

전립선암 세포주에서 Peroxiredoxin I과 c-Myc에 의한 인간 Telomerase 역전사효소 유전자 발현의 억제

The Inhibition of Human Telomerase Reverse Transcriptase Expression by Peroxiredoxin I and c-Myc in Prostatic Cancer Cells

In Ho Chang, Hwa Su Kim¹, Tae Hyung Kim², Soon Chul Myoung², Sang Eun Lee, Young Sun Kim²

From the Department of Urology, Seoul National University College of Medicine, ¹Division of Brain Disease, Department of Biochemical Sciences, National Institute of Health Korea Center for Disease Control and Prevention, and the ²Department of Urology, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul, Korea

Purpose: We evaluated the hypothesis that the telomerase expression is associated with c-Myc and peroxiredoxin I (Prx I) in patients with prostate cancer. The study determined the link between Prx I, c-Myc and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in prostate cancer cells.

Materials and Methods: The cDNA of the Prx I gene was obtained by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification. Cotransfections were performed by using a hTERT luciferase reporter plasmid and each expression vector as indicated (c-Myc or Prx I). Empty vectors were used as controls for determining the basal promoter activity. RT-PCR was performed to evaluate the effect of the DEM-induced Prx I mRNA expression. Luciferase assay was performed to evaluate the inhibitory effect of transfected Prx I and the DEM induced Prx I on the transcriptional activity of hTERT in the human prostatic cancer cell lines PC-3 and DU-145.

Results: In this study, we found that Prx I could inhibit hTERT expression through direct interaction with c-Myc protein in the prostate cancer cell lines. In addition, it was obvious that Prx I could interact with c-Myc protein. We also found that DEM could induce upregulation of the Prx I mRNA expression and that the increased expression of Prx I could downregulate the expression of hTERT.

Conclusions: Our results demonstrated a direct link between Prx I, c-Myc and hTERT, and we suggest that Prx I regulates cellular immortalization through c-Myc and hTERT, which is activation step in carcinogenesis. (Korean J Urol 2006;47:418-425)

Key Words: Telomerase reverse transcriptase; Peroxiredoxin I; Genes, myc; Prostate cancer

대한비뇨기과학회지
제 47 권 제 4 호 2006

서울대학교 의과대학 비뇨기과학교실,
¹질병관리본부 국립보건연구원
생명의학부 뇌신경질환과,
²중앙대학교 의과대학 비뇨기과학교실

장인호 · 김화수¹ · 김태형²
명순철² · 이상은 · 김영선²

접수일자 : 2005년 10월 17일
채택일자 : 2006년 2월 18일

교신저자: 김영선
중앙대학교 의과대학
부속용산병원 비뇨기과
서울시 용산구 한강로 3가
65-207
☎ 140-757
TEL: 02-748-9578
FAX: 02-792-8496
E-mail: cauro@chollian.net

서 론

전립선암은 서구의 남성에서 발생 빈도가 높은 암 중의 하나이며, 중앙 관련 사망원인의 두 번째를 차지한다. 우리나라에서도 노령인구의 증가와 생활양식의 서구화 및 여러 요인에 의해 전립선암의 유병률이 증가되면서, 관심의 대

상으로 부각되고 있다.¹ 그러나 전립선암의 치료에 해결하여야 할 문제점이 많으며, 특히 일차적 치료에 실패하였을 경우 그 후의 치료를 결정하기에 어려움이 크다.²

암세포의 특징은 불멸과 유전자 불안정성이며, 현재까지의 연구에 의하면 정상세포와 암세포의 사멸과 불멸에 telomere와 telomerase의 상호관계가 깊이 관여하고 있는 것으로 보고되고 있다.³

Telomere는 인간 염색체의 말단부에 위치하는 반복적인 G-rich DNA 염기서열 (5'-TTAGGG-3')로 크기는 대략 5-20 kb이며, 유전암호를 가지고 있지 않는 특징이 있다. 이러한 특수한 구조는 다른 염색체의 말단과의 융합 및 분해를 막아 염색체의 안정을 유지하며, 방사선에 의한 융합이나, 세포파괴를 방지하는 역할을 수행한다.⁴ Telomerase는 telomere의 생성과 유지에 중요한 역할을 하는 핵내의 인산단백질로 RNA subunit와 인간 telomerase 역전사효소 (human telomerase reverse transcriptase; hTERT)를 포함하는 catalytic subunit로 구성되어 있다.⁵ 세포분열을 할수록 선상 DNA의 말단부를 복원하는 DNA 중합효소의 기능상실에 의해 telomere의 길이가 짧아지며, 일정길이 이하로 짧아지는 경우 세포고사가 발생한다. 그러나 안정적으로 hTERT 유전자 발현이 되는 경우 세포는 telomere의 연장을 유지하며, 생명을 유지하게 된다.⁶

암발생 유전자인 c-Myc은 8번 염색체의 장완 (8q24)에 존재하며, 439개의 아미노산으로 구성된 핵내의 인산단백질인 c-Myc 단백질로 발현된다. C-Myc 단백질은 basic helix-loop-helix leucine zipper (bHLH-ZIP) 전사인자로 다른 전사인자와 결합형태로 표적유전자 특정부위에 결합하여 표적유전자의 전사 및 발현을 촉진하여 세포의 분열과 분화, 종양형성 등의 과정을 조절한다.^{7,8} C-Myc 단백질이 hTERT 유전자의 promoter 중 hTERT core promoter (hTCP) 내의 E-box 부위에 결합하여 hTERT 유전자 발현의 증가를 유발하며, 증가된 hTERT 단백질의 발현이 telomerase의 활성도를 증가시켜 암의 발생에 관여하는 것으로 생각한다.⁹

Peroxiredoxin (Prx)은 분자량이 20-30kDa인 peroxidase 계열의 효소로 모든 생물체에 존재하며, Prx 내의 cysteine이 과산화수소를 물과 산소로 분리하는 thioredoxin peroxidase의 활성을 가지고 항산화제의 기능을 수행한다. 산화작용은 transforming growth factor beta (TGF- β), matrix metalloproteinases (MMPs)의 합성을 유도하고 p53 등의 항암유전자를 억제하여 암의 발생 및 진행에 중요한 역할을 수행하기도 하는데, Prx가 이를 억제하는 역할을 한다.¹⁰ Prx는 cysteine을 포함한 구조의 동일성에 따라 크게 전형적인 두 개의 cysteine Prxs (Prx I-Prx IV), 비전형적인 두 개의 cysteine Prx (Prx V), 그리고 한 개의 cysteine Prx (Prx VI)의 6가지의 isoform으로 분류한다.¹¹ 그중 Prx I은 23kDa의 단백질로 ras 암발생 유전자에 의하여 발현된 유선상피세포에서 그 존재가 처음 발견되었고, 산화제의 자극 시에 발현의 증가가 관찰된다.¹²

Diethyl maleate (DEM)은 glutathione (GSH) 억제인자이며, 세포 내에서 산화적 스트레스를 유발하는 산화제로 Prx I의 증가를 유발하는 것으로 알려져 있다.¹³

Prx I이 c-Myc 단백질의 Myc Box II (MBII)에 결합하고 c-Myc 단백질 표적유전자의 발현을 조절하여 항암작용을 수행한다는 것은 보고되고 있으나,¹⁴ 정확한 기전은 아직 모르는 상태이다. 본 연구는 전립선암세포 및 모든 전립선암 세포주에서 telomerase의 활성이 80-90%까지 관찰되고 있으므로, 남성호르몬 비의존성 전립선암세포주 (PC-3, DU-145)에서 Prx I, c-Myc 단백질의 hTERT 및 telomerase의 발현조절여부를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양

실험에 사용한 암세포주는 한국세포주은행 (Korean Cell Line Bank)에서 분양받은 남성호르몬 비의존성 전립선암세포주 PC-3 (ATCC, CRL1435), DU-145 (ATCC, HTB-81)를 사용하였다. 기본 배지로 RPMI 1,640 (Gibco, Carlsbad, USA)에 10% 우태아혈청, L-glutamine, 항생제로 penicillin과 streptomycin을 첨가하여 사용하였고, CO₂ incubator는 5% CO₂가 공급되고 적절한 습도와 37°C의 온도가 유지되도록 하였다.

2. Prx I, c-Myc, pHTCP plasmid 벡터의 제작

1) RNA 추출: TRI 반응액 (Molecular Research Center, USA)을 이용하여 전립선암세포주 PC-3에서 전체 RNA를 추출하였다. PC-3 전립선암세포주 침전물을 TRI 반응액 1ml와 혼합하여 5분간 진탕하고, bromochloropropane 0.1ml를 첨가하여 4°C에서 12,000g으로 8분간 원심분리하였다. 상층액을 새로운 미세시험관으로 옮기고, isopropanol을 첨가하여 RNA를 침전시켰다. 75% 에탄올로 세정하여 건조시킨 후, diethyl pyrocarbonate (DEPC) 처리수로 녹여 분광기로 RNA 농도를 확인하였다.

2) cDNA 합성: 추출된 RNA는 Universal RiboClone cDNA Synthesis System (Promega, USA)을 이용하여 역전사반응을 시행하였다. 추출된 RNA 1 μ g, oligo dT18 시발체 (primer), (0.5mg/ml), (Promega, USA) 1 μ l에 nuclease-free water를 첨가하여 총량을 30 μ l로 만들고 70°C 항온수조에 10분간 변성시킨 후 5x 역전사완충액 5 μ l, RNasin ribonuclease inhibitor 40units와 혼합하였다. 이 혼합물을 37°C 항온기에서 5분간 유지하여 시발체를 annealing시킨 후, 역전사효소 (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase), (Promega, USA) 30units, sodium pyrophosphate (40mM) 2.5 μ l, nuclease-free water를 첨가하여 전체 양을 40 μ l로 만들고 이를 잘 섞어 주었다. 혼합물 중 5 μ l를 취하여 미세시험관에 넣고 42°C 항온기에서 1시간 동안 방치하였다. 이후 70°C에서 10분간 마지막 변성을 시키고 즉시 냉각하였다.

Table 1. Polymerase chain reaction (PCR) primers used for analyzing expression and cloning

Genes	Sequences	Size
β -actin	F: 5'-ACCCAGATCATG-TTTGAGAC R: 5'-TGAGGTAGTCAGTCAGGTCC	228bp
Prx I	F: 5'-CCAAGCTTGGGATG-TCTTCAGGAAAT R: 5'-CCGGAATTCGGGTC ACTTCTGCTTGGA	600bp
hTERT	F: 5'-CTACCTTGACAGACCTCCAG R: 5'-AAACAGCTTCTTCTCCATGT	288bp
c-Myc	F: 5'-CCCAAGCTTGGGATGCC-CCTCAACGTTAGC R: 5'-CCGGAATTCGGTTACGCA-CAAGAGTTCGG	1,320bp
hTCP	F: 5'-CGGGGTACCTCCCCACG-TGGCGGAGGGAC R: 5'-CCCAAGCTTAGGCTTCC-CACGTGCGCAGC	245bp

3) Polymerase chain reaction (PCR): 역전사로 합성한 cDNA 5 μ l, 5x PCR 완충액 4 μ l, sense 시발체 (10pmol) 2 μ l, antisense 시발체 (10pmol) 2 μ l, dNTP (2.5mM) 2 μ l, Go-Taq polymerase (Promega, USA) 1 unit을 포함하여 20 μ l의 혼합물을 만들어 PCR을 시행하였다. House keeping 유전자인 β -actin은 mRNA의 적합성 여부를 판단하기 위하여 측정하였다. 각각의 시발체는 Table 1과 같다. 각각의 유전자의 증폭은 94°C에서 30초, 48°C 혹은 60°C에서 30초, 72°C에서 30초의 조건으로 25-30회 시행하였다. 증폭된 PCR 산물을 1% agarose gel에 전기영동하고 ethidium bromide로 염색한 후 UV transilluminator상에서 확인하였다.

4) Cloning: RT-PCR을 이용하여 획득한 Prx I cDNA 절편은 pcDNA 3.1 (+) plasmid (Invitrogen, Carlsbad, USA)의 Hind III/EcoR I 부위에 cloning하고, cloning된 cDNA는 automated DNA sequencer를 이용해 염기서열을 확인하였다. 같은 방법으로 제작한 c-Myc cDNA 절편은 pcDNA 3.1 (+) plasmid (Invitrogen, Carlsbad, USA)의 Hind III/EcoR I 부위에, hTCP는 pGL3-basic luciferase reporter plasmid (Promega, USA)의 Kpn I/Hind III 부위에 cloning을 시행하였다.

3. Plasmid 벡터의 전립선암세포주 내로 이입

대상세포주인 전립선암세포주를 6-well plate에 분주하고 (2x10⁵), 37°C CO₂ 배양기에서 60-80%의 군집을 보일 때까지 배양한 후, serum-free medium으로 2번 세척하였다.

HTCP, c-Myc, Prx I plasmid 각각 1-2 μ g을 각각의 실험방법에 따라 동시에 세포 내로 이입하였다. 또한 basal-promoter activity에 대한 대조군으로 내용이 빈 벡터를 이입하였다. Liposome인 1, 2-dimyristyloxypropyl-3-dimethyl-hydroxy ethyl ammonium bromide (DMRIE)-C reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA) 10 μ l와 plasmid 벡터 DNA를 각각 500 μ l의 serum-free medium에 용해한 후 혼합하여 실온에서 30분 동안 정지시켜 충분히 결합시켰다. DMRIE-C reagent와 plasmid 벡터 DNA 혼합물을 종양세포주 주위에 서서히 첨가하여 혼합한 후, 37°C CO₂ 배양기에서 4시간 동안 배양하여 plasmid를 세포내로 이입시키고, 이후 새로운 배양배지로 갈아주고, 37°C, CO₂ 배양기에서 배양하였다.

4. DEM 처리

대상세포주인 전립선암세포주를 6-well plate에 분주하고 (2x10⁵), 37°C CO₂ 배양기에서 60-80%의 군집을 보일 때까지 배양한 후, serum-free medium으로 2번 세척하였다. 각각의 well에 DEM (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA)으로 16시간 동안 처리하였으며, DEM의 농도는 각각 0.05, 0.1, 0.15mM로 처리한 후, RT-PCR을 이용하여 Prx I, hTERT, β -actin mRNA 발현의 변화를 측정하였다. House keeping 유전자인 β -actin은 mRNA의 적합성 여부 및 Prx I, hTERT mRNA 발현의 변화의 대조군으로 판단하기 위하여 측정하였다. 또한 실험방법에 따라 plasmid의 이입이 끝난 세포주에 DEM 0.1mM의 농도로 16시간 동안 처리한 후, luciferase 활성도를 3회 측정하였다.

5. Luciferase 활성도의 측정

HTERT 단백질의 발현을 luciferase 활성도를 통하여 간접적으로 관찰하였다. 이입 시작 48시간 이후에 배양액을 제거하고, 인산완충식염수 (phosphate buffered saline; PBS)로 세척한 후, 1x lysis 완충액 (luciferase cell culture lysis reagent, 5x) 400 μ l를 세포 위에 첨가하였다. 세포와 완충액 혼합물을 미세시험관에 담고, 10-15초 동안 충분히 섞은 후, 실온에서 12,000g으로 15초 동안 원심분리하고 상층액을 새로운 미세시험관에 담았다. Luciferase assay 완충액을 luciferase assay substrate에 첨가하여 luciferase assay reagent를 제조하였다. 상층액을 취한 미세시험관에 luciferase assay reagent 100 μ l를 첨가하고 luminometer를 이용하여 luciferase 활성도를 3회 측정하였다. 모든 luciferase 활성도의 결과는 측정값에 대한 평균값으로 표시하였다. HTERT 발현을 표준화하기 위하여 c-Myc, hTCP plasmid를 cotransfection시킨 세포주의 결과를 100%로 하고 다른 결과들은 이에 대한 상대적 정량을 시행하였다.

6. 결과분석

통계검정은 Student's t-test를 적용하였으며, p값이 0.05 미만인 경우에 의미 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 전립선암세포주 PC-3에서 Cloning한 Prx I 유전자의 적합성 확인

전립선암세포주 PC-3에서 RT-PCR을 이용하여 획득한 Prx I cDNA절편 (600bp)을 전기영동하여 Prx I의 적합성을

확인하였으며, pcDNA 3.1 (+) 벡터에 cloning한 후, 동일한 시발체로 PCR을 시행하여 Prx I과 동일함을 확인하였다. 또한 cloning한 벡터를 *Hind* III/*Eco*R I 제한효소를 이용하여 절단 후, 이를 전기영동하여 Prx I이 분리됨을 확인하였다 (Fig. 1). 염기서열을 분석한 결과 유전자은행에 있는 자료와 본 실험에서 얻어진 Prx I 유전자의 염기서열은 일치함을 확인하였다 (Fig. 2).

2. Prx I과 c-Myc 단백질의 결합이 hTERT 단백질의 발현에 미치는 영향

Cloning한 Prx I 유전자를 전립선암세포주 PC-3, DU-145

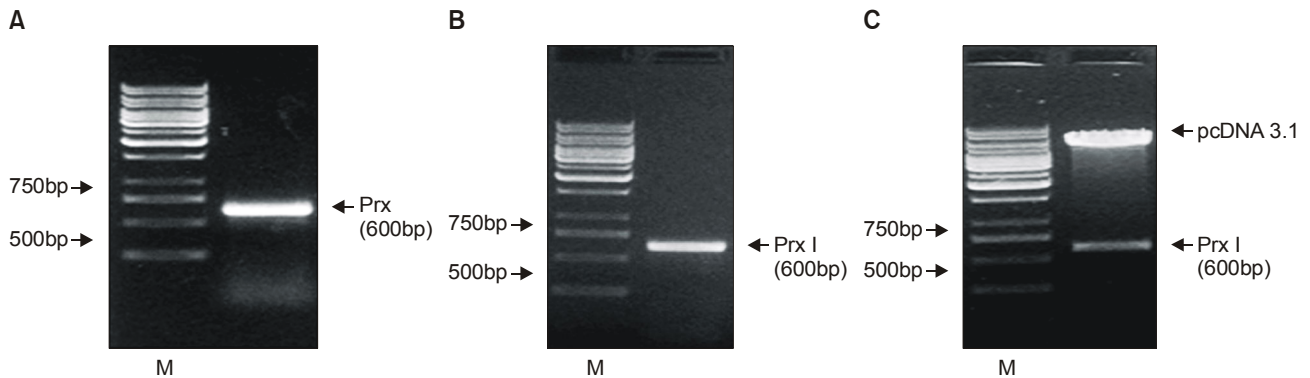
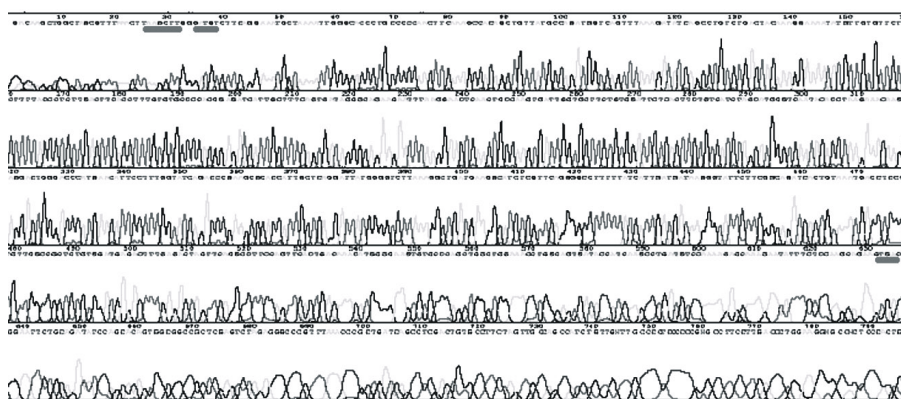


Fig. 1. The Prx I cDNA expression and plasmid construction. (A) Agarose gel electrophoresis of the Prx I cDNA that is obtained by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). (B) The PCR products from Prx I + pcDNA 3.1 (+). (C) The digestion products from Prx I+pcDNA 3.1 (+) (*Hind* III/*Eco*R I), M:1kb ladder.



```

atg tcttcaggaa atgctaaaaat tgggcacccct gccccaact tcaaagccac
121 agctgttatg ccagatggtc agtttaaga taccagctg tctgactaca aaggaaaata
181 tgttgtgttc ttcttttacc ctcttgactt cactttgtg tgccccacgg agatcattgc
241 ttccagtgat agggcagaag aatttaagaa actcaactgc caagtgttg gtgcttctgt
301 ggattctcac ttctgtcatc tagcatgggt caatacacct aagaacaag gaggactggg
361 accatgaac attcctttgg taccagacc gaagcgacc attgtcagg attatgggtt
421 cttaaaggct gatgaaggca tctcgttcag gggcctttt atcattgat ataagggtat
481 tcttcggcag atcactgtaa atgacctccc tttggccgc tctgtggatg agactttgag
541 actagttcag gcccttcagt tcaactgaca acatggggaa gtgtgcccag ctggctggaa
601 acctggcagt gataccatca agcctgatgt ccaaagagc aaagaatatt tctcaagca
661 gaagtga
    
```

Fig. 2. Sequencing analysis of the Prx I cDNA.

에 주입하여 hTERT 단백질 발현의 변화를 관찰하였다. PC-3 세포주에 hTCP, c-Myc, Prx I plasmid를 실험방법에 따라 이입시킨 후 hTERT 단백질의 발현을 관찰하였을 때, c-Myc, hTCP plasmid를 이입한 세포주에 비하여 Prx I, c-Myc, hTCP plasmid를 이입한 세포주에서 luciferase 활성도로 측정된 hTERT 단백질의 발현 ($100.0 \pm 11.5\%$ vs $53.5 \pm 14.9\%$)은 감소소견을 보였으나, 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다 ($p=0.08$). 그러나 Prx I plasmid의 양을 $1\mu\text{g}$ 에서 $2\mu\text{g}$ 으로 증가시킨 경우에 농도 의존적으로 감소하였고, c-Myc, hTCP plasmid를 이입한 세포주 ($100.0 \pm 11.5\%$ vs $18.3 \pm 1.6\%$)에 비하여 통계적으로 매우 유의한 감소를 보였

다 ($p<0.01$) (Fig. 3). DU-145 세포주에서는 c-Myc, hTCP plasmid를 이입하는 경우에 비하여 Prx I, c-Myc, hTCP plasmid를 이입한 경우에 luciferase의 활성도 ($100.0 \pm 6.2\%$ vs $77.5 \pm 7.0\%$)는 통계적으로 유의한 감소를 보였으며 ($p<0.05$), Prx I plasmid의 양을 $2\mu\text{g}$ 으로 증가시킨 경우 ($100.0 \pm 6.2\%$ vs $58.0 \pm 6.6\%$)에 더욱 유의한 감소를 보였다 ($p<0.01$) (Fig. 3).

3. DEM에 의한 Prx I 및 hTERT mRNA 발현의 변화

DEM 처리 후 Prx I 및 hTERT mRNA 발현의 증가 여부를 RT-PCR을 이용하여 확인하였다. β -actin mRNA의 발현과

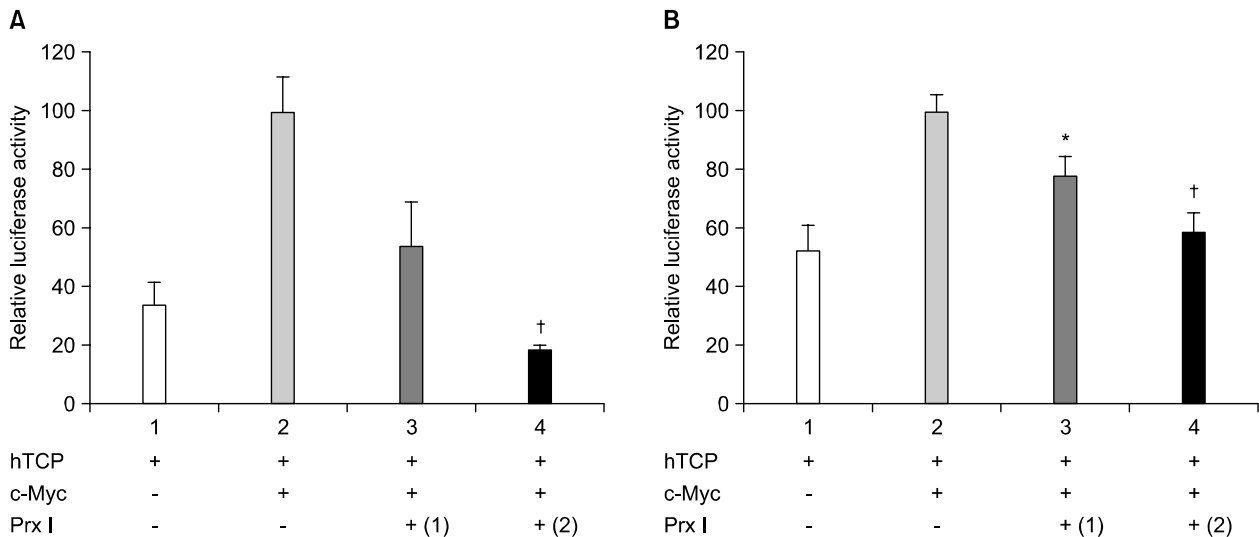


Fig. 3. The effect of c-Myc and Prx I on the level of the hTERT expression in the PC-3 and DU-145 cell lines. The hTCP is cotransfected with the c-Myc expression plasmid, in the presence or absence of the Prx I expression plasmid, into (A) PC-3 cells and (B) DU-145 cells. The name of each plasmid is indicated on the left lower position of the figure. The error bars represent the standard deviation. Cotransfection with the Prx I expression plasmid inhibits the activation of all. This repression is dose-dependent. Each experiment is performed three times. The presence or absence of each plasmid used in each transfection is indicated by + or -. (1): $1\mu\text{g}$, (2): $2\mu\text{g}$, *: $p<0.05$, †: $p<0.01$.

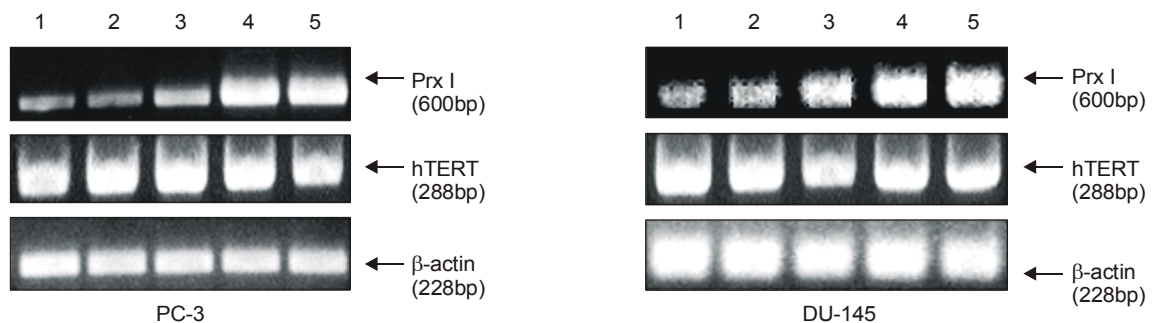


Fig. 4. mRNA expressions of Prx I and hTERT from the PC-3 and DU-145 cells after DEM treatment. These findings suggest that DEM induces the Prx I expression dose-dependently, but not hTERT expression in both the prostatic cancer cell line. 1: cell only, 2: ethanol only, 3: DEM 0.05mM, 4: DEM 0.1mM, 5: DEM 0.15mM treatment, DEM: diethyl maleate.

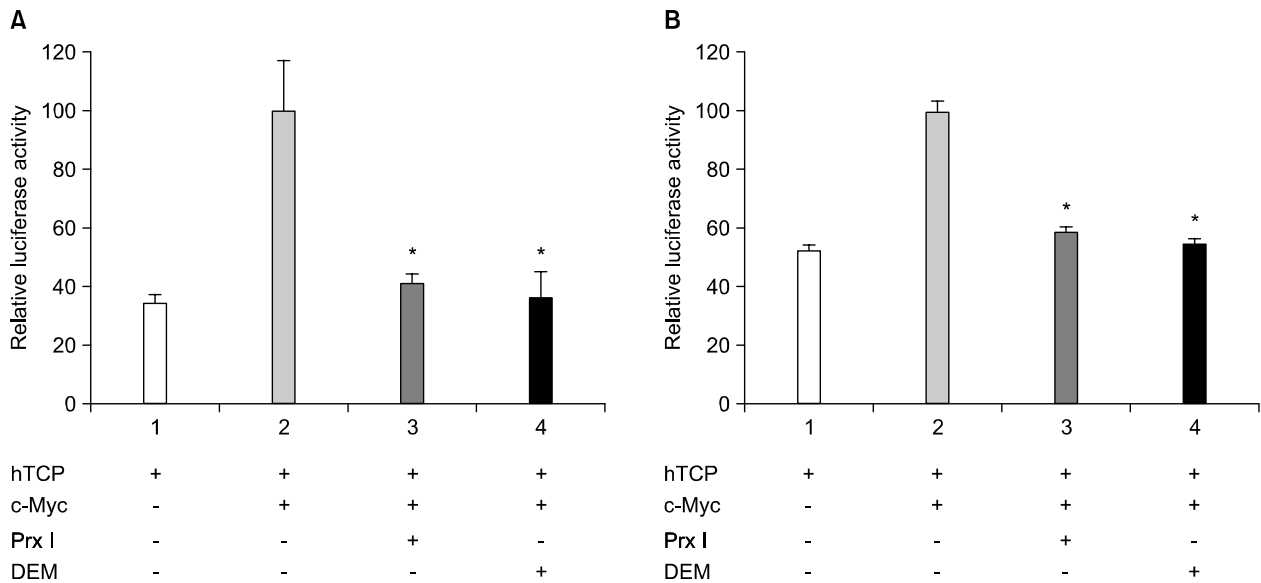


Fig. 5. The hTERT inhibition by DEM (0.1mM for 16hrs) in the PC-3 and DU-145 cells. The name of each plasmid is indicated on the left lower position of the figure. The bars represent the standard deviation. The presence and absence of each plasmid are indicated by + and -, respectively. The plasmid hTCP is cotransfected with the c-Myc expression plasmid into the cells. After pretreatment with DEM, the cotransfected cells show an approximately 50% decrease in the level of hTERT transcription in the (A) PC-3 cells and the (B) DU-145 cells. Each experiment is performed three times. The presence or absence of each plasmid used in each transfection is indicated by + or -. *: $p < 0.05$, DEM: diethyl maleate.

비교하였을 때, Prx I mRNA의 발현은 PC-3, DU-145 세포주 모두에서 DEM으로 처리하였을 경우 증가하였으며, DEM의 농도가 증가함에 따라 비례하여 증가하였다. 그러나 hTERT의 mRNA 발현은 PC-3, DU-145 세포주 모두에서 DEM의 처리 여부 및 DEM 농도와 관계없이 일정하게 발현되었다 (Fig. 4).

4. DEM에 의하여 간접적으로 증가된 Prx I이 hTERT 단백질의 발현에 미치는 영향

DEM은 0.1mM로 16시간 동안 처리하였으며 Prx I plasmid의 양은 1 μ g으로 하였다. PC-3 세포주에서 c-Myc, hTCP plasmid를 이입한 상태에서 DEM을 처리한 경우에 c-Myc, hTCP plasmid를 이입한 세포주에 비하여 hTERT 단백질의 발현 (100 \pm 17.4% vs 35.9 \pm 8.7%)이 통계적으로 유의하게 감소하였다 ($p < 0.05$) (Fig. 5). DU-145 세포주에 c-Myc, hTCP plasmid를 이입한 상태에서 DEM을 처리한 경우에도 hTERT 발현 (100 \pm 3.1% vs 54.1 \pm 2.1%)이 현저하게 감소하였으며 ($p < 0.05$), 발현의 감소는 c-Myc, Prx I, hTCP plasmid를 이입한 경우와 비슷한 수준의 감소를 보였다 (Fig. 5).

고 찰

Prx는 모든 종류의 생물에 존재하며, 다양한 형태로 발현

한다. 또한 대부분 인간의 세포는 Prx 이외에도 glutathione과 thioredoxin을 산화시키거나 환원시키는 다양한 효소들을 가지고 있다. 이는 hydroxyperoxide의 급격한 생성이 세포 내에 산화작용 이외의 다양한 역할을 수행하는 것임을 암시하거나 hydroxyperoxide 이외의 다른 산화물이 서로 다른 경로를 통하여 산화작용을 유발하는 것임을 암시하기도 한다. 일반적으로 호흡 동안에 산소가 물로의 환원이 불완전할 경우에 superoxide anion이 형성되며, 이는 자연적 혹은 효소에 의하여 과산화수소로 변한다. Hydrogen peroxide 자체는 활성도가 그다지 높지 않으나, 강한 활성도를 가지는 hydroxyl radical로 변하는 경우에 세포에 심한 손상을 유발하거나, 성장인자의 합성을 유도하여 암의 성장 및 진행에 중요한 역할을 수행한다.¹⁰

Hydrogen peroxide, hydroxyl radical을 포함하는 반응성 산소기 (reactive oxygen species)는 호흡뿐만 아니라 지방산의 산화 (beta-oxidation) 동안에도 생성되며, 방사선, 빛, 금속, 특정 약물 (redox drug)에 노출된 경우에도 발생한다. 따라서 호기 세포들은 다양한 산화경로에 의한 산화물의 발생과 산화작용 이외의 다양한 작용에 의해 생성된 과산화수소를 제거하는 catalase, glutathione peroxidase, haem-containing peroxidase, Prx 등의 다양한 항산화효소를 가지고 있다. 최근 보고에 의하면 많은 세포표면 수용체의 활성 시에 과산화수소가 생성되는데, 특히 세포에서 peptide 성장인자

나 cytokine 등의 다양한 세포 외 자극이 과산화수소의 증가를 유발하고, 반대로 Prx I이나 nuclear NF- κ B가 이를 억제한다.¹⁵ 이러한 순간적인 과산화수소 농도의 변화는 과산화수소가 세포 내의 신호전달의 역할에 관여하는 것으로 생각된다.

정상 및 암세포에서 telomerase의 활성을 자극하거나, 억제하는 hTERT 유전자의 발현에 대하여 세포 내 성장인자, mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase C (PKC), stress-activated protein kinase signaling pathway에 관여하는 protein kinase 등 여러 가지 단백질들이 관여한다.¹⁶ 정상 전립선세포 및 전립선비대증세포는 telomerase의 활성이 관찰되지 않거나 미미하게 발현되는 반면에, 전립선암세포 및 전립선암 세포주에서 telomerase의 활성이 관찰된다.¹⁷ 따라서 telomerase의 활성도가 전립선암의 진단 및 악성도의 판단에 도움을 주며, telomerase의 catalytic subunit인 hTERT 유전자의 발현이 telomerase의 활성도를 반영할 것으로 생각된다. 또한 PC-3, LNCaP, Du145 등의 전립선암 세포주에서 Prx I의 증가는 이미 보고되어 있다.¹⁸ C-Myc 유전자는 전립선암의 발생에 관여하는 것으로 알려져 있으며, c-Myc 유전자발현과 hTERT 유전자발현의 상관관계는 전립선암세포뿐만 아니라, 일부의 전립선암 세포주에서도 관찰되었다.^{19,20} 그러나 Prx I, c-Myc, hTERT와의 관계는 아직까지 보고된 바가 없다.

본 연구의 결과로 볼 때, 첫 번째, hTERT 유전자의 발현은 Prx I에 의하여 조절되는 것을 시사한다. 인간 난소암에서 암억제단백질인 BRCA1이 c-Myc 단백질과 직접적 결합을 통하여 hTERT 유전자의 발현을 억제한다고 보고되었으며,²¹ 인간 유방암에서도 BRCA1, N-Myc interacting protein (Nmi), c-Myc 단백질들의 결합이 c-Myc 단백질에 의한 hTERT promoter의 활성을 억제하여 hTERT 유전자의 과발현을 억제한다고 보고되어 있다.²² 저자는 호르몬 비의존성 전립선암 세포주 PC-3에서 Prx I plasmid를 1 μ g 이입하였을 경우에는 c-Myc plasmid를 이입한 세포주에 비하여 통계적으로 유의한 차이를 발견할 수 없었으나, 감소소견을 보였으며, 2 μ g으로 증량하였을 경우에는 통계적으로 매우 유의한 감소를 보였다. DU-145 세포주에서 hTCP, c-Myc, Prx I plasmid를 이입한 경우에 pHTCP, c-Myc plasmid의 경우보다 통계적으로 유의한 hTERT 단백질 발현의 감소를 관찰하였다. Prx I의 농도가 1 μ g인 경우에 두 세포주에서 반응의 차이를 보이는 것은 세포주에 따른 Prx I의 반응정도의 차이일지도 모르나 그에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각되나, 두 세포주 모두에서 hTERT 단백질의 발현이 Prx I에 의하여 농도의존적으로 억제된다는 것을 밝혀냈다. 이는 Prx I이 c-Myc 단백질과 결합을 통하여 hTERT 유전자의

발현을 억제한다는 사실을 시사하며, 이로 인한 telomerase 활성의 감소와 이로 인한 항암작용을 예상할 수 있다. Latil 등²⁰은 c-Myc 유전자의 발현은 전립선암발생 초기 및 말기에만 나타나며, 항호르몬 전립선암이나 호르몬 비의존성 전립선암세포주 (PC-3, DU-145)에서 c-Myc 유전자 발현의 증가가 나타나지 않는다고 보고했다. Bernard 등²³과 Birocio와 Leonetti²⁴는 항호르몬 전립선암의 진행에 c-Myc 단백질에 의한 hTERT 유전자 발현의 증가가 있다고 보고하였으며, 이는 본 연구의 결과와 일치한다. 그러나 아직도 이에 대하여서는 논란의 여지가 있으므로 향후의 추가적인 연구가 필요할 것이라 생각한다.

두 번째, 산화적 스트레스가 Prx I 유전자의 발현을 증가시킴을 확인하였다. 즉, PC-3, DU-145 세포주 모두에서 RT-PCR을 이용한 Prx I mRNA의 발현은 산화제인 DEM의 농도의 증가에 따라 농도의존적으로 증가를 나타냈다. 그러나 DEM에 의한 산화적 스트레스가 Prx I의 증가를 통하여 hTERT 유전자 발현억제에 관여한다는 보고는 없다. 저자는 RT-PCR을 이용하여 mRNA 발현의 정도를 비교한 결과, Prx I의 mRNA는 DEM의 용량이 증가함에 따라 증가하였으나, hTERT mRNA의 발현은 DEM의 용량에 따라 변화가 없었다. 이는 Prx I이 직접적으로 hTERT 유전자의 발현을 억제한다기보다는 중간단계에서 밝혀지지 않은 기전에 의하여 간접적으로 hTERT 유전자의 발현을 억제한다고 생각할 수 있다. 또한 c-Myc 단백질이 전립선암의 발생초기 및 항호르몬으로 변화 시에 관여를 하므로 이미 c-Myc의 농도가 낮은 전립선암 세포주에서는 c-Myc의 작용이 미약하므로 hTERT의 발현에는 변화가 없을 것으로 생각할 수 있다. 이에 대하여서는 추가적인 연구가 필요한 실정이다.

세 번째, PC-3, DU-145 세포주 모두에서 DEM이 Prx I 유전자의 발현을 증가시키고, 간접적으로 증가된 Prx I이 c-Myc 단백질과 결합하여 c-Myc 단백질이 hTCP에 결합하는 것을 억제함으로써, hTERT 유전자의 발현을 억제하는 것을 확인하였으며, 이는 통계적으로 유의한 감소를 보였다. 이때, hTERT 단백질의 발현은 hTCP에 대한 luciferase 활성도를 통하여 확인하였다.

저자는 남성호르몬 비의존성 전립선암세포주 PC-3, DU-145에 이입된 Prx I이 c-Myc 단백질과 결합을 통하여 hTERT 유전자의 발현을 억제함과 PC-3, DU-145를 DEM으로 처리한 후, RT-PCR을 이용하여 Prx I mRNA 발현의 증가를 확인하였다. 또한 DEM에 의하여 간접적으로 증가된 Prx I 단백질이 c-Myc 단백질과의 결합을 통하여 hTERT 유전자의 발현을 억제한다는 것을 확인하였다.

이와 같은 결과로 산화적 스트레스 (DEM)에 의해 혹은 다른 원인에 의하여 증가된 Prx I이 c-Myc과 결합하여 hTERT

의 발현을 억제함을 알 수 있으며, 이에 대해서 향후 *in vivo* 및 *in vitro* 연구가 필요하다고 생각한다. 향후 Prx I이 전립선암, 특히 항호르몬 전립선암에 대한 항암요법 및 암유전자 요법의 보조치료제로 이용할 수 있을 것이라 생각한다.

결론

본 연구는 남성호르몬 비의존성 전립선암세포주(PC-3, DU-145)에서 Prx I과 hTERT 유전자 간 연관성에 대한 연구이며, 암의 발생 초기 및 항호르몬암의 발생에 중요한 역할을 수행하는 hTERT 유전자 발현 조절에 의한 암발생의 억제에 Prx I이 관여한다는 결과를 나타냈다. 결론적으로 본 저자는 hTERT promoter가 Prx I의 표적유전자이며, hTERT 유전자에 대한 조절의 손상이 불멸세포의 발생을 유도하여 전립선암의 발생 및 항호르몬 전립선암의 진행을 유발하며, Prx I이 c-Myc 단백질과 결합하여 이를 예방하고 그의 진행을 막는 작용을 한다고 생각한다.

REFERENCES

1. Lee C, Lee ES, Choi H, Koh SK, Lee JM, Chai SE, et al. Incidence estimation of genitourinary cancer in Korea. J Korean Med Sci 1992;7:154-61
2. Schroder FH. Hormonal therapy of prostate cancer. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED Jr, Wein AJ, editors. Campbell's urology. 8th ed. Philadelphia: Saunders; 2002;3182-208
3. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. Science 1998;279:349-52
4. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. Nature 1991;350:569-73
5. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. Cell 1985;43:405-13
6. Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, et al. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. EMBO J 1992;11:1921-9
7. Prendergast GC, Lawe D, Ziff EB. Association of Myn, the murine homolog of max, with c-Myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and ras cotransformation. Cell 1991;65:395-407
8. McMahon SB, Wood MA, Cole MD. The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. Mol Cell Biol 2000;20:556-62
9. Kyo S, Takakura M, Taira T, Kanaya T, Itoh H, Yutsudo M, et al. Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). Nucleic Acids Res 2000;28:669-77
10. Kinnula VL, Paakko P, Soini Y. Antioxidant enzymes and redox regulating thiol proteins in malignancies of human lung. FEBS Lett 2004;569:1-6
11. Rhee SG, Kang SW, Chang TS, Jeong W, Kim K. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. IUBMB Life 2001;52:35-41
12. Prosperi MT, Ferbus D, Karczinski I, Goubin G. A human cDNA corresponding to a gene overexpressed during cell proliferation encodes a product sharing homology with amoebic and bacterial proteins. J Biol Chem 1993;268:11050-6
13. Prosperi MT, Ferbus D, Rouillard D, Goubin G. The pag gene product, a physiological inhibitor of c-abl tyrosine kinase, is overexpressed in cells entering S phase and by contact with agents inducing oxidative stress. FEBS Letters 1998;423:39-44
14. Mu ZM, Yin XY, Prochownik EV. Pag, a putative tumor suppressor, interacts with the Myc Box II domain of c-Myc and selectively alters its biological function and target gene expression. J Biol Chem 2002;277:43175-84
15. Rhee SG, Bae YS, Lee SR, Kwon J. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. Sci STKE 2000;2000:PE1
16. Wang Z, Kyo S, Takakura M, Tanaka M, Yatabe N, Maida Y, et al. Progesterone regulates human telomerase reverse transcriptase gene expression via activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathway. Cancer Res 2000;60:5376-81
17. Lin Y, Uemura H, Fujinami K, Hosaka M, Harada M, Kubotay Y. Telomerase activity in primary prostate cancer. J Urol 1997;157:1161-5
18. Shen C, Nathan C. Nonredundant antioxidant defense by multiple two-cysteine peroxiredoxins in human prostate cancer cells. Mol Med 2002;8:95-102
19. Nag A, Smith RG. Amplification, rearrangement and elevated expression of c-myc in the human prostatic-carcinoma cell line LNCaP. Prostate 1989;15:115-22
20. Latil A, Vidaud D, Valeri A, Fournier G, Vidaud M, Lidereau R, et al. Htert expression correlates with MYC over-expression in human prostate cancer. Int J Cancer 2000;89:172-6
21. Zhou C, Liu J. Inhibition of human telomerase reverse transcriptase gene expression by BRCA1 in human ovarian cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 2003;303:130-6
22. Li H, Lee TH, Avraham H. A novel tricomplex of BRCA1, Nmi, and c-Myc inhibits c-Myc-induced human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT) promoter activity in breast cancer. J Biol Chem 2002;277:20965-73
23. Bernard D, Pourtier-Manzanedo A, Gil J, Beach DH. Myc confers androgen-independent prostate cancer cell growth. J Clin Invest 2003;112:1724-31
24. Biroccio A, Leonetti C. Telomerase as a new target for the treatment of hormone-refractory prostate cancer. Endocrine-Related Cancer 2004;11:407-2