

산화 스트레스에 의한 Thioredoxin의 발현과 폐암 조직에서의 발현

연세대학교 의과대학 내과학교실

이장훈, 김형중, 안철민, 김성규, 이원영

= Abstract =

Induction of Thioredoxin by Oxidative Stress and Overexpression of Thioredoxin in Lung Cancer Tissue

Jang Hoon Lee, M.D., Hyung Jung Kim, M.D., Chul Min Ahn, M.D.,
Sung Kyu Kim, M.D. and Won Young Lee, M.D.

Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine.

Background : Reactive oxygen species are involved in multi-stage process of carcinogenesis. The most of cancer cell lines and cancer cells in tumor tissue produce reactive oxygen species and on the other hand, the activities of catalase, Mn- and CuZn-superoxide dismutase in tumor cells are usually low. These persistent oxidative stress in tumor tissue facilitates tumor invasion and metastasis. 12-kDa thioredoxin, which regulates the intracellular redox potential with glutathione and glutaredoxin is involved in cell activation, proliferation, differentiation and redox-mediated apoptosis. It is also purified as 14-kDa and 10-kDa eosinophilic cytotoxic enhancing factor(ECEF) from human histiocytic cell(U937) and 10-kDa ECEF has more than 20 times eosinophilic stimulation activity than 14-kDa ECEF. It has been reported that adult T-cell leukemia, squamous cell carcinoma of uterine cervix, and hepatocellular carcinoma show increased amounts of human thioredoxin and thioredoxin mRNA is increased in lung cancer. In this study, we investigated the expression of conventional antioxidant enzymes such as catalase, CuZn-SOD, and glutathione peroxidase and thioredoxin in lung cancer tissue compared to adjacent normal lung tissue and the induction of thioredoxin in macrophage cells after treatment of oxidative stress and endotoxin.

Methods : We measured the amount of conventional antioxidant enzymes such as catalase, CuZn-SOD, and glutathione peroxidase and thioredoxin in lung cancer tissue compared to adjacent normal lung tissue by immunoblot analysis and the induction of thioredoxin in mouse monocyte-macrophage cells(RAW 264.7) by treatment of 5 μ M menadione and 1 μ g/ml endotoxin.

Results : On immunoblot analysis, the expression of 12-kDa thioredoxin was increased in lung cancer tissue

compared to paired normal lung tissue. but the expression of catalase and CuZn-SOD were decreased in lung cancer tissue compared to paired normal tissue and the expression of glutathione peroxidase in lung cancer was variable. The expression of truncated thioredoxin was also increased in lung cancer. When mouse monocyte-macrophage cells were treated with 5 μ M menadione and 1 μ g/ml endotoxin, the expression of thioredoxin was peaked at 12 hrs and sustained to 48 hrs.

Conclusion : In contrast with other conventional antioxidants, the expression of 12-kDa and truncated thioredoxin in lung cancer were increased and it is closely associated with persistent oxidative stress in tumor microenvironment. Considering especially the biological functions of truncated thioredoxin, the increased amount of truncated thioredoxin has significant role in tumor growth through cell proliferation. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1999, 46 : 327-337)

Key words : Oxidative stress, Antioxidants, Thioredoxin, Lung cancer.

서 론

활성산소종(reactive oxygen species : O_2 , H_2O_2 , OH)은 DNA의 변형 및 변이, 단백 및 지질의 산화 등을 유발하여 염증 질환에서부터 종양 질환의 발생에 까지 작용하는 것으로 알려져 있다¹⁾. 한편 생체는 이런 활성산소종에 대한 방어 기전으로 glutathione, thioredoxin 및 glutaredoxin 등의 분자량이 적은 세포내 항산화 단백질²⁾ 및 catalase, Mn-SOD, CuZn-SOD, glutathione peroxidase, cytochrome C peroxidase, NADPH peroxidase 및 non-specific peroxidase 등의 항산화 단백을 가지고 있다¹⁾.

Thioredoxin은 분자량이 12-kDa으로 *E. coli*에서 DNA 합성에 필수적인 효소인 ribonucleotide reductase에 전자를 전달하는 단백질로 정제되었고 생화학적으로 dithiol-disulfide oxidoreductase의 활성도를 가지며 glutathione 및 glutaredoxin 등과 함께 세포내 산화-환원 전위를 유지하는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁾. Thioredoxin의 활성 부위는 Trp-Cys-Gly-Pro-Cys(amino acids 30-34)으로 세균부터 식물 및 포유류에까지 잘 보존되어 있으며²⁾ 인간 thioredoxin은 HTLV-1(+) T-림프구 세포의 배양액에서 interleukin-2 receptor(IL-2R) inducing factor로 처음 정제되어 adult T-cell leu-

kemia(ATL)-derived factor(ADF)로 명명되었다가^{3,4)} cDNA가 분리된 후 아미노산 서열의 유사성에 근거하여 ADF는 포유동물의 thioredoxin이라는 것이 밝혀졌다⁵⁾. 한편 Silberstein⁶⁾ 등이 인간 histiocytic lymphoma 세포로부터 정제하여 호산구 세포 독성 촉진 기능을 보인 14- 및 10-kDa의 eosinophil cytotoxic enhancing factor(ECEF)도 thioredoxin으로 알려져 있다. Thioredoxin은 산화스트레스 및 분열유발성 인자 등에 의해 유도되고 형질 전환된 세포에서 과발현 되는 것으로 알려져 있으며⁷⁾ 최근 티올 산화-환원 전위(thiol redox status)가 림프구의 활성⁸⁻¹⁰⁾, 증식^{11,12)} 및 분화^{9,10)} 등을 조절하고 glutathione와의 티올(thiol)이 T-세포 아포토시스를 조절하는 것으로 알려져 있다¹³⁾. 한편 eosinophil cytotoxic enhancing factor는 10-kDa(truncated form)이 14-kDa(intact form)보다 호산구 자극 활성은 20배 이상이며 이런 기능은 활성 부위에 의해 조절 되는 dithiol reductase의 효소 활성과는 관련이 없는 것으로 알려져 있다⁶⁾. 이는 ECEF는 서로 다른 기전으로 생체내 역할을 수행하는 것을 시사한다.

대부분의 종양 세포주 및 종양내의 종양 세포는 많은 활성산소종을 생성하며^{14,15)} 반면 종양 세포의 catalase, Mn- 및 CuZn-SOD 등 기존의 항산화 단백질의 활성도는 대부분 저하되어 있다¹⁶⁻¹⁹⁾. 따라서 종양 조

직내의 지속적인 산화 스트레스는 발암 기전의 여러 단계에 관여하는 것으로 알려져 있다. 한편 성인 T-세포백혈병, 자궁 경부상피세포암 및 간세포암 등에서 thioredoxin 발현이 증가한다는 보고가 있으며^{20, 21)} 폐암에서는 catalase 및 superoxide dismutase의 활성도가 감소하고²²⁾ thioredoxin mRNA 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다²³⁾.

이에 본 연구에서는 폐암 조직과 주변의 정상 조직을 비교하여 catalase, CuZn-SOD 및 glutathione peroxidase 등 기존의 항산화 단백질의 발현을 관찰하고 서로 특성이 다른 thioredoxin에 대한 항체를 이용하여 12-kDa 및 절단형 thioredoxin의 발현을 평가하고 산화 스트레스에 의한 thioredoxin의 발현을 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 항체 준비

Catalase 및 CuZn-SOD 항체는 Calbiochem으로부터 구입하였으며 glutathione peroxidase 항체는 렫트의 간에서 정제된 glutathione peroxidase 단백질에 대한 다클론항체를 만들었다. Thioredoxin 항체는 렫트의 간에서 정제된 thioredoxin 단백질에 대한 다클론항체를 만들었고 한편 thioredoxin 다클론 항체를 affinity chromatography인 Affi-Gel 10 gel(Biorad, Inc.)을 이용하여 정제하였다.

2. 조직 확보

뇌, 간, 췌장, 신장, 비장 및 부신 조직을 렫트로부터 확보하였고 수술로 절제된 폐암 조직(상피세포암 5예, 선암 5예)에서 괴사 소견이 적은 폐암 조직과 정상 조직을 동시에 취해 즉시 액체 질소에 넣어 급속 냉동후 -70℃의 냉동고에 보관하였다. 실험시 조직을 차가운 phosphate buffered saline(PBS)으로 3번 세척한 후 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride

(PMSF), 5 μg/ml aprotinin 및 1 μg/ml leupeptin을 함유한 20 mM HEPES-NaOH 완충액(pH 7.0)에 넣어 균질화 한후 10,000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 상층액을 취하여 BCA reagent(Pierce, Inc)으로 단백을 정량 하였다.

3. 세포 배양 및 배양 조건

HTB-56(Anaplastic carcinoma), HTB-58(Squamous carcinoma), HTB-119(Small cell carcinoma) 및 HTB-174(Papillary adenocarcinoma) 등 폐암 세포주를 American Type Culture Collection(Rockville, MD, USA)으로부터 구입하였다. HTB-56 세포와 HTB-58 세포는 10% fetal bovine serum, non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate 및 Earle's BSS를 함유한 MEM 배지에 배양하였으며 HTB-119 및 HTB-174 세포는 10% fetal bovine serum을 함유한 RPMI 1640 배지에 배양하였다. 배양은 37℃에서 5% CO₂의 상태의 incubator에 배양하였다. 충분한 양의 세포를 배양후 원심 분리하여 세포 침전물을 얻은후 차가운 PBS로 3-4 차례 세척후 일정량의 20 mM HEPES 완충액(pH 7.0)에 넣어 초음파 처리하여 원심 분리후 상층액을 취하여 BCA reagent(Pierce, Inc)으로 단백을 정량하였다.

4. 산화 스트레스 및 내독소에 의한 thioredoxin의 유도

Mouse monocyte-macrophage cell line(RAW 264.7)을 American Type Culture Collection(Rockville, MD, USA)으로부터 구입하여 10% fetal bovine serum, 50 units/ml penicillin 및 50 μg/ml streptomycin을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 5% CO₂, 37℃에서 배양하였다. Mouse monocyte-macrophage cells을 9.2cm dish에 1.0×10⁵/ml으로 4시간 배양

후에 부유 세포를 제거한후 serum free DMEM으로 2시간 배양하였다. 산화 스트레스를 유도하기 위해 5 μ M menadione(2-methyl-1,4-naphthoquinone sodium bisulfite)을 함유한 DMEM 및 1 μ g/ml lipopolysaccharide(Serotype 055 : B5)를 함유한 DMEM에 배양하였으며 0, 3, 6, 12, 24 및 48 hr에 세포를 수확하여 3000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 차거운 PBS으로 세척한후 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 5 μ g/ml aprotinin 및 1 μ g/ml leupeptin을 함유한 20 mM Hepes-NaOH 완충액(pH 7.0)에 넣어 초음파 처리하여 10,000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 상층액을 취하여 BCA reagent(Pierce, Inc)으로 단백을 정량하였다.

5. Immunoblot 분석

상기와 같이 준비된 추출물 40 μ g을 catalase 및 glutathione peroxidase는 12%, CuZn-SOD 및

thioredoxin은 16% SDS-polyacrylamide gel에 전기 영동후 nitrocellulose membrane에 이동시켜 2% BSA를 함유한 TTBS 용액으로 15분간 차단한 후 catalase 항체(1 : 200), CuZn-SOD 항체(1 : 200), glutathione peroxidase 항체(1 : 2000), 다클론 thioredoxin 항체(1 : 2000) 및 affinity-purified thioredoxin 항체(1 : 200)를 밤새 처리하여 3차례 이상 TTBS 용액으로 세척한 후 catalase, CuZn-SOD, glutathione peroxidase의 immunoreactive band는 alkaline phosphatase 방법으로 확인하였다. Thioredoxin의 immunoreactive band는 affinity-purified thioredoxin 항체를 처리한 경우는 alkaline phosphatase 방법으로 확인하였으며 다클론 thioredoxin 항체를 처리한 경우는 enhanced chemiluminescence(ECL) 방법으로 확인하였다. 한편 절단형 thioredoxin을 확인하고자 antibody competition test를 시행하였는데 이는 정제된 단백질과 항체를 일정 시간 반응시켜 항체를 소모시킨 후 immunoblot 분석을 시행하였다.

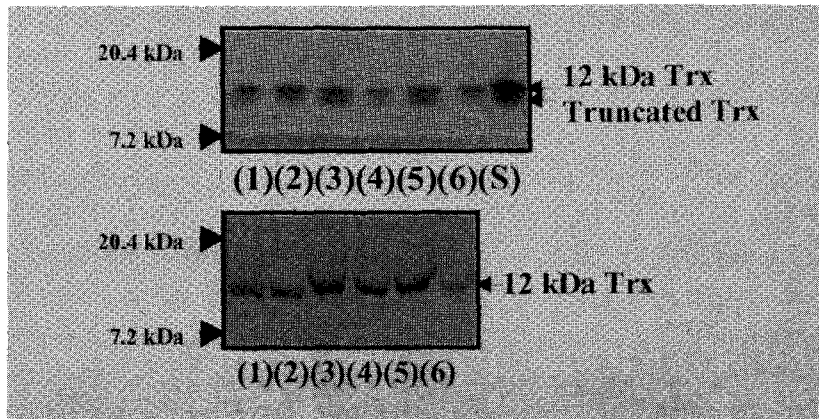


Fig. 1. The characterization of polyclonal antibody against rat thioredoxin and its affinity purified antibody. On sensitive ECL method(*Top panel*), polyclonal antibody reacts with 12-kDa and truncated thioredoxin in all tissues which we examined and purified thioredoxin. On alkaline phosphatase method(*Bottom panel*), affinity-purified antibody reacts only with 12-kDa thioredoxin in all tissues which we examined. (1) : brain, (2) : liver, (3) : pancreas, (4) : kidney, (5) : spleen and (6) : adrenal gland of rat(S) : 10 ng of purified thioredoxin from rat liver.

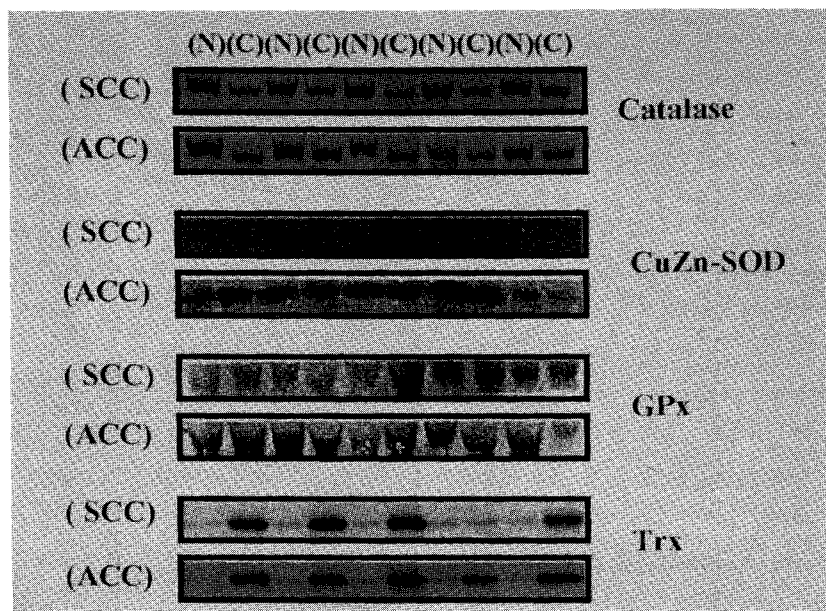


Fig. 2. The expression of catalase, CuZn-SOD, glutathione peroxidase(GPx) and thioredoxin (Trx) in lung cancer tissue(C) and adjacent normal lung tissue(N).
On immunoblot analysis, the amount of catalase and CuZn-SOD in lung cancer tissue were decreased compared to that in adjacent normal lung tissue. the amount of Gpx in lung cancer tissue was variable compared to that in adjacent normal lung tissue. and the amount of thioredoxin in lung cancer tissue was obviously increased compared to that in adjacent normal lung tissue. SCC : squamous cell carcinoma. ACC : adenocarcinoma.

결 과

1. 렛트에서 추출된 여러 조직에서 thioredoxin의 분포 및 다클론 thioredoxin 항체 및 affinity-purified thioredoxin 항체의 성격 :

Thioredoxin 다클론 항체를 이용하여 ECL 방법으로 immunoblot을 시행한 결과 여러 조직 모두에 12-kDa 및 절단형 thioredoxin이 존재하였으며 정제된 thioredoxin도 절단되는 양상을 보였다(Fig. 1, *Top panel*) Affinity-purified thioredoxin 항체를 이용하여 alkaline phosphatase 방법으로 immunoblot을 시행한 결과는 모든 조직에서 12-kDa thioredoxin 만을 인지하였다(Fig. 1, *Bottom panel*).

2. 폐암 조직에서 catalase, CuZn-SOD, glutathione peroxidase 및 thioredoxin의 발현 :

상피세포암과 선암의 각각 5예에서 조직학적 형태에 관계 없이 immunoblot 분석상 폐암 조직에서 catalase는 뚜렷히 감소하였고 CuZn-SOD는 감소하는 경향을 보였으며 glutathione peroxidase는 다양한 결과를 보였다(Fig. 2). 그러나 affinity-purified thioredoxin 항체를 이용하여 alkaline phosphatase 방법으로 immunoblot 분석을 시행한 결과 10예의 폐암 조직중 9예에서 12-kDa thioredoxin이 뚜렷이 증가하는 양상을 보였다(Fig. 2). Thioredoxin 다클론 항체를 이용하여 ECL 방법으로 immunoblot을 시행한 결과 3예의 폐암 조직 모두에서 12-kDa 및

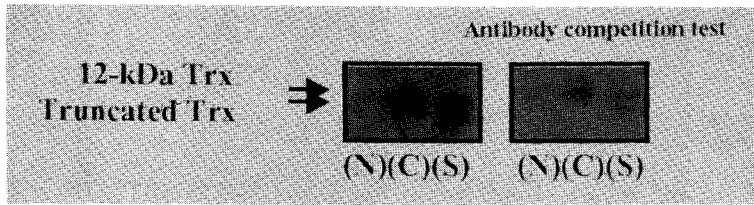


Fig. 3. The expression of 12-kDa and truncated thioredoxin in lung cancer tissue(C) and adjacent normal lung tissue(N). On sensitive ECL method, the amount of 12-kDa and truncated thioredoxin in lung cancer tissue were increased compared to that in adjacent normal lung tissue. The antibody competition test confirmed two immunoreactive bands as thioredoxin.(S) : 2ng of purified thioredoxin.

절단형 thioredoxin이 증가함을 알수 있었다. 한편 12-kDa 및 절단형 단백질은 antibody competition test을 시행하여 immunoreactivity가 감소하여 모두 thioredoxin임을 알수 있었다(Fig. 3).

3. 여러 폐암 세포에 존재하는 thioredoxin 양의 측정:

Anaplastic carcinoma(HTB-56), squamous carcinoma(HTB-58), small cell carcinoma(HTB-119) 및 papillary adenocarcinoma(HTB-174) 등 폐암 세포주에 존재하는 thioredoxin 양을 비교한 결과 세포 증식이 현저한 소세포 폐암에서 가장 많이 존재하였다(Fig. 4).

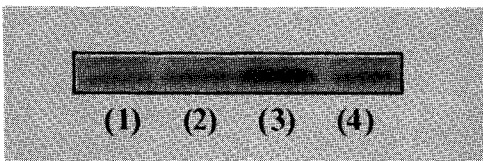


Fig. 4. The amount of thioredoxin in various lung cancer cells. The small cell carcinoma cell has larger amount of thioredoxin than other lung cancer cells.(1): anaplastic carcinoma cell, (2) squamous carcinoma cell (3) small cell carcinoma cell and(4) adeno-carcinoma cell.

4. Mouse monocyte-macrophage cells(RAW 264.7)에서 산화 스트레스 및 내독소에 의한 thioredoxin의 발현 변화:

Menadione은 quinone 화합물로 redox cycling을 통하여 지속적으로 reactive oxygen species($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2)를 생성하는 것으로 알려져 있다. 5 μ M menadione 및 1 μ g/ml 내독소를 투여하였을 때 thioredoxin의 발현이 12시간에 최고에 도달하여 4 시간까지 지속되었다(Fig. 5).

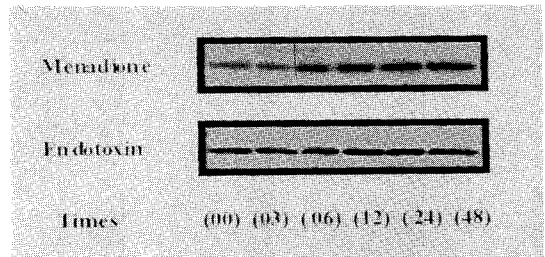


Fig. 5. The expression for thioredoxin in mouse monocyte-macrophage cells(RaW 264.7) after treatment of menadione and endotoxin. After dose dependent study, we treated RAW 264.7 cells with 5 μ M menadione and 1 μ g/ml endotoxin. The expression of thioredoxin was increased and peaked at 12 hrs. Menadione: 2-methyl-1, 4-naphthoquinone sodium bisulfite, Endotoxin: lipopolysaccharide Serotype 055 : B5.

고 찰

Thioredoxin은 NADPH, thioredoxin reductase으로부터 전자를 받아 생화학적으로 dithiol-disulfide oxidoreductase의 활성도를 가진 12-kDa의 단백질로 thioredoxin system은 NADPH, thioredoxin reductase 및 thioredoxin으로 구성되어 있다²⁾.

Thioredoxin은 glutathione 및 glutaredoxin등과 함께 세포내 산화-환원 전위를 유지하는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며²⁾ 본 연구에 결과(Fig. 1)와 같이 모든 조직에 존재하는 것으로 알려져 있다. 이 단백질의 활성 자리는 Trp-Cys-Gly-Pro-Cys (amino acids 30-34)으로 세균에서 식물 및 포유류에까지 잘 보존되어 있으며 두 cysteine 잔기가 산화-환원 활성에 관여한다고 알려져 있다²⁾. 한편 Silberstein⁶⁾등이 histiocytic lymphoma 세포에서 정제하여 호산구 세포 독성 촉진 기능을 보인 eosinophil cytotoxic enhancing factor(ECEF) 역시 thioredoxin이었으며 이 단백질은 14-kDa과 10-kDa으로 정제되었다.

활성산소종은 DNA와 반응하여 DNA strand의 절단, DNA base의 변화 및 DNA와 단백질의 cross linkage등을 포함한 DNA 손상(OH₂-mediated damage)을 유발하고^{1, 24)} NF- κ B와 같은 전사 인자의 자극²⁵⁾ 및 *c-fos*, *c-jun* 및 *c-myc* 같은 원종양 유전자 활성화를 유도하고^{26, 27)}, 종양의 국소 침습 및 전이등 발암 기전의 여러 단계에 중요한 역할을 한다. 이런 활성산소종에 의한 생체내 DNA base 산화의 중요한 산물로 알려진 8-hydroxy-2'-deoxy-guanosine(8-OH-dG)은 신장, 유방암, 간암 및 폐암에서 정상 조직보다 높은 것으로 알려져 있다^{15, 24)}. 종양에서 활성 산소종 발생 부위는 종양 세포로 적어도 신장암의 경우 면역조직화학적검사상 지질 과산화물인 4-hydroxy-2-nonenal-modified 단백질이 종양 세포질 내 양성 소견인 점으로 알수 있다¹⁵⁾. 한편 종양 질환에서 항산화 단백질은 간암 세포에서 catalase 유전자의 발현이 저하되어 있고¹³⁾ 많은 종양 세포 및 조직에

서 catalase, Mn- 및 CuZn-SOD의 활성도가 대부분 저하 되어 있으며^{17, 18, 22)}, glutathione peroxidase 및 glutathione reductase의 활성도는 일정하지 않은 것으로 알려져 있다¹⁹⁾. 폐암에서 종양 조직과 정상 조직의 catalase 및 superoxide dismutase의 활성도를 비교한 결과 종양 조직에서 이들의 활성도가 떨어져 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 폐암으로 절제술을 받은 환자의 종양 조직과 정상 조직을 immunoblot 방법으로 catalase, CuZn-SOD, glutathione peroxidase 및 thioredoxin의 단백질 양을 비교 하였으며 catalase, CuZn-SOD등의 양은 감소하였다(Fig. 2). 이런 단백질 양의 감소는 이미 알려진 단백질의 활성도 감소와 일치하는 결과이다.

이런 문헌 보고와 본 연구의 결과들을 고려하여 볼 때 종양 조직의 종양 세포는 지속적인 산화 스트레스에 노출되게 됨을 알수 있으며 따라서 종양 세포는 산화스트레스에 의한 세포 용해(oxidative cytolysis)에 대한 방어 기전을 필요로 하게 되며 thioredoxin, glutathione 및 glutathione-S-transferase π (GST-P)등이 이런 기전에 관여하리라는 보고가 있다^{24, 28)}. Thioredoxin은 산화 스트레스, 유사분열촉진 인자, 바이러스 감염(HTLV-1, EBV 및 HPV), 내독소 및 PMA 등에 의해 유도되고 형질 변환된 세포에서 과발현 되는 것으로 알려져 있으며⁷⁾ 성인 T-세포백혈병, 자궁경부상피세포암 및 간세포암에서 thioredoxin 양이 증가 되어 있고^{20, 21)} 폐암에서는 thioredoxin mRNA가 증가되어 있는 것으로 보고되어 있다²³⁾. 본 연구는 10예의 폐암 조직 중에서 9예에서 12-kDa thioredoxin의 양이 증가한 소견(Fig. 2)을 확인 하였으며 3예 모두에서 12-kDa 및 절단형 thioredoxin이 증가하였다. 한편 12-kDa 및 절단형 단백질은 antibody competition test을 시행하여 모두 thioredoxin임을 알수 있었다(Fig. 3). 폐암에서 증가된 thioredoxin의 생물학적 의미를 고찰하면 종양 세포 증식을 통한 종양 성장에 관여하리라고 사료된다. 우선 thioredoxin은 인간 B 세포주에서 protein kinase C 의존 경로로 세포 증식에 관여하는 것으로

알려져 있고¹¹⁾ leader sequence에 관계없이 세포 밖으로 배출되며⁷⁾ 세포밖에 존재하는 thioredoxin은 NIH3T3 세포에서 platelet derived growth factor (PDGF)와 비슷한 세포 증식 활성을 보인다^{29, 30)}. 이런 성장 효과는 thioredoxin의 환원 활성 뿐만아니라 구조가 중요하다는 보고도 있으며²⁹⁾ Cys73이 산화되어 다른 분자의 Cys73과 disulfide 결합을 형성하면 성장이 감소하며 이런 산화 반응은 thioredoxin의 성장 인자로서의 기능을 조절하는 기전의 하나라는 보고도 있다³⁰⁾. 아울러 ECEF 생물학적 작용을 생각하여 볼 때 절단형은 효소 활성이 없으나 호산구 자극 효과가 14-kDa thioredoxin에 비해 20배 이상으로 알려져 있다⁹⁾. 따라서 폐암에서 증가된 thioredoxin은 종양 성장에 중요한 역할을 하며 본 연구에서 소세포 폐암에서 thioredoxin 양이 가장 많이 존재하는 것도 thioredoxin이 세포 증식과 밀접한 연관이 있다는 사실을 의미한다. 한편 본 연구에서 처음으로 확인한 절단형 thioredoxin은 10-kDa ECEF의 생물학적 특성을 고려할 때 종양 성장에 더욱 중요한 역할을 할 것으로 사료된다. 그러나 간암 세포(Hep G2)는 정상적인 간세포에 비해 많은 양의 thioredoxin을 세포 밖으로 배출하며 배출된 thioredoxin은 세포 모양의 변화를 수반한 성장 억제 효과를 보이는 것으로 알려져 있다³¹⁾. 한편 산화 스트레스가 유전자 전사 및 아포토시스를 조절하며^{25, 27, 32)} glutathione을 제외한 세포내 티올(thiol)은 유전자의 전사 및 아포토시스를 조절한다는 보고는¹³⁾ 종양 세포에서 증가된 thioredoxin이 아포토시스의 억제를 통한 종양 성장에 관여할 것으로 사료된다.

Mouse monocyte-macrophage cells에서 5 μ M menadione 및 1 μ g/ml 내독소에 의해 12-kDa thioredoxin 발현 증가 소견(Fig. 5)은 물론 본 연구에서 처치한 자극이 종양의 미세 환경내 산화 스트레스와 어느 정도 일치하는지 알수 없으며 실험에서 이용한 세포에도 문제가 있어 단언하기 어렵지만 폐암 세포에서 thioredoxin 발현 증가는 폐암 조직내 산화 스트레스와 밀접한 연관이 있을 것으로 사료된다.

결론적으로 세포내 항산화 단백질인 thioredoxin은 산화 스트레스 및 내독소에 의해 발현이 증가하고 폐암 조직에서 catalase, CuZn-SOD 및 glutathione peroxidase등 기존 항산화 단백질 양은 감소하는 반면 12-kDa 및 절단형 thioredoxin은 증가한다. 폐암에서 증가된 thioredoxin은 신호 전달물질로서 세포 증식을 통한 종양 성장을 촉진하고 특히 절단형 thioredoxin의 생물학적 기능을 고려할 때 폐암에서 이 단백질의 발현 증가는 종양 성장에 더욱 의미 있는 역할을 하리라고 생각한다.

요 약

연구배경 :

활성산소종(reactive oxygen species)은 발암 기전의 여러 단계 과정에 관여한다. 대부분의 종양 세포주 및 종양 조직내의 종양 세포는 활성산소종을 생성하는 반면 종양 세포의 catalase, Mn- 및 CuZn-SOD등 기존 항산화 단백질의 활성도는 대부분 저하되어 있다. 이로 인한 종양 조직내의 지속적인 산화 스트레스는 종양의 국소 침습 및 전이를 촉진한다. 12-kDa thioredoxin은 glutathione 및 glutaredoxin과 함께 세포내 산화-환원 전위를 조절하여 세포 활성, 증식, 분화 및 산화-환원에 의한 아포토시스 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다. 한편 histiocytic lymphoma 세포(U937, human)에서 14-kDa 및 10-kDa의 eosinophilic cytotoxic enhancing factor(ECEF)로 정제되었으며 호산구 자극의 생물학적 기능은 10-kDa에서 20배 이상 높은 것으로 알려져 있다. 성인 T-세포백혈병, 자궁경부상피세포암 및 간세포암에서 thioredoxin 양이 증가되어 있고 폐암에서는 thioredoxin mRNA가 증가되어 있는 것으로 알려져 있다. 이에 폐암 조직과 주위 정상 조직을 비교하여 catalase, CuZn-SOD 및 glutathione peroxidase 등 기존 항산화 단백질과 thioredoxin 발현 변화를 비교 관찰하고 대식세포에서 산화 스트레스 및 내독소에 의한 thioredoxin 발현 변화를 관찰하고자 하였다.

방 법 :

동일한 환자의 폐암 조직과 주변의 정상 폐 조직을 immunoblot 분석으로 catalase, CuZn-SOD, glutathione peroxidase 및 thioredoxin 발현을 비교 관찰하였으며 대식세포인 mouse monocyte-macrophage 세포(RAW 264.7)에 5 μ M menadione 및 1 μ g/ml endotoxin을 처리하여 thioredoxin 발현을 관찰하였다.

결 과 :

Immunoblot 분석상 12-kDa의 thioredoxin 발현은 폐암 조직에서 정상 폐조직과 비교하여 의미있는 증가를 보였으나 catalase 및 CuZn-SOD의 발현은 폐암 조직에서 정상 폐 조직과 비교하여 감소하였고 glutathione peroxidase의 발현은 일정 하지 않은 변화를 보였다. 절단형(truncated) thioredoxin 역시 폐암에서 증가하였다. Mouse monocyte-macrophage cells에 5 μ M menadione 및 1 μ g/ml endotoxin을 처리하였을때 thioredoxin 발현은 12시간에 최고로 증가하여 48시간까지 지속되었다.

결 론 :

폐암에서 기존의 항산화 단백질과는 달리 12-kDa 및 절단형 thioredoxin 발현이 증가하며 이는 종양 조직 내의 지속적인 산화 스트레스와 밀접한 연관이 있다. 특히 절단형 thioredoxin의 생물학적 기능을 고려할 때 절단형 thioredoxin 발현 증가는 종양 세포 증식을 통한 종양 성장에 더욱 의미있는 역할하리라고 생각 된다.

참 고 문 헌

1. Halliwell B, Gutteridge JMC : Free Radicals in Biology and Medicine. 2nd ed. Clarendon Press, Oxford, 1989
2. Holmgren A : Thioredoxin and Glutaredoxin Systems. J Biol Chem 264 : 13963, 1989
3. Okada M, Maeda M, Tagaya Y, Taniguchi Y, Teshigawara K, Yoshiki T, Diamantstein T,

Smith KA, Uchiyama T, Honjo T, Yodoi J : TCGF(IL-2)-receptor inducing factor(s). II. Possible role of ATL-derived factor (ADF) on constitutive IL-2R expression. J Immunol 135 : 3995, 1985

4. Teshigawara K, Maeda M, Nishino K, Nikaido T, Uchiyama T, Tsudo M, Wano Y, Yodoi J : Adult T cell leukemia cells produce a lymphokine that augments interleukin 2 receptor expression. J Mol Cell Immunol 2 : 17, 1985
5. Wollman EE, Auriol L, Rimsky L, Shaw A, Jacquot JP, Wingfield P, Graber P, Dessarps F, Robin P, Galibert F, Bertoglio J, Fradelizi D : Cloning and expression of a cDNA for human thioredoxin. J Biol Chem 263 : 15506, 1988
6. Silberstein DS, McDonough S, Minkoff MS, Balcewicz-Sablinska MK : Human Eosinophil Cytotoxicity-Enhancing Factor. J Biol Chem 268 : 9138, 1993
7. Rubartelli A, Bajetto A, Allavena G, Wollman E, Sitia R : Secretion of Thioredoxin by Normal and Neoplastic Cells through a Leaderless Secretory Pathway. J Biol Chem 267 : 24161, 1992
8. Tagaya Y, Maeda Y, Mitsui A, Kondo N, Matsui H, Hamuro J, Brown N, Arai Ken-ichi, Yokota T, Wakasugi H, Yodoi J : ATL-derived factor (ADF), an IL-2 receptor/Tac inducer homologous to thioredoxin : possible involvement of dithiol-reduction in the IL-2 receptor induction. EMBO J 8 : 757, 1989
9. Wakasugi N, Tagaya Y, Wakasugi H, Mitsui A, Michiyuki M, Yodoi J, Turst T : ADF/Thioredoxin produced by both HTLV-I and EBV transformed lymphocytes acts as an autocrine growth factor and synergizes with IL-1 and IL-2. Proc Natl Acad Sci USA 87 : 8282, 1990
10. Yamauchi A, Masutani H, Tagaya Y, Wakasugi

- N, Mitsui A, Nakamura H, Inamoto T, Ozawa K, Yodoi J : Lymphocyte transformation and thiol compounds : the role of ADF/thioredoxin as an endogenous reducing agent. *Mol Immunol* **29** : 263, 1992
11. Biguet C, Wakasugi N, Mishal Z, Holmgren A, Chouaib S, Tursz T, Wakasugi H : Thioredoxin Increases the Proliferation of Human B-cell Lines through a protein kinase C-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **269** : 28865, 1994
12. Gallegos A, Gasdaska JR, Taylor CW, Paine-Murrieta GD, Goodman D, Gasdaska PY, Berggren M, Briehl MM, Powis G : Transfection with human thioredoxin increase cell proliferation and a dominant-negative mutant thioredoxin reverses the transformed phenotype of human breast cancer cells. *Cancer Res* **56** : 5765, 1996
13. Sato N, Iwata S, Nakamura K, Hori Toshiyuki, Mori K, Yodoi J : Thiol-Mediated Redox Regulation of Apoptosis : Possible Roles of Cellular Thiols Other Than Glutathione in T Cell Apoptosis. *J Immunol* **154** : 3194, 1995
14. Sztatrowski TP, Nathan CF : Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.* **51** : 794, 1991
15. Okamoto K, Toyokuni S, Uchida K, Ogawa O, Takenawa J, Kakehi Y, Kinoshita H, Hattori-Nakakuki Y, Hiai H, Yoshida O : Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in human renal-cell carcinoma. *Int J Cancer* **58** : 825, 1994
16. Sato K, Ito K, Kohara H, Yamaguchi Y, Adachi K, Endo H : Negative regulation of catalase gene expression in hepatoma cells. *Mol Cell Biol* **12** : 2525, 1992
17. Aida Y, Maeyama S, Takakuwa T, Uchikoshi, T : Immunohistochemical expression of manganese superoxide dismutase in hepatocellular carcinoma, using a specific monoclonal antibody. *J Gastroenterology* **29** : 443, 1994
18. Oberley L W : The role of superoxide dismutase and gene amplification in carcinogenesis. *J Theor Biol* **106** : 403, 1984
19. Sun Y : Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* **8** : 583, 1990
20. Fujii S, Nanbu Y, Nonogaki H, Konishi I, Mori T, Masutani H, Yodoi J : Coexpression of Adult T-Cell Leukemia-Derived Factor, a Human Thioredoxin Homologue, and Human Papillomavirus DNA in Neoplastic Cervical Squamous Epithelium. *Cancer* **68** : 1583, 1991
21. Nakamura H, Masutani H, Tagaya Y, Yamauchi A, Inamoto T, Nanbu Y, Fujii S, Ozawa K, Yodoi J : Expression and Growth-Promoting Effect of Adult T-Cell Leukemia-Derived Factor. *Cancer* **69** : 2091, 1992
22. G ner G, Islekel H, Oto O, Hazan E, Acikel U : Evaluation of some antioxidant enzymes in lung carcinoma tissue. *Cancer Letters* **103** : 233, 1996
23. Gasdaska PY, Oblong JE, Cotgreave IA, Powis G : The predicted amino acid sequence of human thioredoxin is identical to that of the autocrine growth factor human adult T-cell derived factor (ADF) : thioredoxin mRNA is elevated in some human tumors. *Biochim Biophys Acta* **1218** : 292, 1994
24. Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J, Hiai H : Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Letters* **358** : 1, 1995
25. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA : Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NK-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* **10** :

- 2247, 1991
26. Crawford D, Zbinden L, Amstad P, Cerutti P : Oxidant stress induces the proto-oncogenes *c-fos* and *c-myc* in mouse epidermal cells. *Oncogene* 3 : 27, 1988
27. Nose K, Shibanuba M, Kikuchi K, Kageyama H, Sakiyama S, Kuroki T : Transcriptional activation of early-response genes by hydrogen peroxide in a mouse osteoblastic cell line. *Eur J Biochem* 201 : 99, 1991
28. O'Donnell-Tormey J, DeBoer CJ, Nathan CF : Resistance of human tumor cells in vitro to oxidation. *J Clin Invest* 76 : 80, 1985
29. Powis G, Oblong JE, Gasdaska PY, Berggren M, Hill SR, Kirkpatrick DL : The thioredoxin/thioredoxin reductase redox system and control of cell growth. *Onc Res* 6 : 539, 1994
30. Natsuyama S, Noda Y, Yamashita M, Nagahama Y, Mori T : Superoxide dismutase and thioredoxin restore defective p34cdc kinase activation in mouse two-cell block. *Biochim Biophys Acta* 1176 : 90, 1993
31. Rubartelli A, Bonifaci N, Sitia R : High rates of thioredoxin secretion correlate with growth arrest in hepatoma cells. *Cancer Res* 55 : 675, 1995
32. Buttke TM, Sandstrom PA : Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol. Today* 15 : 7, 1994