

Histone Deacetylase 억제제로 유도된 자궁내막암 세포의 세포증식 억제와 세포자멸사 기전연구

계명대학교 의과대학 동산의료원 산부인과

임수연 · 최준국 · 신소진 · 권상훈 · 조치흠 · 차순도 · 송동금

Induction of growth inhibition and apoptosis in human endometrial cancer cells by histone deacetylase inhibitors

Su Yeon Lim, M.D., June Kuk Choi, M.D., So Jin Shin, M.D., Sang Hoon Kwon, M.D.,
Chi Heum Cho, M.D., Soon Do Cha, M.D., Dong Kum Song, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Keimyung University, Daegu, Korea

Objective: Endometrial cancer is the most common malignant tumor of the female genital tract. Its incidence has increased in recent years, making up 13% of female genital cancers. Nevertheless, the search for agents effective in the treatment of either advanced or recurrent endometrial cancer has been disappointing. Histone deacetylase inhibitors (HDACIs) were recently found to be well-tolerated in patients with hematologic and solid malignancies. HDACIs have been shown to inhibit cancer cell proliferation, stimulate apoptosis, and induce cell cycle arrest. Our purpose was to investigate the antiproliferative effects of the HDACIs (sodium butyrate and HDAC-I1) against endometrial cancer cell line (Hec 1A) and normal endometrial cell line (T-HESCs).

Methods: MTS reduction assay was carried out to determine the cell viability. Cell cycle analysis and DNA fragmentation assay was done by fluorescent activated cell sorter analysis. The expression of cell cycle-regulatory and apoptosis-related proteins were evaluated by Western blot. Caspase 3 and 7 activity were measured by immuno-fluorescent staining.

Results: Each sodium butyrate and HDAC-I1 induced growth inhibition in a dose and time dependent manner in endometrial cancer cells but did not induce growth inhibition in normal endometrial cells. Treatment with each drugs in endometrial cancer cells increased the percentage of cells in subG1 phase. The expression of p53, p21, p27, FAS, and FAS legand were increased and it was associated with increased p21 and p27 expression in a p53-dependent manner. Activation of caspase-3, 7, 8, 9 and down-regulation of Bcl-2, up-regulation of Bax, with concomitant increase in PARP cleavage, were observed.

Conclusion: These results demonstrate that sodium butyrate induced growth inhibition and apoptosis in human endometrial cancer cells rising their possibility applicable against human endometrial cancers.

Key Words: Endometrial cancer cell line, Apoptosis, Histone deacetylase inhibitors (HDACIs)

서 론

National Cancer Institute (NCI)에 의하면 자궁내막암은 부인과 암 중 가장 흔한 여성생식기 암이다. 미국에서는 2006년에 41,200명이 자궁내막암으로 진단되고 약 7,350명의 여성이 이 질병으로 사망한다.¹ 우리나라에서 자궁내

접 수 일 : 2009. 3. 27.
채 택 일 : 2009. 7. 23.
교신저자 : 송동금
E-mail : tgjes@hanmail.net

막암은 여성 암의 1~2%를 차지하며 서양에 비해 동양에서는 드문 편이었지만, 자궁경부암, 난소암 다음으로 3위의 발생빈도를 보이고, 2004년 한국 부인암 등록사업 조사보고서에 따르면 714명의 신환이 발생하였다.²

자궁내막암의 원인은 불분명하지만 경제 성장에 따른 생활수준의 향상으로 인하여 평균 수명이 길어짐에 따라 발생빈도가 증가하는 추세이다. 이 외에도 에스트로겐 호르몬의 지속적인 노출이 자궁내막암의 발생을 증가시키고 종양의 성장을 촉진하는 요인이 되고 있다.³ 유방암 치료제로 사용되는 tamoxifen을 장기간 투여한 경우 tamoxifen이 자궁내막에 부분적 효현제 (partial agonist)로 작용해 자궁내막암의 발생률을 높이는 것으로 밝혀졌다.⁴ 이외에 비만, 당뇨병, 고혈압과 같은 전신질환 또한 자궁내막암의 발생을 높이는 것으로 알려져 있다. 자궁내막암의 치료는 질병의 경과와 환자의 전반적인 건강 상태를 종합적으로 고려해서 이루어진다. 외과적 절제가 가장 기본적인 치료이고, 방사선 치료, 호르몬 치료, 항암요법치료가 전이되거나 암이 재발한 환자의 경우 보조적인 치료방법으로 동원될 수 있다. 다양한 항암치료제들은 서로 다른 세포내 표적기관을 대상으로 하고 약제에 의해 유도되는 세포사멸은 생리적인 세포자멸사 기전에 의해 이루어지는 것으로 인정되고 있다.⁵

Histone Deacetylase (HDAC) 억제제는 악성화되는 과정에 있는 세포를 복구하는 능력을 가진 새로운 항암치료제이다. HDAC 저해제들은 세포주기를 억제하고 종양이 유발된 세포주에서 세포자멸사를 유도하며 생체에서 신생혈관 생성은 차단하고 면역시스템은 촉진시키는 것으로 알려져 있다.⁶ 특별히 sodium butyrate (NaB)는 장내에 존재하는 무독성의 단쇄지방산으로 식이섭취와 소화되지 않는 전분, 단백질의 혐기성 발효작용의 결과로 얻어지는 물질이다. Millimolar농도의 NaB는 세포주기 G0/G1 차단, 세포내 증식의 억제, 여러 배양된 세포주에서의 DNA 합성의 억제기능을 가지는 것으로 보고되었다.⁷ NaB의 강력한 세포증식 억제 기능과 독성이 적다는 장점 때문에 항암치료제로 관심을 끌고 있다. 최근 연구에 의하면 NaB에 의해 유도된 p21 단백질이 인간 자궁내막암 세포의 제거와 관련된 것으로 알려져 있다.^{8,9} 이에 본 연구자는 자궁내막암 세포와 정상 자궁 내막 세포에 HDAC 억제제 중의 하나인 NaB와 HDAC-I1을 각 각 투여하여 세포에 미치는 영향을

분석하고, 세포자멸사가 일어나는지 확인하며, 세포자멸사의 기전을 규명하여 치료에 유용한지를 알아보고자 이 연구를 계획 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입한 자궁내막암 세포주인 Hec 1A과 정상 자궁내막 세포 (T-HESCs)주를 이용하여 세포주 배양을 통해 실험을 하였으며, NaB와 HDAC-I1은 Calbiochem 회사 (USA)에서 구입하였다.

2. 연구 방법

1) 세포 배양

세포를 10% fetal bovine serum이 든 Dulbecco's modified eagle's medium/Nutrient mixture F-12 ham 배양액에서 부유시킨 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하고, 24~48시간 마다 배양액을 교환하였다.

2) MTS [3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)5- (3-carboxymethoxyphenyl)-2- (4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] 분석

96 well plate에 자궁내막암 세포를 multi pipet을 사용하여 4×10³/well로 분주하였다. 배양기에서 24시간 배양 후 NaB와 HDAC-I1을 각각 농도별로 24, 48, 72시간 처리 후 MTS 측정 시, One Solution Reagent를 실온에 90분 또는 37°C에 10분간 방치하였다. 각 well당 들어있는 media 200 μL를 multi pipet을 이용하여 pipeting하여 cell이 suspension 한 후 well당 100 μL 되도록 하였다. 각 well당 One Solution Reagent를 20 μL넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에 배양한 후 1~4시간 사이, 1시간 간격으로 MTS 측정하였다. 96 well plate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) Fluorescence-activated cell sorter (FACS)에 의한 세포주기 분석

자궁내막암 세포를 60 mm tissue culture dish에 3×10^5 cells/dish로 cell seeding 하였다. 배양기에 24시간 배양 후 NaB를 용량별로 각각 투여 하였다. 24시간 배양 시킨 세포를 PBS로 수세 후, $1 \times$ trypsin-EDTA로 재부유 시킨 뒤, 1,000 rpm 3분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 PBS로 재부유시킨 뒤, 1.5 mL tube에 옮겨 1,000 rpm 3분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 cold absolute 에탄올 1 mL를 넣고 재부유 시킨 후, 4°C에 1시간 이상 세포를 고정시켰다. 1000 rpm으로 3분간 다시 원심분리하고 상층액 제거하고 PBS로 수세한 후, Trisodium citrate (Sigma, USA) 0.1%, IGEPAL-Ca-630 (Sigma, USA) 0.1%가 함유된 용액에 RNase A 5 mg/mL, propidium iodide (Sigma, USA) 용액을 첨가하여 암실에서 1시간 동안 4°C에서 염색하였다. 유세포분석기 (Becton Dickinson, USA)를 이용하여 DNA 함량에 따른 histogram을 측정하였다.

4) DNA laddering analysis

자궁내막암 세포에 NaB를 투여후 10 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA와 0.5% Triton X-100 이 든 완충액을 얼음에 30분간 용해시켰다. 용해된 용해질

을 충분히 혼합 한 후 10,000 rpm으로 20분간 원심분리 하였다. 상층액에 분절된 DNA를 동일한 양의 neutral phenol: chloroform: isoamyl alcohol mixture (25:24:1)로 추출 한 뒤, 0.1 µg/mL ethidium bromide를 함유한 2% agarose gel에 전기영동 한 후 관찰하였다.

5) Western blot analysis

자궁내막암 세포에서 NaB 투여 후 세포 주기 회로와 세포자멸사에 관계하는 유전자의 발현을 보고자 시행하였다. 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 30분간 둔 후 원심하여 상층액을 취하고 Biorad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories Inc., USA)를 이용하여 분광광도계 (Du® 650, Beckman Coulter Inc., USA)의 595 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질을 정량 하였다. 얻어진 단백질 분획을 전기영동하고 nitrocellulose paper (Immobilon, Milipore Co., USA)로 전기이동 (electrotransfer)을 시행하였다. 전기 이동된 막을 blocking용액에 넣어 cold chamber내에서 12시간 shaking하였다. Blocking용액을 제거하고 세포 주기회로에 관계하는 일차항체인 p27, p53, p21 (Santa Cruz, USA)과 세포자멸사에 관계하는

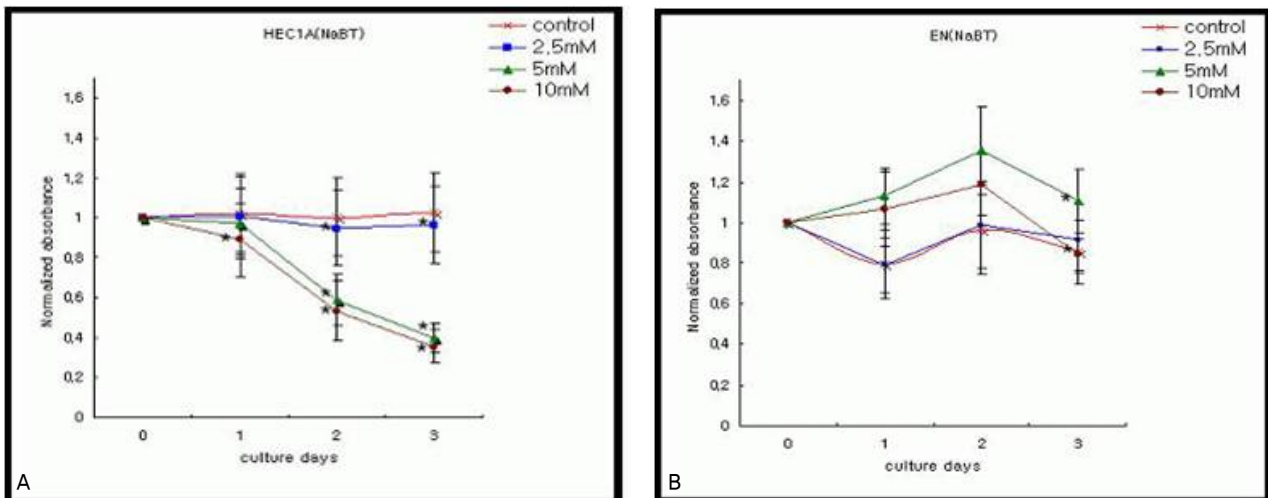


Fig. 1. Effect of sodium butyrate on the cell growth of endometrial cancer cells (Hec 1A) (A) and normal endometrial cells (T-HESCs) (B). Growth inhibition in Hec 1A cells treated for 24 and 48 hours with various concentrations of sodium butyrate. Cell viability was measured using Cell Titer cell Proliferation Assay (Promega Corp) and expressed as % of control culture conditions. * $P < 0.05$.

일차항체인 pro-caspase3, PARP, Bcl2, FAS (Santa Cruz, USA)을 blocking 용액에 1:1,000으로 희석하여 실온에 3시간 동안 반응 시킨 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, USA)를 1:1,000으로 희석한 blocking 용액에 nitrocellulose 막을 넣고 2시간 동안 반응 시켜 항체를 결합시켰다. 1 X TBS-T 용액으로 nitrocellulose 막을 10분간 3회 세척하여 비 특이적으로 결합해있는 항체를 제거하였다. 세척 후 막에 남아있는 TBS-T를 제거하고 ECL Western Blotting Detection Reagent (Amersham Bioscience, USA)로 검출하였다.

6) Caspase 3 & 7 activity 분석

chamber slide에 10^4 – 10^5 개의 세포를 부유시킨 후 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 배양시켰다. 배양 용기에 80%정도 되도록 배양 한 후 serum free media로 배양액을 교환 한다. 24시간 동안 starvation 시킨 후 NaB를 농도별로 처리하여 24시간 동안 방치하였다. 24시간 약물을 처리한 후 PBS로 두 번 씻어준 후 배양액을 300 µL넣어 주었다. 10 µL의 31X MR- (DEVD)₂ 용액을 첨가하여준 후 30분에서 1시간동안 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 반응시킨다. 반응이 끝나면 배양액을 버리고 PBS (인산완충액)로 1분간 두 번 수세하였고 필요하다면 Hoechst염색을 시행하였다. PBS를 버리고 coverslide로 덮어준 후 형광현미경으로 관찰하였다.

7) 통계처리

대조군 실험군 각 그룹의 독립적인 세포에서 3번의 실험을 수행하고 각 8번 자료를 측정하여 분석하였다. 대조군과 실험군의 그룹간의 차이 검정하기 위해서 *t*-test와 각 그룹에서 농도에 따른 차이 시간에 따른 차이를 알아보기 위해 분산분석 (ANOVA)을 이용하여 분석하였다.

*P*값 0.05를 유의기준으로 통계분석을 시행하였으며 SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 15.0E를 사용하였다.

결 과

1. NaB와 HDAC-I1의 자궁내막암 세포와 정상 자궁내막 세포에 대한 세포생존율

배양된 자궁내막암 세포인 Hec 1A 세포에 NaB를 농도별로 처리하여 24, 48, 72시간 후 NaB는 농도 의존적, 시간 의존적으로 의미있는 증식억제를 보였으며 (Fig. 1A), 정상 자궁내막세포의 경우에는 영향을 주지 않았다 (Fig. 1B). HDAC 억제제의 또 다른 종류인 HDAC-I1을 자궁내막암 세포주인 Hec 1A와 정상 자궁내막세포에 투여하여 자궁내막암 세포가 농도 시간의존적으로 의미 있는 증식 억제됨을 확인하였으나 (Fig. 2A), 정상 자궁내막세포에서는 증식 억제를 보이지 않았다 (Fig. 2B).

2. NaB와 HDAC-I1이 세포주기에 미치는 효과

NaB를 Hec 1A 세포에 농도별로 처리하여 24시간 후 세

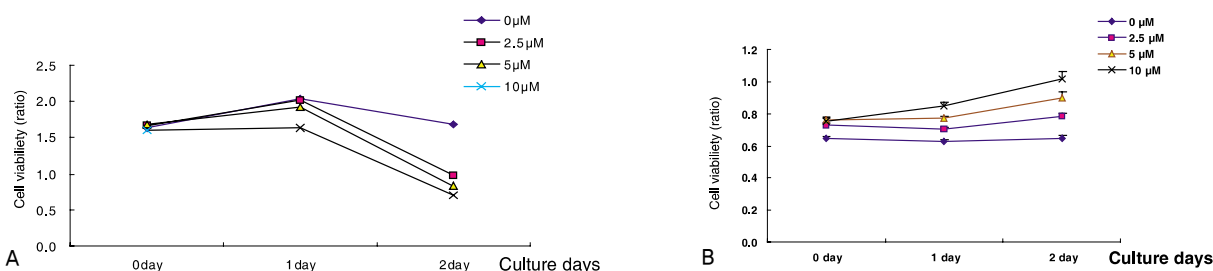
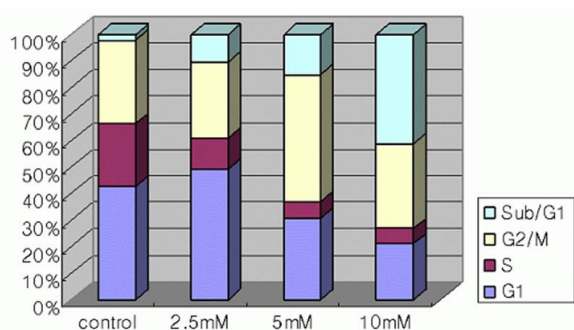
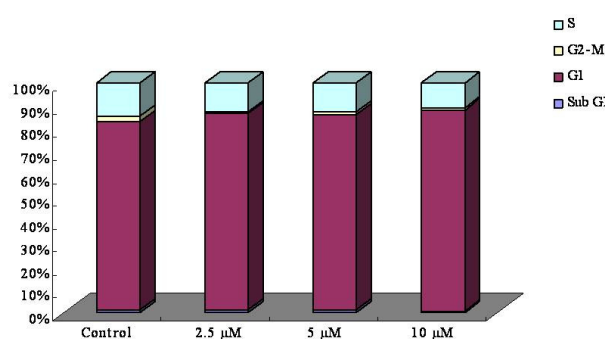


Fig. 2. Effect of HDAC-I1 on the cell growth of endometrial cancer cell Hec 1A (A) and normal endometrial cells (T-HESCs) (B). Growth inhibition in Hec 1A cells treated for 24 and 48 hours with various concentrations of HDAC-I1. Cell viability was measured using Cell Titer cell Proliferation Assay (Promega Corp) and expressed as % of control culture conditions.

P*<0.05, *P*<0.01.



A Concentrations



B Concentrations

Fig. 3. Effect of sodium butyrate treatment on the cell cycle profile in Hec 1A cells (A) and normal endometrial cells (T-HESCs)(B). After treatment with indicated dose of sodium butyrate treatment for 24 hours, cells were collected, fixed, stained with PI and analyzed by flow cytometry. The value represent the number of cells in a phase of the cell cycle as a percentage of total cells.

Marker 0 2.5 5 10 mM

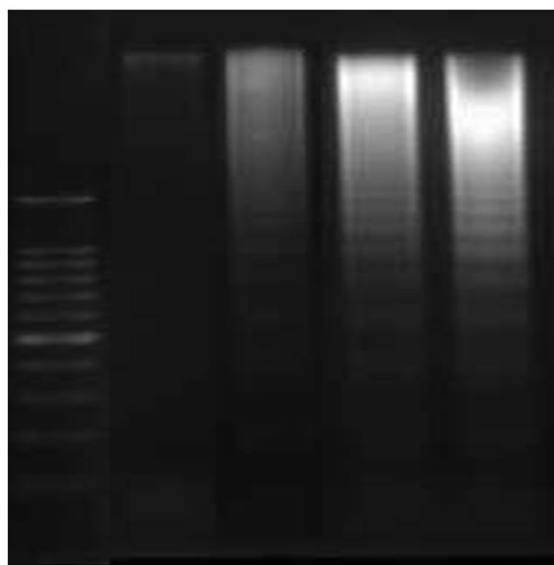


Fig. 4. DNA fragmentation assay of sodium butyrate in Hec 1A cells. Cells were seeded in 96-well culture plate. Cells were then treated with a indicated concentrations of sodium butyrate for 24hrs.

세포주기를 분석한 결과, 대조군과 비교하여 subG1 주기의 지연이 농도가 증가할수록 증가하였다 (Fig. 3A). 그러나 정상 자궁내막 세포에서는 세포주기의 변화가 없어 세포 생존율 분석과 같은 결과를 보였다 (Fig. 3B).

3. NaB 투여에 의한 자궁내막암 세포의 세포자멸사

세포주기에서보인 주기 억제가 세포자멸사에 의한 것인

지를 확인하기위해 세포주기의 모양을 가장 잘보인 Hec 1A 세포에 NaB를 농도별로 처리하여 24시간 후의 세포자멸사의 증거인 DNA 분절 검사를 시행하여본 결과 농도가 증가할수록 세포분절현상이 증가되는 것을 확인하였다 (Fig. 4).

4. 자궁내막암 세포에 NaB 투여에 의한 세포주기 관련 유전자와 세포자멸사 관련 유전자에 대한 효과

자궁내막암 세포주인 Hec 1A 세포에 NaB를 2, 5, 5, 10 mmol/L의 농도로 증량하여 처리하고 24시간 후 세포자멸사의 경로를 알아보기 위하여 pro-caspase 3, pro-caspase 8, active caspase 9, PARP 단백질의 발현을 측정 한 결과, pro-caspase 3와 pro-caspase 8은 투여 농도가 증가할수록 단백질의 발현의 감소를 확인하였고, active caspase 9은 증가를 확인하였다. 또한 PARP는 농도가 증가할수록 분절이 일어나는 것을 관찰하였다 (Fig. 5). 세포자멸사에 관계하는 Bcl2 단백질 발현의 감소와 Bax 단백질의 발현 증가를 확인하였고, FAS와 FAS ligand 단백질 발현의 증가를 확인하였다 (Fig. 5). 이외에 세포 주기회로 관련 유전자를 검색하여 NaB의 농도가 증가할수록 p53의 발현 증가와 더불어 하부 조절 유전자인 p27, p21 단백질 발현의 증가 및 CDK2 와 cyclin A의 발현 감소를 확인하였다 (Fig. 6).

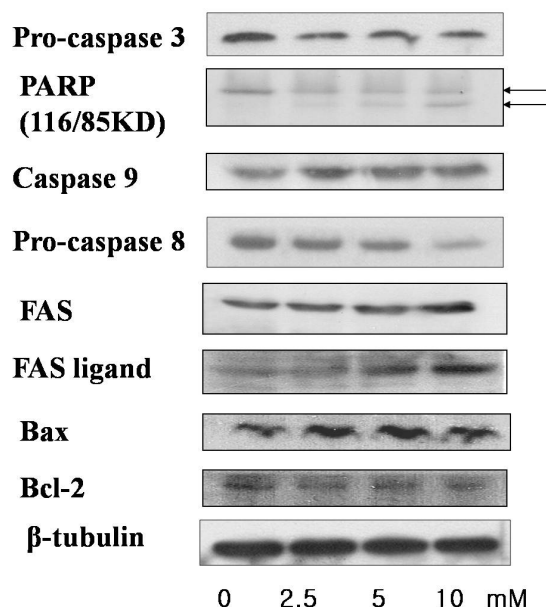


Fig. 5. Effect of the sodium butyrate treatment Hec 1A cells on the apoptosis-related gene expression. Whole cell lysates were prepared, and used for the detection of each protein expression using antibodies against pro-caspase 3, caspase 9, FAS, and PARP by Western blot analysis. β -tubulin was shown as an internal control.

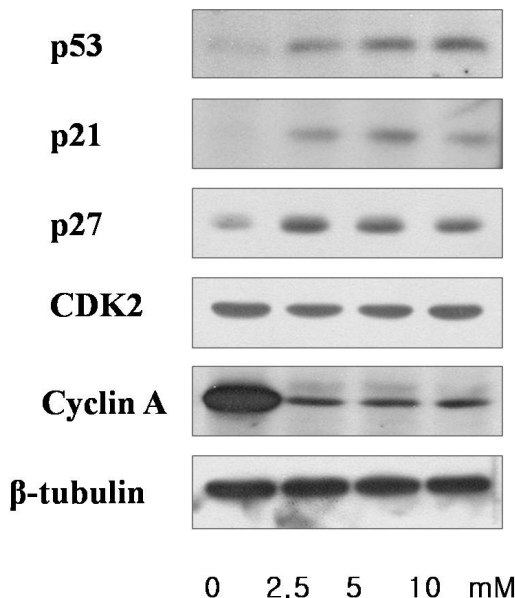


Fig. 6. Effect of the sodium butyrate treatment on the cell cycle-regulatory gene expression in Hec 1A cells. β -tubulin was shown as an internal control.

5. 자궁내막암 세포에 NaB 투여에 의한 caspase 활성화

자궁내막암 세포주인 Hec 1A 세포에 NaB를 2, 5, 10

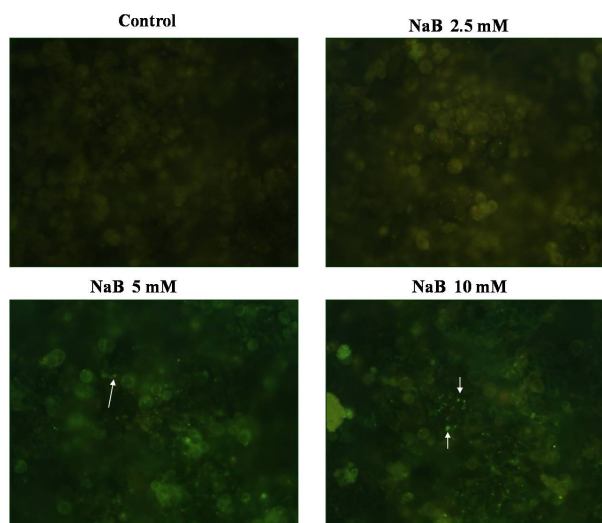


Fig. 7. Immunofluorescence analysis of the level of caspase 3 and 7 activity in Hec 1A cells. Cell were treated with of sodium butyrate in dose dependent manner for 24 h. Hoechst staining and immunofluorescence analysis were performed as described in Materials and methods.

mmol/L의 농도로 증량하면서 처리하여 24시간 후의 caspase 3와 7의 활성도를 면역형광 염색을 통해 형광 현미경으로 확인하여, 농도 의존적으로 caspase의 활성이 증가함을 관찰하였다 (Fig. 7).

고 찰

자궁내막암은 미국이나 유럽의 여러 선진국에서 높은 발생빈도를 보이고 있는 부인 암으로서 우리나라에서는 다른 여성 생식기종양 특히 자궁경부암에 비하여 비교적 낮은 빈도를 보이고 있다. 그러나 최근 급속한 경제 성장에 따른 생활수준의 향상으로 말미암아 평균 생명이 연장되고 점차 발생 빈도가 증가하고 있는 중요한 부인암의 하나로 자리매김하고 있다. 자궁내막암 환자의 70~80%는 암병기 제 1기에 속하며 생존율이 비교적 양호한 경과를 보이지만 진행암 및 재발암의 경우에는 다른 악성 부인과 종양과 마찬가지로 불량한 예후를 나타내게 된다.¹⁰ 지금까지 cisplatin, doxorubicine 그리고 paclitaxel의 등장으로 치료에 많은 효과를 보았으나 치료 반응률은 70% 이하이며, 반응 기간도 4~8개월 이하로 진행된 암에서의 치료는 지금까지 적절한 약물치료가 없는 실정이다.^{11,12}

최근 세포 복구 능력이 탁월한 HDACIs들이 새로운 항

암치료제로 부각되고 있고, 백혈병, 피부암, 대장암, 전립선암, 유방암, 폐암 그리고 자궁경부암에 효과 있는 것으로 보고 하였다.^{8,13-17} HDAC 억제제 계열의 하나인 NaB는 기존의 항암제와는 달리 독성이 적은 천연물질이면서도 강력한 세포 증식 억제 기능을 가지고 있어 새로운 항암치료제로서의 가능성 타진이라는 관점에서 주목을 받고 있다. 그렇지만 HDAC 억제제의 구체적인 작용기전에 대해서는 아직 명확히 밝혀지고 있지 않다. 본 연구에서는 천연 물질인 NaB와 합성된 HDAC-I1을 이용하여 자궁내막암 세포주인 Hec 1A 세포주와 정상 자궁내막 세포주인 THESCs 세포에 어떤 영향을 미치는지 알아보고, 그 작용기전을 분자 생물학적 방법으로 증명하고자 하였다.

먼저 NaB와 HDAC-I1에 의한 자궁내막암 세포의 증식 억제 효과를 알아보기 위하여 각 각 농도별, 시간별로 투여하였다. NaB의 경우 Hec 1A세포에서는 농도 및 시간 의존적 증식 억제를 보였으나, 정상 자궁내막 세포인 T-HESCs 세포에서는 억제를 보이지 않았다. HDAC-I1의 경우 자궁내막암 세포주인 Hec 1A 세포에서 시간 및 농도 의존적으로 증식억제 효과를 보였으나, 정상 자궁내막 세포인 T-HESCs 세포에서는 억제를 보이지 않았다. 그러므로 이 두 약제 모두가 정상 자궁내막 세포에는 영향을 주지 않는 것으로 확인 되어 예방이나 치료에 있어 좋은 약제임을 증명하였다. NaB와 HDAC-I1 투여가 세포주기에 미치는 영향을 조사하기 위하여 자궁내막암 세포와 정상 자궁내막 세포에 농도를 증량하면서 24시간 후 세포주기를 분석한 결과, NaB와 HDAC-I1 모두에서 자궁내막암 세포주에서 subG1 주기의 지연 증가를 보였으나 정상 자궁내막 세포주에서는 이 모든 약제에 세포주기의 변화는 관찰되지 않았다. 이러한 결과로 세포자멸사를 초래하는 subG1 주기의 변화가 자궁내막암 세포주에서 세포자멸사의 정도를 증가시키는 것으로 판단된다. 그러나 정상 자궁내막 세포는 영향을 받지 않는다는 것이 주목할 만한 사실이다. 세포자멸사를 확인하기 위해 DNA 분절검사를 자궁내막암 세포주인 Hec 1A 세포를 대상으로 시행하여, NaB 투여군에서 농도에 비례하여 분절이 증가됨을 보여 세포자멸사를 확인하였다.

항암치료 약제들은 다음의 두가지 세포자멸사 기전을 통해 세포사멸을 유도한다.⁵ 첫 번째 기전은 세포자멸사가 유도되는 신호전달과정에서 caspase (caspase-8 and cas-

pase-10)라고 하는 cystein protease가 활성화 되는데 이 효소가 effector caspase인 caspase-3을 활성화시켜 단백질과 DNA 등을 절단함으로써 세포자멸사를 유발하게 된다. 두 번째 기전은 항암치료, 방사선치료와 같은 스트레스 자극으로 활성화되는데, 이런 자극에 의해 cytochrome c와 같은 미토콘드리아단백질이 유리되고, 이어서 Apaf-1, dATP, procaspase-9과 복합체를 형성하게 되고 이것이 caspase-3를 활성화시킨다. 두 번째 기전은 antiapoptotic, proapoptotic members (Bid, Bax)를 포함하는 Bcl-2 family에 의해 기본적으로 조절된다.⁹ 본 연구에서는 caspase-3의 활성화와 caspase-9의 활성화가 면역형광 염색과 Wester blot을 통해 증가됨을 확인하여 이러한 경로를 통하는 것을 알 수 있었다. caspase-3는 세포내의 여러 종류의 기질 단백질을 절단한다.¹⁸ 그 중 Poly-[ADP-ribose]-polymerase (PARP) 단백질은 DNA 회복 과정에 관계되는 핵 내에 존재하는 효소 중의 하나인데, 다양한 유전자독성 물질에 의해 유발된 DNA strand break를 특이적으로 인지할 수 있는 DNA-binding단백질이다. 최근 PARP가 apoptosis specific protease를 위한 기질로 작용한다는 것이 밝혀졌다.¹⁹ 116kD의 PARP는 세포자멸사 동안에 분열되어 85kD 분절로 나뉘지는데, 이것이 초기 세포자멸사 반응의 특이적인 지표가 된다. 본 연구에서도 PARP 분절현상은 NaB의 농도가 증가할수록 발현이 증가함을 관찰할 수 있어 세포자멸사가 일어났음을 알 수 있었다. Bcl2는 세포자멸사의 진행과정과 꼭 필요한 조절요소 중의 하나로 28 kD의 세포막 관련 anti-apoptotic oncoprotein이다. Bcl2는 미토콘드리아막을 안정화시킴으로써 cytochrome c/Apaf-1 pathway의 활성을 방해하는 기전으로 anti-apoptotic 단백질 작용을 일으킨다. BAX는 mitochondria stress를 통해 유도된 세포자멸사에 중요한 요소로 작용한다.²⁰ 미토콘드리아 세포막이 pore protein과의 상호작용으로 미토콘드리아로부터 cytochrome c를 유리시켜 caspase-9을 활성화시키고, 세포자멸사를 위한 caspase activation pathway를 개시한다.²¹ 본 연구에서는 NaB 처리에 따른 Bcl2와 Bax의 발현 정도를 확인한 결과 Bcl2 발현은 감소하였으며, Bax의 발현은 증가를 확인하였다. 면역체계에서 세포자멸사의 시작은 death receptor로 불리는 CD95/Fas/Apo-1, tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 그리고 TNF-related apopto-

sis-inducing ligand (TRAIL) receptor 등의 TNF-R family와 같은 특별한 수용체에 ligand가 결합함으로써 일어난다.²² 본 연구에서 death receptor인 FAS와 FAS ligand의 발현 증가가 확인되어 이 경로를 통하는 것을 확인하였다. 세포주기 조절을 통한 세포의 성장은 적절한 시기의 각기 다른 cyclin dependent kinase (CDK)의 활성화와 비활성으로 조절된다. p21을 포함해서 CDK는 p53에 의존해서 G1 phase의 DNA 손상에 따라 level이 올라간다.²³ p27 또한 G1 progression의 억제조절자로 확인되고 있다. p53은 DNA 손상과 유전적 이상에 대한 세포반응에 주요한 역할을 하는 종양 억제 단백질이므로, p53의 활성화는

세포주기 정지와 DNA 복구 혹은 세포자멸사를 일으킨다. 본 연구에서는 p21과 p27의 발현이 p53에 의존적으로 증가하는 것을 확인하여, 자궁내막암 세포에 대한 NaB의 효과는 p53 의존성 경로를 통해 일어나는 것을 알 수 있었다.

이상의 결과를 통해 NaB와 HDAC-I1이 자궁내막암 세포에 내인성과 외인성의 세포자멸사의 경로를 거쳐 세포주기와 세포자멸사에 관련된 유전자들의 발현에 영향을 미침으로써 자궁내막암 세포의 증식을 억제하여 결과적으로 세포자멸사에 이르게 함을 알았으며, 향후 자궁내막암의 치료 약물로서의 가능성을 보인다고 생각된다.

참고문헌

- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, et al. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 2006; 56: 106-30.
- 대한산부인과학회 부인종양위원회. 한국부인암등록사업조사보고서 (2002.1.1-2002.12.31). 대한산부회지 2004; 47: 1029-70.
- Kim JW, Kim SH, Kim YT, Kim DK. Clinicopathologic and biological parameters predicting in endometrial cancer. *Yonsei Med J* 2002; 43: 769-78.
- American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Gynecologic Practice. ACOG committee opinion. No. 336: Tamoxifen and uterine cancer. *Obstet Gynecol* 2006; 107: 1475-8.
- Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 2002; 108: 153-64.
- Marks PA, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer* 2001; 1: 194-202.
- Schwartz B, Avivi-Green C, Polak-Charcon S. Sodium butyrate induces retinoblastoma protein dephosphorylation, p16 expression and growth arrest of colon cancer cells. *Mol Cell Biochem* 1998; 188(1-2): 21-30.
- Richon VM, Sandhoff TW, Rifkind RA, Marks PA. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 10014-9.
- Okamoto H, Fujioka Y, Takahashi A, Takahashi T, Taniguchi T, Ishikawa Y, Yokoyama M. Trichostatin A, an inhibitor of histone deacetylase, inhibits smooth muscle cell proliferation via induction of p21 (WAF1). *J Atheroscler Thromb* 2006; 13: 183-91.
- Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 647-56.
- Miller DS, King LP. Gynecologic oncology group trials in uterine corpus malignancies: recent progress. *J Gynecol Oncol* 2008; 19: 218-22.
- Thigpen T, Brady MF, Alvarez D, Adelson MD, Homesley HD, Manetta A, et al. Oral medroxyprogesterone acetate in the treatment of advanced or recurrent endometrial carcinoma: a dose-response study by the Gynecol. Oncol. Group (GOG) study. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1736-44.
- David G, Alland L, Hong SH, Wong CW, DePinho RA, Dejean A. Histone deacetylase associated with mSin3A mediates repression by the acute promyelocytic leukemia-associated PLZF protein. *Oncogene* 1998; 16: 2549-56.
- Inokoshi J, Katagiri M, Arima S, Tanaka H, Hayashi M, Kim YB, et al. Neuronal differentiation of neuro 2a cells by inhibitors of cell cycle progression, trichostatin A and butyrolactone I. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 256: 372-6.
- Saunders N, Dicker A, Poppa C, Jones S, Dahler A. Histone deacetylase inhibitors as potential anti-skin cancer agents. *Cancer Res* 1999; 59: 399-404.
- Huang H, Reed CP, Zhang JS, Shridhar V, Wang L, Smith DI. Carboxypeptidase A3 (CPA3): a novel gene highly induced by histone deacetylase inhibitors during differentiation of prostate epithelial cancer cells. *Cancer Res* 1999; 59: 2981-8.
- Sambucetti LC, Fischer DD, Zabludoff S, Kwon PO, Chamberlin H, Trogani N, et al. Histone deacetylase inhibition selectively alters the activity and expression of cell cycle proteins leading to specific chromatin acetylation and antiproliferative effects. *J Biol Chem* 1999; 274: 34940-7.
- De Schepper SD, Bruwier H, Verhulst T, Steller U, Andries L, Wouters W, et al. Inhibition of histone deacetylases by chlamydocin induces apoptosis and proteasome-mediated degradation of surviving. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 304: 881-8.
- Graziani G, Szabó C. Clinical perspectives of PARP inhibitors. *Pharmacol Res* 2005; 52: 109-18.
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001; 292: 727-30.
- Narita M, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz RJ, Matsuda H, et al. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 14681-6.
- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signalling and modulation. *Science* 1998; 281: 1305-8.
- Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994; 266: 1821-8.

= 국문초록 =

목적: 자궁내막암은 최근 급속한 경제 성장에 따른 생활수준의 향상으로 말미암아 평균 수명이 연장되고 점차 발생 빈도가 증가하고 있는 중요한 부인암의 하나이다. 자궁내막암 환자의 70~80%는 암병기 제 1기에 속하며 생존율이 비교적 양호한 경과를 보이지만 진행암 및 재발암의 경우에는 다른 악성 부인과 종양과 마찬가지로 불량한 예후를 보이며, 진행된 암에서의 치료는 지금까지 적절한 약물치료가 없다. Histone Deacetylase (HDAC) 억제제는 악성화되는 과정에 있는 세포를 복구하는 능력을 가진 새로운 항암치료제이다. 그렇지만 HDACIs의 구체적인 작용기전에 대해서는 아직 명확히 밝혀지고 있지 않다. 그러므로 본 연구자는 천연 물질인 NaB와 합성된 HDAC-I1을 이용하여 자궁내막암 세포주인 Hec 1A 세포주와 정상자궁 내막 세포주인 THESCs 세포에 어떤 영향을 미치는지 알아보고 세포에 미치는 영향을 분석하여 치료에 유용한지를 알아보고자 하였다.

연구 방법: NaB와 HDAC-I1 각각 투여 후 자궁내막암 세포와 정상 자궁 내막세포에서의 세포생존율을 알아보기 위해 MTS 분석을 이용하였고, 세포 주기 회로 및 세포자멸사에 관계하는 유전자의 발현을 보기 위해 Western blot analysis를 시행하였다. 세포주기분석은 유세포분석기를 이용하였으며 세포자멸사를 확인하기 위해 DNA fragmentation 방법을 이용하였다. Caspase의 활성도를 확인하기 위해 면역형광 염색을 시행하였다.

결과: 자궁내막암 세포에 NaB와 HDAC-I1을 농도별로 처리하여 24시간 후의 결과에서 농도 및 시간 의존적으로 증식억제의 증가를 보였으나 정상 세포에서는 성장 억제 효과는 보이지 않았다. 세포 주기분석에서 자궁내막암 세포에 투여 시 subG1 주기의 지연이 농도가 증가할수록 증가하였으나, 정상 자궁내막 세포에서는 세포주기의 변화가 없었다. 세포자멸사의 증거인 DNA 분절 검사를 시행하여본 결과 자궁내막암 세포가 NaB에 의해 농도가 증가할수록 세포분절현상이 증가되는 것을 확인하였다. p53, p21, p27, FAS와 FAS ligand 단백질은 농도가 증가할수록 발현이 증가하였고, CDK2와 cyclin A의 발현 감소를 확인하였으며, 미토콘드리아에서 세포자멸사에 관계하는 Bcl2는 감소하였으나 Bax 단백질은 반대로 발현 증가를 보였다. 비활성 형태의 pro-caspase 3과 8 단백질의 양적 감소, caspase 9의 활성화와 PARP cleavage의 증가되어 세포자멸사로 유도되는 것을 알았다. caspase 7과 3의 활성화도 검사에서도 면역형광으로 활성이 증가하는 것을 관찰하였다.

결론: 이상의 결과를 통해 NaB와 HDAC-I1이 자궁내막암 세포에 내인성과 외인성의 세포자멸사의 경로를 거쳐 세포주기와 세포자멸사에 관련된 유전자들의 발현에 영향을 미침으로써 자궁내막암 세포의 증식을 억제하여 결과적으로 세포자멸사에 이르게 함을 알았으며, 향후 자궁내막암의 치료 약물로서의 가능성을 보인다고 생각된다.

중심단어: 자궁내막암 세포주, 세포 자멸사, Histone deacetylase inhibitors (HDACIs)
