

비소세포 폐암세포에서 Uteroglobin의 이입에 의한 cPLA2와 COX-2 발현 및 ERK 활성의 변화

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 의학연구원 폐연구소

김우진, 윤정민, 이경희, 한선진, 신원혁, 임재준,
유철규, 이춘택, 한성구, 심영수, 김영환

=Abstract=

The Effect of Uteroglobin on cPLA2, COX-2 Expression and ERK Activation in NSCLC Cells

Woo Jin Kim, M.D., Jung Min Yoon, Kyoung Hee Lee, Seon Jin Han,
Won Hyuk Shin, M.D., Jae-Joon Yim, M.D., Chul-Gyu Yoo, M.D.,
Choon Taek Lee, M.D., Sung Koo Han, M.D.,
Young-Soo Shim, M.D., and Young Whan Kim, M.D.

Department of Internal Medicine and Lung Institute of Medical Research Center,
Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Uteroglobin is a protein produced by the normal bronchial epithelium and its expression level is lower in non-small cell lung cancer tissues and cell lines. It mainly functions as an anti-inflammatory, and when it is overexpressed in cancer cells, the neoplastic phenotype is antagonized. cPLA2 and COX-2, which are also associated with inflammation, were reported to be related to cancer. The relationship between cPLA2, COX-2 and uteroglobin is unclear. The relationship between uteroglobin and ERK, which is related to cell growth, is also not unclear. This study investigated the changes in the cPLA2 and COX-2 expression levels and the ERK activities after the overexpression of uteroglobin in non-small cell lung cancer cell lines.

Methods : The A549 and NCI-H460 cell lines were infected by adenovirus-null and adenovirus-uteroglobin. The cChange in the cPLA2, COX-2 expression level and ERK activity after uteroglobin overexpression was measured by Western blot. The change in MMP activity was measured by zymography.

이 논문은 서울대학교병원 일반연구비(04-2002-018) 지원에 의해 이루어진 것임

Address for correspondence:

Young Whan Kim, M.D.

Department of Internal Medicine and Lung Institute of Medical Research Center,
Seoul National University College of Medicine, and Clinical Research Institute,
Seoul National University Hospital, 28 Yongon-Dong, Chongno-Gu, Seoul 110-744, Korea
Phone : +82-2-760-2856 Fax : +82-2-762-9662 E-mail : ywkim@snu.ac.kr

Results : Western blot revealed decreased expression levels of cPLA2, and COX-2, and increased pERK levels in nonsmall cell lung cancer cells after uteroglobin overexpression. Zymography revealed no changes in the MMP-2 activity and lower MMP-9 activity. U0126, which is a specific inhibitor of ERK-activating kinase MEK-1/-2, prevented the decrease in the MMP-9 activity

Conclusions : A decrease in cPLA2 expression, COX-2 expression, MMP-9 activity and a increase in ERK activity may be related to the anticancer effects of uteroglobin in nonsmall cell lung cancer cells. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2004, 56:638-645)

Key words : Uteroglobin, Lung cancer, cPLA2, COX-2, ERK.

서 론

Uteroglobin은 두 개의 70개 아미노산으로 구성된 단백질로 구성되어 있고, 자궁, 폐, 유선, 전립선 등 여러 장기의 점막 세포에서 분비되며, 혈액, 뇨, BAL fluid에서 검출된다. 그 생물학적인 작용은 면역 조절과 항염증작용을 하는 것이 알려져 있는데, 작용기전으로는 sPLA2를 강력하게 억제하는 것으로 알려지고 있으나¹ 폐에서 생리적으로 어떤 기능을 하는지는 아직 정확하게 알려지지 않고 있다.

최근 비소세포폐암 조직이나 세포주에서 uteroglobin의 발현이 현저하게 줄어있다는 보고들이 있고², 또한 암세포에 uteroglobin을 과발현 시키면 암의 형질이 소실되고, 세포 성장이 억제된다는 연구들이 있어³⁻⁵ 암억제 유전자로서의 역할의 가능성을 시사한다. 그러나, 그 기전에 대해서는 아직 잘 밝혀지지 않고 있다.

한편, cPLA2는 인지질에서 arachidonic acid를 생성하는데 중요한 효소로 최근 비소세포폐암과의 연관성에 대한 연구가 보고되고 있다⁶⁻⁸. Uteroglobin이 sPLA2를 억제하는 것은 잘 알려져 있지만, 암과의 관련 가능성이 있는 cPLA2와의 관련성에 대해서는 잘 알려져 있지 않다.

또한, COX-2는 비소세포암의 조직에서 증가되어있고^{9,10}, COX-2를 억제하면 암세포의 세포성장

저하나 세포주 고사에 이른다는 보고들이 있다^{11,12}. 항염증효과가 알려져 있는 uteroglobin을 과발현시켰을 때, 항암효과와 MMP 활성의 저하를 보였고, COX-2를 억제한 경우에도 항암효과와 MMP 활성의 저하가 알려져 있어²¹, 이들이 연관성이 있을 가능성을 시사한다. 또한, COX-2의 암과의 관련성을 설명하는 기전으로 COX-2에 의해 생성된 PGE2가 EGF 수용체를 활성화시키고, 그 결과 ERK의 활성화로 세포성장을 촉진시킨다는 보고가 있다¹³. 또한, 일부에서는 ERK의 지속적인 활성화가 COX-2 억제에 의한 항암효과의 기전으로 제시하고 있다²⁴. 그러나, uteroglobin과 ERK의 활성화에 대해서는 잘 알려져 있지 않다.

저자들은 비소세포폐암 세포주에 uteroglobin을 과발현시킨 후, cPLA2와 COX-2의 발현, 그리고 MMP-2, MMP-9, ERK의 활성화가 어떻게 변화하는지를 Western blot과 zymography로 알아보았다.

대상 및 방법

1. 비소세포 폐암세포주

A549 세포주와 NCI-H460 세포주를 10% FBS과 penicillin/streptomycin이 포함되어있는 RPMI 1640 배양액으로 5% CO₂, 37°C 배양기 속에서 배양하였다.

2. Uteroglobin transduction

비소세포 폐암세포주를 6cm plate에 준비하여, 한 plate의 세포를 detach하여 viable한 세포수를 측정하였다. 측정된 세포수에 따라 폐암세포주가 있는 6cm plate에 adenovirus-null과 adenovirus-uteroglobin을 20moi(multiplicity of infection), 100moi를 넣고 37°C에서 1시간 배양하여 감염시킨 후 complete media를 넣고 48시간동안 배양하였다. Moi는 한 개의 세포 당 감염시키는 아데노바이러스의 플라크 형성단위로 정의하였다.

3. MEK blocking

MEK-1/-2 활성의 inhibitor인 U0126(Promega, USA)을 DMSO로 10mM stock으로 만들어 -70°C에서 보관하였다. 세포주에 U0126을 1,5,10 μ M로 처리하여 그 효과를 관찰하였다.

4. Western blot

비소세포 폐암세포주를 transduction 시키고 48시간 배양한 후, PBS로 세척하고 용해 완충액(0.1% Nonidet P-40, 5mM EDTA, 50mM Tris pH 7.5-8.0, 250mM NaCl, 50mM NaF)을 넣어 용해시켰다. Eppendorf 시험관에 옮겨 넣고 10분간 14000 rpm에서 원심분리하였다. 세포용해질 40 μ g을 SDS-PAGE gel에서 전기영동시킨 후, 단백질을 nitrocellulose membrane으로 transfer하고 skim milk로 1시간동안 block시킨 후 항체와 밤새 반응시켰다. 일차항체로 cPLA2(Cell Signaling technology, USA), Cox-2, MMP-2, MMP-9(Santa Cruz Biotechnology, USA), pERK, ERK(Cell Signaling technology, USA)를 이용하였고, 3회 세척 후 이차항체로 1시간동안 반응시키고 다시 3회 세척하였다. 면역신호의 검출은 ECL Western blotting detection

system(Amersham: Buckinghamshire, England)을 이용하였다.

5. Zymography

비소세포 폐암세포주를 transduction 시키고 48시간 배양한 후 배양액을 농축하였다. 10% zymogram gel(Novex)을 이용하여 전기영동시키고, renaturing buffer와 developing buffer를 이용하여 현상하였고, 효소 활성도를 측정하였다.

결 과

1. Uteroglobin expression

Adenovirus-null로 transduction 시킨 세포주에서는 uteroglobin의 발현을 확인할 수 없었고, adenovirus-uteroglobin으로 transduction 시킨 세포주에서 uteroglobin이 발현되는 것을 Western blot으로 확인하였다(Fig. 1). BAL fluid를 positive control로 이용하였다. 그 발현은 U0126의 처리에는 영향을 받지 않았다.

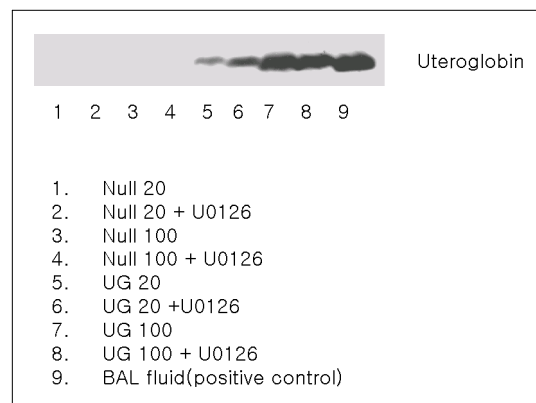


Fig. 1. Uteroglobin expression was not detected in the adenovirus-null transduced cells, and adenovirus-uteroglobin transduced cells expressed uteroglobin.

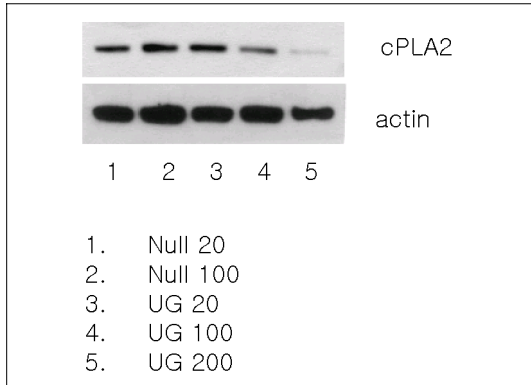


Fig. 2. cPLA2 expression was lower in the uteroglobin-overexpressed lung cancer cells.

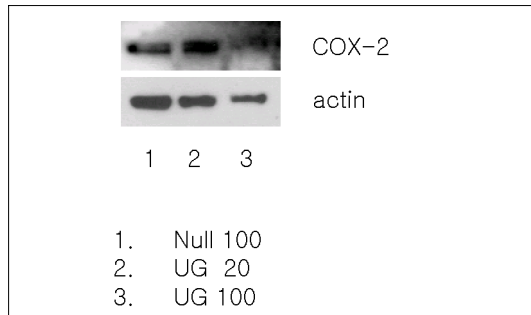


Fig. 3. COX-2 expression was lower in the uteroglobin-overexpressed lung cancer cells.

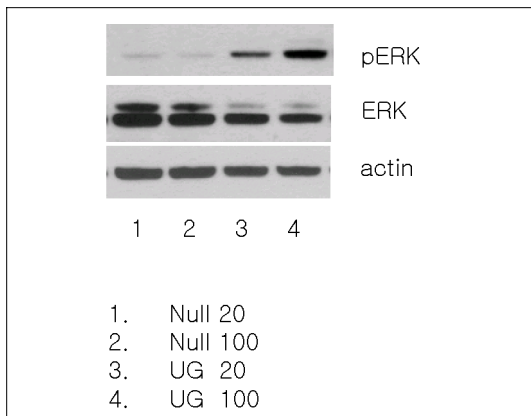


Fig. 4. Western blot revealed increased ERK activation in the uteroglobin-overexpressed lung cancer cells.

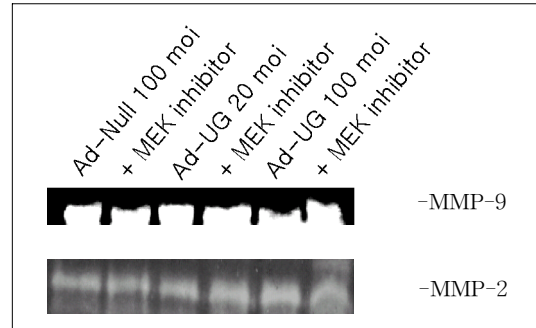


Fig. 5. Analysis of MMP-9, MMP-2 in A549, which were transduced with the Adenovirus-UG, after the cells were treated with or without the MEK inhibitor by gelatin zymography.

2. cPLA2 expression 변화

A549 세포주와 NCI-H460 세포주에서 uteroglobin이 발현된 세포주에서 cPLA2의 발현이 감소함을 Western blot으로 확인하였다(Fig. 2).

3. COX-2 expression 변화

A549 세포주와 NCI-H460 세포주에서 uteroglobin이 발현된 세포주에서 COX-2의 발현이 감소함을 Western blot으로 확인하였다(Fig. 3).

4. ERK activation 변화

A549 세포주와 NCI-H460 세포주에서 uteroglobin이 발현됨에 따라 pERK가 증가함을 Western blot으로 보았고, ERK의 활성화가 증가함을 확인하였다(Fig. 4).

5. MMP-2, MMP-9의 변화 및 U0126의 영향

Zymography 결과 MMP-9은 uteroglobin의 발현을 확인한 세포주에서 감소하였고, MMP-2는 변화가

없었다. MEK inhibitor인 U0126는 농도 5 μ M에서 ERK 활성이 저해되는 것을 확인하였고, U0126 5 μ M 이용하여 ERK의 활성화를 저해시킨 후, uteroglobin의 발현에는 영향이 없었고, MMP-9 활성도가 감소되었던 것이 다시 회복되는 소견을 보였다(Fig. 5).

고 찰

Uteroglobin이 폐암을 억제하는 것으로 알려져 있는데, 그 기전으로 폐암세포주에서 작용은 주로 세포고사보다는 세포 성장을 억제시키는 것으로 보인다¹⁴. Uteroglobin은 사이토카인처럼 수용체를 통하여 작용할 것으로 추정되나, 수용체나 그 자세한 작용기전에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않다. 자궁내막의 선암을 이용한 연구에서 uteroglobin의 잘 알려진 기능인 sPLA2의 억제에 의해 platelet-activating factor가 감소된 것과 암억제 기능과 관련이 있다는 보고된 바 있다¹⁵. 그러나, 이 기전이 uteroglobin의 항암작용을 모두 설명하기는 어렵다.

한편, cPLA2는 interferon- γ TNF- α epidermal growth factor 등의 여러 가지 사이토카인과 성장 인자에 의해 그 발현이 조절되는 것으로 알려져 있으나, 실제 임상적인 염증에서 어떤 역할을 하는지는 잘 모르고 있다¹⁶⁻¹⁷. 또한, uteroglobin은 분비형인 sPLA2에 대해서는 강력한 억제작용을 하지만, cPLA2에 대한 작용은 잘 알려져 있지 않다. cPLA2는 일부 폐암세포에서는 *ras* oncogene과 관련되어 그 발현이 증가하는 것이 보고되고 있어 폐암과의 관련성을 시사한다. 본 연구에서는 uteroglobin이 과발현되는 경우 cPLA2의 발현이 억제됨을 Western blot으로 관찰하였다.

또한, COX-2는 염증반응 등에서 사이토카인, 성장 인자, 암유전자, endotoxin 등에 의해 유도된다. 어떻게 폐암세포에서 과발현하는 지에 대해서 몇 가지 연구들이 있는데, p53과 EGFR 신호전달과정

과 관련되어 있다는 보고가 있고¹⁸, 악성세포에서 분비된 PGE2가 정상세포에서 COX-2를 유도할 수 있고 이 과정에서 NF- κ B p65가 관여한다는 보고¹⁹와 TNF- α 에 의해 유도되는 경우 정상세포에 비해 악성세포에서 많은 양의 COX-2가 여러 곳에 발현한다는 보고²⁰가 있다. 또한, COX-2 억제제가 항암작용을 하는 것으로 보고되고 있다. 그러나, uteroglobin이 COX-2 발현을 억제하는 것에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 본 연구의 결과로 uteroglobin이 COX-2의 발현을 억제함을 확인할 수 있었고 이를 통해 암세포의 세포성장을 억제함을 추정할 수 있었다.

ERK는 세포성장과 관련된 신호전달 과정에 중요하다 알려져 있다. COX-2와 관련된 성장촉진에도 ERK의 활성화가 관여한다는 보고가 있고, COX-2의 억제가 암의 형질을 소실시키는 기전에도 ERK의 억제가 관여한다는 보고가 있다²¹. 그러나, 본 연구에서 암세포성장을 억제하는 uteroglobin이 오히려 ERK의 활성화를 증가시키는 것을 관찰할 수 있었다. 최근 일부보고에서 ERK가 신경세포에서 지속적으로 활성화되는 경우 세포성장보다는 분화쪽으로 유도되며, 암세포에서는 세포성장억제나 세포고사를 일으킨다는 보고가 있다²²⁻²⁴. 또한, ERK를 억제하는 경우 암억제 작용이 소실된다는 보고도 있다. 이에대한 설명으로, ERK가 일시적으로 활성화되었다가 비활성화되는 경우는 세포성장의 신호전달로 작용하지만, 지속적으로 활성화되어있는 경우는 암억제의 기전으로 작용할 가능성이 있다²⁴.

MMP-9는 암의 침범과 전이에 관련되는 것으로 알려져 있고, 그 활성도를 알기위해 zymography를 시행한 결과, uteroglobin의 과발현에 의해 그 활성이 억제된 것으로 보이며, 이전의 보고와 일치하는 결과였다³. 한편, uteroglobin을 과발현 시키면서 MEK의 억제제인 U0126으로 ERK의 활성을 억제하였을 때, 그 효과가 반전되는 것을 보았다. 이는

MMP가 ERK에 의해 분비가 증가되고, ERK의 억제에 의해 MMP가 억제될 수 있다는 보고들^{25,26}과는 상반된 결과이다. 이것 역시 신호전달과정에서 ERK의 활성화가 시간적으로 어느 시점에서, 그리고 얼마동안 이루어지는 지에 따라서 상반된 결과를 가져올 가능성이 있음을 시사한다.

이상의 결과에서 uteroglobin의 비소세포폐암세포 성장 억제작용이 cPLA2, COX-2의 발현감소와 ERK의 활성화와 관련이 있을 가능성을 시사한다. 그러나, 본 실험은 cPLA와 COX-2의 발현이 잘 되어있는 두가지 비소세포암 세포주를 대상으로 시행하였고, 폐암에 일반화시키기에는 제한점이 있을 것으로 사료된다. 기존의 연구와 상반된 결과를 보인 ERK와 MMP-9의 결과에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

연구배경 :

Uteroglobin은 정상 폐상피세포에서 발현되는 단백질로 비소세포암 조직이나 세포주에서는 발현이 저하되어있다. 항염증작용을 하며 암세포에 과발현시키면 암의 형질이 소실됨이 밝혀지고 있다. 역시 염증작용과 관련이 있는 cPLA2와 COX-2도 암과의 관련성이 밝혀지고 있고, 암억제나 MMP의 억제 등의 공통점을 가지고 있으나 이들의 관련성에 대해서는 밝혀진 바가 없다. 또한, COX-2의 암과의 관련성을 설명하는 기전으로 ERK 활성화의 관련 가능성이 있으나, uteroglobin과 ERK의 관련성도 아직 밝혀지지 않고 있다. 비소세포폐암 세포주에 uteroglobin을 과발현시킨 후, cPLA2와 COX-2의 발현, 그리고 MMP-2, MMP-9, ERK의 활성화가 어떻게 변화하는지에 대해 실험하였다.

방 법 :

폐선암세포주인 A549와 NCI-H460 세포주에 adenovirus-uteroglobin, adenovirus-null을 각각

20,100,200 moi로 transduction 시킨 뒤, 48시간 배양한 후에 단백질을 추출하였다. Uteroglobin의 발현을 확인한 후, cPLA2, COX-2, pERK, total ERK에 대해 Western blot을 시행하였고, 배양액으로 zymography를 시행하였다.

결 과 :

A549 세포주와 NCI-H460 세포주에서 uteroglobin의 발현을 확인한 세포주에서 cPLA2와 COX-2의 발현이 감소함을 Western blot으로 확인하였고, pERK가 증가함을 Western blot으로 보았고, ERK의 활성화가 증가함을 확인하였다. MMP-9는 활성이 저하되었고, MMP-2는 변화가 없었다. MEK inhibitor인 U0126을 이용하여 ERK의 활성화를 저해시킨 후, uteroglobin의 발현에는 영향이 없었고, MMP-9의 활성저하효과가 소실되었다.

결 론 :

폐암세포주에서 uteroglobin의 항암작용기전에 cPLA2 와 COX-2의 발현의 감소와 ERK의 활성화가 기여할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Mukherjee AB, Kundu GC, Mantile-Selvaggi G, Yuan CJ, Mandal AK, Chattopadhyay S et al. Uteroglobin: a novel cytokine? Cell Mol Life Sci 1999;55:771-87
2. Linnoila RI, Szabo E, Demayo F, Witschi H, Sabourin C, Malkinson A. The role of CC10 in pulmonary carcinogenesis: from a marker to tumor suppression. Ann N Y Acad Sci. 2000;923:249-67.
3. Szabo E, Goheer A, Witschi H, Linnoila RI. Overexpression of CC10 modifies neoplastic potential in lung cancer cells. Cell Growth Differ 1998;9:475-485
4. Zhang Z, Kundu GC, Panda D, Mandal AK,

- Mantile-Selvaggi G, Peri A et al. Loss of transformed phenotyped in cancer cells by overexpression of the uteroglobin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:3963-8
5. Kundu GC, Mandal AK, Zhang Z, Mantile-Selvaggi G, Mukherjee AB. Uteroglobin suppresses extracellular matrix invasion by normal and cancer cells that express the high affinity UG-binding proteins. *J Biol Chem* 1998;273:22819-24
6. Heasley LE, Thaler S, Nicks M, Price B, Skorecki K, Nemenoff RA. Induction of cytosolic phospholipase A2 by oncogenic Ras in human non-small cell lung cancer. *J Biol Chem* 1997;272:14501-4
7. Putten VV, Refaat Z, Dessez C, Blaine S, Wick M, Butterfield L et al. Induction of cytosolic phospholipase A2 by oncogenic Ras is mediated through the JNK and ERK pathways in rat epithelial cells. *J Biol Chem* 2001;276:1226-32
8. Blaine SA, Wick M, Dessez C, Nemenoff RA. Induction of cPLA2 in lung epithelial cells and non-small cell lung cancer is mediated by Sp1 and c-Jun. *J Biol Chem* 2001;276:42737-43
9. Hosomi Y, Yokose T, Hirose Y, Nakajima R, Nagai K, Nishiwaki Y et al. Increased COX-2 expression occurs frequently in precursor lesions of human adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer* 2000;30:73-81
10. Hasturk S, Kemp B, Kalapurakal SK, Kurie JM, Hong WK, Lee JS. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in bronchial epithelium and nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2002;94:1023-31
11. Hida T, Kozaki K, Muramatsu H, Masuda A, Shimizu S, Mitsudomi T et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor induced apoptosis and enhances cytotoxicity of various anticancer agents in non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2000;6:2006-11
12. Hung W, Chang H, Pan M, Lee T, Chuang L. Induction of p27 as a mechanism underlying NS398 induced growth inhibition in human lung cancer cells. *Mol Pharmacol* 2000;58:1398-1406
13. Pai R, Soreghan B, Szabo IL, Pavelka M, Baatar D, Tarnawski AS. Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nat Med* 2002;3:289-293
14. JC Lee, KH Park, SJ Han, CG Yoo, CT Lee, SK Han et al. The inhibitory effect of adenovirus-uteroglobin transduction on the growth of lung cancer cell lines. *Cancer Gene Therapy* 2003;10:287-293
15. Peri A, Bonaccorsi L, Muratori M, Luconi M, Balci E, Granchi S et al. Uteroglobin reverts the transformed phenotype in the endometrial adenocarcinoma cell line HEC-1A by disrupting the metabolic pathways generating platelet-activating factor. *Int J Cancer* 2000;88:525-534
16. Jiang YJ, Hatch GM, Mymin D, Dembinski T, Kroeger EA, Choy PC. Modulation of cytosolic phospholipase A2 by PPAR activators in human preadipocytes. *J Lipid Res* 2001;42:716-724
17. Levy R, Dana R, Hazan I, Levy I, Weber G, Smolakov R et al. Elevated cytosolic pho-

- sphlipase A2 expression and activity in human neutrophils during sepsis. *Blood* 2000; 95:660-5
18. Niki T, Kohno T, Iba S, Moriya Y, Takahashi Y, Saito M et al. Frequent co-localization of Cox-2 and laminin-5 γ 2 chain at the invasive front of early-stage lung adenocarcinomas. *Am J Pathol* 2002;160:1129-41
19. Tamura M, Sebastian S, Yang S, Gurates B, Ferrer K, Sasano H et al. Up-regulation of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin synthesis in endometrial stromal cells by malignant endometrial cells. *J Biol Chem* 2002;277:26208-16
20. Subbarayan V, Sabichi AL, Llansa N, Lippman SM, Menter DG. Differential expression of cyclooxygenase-2 and its regulation by tumor necrosis factor- α in normal and malignant prostate cells. *Cancer Res* 2001;61: 2720-6
21. Abiru S, Nakao K, Ichikawa T, Migita K, Shigeno M, Sakamoto M et al. Aspirin and NS-398 inhibit hepatocyte growth factor-induced invasiveness of human hepatoma cells. *Hepatology* 2002;35:1117-1124
22. Galve-Roperh I, Sanchez C, Cortes ML, Pulgar TG, Izquierdo M, Guzman M. Antitumoral action of cannabinoids: Involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nat Med* 2000;6:313-319
23. Pumiglia KM, Decker SJ. Cell cycle arrest mediated by the MEK/mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:448-52
24. Elder DJ, Halton DE, Playle LC, Paraskeva C. The MEK/ERK pathway mediated COX-2-selective NSAID-induced apoptosis and induced COX-2 protein expression in colorectal carcinoma cells. *Int J Cancer* 2002;99:323-7
25. Pan MR, Hung WC. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit matrix metalloproteinase-2 via suppression of the ERK/Sp1-mediated transcription. *J Biol Chem* 2002; 277:32775-80
26. Park MJ, Park IC, Lee HC, Woo SH, Lee JY, Hong YJ et al. Protein kinase C- α activation by phorbol ester induces secretion of gelatinase B/MMP-9 through ERK 1/2 pathway in capillary endothelial cells. *Int J Oncol*. 2003;22:137-43