showing *FHIT* expression in stably transfected NCI-H358 cells. Signals due to anti-*FHIT*, anti- β -actin antibody used as a protein loading control are indicated. Lanes 1, untransfected; 2, transfected with pRc/CMV plasmid; 3, transfected with recombinant pRc/CMV-*FHIT*.

하였다(Fig. 2). 먼저 cisplatin 3 μ g/ml을 투여하고 시간별로 관찰하였을 때 NCI-H1573과 A549 세포 모두에서 시간 경과에 따른 *FHIT* 단백질의 발현 증가를 관찰할 수 있었다. Paclitaxel 0.1 μ g/ml을 투여하고 관찰하였을 때도 같은 결과를 얻을 수 있었다. 이러한 소견은 항암제에 의한 세포 사멸 과정에 *FHIT*가 관여할 수도 있음을 시사하고 있다.

3. 폐암 세포주에 *FHIT* 유전자를 stable transfection 시킨 후 세포 생존율의 관찰

FHIT 유전자의 발현이 항암제에 의한 세포의 사멸에 미치는 영향을 알아보기 위해 *FHIT*가 결손된 폐암 세포주인 NCI-H358 세포에 *FHIT* 유전자를 stable transfection 시킨 후 항암제에 대한 반응의 변화를 살펴보고자 하였다. *FHIT* 유전자를 삽입한 plasmid인 pRc/CMV-*FHIT*를 transfection 시켰을 때, transfection을 시키지 않은 세포나 *FHIT* 유전자를 삽입하지 않은 plasmid인 pRc/CMV를 transfection 시킨 세포에서는 관찰되지 않는 *FHIT* 단백질의 발현을 확인 할 수 있었다(Fig. 3). 이렇게 *FHIT*가 stable transfection된 세포에서 항암제를 투여하기 전 기저 상태에서 생

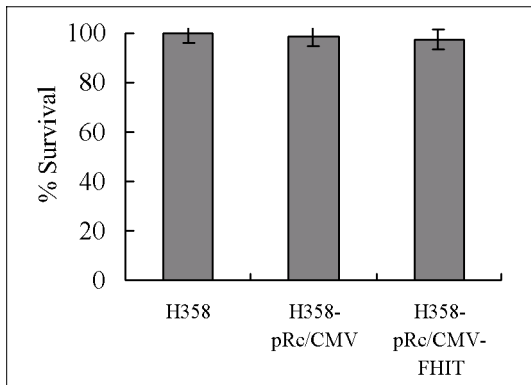


Fig. 4. The effects of pRc/CMV-FHIT stable transfection on the growth of NCI-H358 cells. The stable transfection of pRc/CMV-FHIT shows no significant effect on the cell growth in NCI-H358 cells, as compared with untransfected and pRc/CMV transfected cells.

존율에 차이가 있는지를 MTT assay로 분석해 보았다. Transfection을 시키지 않은 NCI-H358 세포의 생존율을 100%로 하였을 때 *FHIT* 유전자를 삽입하지 않은 plasmid인 pRc/CMV를 transfection시킨 세포 (H358-pRc/CMV)와 *FHIT* 유전자를 삽입한 plasmid인 pRc/CMV-*FHIT*를 transfection시킨 세포 (H358-pRc/CMV-*FHIT*)에서 모두 차이를 보이지 않았다(Fig. 4).

4. *FHIT* 유전자가 stable transfection된 세포에서 항암제 투여에 의한 apoptosis의 변화

위의 H358, H358-pRc/CMV, H358-pRc/CMV-*FHIT* 세 가지 세포에 각각 항암제를 가하고 이때 발생하는 apoptosis에 차이가 나타나는가를 조사해 보았다. Cisplatin을 0-30 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 72 시간 동안 투여하였을 때 H358-pRc/CMV-*FHIT* 세포는 나머지 두 세포에 비해 통계적으로 유의하게 생존율이 감소하였다 ($p < 0.05$). 예를 들어 cisplatin 농도 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 H358은 61%, H358-pRc/CMV

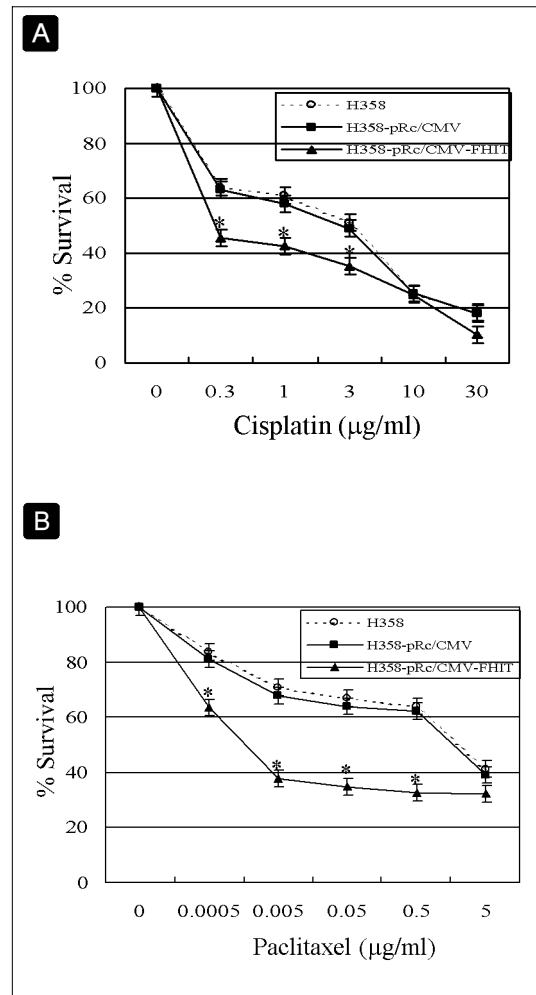


Fig. 5. Transfection of *FHIT* gene increases the cell death induced by cisplatin and paclitaxel. **(A)** Cells were treated with 0, 0.3, 1, 3, 10, 30 $\mu\text{g/ml}$ of cisplatin for 72 hours. In NCI-H358, pRc/CMV-*FHIT* transfection enhanced the decrease of cell survival as compared with control cells. **(B)** Cells were incubated with 0, 0.0005, 0.005, 0.05, 0.5, 5 $\mu\text{g/ml}$ of paclitaxel for 48 hours. In NCI-H358, pRc/CMV-*FHIT* transfection enhanced the decrease of cell survival as compared with control cells. Cell viability was assayed by MTT assay. Data are shown as mean percentage of control \pm standard deviation. *: $p < 0.05$ compared to control.

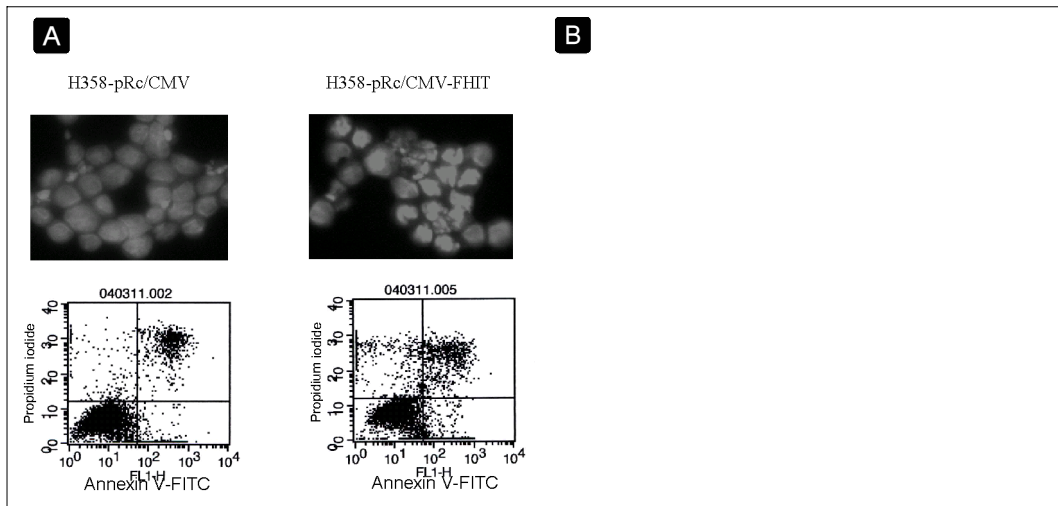


Fig. 6. Cisplatin and paclitaxel induce markedly increased apoptosis in cells transfected with *FHIT* gene. H358-pRc/CMV and H358-pRc/CMV-*FHIT* cells were treated with 3 μ g/ml of cisplatin for 48 hours (**A**) or with 0.1 μ g/ml of paclitaxel for 24 hours (**B**). Apoptosis was analysed by DAPI staining and FACS analysis by using both annexin V and propidium iodide. Comparison of fluorescent staining profiles of H358-pRc/CMV with that of H358-pRc/CMV-*FHIT* cells indicated a higher percentage of apoptotic H358-pRc/CMV-*FHIT* with condensed and fragmented nuclei. The apoptotic rate of H358-pRc/CMV-*FHIT* and H358-pRc/CMV cells was 23.4% and 12.7% respectively after cisplatin treatment, and 58.1% and 7.8% respectively after paclitaxel treatment.

는 58%의 생존율을 보인 반면, H358-pRc/CMV-*FHIT* 세포는 43%로 생존율이 뚜렷이 낮게 나타났다. 이러한 현상은 paclitaxel을 투여하였을 때 더욱 뚜렷이 나타났다. Paclitaxel 농도 0.05 μ g/ml에서 각각 H358은 67%, H358-pRc/CMV는 64%, H358-pRc/CMV-*FHIT* 세포는 35%의 생존율을 보였고, IC₅₀는 H358이 1.7 μ g/ml, H358-pRc/CMV가 1.4 μ g/ml, H358-pRc/CMV-*FHIT*가 현저히 낮은 0.002 μ g/ml 였다(Fig. 5). 이러한 세포 생존율의 감소가 apoptosis에 기인한 것인지를 확인하기 위해 H358-pRc/CMV 세포와 H358-pRc/CMV-*FHIT* 세포에 항암제를 투여한 후 DAPI staining과 FACS 분석을 시행하였다. Cisplatin을 투여하고 48시간 후 관찰하였을 때, H358-pRc/CMV-*FHIT* 세포는 H358-pRc/CMV 세포에 비해 DAPI staining상 apoptosis가 유의하게 증가되어

있었으며 FACS 결과에서도 apoptosis 분획이 증가되어 있음을 확인할 수 있었다 (각각 23.4%, 12.7%). Paclitaxel을 투여하고 24시간 후에 관찰하였을 때도 같은 현상을 관찰할 수 있었는데 FACS 분석상 apoptosis 분획은 각각 58.1%와 7.8%로 더욱 큰 차이를 보였다(Fig. 6). 한편, apoptosis의 특징적 소견인 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)의 분해를 시간 경과에 따라 Western blotting으로 조사해 보았다. H358-pRc/CMV와 H358-pRc/CMV-*FHIT* 세포에 3 μ g/ml의 cisplatin 혹은 0.1 μ g/ml의 paclitaxel을 투여하고 48시간까지 PARP의 분해를 관찰하였을 때, PARP의 분해시 나타나는 86 kDa 분절은 48시간째에 나타났는데 band의 density를 비교해 보았을 때 H358-pRc/CMV-*FHIT* 세포에서 훨씬 뚜렷이 나타남이 확인되었고(Fig. 7), 이는 MTT assay 결과와 같은 양상이라고 할 수 있다.

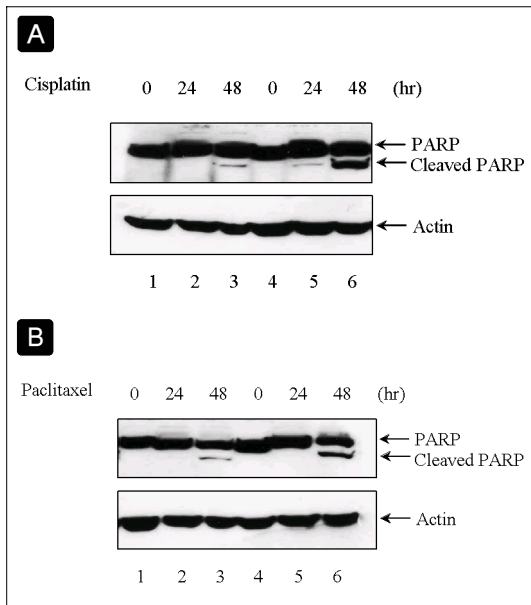


Fig. 7. Cisplatin and paclitaxel induce markedly increased poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in cells transfected with *FHIT* gene. H358-pRc/CMV (Lanes 1, 2, and 3) and H358-pRc/CMV-*FHIT* cells (Lanes 4, 5, and 6) were treated with 3 μ g/ml of cisplatin for 0, 24, and 48 hours (A) or with 0.1 μ g/ml of paclitaxel for 0, 24, and 48 hours (B). Total cellular extracts were separated by 10% SDS-PAGE and PARP was detected by Western blot analysis.

이상의 결과는 cisplatin이나 paclitaxel 투여에 의한 세포 생존율의 감소는 apoptosis에 의하며, *FHIT*가 발현된 세포에서는 그렇지 않은 세포에 비해 항암제에 의한 apoptosis가 증가함을 보여주고 있다.

5. *FHIT* 유전자가 transfection된 세포에서 caspase system의 변화

활성화된 caspase에 의한 단백 분해는 apoptosis에서 관찰되는 특징적인 소견으로서, DNA의 분절화

와 함께 세포 사멸 과정을 비가역적인 과정이 되게 한다. 위에서 관찰된 *FHIT* 단백질 발현에 의해 유발되는 apoptosis의 증가 과정에 caspase system이 관여하는지를 평가하기 위하여 H358-pRc/CMV 세포와 H358-pRc/CMV-*FHIT* 세포에 paclitaxel을 투여한 후 caspase-3, -7, -8, -9의 활성을 Western blot 분석으로 조사하였다(Fig. 8). 32 kDa의 caspase-3는 12 kDa 분절로 분해되어 활성화됨이 알려져 있다. 0.1 μ g/ml의 paclitaxel을 투여하고 0, 24, 48, 72 시간 후에 cleaved caspase-3를 관찰하였을 때, H358-pRc/CMV, H358-pRc/CMV-*FHIT* 세포 모두에서 48시간째에 cleaved caspase-3의 발현이 나타났으나 H358-pRc/CMV-*FHIT*에서 훨씬 강하게 발현되었다. Cleaved caspase-7 (20 kDa)에 있어서도 같은 소견을 관찰할 수 있었다. 하지만 caspase-8, -9에 있어서는 두 세포간에 차이를 관찰할 수 없었다. 나아가 이러한 caspase-3, -7 활성화의 증가가 apoptosis의 증가와 직접 관련되어 있는지를 확인하기 위하여, pan-caspase inhibitor인 Z-VAD-FMK를 10 μ M로 1시간동안 전처리한 후 paclitaxel을 투여하고 PARP의 분해와 세포 생존율의 변화를 관찰해 보았다(Fig. 9). H358-pRc/CMV, H358-pRc/CMV-*FHIT* 세포 모두에서 paclitaxel 투여 48시간째에 관찰되던 PARP의 분해가 Z-VAD-FMK의 투여에 의해 소실됨이 확인되었다(Fig. 9A). MTT 분석 결과를 살펴보면 Z-VAD-FMK를 투여했을 때 H358-pRc/CMV, H358-pRc/CMV-*FHIT* 세포 모두에서 생존율이 증가되었는데 paclitaxel만을 투여했을 때 관찰되던 두 세포간의 유의한 차이가 소실된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 9B). 이 결과는 NCI-H358 세포에서 *FHIT* 단백질 발현에 의해 항암제 투여 후 나타나는 apoptosis가 증가되는 경로에 caspase-3과 caspase-7의 활성화가 관련되어 있음을 보여주는 소견이라 할 수 있다.

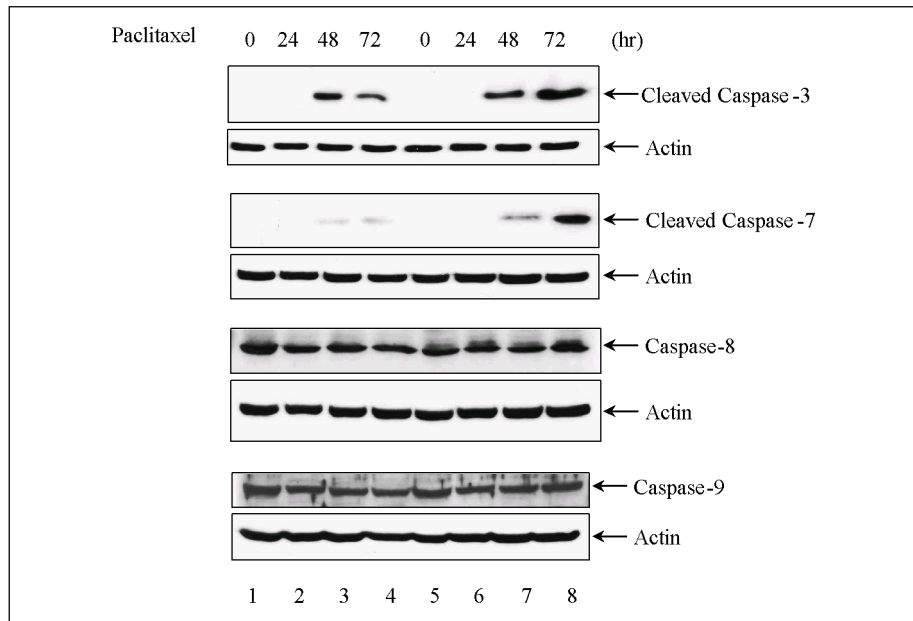


Fig. 8. Modulation of caspases in cells transfected with pRc/CMV-FHIT. Restored FHIT expression induces markedly increased activation of caspase-3 and -7. On the contrary, caspase-8 and -9 expression is not significantly affected by exogenous FHIT expression. H358-pRc/CMV (Lanes 1, 2, 3, and 4) and H358-pRc/CMV-FHIT cells (Lanes 5, 6, 7, and 8) were treated with 0.1 μ g/ml of paclitaxel for 0, 24, 48, and 72 hours. Total cellular extracts were separated by 10% SDS-PAGE and caspases were detected by Western blot analysis.

6. *FHIT* 유전자가 stable transfection된 세포에서 Bcl-2 family의 변화

한편, *FHIT* 단백질 발현에 의해 유발되는 apoptosis의 증가 과정에 Bcl-2 family가 관여하는지를 평가하기 위하여 H358-pRc/CMV 세포와 H358-pRc/CMV-FHIT 세포에 paclitaxel을 투여한 후 Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Bad의 활성을 Western blot 분석으로 조사하였다(Fig. 10). Bcl-2 family는 미토콘드리아의 투과성과 cytochrome c의 분비를 조절함으로써 apoptosis를 제어함이 잘 알려져 있다. 여기에는 apoptosis를 억제하는 단백질과 항진시키는 단백질이 모두 포함되어 있는데, Bcl-2, Bcl-xL 등은 미토콘드리아의 외벽에 존재하면서 cytochrome c의 분비를 막아 apoptosis를 억제하며,

Bax, Bad 등은 세포질 내에 존재하다가 사멸 신호가 전달되면 미토콘드리아로 이동하여 cytochrome c의 분비를 촉진함으로써 apoptosis를 항진시키게 된다. H358-pRc/CMV, H358-pRc/CMV-FHIT 두 세포에 0.1 μ g/ml의 paclitaxel을 투여하고 0, 48 시간 후에 관찰하였을 때, H358-pRc/CMV-FHIT 세포에서는 paclitaxel을 투여하고 48 시간 후 H358-pRc/CMV 세포에 비해 Bcl-2와 Bcl-xL는 유의하게 감소하고 Bax와 Bad는 유의하게 증가함을 관찰할 수 있었다. 즉, apoptosis 억제 단백질의 감소와 apoptosis 유발 단백질의 증가를 관찰할 수 있었다. 이 결과는 NCI-H358 세포에서 *FHIT* 단백질 발현에 의해 유발되는 항암제 투여 후 apoptosis의 증가 과정이 미토콘드리아 의존성 기전에 의한 것임을 시사하는 소견이라 할 수 있다.

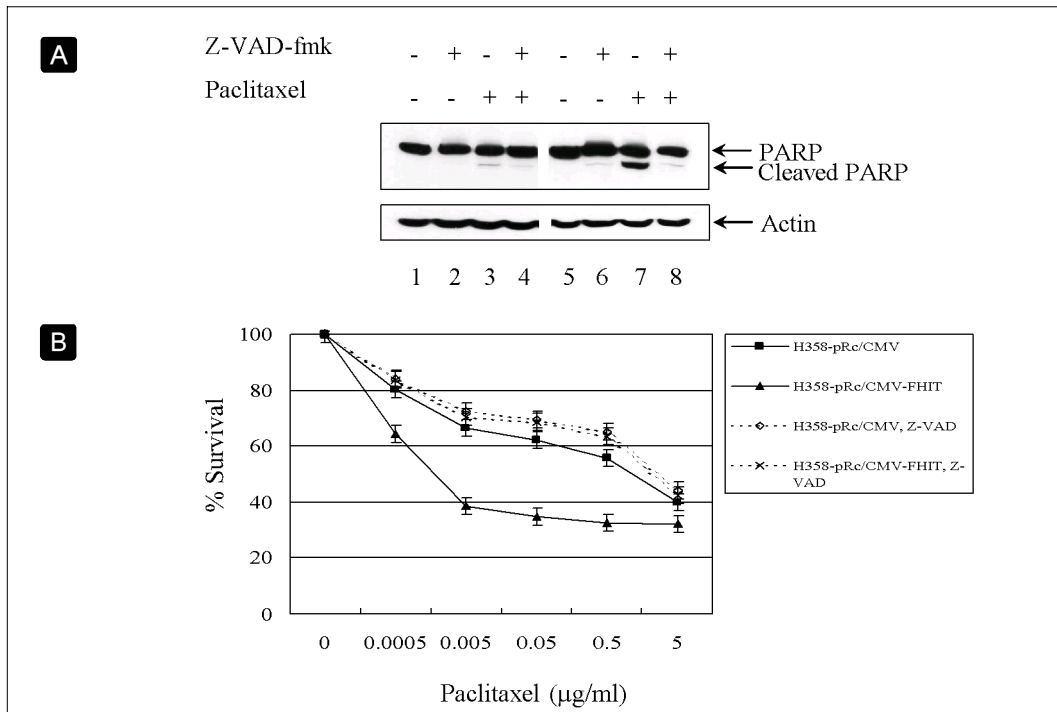


Fig. 9. Z-VAD-FMK prevents enhanced apoptosis induced by paclitaxel in *FHIT*-transfected cells. **(A)** H358-pRc/CMV (Lanes 1, 2, 3, and 4) and H358-pRc/CMV-FHIT cells (Lanes 5, 6, 7, and 8) were treated with 0.1 μg/ml of paclitaxel for 48 hours with or without Z-VAD-FMK preincubation (10 μM). Total cellular extracts were separated by 10% SDS-PAGE and PARP was detected by Western blot analysis. **(B)** Cells were incubated with 0, 0.0005, 0.005, 0.05, 0.5, 5 μg/ml of paclitaxel for 48 hours with or without Z-VAD-FMK preincubation (10 μM). Z-VAD-FMK significantly inhibited paclitaxel-induced cell death in both H358-pRc/CMV and H358-pRc/CMV-FHIT cells and prevented enhanced apoptosis in *FHIT*-transfected cells. Cell viability was assayed by MTT assay. Data are shown as mean percentage of control ± standard deviation.

고 찰

일부 연구에 의하면 *FHIT* 유전자를 폐암 세포 내에 이입시키고 그 변화를 관찰하였을 때 apoptosis가 유발되었으며, 세포 주기 분석에서도 이상 소견이 관찰되었다²³⁻²⁵. 나아가 nude mice에서 폐암세포주의 종양형성 능력이 억제됨도 관찰되었다^{24,25}. 하지만 아직까지 *FHIT* 단백질이 세포내에서 어떠한 경로를 거쳐 apoptosis를 유발하는지에 대한 지식은 매우 부족한 상태이다. 현재까지 보고된 몇몇

apoptosis 관련 단백질들에 대한 연구 결과를 보면 caspase system의 활성화가 관련되어 있음이 알려지고 있다. Adenoviral vector를 이용하여 *FHIT* 유전자를 transduction시켰을 때, 식도암 세포에서는 caspase-8, -9이²⁶, 췌장암 세포에서는 caspase-3, -8, -9이²⁷, 폐암세포에서는 caspase-8이²⁵, 유방암 세포에서는 caspase-2, -9이 활성화 되었다²⁸.

본 연구에서도 caspase system의 활성화를 관찰할 수 있었다. *FHIT*가 발현된 세포에서는 PARP의 바로 위 단계에 있는 caspase-7과 그 위 단계

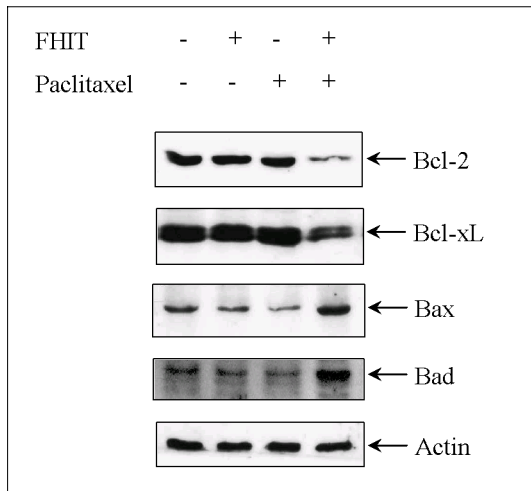


Fig. 10. Activation of proapoptotic proteins and inactivation of anti-apoptotic proteins of Bcl-2 family in cells transfected with pRc/CMV-FHIT. H358-pRc/CMV ('FHIT (-)') and H358-pRc/CMV-FHIT cells ('FHIT (+)') were treated with 0.1 μ g/ml of paclitaxel for 0 ('paclitaxel (-)') and 48 hours ('paclitaxel (+)'). Total cellular extracts were separated by 10% SDS-PAGE and caspases were detected by Western blot analysis.

의 caspase-3 활성도가 유의하게 증가되는 것이 관찰되었다. 하지만 그 보다 위 단계에 있는 caspase-8, -9의 차이는 관찰할 수 없었다. 또한, 이러한 caspase 활성도가 apoptosis 유발에 직접적으로 관련되어 있음을 Z-VAD-FMK를 이용한 억제 실험으로 확인하였다. 폐암 세포에 대한 기존의 연구에서는 caspase-8의 활성화만이 관찰되었으나²⁵, 이는 NCI-H460 세포에 대한 실험 결과로서 본 연구와는 차이를 보이는 것으로 생각된다.

한편, 본 연구에서는 기존에 발표된 연구 결과에서는 확실치 않았던 Bcl-2 family의 활성화가 *FHIT* 단백질이 발현된 세포에서 관찰되었다. 본 실험 결과를 보면, *FHIT*가 발현된 세포에서는 apoptosis 억제 단백질인 Bcl-2, Bcl-xL의 활성이

감소하고 apoptosis 유발 단백질인 Bax, Bad의 활성은 증가함이 관찰되어 apoptosis를 유발하는 방향으로 변화되어 있음을 알 수 있다. *FHIT* 발현에 의한 apoptosis 과정에 미토콘드리아가 관련되어 있을 가능성을 시사하는 소견들이 발표된 바 있는데, 췌장암 세포에서 미토콘드리아에 대한 형광 염색을 시행하였을 때 *FHIT*가 발현된 세포에서는 정상 세포에 비해 미토콘드리아의 형광 염색이 변화되어 관찰되었고²⁷, 위암 세포에서 미토콘드리아 내막 전위 (inner mitochondrial transmembrane potential)을 synchronous luminescence spectroscopy를 이용하여 측정하였을 때, *FHIT*가 발현된 세포에서는 정상 세포에 비해 막전위가 파괴되어 관찰되었다는 보고가 있다²⁹.

본 연구의 제한점은 *FHIT* 발현에 상대적으로 resistant한 폐암 세포를 대상으로 한 연구라는 점이다. NCI-H358 세포에 *FHIT* 유전자를 stable transfection 시킨 후 시행한 실험이므로, selection 과정에서 *FHIT* 발현 자체에 의해 apoptosis가 일어난 세포, 즉 *FHIT* 발현에 상대적으로 sensitive한 세포는 이미 제거되었을 것이다. 따라서 이러한 세포에 대해서도 결과를 얻기 위해 transient transfection을 시키고 실험을 진행하였으나, transfection 효율이 충분하지 못하여 결과를 얻을 수 없었다. 따라서 이러한 세포군에 대한 연구를 위해서는 향후 효율이 높은 viral vector를 이용한 실험이나 inducible promotor를 가진 plasmid vector를 이용한 실험이 필요할 것으로 생각된다. 또한, *FHIT* 유전자를 transfection 시킨 후 관찰된 이상의 실험 결과들이 *FHIT* 발현과 직접적인 관련이 있는지를 확인하기 위한 *FHIT*의 억제 실험들이 뒤따라야 할 것이다.

유력한 폐암억제유전자인 *FHIT*가 apoptosis를 유발하는 기전을 규명한다면, 이에 대한 이해를 바탕으로 유전자 치료 등의 새로운 치료 방법의 소재로서 중요한 기여를 할 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

연구배경 :

FHIT 유전자의 homozygous deletion과 이와 관련된 mRNA 발현 이상, 단백질의 발현 결손은 폐암에서 매우 높은 빈도로 관찰되고 있다. 일부 연구에 의하면 *FHIT* 유전자를 폐암 세포 내에 이입시켰을 때 apoptosis가 유발되었고, 세포 주기의 이상 소견이 관찰되었으며, 종양형성 능력이 억제됨이 관찰되었다. 하지만 아직까지 *FHIT* 단백질의 기능에 대한 지식은 미진한 상태이다. 본 연구에서는 *FHIT* 유전자를 폐암 세포에 이입시켰을 때 유발되는 apoptosis의 기전을 규명하고자 하였다.

방 법 :

FHIT 유전자가 결손된 NCI-H358 세포주에 *FHIT* 유전자를 stable transfection 시킨 후, cisplatin 혹은 paclitaxel을 가하고 apoptosis가 항진되어 나타나는가를 DAPI staining과 flow cytometry로 관찰해 보았다. 또한 이 과정에서 나타나는 caspase system의 변화와 Bcl-2 family의 변화를 Western blotting으로 조사해 보았다.

결 과 :

*FHIT*를 발현시킨 세포에서는 cisplatin 혹은 paclitaxel을 투여하였을 때 유의하게 생존율이 감소하였으며, 이는 apoptosis 증가에 의한 것으로 확인되었다. 이 과정에서 *FHIT*가 발현된 세포는 caspase-3, caspase-7의 활성화가 유의하게 증가되었으며, Bcl-2와 Bcl-xL 발현은 유의하게 감소하고 Bax와 Bad 발현은 유의하게 증가하였다.

결 론 :

*FHIT*가 발현된 폐암 세포에 항암제를 투여하였을 때 유의하게 증가한 apoptosis는 caspase system과 Bcl-2 family의 활성화와 관련되어 있다.

참 고 문 헌

1. Brauch H, Johnson B, Hovis J, Yano T, Gazdar A, Pettengill OS, Graziano S, Sorensen GD, Poiesz BJ, Minna J, Linehan N, Zbar B. Molecular analysis of the short arm of chromosome 3 in small-cell and non-small-cell carcinoma of the lung. *N Engl J Med* 1987;317:1109-13.
2. Naylor SL, Johnson BE, Minna JD, Sakaguchi AY. Loss of heterozygosity of chromosome 3p markers in small-cell lung cancer. *Nature(London)* 1987;329:451-4.
3. Yokota J, Wada M, Shimosato Y, Terada M, Sugimura T. Loss of heterozygosity on chromosome 3, 13, 17 in small cell carcinoma and on chromosome 3 in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:9252-6.
4. Hibi K, Takahashi T, Yamakawa K, Ueda R, Sekido Y, Ariyoshi Y, Suyama M, Takagi H, Nakamura Y, Takahashi T. Three distinct regions involved in 3p deletions in human lung cancer. *Oncogene* 1992;7:445-9.
5. Sundaresan V, Ganly P, Hasleton P, Rudd R, Sinha G, Bleehen NM, Rabbitts P. p53 and chromosome 3 abnormalities, characteristic of malignant lung tumors, are detectable in preinvasive lesions of the bronchus. *Oncogene* 1992;7:1989-97.
6. Hung J, Kishimoto Y, Sugio K, Virmani A, McIntire DD, Minna JD, Gazdar AF. Allele-specific chromosome 3p deletions occur at an early stage in the pathogenesis of lung carcinoma. *J Am Med Assoc* 1995;273:558-63.
7. Killary AM, Wolf ME, Giambernardi TA, Naylor SL. Definition of a tumor suppressor locus within human chromosome 3p21-p22. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:10877-81.
8. Daly MC, Xiang RH, Buchhagen D, Hensel

- CH, Garcia DK, Killary AM, Minna JD, Naylor SL. A homozygous deletion on chromosome 3 in a small cell lung cancer cell line correlates with a region of tumor suppressor activity. *Oncogene* 1993;8:1721-9.
9. Kok K, Hosfra R, Pilz A, van den Berg A, Terpstra P, Buys CH, Carrit B. A gene in the chromosomal region 3p21 with greatly reduced expression in lung cancer is similar to the gene for ubiquitin activation enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:6071-5.
10. Sekido Y, Bader S, Latif F, Gnarra JR, Gazdar AF, Linehan M, Zbar B, Lerman MI, Minna JD. Molecular analysis of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene in human lung cancer cell lines. *Oncogene* 1994;9:1599-604.
11. Ohta M, Inoue H, Coticelli MG, Kastury K, Baffa R, Palazzo J, Siprashvili Z, Mori M, McCue P, Druck T, Croce CM, Huebner K. The *FHIT* gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* 1996;84:587-97.
12. Kastury K, Baffa R, Druck T, Ohta M, Coticelli MG, Inoue H, Negrini M, Rugge M, Huang D, Croce CM, Palazzo J, Huebner K. Potential gastrointestinal tumor suppressor locus at the 3p14.2 FRA3B site identified by homozygous deletions in tumor cell lines. *Cancer Res* 1996;56:978-83.
13. Sozzi G, Alder H, Torielli S, Corletto V, Baffa R, Veronese ML, Negrini M, Pilotti S, Pierotti MA, Huebner K, Croce CM. Aberrant *FHIT* transcripts in Merkel cell carcinoma. *Cancer Res* 1996;56:2472-4.
14. Negrini M, Monaco C, Vorechovsky I, Ohta M, Druck T, Baffa R, Huebner K, Croce CM. The *FHIT* gene at 3p14.2 is abnormal in breast carcinomas. *Cancer Res* 1996;56:3173-9.
15. Virgilio L, Shuster M, Gollin SM, Veronese ML, Ohta M, Huebner K, Croce CM. *FHIT* gene alterations in head and neck squamous cell carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9770-5.
16. Smeets DF, Scheres JM, Hustinx TW. The most common fragile site in man is 3p14. *Hum Genet* 1986;72:215-20.
17. Huang Y, Garrison PN, Barnes LD. Cloning of the *Schizosaccharomyces pombe* gene encoding diadenosine 5'5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate (Ap₄A) asymmetrical hydrolase: sequence similarity with histidine triad (HIT) family. *Biochem J* 1995;312:925-32.
18. Barnes LD, Garrison PN, Siprashvili Z, Guranowski A, Robinson AK, Ingram SW, Croce CM, Ohta M, Huebner K. Fhit, a putative tumor suppressor in humans, is a dinucleoside 5', 5'''-P₁P₃ triphosphate hydrolase. *Biochemistry* 1996;35:11529-35.
19. Sozzi G, Veronese ML, Negrini M, Baffa R, Coticelli MG, Inoue H, Torielli S, Pilotti S, Gregorio LD, Pastorino U, Pierotti MA, Ohta M, Huebner K, Croce CM. The *FHIT* gene at 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell* 1996;85:17-26.
20. Yanagisawa K, Kondo M, Osada H, Uchida K, Takagi K, Masuda A, Takahashi T, Takahashi T. Molecular analysis of the *FHIT* gene at 3p14.2 in lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1996;56:5579-82.
21. Fong KM, Biesterveld EJ, Virmani A,

- Wistuba I, Sekido Y, Bader SA, Ahmadian M, Ong ST, Rassool FV, Zimmerman PV, Giaccone G, Gazdar AF, Minna JD. *FHIT* and FRA3B 3p14.2 allele loss are common in lung cancer and preneoplastic bronchial lesions and are associated with cancer-related *FHIT* cDNA splicing aberrations. *Cancer Res* 1997;57:2256-67.
22. Sozzi G, Tornielli S, Tagliabue E. Absence of Fhit protein in primary lung tumors and cell lines with FHIT gene abnormalities. *Cancer Res* 1997;57:5207-12.
23. Sard L, Accornero P, Tornielli S, Delia D, Bunone G, Campiglio M, Colombo MP, Gramegna M, Croce CM. The tumor-suppressor gene *FHIT* is involved in the regulation of apoptosis and in cell cycle control. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8489-92.
24. Ji L, Fang B, Yen N, Fong K, Minna JD, Roth JA. Induction of apoptosis and inhibition of tumorigenicity and tumor growth by adenovirus vector-mediated fragile histidine triad (*FHIT*) gene overexpression. *Cancer Res* 1999;59:3333-9.
25. Roz L, Gramegna M, Ishii H, Croce CM, Sozzi G. Restoration of fragile histidine triad (*FHIT*) expression induces apoptosis and suppresses tumorigenicity in lung and cervical cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:3615-20.
26. Ishii H, Dumon KR, Vecchione A, Trapasso F, Mimori K, Alder H, Mori M, Sozzi G, Baffa R, Huebner K, Croce CM. Effect of adenoviral transduction of the *fragile histidine triad* gene into esophageal cancer cells. *Cancer Res* 2001;61:1578-84.
27. Dumon KR, Ishii H, Vecchione A, Trapasso F, Baldassarre G, Chakrani F, Druck T, Rosato EF, Williams NN, Baffa R, During MJ, Huebner K, Croce CM. Fragile histidine triad expression delays tumor development and induces apoptosis in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 2001;61:4827-36.
28. Sevignani C, Calin GA, Cesari R, Sarti M, Ishii H, Yendamuri S, Vecchione A, Trapasso F, Croce CM. Restoration of *fragile histidine triad (FHIT)* expression induces apoptosis and suppresses tumorigenicity in breast cancer cell lines. *Cancer Res* 2003;63:1183-7.
29. Askari MD, Vo-Dinh T. Implication of mitochondrial involvement in apoptotic activity of fragile histidine triad gene: application of synchronous luminescence spectroscopy. *Biopolymers* 2004;73:510-23.