악액질 완화를 위한 안전한 Nuclear Factor-kappa B 전사인자 제어 물질 발굴

박정수

단국대학교 의과대학 생화학교실 부교수

Safe Nuclear Factor-kappa B Inhibitor for Cachexia Management

Jeong-Soo Park

Associate Professor, Department of Biochemistry, Dankook University College of Medicine, Cheonan, Korea

Purpose: Cachexia is a complex metabolic syndrome associated with wasting of skeletal muscle which contributes to nearly one-third of all cancer deaths. Cachexia lowers the frequency of response to chemotherapy and radiation and ultimately can impact survival as well as quality of life during treatment. NF-kappa B is one of the most important molecular mediators of cachexia. In this study, therefore, possible candidates for inhibitors of NF-kappa B were searched. **Methods:** Amino acids that regulate cellular redox potential by adjusting the level of NAD/NADH ratio, such as aspartate, pyruvate, and isocitrate were selected. **Results:** Pyruvate effectively inhibited luciferase activity in TNF-stimulated 293T cells transfected with an NF-kB dependent luciferase reporter vector. Pyruvate also showed protective effect on muscle atrophy of differentiated C2C12 myocyte induced by TNF/IFN. **Conclusion:** We might be able to develop the nutritional management strategy for cancer cachexia patients with pyruvate supplementation.

Key Words: NF-kB; Pyruvate; Cachexia; Cancer patient nursing; Nutrition

국문주요어: NF-kB 전사인자, 피루브산, 악액질, 암환자 간호, 영양

서 론

악액질(cachexia)은 암과 에이즈(acquired immunodeficiency syndrome)를 포함하는 만성 질환의 최종단계에서 수반되는 극도의 영양실조 상태 또는 쇠약 상태로서 지방 감소와는 무관하게 근육이 소실되는 것을 그 특징으로 하는 복합적 대사 증후군이다(Evans et al., 2008; Larkin, 1998). 암성 악액질(cancer induced cachexia)은 중증 암, 특히 소화기암, 췌장암, 흉부 암, 머리와 목의 종양의 경우 전체 환자의 50-80%에서 동반되며(Hopkinson, Wright, McDonald, & Cor-

ner, 2006), 암 관련 사망의 약 20-30%의 원인이 된다(Choi, 2011; MacDonald, Easson, Mazurak, Dunn, & Baracos, 2003; van Eys, 1985). 암성 악액질은 단순한 공복(starvation)이나 식욕 부진, 노화에 따라 나타나는 근육감소증(sarcopenia), 뇌졸중 환자 등에서 나타나는 부동 증후군에 의한 근위축(Im & Choe, 2002) 등과 마찬가지로 체중의 감소가 동일한 증상으로 나타나기는 하지만, 종양에서 유리 인자들에 의해 야기된 대사 조절의 변화로 동화 자극이 감소되고 이화 반응이 증가되는 결과로 근육의 소실이 나타난다. 암성 악액질 치료를 위한 단순한 영양 보충은 완화 효과를 거두지 못하는 것으로 보고되고 있다(Barber, Ross, & Fearon, 1999; Gullett, Mazurak, Hebbard, & Ziegler, 2011). 암성 악액질이 나타난 환자의 경우 항암 화학 요법이나 방사선 치료에 견딜 수 있는 능력이 저하되어 효율적인 치료의 진행이 어렵고 그 결과 환자의 생존율뿐 아니라 치료 과정에서 삶의 질을 저하시키는 주요한 원인이 되고 있다(Andreyev, Norman, Oates, & Cunningham, 1998; O'Gorman, McMillan, & McArdle, 1998).

Corresponding author:

Jeong-Soo Park, Associate Professor, Department of Biochemistry,
Dankook University College of Medicine, 119 Dandae-ro, Dongnam-gu,
Cheonan 330-714, Korea
Tel: +82-41-550-3876 Fax: +82-41-565-6167 E-mail: jeongsp@dankook.ac.kr

*본 연구는 2011년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음.

투고일: 2012년 7월 2일 심사회의일: 2012년 7월 2일 게재확정일: 2012년 7월 19일

따라서 암 환자의 수명을 연장시키고 치료 효과를 증대시키며 환자의 삶의 질을 향상시키기 위해서 악액질을 완화시키거나 저해할 수 있는 방안을 강구하는 것이 절실히 요구되고 있다. 따라서 암 환자의 치료 효율을 높이고 삶의 질을 향상시키기 위하여 악액질의 분자적 기전을 이해하고, 악액질에 수반되는 대사적 문제들을 정상화시킬 수 있는 약물을 개발함과 동시에 영양적인 보충으로 악액질을 완화시킬 수 있는 연구가 필요하다.

암성 악액질에서 나타나는 근육 소실의 분자적 기전으로 TNF- α 와 인터페론 감마가 중요한 매개자로 보고되었으며(Argiles & Lopez-Soriano, 1999; Oliff et al., 1987; Tracey & Cerami, 1994), 이에 의한 유전자 전사 인자 Nuclear Factor kappaB (NF- κ B)의 활성화가 근육 단백질의 합성 저하를 야기하는 것으로 보고되었다(Acharyya et al., 2004; Guttridge, Mayo, Madrid, Wang, & Baldwin, 2000). TNF- α 에 의한 골격근 소실은 NF- κ B를 통한 MyoD 유전자 전사인자의 발현 저해에 의해 근육으로의 분화가 저해되고 근 단백질의 발현 저하로 근육 소실이 야기된다. 이를 뒷받침하는 증거로 실험 동물에서 중앙 부위에 NF- κ B 활성을 억제하였을 때 악액질이 완화되는 결과를 나타내었다(Kawamura et al., 1999). 암환자의 경우에도 NF- κ B 활성을 저해할 수 있다면 TNF- α 에 의한 근육소실을 줄일 수 있을 것이며, 이는 악액질로 인한 암 사망률을 저하시키고, 암 치료 효과를 증진시킬 수 있을 것이다. NF- κ B의 억제는 암성 악액질뿐 아니라 암 종괴 자체의 증식이 억제되고, 세포 사망(apoptosis)이 촉진되는 효과가 있기 때문에 많은 연구에서 암 치료 전략으로 NF- κ B 활성 저해제가 개발되었다. 프로테아좀(proteasome) 억제제, 항산화제, 항염증제, 합성 펩타이드 등 다양한 형태의 억제제가 개발되고 있으나 *in vivo* 효과 및 안정성에 대한 연구가 뒷받침되지 못하고 있는 실정이다(Schwartz, Hernandez, & Mark Evers, 1999).

NF- κ B는 대표적인 세포 내 산화 환원 전위 의존성 전사 인자이다(Ginn-Pease & Whisler, 1998; Sen & Packer, 1996). NF- κ B가 활성화되기 위해서는 억제 단백질인 I κ B의 유리와 더불어 p50과 p65 아단위가 이황화(disulfide) 결합으로 이합체화(dimerization)를 유지하는 산화형일 때 핵 내로 이동하여 해당 DNA 결합 부위에 부착되어 활성을 나타낼 수 있다(Figure 5F; Staal, Roederer, Herzenberg, & Herzengerg, 1990). 이황화 결합에 관여하는 시스테인 잔기의 티올(thiol)기 전위는 글루타티온(glutathione, GSH)을 비롯한 티올 공여기에 크게 영향을 받기 때문에 세포 내 NAD/NADH, NADP/NADPH 비에 크게 좌우된다(Ginn-Pease & Whisler, 1998; Sen & Packer, 1996; Figure 5F). 또한 NF- κ B의 활성화는 다양한 자극에 의해 조절되는데, 그 중 H₂O₂와 같은 ROS 자극 및 세포 내 대사 과정에서 생성되는 산소 라디칼이 NF- κ B 활성화 기전에 있어 매우 중요한 인자로 알려져 있

다(Sen & Packer, 1996; Figure 5). 세포 내 NAD/NADH나 NADP/ NADPH 등의 산화 환원 조절 물질들의 균형 변화는 세포 산화 환원 전위를 변화시킬 뿐 아니라 생체 내 유리 라디칼의 생성을 조절하기도 한다(Massudi, Grand, Guillemin, & Braid, 2012). 이렇게 세포 내 산화 환원 조절 물질의 균형 조절에 의해 세포 산화 환원 전위가 조절 가능하고 이는 NF- κ B의 활성화를 직접적으로 제어하기 때문에 본 연구에서는 산화 환원 전위를 조절할 수 있는 아미노산들에 주목하였다. 산화 환원 조절 물질들의 균형은 아스파테이트(aspartate), 이소시트르산(isocitrate), 피루브산(pyruvate) 등의 아미노산들에 의해 조절 가능하며 이에 의해 산소 라디칼 생성이 대사적으로 조절 가능함이 알려져 있다(Barron, Gu & Parillo, 1998; Park, Oh, & Park, 1997; Park & Park, 1995). 아스파테이트는 미토콘드리아 막에 존재하는 말레이트-아스파테이트 왕복통로(malate-aspartate shuttle)를 통해 미토콘드리아 기질과 세포질의 NAD/NADH 균형을 조절함으로써 산화 환원 전위를 조절하고 산소 라디칼 생성을 대사적으로 조절한다(Barron, Gu & Parillo, 1998; Figure 5D). 피루브산의 경우 항산화제 효과를 나타내는 것이 이미 보고된 바 있으며(Varma, Devamanoharan, & Ali, 1998; Figure 5A), 세포질에서 락테이트 탈수소효소(lactate dehydrogenase, LDH)에 의해 락테이트로 전환되는 과정에서 NAD/NADH 비를 역전시키거나(Figure 5B), 미토콘드리아 내로 이동하여 피루브산 탈수소효소(pyruvate dehydrogenase)와 TCA 회로를 경유하면서 전위 조절에 기여하기도 한다(Figure 5C). 이에 본 연구에서는 인체에 해가 없으며 산화/환원 전위를 조절할 수 있는 아미노산 중에서 NF- κ B의 활성을 효과적으로 제어할 수 있는 안전한 억제제를 검색함으로써 이를 이용하여 암성 악액질을 분자적 기전에 기반을 두고 부작용 없이 안전하게 제어하고자 하였다. 또한 영양분자생물학적 접근을 통해 암 환자의 치료 효율을 높이고, 삶의 질을 향상시킬 수 있는 기반을 마련하고자 한다.

연구 방법

1. 세포배양 및 분화 유도

실험에 사용한 293T 인체 태아 신장 상피세포주(human embryonic kidney epithelial cell line; American Type Culture Collection [ATCC], VA, USA)는 DMEM 배지(Life technologies-Gibco, NY, USA)에 10% 태아 우혈청(fetal bovine serum; Thermo Scientific Hyclone, UT, USA)과 50 IU/mL의 페니실린, 100 μ g/mL의 스트렙토마이신 항생제(Life technologies-Gibco)를 넣고 배양하였다. 근육위축 실험을 위해 사용한 C2C12 생쥐 골격근아세포(mouse skeletal myoblast; ATCC) 세포주는 평소에는 상기와 동일한 배지에서 배양하다가 분화 유도 3일

전부터 20% 태아 우혈청이 포함된 배지에서 배양하였다. 골격근세포(myotube)로의 분화 유도(Acharyya et al, 2004)는 분화 배지(differentiation medium, DM): 20% 태아 우혈청 대신 2%의 말 혈청(horse serum; Thermo Scientific Hyclone)과 1 μ M의 인슐린(insulin, Sigma-Aldrich, MO, USA)을 가하고 4-7일간 유도하였다. 분화 배지는 매 24 시간마다 새로 갈아주었다.

2. NF- κ B reporter construct 제작

NF- κ B 활성 측정을 위하여 NF- κ B 결합 DNA 염기서열을 이용하여 발광효소(luciferase) 분석 용 plasmid DNA 벡터(pNF- κ B-Luc)를 제작하였다(Guttridge, Mayo, Madrid, Wang, & Baldwin, 2000; Han, Englert, Yang, Delude, & Fink, 2005). NF- κ B 결합을 위한 염기서열은 IL-6 유전자의 프로모터 부위로부터 취하여 세 번 중열 중복(tandem repeat)하여 사용하였고(Figure 1A; white box), 이후 인터페론 베타의

프로모터를 연결하여 이를 제조사의 manual에 따라 pGEM-luc 벡터(Promega, WI, USA)에 클로닝 하였다. 제작한 pNF- κ B-Luc의 구조를 Figure 1A에 모식적으로 나타내었다.

3. 형질주입(Transfection)

NF- κ B 활성의 변화를 측정하기 위하여 위에서 제작한 pNF- κ B-Luc 벡터를 사용하여 발광효소 분석을 수행하였다. 이를 위하여 pNF- κ B-Luc 벡터를 Lipofectamine 2000 형질주입 시약(transfection reagent; Lifetechnologies-Invitrogen, NY, USA)을 사용하여 293T 세포에 형질주입 하였다(Han, Englert, Yang, Delude, & Fink, 2005). 동시에 각 실험에서 형질주입 효율을 보정하기 위하여 pSV- β gal 벡터를 함께 동 형질주입(co-transfection)하였다. 293T 세포를 형질주입 12-18 시간 전에 약 30% 정도로 6 well plate에 계대배양하고, 각 DNA는 luciferase construct를 1 μ g, 그리고 pSV β gal DNA를 1 μ g씩 사용하였다. Lipofectamine2000을 제조사의 manual에 따라 DNA와 함께 섞어 혈청과 항생제를 넣지 않은 배지에서 5시간 동안 배양하고, 이후 정상 배지로 교환한 다음 DNA를 넣은 지 24시간 되는 때에 24 well plate로 계대배양 하였다.

4. TNF- α 유도 NF- κ B 활성화

293T 세포에 상기의 방법으로 pNF- κ B-Luc 플라스미드를 형질주입 후 48시간 경과 시점에 혈청을 4-5시간 동안 제거하여 NF- κ B의 기본 활성을 기저 수준으로 낮추었다. 이후 TNF- α (Promega, WI, USA)를 서로 다른 농도(0.33-10 ng/mL)로 각기 처리하고 2시간 후에 발광효소 분석에 의해 NF- κ B 활성을 측정하였다(Li, Thomas, Suzuki, De Brabander, Wang, & Harran, 2004).

5. 아미노산 및 약물의 처리

이미 잘 알려진 라디칼 제거제인 N-acetylcysteine (NAC) (Sigma-Aldrich, MO, USA) (van Zandwijk, Dalesio, Pastorino, & de Vries, 2000)을 포함하여 각종 아미노산 및 관련 약물을 전처리 하고 NF- κ B 활성을 비교하였다. 이를 위하여 TNF- α 자극 이전에 먼저 세포를 2시간 동안 혈청이 없는 배지로 배양 후에, NAC을 동일 혈청 제거 배지에 섞어 2시간 동안 추가 전 처리 하였다. 사용한 아미노산은 아스파테이트(aspartate), 글루탐산(glutamate), 피루브산(pyruvate), 알라닌(alanine), 이소시트르산(isocitrate), 글리신(glycine) (Sigma-Aldrich, MO, USA)이며 각각 0-20 mM 농도에서 실험하였다. 아미노산은 혈청 제거 배지에서 5시간 동안 전처리 하고 TNF- α 자극에 2시간 노출하여 NF- κ B 활성을 분석하였다.

Figure 1. Optimization of NF- κ B reporter assay. (A) Construct of pNF- κ B-Luc plasmid. Dose dependent (B) or time dependent (C) activation of NF- κ B dependent reporter gene expression by TNF- α stimulation. * $p < .05$; ** $p < .001$. RLU = relative luciferase unit.

6. 발광효소 분석(Luciferase assay) 및 통계 처리

처리된 세포를 PBS로 세척한 후에 세포 용해 시약(lysis buffer: 10 mM Tris, pH 8.0; 1 mM EDTA; 0.5% NP-40; 150 mM NaCl; 1 mM PMSF; 1 mM aprotinin)을 사용하여 균질액(homogenate)을 만들었다. 각각의 시료로부터 동일한 양의 균질액을 이용하여 루미놀(luminol; Promega, WI, USA) 액과 혼합하고 이를 발광분석기(luminometer; GloMax-20/20; Promega, WI, USA)를 이용하여 발광효소 값(luciferase unit)을 측정하였다. 동시에 베타 갈락토시데이즈(β -galactosidase) 활성을 측정하였는데, 베타 갈락토시데이즈 활성 분석액(β -gal assay buffer: 50 mM phosphate buffer, pH 7.4; 10 mM KCl; 1 mM $MgCl_2$; 50 mM β -mercaptoethanol)과 800 μ g/mL의 ortho-Nitrophenyl- β -galactoside (ONPG) (Sigma-Aldrich, MO, USA)를 섞은 반응액에서 반응시켜 분석하고, 이 값으로 각 해당 시료의 발광효소 값을 나누어 발광효소 활성을 보정하고 상대 발광효소 값(relative luciferase unit, RLU), 또는 대조군과 비교를 용이하게 하기 위하여 % 증가량으로 환산하여 활성화 비율(Relative Luciferase Activity (%))로 나타내었다 (Guttridge, Mayo, Madrid, Wang, & Baldwin, 2000). 모든 실험은 3-4 개 중복군으로 진행하였고, 그 중 대표적 실험군의 수치를 평균값 $\pm$ 표준편차(standard deviation)로 나타내었다. 통계 분석은 통계 프로그램(SPSS, version 18.0)을 사용하여 독립표본 양측 t검정으로 하였다. p 값이 0.05 (*) 혹은 0.01 (**)보다 작은 경우 통계적으로 유의한 것으로 표시하였다.

7. 분화된 골격근세포의 위축 유도

실제 악액질 상황을 실험적으로 재현하기 위하여 분화시킨 골격근세포(myotube)에 TNF/IFN 신호 자극을 통해 위축을 유도하였다 (Acharyya et al, 2004). C2C12 근아세포를 분화 배지에서 4일간 배양하여 골격근세포를 얻었다. 분화된 골격근세포에 10 ng/mL의 TNF- α 와 인터페론 감마(IFN- γ) 100 U/mL을 48시간 동안 처리하여 근위축을 유도하였다. 근위축의 정도를 비교하기 위하여 도립 위상차 현미경(inverted phase contrast microscope, CKX-41; Olympus)으로 근섬유의 크기 및 밀도를 관찰하였다.

연구 결과

1. 세포주 선정 및 TNF- α 처리 조건 확립

NF- κ B 저해제 검사를 효율적으로 수행하기 위하여 본 실험에서는 발광효소를 매개로 하는 reporter assay를 수행하였다. 이를 위하여 사용한 pNF- κ B-Luc 벡터를 Figure 1에 모식적으로 나타내었다. 벡터는 IL-6 유전자 프로모터 부위의 NF- κ B 결합부위 서열(Figure

1A, white box)과 인터페론 베타의 프로모터(Figure 1A, light gray box), 그리고 발광 효소 서열(Figure 1A, gray box)을 포함한다. 제작한 벡터가 NF- κ B 활성화 자극에 의해 효과적으로 반응하여 NF- κ B의 활성을 반영하는지 확인하기 위하여 TNF- α 에 의한 NF- κ B 활성화 양상을 측정하였다(Figure 1B, C). pNF- κ B-Luc을 형질 이입한 세포에 TNF- α 처리 후 NF- κ B 활성화 정도를 확인한 결과, 처리하지 않은 대조군의 RLU 값이 $1,765.0 \pm 367.7$ (mean $\pm$ SD)인데 비해 각각 0.33, 1, 3, 그리고 9 ng/mL TNF- α 처리군에서 $2,765.9 \pm 189.2$ (1.6배 증가; $p = .007$), $3,790.8 \pm 246.0$ (2.1배 증가; $p = .003$), $4,813.6 \pm 623.2$ (2.7배 증가; $p < .001$), $6,183.6 \pm 804.3$ (3.5배 증가; $p < .001$)의 RLU로 모두 유의한 변화(* $p < .05$; ** $p < .001$)를 나타내었다(Figure 1B). 이 결과에 따라 이후 실험에서는 TNF- α 의 농도를 5 ng/mL로 지정하였다. 또한 TNF- α 처리 후 NF- κ B의 시간에 따른 활성변화를 추적하기 위하여 위와 동일한 방법으로 실험을 수행하고 시간 변화에 따라 활성 값을 측정하였다. 그 결과 1시간 후부터 이미 활성화가 관찰되었고, 2시간 이후부터 유의한 활성화를 확인할 수 있었다(대조군: $1,665.3 \pm 444.1$, 1 hr: $2,334.7 \pm 1,084.2$, 2 hr: $6,042.1 \pm 1,671.4$; $p = .025$, 4 hr: $5,800.1 \pm 352.8$; $p = .002$, mean $\pm$ SD, RLUs were presented as mean $\pm$ SE in Figure 1C, * $p < .05$) (Figure 1C). 2시간 이후부터 4시간까지는 큰 변화가 없었다. 따라서 이후의 모든 실험에서는 TNF- α 처리 후 2시간 경과 후에 발광 효소 활성을 측정하였다. 배지에 포함된 혈청에 의한 NF- κ B 활성화의 증가를 제거하기 위하여 혈청이 제거된 배지에서 세포를 배양해야 하는데 이때 세포에 독성이 나타날 수 있다. 따라서 혈청이 제거된 배지에서 세포의 생존 여부 및 NF- κ B 활성을 비교한 결과 3시간 이상 혈청을 제거하여야 NF- κ B 활성이 사라지는 것을 볼 수 있었다(data not shown). 본 실험에서는 4시간 동안 혈청을 제거하고 이후에 TNF- α 를 처리하고 그 효과를 관찰하였다.

2. N-acetylcysteine에 의한 TNF- α 유도성 NF- κ B 활성 억제

TNF- α 유도성 NF- κ B 활성화 조건에서 라디칼 제거제인 NAC (Zafarullah, Li, Sylvester, & Ahmad, 2003) 억제제의 효과를 조사하였다. pNF- κ B-Luc을 형질 주입한 293T 세포에 다양한 농도의 NAC을 전 처리하고 TNF- α 에 의한 NF- κ B 활성화 정도를 분석하였을 때, NAC의 농도에 따라 TNF- α 자극에 의한 NF- κ B 활성화가 억제되었는데 10 mM부터 20 mM의 농도에서 활성이 급격히 감소하는 것을 확인하였다(Figure 2). NAC은 TNF- α 의 농도 증가에 무관하게 10 mM부터 유의한 억제 효과를 나타내었고(Figure 2A, $p = .009$ for 1 ng/mL TNF- α , and $p = .002$ for 5 ng/mL TNF- α when compared to NAC untreated controls), 20 mM 농도에서는 더욱 현저한 억제 효과를 나타내었다(Figure 2B, $p < .001$ for 1 ng/mL TNF- α , and $p < .001$ for 5 ng/

Figure 2. Effect of *N*-acetylcysteine on NF- κ B activation by TNF- α stimulation. (A) 293T cells transfected with pNF- κ B-Luc plasmid were pre-treated with different dose of NAC (0 to 20 mM) for 2 hours and exposed to TNF- α for another 2 hours. (B) Dose dependent inhibition of TNF- α induced NF- κ B activity by NAC. Open bars: TNF- α non-treated controls; filled bars: stimulated with 1 ng/mL of TNF- α . * $p < .05$; ** $p < .001$.

mL TNF- α when compared to NAC untreated controls each). NAC에 의한 농도 의존적 억제 양상을 보다 정량적으로 확인하기 위하여 TNF- α 를 처리하지 않은 군과 1 ng/mL로 처리한 군에서 각기 NAC에 의한 효과를 분석하였을 때, TNF- α 를 1 ng/mL로 처리하고 NAC은 처리하지 않은 경우 해당 대조군(TNF- α 0 ng/mL, NAC 0 mM)에 비해 $526.5 \pm 26.7\%$ 의 활성화를 보였다. 이에 비해 5 mM의 NAC은 $546.7 \pm 73.2\%$, 10 mM의 NAC은 $378.0 \pm 32.6\%$, 20 mM의 NAC은 $129.5 \pm 15.4\%$ 의 활성을 나타내어, 10 mM NAC의 경우 NAC 없이 TNF- α 만 처리한 대조군에 비해 $28.201 \pm 6.197\%$ 의 감소(* $p = .009$), 20 mM의 경우 $75.405 \pm 2.921\%$ 의 감소(** $p < .001$) 효과를 확인하였다. 즉 20 mM NAC은 TNF- α 를 처리하지 않은 군과 비슷한 수준까지 억제 효과를 나타내는 것을 확인하였다(Figure 2B).

3. 아미노산에 의한 TNF- α 유도성 NF- κ B 활성 억제

NF- κ B의 활성을 *in vivo* 위험성 등의 부작용 없이 안전하게 제어할 수 있는 억제제를 검색하기 위하여, 인체 내에 이미 존재하고 식이 중에 다양하게 포함되어 있는 아미노산 중에서 세포 내 NAD/NADH 비율 변화를 통해 산화 환원 전위(redox potential)를 조절할 수 있는 아미노산을 대상으로 NF- κ B 활성 제어 효과를 확인하였다(Figure 3). pNF- κ B-Luc를 형질 이입한 293T 세포에 해당 아미노산들을 0-20 mM의 농도로 혈청 제거 배지에서 5시간 동안 전 처리 후, TNF- α 에 의한 NF- κ B 활성화 정도를 분석하였을 때, 아스파테이트의 경우 TNF- α 만 처리한 군에서 $236.1 \pm 29.763\%$ 의 활성화가 나타났는데 비해, 5 mM부터 NF- κ B 활성이 급격히 감소하여($92.5 \pm 10.672\%$, * $p = .023$) 10 mM 처리군에서는 $76.0 \pm 33.186\%$ (* $p = .018$)로 동일 농도의 아스파테이트만 처리한 대조군($72.5 \pm 27.495\%$)과 비슷한 정도로 억제 효과를 나타내었다(Figure 3A). 그러나 아스파테이트 처리 군의 경우 세포의 상태가 농도에 따라 현저히 나빠져 50 mM에서는 강한 세포 독성이 나타났다(data not shown). 반면 아스파테이트와 전하와 크기가 비슷한 글루탐산 의해서는 NF- κ B 활성 제어 효과를 볼 수 없었다(Figure 3B). 피루브산(pyruvate)은 락테이트 탈수소 효소의 기질로 작용하여 세포 내 NAD의 합성을 증가시킬 수 있기 때문에 세포 내 산화 환원 전위를 조절하는 기능을 나타낼 수 있다. 이에 피루브산에 의한 NF- κ B 활성 제어 효과를 확인하였다. 그 결과 $213.9 \pm 14.106\%$ 의 TNF- α 만 처리한 군에 비해 10 mM과 20 mM 농도에서 각각 $93.4 \pm 41.596\%$ (* $p = .014$), $22.1 \pm 6.418\%$ (* $p = .001$)로 농도 증가에 비례하여 NF- κ B 활성을 대조군 수준으로 억제하는 것을 확인하였다(Figure 3C). 피루브산 제어 효과의 특이성을 확인하기 위하여 알라닌을 처리하여 그 효과를 관찰하였을 때, 5-10 mM에서는 NF- κ B 활성에 전혀 영향을 주지 않았으나 20 mM 알라닌을 처리한 경우 약간의 활성 저하를 볼 수 있었다(Figure 3D). 그러나 동일 농도의 피루브산 처리군에 비교하여 유의한 제어 효과를 나타내지 못하는 것을 확인하였다. 마지막으로 이소시트르산을 5-20 mM까지 처리한 결과 유의한 억제 효과를 나타내지 않음을 확인하였다(Figure 3E). 일반적인 아미노산의 효과를 검토하기 위하여 글리신을 동일한 농도들로 처리한 경우에도 NF- κ B 활성의 변화를 볼 수 없었다(Figure 3F). 이 결과를 종합하면 아스파테이트와 피루브산의 경우 10-20 mM의 농도에서 효과적으로 TNF- α 에 의한 NF- κ B 활성을 억제할 수 있었다. 아스파테이트의 경우 고농도에서 세포 독성을 나타낸 데 반해 피루브산은 세포 독성을 보이지 않았기 때문에 이후 실험은 피루브산으로 진행하였다.

Figure 3. Effects of various amino acids on TNF- α induced NF- κ B activation. After 48 hours of reporter construct transfection, 293T cells were pre-treated with different dose of amino acids; 0 to 20 mM for 5 hours in serum free medium and exposed to TNF- α of 0 (open bars) or 5 ng/mL (filled bars) for another 2 hours. * $p < .05$. RLA = relative luciferase activity.

4. 피루브산에 의한 근 위축 억제 효과

실제로 본 연구에서 검색한 대사적 NF- κ B 억제제인 피루브산이 악액질에서 나타나는 근위축 완화 효과를 나타낼 수 있을지 확인하기 위하여 분화된 골격근세포에 근위축을 유도하고 피루브산의 효과를 관찰하였다. 3일간 분화를 유도하여 얻는 C2C12 골격근세포에 근위축을 유도하였을 때, 도립 위상차 현미경상 분화된 골격근 세포에 조밀하게 형성되어 있던 근섬유(myofiber)들이 위축 유도에 의해 그 개수가 현저히 줄어들어 밀도가 저하되고 남은 근섬유의 길이와 직경이 크게 감소되어 있음을 확인하였다(Figure 4A, B). 근섬유의 길이가 분화된 골격근세포(Figure 4A)는 $447.2 \pm 118.063 \mu\text{m}$ 에 비해 위축 유도군(Figure 4B)은 $188.8 \pm 34.375 \mu\text{m}$ 로 유의하

게 감소되었다($p = .006$). 여기에 앞서 실험을 통해 대사적 NF- κ B의 활성 제어 물질로 검색한 피루브산을 50 mM로 위축 유도자극과 함께 처리하였을 때, TNF/IFN 단일 처리군(Figure 4B)에 비해 현저히 근위축이 억제되었음을 확인할 수 있었다(Figure 4D). 피루브산 처리군의 경우 근섬유의 길이가 $257.3 \pm 68.843 \mu\text{m}$ 로 위축 유도군 $188.8 \pm 34.375 \mu\text{m}$ 에 비해 길이가 유지되어 있었고, 근섬유의 밀도와 직경 또한 유지되고 있음을 확인하였다. 또한 위축 유도자극 없이 분화된 골격근세포에 피루브산만 처리했을 때에도 근섬유의 길이가 $889.5 \pm 300.196 \mu\text{m}$ 로 분화된 골격근세포($447.2 \pm 118.063 \mu\text{m}$, Figure 4A)에 비교했을 때 2배 증가하는 효과를 나타내었다(Figure 4C; $p = .003$). 또한 근섬유 밀도가 더 조밀하고 각 섬유의 직경이 유의하

Figure 4. Pyruvate prevents muscle wasting induced by pro-inflammatory cytokines, TNF- α and Interferon- γ . C2C12 myoblasts were differentiated in DM for 3 days and subsequently switched to DM alone (A), containing TNF (10 ng/mL) and IFN (100 U/mL) (B), 50 mM pyruvate (C) or TNF+IFN+50 mM pyruvate (D) for 48 hours. Bar, 100 μ m.

게 증가하는 것을 확인하였다(Figure 4C).

논 의

NF- κ B는 인체 내 거의 모든 조직의 세포에서 발현되는 유전자 전사 조절 인자로서(Kaileh & Sen, 2012) 면역 및 염증 반응, 세포 증식, 세포 사멸, 그리고 암화(carcinogenesis) 과정 등 다양한 세포 내 반응에 관여한다. 즉 NF- κ B를 저해하면 암 종괴의 증식이 억제되고, 항암제에 민감하게 반응하여 세포 사멸이 촉진되고, 암성 악액질에

도 효과를 기대할 수 있기 때문에 많은 연구에서 암 치료 전략으로 NF- κ B 활성 제어제를 개발하고자 하였다. NAC은 잘 알려진 항산화제로서 c-Jun 인산화 효소나 p38 MAP 인산화 효소를 포함, NF- κ B의 활성을 억제함으로써 세포 사멸을 예방하고 세포 생존율을 높이는 효과를 나타낸다(Zafarullah, Li, Sylvester, & Ahmad, 2003). 또한 항염증 효과가 있어 만성폐쇄성폐질환에 점액분해제로 쓰이기도 한다. 본 연구에서도 TNF- α 에 의해 활성화된 NF- κ B를 농도 의존적으로 효과적으로 억제하는 양상을 관찰하였다(Figure 2). 이 결과는 본 연구에서 주 연구 방법으로 사용한 발광효소 분석이 NF- κ B 활

Figure 5. Hypothetical scheme illustrating the steps in NF-κB that may be influenced by antioxidants and redox regulatory amino acids. Antioxidants can inhibit NF-κB activation by scavenging ROS or may inhibit certain oxidant sensitive protein tyrosine kinases; It is possible that pyruvate inhibits activation of NF-κB by scavenging ROS (A); or by regulating redox potential of cells via NAD/NADH, NADP/NADPH ratio adjustment through LDH (B) or pyruvate dehydrogenase activity (C); Aspartate can elevate cytoplasmic NAD/NADH through malate-aspartate shuttle in mitochondrial membrane (D); NAD/NADH, NADP/NADPH dependent redox potential changes may reduce thioredoxin that directly affect on NF-κB activity by modulation of thiol groups on each monomers (E), or resulting decrease of GSH [glutathione] may also affect on NF-κB DNA binding capacity (F). PYR = pyruvate; LAC = lactate; LDH = lactate dehydrogenase; ASP = aspartate; GR = glutathione reductase; GPx = glutathione peroxidase; GSH = reduced glutathione; GSSG = oxidized glutathione disulfide, IκB = inhibitory κB.

성을 제대로 반영함을 보여준다. 그러나 NAC은 분무흡입치료에 사용하는 경우 기도를 자극하거나 기관지 수축을 일으킬 수 있고, 낭포성 섬유증 환자에서는 치명적 부작용이나 폐기능의 감소를 야기하는 등의 부작용을 나타낸다. 이에 경구 투여를 권장하고 있으나 경구 투여 시에는 치료 효과가 나타나지 않고(Decramer et al, 2005), 암환자에서도 효과를 나타내지 못하고 있다(van Zandwijk, Dalesio, Pastorino, & de Vries, 2000). NAC을 포함하여 기존에 개발된 제어제들이 가지고 있는 부작용이나 인체 적용상 제한점 등의 문제를 야기하지 않고 보다 안전하게 NF-κB 활성을 억제하는 물질을 찾아 암성 악액질을 제어하고자 본 연구에서는 본 연구에서는 인체 내에 이미 존재하고 식이 중에 다양하게 포함되어 있는 아미노산 중에서

세포 내 산화 환원 전위(redox potential)를 조절할 수 있는 아미노산을 대상으로 NF-κB 활성 제어제를 검색하였다. 세포 내 NAD/NADH 비를 변화시킬 수 있는 아스파테이트와 피루브산이 유의한 억제 효과를 나타내었고(Figure 3A, C), 이소시트르산 또한 유의하지는 않지만 약한 억제 효과를 보임을 확인하였다(Figure 3E). 아스파테이트의 효과가 아미노산 특이적인지 확인하기 위하여 아스파테이트와 전하와 크기가 비슷한 글루탐산을 동일하게 처리하였을 때 제어 효과가 나타나지 않은 결과(Figure 3B)는 아스파테이트의 효과가 아미노산 자체의 농도나 이온성 등에 따른 비특이적 현상이 아님을 시사한다. 또한 피루브산과 성상이 비슷하나 산화 환원제 조절 기능을 갖지 않는 알라닌을 처리하였을 때도 유의한 제어 효과가 나타나지 않은 결과(Figure 3D)로부터 피루브산에 의한 NF-κB 활성 제어가 아미노산의 성상이나 이온적 특성에 의한 것이 아니라 NAD/NADH 조절에 의해 나타나는 산화 환원 전위 조절에서 기인하는 것으로 추정할 수 있다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때, 피루브산에 의한 NF-κB 활성을 억제 효과의 기전을 다음과 같이 유추해 볼 수 있다. Varma, Devamanoharan과 Ali (1998)가 보고한 바와 같이 직접적으로 세포 내 ROS에 의한 IκB 인산화 제어를 통해 NF-κB 활성을 억제하거나(Figure 5A), 락테이트 탈수소효소나 미토콘드리아 피루브산 탈수소효소를 통해 세포 내 산화 환원 전위를 저하시킴으로서 글루타티온 환원제(glutathione reductase, GR)나 글루타티온 과산화효소(glutathione peroxidase, GPx)의 활성을 조절함으로써 환원형 글루타티온에 의한 NF-κB 이항화 결합 안정화를 통한 활성 촉진(Staal, Roederer, Herzenberg, & Herzengerg, 1990; Figure 5E, F)을 억제함에 의해 NF-κB의 활성을 제어하는 것으로 추정할 수 있다. 즉, IκB의 인산화에 의한 NF-κB의 활성화 기전(Beg & Baldwin, 1993)과는 다른 경로를 통하여 NF-κB 활성을 조절하는 경로를 통한 억제 양상을 나타내는 것이라 할 수 있다. 피루브산은 에틸 피루브산의 경우 NF-κB 활성을 조절하는 기능이 보고되어 있으며(Han, Englert, Yang, Delude, & Fink, 2005), 항염증효과 및 암 혈관생성 억제 효과 등이 보고된 바 있다(Fink, 2008). 본 연구에서는 이러한 피루브산의 NF-κB 활성 제어 효과가 실제 악액질에서 나타나는 근위축 완화 효과를 나타낼 수 있는지의 가능성을 확인하였다. 피루브산을 분화된 C2C12 골격근세포에 악액질 유도물질과 함께 처리하였을 때 근섬유 길이와 직경이 유의한 수준으로 보존된 결과(Figure 4B, D)는 이 가능성을 지지하는 결과이다. 본 연구 결과를 토대로 피루브산이 NF-κB의 활성을 억제하는 분자적 기전을 밝히고, 추후 동물 실험을 통해 암성 악액질에 직접 생체 투여 하였을 때에도 동일한 효과를 나타낼 수 있는지 등의 추가 연구가 필요하다.

결론 및 제언

본 연구는 암 환자, 특히 악액질 환자에 있어 매우 중요한 영양에 있어 피루브산 보충의 중요성에 대한 이론적 기틀을 마련하고자 하였다. 인체에 해가 없으며 산화/환원 전위를 조절할 수 있는 아미노산 중에서 NF- κ B의 활성을 효과적으로 제어할 수 있는 안전한 억제제를 검색한 결과 피루브산을 가장 효과적인 NF- κ B 활성 억제 아미노산으로 확인하였고, 이를 이용하여 악액질에서 나타나는 근위축 억제 효과를 *in vitro*에서 검증함으로써 암성 악액질을 분자적 기전에 기반을 두고 부작용 없이 안전하게 제어할 수 있는 가능성을 제시하였다. 이 연구는 암성 악액질 환자의 피루브산 보충의 중요성에 대한 근거중심 간호연구로서 암환자 영양보충에 대한 이론적 근거를 제공했다는 점에서 의의가 있다. 이를 통해 암 환자 간호 중재에 있어 영양 관리에 피루브산을 고려하여 악액질을 완화함으로써 암 환자의 치료 효율을 높이고, 삶의 질을 향상시킬 수 있는 기반을 마련할 수 있을 것으로 기대한다.

REFERENCES

- Acharyya, S., Ladner, K. J., Nelsen, L. L., Damrauer, J., Reiser, P. J., Swoap, S., et al. (2004). Cancer cachexia is regulated by selective targeting of skeletal muscle gene products. *Journal of Clinical Investigation*, 114, 370-378.
- Andreyev, H. J., Norman, A. R., Oates, J., & Cunningham, D. (1998). Why do patients with weight loss have a worse outcome when undergoing chemotherapy for gastrointestinal malignancies? *European Journal of Cancer*, 34, 503-509.
- Argiles, J. M., & Lopez-Soriano, F. J. (1999). The role of cytokines in cancer cachexia. *Medical Research Reviews*, 19, 223-248.
- Barber, M. D., Ross, J. A., & Fearon, K. C. (1999). Cancer cachexia. *Surgical Oncology*, 8, 133-141.
- Barron, J. T., Gu, L., & Parrillo, J. E. (1998). Malate-aspartate shuttle, cytoplasmic NADH redox potential, and energetics in vascular smooth muscle. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 30, 1571-1579.
- Beg, A. A., & Baldwin, A. S. (1993). The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Genes & Development*, 7, 2064-2070.
- Choi, S. G. (2011). Recent advances in cancer cachexia. *Journal of Korean Oncology Nursing*, 11, 20-25.
- Decramer, M., Rutten-van Molken, M., Dekhuijzen, P. N., Troosters, T., van Herwaarden, C., Pellegrino, R., et al. (2005). Effects of N-acetylcysteine on outcomes in chronic obstructive pulmonary disease (Bronchitis randomized on NAC co-seutility study, BRONCUS): a randomized placebo-controlled trial. *Lancet*, 365, 1552-1560.
- Evans, W. J., Morley, J. E., Argiles, J., Bales, C., Baracos, V., Guttridge, D., et al. (2008). Cachexia: A new definition. *Clinical Nutrition*, 27, 793-799.
- Fink, M. P. (2008). Ethyl pyruvate. *Current Opinion in Anesthesiology*, 21, 160-167.
- Ginn-Pease, M. E., & Whisler, R. L. (1998). Redox signals and NF-kappaB activation in T cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 25, 346-361.
- Gullett, N. P., Mazurak, V. C., Hebbard, G., & Ziegler, T. R. (2011). Nutritional interventions for cancer-induced cachexia. *Current Problems in Cancer*, 35(2), 58-90.
- Guttridge, D. C., Mayo, M. W., Madrid, L. V., Wang, C. Y., & Baldwin, A. S. Jr. (2000). NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science*, 289, 2363-2366.
- Han, Y., Englert, J. A., Yang, R., Delude, R. L., & Fink, M. P. (2005). Ethyl pyruvate inhibits nuclear factor kappaB-dependent signaling by directly targeting p65. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 312, 1097-1105.
- Hopkinson, J. B., Wright, D. N., McDonald, J. W., & Corner, J. L. (2006). The prevalence of concern about weight loss and change in eating habits in people with advanced cancer. *Journal of Pain and Symptom Management*, 32, 322-331.
- Im, J. H., & Choe, M. A. (2002). Effect of exercise during acute stage of stroke on affected and unaffected hindlimb muscle mass of cerebral ischemic rat. *Journal of Korean Biological Nursing Science*, 4, 51-69.
- Kawamura, I., Morishita, R., Tomita, N., Lacey, E., Aketa, M., Tsujimoto, S., et al. (1999). Intratumoral injection of oligonucleotides to the NF kappa B binding site inhibits cachexia in a mouse tumor model. *Gene Therapy*, 6, 91-97.
- Kaileh, M., & Sen, R. (2012). NF-kB function in B lymphocytes. *Immunological Reviews*, 246, 254-271.
- Larkin, M. (1998). Thwarting the dwindling progression of cachexia. *Lancet*, 351, 1336.
- Li, L., Thomas, M., Suzuki, H., De Brabander, J. K., Wang, X., & Harran, P. G. (2004). A small molecule Smac mimic potentiates TRAIL- and TNF- α -mediated cell death. *Science*, 305, 1471-1474.
- MacDonald, N., Easson, A. M., Mazurak, V. C., Dunn, G. P., & Baracos, V. E. (2003). Understanding and managing cancer cachexia. *Journal of American College of Surgeons*, 197, 143-161.
- Massudi, H., Grant, R., Guillemin, G. J., & Braidy, N. (2012). NAD⁺ metabolism and oxidative stress: the golden nucleotide on a crown of thorns. *Redox Report*, 17, 28-46.
- O'Gorman, P., McMillan, D. C., & McArdle, C. S. (1998). Impact of weight loss, appetite, and the inflammatory response on quality of life in gastrointestinal cancer patients. *Nutrition and Cancer*, 32, 76-80.
- Oliff, A., Defeo-Jones, D., Boyer, M., Martinez, D., Kiefer, D., Vuocolo, G., et al. (1987). Tumors secreting human TNF/cachectin induce cachexia in mice. *Cell*, 50, 555-563.
- Park, Y. C., & Park, S. C. (1995). Reduction of oxidative stress by aspartate in the ethanol-perfused rat liver tissues. *Korean Journal of Biochemistry*, 27, 165-169.
- Park, Y. C., Oh, S. I., Park, Y. H., & Park, S. C. (1997). Modulation by aspartate of ischemia/reperfusion-induced oxidative stress in rat liver. *Experimental Molecular Medicine*, 29, 19-23.
- Schwartz, S. A., Hernandez, A., & Mark Evers, B. (1999). The role of NF-kappaB/IkappaB proteins in cancer: implications for novel treatment strategies. *Surgical Oncology*, 8, 143-153.
- Sen, C. K., & Packer, L. (1996). Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *The FASEB Journal*, 10, 709-720.
- Staal, F. J., Roederer, M., Herzenberg, L. A., & Herzenberg, L. A. (1990). Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor kB and transcription of human immunodeficiency virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 9943-9947.
- Tracey, K. J., & Cerami, A. (1994). Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annual Review of Medicine*, 45, 491-503.
- van Eys, J. (1985). Nutrition and cancer: physiological interrelationships. *Annual Review of Nutrition*, 5, 435-461.

- van Zandwijk, N., Dalesio, O., Pastorino, U., & de Vries, N. (2000). EUROSCAN, a randomized trial of Vitamin A and N-acetylcysteine in patients with head and neck cancer or lung cancer. *Journal of National Cancer Institute*, 92, 977-986.
- Varma, S.D., Devamanoharan, P. S., & Ali, A. H. (1998). Prevention of intracellular oxidative stress to lens by pyruvate and its ester. *Free Radical Research*, 28, 131-135.
- Zafarullah, M., Li, W. Q., Sylvester, J., & Ahmad, M. (2003). Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60, 6-20.