

# Expression of Cell Cycle Regulatory and Apoptosis-related Proteins in Etoposide-treated Human Skin Fibroblast

Jae-We Cho, M.D. and Min-Ho Suh, M.D.<sup>1</sup>

Department of Microbiology, College of Medicine, Seonam University, Namwon; <sup>1</sup>Department of Microbiology, School of Medicine, Keimyung University, Daegu, Korea

**Purpose:** This study was designed to investigate effect of the etoposide on expression of cell cycle regulatory proteins and apoptosis-related proteins in human skin fibroblast (HSF).

**Materials and Methods:** HSF cells were treated with etoposide. After treatment, expression patterns of cell cycle regulatory proteins and apoptosis-related proteins were analyzed by using Immunoprecipitation-Western blot method and RT-PCR.

**Results:** Immediately after etoposide treatment, E2F-1 was up-regulated following MDM2 down-regulation. After E2F-1 up-regulation, p53 and p21<sup>WAF1</sup> level was markedly increased without or with mRNA up-regulation, respectively. Consistent with these results, cell cycles arrested in mainly G1 phase 24 hr after etoposide treatment. How-

ever, HSF cells progressed into apoptosis 72 hr after etoposide treatment. In this process, caspase-3 activation and Bax up-regulation were observed.

**Conclusion:** In early response of etoposide treatment, E2F-1 plays an important role in p53 accumulation through MDM2 down-regulation. The increased p53 induce an increase of p21<sup>WAF1</sup> level through p21<sup>WAF1</sup> mRNA up-regulation. However, after long term treatment of etoposide, HSF cells resulted in apoptotic cell death through caspase-3 activation and Bax up-regulation. (J Korean Cancer Assoc 2001;33:77-83)

**Key Words:** E2F-1, Mouse double minute 2, p53 gene, p21<sup>WAF1</sup>, Etoposide

## 서 론

세포사멸(apoptosis)은 여러 단백질들간의 상호 작용으로 일어나는 정밀한 세포 내 방어기전으로 알려져 있으며 (1,2), 이를 유발하는 원인으로는 유전자 불안정성(genome instability), 세포독성물질(cytotoxic agent), 바이러스감염 등 여러 가지가 있다. 이 가운데에서도 특히 유전자 불안정성을 유발하는 자극이 가해지면, 세포는 세포 주기를 G1에 정지시키면서 손상된 유전자를 복구하는데 이 과정에 p53이 중요한 역할을 한다고 보고되어 있다(3~5). 만약 유전자 손상이 심하면 p53은 세포사멸을 촉진시킴으로써 비정상 세포를 제거하는데, 이 과정에서 caspases family, Bcl-2 family 등이 중요하게 작용한다(6,7). 최근에는 Rb 항암단백질(pRb)을 중심으로 한 pRb, MDM2, p53 단백질들

간의 상호 작용이 세포 운명을 결정하는 핵심 조절 물질로 간주되어(8~10), 이를 단백질들 간의 상호 작용 규명이 apoptosis기전 연구에 매우 중요한 쟁점으로 대두되었다.

그러나 현재까지 보고된 여러 결과들은 apoptosis를 적극적으로 유도하기 위해 과도한 자극을 세포에 가하여 수 시간 내의 급격한 세포사를 유도함으로써 수일에 걸쳐서 점진적으로 일어나는 apoptosis 기전에 대한 연구는 미비했다고 생각된다. 또한 이 과정에서 세포주기조절 단백질들은 상위 유전자들의 발현 변화에 따라 여러 상황에 적합하게 양적 증가 혹은 감소를 되풀이 할 가능성이 매우 높으므로, 유전자 손상에 대한 세포주기조절 차원에서의 세포 내 방어기전을 전반적으로 이해하기 위해서는 apoptosis 유도 이후 세포주기 조절관련 단백질들의 발현 양상을 초기 및 후기 반응으로 나누어 분석하는 것이 매우 중요할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 인간 피부 섬유아세포(human skin fibroblast)에 유전자 손상을 유발 한 후 세포주기 조절 인자들 및 apoptosis 관련 단백질들의 발현양상을 초기와 후기 발현 변화로 나누어 분석하여, 유전자 손상 시 세포주기 조절인자들과 apoptosis 관련 단백질들간의 상호작용을 규명함으로써 유전자 손상에 의한 암 발생 기전 연구뿐만 아니라

책임저자 : 조재위, 전북 남원시 광치동 720번지  
⑨ 590-711, 서남대학교 의과대학 미생물학교실  
Tel: 063-620-0342, Fax: 063-620-0345  
E-mail: jwcho@tiger.seonam.ac.kr

이 연구는 계명대학교 대학원 학생 학술연구장학금에 의한 것임.  
수혜 연도: 2000년 9월 30일  
접수일 : 2000년 10월 23일, 게재승인일 : 2001년 1월 10일

암 치료에도 근간이 될 기초자료를 구축하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1) 세포주 및 배양조건

인간 피부 섬유아세포를 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM glutamine 및 HEPES가 함유된 DMEM 배양액을 이용하여 36°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기내에서 배양하였고, etoposide (Sigma Co., St. Louis, MI) 처치 시 10 µg/ml 농도로 사용하였다.

### 2) 생존세포 수 계수

0.4% trypan blue 50 µl에 세포 50 µl를 넣고 섞은 후 hemocytometer에 접종하고 1분 후 세포수를 세어 생존세포 수를 계수 하였으며, 두 개의 시료를 각각 계수 후 그 평균치를 취하였다.

### 3) RNA 분리 및 RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)

RNA 분리는 RNazol B (Biotex laboratories, Houston, TX) 시약을 사용하여 분리한 후 자외선 분광비색계로 농도를 측정한 후 사용하였다. 분리된 RNA 1 µg을 oligo dT (16 mer)를 사용하여 MuLV reverse transcriptase (Promega Co., Madison, WI)로 역전사 한 후 PCR을 시행하였다. PCR은 이전에 본 연구팀에서 보고한 방법대로 실행하였으며(11) 사용된 primer는 Table 1에 표기하였다.

### 4) 단백질 분리 및 Western blotting

배양된 세포를 lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM EDTA, 130 mM NaCl, 1% Triton X-100) 100 µl와 0.2

M PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) 및 proteinase inhibitor cocktail (0.02 mM aprotinin, 2 mM leupeptin, 5 mM phenanthroline, 28 mM benzamidine-HCl)을 넣고 얼음에 30분간 방치한 뒤 12,000 rpm, 4°C에서 원심하여 상층액을 취한 후, Biorad 단백정량 kit (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA)으로 정량하였다. 100 µg의 단백질을 12% 또는 6.5%의 SDS-polyacrylamide gel에 전기 영동 한 다음, nitrocellulose paper (Millipore Co., Bedford, MA)로 전이하였다. 전이된 membrane을 blotto 용액(5% 탈지분유, 20 mM Tris (pH 7.5), 137 mM NaCl, 0.05% Tween-20)에 넣어 4°C에서 하룻밤 둔 후 일차 및 이차 항체로 반응시키고 ECL (Amersham Co., Buckinghamshire, UK) 방법으로 결과를 확인하였다. 사용한 일차 항체들은 다음과 같다(pRb, Phar-Mingen Co., San Diego, CA; p53, Neomark Co., Fremont, CA; p21<sup>WAF1</sup>, Bax, E2F-1, MDM2, caspase-3, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA).

### 5) Immunoprecipitation

차가운 phosphate buffered saline (PBS)로 배양중인 세포를 2회 세척 한 후 미리 얼음에 넣어 둔 eppendorf tube에 세포를 모았다. 여기에 lysis buffer [50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40] 1 ml, 1 M NaF 100 µl, 200 mM sodium orthovanadate 1 µl, PMSF (10 µg/µl) 1 µl를 혼합한 후 얼음에 30분간 두었다. 4°C에서 12,000 rpm으로 20분간 원심한 후 상층액을 모았다. Biorad 단백정량 kit를 이용하여 정량한 후 1 mg 농도로 분주하여 -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 1 mg의 단백질에 3 µg의 일차 항체 (pRb)를 넣고 lysis buffer로 전체부피를 1 ml 되게 맞춘 후 4°C에서 4시간 동안 흔들면서 반응시켰다. Protein A-sepharose beads (Sigma Co., St.

Table 1. DNA sequences of PCR primers used in this study

Name		PCR primer sequences	Product size (bp)
GAPDH	Sense	5-CGTCT TCACC ACCAT GGAGA-3	300
	Antisense	5-CGGCC ATCAC GCCAC AGTTT-3	
p53	Sense	5-GCCAT CTACA AGCAG TCACA-3	554
	ntisense	5-TTCAG CTCTC GGAAC ATCTC-3	
p21 <sup>WAF1</sup>	Sense	5-CGGGA TCCGG CGCCA TGTCA GAACC GGC-3	509
	Antisense	5-CGGGA ATTCTG TGGGC GGATT AGGG-3	
E2F-1	Sense	5-ACGTG ACGTG TCAGG ACCTT-3	336
	ntisense	5-GTTCT TGCTC CAGGC TGAGT-3	
MDM2	Sense	5-AATCA TCGGA CTCAG GTACA-3	600
	Antisense	5-GTCCA GCTAA GGAAA TTCTA GG-3	

Louis, MI) 20  $\mu$ l와 이차항체(rabbit anti-mouse IgG, Amersham Co., Buckinghamshire, UK) 10  $\mu$ l를 첨가하여 4°C에서 하룻밤 더 반응시킨 후 2 분간 원심하여 생긴 침전물을 lysis buffer로 2번 washing buffer [50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA]로 3번 세척하였다. 여기에 1× sample buffer를 넣고 5분간 끓인 후 SDS-PAGE (7.5%)를 하였다.

#### 6) Flow cytometry 분석

세포를 tube ( $1 \times 10^6$ /tube)에 모은 후 PBS로 두 번 세척하고, 500  $\mu$ l의 PBS로 다시 부유한 후 차가운 ethanol (100%) 5 ml를 천천히 첨가하여 고정한 후 1,000 rpm에서 4분간 원심하고 상층액을 제거한 후 propidium iodide (Sigma, St. Louis, MI) 염색액 (PI 50  $\mu$ g/ml, RNase A 0.1 mg/ml, 0.1% NP-40, 0.1% trisodium citrate)으로 1시간 염색한 뒤 FACS Calibur (Becton Dickinson Co., Franklin lakes, NJ) 장치로 세포주기를 분석하였다.

#### 7) Caspase-3 활성도 측정

$2 \times 10^6$ /ml의 세포에 lysis buffer [50 mM Tris (pH 7.5), 0.03% NP-40, 1.0 mM DTT]를 넣고 얼음에 30분간 두었다. 12,000 rpm으로 원심 후 상층액을 취하여 정량 한 뒤 20  $\mu$ g lysate에 2 mM ac-DEVD-pNA (Enzyme System Products, Livermore, CA)를 넣고 37°C에서 2시간 incubation하면서 분광광도계(Amersham pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ) 405 nm 파장에서 30분 간격으로 흡광도를 측정하였다

### 결과

#### 1) Etoposide 처치가 세포 생존 및 세포주기에 미치는 영향

Etoposide 처치가 인간 피부 섬유아세포의 생존에 미치는 영향을 확인하고자 10  $\mu$ g/ml 농도의 etoposide를 처치한 후 생존세포계수를 산정하였다. 시약 처치 24시간 후 세포 생존율의 변화를 거의 관찰 할 수 없었으나, 48시간 후 16%, 그리고 72시간 후 24% 정도의 세포 사망을 관찰 할 수 있었다(Fig. 1A). Etoposide 처치가 세포주기에 미치는 영향을 분석한 결과(Fig. 1A), 시약 처치 24시간 후 G1 세포주기 비율이 다소 증가하였으나 48시간 이후부터 오히려 소폭 감소하였고, subG1 세포수는 48시간 이후 증가하기 시작하여 72시간 후 소폭 증가되었음을 알 수 있었다. 따라서, 10  $\mu$ g/ml 농도의 etoposide 처치 시 세포사멸은 48시간 후부터 서서히 시작되어 72시간이 지나면 가속화 될 것으로 생각된다.

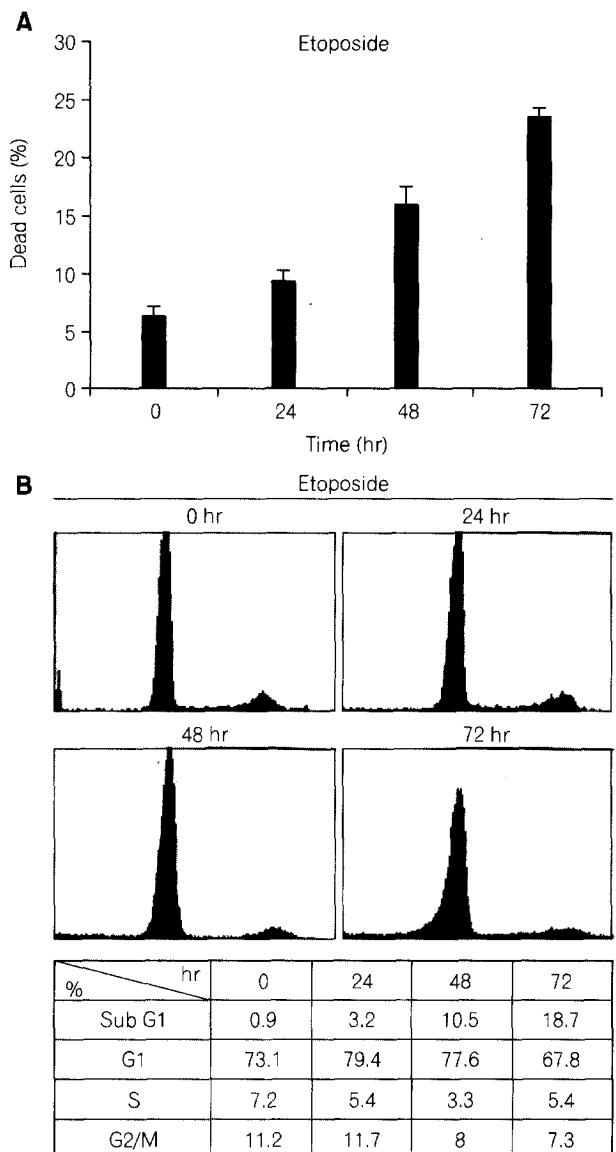


Fig. 1. Effect of etoposide on HSF cell viability and cell cycles. HSF cells were cultured in the absence or presence of etoposide (10  $\mu$ g/ml) for the indicated times. Cell viability was determined by trypan blue dye exclusion assay (A) and cell cycle analysis was performed using propidium iodide staining solution (B).

#### 2) Etoposide 처치가 세포주기조절 인자들의 초기 발현에 미치는 영향

선행된 결과들을 고려 할 때 시약 처치 24시간 이전에는 세포 사망이 발생하지 않으며 적어도 48시간 후 세포 사멸이 가속화 될 것으로 판단되어, 유전자 손상에 대한 초기 방어기전으로 세포주기 조절인자들이 어떻게 판여

**Fig. 2.** Expression of cell cycle regulatory genes in HSF following etoposide treatment. HSF cells were cultured in the presence of etoposide ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) for the indicated times. Western blot (A) or RT-PCR (B) was performed as described in materials and methods. Similar results were obtained from two independent experiments.

하는지를 분석하고자, 시약 처치 후 8시간 이내에 여러 시간대 별로 단백질을 추출하여 Western blot을 시행하였다. 단백질들의 발현변화를 보면(Fig. 2A), 시약 처치 2시간 후 p53은 뚜렷한 증가를 보였고, E2F-1은 시약처치 30분 후 그리고 4시간 후 두 번에 걸쳐 양적 증가를 보였으며, p21<sup>WAF1</sup>은 4시간이 지나서야 소폭의 증가가 시작되었다. MDM2는 시약 처치 후 1시간 이내에는 소폭의 양적 감소를 보이다가 4시간 이후 현저하게 증가하는 양상을 보였다. Pro-apoptotic 단백질인 Bax는 시약처치 8시간 이내에서는 양적 변화를 관찰 할 수 없었다. 또한 여러 단백질들의 mRNA의 양적 변화를 시약처치 2시간 이내의 초기 시간대에서 관찰하고자 하였다(Fig. 2B). 시약 처치 2시간 이내의 경우, p53은 단백질의 증가에 비해 mRNA의 증가는 미비한 반면, p21<sup>WAF1</sup> mRNA의 경우 단백질의 양적 변화와 대조적으로 시약 처치 30분 이후부터 증가를 보이다가 1시간 이후부터는 현저한 양적 증가를 보였다. MDM2는 E2F-1에 의하여 조절 받는 것으로 알려져 있는데, E2F-1 단백질 증가 시점과 거의 동일한 시간대에서(시약처치 0.5~1시간 후) MDM2 mRNA의 발현이 소폭 감소하였다.

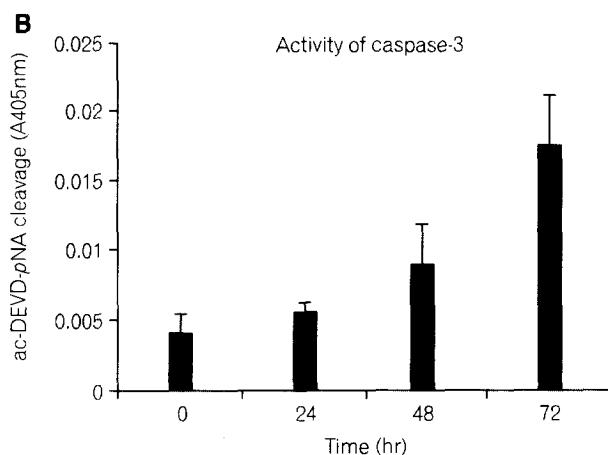
### 3) Etoposide 처치가 세포주기 조절인자들 및 apoptosis 관련 단백질들의 후기 발현에 미치는 영향

Etoposide 처치 48시간 이후 세포사멸이 가속화되는 것을 고려하여, 시약 처치 72시간까지 세포주기 조절 인자들 및 apoptosis 관련 단백질들의 발현을 Western blot 법으로 분석하였다(Fig. 3A). E2F-1은 점차적인 발현 증가를 보

였고, MDM2는 지속적인 발현증가를 보일 뿐만 아니라 인산화가 증가되어 mobility 변화가 생긴 것을 볼 수 있었다. pRb는 시약 처치 24시간 후부터 저인산화된(hypophosphorylated) Rb가 주로 발현되다가 시간이 지날수록 양적인 감소를 보였다. p53은 시약처치 24시간 후 증가된 발현이 그대로 유지되었으나 p21<sup>WAF1</sup>은 현저하게 발현이 증가된 상태에서 72시간째 뚜렷한 발현 감소를 보였다. p21<sup>WAF1</sup>과 같이 p53의 조절을 받는 Bax는 p21<sup>WAF1</sup> 발현이 감소한 72시간째 소폭의 증가를 보였고, caspase-3의 경우 pro-caspase-3의 발현 감소는 없는 상태에서 활성화된(active) caspase-3의 발현이 다소 증가하였다. Caspase-3 활성도를 같은 시간대에 측정한 결과, active caspase-3 증가와 일치하게 caspase-3 활성도도 비슷한 양상을 보임을 알 수 있었다(Fig. 3B).

### 4) MDM2 인산화에 따른 pRb와의 결합 변화

인산화 정도에 따라 단백질의 3차원적 구조가 변하고, 이에 따라 단백질들간의 결합 양상이 변하여 결국 단백질 복합체 기능이 변하는 것으로 밝혀져 있다. MDM2는 pRb C-pocket에 결합하는 단백질로 알려져 있는데, 앞의 결과에 의하면 etoposide 처치 시 MDM2 인산화가 점차적으로 증가하는 양상을 보였다. 그래서 본 연구자들은 MDM2 인산화와 pRb 결합과의 관계를 Immunoprecipitation-Western blot 법으로 확인하고자 하였다(Fig. 4). MDM2 항체로 immunoprecipitation한 후 MDM2 및 Rb 항체로 Western blot한 결과, MDM2에 결합된 pRb의 양이 현저하게 감소함을 알 수 있었다.



**Fig. 3.** Expression of apoptosis-related and cell cycle regulatory proteins in HSF following etoposide treatment. HSF cells were cultured in the presence of etoposide ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) for the indicated times. Western blot was performed as described in materials and methods (A). Similar results were obtained from two independent experiments. Caspase-3 like activity was determined using ac-DEVD-pNA, synthetic substrate of caspase-3 (B). pRb, hypophosphorylated Rb; ppRb, hyperphosphorylated Rb.

**Fig. 4.** Immunoprecipitation-Western blot analysis of MDM2 and pRb. HSF cells were cultured in the presence of etoposide ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) for the indicated times. 1 mg of total cell lysate was immunoprecipitated (I.P.) with anti-MDM2 antibody followed by Western blotting (W.B.) with anti-Rb antibody.

고  
찰

본 연구에서는 인간 피부 섬유아세포(human skin fibroblast)에 유전자 손상을 유발 한 후 세포주기 조절 인자들 및 apoptosis 관련 단백질들의 발현 양상을 초기와 후기 발현 변화로 나누어 분석함으로써 유전자 손상에 대한 세포 주기조절 차원에서의 세포 내 방어기전을 시간대 별로 나누어 분석하고자 하였다.

유전자 손상을 민감하게 인지하고 반응하는 단백질로 p53이 잘 알려져 있다. 유전자 손상 후 p53의 세포 내 축적은 매우 중요한 현상 중 하나인데 해독(translational) 후 p53 안정성 증가가 p53 축적에 핵심 기전으로 알려져 있다(12). 본 연구에서도 etoposide 처리 후 p53의 증가가 관찰되는 시점에서 p53 mRNA 발현이 거의 변화가 없어 여러 연구자들의 결과와 일치하였다. 그렇지만, p53의 현저한 양적 증가에 앞서서 소폭의 E2F-1 발현 증가가 관찰되었다. E2F-1은  $p19^{ARF}$ 의 유전자 발현을 유도하여 p53에 대한 MDM2의 조절 기능을 억제할 수 있는 것으로 알려져 있다(13,14). 본 연구에서 유전자 손상 초기에 E2F-1의 증가와 MDM2의 감소가 동시에 관찰된 것을 고려하면, 유전자 손상 시 E2F-1의 발현이 증가하여 MDM2 기능을 일시적으로 억제하게 되면 뒤이어 p53의 현저한 세포 내 축적이 시작될 것으로 사료된다.

$p21^{WAF1}$ 과 Bax는 p53의 조절을 받는 단백질로 잘 알려져 있는데 p53 의존성 세포사에서  $p21^{WAF1}$ 은 주로 G1 세포주기 정지에 Bax는 apoptosis 유도에 관여한다고 보고되었다(15). 본 연구에서도 p53 증가에 뒤이어  $p21^{WAF1}$ 의 발

현이 증가된 반면, Bax는 48시간 후에나 발현이 다소 증가되었다. 또한 p21<sup>WAF1</sup> mRNA 발현이 증가된 뒤 p21<sup>WAF1</sup> 단백질이 증가된 것을 고려하면, p53이 p21<sup>WAF1</sup> 전사를 촉진시켜 결국 p21<sup>WAF1</sup> 단백질 발현이 증가되어 세포 주기가 G1에 정지된 것으로 사료된다. p53에 의하여 조절 받는 Bax의 경우 유전자 손상 초기에는 증가하지 않고 apoptosis 진행 초기에 발현이 증가된 것을 볼 때, 유전자 손상 후 p53의 transactivation 기능은 세포 내 상황에 따라서 정밀하게 이루어질 것으로 판단된다. 이상의 결과들을 종합하면, 유전자 손상 초기에 E2F-1의 증가가 p53 축적에 중요하며, 증가된 p53은 결국 p21<sup>WAF1</sup>의 발현을 증가시켜 세포주기를 G1에 정지시키는 것으로 사료된다.

본 연구에서 etoposide 처치 48시간 후부터 세포사멸이 증가되었는데, 이때 E2F-1, p53, 및 Bax의 증가와 함께 caspase-3의 활성도가 증가하였다. Caspase-3의 존적 세포사멸 시 caspase-3 기질로 pRb가 잘 알려져 있는데(16) 본 연구에서도 저인산화된 pRb의 양이 소폭 감소하면서 절단된 48 kDa pRb 절편이 관찰되었다(data not shown). 최근에 caspase-3의 존적 세포사멸 시 p21<sup>WAF1</sup>이 절단되면서, 절단된 p21<sup>WAF1</sup>에 의하여 세포사멸이 더욱 더 가속화된다 는 보고가 있었는데(17), 본 연구에서는 caspase-3 활성화와 더불어 p21<sup>WAF1</sup>의 양적 감소가 관찰되었으나 p21<sup>WAF1</sup>의 절단된 단편은 확인할 수가 없었다.

본 연구에서 MDM2는 etoposide 처치 초기에(0.5~1시간) E2F-1 증가 시 발현이 소폭 감소된 반면, etoposide 처치 48시간 후부터는 E2F-1의 증가에도 불구하고 MDM2 발현증가 및 인산화가 촉진되었다. 이러한 양상은 E2F-1, p53, 그리고 MDM2 간의 음성(negative) 혹은 양성(positive) 되먹임 고리(feed back loop)에 의한 것으로 생각된다(8~10,18). 즉, E2F-1이 MDM2 억제를 통한 p53 증가를 유도하고, 증가된 p53은 양성 되먹이기 기전으로 MDM2 mRNA 발현을 촉진하고, MDM2는 다시 음성 되먹이기 기전으로 p53의 기능을 일부 억제할 것으로 생각된다. 따라서, 유전자 손상 초기 반응과는 달리 세포사멸 직전 혹은 세포사망 시 E2F-1, MDM2, 그리고 p53 간의 복잡한 조절 기전이 존재할 것으로 사료된다. 또한, MDM2는 pRb 및 p53과 삼중복합체(triple complex)를 형성하여 p53의 transrepression 기능을 억제시키는 것이 세포사멸 유도에 있어 중요하다고 보고되었다(19). 그러나 본 연구에 따르면, 세포사멸이 촉진되는 시기에 MDM2의 인산화가 증가되어 오히려 pRb로부터 MDM2가 이탈(release)되는 것으로 관찰되어 세포사멸 유도 직전 혹은 세포사멸 촉진 시 MDM2, p53 및 pRb 복합체가 서로 어떻게 변하는지는 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

따라서, 본 연구 결과에 의하면 인간 섬유아세포에 etoposide 처치로 인한 유전자 손상 시 초기에는 E2F-1이 증가하여 MDM2의 일시적 발현 감소가 초래된 뒤 p53의 양적 증가 및 그에 따른 p21<sup>WAF1</sup>의 증가로 인해 세포주기가 G1에 정지하며, 유전자 손상이 계속해서 누적되면 Bax 증가 및 caspase-3 활성화를 통하여 세포사멸이 촉진될 것으로 생각된다. 세포사멸 유도 혹은 촉진 시 MDM2는 인산화가 증가되면서 pRb로부터 유리되는데, MDM2의 pRb로부터 이탈이 의미하는 바는 더 깊이 연구해야 할 과제로 남아 있다.

## 결 론

본 연구에서는 인간 섬유아세포에 유전자 손상을 야기하는 etoposide 처치를 한 후 세포주기 조절 인자들 및 apoptosis 관련 단백질들의 발현양상을 초기와 후기 발현 변화로 나누어 분석한 결과, 초기에는 E2F-1의 증가로 인한 MDM2 감소가 p53 축적에 중요하게 작용하였고, 증가된 p53은 결국 p21<sup>WAF1</sup>의 발현을 증가를 통하여 G1 세포주기 정지에 관여함을 알 수 있었다. 유전자 손상이 계속해서 누적되면 Bax 증가 및 caspase-3 활성화를 통하여 세포사멸이 촉진되어 비정상 세포를 제거하는 것으로 생각된다. 이러한 결과들은 유전자 손상에 의한 암 발생 기전 연구뿐만 아니라 유전자 손상을 야기하여 암세포의 apoptosis를 유도하고자 하는 암 치료 모델의 기초자료로도 활용될 것이라고 생각한다.

## 참 고 문 헌

- Wilson MR. Apoptosis: unmasking the executioner. *Cell Death and Differentiation* 1998;5:646-652.
- Chinnaiyan AM. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia* 1999;1:5-15.
- Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995;267:1445-1449.
- White E. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev* 1996;10:1-15.
- Haffner R, Oren M. Biochemical properties and biological effects of p53. *Curr Opin Genet Dev* 1995;1:84-90.
- Adams JM, Cory S. The bcl-2 protein family arbiters of cell survival. *Science* 1998;281:1322-1326.
- Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326:1-16.
- Damian BS, Hsieh JK, Chan F, Lu X. mdm2: a bridge over the two tumor suppressors, p53 and Rb. *Oncogene* 1999;18:7681-7689.
- Monad J, Wu H, Dasgupta G. MDM2-master regulator of the

- p53 tumor suppressor protein. *Gene* 2000;242:15-19.
10. Loughran O, Nicholas B, Thangue L. Apoptotic and growth-promoting activity of E2F modulated by MDM2. *Mol Cell Biol* 2000;20:2186-2197.
  11. Lim CC, Kim IH, Cho JW, Baek WK, Suh SI, Suh MH, Park JW, Kang JS, Sohn SS. Expression of cell cycle control genes in Korean gastric cancer cell lines. *J Korean Cancer Assoc* 2000;32:279-287.
  12. Appella E, Anderson CW. Signaling to p53: breaking the posttranslational modification code. *Pathol Biol (Paris)* 2000; 48:227-245.
  13. Promerantz J, Schreiber-Agus N, Leigois NJ, Silverman A, Allard L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlow I, Lee H. The INK4a tumor suppressor gene product p19ARF interacts with mdm2 and neutralises mdm2's inhibition of p53. *Cell* 1998; 92:713-723.
  14. Kamijo T, Weber JD, Zambetti G, Zindy F, Roussel MF, Sherr CJ. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8292-8297.
  15. Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *J Pathol* 1999;187: 112-126.
  16. Fattman CL, An B, Dou QP. Characterization of interior cleavage of retinoblasoma protein in apoptosis. *J Cell Biochem* 1997;67:399-408.
  17. Zhang Y, Fujita N, Tsuruo T. Caspase-mediated cleavage of p21<sup>Waf1/Cip1</sup> converts cancer cell from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene* 1999;18:1131-1138.
  18. Sherr CJ, Weber JD. The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev* 2000;10:94-99.
  19. Hsieh JK, Chan FSG, O'Connor DJ, Mittnacht S, Zhong S, Lu X. RB regulates the stability and the apoptotic function of p53 via MDM2. *Mol Cell* 1999;3:181-193.