

난소암에서 GADD34 유전자의 발현변화

계명대학교 의과대학 산부인과학교실, *생리학교실
손원경 · 조치흠 · 송대규* · 권상훈 · 김숙현 · 강형욱 · 차순도

Increased Expression of GADD34 in Ovarian Carcinomas

Won kyung Shon, M.D., Chi Heum Cho, M.D., Dae Kyu Song M.D.*,
Sang Hoon Kwon, M.D., Sook Hyun Kim, M.D., Hyoung Ok Kang, M.D.,
Soon Do Cha, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology,

*Physiology, School of Medicine, Keimyung University, Daegu, Korea

Objective : GADD34 was originally described as a growth arrest and DNA damage-inducible gene. Increased expression of GADD34 was subsequently found to correlate with apoptosis, and forced overexpression of the protein leads to apoptosis. In this study we evaluated the expression of GADD34 in ovarian cancers and normal ovarian tissues.

Methods : Fresh tissues were retrieved from 15 cases with ovarian cancers, 7 normal and 3 benign ovarian tissues. The expression of GADD34 in ovarian cancers compared with normal tissues were examined by RT-PCR, Western-blot analysis and immuno-histochemical analysis.

Results : The overexpression of GADD34 mRNA levels was identified in ovarian cancers compared with normal ovaries by RT-PCR assay. Using Western-blot analysis, the overexpression of GADD34 was observed in ovarian cancer tissues compared with normal ovarian tissues. On histochemical results, the expression of GADD34 were observed in ovarian cancer tissues.

Conclusion : Increased expression of GADD34 in the ovarian carcinoma compared to normal ovarian tissues may play a part of role in pathogenesis of ovarian cancer.

Key Words : Ovarian cancer, GADD34

서 론

난소암은 부인암으로 인한 사망률 1위인 치명적인 암이다. 대부분의 환자들이 진단시 진행된 3기 이상에서 발견되는 것이 문제이다. 일차 치료후 병리학적 완전 관해율이 30%에 이르고, 부분 관해가 75%에 이르지만 재발이 많으며, 환자의 5년 생존율은 25% 이하가 된다.¹ 근치적 수술 후 항암화학요법이 주된 치료 방법이지만 암이 재발하게 되면 고식적인 항암화학요법을 하게 된다. 최근 연구의 방향은 암의 발생을 분자생물학적으로 잘 이해하고, 세포의 무한 증식이 일

어나는 기전을 억제하는 연구를 하고 있다.² 이러한 연구 중에서 종양억제 유전자가 기능을 상실하고 변이가 일어남으로써 암화가 일어난다는 근거 하에 종양억제 유전자를 조절하여 치료하는 연구가 제시되어 왔다. Berkhuick 등³은 초기 난소암의 10-15%에서 p53 유전자의 변이를 동반한 과 발현이 있고, 말기 암에서는 40-50%의 과 발현을 보고하였다.

Growth arrest and DNA damage-inducible (GADD) 유전자들은 스트레스에 반응하는 유전자들로 GADD34, GADD45, GADD153으로 구성되어져 있다. 이 유전자들은 UV irradiation, chemical carcinogens, starvation에

의해 유도된다.^{4,5} GADD34 유전자는 mouse MyD116 cDNA의 human/hamster homologue를 이루고, M1 세포의 myeloid 분화 중에 respond transcription에 의해 유도된다.⁶ M1 세포를 methylethane sulfonate (MMS), UV irradiation, interleukin-6로 처리하면 MyD116 mRNA가 가파른 증가가 확인된다.⁷ GADD 유전자들의 증가는 세포 성장 억제와 세포자멸사를 유도하고 위의 세 유전자의 협동으로 세포의 성장 억제를 돕게 된다.⁸ 그러나 이러한 GADD 유전자들이 세포자멸사에 관여하는 정확한 기전은 밝혀져 있지 않다. 이러한 것으로 볼 때 GADD 34 유전자는 스트레스에 의해 유도되는 세포자멸사에 관여하는 유전자로 생각되어 진다. 본 연구자는 난소암과 정상 난소 조직에서의 GADD34 유전자의 발현 정도를 비교하고 그 연관 관계를 규명하고자 이 실험을 계획하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

계명대학교 의과대학 산부인과학교실에서 병리조직학적으로 확진된 15명의 난소암 환자의 수술시 조직을 채취하였으며, 정상 난소 조직은 양성중양으로 수술시 제거된 7예의 정상 난소와 양성 난소 낭종 3예를 대조군으로 하였다. 환자들의 특성은 난소암은 평균 연령이 57세(45-68세)이었으며, 대조군은 평균 연령이 49세(43-58세) 이었다. 난소암의 조직학적 분류는 장액성이 8예, 점액성이 4예, 생식세포암이 3예이었다. 병기별로는 FIGO stage 1기가 5예, 2기가 1예, 3기가 9예이었다. 양성난소 낭종은 2예가 단순 낭종 이었고, 1예는 자궁 내막종 이었다.

2. RT-PCR

cDNA합성은 분리된 RNA 2 µg을 oligo dT (16 mer)를 사용하여 40 µL 용량으로 역전사(reverse transcription)를 시행하였다. 반응혼합액의 조성은 RNA 2 µg, 5 mmol/L MgCl₂, 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 1 mmol/L dATP, 1 mmol/L dTTP, 1 mmol/L dCTP, 1 mmol/L dGTP, 1 U/µL RNase inhibitor (Perkin-Elmer Co.), 2.5 U/µL MuLV reverse transcriptase (Perkin-Elmer Co., USA), 2.5 µmol/L oligo d(T)₁₆로, 반응 조건은 42°C 1시간, 99°C 5분, 5°C 5분으로 하였다. PCR은 10 X reaction buffer (15 mmol/L MgCl₂, 100 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 500 mmol/L KCl)

5 µL와 10 mmol/L dATP, dTTP, dCTP, dGTP 각 1 µL 씩, 그리고 30 µmol/L GADD34 sense (5'-ATG TAT GGT GAG CGA GAG GC-3') 및 antisense primer (5'-GCA GTG TCC TTA TCA GAA GGC-3')를 각각 1 µL를 넣은 mixture에 1 µL의 반응시킨 cDNA reaction mixture와 2.5 unit의 Taq polymerase (Perkin-Elmer Co., USA)를 넣은 후 증류수로 50 µL로 용량을 맞추고 30 µL의 mineral oil을 증충한 후 DNA thermal cycler (Perkin-Elmer Co., USA)를 사용하여 PCR을 시행하였다. 증폭된 PCR 산물 10 µL를 1% agarose gel에 전기영동한 후 관찰하였다.

3. Western blot analysis

분쇄한 세포에서 Lysis Buffer (10 mmol/L Tris-Cl [pH 7.4], 5 mmol/L EDTA [pH 8.0], 130 mmol/L NaCl, 1% TritonX-100), 0.2 mol/L phenyl-methyl-sulfonyl fluoride, proteinase inhibitor cocktail을 넣고 얼음에 30 분간 둔 후 원심하여 상층액을 취하고 Biorad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories Inc., USA)를 이용하여 단백질을 추출한 후 분광광도계(Du[®] 650, Beckman Coulter Inc., USA)의 595 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질을 정량하였다. 얻어진 단백질 분획을 전기영동하고 Nitrocellulose paper (Immobilon, Milipore Co., USA)로 전기이동(electrotransfer)을 시행하였다. 전기이동된 막을 blocking 용액에 넣어 cold chamber내에서 12시간 shaking하였다. Blocking용액을 제거하고 일차 항체(Santa Cruz Biotechnology Inc., USA)인 GADD34를 1:1,000으로 희석한 blocking 용액(실온)에 3시간 동안 반응시킨 후 1 X TBS-T 용액(20 mmol/L Tris, 137 mmol/L NaCl, 0.5% Tween 20)으로 nitrocellulose 막을 넣고 10분간 3회 세척하였다. 그리고 이차 항체인 goat polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA)를 1:1,000으로 희석한 blocking 용액에 nitrocellulose 막을 넣고 2시간 동안 반응시켜 항체를 결합시킨다. 1 X TBS-T 용액으로 nitrocellulose 막을 10분간 3번 세척하여 비 특이적으로 결합해있는 항체를 제거하였다. 세척 후 막에 남아있는 TBS-T를 제거하고 ECL Western Blotting Detection Reagent (Amersham Bioscience, USA)로 검출하였다.

4. Immunohistochemistry

조직에서 GADD34 단백질의 증명을 위해 4 µM 두께의 파라핀 절편을 유리슬라이드에 부착시키고 60°C

에서 1시간 동안 방치한 후 xylene과 계열알코올로 탈파라핀 및 함수를 하였다. 내인성 peroxidase의 차단을 위해 메탄올과 30% 과산화수소가 9:1의 비율로 섞인 용액에서 15분간 처리하고 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.2)로 수세하였다. 그 후 포르말린 고정으로 조직 내에 감추어진 항원을 노출시키기 위해 1% zinc sulfate용액에 담구어 microwave 오븐을 이용하여 15분간 가열하였다. 실온에서 20분 가량 식힌 후 30분간 normal horse serum (Vector Laboratories, USA)을 가한 후 항체인 GADD34 폴리클론항체(Santa Cruz Biotechnology, USA)를 1:10으로 희석하여 2시간 동안 37℃에서 반응시켰다. PBS로 수세하고 peroxidase-conjugated streptavidin (Dako, USA) 1:500을 37℃에서 15분간 반응시킨 후 PBS로 수세하고 DAB (3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)로 10-20분간 실온에서 발색하고 Mayer's hematoxylin으로 대비 염색을 한 후 광학현미경으로 관찰하였다. 광학현미경상에서 GADD34 단백질에 대한 면역조직화학적 반응의 판독은 종양세포의 세포질에 갈색으로 진하게 염색된 경우에 한해서 양성반응으로 하였다. 먼저 100배 시야의 저 배율에서 염색된 부위를 선택한 후 400배 시야에서 염색된 세포가 전체세포의 10% 이상인 경우 양성으로 판정하였다.

결 과

병리조직학적으로 확진된 상피성 난소암 5예와 정상난소 5예에서 mRNA의 발현을 보기 위해 RT-PCR을 시행하였다. 난소암 조직에서 정상보다 GADD34의 강한 발현을 보였다(Fig. 1).



Fig. 1. RT-PCR analysis of GADD34 and GAPDH mRNA expression in ovarian carcinomas (c) and normal ovarian tissues (N). GAPDH was used as internal control.

GADD34의 Western blot 분석에서 mRNA에서 보인 것 같이 난소암에서 발현의 증가를 확인하였다(Fig. 2). 조직에서의 발현을 보기 위해 시행한 면역화학염색에서는 난소암에서 GADD34의 발현이 확인되는 갈

색의 양성 반응을 확인하였으며, 정상 난소에서는 발현을 보이지 않았다(Fig. 3). 또한 난소암의 조직학적 종류에 관계없이 모든 난소암에서 양성 반응을 확인하였다.

GADD 34 (72KD)



C C C N N N

β -tubulin



C C C N N N

Fig. 2. Western-blot analysis of GADD34 and β -tubulin expression in ovarian crinomas (c) and normal ovarian tissues (N). β -tubulin was used as internal control.

고 찰

GADD34 유전자는 stress 즉, UV irradiation, chemical carcinogen, starvation에 의해 유도되는 유전자로 난소암에서의 연구는 지금까지 진행되어 온 것이 많지 않다. 본 연구자는 난소암과 정상 난소에서 GADD34 유전자의 발현 정도를 비교함으로써 암화 과정에 관계하는지를 연구하여 보고자 하였다.

GADD34 유전자는 원래 세포 성장을 억제하고, DNA 손상을 재생하는 기능을 가진 유전자이다. 이 유전자의 과 발현은 단백질에서 protein phosphatase type 1의 기능을 조절하여 세포자멸사에 이르게 한다. 세포자멸사가 수행되는 동안 많은 전사 인자들이 활성화되지만, 알려진 전사인자들은 그렇게 많지는 않다. 세포자멸사를 방해하거나 길항시키는 인자들은 BAX, BCL-X_L, 그리고 Killer/DR5가 있다.⁹⁻¹² 세포자멸사가 일어나는 동안 많은 유전자들의 증가가 치료나 조직에 따라 다양하게 일어난다. 반면에 GADD34 유전자는 p53의 상태와 관계없이 많은 다양한 세포에서 세포자멸사의 신호에 따라 유도된다.¹³ Human GADD34 유전자는 처음 세포주에 이온화 방사선(ionizing radiation) 투여에 의해 유도되며, p53에 의존하지 않고 세포자멸사에 이르게 한다고 알려져 있다.⁶ 일반적으로 GADD 유전자들은 DNA에 손상을 주는 약제 투여 후에 나타나며, 조절에 관여한다. GADD34 유전자의 유도는 세포자멸사와 관계가 밀접하고, 이온화 방사선 조사후의 세포자멸사의 척도로 사용된다. 세포는 이온화방

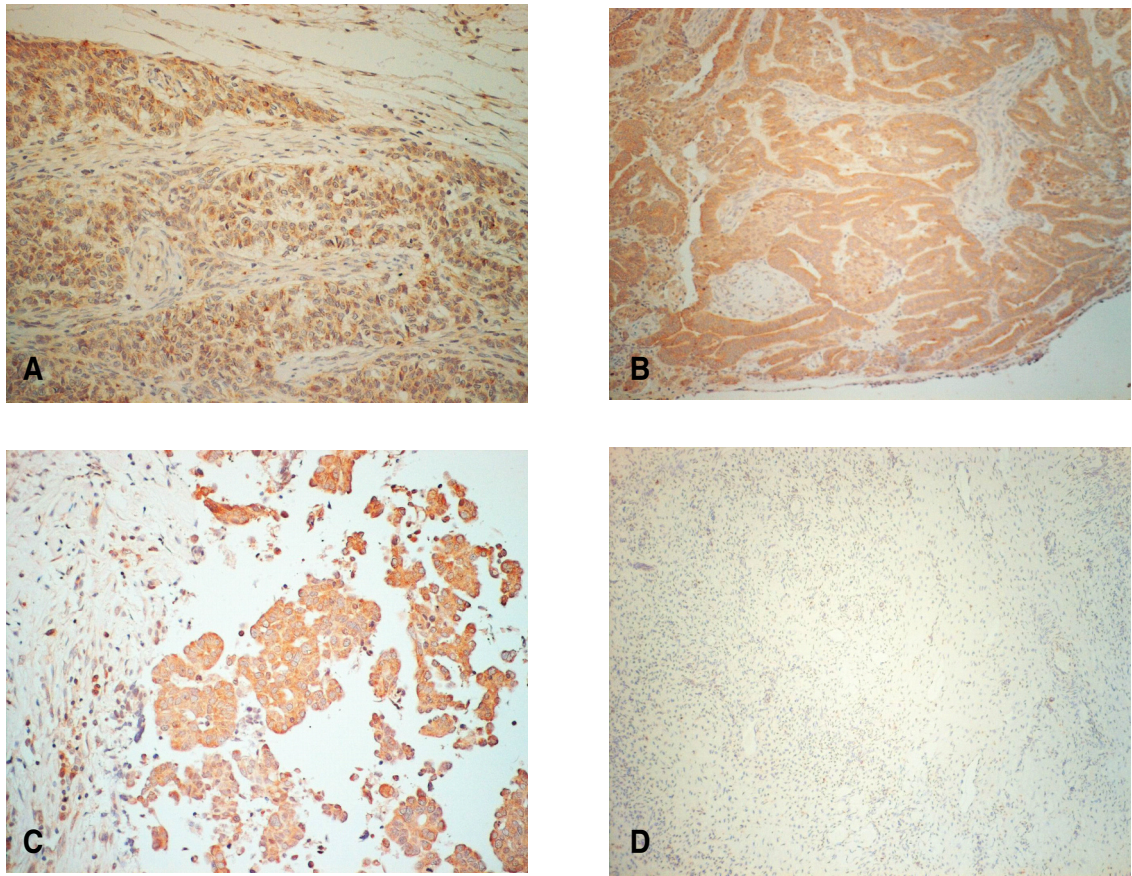


Fig. 3. Immunohistochemical analysis of GADD34 expression in ovarian carcinomas and normal ovarian tissues. A, B, and C were ovarian carcinomas. D was normal ovarian tissue.

사선 조사후 세포자멸사에 이르는 동안 ceramide가 생성하게 되고, 이것은 TNF α , UV 방사선, nerve growth factor, staurosporine, 그리고 FAS 투여 후에 생성되는 세포자멸사의 중간경로와 동일하다.¹⁴ 실제로 인간과 쥐의 세포에는 sphingomyelin을 ceramide로 치환하는 acid sphingomyelinase가 결여되어 있기에 이온화 방사선 조사후 ceramide 증가와 세포자멸사를 유도하게 된다.¹⁵ 이러한 것으로 볼 때 GADD34 유전자는 세포 성장의 억제와 방사선 조사로 인한 세포자멸사를 유도하게 된다.¹⁶

본 연구자는 GADD34의 세포자멸사와 관계있는 것을 근거로 하여 난소암에서의 발현을 정상 난소와 비교하여 보았다. 난소암은 다른 암과 같이 세포주기 회로가 끊임없이 가동되며, 세포의 증식이 세포자멸사 없이 계속적으로 일어난다고 생각된다. 그러므로 세포자멸사에 관계하는 GADD34 유전자의 감소를 예측

하였다. 그러나 본 연구에서는 mRNA와 단백질의 발현이 일관되게 난소암에서의 증가를 확인하였다. 또한 조직에서의 발현 양상을 비교하여서도 정상 난소에서는 발현이 없거나 미약하였고, 난소암에서는 강한 양성 발현을 확인하였다. 그러므로 GADD34 유전자는 난소암에서는 발현이 높은 것을 알 수 있었으며, 이것으로 보아 GADD34 유전자의 종래에 알려진 세포자멸사를 유도하는 역할 외에 다른 요소가 있다고 하겠다. 난소암에서의 GADD34 유전자의 발현 증가에 대한 것을 가설로 세워 보면, 종양 억제 유전자들의 기능을 상실하여, 본래의 역할을 하지 못하는 것은 유전자의 변이가 존재할 때이다. 난소암 환자에서 항암 화학제제인 platinum에 내성이 강한 것은 p53유전자의 변이가 많이 존재한다고 보고하였다.¹⁷ 그러므로 유전자 자체의 변이가 발생하는 경우에 본래의 종양억제의 역할을 수행하지 못할 것으로 생각된다. 이외에 난

소암에서는 세포의 생성과 세포자멸사가 활발하여, 세포자멸사에 관계하는 GADD34 유전자의 발현이 높게 나타날 수 있다고 생각된다. 마지막으로 가능성 있는 가설은 종양억제 유전자들의 methylation에 의한 기능의 상실을 보고하고 있어,¹⁸ GADD34 유전자의 methylation 이상에 의한 과 발현으로 추정할 수 있겠다. 그러나 위의 가설은 추후 실험을 통해 밝혀야 할 과제이다. 지금까지의 실험에서는 GADD34 유전자가 난소암에서 발현이 증가된 것을 확인하였다.

이상의 결과로 보아 난소암에서는 GADD34 유전자의 발현이 정상 난소와 비교하여 증가되었으며, 이러한 증가가 난소암의 암화 과정에 관여하는 일부의 기전이라 생각된다.

참고문헌

1. Banks E, Beral VGR. The epidemiology of epithelial ovarian cancer: a review. *Int J Gynecol Cancer* 1997; 7: 425-30.
2. Walker TL, Dass CR, Burton MA. Enhanced in vivo tumor response from combination of carboplatin and low-dose c-myc antisense oligonucleotides. *Anticancer Res* 2002; 22: 2237-45.
3. Berchuck A, Kohler MF, Marks JR, Wiseman R, Boyd J, Bast RC Jr. The p53 tumor suppressor gene frequently is altered in gynecologic cancers. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170: 246-52.
4. Fornace AJ Jr, Nebert DW, Hollander MC, Luethy JD, Papathanasiou M, Fargnoli J, et al. Mammalian genes coordinately regulated by growth arrest signals and DNA-damaging agents. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 4196-203.
5. Jackman J, Alamo I Jr, Fornace AJ Jr. Genotoxic stress confers preferential and coordinate messenger RNA stability on the five GADD genes. *Cancer Res* 1994; 54: 5656-62.
6. Hollander MC, Zhan Q, Bae I, Fornace AJ Jr. Mammalian GADD34, an apoptosis- and DNA damage-inducible gene. *J Biol Chem* 1997; 272: 13731-7.
7. Lord KA, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA. Sequence of MyD116 cDNA: a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 2823-9.
8. Kearsley JM, Coates PJ, Prescott AR, Warbrick E, Hall PA. GADD45 is a nuclear cell cycle regulated protein which interacts with p21Cip1. *Oncogene* 1995; 11: 1675-83.
9. Borovitskaya AE, Evtushenko VI, Sabol SL. Gamma-radiation-induced cell death in the fetal rat brain possesses molecular characteristics of apoptosis and is associated with specific messenger RNA elevations. *Brain Res Mol Brain Res* 1996; 35: 19-30.
10. Chen M, Quintans J, Fuks Z, Thompson C, Kufe DW, Weichselbaum RR. Suppression of Bcl-2 messenger RNA production may mediate apoptosis after ionizing radiation, tumor necrosis factor alpha, and ceramide. *Cancer Res* 1995; 55: 991-4.
11. Zhang J, Alter N, Reed JC, Borner C, Obeid LM, Hannun YA. Bcl-2 interrupts the ceramide-mediated pathway of cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 5325-8.
12. Wu GS, Kim K, el-Deiry WS. KILLER/DR5, a novel DNA-damage inducible death receptor gene, links the p53-tumor suppressor to caspase activation and apoptotic death. *Adv Exp Med Biol* 2000; 465: 143-51.
13. Hollander MC, Sheikh MS, Yu K, Zhan Q, Iglesias M, Woodworth C, et al. Activation of Gadd34 by diverse apoptotic signals and suppression of its growth inhibitory effects by apoptotic inhibitors. *Int J Cancer* 2001; 96: 22-31.
14. Verheij M, Bose R, Lin XH, Yao B, Jarvis WD, Grant S, et al. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signaling in stress-induced apoptosis. *Nature* 1996; 380: 75-9.
15. Santana P, Pena LA, Haimovitz-Friedman A, Martin S, Green D, McLoughlin M, et al. Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell* 1996; 86: 189-99.
16. Adler HT, Chinery R, Wu DY, Kussick SJ, Payne JM, Fornace AJ Jr, et al. Leukemic HRX fusion proteins inhibit GADD34-induced apoptosis and associate with the GADD34 and hSNF5/INI1 proteins. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 7050-60.
17. Kigawa J, Sato S, Shimada M, Takahashi M, Itamochi H, Kanamori Y, et al. p53 gene status and chemosensitivity in ovarian cancer. *Human Cell* 2001; 14: 65-71.
18. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999; 21: 163-7.

국문초록

목적 : GADD34 유전자는 stress 즉, UV irradiation, chemical carcinogen, starvation에 의해 유도되어 세포 성장을 억제하고, DNA 손상을 재생하는 기능을 가진 유전자이다. 본 연구자는 난소암과 정상 난소 조직에서 GADD34 유전자의 발현을 비교하고, 암화 과정에 관계하는지를 연구하여 보고자 하였다.

연구 방법 : 조직학적으로 확진된 15예의 난소암 조직과 10예의 정상 난소 조직을 대상으로 하였으며, 분석은 RT-PCR, Western-blot 분석과 면역조직화학염색을 시행하였다.

결과 : RT-PCR 분석에서 난소암 조직에서 정상보다 GADD34의 강한 발현을 보였다. GADD34의 western blot 분석에서 mRNA에서 보인 것 같이 난소암에서 발현의 증가를 확인하였다. 조직에서의 발현을 보기 위해 시행한 면역화학염색에서는 난소암에서 GADD34의 발현이 확인되는 갈색의 양성 반응을 확인하였으며, 정상 난소에서는 발현을 보이지 않았다. 또한 난소암의 조직학적 종류에 관계없이 모든 난소암에서 양성 반응을 확인하였다.

결론 : 난소암에서는 GADD34 유전자의 발현이 정상 난소와 비교하여 증가되었으며, 이러한 증가가 난소암의 암화 과정에 관여하는 일부의 기전이라 생각된다.

중심단어 : 난소암, GADD34