

# 암억제 유전자 p53에 의한 insulin-like growth factor binding protein-3의 발현과 glycosylation를 통한 항암작용

전북대학교 의과대학 소아과학교실, 임상의학연구소\*, 치과대학 생화학교실†

김선영\* · 김세림\* · 이정창† · 이호근† · 이대열 · 황평한

## The anti-tumor mechanisms of p53 through the regulation of expression and glycosylation of insulin-like growth factor binding protein-3

Sun Young Kim, Ph.D.\*, Se Rim Kim, M.S.\*, Jung Chang Lee, Ph.D.†  
Ho Keun Yi, Ph.D.†, Dae Yeol Lee, M.D. and Pyoung Han Hwang, M.D.

Department of Pediatrics, School of Medicine, Research Institute of Clinical Medicine\*,  
Department of Biochemistry†, School of Dentistry, Chonbuk National University, Jeonju, Korea

**Purpose :** Insulin-like growth factor binding protein(IGFBP)-3 has been known as a tumor suppressor gene, and its anti-tumor function was divided into insulin-like growth factor(IGF)-dependent and IGF-independent mechanism. In IGF-independent mechanism, IGFBP-3 directly interacts with a cell without binding of IGFs, becoming an interesting object in oncology. Several studies demonstrate that one of the well-known tumor suppressor genes, p53, induces directly IGFBP-3 transcription, and the increment of IGFBP-3 expression induces apoptosis of many cancer cells. Recently, the anti-tumor mechanisms of IGFBP-3 have been reported, but post-translational modification of IGFBP-3 and its anti-tumor mechanism are not well known. In this study, we examined whether p53 regulated the glycosylation of IGFBP-3, and analysed the meaning of IGFBP-3 glycosylation related to the apoptosis of cancer cell.

**Methods :** The p53-mutated status of MDA-MB-231 human breast cancer cells was used in this experiment. The expression and glycosylation of IGFBP-3 were tested by Western blot analysis after infection of adenovirus mediated Ad/p53 and/or Ad/IGFBP-3.

**Results :** Ad/p53 infected cells resulted in growth retardation and the induced apoptosis. p53 induced direct expression and glycosylation of IGFBP-3. The increase of glycosylated IGFBP-3 was able to promote cellular apoptosis, and the glycosylation of IGFBP-3 was more activated by the double treatment of Ad/p53 and Ad/IGFBP-3.

**Conclusion :** From this study, the anti-tumor activity of IGFBP-3 was shown to improve the stabilization of IGFBP-3 through the increment of glycosylation of IGFBP-3 by p53. This result suggests that the combined gene therapy of p53 and IGFBP-3 may appropriate treatment of cancer. (**Korean J Pediatr** 2006;49:431-438)

**Key Words :** p53, IGFBP-3, Glycosylation

### 서론

이 논문은 전북대학교병원 임상연구소의 학술연구비 지원에 의해 연구되었음.

접수 : 2005년 10월 31일, 승인 : 2005년 11월 30일

책임저자 : 황평한, 전북대학교병원 소아과

Correspondence : Pyoung Han Hwang, M.D.

Tel : 063)250-1472 Fax : 063)250-1464

E-mail : hwaph@chonbuk.ac.kr

Insulin-like growth factor(IGFs)는 성장을 촉진하는 펩타이드로 구조적으로 insulin과 매우 유사한 특징을 갖고 있다<sup>1)</sup>. 간에서 합성되는 IGFs는 여러 조직과 기관의 성장 및 분화를 조절하는 중요한 인자이며, IGF-system에는 IGF-I, IGF-II, IGF-I & -II receptor, IGFBPs로 구성되어 있다<sup>2)</sup>. 정상세포뿐만 아

나라 암세포의 증식에도 여러 성장인자가 필수적이며, 대표적인 암세포의 증식인자로는 platelet-derived growth factor(PDGF), basic fibroblastic growth factor(bFGF), epidermal growth factor(EGF), transforming growth factor(TGF) 등이 있다<sup>3)</sup>. IGF-I은 정상 세포뿐만 아니라 암 세포주에서도 분열촉진성(mitogenic) 효과가 있음이 알려져 있고, 세포주기의 G1에서 S기로 진행하는데 필수적인 인자이다<sup>4)</sup>. IGF-II는 태아에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있지만 성인에서의 역할은 아직 밝혀져 있지 않다. 지금까지 여러 종류의 암세포에서 IGFs mRNA 이상발현이 보고되고 있으며, 골육종, 율름씨 종양, 대장암, 유방암, 크롬친화세포종, 간모세포종, 횡문근육종, 간암 등에서 IGF-I과 IGF-II의 발현이 증가되는 것으로 알려져 있다<sup>5-9)</sup>. 이렇게 다양한 암세포에서 IGFs의 발현증가는 암의 발생, 성장, 진행에 이들이 폭넓게 작용하고 있음을 의미한다. 뿐만 아니라 IGF-I은 유방암 세포의 증식에 강력한 증식인자일 뿐만 아니라 에스트로겐보다 더 강한 성장촉진인자로 작용하고 있다<sup>10)</sup>.

IGF의 활성은 IGFFPs에 의해서 조절되며, 지금까지 6개의 IGFFPs(IGFBP-1~6)가 밝혀졌다<sup>11, 12)</sup>. IGFFPs는 IGF와 높은 친화력으로 결합하여 IGF를 운반하고 반감기를 증가시키며, 유리된 IGF가 IGF 수용체에 결합하는데 조절역할을 한다. 그러므로 대부분의 IGFFPs는 세포증식에 대한 IGF-I의 자극 효과를 억제하지만 반대로 IGF 작용을 강화시키는 경우도 있다. IGFBP-3는 IGF와는 무관하게 직접 세포에 작용하여 세포 성장을 억제시키는 IGF-independent mechanism이 제시되었다<sup>13, 14)</sup>. IGFBP-3의 IGF-independent mechanism으로 유방암, 전립선암 등의 성장을 억제시켜 최근 IGFs와 IGFBP-3에 관한 관심이 새로이 인식되고 있다. IGFBP-3는 TGF- $\beta$ , retinoic acid, antiestrogen, vitamin D analog, TNF- $\alpha$  등에 의해서 발현이 증가되어 여러 암 세포의 성장을 억제시킨다<sup>15-19)</sup>. 그밖에 암억제 유전자로 잘 알려져 있는 p53은 IGFBP-3를 직접 전사시키며, p53의 항암작용에 있어 IGFBP-3의 기능이 중요한 역할을 할 것으로 보고되었다<sup>20)</sup>. 이러한 p53에 의한 IGFBP-3의 전사작용에 관해서는 언급되어 왔지만, 번역 작용과 번역 후에 유도되는 변형(translational modification)에 관해서는 잘 알려져 있지 않다. 세포질에서 IGFBP-3는 여러 단백질 분해 효소에 의해서 분해된다<sup>21)</sup>. IGFBP-3의 분해를 억제시켜 항암 활성을 지속적으로 유지시키는 생화학적 변화로 IGFBP-3의 glycosylation이 있으며<sup>22)</sup>, IGFBP-3 활성의 증가는 세포 사멸을 촉진시킬 것으로 예측하고 있다. IGFBP-3의 대표적인 항암기전은 caspase-7과 -8의 활성을 유도시키고<sup>23)</sup>, p53과는 무관하게 직접 bax와 bcl-2의 발현을 조절시켜 apoptosis를 유도하는 것으로 알려져 있다<sup>24)</sup>. 하지만 IGFBP-3의 정확한 항암작용 및 기전에 관해서는 더욱 많은 연구가 요구되고 있다.

본 연구에서는 새로운 IGFBP-3의 항암기전의 탐색을 목적으로 암억제 유전자 p53에 의해서 유도되는 IGFBP-3와 IGFBP-3의 glycosylation에 미치는 영향을 조사하였으며, 아울러

IGFBP-3의 glycosylation이 암세포에 미치는 항암작용과 apoptosis에 미치는 기전을 조사하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 세포배양

세포주는 한국 세포주 은행으로부터 분양 받은 사람의 유방암 세포주 MDA-MB-231를 실험에 사용하였다. 세포 배양액은 DMEM(Life Technologies, Grand Island, NY, USA) 배지에 56°C에서 30분간 가열하여 비활성화 시킨 우태아 혈청(FBS, Hyclone, Logan, Utah, USA)을 10%, penicillin(100 unit/mL)과 streptomycin(100  $\mu$ g/mL) 및 300  $\mu$ g/mL-glutamine을 첨가하여 조제하였다. 세포주는 위의 배양액을 사용하여 37°C, 95% 습도, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였고, 통상적으로 3-4일 간격으로 계대 배양을 하였으며, 실험에는 총 30 계대 이하인 세포만을 사용하였다.

### 2. 재조합 p53, IGFBP-3 아데노바이러스(Ad/p53, Ad/IGFBP-3) 제작

Ad/p53과 Ad/IGFBP-3의 제작은 Quantum Biotechnologies (Maisonevenue West, Montreal, Canada)의 AdEasy Vector System을 이용하였다. p53과 IGFBP-3 유전자를 CMV 촉진자가 결합된 전달 벡터에 재조합 시키고, 재조합된 플라스미드를 pAdEasy-1 벡터와 대장균 BJ5183에서 동종 재조합(homologous recombination)을 시켰다. 동종 재조합의 확인은 제한효소 Pac I을 이용하여 전체 유전자의 크기와 Kpn I으로 클로닝 영역을 재확인하였다. 이상의 재조합된 p53과 IGFBP-3 벡터를 대장균 DH5 $\alpha$ 에 이입시켜 안정된 p53과 IGFBP-3 아데노바이러스 벡터를 대량 정제하였다. 재조합된 이들 벡터를 Pac I으로 선형화(linearizing)를 시킨 후, 인산석회전달(calcium phosphate transfection) 방법(Promega, Madison, WI, USA)으로 QBI293A(human embryonic kidney) 세포에 전달시켜 재조합 바이러스를 제작하였다. QBI293A 세포의 배양은 MEM(minimum essential medium, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) 배양액에서 통상적인 배양방법으로 배양하였고, 유전자 도입 2-3주일 후 아데노바이러스가 생성된 배양 용기로부터 바이러스를 분리하였다. 분리된 바이러스로부터 p53과 IGFBP-3 유전자의 확인은 위와 동일하게 제한효소를 이용하였고, 확인된 바이러스를 QBI293A에 재감염 시켜 중복 염화세슘배원심분리법(double CsCl gradient)으로 다량의 바이러스를 정제하였다. 이후 바이러스의 보관은 10% 글리세롤이 함유된 투석 완충액(10 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>)과 함께 -80°C로 저장하였다.

정제된 바이러스의 생물학적 활성은 플라크형성단위(plaque forming unit, PFU/mL)를 측정하여 실험 세포주에 일정수의 바이러스를 감염시켰다. QBI293A 세포 3 $\times$ 10<sup>5</sup>개를 60 mm 배양용기에 하룻밤 배양시키고 정제 후 희석된 바이러스 1 mL과

1.25% SeaPlaque agarose(FMC, Rockland, Maine USA) 1 mL(42°C)를 서서히 섞은 후 세포 위에 부었다. 통상적으로 2주 일 진후하여 나타나는 플라크의 숫자를 세어 PFU를 계산하였다.

MDA-MB-231 세포주에 바이러스를 150 MOI(multiplicity of infection, number of active virus particle/cell number)로 감염시켰으며, 감염은 우태아 혈청이 함유되지 않는 배양액에 5분 간격으로 흔들어서 37°C에서 3시간 시켰다.

### 3. 클론원성 생존 분석(clonogenic survival assay)

세포성장을 측정하기 위하여, MDA-MB-231 세포주에 Mock, Ad/LacZ, Ad/p53 바이러스를 150 MOI로 감염시켰다. 감염 3일 후에, 각각의 세포를 60 mm 배양용기에  $1 \times 10^4$ 개씩 배양시켰다. 배양 2주 후에, 1 mL의 세포 고정용액(2% formaldehyde, 0.2% glutaraldehyde, PBS)을 이용하여 고정하였다. 실온에서 5-10분 방치한 후, PBS로 2-3회 세척을 통하여 고정용액을 제거하였다. 1 mL의 3% crystal violet 염색용액을 넣은 후, 실온에서 10-20분 동안 방치하였다. 세포의 성장 유무는 광학 현미경을 이용하여 관찰하였다.

### 4. Western 분석법

#### 1) 총 단백질 추출

MDA-MB-231 세포에 Ad/p53를 감염시킨 72시간 후 세포로부터 총 단백질을 분리하였다. 세포를 2-3회 차가운 PBS로 세척 후 100 mm 배양용기에 1 mL의 PBS-TDS(PBS, 1% Triton X-100, 0.05% sodium deoxycholate, 0.01% SDS, 0.5  $\mu$ g/mL leupeptin, 1 mM EDTA, 1  $\mu$ g/mL pepstatin, 0.2 mM PMSF) 용액을 첨가하여 15분간 얼음 위에서 방치 후 12,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였으며, 단백질 농도는 bovine serum albumin(BSA)을 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 정량 하였다.

#### 2) 세포질 및 미토콘드리아 단백질 추출

위와 같은 방법으로 처리한 세포에서 세포질 및 미토콘드리아 단백질을 분리하였다. 트립신을 처리하여 분리된 세포는 2-3회 차가운 PBS로 세척한 후 100 mm 배양용기에 1 mL의 고농도 완충액(20 mM HEPES pH 7.4, 10 mM potassium chloride, 2 mM magnesium chloride, 1 mM EDTA, 0.5  $\mu$ g/mL leupeptin, 1  $\mu$ g/mL pepstatin, 0.2 mM PMSF) 용액을 첨가하여 세포를 풀어준 후, 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 100  $\mu$ L 고농도 완충액을 넣어준 후, 얼음 위에서 5분간 반응시켰다. 26 gauge 주사바늘을 이용하여 10회 위 아래로 혼합한 후, 10분간 원심분리를 하였다. 원심분리 후 상층액은 세포질 단백질로 사용하였고, 펠렛에는 100  $\mu$ L의 PBS-TDS 용액을 첨가하였다. 15분간 얼음 위에서 방치 후 12,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 미토콘드리아 단백질로 이용하였다.

### 3) Western hybridization

위의 방법으로 분리한 20  $\mu$ g의 용해질을 7.5% mini gel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) SDS-PAGE(poly acrylamide gel electrophoresis)로 변성 분리하였고, 이를 니트로 셀룰로오스 막(Hybond-C Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)에 60V로 2시간 동안 전기적으로 이동하였다. 블로킹은 5% skim milk가 함유된 TBST(TBS, 0.1% Tween 20)용액으로 상온에서 1시간 동안 실시하였다. Phospho-p53을 비롯하여 아래에 열거한 단백질의 발현을 측정하기 위한 1차 항체를 1:1,000으로 TBST 용액에 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후 TBST로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 horse radish peroxidase(HRP)가 결합된 anti-mouse IgG 혹은 anti-rabbit IgG (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)를 1:5,000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응하였다. TBST로 3회 세정 후 ECL 기질(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)과 30-60초간 반응 후 X-Ray 필름에 감광시켰다. 1차 항체는 Anti-p53(sc-6243, Santa Cruz, CA, USA), Anti-phospho-p53(#9286, Cell Signaling, Beverly, MA, USA), Anti-PARP(AM30, Calbiochem, Darmstadt, Germany), Anti-caspase 8(sc-7890, Santa Cruz, CA, USA), Anti-Bax(sc-493, Santa Cruz, CA, USA), Anti-caspase 9(sc-7885, Santa Cruz, CA, USA), Anti-actin(A-2066, Sigma, St. Louis, MO, USA)을 사용하였다.

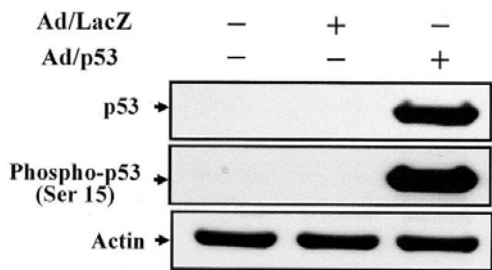
## 결 과

### 1. MDA-MB-231 세포에서 p53 아데노바이러스(Ad/p53)에 의한 p53의 발현

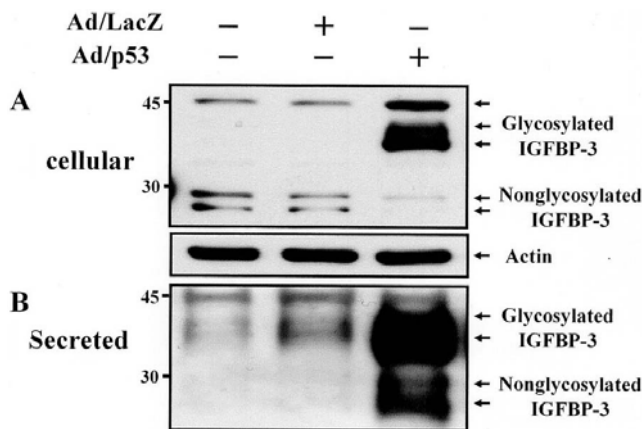
p53 cDNA를 제시된 방법에 따라 CMV 촉진자 방향으로 재조합시켜 복제 결합 재조합 아데노바이러스(Ad/p53)를 제작하였다. 실험세포주인 MDA-MB-231 유방암 세포는 p53 변이를 가진 세포로 대조세포(Mock와 Ad/LacZ)에서는 p53이 발현되지 않았지만, Ad/p53을 감염시킨 MDA-MB-231 세포에서는 p53의 발현이 유도되었다(Fig. 1). 특히 Ad/p53에 의한 새로이 유도된 p53은 serine 15번째에 인산화가 유도되었다(Fig. 1).

### 2. p53 의존적인 IGFBP-3의 glycosylation

p53에 의한 IGFBP-3의 translation level에서의 발현 및 glycosylation의 변화를 세포질과 condition media로 분리되는 IGFBP-3을 구분하여 검토하였다. 대조세포의 세포질에는 42, 39 kDa의 IGFBP-3의 당단백질(glycoprotein) 형태는 거의 존재하지 않았지만, 반면 Ad/p53을 감염시킨 세포에서는 현저한 증가를 보였다(Fig. 2). 분리된 IGFBP-3의 형태는 대조세포에서 소량의 당단백질 형태가 존재하였지만, 비당단백질(non-glycoprotein)은 거의 존재하지 않았다. 그러나 p53에 의해서 유도된 분비형의 IGFBP-3에는 소량의 비당단백질 형태는 존재하였



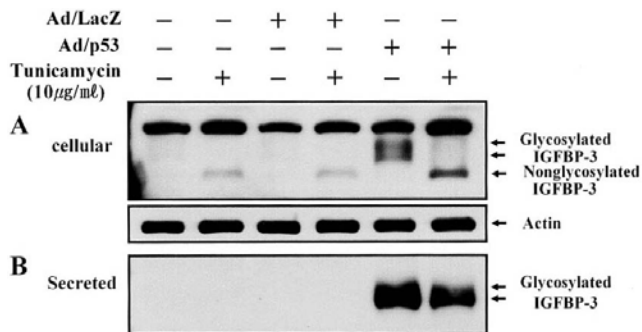
**Fig. 1.** Expression of p53 in MDA-MB-231 cells infected with Ad/LacZ, Ad/p53. Cells were collected at 3 days after adenoviral infection, and total protein was analyzed by Western blot with specific antibody. To confirm equal protein levels the same blot was stripped and developed with an anti-actin antibody.



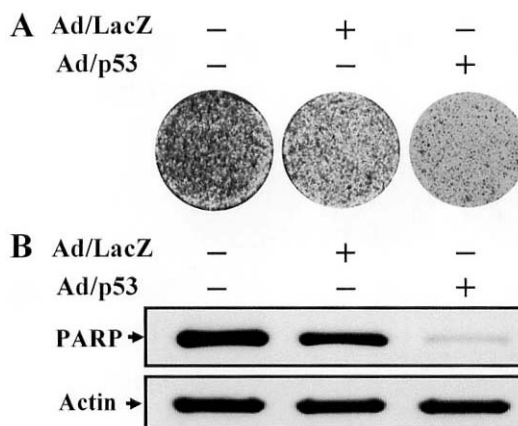
**Fig. 2.** Expression of glycosylated IGFBP-3 by Ad/p53 infection. Cells were infected with Ad/p53 and Ad/LacZ at a dose of 150 MOI for 3 hours, and then allowed to grow under serum free medium. After 3 days, cell lysates were harvested, and IGFBP-3 expression in total protein from transduced MDA-MB-231 cells was assayed by Western blot analysis(A). To confirm equal protein levels the same blot was stripped and developed with an anti-actin antibody. Serum free medium was concentrated 10 times by freezing dry and IGFBP-3 was analyzed by western blot analysis(B).

으나 대부분의 IGFBP-3는 당단백질 형태로 나타났다(Fig. 2).

p53에 의해서 발현이 유도되는 42, 39 kDa의 IGFBP-3의 당단백질이 당쇄화 단백질인지를 확인하기 위하여 glycosylation 억제제인 tunicamycin을 처리하였다. 정상세포에서 tunicamycin 처리로 IGFBP-3는 42와 39 kDa 영역의 당단백질이 분해되어 30 kDa 영역의 비당단백질로 변환되었다(Fig. 3). 또한 p53에 의해서 유도되는 IGFBP-3에서도 동일한 결과가 나타났으며, 이러한 결과는 세포질과 분비형에서도 동일하게 나타났다(Fig. 3). 따라서, 42와 39 kDa에서 측정되는 IGFBP-3는 당쇄화 형태의 당단백질이었으며, p53에 유도되는 대부분의 IGFBP-3는 당단백질로 번역 후 변형되었다.



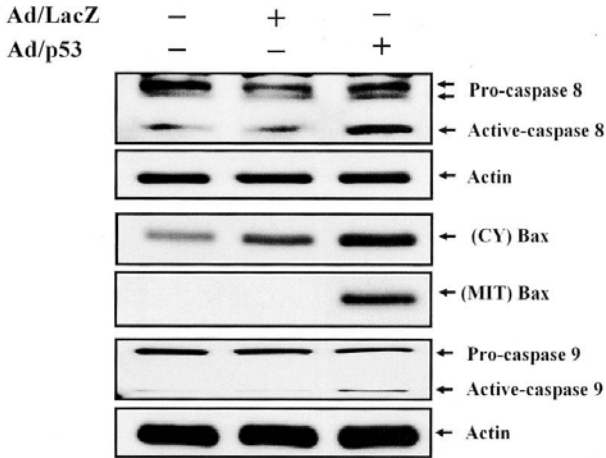
**Fig. 3.** Digestion of glycosylated IGFBP-3 by tunicamycin treatment. MDA-MB-231 cells were infected with AD/LacZ, AD/p53 at a dose of 150 MOI for 3 hours, and allowed to grow under serum free condition. Transduced cells were treated for 3 days with tunicamycin(10 µg/mL). Then cell lysates were harvested, and IGFBP-3 expression in total protein from transduced MDA-MB-231 cells was assayed by Western blot analysis(A). To confirm equal protein levels the same blot was stripped and developed with an anti-actin antibody. Serum free medium was concentrated 10 times by freezing dry and IGFBP-3 was analyzed by western blot analysis(B).



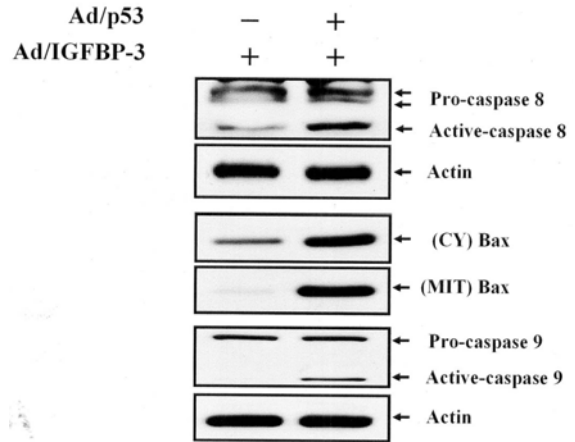
**Fig. 4.** The effect of p53 overexpression on cell growth and apoptosis. Exogenous p53 overexpression induced apoptosis in MDA-MB-231 by using clonogenic survival assay as described in Materials and methods(A). Cells were infected with Ad/p53 and Ad/LacZ at a dose of 150 MOI for 3 hours, and then allowed to grow under serum free medium. After 3 days, cell lysates obtained from transduced cells were analyzed for the apoptosis-specific cleavage of PARP(B). To confirm equal protein levels the same blot was stripped and developed with an anti-actin antibody.

### 3. IGFBP-3 발현 유도에 의한 성장의 억제와 apoptosis 유도

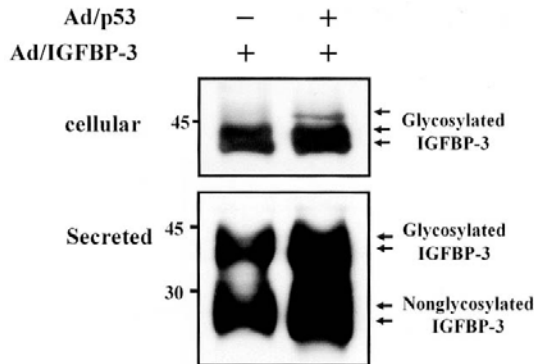
p53에 의해서 유도되는 IGFBP-3의 발현 증가가 세포 성장에 미치는 영향을 검토하였다. 클론원성 생존 분석(clonogenic survival assay)을 이용하여 측정된 세포성장온 대조세포에서는 지속적인 세포성장이 유지되었지만, Ad/p53에 의해서 IGFBP-3가 유도되는 세포는 세포성장이 현저히 감소되었다(Fig. 4). 성장이 억제된 이 세포들은 apoptosis가 유도되었으며, 세포 apoptosis



**Fig. 5.** Apoptotic pathway through caspase-8, bax and caspase-9 in MDA-MB-231 cells by Ad/p53 infection. Cell lysates were collected and processed at 3 days after adenoviral infection, and total, cytosolic(CY), mitochondrial(MIT) protein was analyzed by Western blot analysis with specific antibody. To confirm equal protein levels the same blot was stripped and developed with an anti-actin antibody.



**Fig. 7.** Enhancement of apoptotic effect through caspase-8, bax and caspase-9 by Ad/p53 and Ad/IGFBP-3 double infection. MDA-MB-231 cells infected with Ad/p53 and/or Ad/IGFBP-3. Cell lysates were collected and processed at 3 days after adenoviral infection, and total, cytosolic(CT), mitochondrial(MIT) protein was analyzed by Western blot analysis with specific antibody. To confirm equal protein levels the same blot was stripped and developed with an anti-actin antibody.



**Fig. 6.** Hyper-glycosylation of IGFBP-3 by Ad/p53 and Ad/IGFBP-3 double infection. Cells were infected with Ad/p53 and/or Ad/IGFBP-3 at a dose of 150 MOI for 3 hours, and then allowed to grow under serum free medium. After 3 days, cell lysates were harvested, and IGFBP-3 expression in total protein from transduced MDA-MB-231 cells was assayed by Western blot analysis(A). To confirm equal protein levels the same blot was stripped and developed with an anti-actin antibody. Serum free medium was concentrated 10 times by freezing dry and IGFBP-3 was analyzed by western blot analysis(B).

는 PARP 단백질 분해 효소의 활성으로 증명하였다(Fig. 4).

IGFBP-3의 발현 유도과 작용에 의하여 유도된 apoptosis 경로를 분석하였다. 세포내 apoptosis는 TNF 등의 death receptor에 의해서 유도되어지는 경로와 미토콘드리아 매개로 나타나는 내재적 경로로 구분된다. 대조세포에서는 caspase 8의 활성이 약하게 보였고, bax의 미토콘드리아 내로의 이동이 보이지 않았으며, caspase 9의 활성 역시 약하게 보였다(Fig. 5). 반면에 Ad/p53이 감염된 세포에서는 caspase 8의 활성이 현저히 증

가하였고, bax의 미토콘드리아로의 이동이 보였으며, caspase 9의 활성이 현저히 증가하였다(Fig. 5). 이로써 IGFBP-3에 의한 apoptosis의 경로는 death receptor를 통하여 유도되는 신호가 미토콘드리아 유도 apoptosis를 더욱 활성화시키는 것으로 나타났다. 이러한 apoptosis는 p53과 IGFBP-3를 동시에 발현시킨 결과 IGFBP-3만을 감염시킨 세포에 비하여 두 경로의 활성이 더욱 증가하였다(Fig. 7). 특히 바이러스 매개 IGFBP-3만을 발현시켰을 경우 IGFBP-3의 당화가 나타나지만, p53과 IGFBP-3를 동시에 발현시킨 결과 더욱 당화가 촉진되는 것으로 나타났다(Fig. 6, 7). 세포질내와 분비형의 IGFBP-3의 당화 형태의 증가는 세포의 apoptosis를 현저히 유도시키는 것으로 확인되었다.

## 고 찰

원발암유전자(proto-oncogene)는 세포 증식, 분화 및 발생 등에 중요한 역할을 하지만, 발암물질 혹은 방사선과 같은 외부적 요인에 의해서 유전자의 변이나 증폭으로 활성이 증가되어 정상 세포를 암세포로 전환시킨다. 이와는 다르게 암억제 유전자는 유전자의 변이나 기타의 원인으로 세포내에서 활성이 저하되거나 혹은 소실되어 세포의 성장을 억제시키지 못하여 정상세포가 암세포로 전환된다. 암억제 유전자로는 Rb 단백질이 최초로 동정되었으며<sup>25)</sup>, 이후 p53 암억제 유전자에 관한 많은 연구가 되어 이해의 폭이 넓어지게 되었다. 특히 p53은 백혈병, 림프종, 각종 악성 종양 등 50% 이상의 암에서 활성의 소실이나 돌연변이가 나타나고 있어 대부분의 암은 p53의 기능과 밀접한 연관을 갖고 있다<sup>26)</sup>. p53은 새로운 암억제 유전자로 인식되고 있는 IGFBP-3

의 전사인자로 잘 알려져 있으며, p53의 중요한 항암작용의 축이 IGFBP-3의 작용기전에 의해서 나타나는 것으로 추측하고 있다<sup>20)</sup>. 특히 높은 혈중 IGF-1의 농도와 IGFBP-3의 낮은 혈중 농도가 유방암, 전립선암, 대장암, 폐암 등의 발병률에 관련 있다는 보고가 발표된 이후 IGFBP-3에 관한 관심이 더욱 높아졌다<sup>27)</sup>. IGF-I과 IGF-II는 대부분의 세포에서 성장을 촉진시키고, 유방암세포에서는 에스트로젠보다 강한 성장유도 물질이다<sup>10, 28)</sup>. 반면에 IGFBP-3는 IGF-I과 IGF-II와 결합하여 IGF의 운반과 혈액 내에서 분해를 막아주는 생리적인 기능을 수행하고 있다<sup>29)</sup>. IGF에 대한 활성과는 다르게 IGFBP-3는 암세포의 성장을 직접 억제하고 apoptosis를 유도하는 기능이 보고되면서<sup>13, 14)</sup>, 암억제 유전자로서 IGFBP-3는 새롭게 조명되고 있으며 그 기능에 관심이 집중되고 있다. IGFBP-3의 발현을 증가시켜 세포의 성장을 억제시키는 물질로는 retinoic acid, vitamin D 등이 있으며<sup>15-19)</sup>, 그밖에 암억제 유전자 p53은 직접 IGFBP-3 촉진자에서 전사활성을 조절하여 IGFBP-3를 발현시킨다<sup>20)</sup>. 그러나 아직은 p53의 IGFBP-3의 전사작용 외에 번역과정과 번역 후 변형되는 과정에 관해서는 잘 알려져 있지 않다. 이러한 IGFBP-3의 변형으로 예측되는 당화에 관한 명확한 암억제 유전자로서의 기능과 역할에 관해서 전혀 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 p53에 의한 IGFBP-3의 당화에 관한 변화와 apoptosis 기전을 검토하였다.

실험에 사용한 MDA-MB-231 세포는 유방암 세포로 p53 변이를 보이며, 소량의 IGFBP-3 단백질을 분비시키는 세포이다. 이러한 실험세포에 Ad/p53를 이용하여 외부적으로 정량의 p53을 발현시킴으로써 기존의 세포질과 분비되는 IGFBP-3의 발현량이 증가되었다(Fig. 2). 이는 p53의 전사작용에 의한 것으로 해석되며, 특히 p53의 15번 아미노산 serine 잔기의 인산화(Fig. 1)가 IGFBP-3의 발현량을 더욱 증가시키는 것으로 추론할 수 있다<sup>20)</sup>. 세포내 p53의 외부적 도입으로 세포내에 새롭게 발현되는 대부분의 IGFBP-3는 당화 형태로 유도되었다(Fig. 2). 특이한 점은 대조세포내에는 소량의 IGFBP-3가 존재하였으며 대부분이 비당화 형태로 존재하였다. 반면 p53에 의해서 유도되는 IGFBP-3는 비당화 형태는 감소되고 오히려 당화 형태로 전환을 유도시켰다(Fig. 2). 이 결과는 p53이 직접 혹은 간접적으로 IGFBP-3의 번역 후 단백질의 변형에도 관여한다는 증거로 이해된다. IGFBP-3의 당화는 glycosylation 억제제인 tunicamycin을 처리하였을 경우, IGFBP-3의 42, 39 kDa의 glycoprotein이 감소함으로써 IGFBP-3의 당화를 재확인할 수 있었다(Fig. 3). 실험에는 세포의 생존에 영향을 미치지 않는 소량의 tunicamycin(10 µg/mL)를 처리하였으며, 이 농도에서는 분비형태의 IGFBP-3의 당화의 일부분을 저해시켰지만 전체적인 반응의 저해는 나타나지 않았다.

IGFBP-3의 당화의 증가는 세포 내에 존재하는 protease에 의한 단백질 분해가 억제되므로 IGFBP-3의 세포내 존재량과 분비가 증가되어 활성이 지속된다<sup>22)</sup>. 이러한 활성의 증가는

세포 사멸을 촉진시킬 것으로 예측되며, 이를 p53 도입세포에서 apoptosis의 유도와 관련 분자인 PARP의 활성으로 확인할 수 있었다(Fig. 4). 그러나 p53의 발현유도가 세포의 apoptosis를 유도했지만 IGFBP-3의 기능에 의한 apoptosis 유도만으로 볼 수 없다. 이는 p53의 고유 항암기전과 IGFBP-3의 복합적인 항암기전으로 해석된다. 복합기전에 관한 이유는 p53 도입세포에서 유도되는 apoptosis의 과정으로 caspase 8의 활성이 나타났다. Caspase 8의 활성은 IGFBP-3의 항암작용으로도 유도되지만<sup>23)</sup>, p53이 Fas/FasL의 발현을 통하여 세포내에서도 유도되기 때문이다<sup>30)</sup>. 미토콘드리아 매개의 apoptosis에 관여하는 bax의 발현의 증가 및 세포질로의 이동에 있어서 p53과 IGFBP-3는 모두 작용하는 것은 두 분자에 의한 복합 기전으로 해석된다. 반면, p53만을 도입시킨 세포와 비교하여 IGFBP-3와 p53을 동시에 도입시킨 세포에서는 훨씬 높은 IGFBP-3의 세포내 발현과 동시에 IGFBP-3의 당화가 촉진되었다(Fig. 6). 이는 p53이 IGFBP-3의 당화에 관여한다는 증거이며, 이러한 hyper-glycosylation 상태에서 apoptosis가 훨씬 높게 유도되었다(Fig. 7). 이러한 결과는 p53은 IGFBP-3의 발현뿐만 아니라 당화를 유도시키고, 당쇄화가 증가된 IGFBP-3는 p53의 항암작용과 관계없이 암세포의 apoptosis를 촉진시킨다고 추론할 수 있다.

본 연구의 결과로부터 p53은 IGFBP-3의 발현과 당화를 증가시키는 새로운 기전으로서 apoptosis를 유도한다는 것을 알 수 있었다. 또한 당화되어진 IGFBP-3는 고유의 기능 활성이 더욱 유지됨으로서 세포의 apoptosis를 높이는 것을 알 수 있었다. 향후 IGFBP-3의 항암기전을 높이기 위한 IGFBP-3의 당화 유도는 암억제 및 암의 치료에 응용이 가능할 것으로 예측되며, 그 방법으로 p53을 복합적으로 이용하는 것이 하나의 모델로 제시될 것으로 생각된다. 따라서 암을 목표로 하는 유전자치료를 위해서 IGFBP-3와 p53 복합유전자치료는 이상적인 수단으로 사료된다.

## 요 약

**목적 :** 새로운 암억제 유전자로 알려진 IGFBP-3의 주요 기능은 IGF-I과 IGF-II와 결합을 하여 IGF의 기능을 조절하는 IGF dependent mechanism과 IGFBP-3 자체가 IGF와 결합과는 무관하게 세포의 apoptosis를 유도하는 IGF independent mechanism이 보고되었다. 암억제 유전자 p53의 대표적인 항암기전의 하나는 직접 IGFBP-3의 발현을 증가시키며, 발현된 IGFBP-3는 암세포의 apoptosis를 유도시킨다. IGFBP-3의 항암작용은 보고되었지만, IGFBP-3의 번역 후 변형에 의한 항암기전은 전혀 밝혀져 있지 않다. 본 연구에서는 p53의 항암기전과 관련하여 IGFBP-3의 당화에 관련된 기전을 밝히고, IGFBP-3 당화의 의미를 규명하였다.

**방법 :** 실험 세포주로는 p53의 변이를 보이며 p53의 발현이 일반세포에 비교하여 낮은 특징을 갖고 있는 사람의 유방암세포

인 MDA-MB-231를 사용하였으며, Ad/p53과 Ad/IGFBP-3 아데노바이러스를 감염시킨 후 IGFBP-3의 발현 변화와 apoptosis 기전을 분석하였다. glycosylation 억제제로 알려져 있는 tunicamycin을 처리하여 당화의 정도를 조사하였다.

**결 과 :** 실험 세포에 Ad/p53을 감염시켜 p53을 발현시킨 결과 성장의 억제와 apoptosis가 유도되었고, IGFBP-3의 발현이 현저하게 증가되었으며, 특히 IGFBP-3의 당화 형태를 증가시켰다. 당화된 IGFBP-3의 증가는 세포의 apoptosis의 유도가 촉진되었으며, 이러한 IGFBP-3의 당화는 p53과 IGFBP-3의 발현을 동시에 유도시킨 결과 더욱 향상되었다.

**결 론 :** 이상의 연구에서 IGFBP-3의 압억제 능력의 향상은 p53에 의한 IGFBP-3의 당화의 증가를 통하여 안정화됨으로서 나타나고 있음을 알 수 있었다. 이는 p53과 IGFBP-3를 이용한 혼합유전자 치료가 가능할 것으로 사료된다.

## References

- Rajaram S, Baylink DJ, Mohan S. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr Rev* 1997;18:801-31.
- Daughaday WH, Rotwein P. Insulin-like growth factors I and II: peptide messenger ribonucleic acid and gene structures serum and tissue concentrations. *Endocr Rev* 1989;10:68-91.
- Fouston AS, Leoff EB, Shipley GD, Moses HL. Growth factors and cancer. *Cancer Res* 1986;46:1015-29.
- Froesch ER, Schmidt Chr, Schwander J, Zapf J. Action of insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol* 1985;47:443-67.
- Blatt J, White C, Dienes S, Friedman H, Foley T. Production of an insulin-like growth factor by osteosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;123:373-9.
- Reeve AE, Eccles MR, Wilkins RJ, Bell GI, Millow LJ. Expression of insulin-like growth factor II transcripts in Wilm's tumor. *Nature* 1985;317:258-60.
- Tricoli JV, Rall LB, Karakousis CP, Herrera L, Petrelli NJ, Bell GI, et al. Enhanced levels of insulin-like growth factor messenger RNA in human colon carcinomas and liposarcomas. *Cancer Res* 1986;46:6169-73.
- Huff KK, Kaufman D, Gabbay KH, Spencer EM, Lippman ME, Dickson RB. Secretion of an insulin-like growth factor-I-related protein by human breast cancer cells. *Cancer Res* 1986;46:4613-9.
- Koufos A, Hansen MF, Copeland NG, Jenkins NA, Lampkin BC, Cavenee WK. Loss of heterozygosity in three embryonal tumours suggests a common pathogenetic mechanism. *Nature* 1985;316:330-4.
- Huff KK, Knabbe C, Lindsey R, Kaufman D, Bronzert D, Lippman ME, et al. Multihormonal regulation of insulin-like growth factor-I-related protein in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 1988;2:200-8.
- Rajaram S, Baylink DJ, Mohan S. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr Rev* 1997;18:801-31.
- Shimasaki S, Ling N. Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 and -6). *Progress Growth Factor Res* 1991;3:243-66.
- Oh Y, Muller HL, Lamson G, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factor (IGF)-independent action of IGF-binding protein-3 in Hs578T human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1993;268:14964-71.
- Oh Y. IGFBPs and neoplastic models: new concept for roles of IGFBPs in regulation of cancer cell growth. *Endocrine* 1997;7:111-3.
- Oh Y, Muller HL, Ng L, Rosenfeld RG. Transforming growth factor- $\beta$ -induced cell growth inhibition in human breast cancer cells is mediated through insulin-like growth factor-binding protein-3 action. *J Biol Chem* 1995;270:13589-92.
- Gucev ZS, Oh Y, Kelly KM, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factor binding protein 3 mediates retinoic acid and transforming growth factor  $\beta$ 2-induced growth inhibition in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1996;56:1545-50.
- Huynh H, Yang X, Pollak M. Estradiol and antiestrogens regulate a growth inhibitory insulin-like growth factor binding protein 3 autocrine loop in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1996;271:1016-21.
- Colston KW, Perks CM, Xie SP, Holly JM. Growth inhibition of both MCF-7 and Hs578T human breast cancer cell lines by vitamin D analogues is associated with increased expression of insulin-like growth factor binding protein-3. *J Mol Endocrinol* 1998;20:157-62.
- Rozen F, Zhang J, Pollak M. Antiproliferative action of tumor necrosis factor on MCF-7 breast cancer cells is associated with increased insulin-like growth factor binding protein-3 accumulation. *Int J Oncol* 1998;13:865-9.
- Buckbinder L, Talbott R, Velasco-Miguel S, Takenaka I, Faha B, Seizinger BR, et al. Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature* 1995;377:646-9.
- Mochizuki S, Shimoda M, Shiomi T, Fujii Y, Okada Y. ADAM28 is activated by MMP-7(matrilysin-1) and cleaves insulin-like growth factor binding protein-3. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;315:79-84.
- Kübler B, Cowell S, Zapf J, Bräulke T. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins by a novel 50-kilodalton metalloproteinase in human pregnancy serum. *Endocrinology* 1998;139:1556-63.
- Kim HS, Ingermann AR, Tsubaki J, Twigg SM, Walker GE, Oh Y. Insulin-like growth factor-binding protein 3 induces caspase-dependent apoptosis through a death receptor-mediated pathway in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 2004;64:2229-37.
- Butt AJ, Firth SM, King MA, Baxter RC. Insulin-like growth factor-binding protein-3 modulates expression of Bax and Bcl-2 and potentiates p53-independent radiation-induced apoptosis in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 2000;275:39174-81.
- Knudson AG Jr, Hethcote HW, Brown BW. Mutation and childhood cancer: a probabilistic model for the incidence of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:5116-20.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53

- mutation in human cancers. *Science* 1991;253:49-53.
- 27) Hankinson SE, Willett WC, Colditz GA, Hunter DJ, Michaud DS, Deroo B, et al. Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet* 1998;351:1393-6.
- 28) Pratt SE, Pollak MN. Estrogen and antiestrogen modulation of MCF-7 human breast cancer cell proliferation is associated with specific alterations in accumulation of insulin-like growth factor-binding proteins in conditioned media. *Cancer Res* 1993;53:5193-8.
- 29) Mohan S, Bautista CM, Wergedal J, Baylink DJ. Isolation of an inhibitory insulin-like growth factor(IGF) binding protein from bone cell-conditioned medium : a potential local regulator of IGF action. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:8338-42.
- 30) Thiery J, Abouzahr S, Dorothee G, Jalil A, Richon C, Vergnon I, et al. p53 Potentiation of tumor cell susceptibility to CTL involves Fas and mitochondrial pathways. *J Immunol* 2005;174:871-8.