

## 백서에서 고환적출 후 복측전립선의 Apoptosis 기전

충남대학교 의과대학 생화학교실<sup>1</sup>, 생리학교실<sup>2</sup>, 의학연구소<sup>3</sup>, 암공동연구소<sup>4</sup>

박 청<sup>1</sup> · 박종일<sup>1,3,4</sup> · 윤은진<sup>1</sup> · 송경섭<sup>1</sup> · 김종석<sup>1</sup>  
김영래<sup>1</sup> · 이상도<sup>2</sup> · 박승길<sup>1,3,4</sup> · 황병두<sup>1,3,4</sup> · 임 규<sup>1,3,4</sup>

### Mechanism of Castration-induced Apoptosis of Ventral Prostate in Rat

Chung Park<sup>1</sup>, Jong-Il Park<sup>1,3,4</sup>, Eun-Jin Yun<sup>1</sup>, Kyoung-Sub Song<sup>1</sup>, Jong-Seok Kim<sup>1</sup>,  
Young-Rae Kim<sup>1</sup>, Sang Do Lee<sup>2</sup>, Seung-Keil Park<sup>1,3,4</sup>, Byung-Doo Hwang<sup>1,3,4</sup>, Kyu Lim<sup>1,3,4</sup>

*Department of Biochemistry<sup>1</sup> and Physiology<sup>2</sup>, College of Medicine,  
Research Institute for Medical Science<sup>3</sup> and Cancer Research Institute<sup>4</sup>,  
Chungnam National University, Daejeon, Korea*

### ABSTRACT

**Backgrounds:** Castration-induced androgen deprivation triggers a sequence of events, which activates apoptotic cell death of the androgen-dependent epithelial cells within the rat ventral prostate. To investigate the mechanism of castration-dependent apoptosis in the rat ventral prostate, the regulation of apoptosis-related genes was been investigated.

**Methods:** Azaline B was subcutaneously injected into Sprague-Dawley rat. The Fas receptor (Fas), Fas ligand (FasL) and bcl-2 mRNA, as well as the protein levels were detected by RT-PCR and Western blot analyses. Azaline B-dependent apoptosis was determined using TUNEL and a DNA fragmentation assay. The transacting factor of the FasL promoter was identified by DNA footprinting and a DNA mobility shift assay.

**Results:** The rat prostate was regressed after castration, with and the involuted ventral prostate regenerated by testosterone pretreatment, but not by that with FSH. Apoptosis of the ventral prostate was detected, after castration, using toluidine blue staining, a TUNEL assay and an apoptotic DNA fragmentation assay. The levels of Fas, FasL mRNA and protein were increased after castration. In the DNase I footprinting assay, using the FasL promoter and a nuclear extract prepared from a control prostate, at least two sites were protected: the SP-1 binding site at -283 bp and the prostate-unidentified factor (P-UF) binding site at -247 bp. The SP-1 binding activity vanished in the nuclear extract prepared from castrated rats. In the DNA mobility shift assay, the SP-1 binding activity was slightly decreased after castration. Both the Bcl-2 mRNA and Bcl-2 protein were downregulated after castration.

**Conclusion:** These results suggest that the Fas/FasL system and Bcl-2 may be important to castration-dependent apoptosis in the rat ventral prostate, with SP-1 related to the castration-dependent regulation of the FasL gene (J Kor Soc Endocrinol 20:230~241, 2005).

---

**Key Words:** Fas receptor, Fas ligand, Apoptosis, Prostate

---

접수일자: 2005년 2월 7일

통과일자: 2005년 3월 11일

책임저자: 임 규, 충남대학교 의과대학 생화학교실

## 서 론

세포의 apoptosis는 배형성(embryogenesis) 전후에 나타나는 세포 사망 기전의 하나이며 세포자신의 파괴로 생체 균형을 유지하는데 중요한 역할을 한다[1]. 세포에서 apoptosis가 유도될 때에는 핵의 응축, DNA의 분절화, 막의 농포, 세포질내 공포 및 apoptotic body와 같은 특징적인 조직학적인 소견을 보이며[2] 생화학적으로는 bcl-2[3], myc 및 Fas/APO-1[4] 등과 같은 유전자 발현이 증감되어 그 단백질의 합성이 변동된다고 한다.

Apoptosis 신호전달 과정에 관여하는 사망신호 인자들 중 Fas는 TNF/NGF receptor family에 속하는 type I membrane protein이며 Fas ligand (FasL)나 Fas antibody와 결합하면 세포내 death signal을 활성화하여 apoptosis를 유도하며[5,6] 이는 Fas mutated mice에서 자가면역 질환 및 림프구 증식성 질환을 나타낸다고 한다[7]. 또한 FasL은 세포막에 존재하면서 Fas에 직접 작용하거나 metalloproteinase에 의해 세포막에서 절단되어 soluble FasL로 Fas와 결합하여 apoptosis를 유도한다[8-11]고 하며, 최근 FasL은 인체 melanoma, 간암, 대장암 세포주에 발현됨으로 암세포가 숙주의 면역감시체계를 회피하는데도 관여하리라 추론되고 있다[12]. Bcl-2는 apoptosis를 억제하는 바 anti-Fas 항체에 의해서는 Bcl-2의 하향조절과 apoptosis가 일어난다고 알려져 있다. 반면에 Bcl-2의 과발현시에는 Fas에 의한 apoptotic signal이 억제되거나 Bcl2가 결여되어 있는 mice의 전립선에서도 고환절제 후 Fas가 발현되는 것으로 보아 Bcl-2의 하향조절과 Fasmediated apoptosis와는 직접 관련되어 있지 않다고 한다[13].

한편 정상백서의 전립선 상피세포는 androgen의 조절하에 세포생성과 apoptosis 사이에 균형을 이루어 항상 일정한 세포수를 유지하고 있다[14]. 여러 가지 요인들이 이 미세한 균형에 관련되어 있지만 체내를 순환하는 androgen은 이 세포의 증식과 apoptosis 모두에 직접적으로 관여하는 것으로 알려져 있다[15]. 고환적출 등에 의해 전립선의 퇴축이 유도되며 이는 전립선내의 androgen 의존성인 선상피세포의 apoptosis로 나타난다[16]. 이 선상피세포는 백서의 복측전립선 세포의 약 85%를 차지하고 있으며 고환적출 후 7일째에는 약 70%가 apoptosis된다고 한다[16,17]. 고환절제 후 복측전립선에서 c-myc[18], insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)[19] 등이 발현됨으로 이는 복측전립선의 apoptosis와 관련 있다고 알려져 있다. 또한 전립선 및 부고환 등 생쥐웅성생식기관과 자성생식기관의 생식선 절제술(gonadectomy)에 따른 퇴축이 일어날 때 Fas 발현이 증가되고 Bcl-2는 하향조절되어 apoptosis가 일어나지만[20] Fas mutated (lpr-/-) mice에서는 고환절제에 의한 전립선의 apoptosis가 잘 일어나지 않는다고 알려져 있다[21]. 그러나

고환적출 후 전립선의 apoptosis에 대한 Fas/ FasL system의 관련성과 그 전사조절에 대한 연구는 거의 알려져 있지 않다.

이에 고환적출로 androgen 차단 후 복측전립선의 apoptosis를 TUNEL assay 및 apoptotic DNA fragmentation으로 확인하고 FasL, Fas 유전자 발현을 RT-PCR 및 Western blot으로 검색하는 한편 이때 FasL 전사 조절기전을 규명한 바 약간의 지견을 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

## 대상 및 방법

### 1. 실험동물 및 약물투여

고환적출술(250~300 g Sprague Dowley 사용)은 백서를 ether 마취하고 음낭을 통해 양측고환을 노출한 다음 양측 정맥에서 결찰하여 적출하였다. 또한 수술에 의한 영향을 배제하기 위해 대조군으로는 가성수술(sham operation)을 시행한 것으로 하였으며 이는 백서의 음낭을 절개하고 고환을 노출시킨 후 재봉합하였다. Testosterone은 하루 5 mg, FSH는 20 IU 용량으로 고환적출 30분전에 주사하였다.

### 2. Terminal deoxynucleotidyl transferase dependent dUTP nick end labeling (TUNEL) assay

고환적출군 및 대조군의 전립선을 적출해서 Apop Tag<sup>®</sup> Plus peroxidase in situ apoptosis detection kit을 사용하여 염색하였다. 즉, 전립선조직을 3.7% formaldehyde로 고정 한 후 paraffine block을 만든 다음 초박절편기를 이용 5 µm 두께로 박절하여 poly-L- lysine 처리된 유리 slide 위에 얹은 다음 58℃에서 2시간 동안 가열하여 slide에 고착시켰다. Slide 상의 조직을 xylene으로 탈수하고 ethanol로 다시 재탈수한 후 terminal deoxynucleotidyl transferase와 anti-digoxigenin peroxidase conjugate로 반응시키고 diaminobenzidine (DAB)으로 발색하였으며 methyl green으로 counterstaining하여 광학 현미경으로 400배 시야에서 검정하였다.

### 3. Apoptotic DNA fragmentation (Chromosomal DNA extraction) assay

전립선조직으로부터의 DNA 조제 및 DNA fragmentation assay는 Tilly 등[22]의 방법을 변개한 Lim 등[18]의 방법으로 시행하였다. 즉 전립선조직을 5배 용량의 homogenization buffer (0.1 M sodium chloride, 0.01 M EDTA pH 8.0, 0.3 M Tris-HCl pH 8.0, 0.2 M sucrose)와 함께 Teflon pestle glass homogenizer를 이용해서쇄균하고 이 용액에 0.05배 용량의 10% SDS를 첨가하고 진탕 혼합하여 65℃에서 30분 반응하였다. 반응 후 0.2배 용량의 5 M potassium acetate를 첨가하여 잘 섞은 다음 4℃에서 1시간 반

응시키고, 5000× g에서 10분간 원심 하였다. 상청액을 취하여 0.01배 용량의 proteinase K (1 mg/mL)를 첨가해서 50℃에서 18시간 반응하였다. 1배 용량의 phenol : chloroform (1 : 1) 및 chloroform 용액을 순차적으로 처리한 후 ethanol로 침전시켰다. 원심하여 얻은 침전물을 50 µL TE (pH 8.0) buffer로 녹인 다음 DNase- free RNase (0.5 mg/mL)를 1 µL 넣어 37℃에서 1시간 반응시켰다. 이를 다시 1배 용량의 phenol : chloroform (1 : 1) 및 chloroform 용액을 순차적으로 처리하고 ethanol로 침전시켰다. 원심 하여 얻은 침전물을 TE (pH 8.0) buffer에 녹여 정량한 후 -20℃에 보관 사용하였다. DNA의 end labeling은 0.5 µg의 DNA, 10 µL의 CoCl<sub>2</sub>가 포함된 5×terminal transferase buffer, 5 µL의 α-<sup>32</sup>P]-ddATP (50 µCi)가 포함된 반응액에 1 µL의 terminal transferase (25 U)를 가하여 37℃에서 60분 반응시키며 반응은 5 µL의 0.25 M EDTA로 정지시켰다. <sup>32</sup>P 표지된 DNA는 ethanol로 침전시켜 이를 TE buffer에 녹여 전기영동 할 때까지 -20℃에 보관하였다. <sup>32</sup>P 표지된 DNA는 2% agarose gel에서 전기영동 하여 gel을 건조시킨 후 autoradiography를 시행하였다. Low molecular weight DNA (≤15 kb)에 전입된 [α-<sup>32</sup>P]-ddATP의 정량은 건조된 gel을 잘라내어 liquid scintillation counter로 측정하였다.

#### 4. Total RNA 조제

Total RNA는 Ultraspec II<sup>®</sup> kit을 이용하여 분리하였다. 즉, 고환적출군 및 대조군에서 전립선을 절제하여 무게를 측정하였다. 측정된 무게에 적정 (1~100 mg당 1 mL) 부피의 Ultraspec II<sup>®</sup> 용액을 가해 Teflon pestle glass를 이용해서 조직을 쇄균하였다. 이 용액을 4℃에서 5분간 방치한 후, 0.2배 용량의 chloroform 용액을 가하고 진탕 혼합하였다. 이를 다시 4℃에서 5분간 방치하고, 4℃ 12,000 rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 원심분리 후, 상청액을 취하여 0.5배 용량의 isopropylalcohol을 가하고, 이에 Ultraspec II resin을 0.05배 용량 가하여 진탕 혼합하고 12,000 rpm에서 1분간 원심분리 하였다. 이때 얻은 침전물을 70% ethanol로 2회 씻고 침전물을 건조시켰다. 그리고 침전물에 DEPC 처리한 증류수를 가해 resin에 결합되어 있는 RNA를 용출 시켰

다. 이렇게 얻은 total RNA는 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 방법으로 그 농도를 측정하고, 사용할 때까지 -70℃에서 50% ethanol 용액에 보관하였다.

#### 5. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

대조군 및 고환적출군 백서 전립선조직의 Fas 및 FasL mRNA 발현을 검색하기 위해 Lee 등[23]의 방법을 변개한 Park 등[24]의 방법으로 RT-PCR을 시행하였다. 즉, 1 µg의 total RNA를 65℃에서 5분간 가열 변성시키고 얼음 속에서 급랭시킨 후 8 µL의 10×RT buffer (0.5 M Tris-Cl, 0.5 M KCl, 0.1 M DTT, 0.05 M MgCl<sub>2</sub>, pH 8), 4 µL의 10×dNTP (2.5 mM dATP, 2.5 mM dTTP, 2.5 mM dCTP, 2.5 mM dGTP), 1 µL의 oligo-dT<sub>15</sub> (100 pmoles/µL), 4 µL의 RNase inhibitor, 10 U의 reverse transcriptase를 가하고 총 반응액이 40 µL 되도록 조절한 후 42℃에서 1시간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. cDNA를 증폭시키기 위해 10 µL의 10×PCR buffer (0.1 M Tris-Cl, 0.5 M KCl, 0.015 M MgCl<sub>2</sub>, pH 8.0), 10 µL의 10×dNTP (2.5 mM dATP, 2.5 mM dTTP, 2.5 mM dCTP, 2.5 mM dGTP), 100 pmoles의 Fas, FasL 혹은 Bcl-2 primer, 2 U의 Taq DNA polymerase를 가해 총 반응액이 100 µL 되도록 하여 PCR을 시행하였다. Fas의 PCR 증폭 조건은 94℃에서 1분 denaturation, 58℃에서 1분 annealing, 72℃에서 1분 extension한 다음 마지막으로 72℃에서 3분 final extension 하였으며, FasL의 PCR 증폭조건은 94℃에서 1분 denaturation, 65℃에서 1분 annealing, 72℃에서 1분 extension한 다음 마지막으로 72℃에서 5분 final extension하였고, 또한 bcl-2의 PCR 증폭 조건은 95℃에서 1분 denaturation, 65℃에서 1분 annealing, 72℃에서 1분 extension한 다음 마지막으로 72℃에서 5분 final extension하여 eppendorf Mastercycler 5332로 35회 반복시켰다. 이후 증폭된 DNA 산물을 1.2% agarose gel 상에서 전기영동 시킨 후 band를 확인한 다음 UV-transilluminator하에서 사진 촬영하였다. 보고된 Fas와 FasL cDNA 염기서열에 따라 합성시킨 oligonucleotide primer들의 염기서열과 예상된 PCR product의 size는 Table 1과 같다.

**Table 1.** Primers for PCR of Fas, FasL and β-actin and Size of PCR Products

	Sense primer	Antisense primer	Size of PCR product
Fas	5'-CTCAAGGATGTCCTCAAGTC-3' (20 mer)	5'-CCCCGAGTTAAATGTTTCGAA-3' (20 mer)	414 bp
FasL	5'-CATATCTGGCCAGTAGTGCACTTAATTC-3' (28 mer)	5'-GGAATGGGAAGACACATATGGAACCTCTC-3' (28 mer)	238 bp
bcl-2	5'-CTGGTGGACAACATCGCTCTG-3' (21 mer)	5'-GGTCTGCTGACCTCACTTGTG-3' (21 mer)	228 bp
GAPDH	5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGATT-3' (24 mer)	5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3' (24 mer)	307 bp

## 6. Northern blot hybridization

Northern blot hybridization은 Virca 등[25]의 방법을 변 개한 Lim 등[26]의 방법에 따라 시행하였다. Total RNA (10~50 µg)를 formaldehyde와 formamide 용액하에서 denaturation하여 formaldehyde-1.2% agarose gel로 전기영동 하였다. RNA를 gel로부터 nytrane membrane에 transfer하여 5×SSC (1×SSC = 0.5 M NaCl + 0.015 M Na-Citrate)로 씻고 건조된 RNA blot를 hybridization (50 mM PIPES, 100 mM NaCl, 50 mM sodium phosphate, 1 mM EDTA 그리고 5% SDS가 포함된 용액) 용액으로 60℃에서 1시간 동안 prehybridization 시킨 후 용액을 버리고 10<sup>6</sup> cpm/mL의 probe이 포함된 새로운 hybridization 용액을 가하여 같은 온도에서 하룻밤 hybridization 하였다. Hybridization이 끝나면 5% SDS가 포함된 1×SSC로 실온에서 10분간 세척하고 다시 같은 용액으로 hybridization 온도에서 20분간 세척한 후 autoradiography를 하였다. 이때 prostatein C1의 probe으로는 pC1을 Pst I으로 절단한 후 얻은 420 bp, TRPM-2의 probe으로는 pT17H를 EcoR I으로 절단하여 얻은 1.7 kb의 DNA fragment를 electroelution한 다음 random primed DNA labeling kit로 <sup>32</sup>P를 labeling하여 사용하였다.

## 7. Nuclear extracts 조제

Nuclear extracts의 조제는 Gorski 등[27]의 방법을 변 개한 Lim 등[28]의 방법에 의하여 조제하였다. 적출 해낸 전립선조직에 5배 용량의 homogenization buffer (10 mM HEPES pH 7.9, 25 mM KCl, 0.15 mM spermine, 0.5 mM spermidine, 1 mM EDTA, 2 M sucrose, 10% glycerol)를 가하여 glass teflon homogenizer로 8회 처리한 후 Sorvall AH 627 rotor로 25,000 rpm에서 55분 초원심 하였다. 얻어진 침전물을 homogenization buffer : glycerol (9 : 1) 용액 25 mL로 부유시킨 후 다시 Sorvall AH 627 rotor로 25,000 rpm에서 45분 초원심하여 핵분획을 얻었다. 이것을 15 mL의 Lysis buffer (10 mM HEPES pH 7.9, 100 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 10% glycerol)로 all glass dounce homogenizer (A type)를 이용하여 부유시켰다. 여기에 0.1배 용량의 4 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 가하여 빙냉하에서 30분 동안 교반한 후 Sorvall Type 65 rotor로 45,000 rpm에서 1시간 초원심하였다. 상청액을 취해서 최종농도가 0.3 g/mL되는 양의 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 분말을 가한 후 35,000 rpm에서 25분 초원심 하였다. 얻어진 침전 물을 적당량의 투석 용액으로 녹인 다음 1 liter의 동일한 투석 용액으로 4~12시간 투석하고 12,000 rpm에서 원심 하여 침전물을 제거하였다. 얻어진 용액은 소량씩 분주하여 -70℃에 보관하였고 필요시 사용하였다.

## 8. DNase I footprinting

### 1) End labeled DNA 조제

50 µg의 pGLBasic-FasL-Luc-3을 Hind III로 절단하고 phenol, phenol/chloroform, chloroform으로 처리한 다음 ethanol로 침전시킨 후 calf intestine phosphatase (CIP)로 dephosphorylation하여 이를 다시 [<sup>32</sup>P]-ATP (6,000 Ci/mmol)를 이용하여 T4 polynucleotide kinase로 말단 표지 한 다음 Xho I으로 처리하고 1.2% agarose gel로 전기영동 한 후 long wave UV trans-illuminator로 317 bp의 band를 확인하였다. 이 band를 잘라내어 JETquick<sup>®</sup> elution kit를 사용하여 정제하고 그 방사능을 측정하여 실험에 사용하였다.

### 2) DNase I footprinting assay

DNase I footprinting assay는 Lim 등[28]의 방법에 따라 시행하였다. 즉 1 µL의 end labeled DNA (10,000 cpm)와 대조군, 고환적출군 및 azaline B 주사군의 조직에서 조제 한 80 µg의 nuclear extract, 10 µL의 DNase I footprinting buffer (300 mM KCl, 100 mM HEPES, pH 7.9, 40% glycerol, 5 mM DTT), 2 µL의 poly[dI-dC] (1 mg/mL), 2 µL의 5 mM PMSF가 포함된 반응액을 15분간 빙냉하에 전 부치한 다음 적당량의 DNase I으로 처리하여 10분 동안 부 치 한 후 반응 정지액 (0.6 M NaCl, 0.2% SDS, 10 mM EDTA)을 가하였다. 이를 phenol/chloroform 2회, chloroform 1회 처리 후 ethanol로 침전시켜 5% sequencing gel로 전기영동 한 다음 autoradiography를 시행하였다.

## 9. DNA mobility shift assay

DNA mobility shift assay[28]는 20 µg nuclear extract, 2 µL poly[dI-dC], 4 µL의 5×mobility shift assay buffer (60 mM HEPES, 300 mM KCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 60% glycerol, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7.9)가 포함된 반응액을 15 분간 실온에서 전부치한 다음 <sup>32</sup>Plabel된 DNA probe (Upperstrand, 5'-AGAAATTGTGGGCGGAA ACTTCCAGG-G-3')과 30분간 반응시키고 4% native polyacrylamide gel에서 전기영동 한 다음 건조시킨 후 autoradiography하여 DNA에 결합된 단백질을 동정하였다. 이때 사용된 DNA probe는 cis-element를 포함하는 oligonucleotide를 합성하여 사용하였다.

## 10. Western blot

### 1) 단백질 조제

고환적출군 및 대조군의 전립선을 절제하여 액체 질소로 급결하여 -70℃에 보관하였으며, 이들 조직 100 mg에 RIPA buffer (1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS 및 protease inhibitors (0.02 mg/ml aprotinin, 0.1 µg/mL

leupeptin))을 3 mL 가하여 Teflon pestle glass를 이용하여쇄균하였다. 쇄균액을 13,000×g, 4℃하에서 30분 원심하여상청액을 얻었고 이들의 정량은 Bio-Rad protein assay를 이용하여하였으며 소량씩 분주하여 -70℃에 보관하여 사용하였다.

## 2) Immunoblot analysis

40 µg의 단백질을 15% SDS-PAGE에 전기영동한 다음 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. 이 membrane을 5% skim milk 용액을 이용, 실온에서 1시간 blocking한 다음 잘 세척하여 1차 항체로는 Fas는 0.2 µg/mL rabbit polyclonal antimouse Fas antibody, FasL는 0.2 µg/mL rabbit polyclonal antirat FasL antibody를 그리고 Bcl-2는 0.2 µg/mL mouse monoclonal antihuman Bcl-2 antibody를 사용하였다. 2차 항체로는 HRP-conjugated antirabbit IgG antibody 및 antimouse IgG antibody를 2000배 희석하여 사용하였으며 Amersham Pharmacia Biotech사의 ECL system을 이용하여 X-ray film에 감광하여 관찰하였다.

## 11. 기타 실험 방법

Nuclear extract의 단백질 정량은 spectrophotometer를 이용한 Kalb 등[29]의 A<sub>230</sub>/A<sub>260</sub> 방법에 따라 시행하였다.

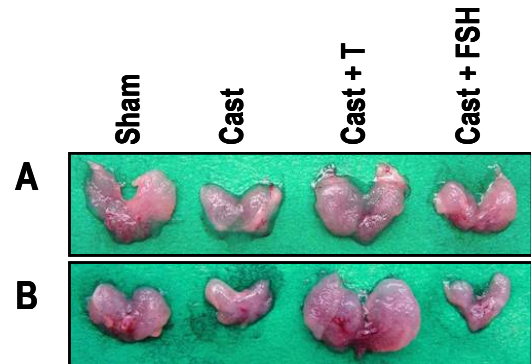
## 결 과

### 1. 고환적출 후 전립선 조직의 형태학적 변동

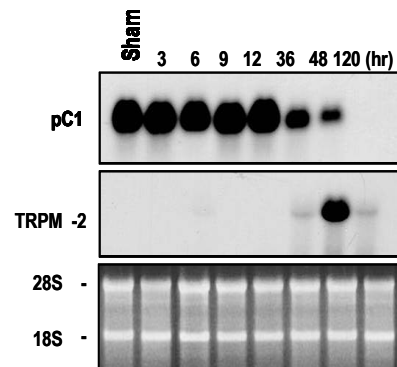
실험적으로 백서의 복측전립선은 고환적출 후 퇴축이 일어난다고 하며 이는 androgen 결핍 때문이라고 알려져 있다 [16,17]. 이에 본 실험에서는 먼저 고환적출 방법으로 전립선조직에 대한 androgen 공급 차단 후 전립선조직의 형태학적인 변동을 검색하였다. 먼저 48시간 후 전립선 조직의 퇴축이 관찰되었으며 5일 후에는 더 많은 퇴축이 나타났다. Testosterone 전처리 후 고환적출 했을 때는 전립선 조직의 퇴축은 나타나지 않고 도리어 전립선조직의 비대가 나타났으며 FSH 전처리 했을 때는 testosterone과는 달리 전립선조직의 퇴축이 정상군 수준으로 회복되지 않았다 (Fig. 1). 따라서 본 실험조건하에서 나타난 전립선조직의 퇴축이 고환적출에 따른 androgen 차단에 의해 전립선조직내 testosterone의 고갈됨으로 나타난 현상임이 확인되었다.

### 2. 고환적출 후 prostatein C1 및 TRPM-2 유전자 발현

Prostatein C1은 androgen에 의해 조절받는 prostatic steroid binding protein으로 고환적출 후 androgen 양이 낮아지면 그 유전자 발현이 감소한다[30]. 또한 TRPM-2 (testosterone-repressed prostate message-2)는 고환적출 후 증가[31]되고 androgen에 의해 억제되는 단백질로 알려져

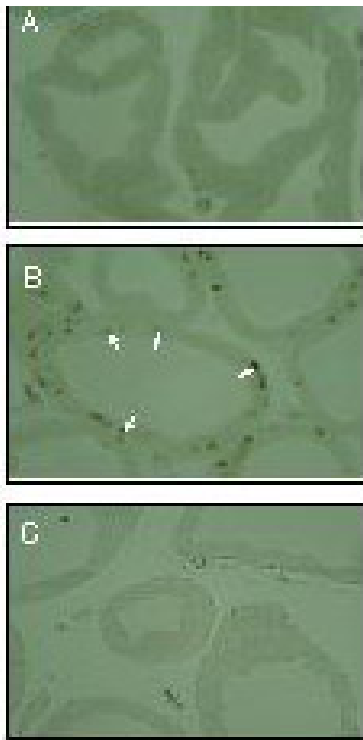


**Fig. 1.** Regression and regrowth of the rat ventral prostate gland in response to androgen manipulation. The ventral prostate obtained of 48 hours (A) or 5 days (B) after castration are shown, respectively. The other assays were performed as described in Materials and Methods. Cast, castration; T, testosterone; FSH, follicle stimulating hormone.



**Fig. 2.** Time course of the castration-dependent changes of prostatein C1 and TRPM-2 mRNA in the ventral prostate. At the indicated time, ventral prostate was removed from groups of rats which were either sham operated or castrated, and total RNA was prepared. Total RNA (30 µg) was analyzed by Northern blot hybridization using prostatein C1 and TRPM-2 cDNA probe as described in Materials and Methods.

있다. 이에 본 실험에서 고환적출 후 testosterone의 차단이 일어났는가를 확인하기 위하여 전립선 퇴축의 중요한 인자인 prostatein C1과 TRPM-2 발현을 Northern blot hybridization으로 검색하였다. Prostatein C1 mRNA는 대조군에서 발현이 증가되어 있으나 고환적출 48시간 후 감소하였으며 TRPM-2 mRNA는 대조군에서 발현되지 않으나 고환적출 48시간 후 발현이 강하게 유도되었다 (Fig. 2). 이는 본 실험에서 고환적출술에 따른 androgen이 감소되어 있음을 시사하는 것이다.



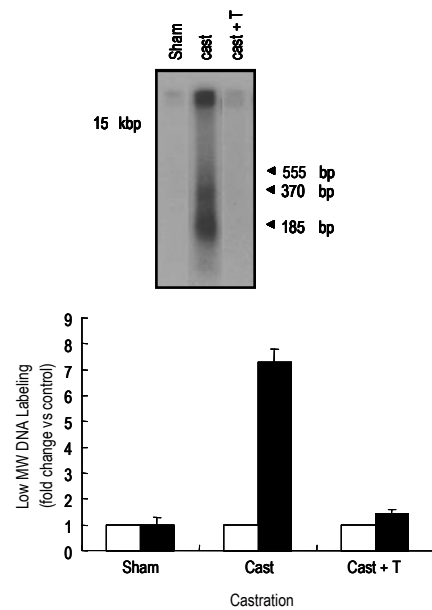
**Fig. 3.** Terminal deoxynucleotidyl transferase dependent dUTP nick end labeling (TUNEL) assay after castration. They were visualized by diaminobenzidine (DAB) and other cells were counter stained with methyl green as described in Materials and Methods. A, sham operation; B, castration; C, testosterone supplementation. Magnification:  $\times 400$ .

### 3. 고환적출 후 TUNEL assay를 이용한 apoptotic cell의 검색

고환적출 후 백서의 복측전립선이 퇴축되며 이는 androgen 결핍에 의해 전립선의 선상피세포가 apoptosis되기 때문인 것으로 알려져 있다[16]. 이에 본 실험에서도 고환적출 후 전립선 조직의 apoptosis를 확인하기 위하여 TUNEL assay를 시행하였다. 즉 대조군, 고환적출군 및 testosterone 전처리한 고환적출군에서 각각 TUNEL assay를 시행한바 대조군 전립선 세포에서는 apoptotic cell이 거의 관찰되지 않았으나 고환적출 48시간 후에는 apoptotic cell이 증가하였으며 이들 apoptotic cell들은 testosterone의 전처리 후에는 관찰되지 않았다(Fig. 3).

### 4. 고환적출 후 전립선 조직의 apoptotic DNA fragmentation assay

고환적출 후 백서의 전립선 조직에서 나타나는 apoptosis를 확인하기 위하여 DNA fragmentation assay를 시행하였다. 즉 고환적출 48시간 후 전립선조직을 적출하여 apoptotic DNA fragment를 확인하기 위하여 실험방법에 따

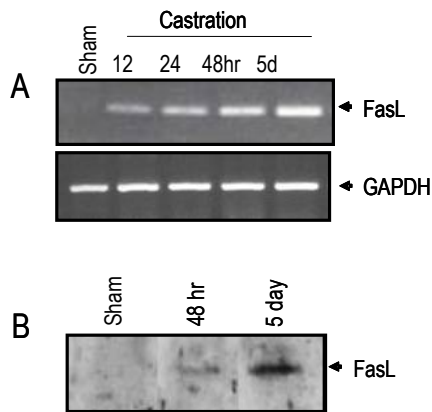


**Fig. 4.** Testosterone suppression of castration-induced apoptotic DNA fragmentation in rat ventral prostate. Before castration, testosterone (5 mg/day) were subcutaneously injected as 24 hrs intervals. After 48 hours, the rats were killed. a, DNA was isolated from ventral prostate, labeled on 3'-ends with [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dideoxy-ATP, and analyzed by electrophoresis in 2% agarose gel. Autography and  $\beta$ -counting of low-molecular weight ( $\leq 15$  kb) DNA fractions were followed. The amount of [ $\alpha$ - $^{32}$ P]- dideoxy-ATP incorporated into DNA fractions from different groups were compared with that of intact animals at each time point an arbitrary unit 1.0. Cast, castration; Sham, sham operation; T, testosterone.

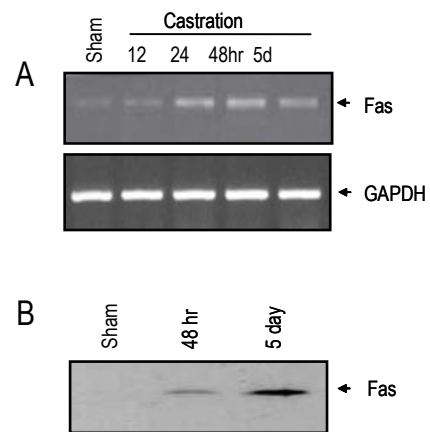
라 DNA를 조제하여 3'-end에 terminal transferase와 [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dideoxy-ATP로  $^{32}$ P-표지하여 2% agarose gel에 전기영동한 바 고환적출 후 전형적인 apoptotic DNA fragment가 관찰되었으며 이는 testosterone 전처리 후에는 거의 대조군 수준으로 회복되었다(Fig. 4). 이는 전립선 조직의 유지에 testosterone이 매우 중요함을 시사한다.

### 5. 고환적출 후 FasL 유전자 발현

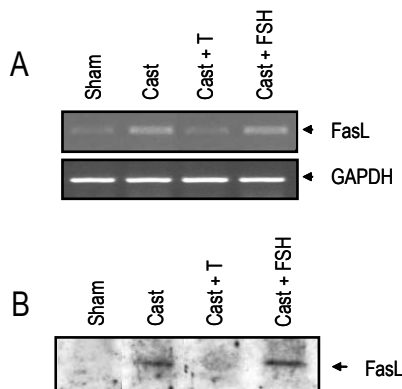
Fas-mediated apoptosis에서 FasL은 Fas에 결합하여 apoptosis를 유발한다고 알려져 있다[5,6]. 이에 고환적출 후 전립선 조직의 apoptosis 기전에 대한 FasL의 관련성을 밝히기 위해 본 실험을 시행하였다. 먼저 고환적출에 따른 FasL mRNA의 변동을 확인하기 위하여 고환적출 후 시간 경과에 따른 FasL mRNA 변동을 RT-PCR로 검색한 바 FasL mRNA 양은 238 bp에서 나타났으며 시간이 경과함에 따라 점차 증가하였다(Fig. 5A). 고환적출 후 FasL 단백질량의 변동을 FasL의 polyclonal antibody를 이용하여 Western blot으로 검색한 바 FasL 단백질량은 고환적출 후 대조군에 비해 증가하였다(Fig. 5B). 고환적출 후 전립선조직의



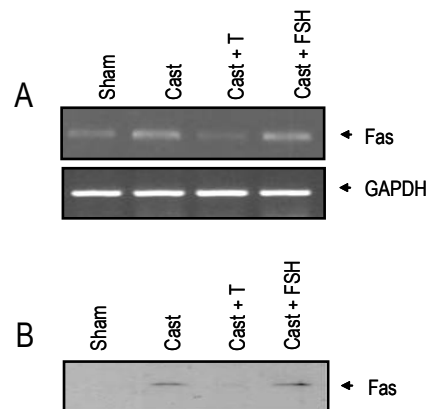
**Fig. 5.** Time course of castration-dependent change of FasL mRNA in rat ventral prostate. The FasL mRNA and protein levels were measured by RT-PCR and Western blot, respectively as described in Materials and Methods. PCR products were separated on 1.2% agarose gel containing ethidium bromide. Animals were killed at indicated time after castration A, RT-PCR; B, Western blot.



**Fig. 7.** Time course of castration-dependent change of Fas mRNA in rat ventral prostate. The Fas mRNA levels and protein were measured by RTPCR and Western blot, respectively, as described in Materials and Methods. PCR products were separated on 1.2% agarose gel containing ethidium bromide. Animals were killed at indicated time after castration A, RT-PCR; B, Western blot.



**Fig. 6.** Effect of testosterone and FSH on castration-induced FasL gene expression. Before castration, testosterone (5 mg/day) and FSH (20 IU/day) were subcutaneously injected as 24 hrs intervals. The FasL mRNA and protein levels were measured by RT-PCR as described in Materials and Methods. PCR products were separated on 1.2% agarose gel containing ethidium bromide. A, RT-PCR; B, Western blot. T, testosterone; AzB, azaline B.



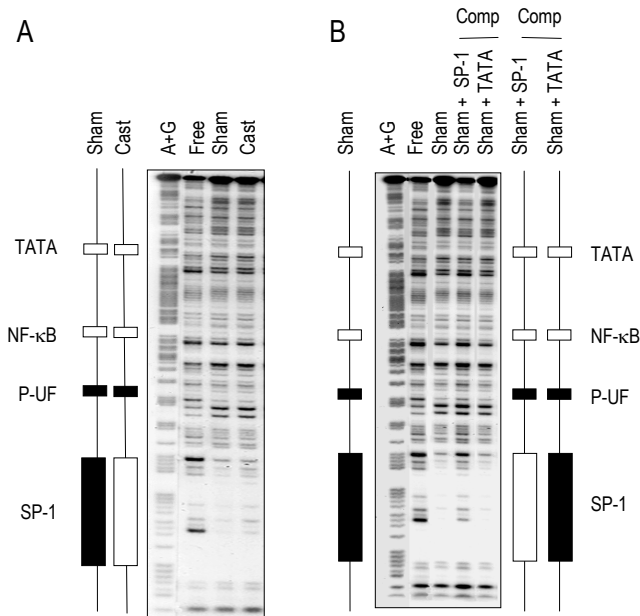
**Fig. 8.** Effect of testosterone and FSH on castration-induced Fas gene expression. Before castration, testosterone (5 mg/day) and FSH (20 IU/day) were subcutaneously injected at 24 hrs intervals. The Fas mRNA and protein levels were measured by RT-PCR and Western blot, respectively as described in Materials and Methods. PCR products were separated on 1.2% agarose gel containing ethidium bromide. A, RT-PCR; B, Western blot.

apoptosis는 testosterone이 밀접히 관련되어 있으므로 본 실험에서 고환적출 후 증가된 FasL 발현에 대한 testosterone의 영향을 검색하였다. 고환적출 후 증가된 FasL mRNA 및 FasL 단백질량은 testosterone 전치리에 의해 대조군 수준으로 감소되었으나 FSH는 전혀 영향이 없었다 (Fig. 6A, 6B). 이는 고환적출 후 증가된 FasL 유전자 발현에 testosterone의 차단이 밀접히 관련되어 있음을 시사한다.

## 6. 고환적출 후 Fas 유전자 발현

Fas는 Fas ligand와의 결합에 의하여 세포내 apoptosis 신호를 전달하는 세포표면의 수용체이다[4]. 이에 고환적출에 따른 Fas mRNA의 변동을 확인하기 위하여 고환적출 후 시간경과에 따른 Fas mRNA 변동을 RT-PCR로 검색한 바 Fas mRNA 양은 414 bp에서 나타났으며 시간이 경과함





**Fig. 9.** The pattern of protein-binding site on the minimal FasL promoter region. The FasL promoter fragment (Hind III-Xho I) was labeled with [ $\gamma$ - $^{32}$ P]- dATP in the presence of T4 polynucleotide kinase at the -318 bp position of the coding, Upper strand. The labeled probe was incubated with 80  $\mu$ g nuclear extracts from rat testis, and the mixtures were digested with 2  $\mu$ L of DNase I (4,000 units/mL) for 30 minutes on the ice. After extraction with phenol/chloroform, the DNAs were resolved by electrophoresis on a 5% polyacrylamide gel in 8 M urea and the labeled DNA bands were visualized by autoradiography. The lane indicated by A+G is the wild type probe digested at adenine and guanine residues. The other assays were performed as described in Materials and Methods. A, DNase I footprinting; B, the sequences of 5'-flanking region of FasL gene. The arrow denoted the hypersensitive site. □, no protection; ■, protection.

에 따라 점차 증가하였다 (Fig. 7A). 고환적출 후 Fas 단백질량의 변동을 Fas의 polyclonal antibody를 이용하여 Western blot으로 검색한 바 Fas 단백질량은 고환적출 후 대조군에 비해 증가하였다 (Fig. 7B). 고환적출 후 전립선조직의 apoptosis는 testosterone이 밀접히 관련되어 있으므로 본 실험에서 고환적출 후 증가된 Fas 발현에 대한 testosterone의 영향을 검색하였다. 고환적출 후 증가된 Fas mRNA양 및 Fas 단백질은 testosterone 전처리에 의해 대조군 수준으로 감소되었으나 FSH는 전혀 영향이 없었다 (Fig. 8A, 8B). 이는 고환적출 후 증가된 Fas 유전자 발현에 testosterone의 차단이 밀접히 관련되어 있음을 시사한다.

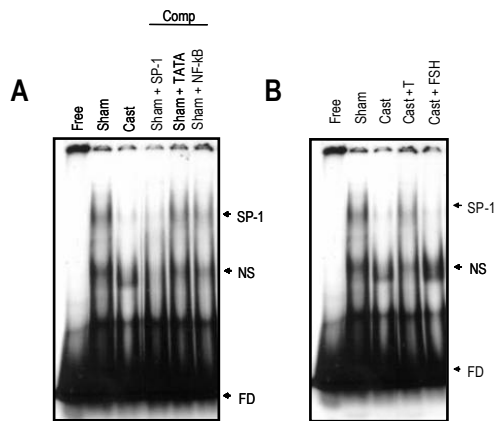
#### 7. 고환적출 후 전립선 조직에서 FasL promoter에 결합하는 핵단백질인자의 동정

상기실험에서 고환적출 후 전립선 조직의 apoptosis가 나타났으며 이때 FasL 유전자 발현이 증가하였다. FasL promoter의 유전자 서열에는 이미 잘 알려진 cis element인 SP-1 (-283 bp), NF-kB (-218 bp), TATA (-132 bp), v-IRE (-78 bp) 결합부위가 존재하는 것으로 보고되고 있다[31, 32]. 따라서 고환적출 후 전립선 조직으로부터 각각 nuclear extract를 조제한 다음 FasL 유전자 promoter에 결합하는 transacting factor들을 DNase I footprinting 방법으로 동정

하고 그 변동 양상을 검색함으로 고환적출 후 FasL 유전자 전사조절기전에 관여하는 핵단백질인자를 밝히고자 본 실험을 시행하였다. 먼저 고환적출하지 않은 가성수술군 백서의 전립선조직으로부터 nuclear extract를 조제하여 상기조건으로 DNase I footprinting을 시행한 바 SP-1 (-283 bp) 및 밝혀지지 않는 새로운 염기서열 (-247 bp, -GAGGCTT-이하 prostate-unidentified factor, PUF)에 결합하는 단백질이 동정되었으나 NF-kB, TATA 등에 결합하는 단백질은 발견되지 않았다. 고환적출 48시간 후 전립선조직에서 조제한 nuclear extract에서는 SP-1 (-283 bp)에 결합하는 단백질은 거의 사라졌으며 P-UF (-247 bp)에 결합하는 단백질만 관찰되었다 (Fig. 9A).

한편 SP-1 (-283 bp) 결합부위에 결합하는 핵단백질이 SP-1 (-283 bp) 결합부위에 특이적으로 결합하는지를 밝히기 위해 SP-1 (-283 bp) 결합부위를 포함하고 있는 합성 oligonucleotide 등을 DNase I footprinting 반응액에 competitor들로 첨가하여 competition assay를 시행했을 때 SP-1 (-283 bp)에 결합하는 핵단백질은 SP-1 (-283 bp) 결합부위를 competition했을 때는 사라졌으나 TATA (-132 bp) 결합부위를 competitor로 했을 때는 영향을 받지 않았다 (Fig. 9B). 이는 SP-1 (-283 bp) 결합부위에 결합하는 핵단백질은 SP-1 결합부위가 포함된 염기서열에 특이적인 결합





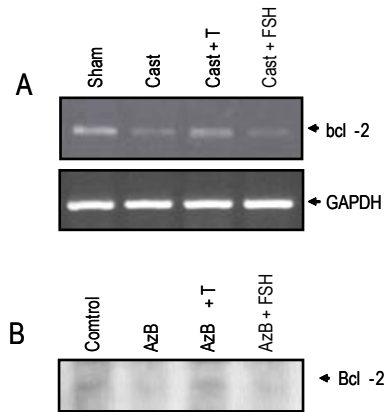
**Fig. 10.** Effect of castration on binding activity of nuclear extracts of prostate to SP-1 motif. Nuclear extracts from rat ventral prostate of sham and castrated were incubated with <sup>32</sup>P-labeled double strand oligonucleotides corresponding to -293~-266 bp from the transcription initiation site. DNA-protein complexes were resolved native 4% polyacrylamide gel and visualized by autoradiography. The other assays were performed as described in Materials and Methods. Free did not contain nuclear extracts. FD, Free DNA probe; Comp, competitor.

임을 시사한다.

#### 8. DNA mobility shift assay에 의한 FasL promoter의 SP-1 결합부위 (-283 bp)에 결합하는 핵단백질인자의 양적변동

상기 DNase I footprinting 결과에서 고환적출하지 않은 대조군의 복측전립선 nuclear extract에서는 -283 bp의 SP-1 결합부위에 결합되는 핵단백질이 동정되었으며 이는 고환적출 후 거의 사라졌다. 따라서 이들 -283 bp의 SP-1에 결합하는 핵단백질 인자들의 양적 변동을 DNA mobility shift assay로 검색하였다. 먼저 대조군의 nuclear extract에서는 SP-1 결합부위에 결합하는 핵단백질이 검출되었으나 고환적출 후 복측전립선에서 조제한 nuclear extract를 사용했을 때는 SP-1의 결합활성이 거의 검출되지 않았다. 이 핵단백질이 SP-1 결합부위 (-283 bp)에 특이적으로 결합하는가를 구명하기 위해 TATA 및 NF-κB 결합부위를 competitor로 사용했을 때 SP-1 결합부위 (-283 bp)에 대한 SP-1의 결합 활성에는 전혀 영향을 미치지 않았다 (Fig. 10A). 따라서 이 단백질은 SP-1 결합부위에 특이적인 SP-1으로 생각되며 이는 대조군의 복측전립선에서 FasL의 발현억제에 관여함을 시사한다.

SP-1 (-283 bp) 결합부위에 결합하는 핵단백질의 변동이 고환적출에 따른 testosterone의 감소 때문인지 밝히기 위하여 testosterone 전처리 후 고환적출하여 얻은 전립선조직 nuclear extract로 DNA mobility shift assay를 시행한 바



**Fig. 11.** Effect of testosterone and FSH on castration-induced Bcl-2 gene expression. Before castration and azaline B administration, testosterone (5 mg/day) and FSH (20 IU/day) were subcutaneously injected at 24 hrs intervals. The bcl-2 mRNA and protein levels were measured by RT-PCR and Western blot, respectively, as described in Materials and Methods. PCR products were separated on 1.2% agarose gel containing ethidium bromide. A, RT-PCR; B, Western blot.

고환적출 후 감소한 SP-1 결합부위에 결합하는 핵단백질이 대조군 수준으로 회복되었다 (Fig. 10B). 이는 고환적출 후 FasL 유전자 발현에 FasL promoter에 있는 SP-1 결합부위에 결합하는 단백질이 중요함을 시사한다.

#### 9. 고환적출 후 Bcl-2 유전자 발현

Bcl-2의 하향조절과 apoptosis는 밀접한 관련성이 있으며 최근 Bcl-2가 Fas에 의한 apoptotic death signal 전달을 차단한다고 알려져 있다[13]. 이에 본 실험에서 고환적출 후 일어나는 apoptosis에 Bcl-2 유전자 발현의 관련성을 밝히기 위해 고환적출 후 전립선을 적출하고 total RNA를 조제하여 RT-PCR을 시행하였다. 대조군에서는 bcl-2 mRNA가 존재하였으나 고환적출 후 사라졌으며 이는 testosterone 전처리로 회복되었으나 FSH에 의해서는 영향이 없었다 (Fig. 11A). 또한 고환적출 후 Bcl-2 단백질량의 변동을 Western blot으로 검색한 바 대조군에서 존재하던 Bcl-2 단백질은 고환적출 후 감소하였으며 이는 testosterone 전처리 후 회복되었으나 FSH에 의해서는 영향이 없었다 (Fig. 11B). 이는 고환적출 후 나타나는 apoptosis에도 testosterone의 감소에 따른 Bcl-2의 하향조절이 밀접히 관련되어 있음을 시사한다.

#### 고 찰

Androgenic steroid를 공급하는 중요한 조직인 고환을 적출하면 백서의 복측전립선에서는 1일 후부터 apoptosis가 일어나고 2주 내에 거의 퇴축되지만 testosterone의 재공급

으로 완전히 회복된다고 한다[15]. 이에 본 실험 조건하에서도 고환적출 후 전립선 조직의 퇴축이 확인되었으며 testosterone 전처리 후에는 대조군보다 더 컸는데 이는 prostate secretion이 고농도의 testosterone에 의해 증가되었기 때문이라 생각된다. 또한 FSH는 그 receptor가 고환의 Sertoli cell에 있고 prostate에 없으며 따라서 FSH의 표적조직이 전립선이 아님으로 고환적출 후 전립선 조직의 퇴축에 전혀 영향을 미치지 않음을 알 수 있다. Park 등[24]은 GnRH antagonist인 azaline B 주사로 고환의 퇴축에 따른 전립선의 퇴축이 일어났다고 하였는데 이는 androgen의 주요 공급처가 고환인 점을 고려할 때 당연한 결과라 생각된다.

English 등[16]은 고환적출 후 전립선 세포에서는 24시간 후부터 apoptotic body가 나타나기 시작하고 2~3일이 경과하면 그 수가 급격히 증가된다고 하였다. 이에 본 실험에서도 고환적출 후 apoptotic body가 TUNEL assay 및 apoptotic DNA fragmentation법으로 확인되었으며 이들은 testosterone 전처리로 억제되었으나 FSH에 의해서는 영향이 없었다. 따라서 본 실험에서 나타난 전립선의 퇴축은 전립선 세포의 apoptosis에 의해 나타난 것이며 이는 testosterone의 공급이 차단되었기 때문이라는 것이 확인되었다.

TRPM-2 및 prostatein C1은 testosterone에 의해 조절되는 유전자로 prostatein C1은 androgen에 의해 유전자 발현이 증가되나 TRPM-2는[31] 억제된다고 알려져 있다[30]. 본 실험에서 고환적출 후 전립선 조직의 prostatein C1 mRNA 양은 감소하였으나 TRPM-2 mRNA 양은 증가하였으므로 이는 본 실험 하에서 testosterone의 차단이 잘 되고 있음을 시사하는 것이다. Fas/APO-1 (CD95)는 TNF/NGF 수용체 superfamily에 속하며 흥선 등 Fas를 발현하는 세포에서 Fas ligand (FasL)과 결합하면 Fas/FasL 경로를 통하여 apoptosis를 유발함으로 immune system 유지에 중요하며 생식 기관에서는 성호르몬에 의한 세포의 조절에도 관여한다고 알려져 있다[32]. 최근 Suzuki 등[13]은 전립선 또는 부고환에서 Fas 단백질이 생식기관 적출 후 증가됨을 보고하였다. 이에 본 실험에서 고환적출 후 나타나는 전립선의 apoptosis에서 Fas 및 FasL mRNA 양이 증가하였으며 Western blot으로 단백질량을 측정했을 때도 증가하여 Suzuki 등[13]의 보고와 일치하였다. 또한 testosterone 전처리로 이들 유전자 발현은 대조군 수준으로 감소하였으나 FSH에 의해서는 영향이 없었는데 이는 고환적출 후 나타나는 전립선의 apoptosis에 Fas/FasL system이 관련되어 있으며 이때 testosterone이 중요함을 시사한다.

TATA, NF- $\kappa$ B, SP-1,  $\gamma$ -IRE 등은 FasL promoter에 존재하는 cis-element이며 이중  $\gamma$ -IRE는 azaline B에 의해 유도된 고환의 apoptosis 때 FasL의 전사조절에 중요하며[24] SP-1은 Sertoli cell에서의 FasL 유전자의 지속적인 발현에 중요하다고 알려져 있다[31, 32]. 이에 본 실험에서 고환적

출 후 증가된 FasL 유전자 전사조절기전을 밝히기 위해 FasL 유전자 promoter를 이용하여 DNase I footprinting을 시행한 바 대조군에서는 SP-1 결합부위 (-283 bp) 및 -247 bp에 있는 새로운 염기서열 (-GAGGCTT-, P-UF)에 결합하는 핵단백질이 동정되었으나 고환적출 후에는 P-UF는 변동이 없으나 SP-1 결합부위에 결합된 단백질이 사라졌다. McClure 등[32]은 Sertoli cell에서 FasL의 지속적인 발현에 SP-1이 중요하다고 하였으나 본 실험에서는 androgen 차단 후 FasL mRNA 증가시 SP-1이 없어졌으므로 상반된 결과를 나타냈다. Park 등[24]은 azaline B 주사 후 나타나는 고환의 apoptosis에 FasL이 중요하며 이때 FasL 유전자 전사조절에  $\gamma$ -IRE (-78 bp)이 중요하다고 하였으나 본 실험에서는 고환조직과는 달리  $\gamma$ -IRE 결합단백질의 존재가 관찰되지 않았다.

Bcl-2는 mitochondria 막에 존재하는 막결합단백질로서 Fas에 의한 apoptotic death signal을 막는다고 한다[3]. Suzuki 등[13]은 Bcl-2가 Fas에 의한 apoptotic death signal을 차단한다고 하였으며 최근 박 등[24]은 azaline B에 의해 복측전립선 조직이 apoptosis 될때 Bcl-2가 감소한다고 하였다. 이에 본 실험에서 고환적출 후 bcl-2 mRNA 및 Bcl-2 단백질을 검색한 바 대조군에 비해 감소하여 Suzuki 등[13] 및 박 등[24]의 결과와 일치하였으며 따라서 고환적출 후 나타나는 apoptosis에 Bcl-2의 하향조절도 중요하리라 생각된다.

## 요 약

**연구배경:** 백서에서 고환적출 등의 방법으로 androgen을 차단시키면 복측전립선 선상피세포의 apoptosis에 의해 전립선이 퇴축된다고 알려져 있다. 이에 본 연구에서는 백서에서 고환적출 후 나타나는 복측전립선의 apoptosis 기전을 연구하고자 하였다.

**방법:** 고환적출은 양측 정맥에서 결찰후 절제하였다. 고환적출 후 apoptosis는 TUNEL 및 DNA fragmentation 방법으로 확인하였으며 FasL promoter에 결합하는 transacting factor는 DNase I footprinting 및 DNA mobility shift assay로 동정하였다.

**결과:** 백서의 전립선은 고환적출 혹은 azaline B 주사 후 대조군에 비해 퇴축되었으나 testosterone 전처리 후에는 대조군보다 컸다. 고환적출 후 prostatein C1 mRNA 양은 감소하였으나 TRPM-2 mRNA는 증가하였다. 복측전립선에서 나타나는 apoptosis가 TUNEL assay, apoptotic DNA fragmentation assay 등으로 확인되었으며 testosterone 전처리 후에는 apoptotic body가 관찰되지 않았다. 또한 고환적출 후 전립선에서 Fas, FasL mRNA 및 그 단백질량은 증가하였으며 이는 testosterone 전처리로 억제되었다. 대조군에

서 FasL 유전자 promoter에 결합하는 핵단백질인자를 DNase I footprinting assay로 검색한 결과 SP-1 결합부위 (-287 bp) 및 미동정된 염기서열 (-247 bp)에 결합되는 핵단백질이 동정되었고 고환적출 후 SP-1 결합부위에 결합되는 핵단백질이 사라졌다. DNA mobility shift assay에서 고환적출 후 SP-1 결합부위에 결합하는 핵단백질의 결합활성이 감소되었으나 testosterone 전처리 후 대조군 수준으로 회복되었다. 고환적출 후 bcl-2 mRNA 및 Bcl-2 단백질량은 감소하였다.

**결론:** 이상의 결과로 백서에서 고환적출 후 유도된 복측 전립선의 apoptosis에는 Fas/FasL system 및 Bcl2가 중요하며 FasL 전사조절에는 SP-1 결합부위에 결합하는 단백질이 중요한 trans-acting factor로 작용하리라 생각된다.

## 감사의 글

pGLBasic-FasL-Luc-3는 Mayo Clinic의 Dr. Paya로부터, pC1은 Vanderbilt 대학의 Dr. RJ Matusik, pT17H는 Adirondack Biomedical Research Institute의 Dr. M. Tenniswood 등으로부터 기증 받아 사용하였으며 이에 대해 감사 드린다.

## 참 고 문 헌

- Smith CA, Williams GT, Kingstone R, Jenkinson EJ, Owen JJT: *Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce cell death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures.* *Nature* 374:811-814, 1995
- Kerr JFR, Searle J, Harmon BV, Bishop CJ: *Apoptosis.* In : Potten CS (ed), *Perspectives on Mammalian cell Death*, p93-94, Oxford University Press 1987
- Tsujimoto Y, Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Matsuda H: *Bcl-2 and Bcl-XL block apoptosis as well as necrosis: possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transduction pathway.* *Leukemia* 11:380-382, 1997
- Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, Li Weber M, Richards S, Dhein J, Trauth BC, Pansting IK, Krammer PH: *Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen.* *J Biol Chem* 267:10709-10715, 1992
- Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S: *Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family.* *Cell* 75:1169-1178, 1993
- Nagata S, Golstein P: *The Fas Death Factor.* *Science* 267:1449-1156, 1995
- Singer GG, Abbas AK: *The Fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice.* *Immunity* 1:365-371, 1994
- Tanaka M, Itai T, Adachi M, Nagata S: *Down regulation of Fas ligand by shedding.* *Nat Med* 4:31-36, 1998
- Tanaka M, Suda T, Haze K, Nakamura N, Sato K, Kimura F, Motoyoshi K, Mizuki M, Tagawa S, Ohga S, Hatake K, Drummond AH, Nagata S: *Fas ligand in human serum.* *Nat Med* 2:317-322, 1996
- Tanaka M, Suda T, Takahashi T, Nagata S: *Expression of the functional soluble form of human Fas ligand in activated lymphocytes.* *EMBO J* 14: 1129-1135, 1995
- Laouar Y, Sarukhan A, Pasqualetto V, Garcia C, Ezine S: *Involvement of the Fas (CD95) system in peripheral cell death and lymphoid organ development.* *Eur J Immunol* 28:1078-1088, 1998
- Shiraki K, Jsui N, Shioda T, Isselbacher KJ, Takahashi H: *Expression of Fas ligand in liver metastases of human colonic adenocarcinomas.* *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6420-6425, 1997
- Suzuki A, Matsuzawa A, Iguchi T: *Down regulation of Bcl-2 is the first step on Fas-mediated apoptosis of male reproductive tract.* *Oncogene* 13:31-37, 1996
- Isaacs JT: *Antagonistic effect of androgens on prostatic cell death.* *Prostate* 5:545-557, 1984
- Chung WLK, McFadden DK: *Sex steroid imprinting and prostate growth.* *Invest Urol* 17: 337-342, 1980
- English HF, Kyprianou N, Isaacs JT: *Relationship between DNA fragmentation and apoptosis in the programmed cell death in the rat prostate following castration.* *The Prostate* 15:233-250, 1989
- Kyprianou N, English HF, Isaacs JT: *Activation of a  $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$ -dependent endonuclease as an early event in castration induced prostatic cell death.* *Prostate* 13:103-117, 1988
- Lim K, Park C, Kim YK, Yun KA, Son MY, Lee YC, Park JJ, Lee JH, Sul CK, Lee CS, Park SK, Hwang BD: *Association of castration-dependent early induction of c-myc expression with a cell proliferation of the ventral prostate gland in rat.* *Exp Mol*

- Med* 32:216-221, 2000
19. Nickerson T, Pollak M, Huynh H: *Castration- induced apoptosis in the rat ventral prostate is associated with increased expression of genes encoding insulin-like growth factor binding proteins 2, 3, 4 and 5. Endocrinology* 139:807-810, 1998
  20. Suzuki A, Masao E, Eguchi Y, Matsuzawa A, Nagata S, Tsujimoto Y, Iguchi T: *Involvement of Fas in regression of vaginal epithelia after ovariectomy and during an estrous cycle. EMBO J* 15:211-215, 1996
  21. Taille de la A, Chen MW, Shabsign A, Bagiella E, Kiss A, Buttyan R: *Fas antigen/CD-95 upregulation and activation during castration- induced regression of the rat ventral prostate gland. The Prostate* 40:89-96, 1999
  22. Tilly JL, Hsueh AJM: *Microscale autoradiographic method for qualitative and quantitative analysis of apoptotic DNA fragmentation. J Cell Physiol* 154:519-526, 1993
  23. Lee J, Richburg JH, Younkin SC, Boekelheide K: *The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. Endocrinology* 138:2081-2088, 1997
  24. 박 청, 남상인, 윤은진, 박종일, 이중화, 박승길, 황병두, 임 규: 백서에서 Azaline B에 의한 복측전립선의 Apoptosis 기전. *대한비뇨기과학회지* 44:1157-1166, 2003
  25. Virca GD, Northemann W, Shiels BR, Widera G, Broome S: *Simplified northern blot hybridization using 5% sodium dodecyl sulfate. BioTechniques* 8: 370-371, 1990
  26. Lim K, Yoo JH, Kim KY, Kweon GR, Kwak ST, Hwang BD: *Testosterone regulation of proto-oncogene c-myc expression in primary Sertoli cell cultures from prepubertal rats. J Androl* 15:543-550, 1994
  27. Gorski K, Carneiro M, Schibler U: *Tissue-specific in vitro transcription from the mouse albumin promoter. Cell* 47:767-776, 1986
  28. Lim K, Chae CB: *Presence of receptor protein for testis-specific H2B (TH2B) histone gene in early stages of spermatogenesis. J Biol Chem* 267:15271-15273, 1992
  29. Kalb VF Jr, Bernlohr RW: *A new spectrophotometric assay for protein in cell extracts. Anal Biochem* 82: 362-371, 1977
  30. Parker MG, White R, Williams JG: *Cloning and characterization of androgen- dependent mRNA from rat ventral prostate. J Biol Chem* 255:6996-7001, 1980
  31. Montpetit ML, Lawless KR, Tenniswood M: *Androgen repressed messages in the rat ventral prostate. Prostate* 8:25-36, 1986
  32. Schulze-osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Marcus EP: *Apoptosis signaling by death receptors. Eur J Biochem* 254:439-459, 1998
  33. Holz-Heppelmann CJ, Algreiras A, Badley AD, Paya CV: *Transcriptional regulation of the human FasL promoter-enhancer region. J Biol Chem* 273:4416-4423, 1998
  34. McClure RF, Heppelmann CJ, Paya CV: *Constructive Fas ligand gene transcription in Sertoli cells is regulated by Sp1. J Biol Chem* 274:7756-7762, 1999