

## 폐암 세포에서 Proteasome Inhibitor에 의한 Apoptosis의 기전

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 의학연구원 폐연구소

김철현<sup>†</sup>, 이경희, 이춘택, 김영환, 한성구, 심영수, 유철규

=Abstract=

### The Mechanism of Proteasome Inhibitor-Induced Apoptosis in Lung Cancer Cells

Cheol Hyeon Kim, M.D., Kyoung-Hee Lee, Choon-Taek Lee, M.D.,  
Young Whan Kim, M.D., Sung Koo Han, M.D.,  
Young-Soo Shim, M.D., Chul-Gyu Yoo, M.D.

*Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine,  
Seoul National University College of Medicine, Clinical Research Institute,  
Seoul National University Hospital, Lung Institute, Medical Research Center, Seoul National University, Seoul, Korea*

**Background** : Proteasome inhibitors can promote either cell survival or programmed cell death, depending on both the specific type and proliferative status of the cell. However, it is not well known whether inhibition of proteasome activity is related to apoptosis in lung cancer cells. In addition, the exact mechanisms responsible for apoptosis induced by proteasome inhibition are not well understood. In the present study, we have examined the effect of proteasome inhibition on lung cancer cells and tried to test the mechanisms that may be associated with the apoptosis of these cells.

**Methods** : We examined the effect of proteasome inhibition with MG132 or PS-341 on cell survival in A549 and NCI-H157 lung cancer cells using MTT assay, and analyzed the cleavage of PARP by Western blot analysis to find evidence of apoptosis. Next, we evaluated the activation of caspase 3 by Western blot analysis and the activity of JNK by immunocomplex kinase assay. We also examined the changes in anti-apoptotic pathways like ERK and cIAP1 by Western blot analysis after inhibition of proteasome function.

---

\*본 연구는 1999년 서울대학교병원 호흡기지정연구비의 보조로 이루어졌음(04-1999-006-0).

<sup>†</sup>현근무처 : 원자력병원 내과

Address for correspondence:

**Chul-Gyu Yoo, M.D.**

Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine, Seoul National University Hospital  
28 Yongon-dong, Chongno-gu, Seoul, 110-744, Korea

Phone : 02-760-3760 Fax : 02-762-9662 E-mail : cgyoo@snu.ac.kr

**Results** : We demonstrated that MG132 reduced cell survival by inducing apoptosis in A549 and NCI-H157 cells. Proteasome inhibition with MG132 or PS-341 was associated with activation of caspase 3 and JNK, reduced expression of activated ERK, and downregulation of cIAP1.

**Conclusion** : Apoptosis induced by proteasome inhibition may be associated with the activation of pro-apoptotic pathways like caspase 3 and JNK and the inactivation of anti-apoptotic pathways in lung cancer cells. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2003, 54:403-414)

**Key words** : Proteasome inhibitor, Apoptosis, Lung cancer.

## 서 론

Apoptosis는 일련의 생화학적, 형태학적 특징을 가진 세포 사멸 과정이다. 세포의 발생, 분화, 성장 및 노화 등의 전 과정을 통하여 세포의 생존과 사멸은 균형을 이루며 개체의 항상성(homeostasis)을 유지하게 한다. 따라서 apoptosis가 여러 가지 원인에 의해 제대로 통제되지 못할 경우 개체는 필연적으로 여러 가지 질병 상태를 일으키게 된다. 예를 들어 암은 제거되어야 할 세포들이 살아 남게되어 발생하는 대표적인 질환이라고 할 수 있다.

Proteasome은 multicatalytic protease complex로서 세포가 ubiquitin과 ATP에 의존하여 신속하게 단백을 분해할 때 사용하는, lysosome을 통하지 않는 세포의 기본적인 장치이다<sup>1-3</sup>. 다양한 단백질, 특히 cyclin, cyclin-dependent kinase inhibitor와 myc, p53, NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B, c-fos, c-jun 등과 같은 각종 전사 인자들이 proteasome을 통해 분해되며<sup>4-9</sup>, 이러한 조절 단백질의 분해 과정은 세포 주기 조절, 신호 전달, 전사 조절, 수용체들의 down-regulation, endocytosis 등에 매우 중요한 역할을 하고 있다. 한편, proteasome을 통해 분해되는 많은 단백질이 apoptosis 과정에 관련된 물질들이며 밝혀지면서 ubiquitin-proteasome system이 apoptosis의 조절에 중요한 역할을 할 것이라는 가설이 제시되었다. 최근에는 proteasome 억제제를 일부 암 환자에 투여하여 좋은 성적을 얻었다는 보고가 알려지면서, proteasome 억제제가 암의 새로운 치료

약제로 관심을 받고 있다.

Proteasome 억제가 세포의 apoptosis에 미치는 영향은 세포 종류에 따라 차이를 보이고 있다. 즉, 분화가 완료된 혹은 빠르게 분열하지 않는 세포들에서는 proteasome 억제제를 투여하면 apoptosis가 억제되지만<sup>10,11</sup>, 빠르게 분열하는 세포들에서는 반대로 apoptosis가 유발된다는 것이다<sup>12-15</sup>. 그러나 아직까지 폐암 세포에서 proteasome 억제가 미치는 효과에 관해서는 알려져 있지 않은 상태이다. Proteasome 억제에 의한 apoptosis의 유도 기전은 아직 확실하게 규명되어 있지는 않지만, 기존의 연구에 의해 proteasome 억제제 투여로 p53, p27, Bcl-2와 같은 short-lived 단백질의 세포 내 축적과<sup>14-16</sup>, stress kinase인 JNK의 활성화가 보고되어 있다<sup>17</sup>. 미토콘드리아로부터 cytochrome c가 분비되고 Apaf-1이 활성화되며 결과적으로 caspase 9, 3, 7이 차례로 활성화되면서 apoptosis가 초래되는 것으로 제시되고 있다<sup>12,18</sup>. 일반적으로 세포가 apoptosis를 유도하는 물질에 노출되면, apoptosis를 억제하는 경로가 동시에 활성화되어 apoptosis가 최소화되는 경향을 보인다. 따라서, 효과적으로 apoptosis가 유도되기 위해서는 apoptosis를 유도하는 경로의 활성화와 함께 항 apoptosis 경로의 억제가 병행되어야 한다. 아직까지 proteasome 억제가 항 apoptosis의 경로에 미치는 효과에 관해서는 알려져 있지 못한 상태이다.

본 연구에서는 폐암 세포주에서도 proteasome 억제에 의해 apoptosis가 유발되는지를 확인하였

고, apoptosis 유도 경로와의 관련성을 평가하였으며, proteasome 억제제가 항 apoptosis 경로에 미치는 효과를 규명하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 세포 배양

폐암 세포주인 A549 세포와 NCI-H157 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건하에서 10% fetal bovine serum(FBS), penicillin(60 g/ml), streptomycin(100 g/ml)이 첨가된 RPMI 1640 배지에 배양하였다.

### 2. 시 약

Proteasome 억제제인 MG132(Z-Leu-Leu-Leu-H)는 Peptide Institute, Inc. (Osaka, Japan)에서 구입하였다. Rabbit polyclonal anti-PARP(poly(ADP-ribose) polymerase) 항체, anti-pro-caspase 3 항체, anti-JNK1 항체, anti-cIAP1 항체, 그리고 recombinant GST-c-jun은 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. Rabbit polyclonal anti-ERK(ERK1/ERK2) 항체, anti-phospho-ERK 항체는 Cell Signaling Technology, Inc. (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. Horseradish peroxidase(HRP)가 conjugation된 goat anti-rabbit 이차 항체는 Promega (Madison, WI, USA)에서, protein-G sepharose beads와 ECL kit는 Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden)에서, protease 억제제는 Roche (Mannheim, Germany)에서, [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP는 ICN Pharmaceuticals, Inc. (Costa Mesa, CA, USA)에서 각각 구입하였다.

### 3. 세포 생존율의 측정

세포 생존율은 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-

diphenyl tetrazolium bromide assay를 이용하여 측정하였다. 96-well plate에 well당  $2 \times 10^3$ 개의 세포를 분주하고 1일 후 proteasome 억제제를 투여하여 정해진 시간 동안 배양하였다. 배양된 세포에 MTT 용액을 0.5 mg/ml까지 첨가하고 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거한 후 50  $\mu$ l의 DMSO를 첨가하여 녹이고 분광광도계를 이용하여 590 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 4개 well의 성적을 분석하였다.

### 4. Western blot 분석

배양된 세포에 MG132 혹은 PS-341을 투여하고 일정 시간동안 배양한 후 whole lysis buffer(0.1% Nonidet P-40, 5 mM EDTA, 50 mM Tris(pH 7.5~8.0), 250 mM NaCl, 50 mM NaF)를 이용하여 총세포 단백을 추출하였다. 30  $\mu$ g의 세포 단백을 10% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동시켰다. 4시간 동안 400 mA의 일정한 전류로 단백질을 nitrocellulose membrane으로 transfer시키고, 이 membrane을 blocking solution(5% skim milk in 1×PBS/Tween 20)으로 1시간동안 block시킨 후 rabbit polyclonal anti-PARP 항체, anti-pro-caspase 3 항체, anti-JNK1 항체, anti-ERK 항체, anti-phospho-ERK 항체, 혹은 anti-cIAP1 항체를 1 : 1,000으로 첨가하여 12시간 동안 반응시켰다. 세척 후 이차 항체를 1 : 2,000으로 첨가하여 반응시킨 후 면역신호의 검출은 ECL Western blotting detection system을 이용하였다.

### 5. JNK 활성에 대한 immunocomplex kinase assay

JNK 활성도를 immunocomplex kinase assay로 평가하였다. JNK는 c-JUN의 N-terminal에 위치하는 serine 63, 73을 phosphorylation 시켜 c-JUN의

transactivation potential과 DNA-binding affinity를 증가시키는 kinase이므로, JNK의 활성도는 c-JUN의 phosphorylation을 평가하면 알 수 있다. 총세포 단백 추출액을 1 : 100으로 희석된 anti-JNK1 항체에 반응시키고, protein-G sepharose bead를 첨가한 상태에서 밤새 반응시켜 immuno-precipitated resin을 얻었다. 여기에 kinase reaction buffer(20 mM HEPES, pH 7.6, 20 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 0.1 mM sodium orthovanadate, 10 mM  $MgCl_2$ , 50 mM NaCl, 1 mM DTT), 1  $\mu$ g/ml GST-c-jun, 10  $\mu$ Ci [ $\gamma$ - $^{32}P$ ]ATP를 가하여 30°C에서 30분간 반응시켰다. SDS protein sample buffer를 가하여 반응을 종료시킨 후 10% SDS-PAGE를 시행하고 nitrocellulose membrane에 transfer하여 autoradiography를 시행하였다. 또한, 동량의 JNK가 immunoprecipitation 되었는지를 확인하기 위하여 같은 membrane을 이용하여 anti-JNK1 항체로 immunoblot을 시행하였다.

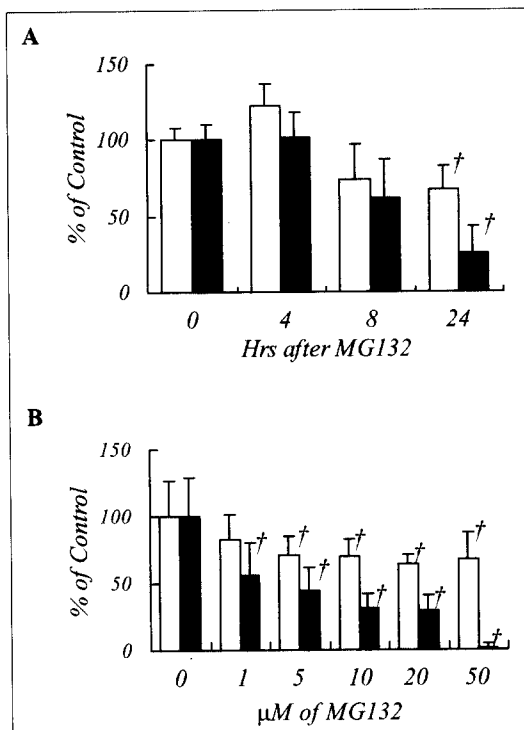
## 6. 통계 분석

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

## 결 과

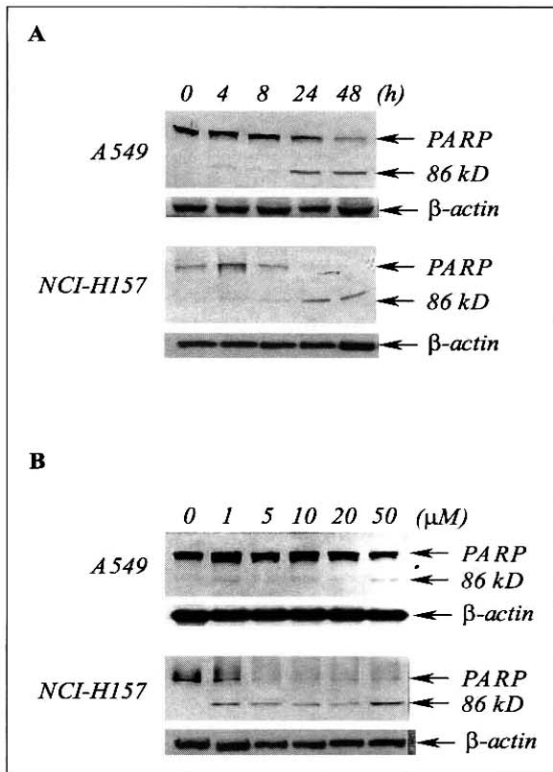
### 1. Proteasome 억제제 MG132가 폐암 세포주의 생존에 미치는 영향

Proteasome 억제제인 MG132가 폐암 세포의 생존에 미치는 영향을 평가하기 위하여, A549와 NCI-H157 세포주에 MG132를 투여하고 시간 경과 및 농도에 따른 세포의 생존율을 측정하였다. 50  $\mu$ M의 MG132 투여 후 시간이 지남에 따라 세포의 생존율이 점차적으로 감소하였고, 24시간 후에는 기



**Fig. 1.** MG132 decreases cell survival in lung cancer cells. (A) Time-dependent effect of MG132 on the cell survival. A549 and NCI-H157 cells were treated with 50  $\mu$ M of MG132 for 0, 4, 8, 24 hrs. Cell viability was assayed by MTT assay at each time points. (B) Dose-dependent effect of MG132 on the cell survival. Cells were incubated with 0, 1, 5, 10, 20, 50  $\mu$ M of MG132 for 24 hrs. Cell viability was assayed by MTT assay. Open bar represents for A549 cells, and black bar for NCI-H157 cells. Data are shown as mean percentage of control  $\pm$  standard deviation. †:  $p < 0.05$  compared to control.

저상태에 비해 통계적으로 유의한 차이를 보여 A549 세포의 생존율은 기저 상태의 65%, NCI-H157 세포의 생존율은 기저상태의 25%로 감소하였다(Fig. 1A). 다음 단계로 여러 농도의 MG132를 투여하고 24시간 후에 세포의 생존율을 측정하였다. A549 세포는 5  $\mu$ M의 MG132 투여로 세포의



**Fig. 2.** MG132 induces apoptosis time- and dose-dependently. A549 and NCI-H157 cells were treated with 50  $\mu$ M of MG132 for 0, 4, 8, 24, 48 hrs (A) or 0, 1, 5, 10, 20, 50  $\mu$ M of MG132 for 24 hrs (B). Total cellular extracts were separated by 8% SDS-PAGE and PARP was detected by Western blot analysis.

생존율이 통계적으로 유의하게 감소하였고, 농도가 증가해도 더 이상의 생존율 감소는 관찰되지 않았다(Fig. 1B). 반면에 NCI-H157 세포는 1  $\mu$ M의 MG132 투여로 생존율이 통계적으로 유의하게 감소하였고, 농도를 증가시키기에 따라 농도 의존성으로 세포의 생존율이 감소하였다(Fig. 1B). 이상의 결과는 폐암세포는 proteasome 억제제로 세포의 생존율이 감소하는데, 세포에 따라 예민도의 차이를 보여 NCI-H157 세포가 A549 세포보다 민감함을

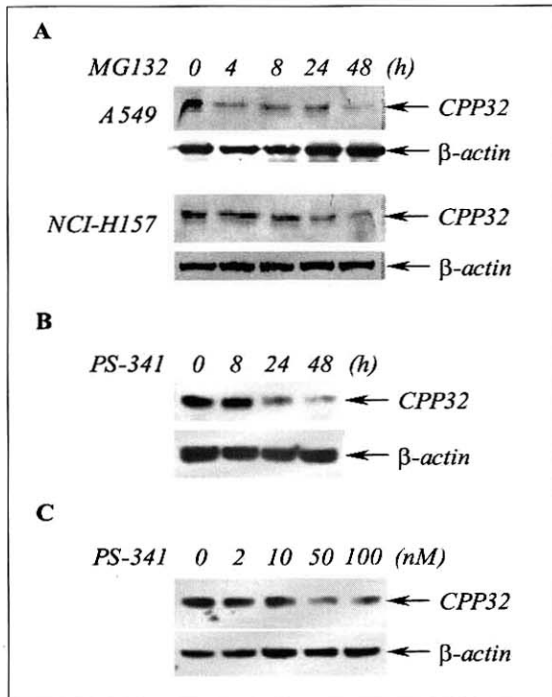
을 시사하는 소견이다.

## 2. 폐암 세포주에서 proteasome 억제에 의한 apoptosis의 유발

MG132의 투여에 의해 관찰되는 세포 생존율의 감소가 apoptosis에 의한 것인지를 확인하기 위하여, A549와 NCI-H157 세포주에 MG132를 투여하고 apoptosis시 특징적으로 관찰되는 poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)의 분해 유무를 시간 경과와 농도 증가에 따라 Western blot으로 조사하였다. A549와 NCI-H157 세포에 50  $\mu$ M의 MG132 투여하고 24시간이 경과한 후 PARP의 분해 시에 관찰되는 86 kD 분절이 관찰되어 48시간까지 지속되었다(Fig. 2A). 여러 농도의 MG132를 세포에 투여하고 24시간 후에 PARP의 분절을 관찰하였는데, NCI-H157 세포는 A549 세포에 비해 훨씬 낮은 농도인 1  $\mu$ M의 MG132 투여시 PARP의 분절이 관찰되어, 세포의 생존율에 미치는 결과와 같은 양상이 관찰되었다(Fig. 2B). 이 결과는 proteasome 억제제에 의한 폐암 세포 생존율의 감소는 apoptosis에 의한 것임을 시사하는 소견이다.

## 3. 폐암 세포주에서 proteasome 억제가 caspase 3의 활성화에 미치는 효과

활성화된 caspase에 의한 단백 분해는 apoptosis에서 관찰되는 특징적인 소견으로서, DNA의 분절화와 함께 세포 사멸 과정을 비가역적인 과정이 되게 한다<sup>19</sup>. 폐암 세포에서 proteasome 억제제에 의해 유발되는 apoptosis에서 caspase 3의 관련성을 평가하기 위하여 MG132와 PS-341을 투여한 후 pro-caspase 3의 활성을 Western blot 분석으로 조사하였다. 32 kD의 pro-caspase 3는 12 kD 분절로 분해되어 활성화됨이 알려져 있다. MG132 50  $\mu$ M을 투여하고 24시간 후에 A549와 NCI-H157



**Fig. 3.** Proteasome inhibitors decreases pro-caspase 3. A549 and NCI-H157 cells were treated with 50  $\mu$ M of MG132 for the indicated times(A). NCI-H157 cells were incubated with PS-341(50 nM) for the indicated times(B), and were treated with 0, 2, 10, 50, 100 nM of PS-341 for 24 h(C). Total cellular extracts were separated by 12% SDS-PAGE and CPP32 and  $\beta$ -actin were detected by Western blot analysis. Results are representative of three separate experiments.

세포 모두에서 pro-caspase 3의 발현이 감소되었고, 이는 48시간 후까지 지속되었다.  $\beta$ -actin을 control로 하여 pro-caspase 3 band의 density를 비율로 표시해 보면 A549의 경우 0, 4, 8, 24, 48 시간째에 각각 1.0, 0.7, 0.8, 0.5, 0.3이었고, NCI-H157의 경우는 각각 0.7, 0.7, 0.6, 0.5, 0.5였다(Fig. 3A). Pro-caspase 3의 발현은 다른 proteasome 억제제인 PS-341에 의해서도 시간과 농도 의존성의

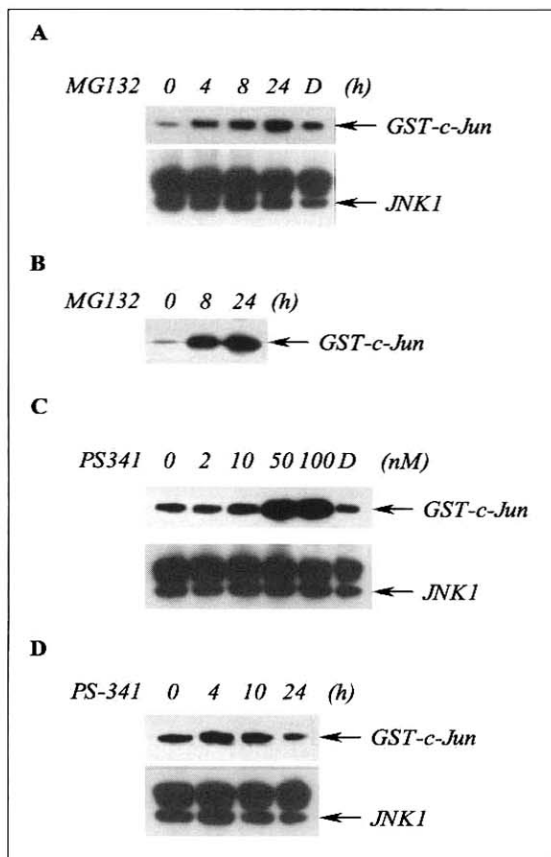
로 감소함이 관찰되었다(Fig. 3B, C). 이 결과는 폐암 세포에서 proteasome 억제제에 의한 apoptosis는 caspase 3의 활성화와 관련 있음을 시사하는 소견이다.

#### 4. 폐암 세포주에서 proteasome 억제에 의한 JNK의 활성화

세포가 다양한 stress를 받았을 때 활성화되는 stress kinase의 하나로 c-jun N-terminal kinase (JNK)가 알려져 있다. JNK는 강한 oxidant나 자외선 조사 등의 stress가 가해졌을 때 활성화되는데, 활성화된 JNK에 의해 apoptosis를 유발하는 신호 전달 체계가 작동된다는 사실이 잘 알려져 있다<sup>20-22</sup>. 일부 세포주에서 proteasome 억제제에 의한 JNK의 활성화가 보고되어 있다<sup>17</sup>. 폐암 세포에서도 proteasome 억제제에 의해 JNK의 활성화가 일어나는지를 평가하기 위하여 세포에 proteasome 억제제를 처리하고 JNK의 활성화 유무를 immunocomplex kinase assay로 측정하였다. NCI-H157 세포에 20  $\mu$ M의 MG132투여하고 4시간이 경과한 후부터 JNK 활성도가 증가하였고, 24시간까지 지속되었다(Fig. 4A). A549 세포에서도 MG132를 투여하고 8시간 후부터 JNK 활성도가 증가하여 24시간까지 지속되었다(Fig. 4B). NCI-H157 세포에서 PS-341 처리로 시간과 농도 의존성으로 JNK 활성도가 증가하였다(Fig. 4C, D). 이상의 결과로 폐암 세포에서 proteasome 억제로 JNK의 활성화가 유도됨을 확인할 수 있었다.

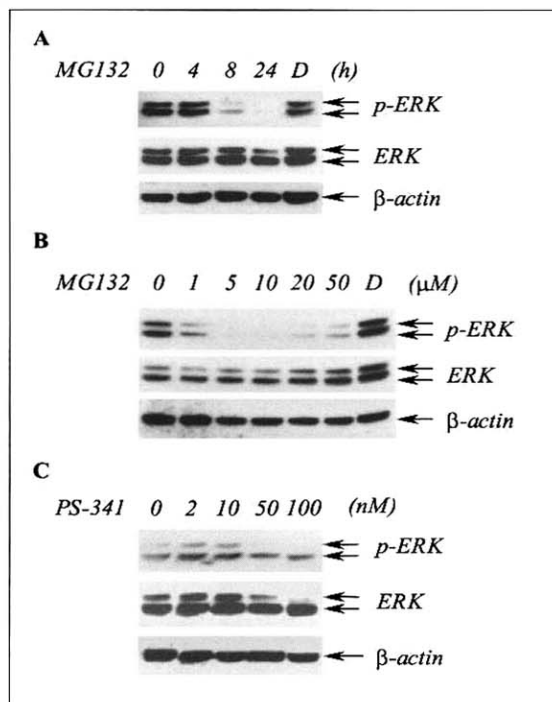
#### 5. 폐암 세포주에서 proteasome 억제가 세포생존 signal에 미치는 효과

Proteasome 억제에 의한 폐암 세포의 apoptosis와 세포생존 signal과의 관련성을 평가하고자, proteasome 억제가 extracellular signal-regulated pro-



**Fig. 4.** JNK activity increases by proteasome inhibition. NCI-H157 (A) and A549 (B) cells were treated with MG132 (20  $\mu$ M) for the indicated times. NCI-H157 cells were incubated with PS-341 (0, 2, 10, 50, 100 nM) for 8 h (C), and treated with PS-341 (50 nM) for the indicated times (D). JNK1 was immunoprecipitated using anti-JNK1 antibody. JNK activity was assayed by immune complex kinase assay with GST-c-Jun and [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP as described in Materials and Methods. The amount of immunoprecipitated JNK1 was evaluated by Western blot analysis. D: DMSO control.

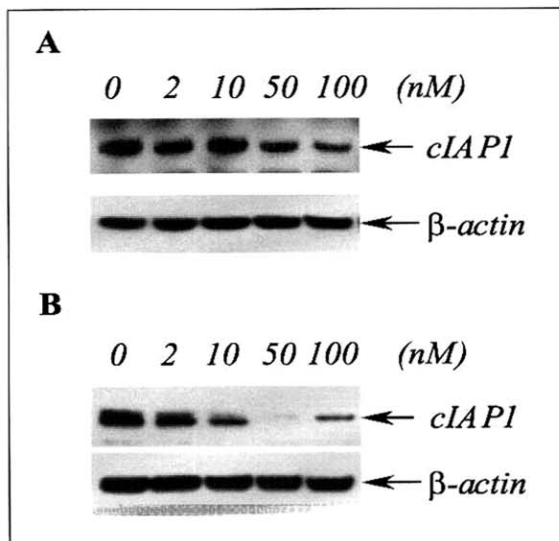
tein kinases(ERK)의 활성화와 c-inhibitor of apoptosis 1 (cIAP1)의 발현에 미치는 효과를 평가하였다. ERK는 생존 신호인 성장 인자의 자극에 의



**Fig. 5.** The phosphorylation of ERK is suppressed by proteasome inhibition time- and dose-dependently. (A) NCI-H157 cells were treated with MG132 (20 mM) for the indicated times. (B) Cells were treated with MG132 (0, 1, 5, 10, 20, 50 mM) for 8 h. (C) Cells were treated with PS-341 (0, 2, 10, 50, 100 nM) for 8 h. The level of phosphorylated ERK, total ERK, and actin expressions were evaluated by Western blot analysis. D: DMSO control.

해 활성화되는 효소로서 apoptosis를 억제하며, 실험적으로 ERK를 억제하면 apoptosis가 유발되는 것이 알려져 있다<sup>20</sup>. NCI-H157 세포의 기저 상태에서 ERK가 활성화되어 있었다(Fig. 5A). NCI-H157 세포에 20  $\mu$ M의 MG132를 투여하고 시간 경과에 따라 전체 ERK와 활성화된 형태인 인산화 ERK를 Western blot 분석으로 관찰하였는데, 8시간 후부터 활성화된 인산화 ERK가 현저히 감소하여 24시간 후에는 완전히 소실되었다(Fig. 5A).

## 고 찰



**Fig. 6.** PS-341 downregulates cIAP1 expression. NCI-H157(A) and A549(B) cells were incubated with 0, 2, 10, 50, 100 nM of PS-341 for 24 h. Total cellular extracts were separated by 12% SDS-PAGE and cIAP1 and  $\beta$ -actin were detected by Western blot analysis. Results are representative of three separate experiments.

MG132에 의한 활성화 ERK의 발현 감소는 1  $\mu$ M의 낮은 농도에서부터 관찰되었다(Fig. 5B). PS-341 처리로도 인산화 ERK의 발현 감소가 관찰되었다(Fig. 5C). Proteasome 억제제는 전체 ERK의 발현에는 영향을 미치지 않았다. 다음 단계로 caspase와 결합하여 caspase의 작용을 억제함으로써 항 apoptosis 작용을 보이는<sup>23, 24</sup> cIAP1에 미치는 proteasome 억제제의 효과를 평가하였다. NCI-H157 세포와 A549 세포에 24시간동안 PS-341을 농도별로 투여한 후 cIAP1의 발현을 관찰하였는데, 50 nM 이상의 농도에 cIAP1 발현이 감소되었다(Fig. 6). 이상의 결과는 폐암 세포에서 proteasome 억제에 의한 apoptosis의 유도에 항 apoptosis 경로의 억제가 관여할 가능성을 시사하는 소견이다.

본 연구에서는 다른 여러 세포들과 마찬가지로 폐암 세포에서도 proteasome 억제제인 MG132나 PS-341을 투여하였을 때 apoptosis가 유발됨을 확인하였다. 또한, proteasome 억제제 투여에 의해 caspase 3, JNK의 활성화가 유발됨을 관찰하였고, 다른 한편으로는 활성화된 ERK의 발현이 감소되고 cIAP1이 down regulation 되는 것을 발견할 수 있었다. 이로부터 유추해 볼 수 있는 가설은 proteasome 억제제가 caspase 3, JNK와 같은 apoptosis 유도 경로를 활성화시키고, ERK, cIAP1과 같은 항 apoptosis 경로를 억제함으로써 apoptosis를 유발할 수 있을 것이라는 가능성이지만 아직 결론을 내릴 수는 없다. 향후 이러한 가설을 뒷받침하기 위해서는 caspase 3나 JNK의 활성화를 억제한 후 proteasome 억제제에 의해 유발되는 apoptosis도 역시 억제되는지를 조사해 보아야 할 것이다. 또한, ERK와 cIAP1을 overexpression 시킨 후 apoptosis 양상에 변화가 나타나는지에 대한 연구도 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 두 종류의 폐암 세포주에 대하여 각각 실험을 진행하였다. 그 결과를 살펴보면 proteasome 억제에 대한 반응은 폐암 세포의 종류에 따라 예민도에 차이가 있음을 알 수 있다. NCI-H157 세포는 A549 세포에 비해 훨씬 낮은 농도의 proteasome 억제제에 의해 세포 생존율의 감소가 유발되었으며, 같은 농도의 proteasome 억제제를 투여했을 때 세포 생존율의 감소가 더욱 크게 관찰되었다. 이러한 양상은 apoptosis를 평가한 결과에서도 마찬가지로 관찰되었다.

Proteasome 억제제에 의해 apoptosis가 유발되는 정확한 기전은 아직 잘 알려져 있지 않다. 최근의 연구 결과에 의하면 proteasome 억제제에 의해 유발되는 apoptosis에는 caspase 3의 활성화가 관



련되어 있음이 밝혀졌다<sup>12</sup>. Proteasome 억제제가 c-jun N-terminal kinase (JNK)와 같은 stress kinase를 활성화시켜서 apoptosis를 유발하는 신호 전달 경로가 활성화된다는 실험 결과도 있다<sup>17,20-22</sup>. 또한, proteasome 억제제를 투여하면 p53, cyclin-dependent kinase inhibitor p21<sup>Waf1</sup>, p27<sup>Kip1</sup>과 같은 세포 주기의 조절에 중요한 조절 단백질이 세포내에 축적된다는 보고들이 있고<sup>14,15,25</sup> apoptosis 억제 물질들의 전사 인자인 NF- $\kappa$ B의 활성이 proteasome 억제제에 의해 차단됨으로써 apoptosis를 유발한다는 보고들도 있다<sup>26-28</sup>. 하지만 폐암 세포에서도 역시 이러한 현상들이 관찰되는지에 대해서는 연구가 진행 중에 있으며, 본 연구에서는 전술한 일부 경로의 변화를 확인할 수 있었다.

최근 일부 proteasome 억제제를 새로운 항암제로 이용할 수 있는지에 대한 연구가 진행 중에 있다<sup>29</sup>. 그 중 본 연구에서도 사용된 PS-341이 특히 주목을 받고 있다. 예전에 가장 광범위하게 사용되어 온 MG132 등의 peptide aldehyde는 cathepsin과 calpain 등을 동시에 억제하므로 그 실험 결과를 해석하는데 어려움이 있었다. 이후에 발견된 천연 산물인 lactacystin도 proteasome에 대한 특이성은 증가되었지만 역시 cathepsin A를 억제하는 것으로 알려져 있다. 이에 반해 새로 개발된 dipeptidyl boronic acid인 PS-341 등은 proteasome에 대해 매우 강력하면서도 특이적인 억제 작용을 나타내는 것으로 밝혀져 있다<sup>29</sup>. 본 연구와 같은 여러 생체 외 실험에서 이들 proteasome 억제제들은 암세포에 대하여 apoptosis를 유발함이 관찰되었고<sup>10-15</sup>, 생체 내 실험에서도 현저한 항종양 효과를 나타내었다<sup>25,30,31</sup>. 또한 혈관 신생과 암세포의 전이를 억제하였으며<sup>32,33</sup>, 암세포의 apoptosis에 대한 감수성도 증가시킴이 확인되었다<sup>12-15</sup>. 더욱 주목할 만한 것은, proteasome 억제제가 활발히 증식을 하거나 형질변환된 세포에 대하여 선택적인 세포 독성을 보이는 것으로 관찰되어<sup>16</sup>,

기존의 항암제에 대해 내성을 보이는 암세포에 대한 새로운 항암제로서 관심이 모아지고 있는 실정이며 추후 현재 진행 중인 몇몇 임상 연구 결과들이 발표될 예정이다<sup>34</sup>.

Proteasome 억제와 apoptosis와의 관련성에 대한 연구는 폐암 세포의 발병에 있어서 중심이 되는 apoptosis의 이상과 그 기전에 대한 새로운 지식을 제공해 줄 수 있으며, 향후 이를 이용한 새로운 치료법의 개발에 많은 도움이 될 것으로 기대된다.

## 요 약

### 연구배경 :

Proteasome 억제가 세포의 apoptosis에 미치는 영향은 세포 종류에 따라 차이를 보이고 있다. 그러나 아직까지 폐암 세포에서 proteasome 억제가 미치는 효과 및 그 기전에 관해서는 확실하게 규명되어 있지 못한 상태이다. 본 연구에서는 폐암 세포주에서 proteasome 억제에 의한 apoptosis의 유도 유무를 관찰하고, 그 기전을 규명하고자 하였다.

### 방 법 :

폐암 세포주인 A549와 NCI-H157 세포에 proteasome 억제제인 MG132와 PS-341을 투여하고 세포의 생존율을 MTT 분석으로 평가하였고, apoptosis 유무를 PARP 단백질에 대한 Western 분석으로 확인하였다. Proteasome 억제가 caspase 3와 JNK의 활성화에 미치는 효과를 각각 Western 분석과 immunocomplex kinase 분석으로 평가하였다. Proteasome 억제제를 투여하고 항 apoptosis 경로인 ERK와 cIAP1에 미치는 효과를 Western 분석으로 평가하였다.

### 결 과 :

A549와 NCI-H157 세포에 MG132를 투여하였을 때, 세포생존율의 감소가 관찰되었고, 이는 apoptosis의 유도에 의한 것으로 확인되었다. MG132

와 PS-341 처리로 caspase 3와 JNK가 활성화되었다. 반면에 활성화된 ERK의 발현과 cIAP1의 발현은 감소하였다.

#### 결 론 :

폐암 세포에서 proteasome 억제에 의한 apoptosis에는 caspase 3, JNK와 같은 apoptosis 유도 경로의 활성화와 함께 항 apoptosis 경로의 억제가 관여할 것으로 생각된다.

### 참 고 문 헌

1. Goldberg AL, Stein R, Adams J. New insights into proteasome function: from archaeobacteria to drug development. *Chem Biol* 1995;2(8):503-8.
2. Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 1996;65:801-47.
3. King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kirschner MW. How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 1996;274(5293):1652-9.
4. Elledge SJ, Harper JW. Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6(6):847-52.
5. Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* 1994;78(5):773-85.
6. Stancovski I, Gonen H, Orian A, Schwartz AL, Ciechanover A. Degradation of the proto-oncogene product c-Fos by the ubiquitin proteolytic system in vivo and in vitro: identification and characterization of the conjugating enzymes. *Mol Cell Biol* 1995;15(12):7106-16.
7. Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 1995;269(5224):682-5.
8. Maki CG, Huibregtse JM, Howley PM. In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53. *Cancer Res* 1996;56(11):2649-54.
9. Pagano M. Cell cycle regulation by the ubiquitin pathway. *FASEB J* 1997;11(13):1067-75.
10. Grimm LM, Goldberg AL, Poirier GG, Schwartz LM, Osborne BA. Proteasomes play an essential role in thymocyte apoptosis. *EMBO J* 1996;15(15):3835-44.
11. Sadoul R, Fernandez PA, Quiquerez AL, Martinou I, Maki M, Schroter M, Becherer JD, Irmier M, Tschoep J, Martinou JC. Involvement of the proteasome in the programmed cell death of NGF-deprived sympathetic neurons. *EMBO J* 1996;15(15):3845-52.
12. Drexler HC. Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(3):855-60.
13. Cui H, Matsui K, Omura S, Schauer SL, Matulka RA, Sonenshein GE, Ju ST. Proteasome regulation of activation-induced T cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(14):7515-20.
14. Lopes UG, Erhardt P, Yao R, Cooper GM. p53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors. *J Biol Chem* 1997;272(20):12893-6.

15. Drexler HC, Risau W, Konerding MA. Inhibition of proteasome function induces programmed cell death in proliferating endothelial cells. *FASEB J* 2000;14(1):65-77.
16. An B, Goldfarb RH, Siman R, Dou QP. Novel dipeptidyl proteasome inhibitors overcome Bcl-2 protective function and selectively accumulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 and induce apoptosis in transformed, but not normal, human fibroblasts. *Cell Death Differ* 1998;5:1062-75.
17. Meriin AB, Gabai VL, Yaglom J, Shifrin VI, Sherman MY. Proteasome inhibitors activate stress kinases and induce Hsp72. Diverse effects on apoptosis. *J Biol Chem* 1998;273(11):6373-9.
18. Almond JB, Snowden RT, Hunter A, Dinsdale D, Cain K, Cohen GM. Proteasome inhibitor-induced apoptosis of B-chronic lymphocyte leukemia cells involves cytochrome c release and caspase activation, accompanied by formation of an ~700 kDa Apaf-1 containing apoptosome complex. *Leukemia* 2001;15:1388-97.
19. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281(5381):1312-6.
20. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995;270(5240):1326-31.
21. Chen YR, Wang X, Templeton D, Davis RJ, Tan TH. The role of c-Jun N-terminal kinase(JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *J Biol Chem* 1996;271:31929-36.
22. Verheij M, Bose R, Lin XH, Yao B, Jarvis WD, Grant S, Birrer MJ, Szabo E, Zon LI, Kyriakis JM, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick RN. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signaling in stress-induced apoptosis. *Nature* 1996;380(6569):75-9.
23. Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 1997;16:6914-25.
24. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins—suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:239-52.
25. Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, Maas J, Pien CS, Prakash S, Elliott PJ. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res* 1999;59(11):2615-22.
26. Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 1996;274(5288):782-4.
27. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science* 1996;274(5288):787-9.
28. Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS Jr. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 1996;274(5288):784-7.
29. Almond JB, Cohen GM. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 2002;16:433-43.
30. Orlowski RZ, Eswara JR, Lafond-Walker A, Grever MR, Orlowski M, Dang CV. Tumor growth inhibition induced in a murine model

- of human Burkitt's lymphoma by a proteasome inhibitor. *Cancer Res* 1998;58:4342-8.
31. Sun J, Nam S, Lee CS, Li B, Coppola D, Hamilton AD, Dou QP, Sefti SM. CEP1612, a dipeptidyl protease inhibitor, induces p21<sup>WAF1</sup> and p27<sup>KIP1</sup> expression and apoptosis and inhibits the growth of the human lung adenocarcinoma A-549 in nude mice. *Cancer Res* 2001;61:1280-4.
32. Sunwoo JB, Chen Z, Dong G, Yeh N, Bancroft CC, Sausville E, Adams J, Elliott P, Van Waes C. Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor- $\kappa$ B, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:1419-28.
33. Oikawa T, Sasaki T, Nakamura M, Shimamura M, Tanahashi N, Omura S, Tanaka K. The proteasome is involved in angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;246:243-8.
34. Teicher BA, Ara G, Herbst R, Palombella VJ, Adams J. The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 1999;5:2638-45.
-