

# 폐암세포주에서 Heme Oxygenase-1의 억제가 Cisplatin의 항암제 감수성에 미치는 영향<sup>‡</sup>

원광대학교 의과대학 내과학교실, 원광대학교 병원운영 군산의료원 병리과<sup>1</sup>

김소영, 김은정, 장혜연, 황기은, 박정현, 김휘정, 조향정<sup>1</sup>, 양세훈, 정은택, 김학렬

## The Effect of Inhibition of Heme Oxygenase-1 on Chemosensitivity of Cisplatin in Lung Cancer Cells

So-Young Kim, M.D., Eun-Jung Kim, M.S., Hye-Yeon Jang, B.S., Ki-Eun Hwang, M.D., Jung-Hyun Park, M.D., Hwi-Jung Kim, M.D., Hyang-Jeong Jo, M.D.<sup>1</sup>, Sei-Hoon Yang, M.D., Eun-Taik Jeong, M.D., and Hak-Ryul Kim, M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine Wonkwang University, Iksan, Korea <sup>1</sup>Department of Pathology Kunsan Medical Center of Wonkwang University Hospital, Kunsan, Korea

**Background:** Heme oxygenase-1 (HO-1) is known to modulates the cellular functions, including cell proliferation and apoptosis. It is known that a high level of HO-1 expression is found in many tumors, and HO-1 plays an important role in rapid tumor growth on account of its antioxidant and antiapoptotic effects. Cisplatin is a widely used anti-cancer agent for the treatment of lung cancer. However, the development of resistance to cisplatin is a major obstacle to its use in clinical treatment. We previously demonstrated that inhibiting HO-1 expression through the transcriptional activation of Nrf2 induces apoptosis in A549 cells. The aim of this study was to determine of the inhibiting HO-1 enhance the chemosensitivity of A549 cells to cisplatin.

**Materials and Methods:** The human lung cancer cell line, A549, was treated cisplatin, and the cell viability was measured by a MTT assay. The change in HO-1, Nrf2, and MAPK expression after the cisplatin treatment was examined by Western blotting. HO-1 inhibition was suppressed by ZnPP, which is a specific pharmacologic inhibitor of HO activity, and small interfering RNA (siRNA). Flow cytometry analysis and Western blot were performed in to determine the level of apoptosis. The level of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) generation was monitored fluoimetrically using 2',7'-dichloro-fluorescein diacetate.

**Results:** The A549 cells showed more resistance to the cisplatin treatment than the other cell lines examined, whereas cisplatin increased the expression of HO-1 and Nrf2, as well as the phosphorylation of MAPK in a time-dependent fashion. Inhibitors of the MAPK pathway blocked the induction of HO-1 and Nrf2 by the cisplatin treatment in A549 cells. In addition, the cisplatin-treated A549 cells transfected with either the HO-1 small interfering RNA (siRNA) or ZnPP, specific HO-1 inhibitor, showed in a more significantly decrease in viability than the cisplatin-only-treated group. The combination treatment of ZnPP and cisplatin caused in a marked increase in the ROS generation and a decrease in the HO-1 expression.

**Conclusion:** Cisplatin increases the expression of HO-1, probably through the MAPK-Nrf2 pathway, and the inhibition of HO-1 enhances the chemosensitivity of A549 cells to cisplatin. (*Tuberc Respir Dis 2007; 62: 33-42*)

**Key words:** Heme oxygenase-1, Cisplatin, Lung Cancer.

## 서 론

항산화반응과 Phase II 항독소 효소에 관련된 유전자의 발현은 각각의 유전자 promoter에서 발견되는 특이한 염기서열인 antioxidant response element (ARE)에 의해서 전사단계가 조절되어진다. ARE에 의해서 조절되는 주요효소로는 heme oxygenase 1 (HO-1), NAD(P)H:quinine oxidoreductase-1 (NQO1),

<sup>‡</sup> 본 연구는 2004년도 원광대학교 교내 연구비 지원에 의해 이루어짐

Address for correspondence: **Hak-Ryul Kim, M.D.**  
Department of Internal Medicine, Wonkwang University Hospital, 344-2 Shinyong-dong, Iksan, Jeonbuk, 570-711, Korea.

Phone: 063-850-1328 Fax: 063-855-2025

E-mail: kshryj@wonkwang.ac.kr

Received: Aug. 23. 2006

Accepted: Oct. 18. 2006

glutathione S-transferase (GST),  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS), thioredoxin reductase-1, thioredoxin 등이 있다<sup>1</sup>. 이러한 ARE를 통한 전사의 활성화는 주로 basic region-leucine zipper (bZIP) 구조를 공유하는 NF-E2-related factor 2 (Nrf2)에 의해 조절되어 진다<sup>2,3</sup>. 또한 Nrf2와 ARE 신호전달계의 상위단계 조절 요인으로는 MAP kinase, protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase 등이 중요하게 대두되고 있다<sup>4</sup>. 실제로 활성산소종을 생성하는 여러 약제나 항생제들에 유도된 화학적 스트레스는 MAPK 신호전달계의 활성화를 초래하고, 이어서 스트레스성 효소들 뿐 아니라 Phase II 항독소 효소들을 포함한 Nrf2-Maf-defendant ARE 유전자들의 활성화가 발생하여 생체방어 기능을 갖거나 세포성장이나 세포고사를 조절하는 것으로 보고되고 있다<sup>5,6</sup>.

HO-1은 HSP계의 한 종류로 저산소상태<sup>7</sup>, UV 방사선<sup>8</sup>, 카드뮴, 납, 수은과 같은 중금속이나<sup>9,10</sup>, 활성산소종<sup>11,12</sup> 등의 다양한 스트레스성 자극에 반응하여 생체방어 기능을 갖는 것으로 알려져 있다. 또한 세포성장이나 세포고사를 조절하여<sup>13-16</sup>, 실제 HO-1 억제제를 투여했을 때 암성장이 억제됨이 보고되었고<sup>8,17-19</sup>, 이러한 기전은 ARE인 Nrf2에 의한 전사의 활성을 통해 유도되는 것으로 알려져 있다<sup>3</sup>.

Cisplatin은 지난 30여년 동안 다양한 고형암들의 치료에 광범위하게 사용되는 항암제 중의 하나이다<sup>20</sup>. 진행성 비소세포 폐암환자에 대해 1990년대부터 개발된 새로운 항암제들의 발전이 있어 왔으나, 현재까지도 cisplatin을 근간으로 하는 항암화학요법이 표준치료로 여겨지고 있다. 그러나 이러한 치료노력에도 불구하고 생존율의 향상은 미미하여 새로운 약제의 개발이나 약제 내성을 극복하기 위한 치료방법의 도입이 요구되고 있다.

저자들은 A549 폐암세포주에서 HO-1의 발현이 증가되었고 HO-1 활성억제제인 ZnPP나 siRNA를 이용한 knock-down 방법으로 생존율의 의미 있는 감소와 세포 내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성의 증가를 통해 세포고사가 유도됨을 보고한 바 있다<sup>21</sup>. 이 연구의 목적은 A549 폐암세포주에서 cisplatin 처리시 HO-1발현의 증가유무와 기전을 규명하고, 실제 HO-1 억제제 cisplatin에 의한 항암제 감수성을 증가시키는지 알아보는데 있다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

A549(선암), NCI-H23(선암), NCI-H157(편평상피암), NCI-H460(대세포암)은 사람의 폐암조직에서 얻은 세포주로서 한국 세포주 은행(Korean cell line bank, 서울대학교)으로부터 분양 받아 계대배양 하면서 실험을 실시하였다. 실험에 필요한 RPMI 1640, 항생제, trypsin 및 우태아 혈청(fetal bovine serum: FBS)은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)에서, ZnPP는 Porphyrin Products사(Logan, UT, USA) 제품을 구입하였다. Cisplatin, methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl, tetrazolium bromide (MTT), PD098059, SB203580, SP600125는 Sigma사(St. Louis, USA)에서, H<sub>2</sub>DCF-DA는 Molecular Probes사(Leiden, Netherlands) 제품을 사용하였다. Phospho-ERK1/2, phospho-p38, phospho-JNK에 대한 단클론 항체들은 Santa Cruz사(CA, USA), anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase와 enhanced chemiluminescence kit (ECL kit)는 Amersham사(Buckinghamshire, UK)에서 구입하였다.

### 2. 방 법

#### 1) 세포배양 및 시약처리

세포배양은 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 10% 우태아 혈청이 포함된 RPMI 1640 (GIBCO BRL, UK) 배양액으로 배양하였으며, 24시간 간격으로 배양액을 교체하여 log phase에 있는 세포에 cisplatin을 각각 농도별로 처리한 후에 48시간 후에 세포 생존율을 관찰하였다.

#### 2) 세포 생존율 측정

폐암세포주들의 각각의 세포수는 5X10<sup>4</sup>/mL 정도로 세포 배양판(24-well plate)에 1mL씩 분주하여 12시간이상 CO<sub>2</sub> 세포배양기 안에서 안정시킨 후, 실험에 필요한 시약을 처리한 다음, MTT 용액(5mg/ml)을 배양액 최종부피의 1/10이 되게 첨가하였다. 4시간 후 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 formazan의

검출은 MTT가 들어있는 배양액을 모두 버리고 DMSO 500ml를 넣어 충분히 녹인 후 96 well plate에 100ml를 넣고 분광광도계(ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, USA)를 이용하여 595nm파장에서 흡광도를 측정하였다.

### 3) Western blotting

세포를 포집하여 차가운 Hank's balanced salt solution (HBSS, pH 7.4)으로 2회 세척 후, 얻어진 세포는 파쇄용액(50mM HEPES pH 7.4, 150mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1μg/ml aprotinin)과 4°C에서 30분간 반응시켰다. 세포 파쇄액은 13,000rpm에서 20분간 원심분리 한 후 상층액을 BCA 용액을 이용하여 단백질을 정량하였다. 동량의 세포 파쇄액(단백질: 200μg)은 2×sample buffer와 혼합하여 100°C에서 5분간 가열한 후 12.5% SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 semi-dry 방법으로 실온에서 단위 면적당 0.8mA를 2시간 동안 부하시켜 nitrocellulose membrane상에 이동시켰다. Nitrocellulose membrane은 blocking buffer (5% skim milk)와 상온에서 1시간 반응시켜 비특이적 항체결합을 예방하였다. 일차항체는 0.01%(v/v)의 Tween-20이 포함된 3% skim milk/TBS에 1:1000으로 희석하여 상온에서 3시간 반응 후 이차항체인 anti-mouse IgG conjugated horseradish peroxidase와 1시간 반응하였다. Nitrocellulose membrane은 TBS로 3번 세척한 후 ECL kit를 사용하여 ECL 필름에 노출하였다.

### 4) 핵과 세포질 분획의 분리

시약 처리된 세포를 포집하여 PBS로 4°C, 1,000g에서 5분간 원심분리 하였고, 얻어진 세포는 200μl lysis buffer (10mM HEPES, pH 7.9, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 0.5mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5mM dithiothreitol)와 15분 동안 반응시켰다. 다음으로 10% NP-40 10μl을 추가하고 4°C, 13,000g에서 1분간 원심분리 한 후 상층액은 세포질 분획으로 사용하기 위해 80°C에서 저장하였다. 또한 침사물은 extraction buffer (5mM HEPES, pH 7.9, 1.5mM

MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.2mM EDTA, 0.5mM dithiothreitol, glycerol 25% vol/vol)에 혼합하여 4°C에서 30분간 반응시킨 후 핵 분획을 얻기 위해 4°C, 13,000g에서 30분간 원심분리 하였다. 이후의 과정은 상술된 Western blotting 방법을 이용하였다.

### 5) 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성 측정

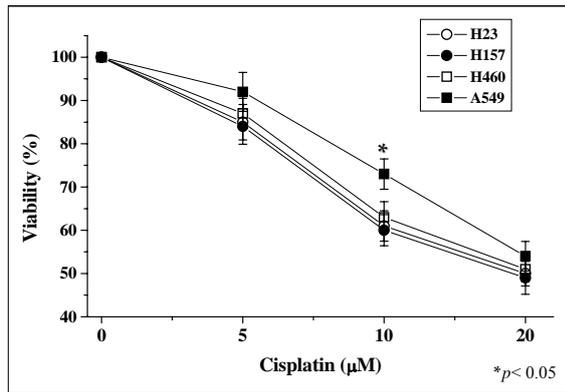
세포 내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 생성은 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Eastman Kodak, NY, U.S.A)를 이용한 방법으로, 산화체가 존재하면 DCFH가 강한 형광물질인 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)로 전환된다. 시약처리된 세포는 phenol red가 없는 RPMI 배양액으로 3회 세척하고 여기에 1ml의 동일 배양액을 넣고 10μM의 DCF-DA와 1시간동안 반응시킨 후 PBS로 세척하여 FACS Vantage flow cytometer를 이용하여 ROS의 생성을 측정하였고, 정보의 분석은 Cell Quest software (Becton Dickinson)을 이용하였다.

### 6) HO-1 small interfering RNA (siRNA) 주입

HO-1의 억제 효과를 관찰하기 위해 HO-1 mRNA 612-630염기서열을 표적으로 하는 21-nucleotide duplex small interfering RNA (siRNA)를 이용하여 특이적으로 억제하였다. 이용된 ribonucleotide의 순서는 5'-rGACUGCGUCCUGCUCAACdTdT-3'와 5'-rGUUGAGCAGGAACGCAGUCdTdT-3' (Roche 사, Germany)였다. A549세포를 세포 배양판(6-well plate)에 각각 분주한 후 12시간 동안 배양하여 well 전체바닥의 30-50%의 면적을 차지하도록 하였다. 그리고 LipofectAMINE 2000 (Introgen, Carlsbad, CA)을 이용하여 제조회사에서 제공하는 방법에 따라서 각 well당 2μg siRNA를 세포에 주입하였다. Silencer Negative Control siRNA (Roche, Germany)는 음성 대조 군으로 사용되었고 같은 방법으로 세포에 주입하였다.

### 7) 결과 산출 방법

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이며



**Figure 1.** Sensitivity to cisplatin in A549 cells. It was revealed that A549 cells had more significantly resistance to cisplatin treatment than other cell lines in a dose-dependent manner, especially 10 μM concentration. The data represent the mean±S.D. of triplicate. \*,  $p < 0.05$ .

이들의 평균(mean)과 표준편차(standard deviation, S.D.)를 산출하여 표시하였다. 실험결과의 통계처리는 Student's t-test에 준하여 처리하였다.

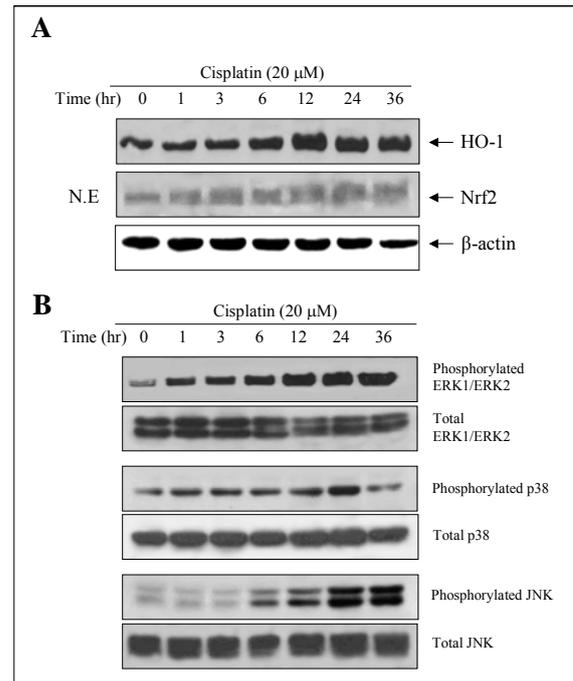
## 결 과

### 1. Cisplatin 처리 후 폐암세포주의 생존율 변화

A549, NCI-H23, NCI-H157, NCI-H460 폐암세포주에서 HO-1 활성억제제인 cisplatin의 농도별 변화에 의한 생존율의 차이를 알아보기 위해 24시간 후에 생존율을 MTT 방법으로 측정하였다. 생존율의 결과는 5μM일 때 NCI-H23, NCI-H157, NCI-H460 세포주에서 각각 85.3%, 84.7%, 87.0%인데 비해 A549 세포주에서 92.3%였고, 10μM일 때 각각 61.1%, 60.5%, 63.7%인데 비해 73.5%로서 A549 세포주가 다른 폐암세포주에 비해 cisplatin에 대하여 의의 있게 내성이 있음을 확인하였다 (Figure 1).

### 2. Cisplatin 처리 후 A549 세포에서 HO-1과 Nrf2의 발현에 미치는 영향

이전 연구에서 비처리 상태에서 A549세포가 다른



**Figure 2.** Expression of HO-1, Nrf2, and MAPK after treatment with cisplatin. (A) Cisplatin resulted in a marked increase in the expression of HO-1 proteins in a time-dependent fashion with the same kinetics. It attained its peak at 12 h, and sustained in cells treated with cisplatin. Western blot was also performed to ascertain whether Nrf2 was expressed or not in A549 cells. Cisplatin resulted in a increase in the expression of Nrf2 proteins in nucleic fraction in a time-dependent fashion. (B) Activation of MAPK was evaluated by Western analysis using phospho-specific antibodies to ERK1/ERK2, p38, JNK. Cisplatin resulted in a increase in the expression of phosphorylated MAPKs proteins in a time-dependent fashion.

세포주에 비해 HO-1의 발현이 증가되었고 HO-1의 활성억제제인 ZnPP를 처리하였을 때 생존율이 의미 있게 감소함을 증명하였다<sup>21</sup>. 따라서 대표적인 활성산소종 생성 항암제인 cisplatin 처리시에 HO-1과 그것의 ARE 조절효소인 Nrf2 단백질들의 발현양상을 확인하였다. 결과를 보면 내인성 상태에서 발현된 HO-1이 시간 의존적으로 증가하였고, 특히 12시간째 가장 증가된 양상을 보였다. A549세포의 세포질과 핵을 분리한 후, 핵 분획에서 cisplatin 처리 후 Nrf2의 발현양상을 보면 역시 내인성 상태에서 발현된 Nrf2가 시간 의존적으로 증가함을 확인하였다 (Figure 2A).

### 3. Cisplatin 처리 후 A549 세포에서 MAPK의 활성화에 미치는 영향

Cisplatin 처리시 MAPK 신호전달계의 활성을 통한 세포고사 기전이 알려져 있고<sup>22</sup>, 또한 ARE의 전사 조절인자인 Nrf2의 활성을 유도하는 것으로 보고되고 있다<sup>23</sup>. 따라서 A549 세포에서 cisplatin 처리가 MAPK 신호전달계에 영향을 미쳤는지 알아보기 위해 ERK1/2, p38, JNK 단백질의 발현정도를 확인하였다. 결과를 보면 cisplatin 처리 후에 ERK1/2, p38, JNK 단백질은 일정한데 비해 각각의 인산화 된 단백질은 시간 의존적으로 증가하여 활성화되었음을 알 수 있었다 (Figure 2B).

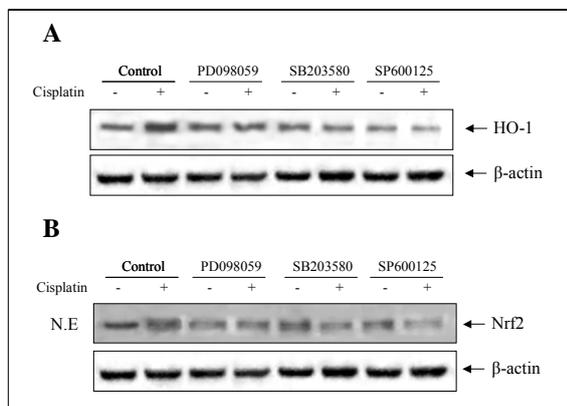
### 4. Cisplatin에 의해 유도된 HO-1과 Nrf2의 발현에 대한 MAPK 억제제들의 효과

앞선 결과에서 cisplatin 처리시 시간 의존적으로 HO-1과 MAPK 활성의 증가를 확인하였고, 이러한 HO-1의 유도에 MAPK 신호전달계가 직접 관여했는지 알아보기 위해 ERK 경로의 특이 MEK1 억제제

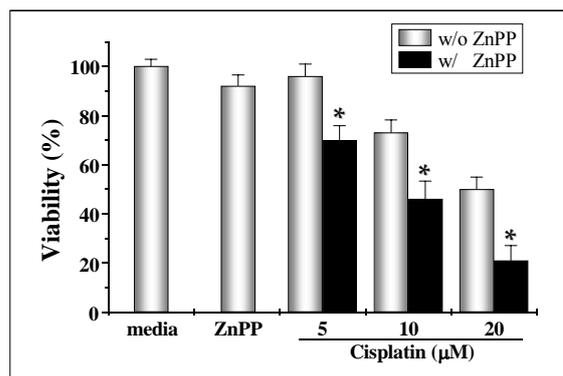
인 PD098059, p38의 선택적 화학억제제인 SB203580, 그리고 JNK의 특이 억제제인 SP600125를 30분 전 처리한 후 cisplatin으로 처리시 가장 발현이 증가하였던 12시간 후에 HO-1의 결과를 확인하였다. 결과를 보면 cisplatin 처리 후 2배 이상 증가된 HO-1의 발현이 ERK와 p38의 억제제들을 전 처리하였을 경우 50% 정도의 발현억제효과를 보였고, 특히 JNK 억제제의 경우 75%의 억제효과를 확인하였다 (Figure 3A). 다음으로 Cisplatin 처리시 시간 의존적으로 증가된 Nrf2의 발현에 MAPK 신호전달계가 직접 관여했는지 알아보기 위해 MAPK 억제제들을 각각 30분 전 처리한 후 핵을 분리하고 나서 Nrf2의 발현을 확인하였다. 결과를 보면 내인성 상태에서 발현된 Nrf2가 cisplatin 처리 후에 1.8배까지 증가하였고, MAPK 억제제들을 전 처리 하였을 경우 약 50% 정도의 Nrf2의 발현억제효과를 보였다 (Figure 3B). 이상의 결과는 Nrf2-HO-1 신호전달체계의 상위단계에 MAPK 경로가 관여함을 알 수 있었다.

### 5. Cisplatin과 ZnPP의 병합요법이 A549 세포의 생존율에 미치는 영향

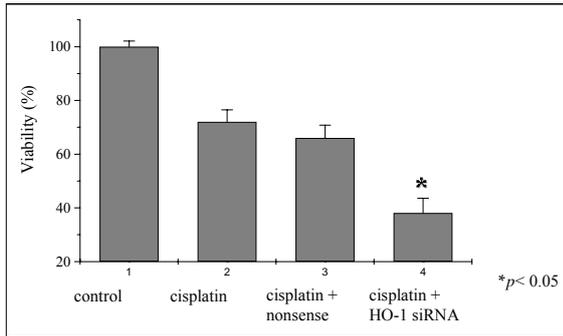
Cisplatin 처리 후 증가된 HO-1을 억제하였을 때 그것의 항암제 감수성을 증가시키는지 여부를 알아보



**Figure 3.** Effects of MEK1 inhibitor PD098059, p38 MAPK inhibitor SB203580, and JNK inhibitor SP600125 on cisplatin-induced HO-1 and Nrf2 expression. (A) Cisplatin resulted in an over twofold increase in HO-1 expression compared with the control, and MAPKs inhibitors decreased cisplatin-induced HO-1 expression from 50% to about 75%. (B) Under the same experimental conditions, cisplatin resulted in an 1.8 folds increase in HO-1 expression compared with the control, and MAPKs inhibitors decreased cisplatin-induced HO-1 expression of about 50%.



**Figure 4.** Sensitivity to ZnPP, a specific pharmacologic inhibitor of HO activity, in cisplatin-induced cytotoxicity. In contrast to ZnPP or various concentrations of cisplatin alone, combination of 10 μM ZnPP with varying doses of cisplatin from 5 to 20 μM resulted in a significant decrease of the viability of A549 cells in a dose-dependent fashion. The data represent the mean±S.D. of triplicate. \*, p<0.05.



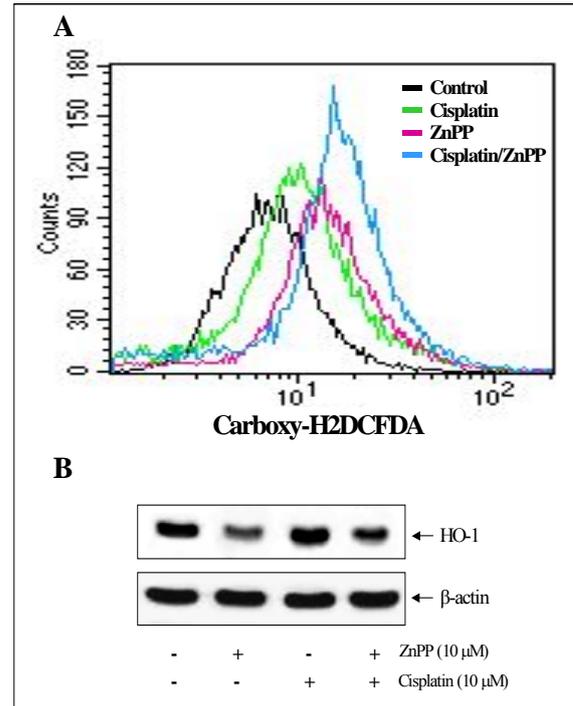
**Figure 5.** Sensitivity to HO-1 siRNA transfection in cisplatin-induced cytotoxicity. In contrast to cisplatin alone or combination with nonsense and cisplatin, combination with HO-1 siRNA and cisplatin resulted in a significant decrease in cell viability (62% of control cells). The data represent the mean±S.D. of triplicate. \*,  $p < 0.05$ .

기 위해 먼저 HO-1의 활성억제제인 ZnPP와 cisplatin을 단독, 또는 병합처리 한 후 MTT방법을 통해 생존율을 확인하였다. 24시간 후의 결과를 확인하였을 때, ZnPP 10 $\mu$ M일 때 92.5%, cisplatin 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M의 단독처리 군이 각각 96%, 73%, 49%인데 비하여 이들을 병합처리 한 군에서는 각각 67%, 50%, 21%로 각각 의의 있는 생존율의 감소를 보였다 (Figure 4).

### 6. HO-1 siRNA를 주입한 A549 세포에서 cisplatin 처리시 생존율 변화

HO-1의 활성억제제인 ZnPP의 효과를 HO-1 siRNA를 이용하여 HO-1 mRNA를 억제시킨 후 cisplatin의 처리효과를 확인하였다. 먼저 HO-1 siRNA를 리포솜을 이용하여 A549 세포주에 운반시킨 후 24시간 후에 cisplatin 10 $\mu$ M을 처리한 후 MTT방법을 통해 생존율을 확인하였다. 결과를 보면 비처리 군과 nonsense siRNA를 주입시킨 음성대조 군에서는 cisplatin 처리시 각각 28%, 34%의 생존율 감소를 보인데 비해, HO-1 siRNA 처리 군에서는 62%로 의의 있는 생존율의 감소를 보였다 (Figure 5).

### 7. Cisplatin과 ZnPP의 병합요법이 활성산소종(ROS)의 생성과 HO-1의 발현에 미치는 영향



**Figure 6.** Contribution of ROS generation and HO-1 expression to anticancer activity of cisplatin combined with ZnPP in A549 cells. (a) Combination treatment with ZnPP and cisplatin of blue line resulted in a significant increase in the generation of ROS. (b) The expression of HO-1 in endogenous state was markedly increased in cells treated with cisplatin only, whereas combination treatment with ZnPP and cisplatin resulted in a decrease of about 50% of the expression of HO-1.

Cisplatin과 ZnPP 처리시에 각각 세포 내 ROS의 증가기전은 잘 알려져 있다<sup>24,25</sup>. 따라서 ZnPP와 cisplatin의 병합처리에 의한 생존율 감소에 대한 배가효과가 ROS 형성과 관련되는지를 알아보기 위해 carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA방법을 통해 확인하였다. 결과를 보면 cisplatin과 ZnPP 단독처리 군의 세포 내 ROS 생성에 비해 병합처리 군에서 현저한 증가가 관찰되었다 (Fig 6A). 다음으로 ZnPP와 cisplatin의 병합처리에 의한 생존율 감소에 대한 배가효과가 HO-1의 발현억제와 관련되는지를 보기 위해 Western blotting 방법을 통해 확인하였다. 결과를 보면 내인성 상태에서 발현된 HO-1 발현이 cisplatin 처리 후 1.6 배 이상 증가하였고, ZnPP를 병합처리 하였을 경우 50%정도 발현이 감소되었다 (Figure 6B).

## 고 찰

Cisplatin은 암세포의 DNA에 비가역적으로 반응하여 guanine residue 사이에 intra, inter-strand cross-link를 형성하여 복사나 전사에 필요한 두개의 DNA strand의 분리과정을 방해하는 DNA adductor로서의 작용<sup>26</sup>과 활성산소종의 생성으로 다양한 신호전달체계를 통한 세포고사에 의해 세포독성을 나타내는 두가지 항암제 작용기전이 알려져 있다<sup>27</sup>. 또한 cisplatin의 내성기전으로는 platinum의 누적감소나 cisplatin의 비활성화와 같은 cytotoxic platinum-DNA adduct의 형성에 장애가 있거나 platinum-DNA adduct 회복의 증가나 platinum-DNA 손상 내성의 증가와 같은 DNA adduct 형성 이후에 발생하는 세포고사를 방해하는 기전으로 나눌 수 있다<sup>28</sup>.

유도성 효소인 산화 스트레스, 염증반응, 세포고사, 이식거부에 대해 보호기능을 하는 것으로 알려져 있다<sup>29-31</sup>. 최근의 보고들은 HO-1이 가장 빠르게 증식하는 세포인 선암, 간암, 육종, 흑색종, 그리고 상피암세포 등의 다양한 암 세포들에서 광범위한 발현을 보고하고 있다<sup>8,19,32-34</sup>. Fang 등은 HO-1의 활성억제제인 ZnPP를 대장암과 간암에 주입하였을 때 종양의 성장을 의미 있게 억제하여 HO-1이 세포성장, 특히 암세포 증식에 중요한 역할이 있음을 제시하였다<sup>8,35,36</sup>. 저자 등은 이전 보고에서 비처리 상태에서 다른 폐암세포주에 비해 A549세포의 HO-1 발현이 증가되었으며 HO-1 활성억제제인 ZnPP를 처리하였을 때 생존율의 의미 있는 감소와 HO-1 siRNA로 주입시 세포고사가 유도됨을 증명함바 있다<sup>21</sup>. 권 등도 A549 폐암세포에서 Nrf2에 의존적인 HO-1의 과발현이 녹차추출물인 epigallocatechin-3-gallate (EGCG)에 의해 유도된 세포고사에 대한 내성에 기여하는 것으로 보고하였다<sup>37</sup>. 몇몇 암 세포주에서 산화스트레스와 관련된 약제들에 의한 HO-1의 유도가 세포고사에 대한 항암제 내성과 관련된 것으로 알려져 왔고<sup>38-40</sup>, 이러한 HO-1의 억제가 종양의 성장을 억제하고 항암제 감수성을 증가시킨다고 하였다<sup>25,35</sup>. 본 연구에서 대표적인 활성산소종 생성 항암제인 cisplatin 처리에 의해 HO-1과 그것의 전사조절 단백질인 Nrf2가 시간 의존적으로 발현이

증가됨을 확인하여, cisplatin 치료에 대한 A549 세포주에서의 내성기전에 HO-1 단백질의 발현증가가 부분적으로 작용하고 있음을 예상할 수 있었다.

외부의 신호를 세포 내로 전달하는 기작인 mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade는 세포 증식과 분화, 세포사멸과 생존 등의 매우 다양한 과정에 관여하는 효소이며, MAPK에는 extracellular signal regulated kinase (ERK), p38 kinase, c-jun N-terminal kinase (JNK) 등의 종류가 알려져 있다<sup>41</sup>. Nrf2는 basic leucine zipper transcription factor로서 세포질에서 Keap1이라는 억제단백질과 결합하여 비활성화 되어있다가 산화 스트레스 조건 하에 분비되어 핵 내로 이동하여 ARE의 단백질과 결합하여 HO-1을 포함한 표적유전자의 발현을 조절하게 된다. 최근 MAPK가 Nrf2를 핵 내로 이동시켜 여러 DNA 단백질과 결합하도록 인산화 및 안정화에 중요한 역할이 알려져 있고<sup>6</sup>, 또한 cisplatin에 의한 MAPK계의 활성화가 보고되고 있다. Zanke 등<sup>42</sup>은 dominant-negative DNA encoding SEK1을 섬유아세포에 주입하여 JNK 인산화를 억제한 결과 cisplatin의 감수성을 감소시킴을 증명하였고, Sanchez-Perez 등<sup>43</sup>도 cisplatin에 의한 JNK의 지속적인 활성화가 세포사에 밀접한 관계가 있음을 보고하였다. 본 연구에서도 cisplatin 치료에 대해 MAPK인 ERK, p38, JNK 단백질 모두 시간 의존적으로 발현이 증가함을 확인하였다. 또한 MAPK가 직접적으로 Nrf2-HO-1 경로에 영향을 미쳤는지 알아보기 위해 각각의 억제제를 사용하여 발현을 확인한 결과, cisplatin 치료에 의해 유도되었던 HO-1과 Nrf2 단백질들의 발현이 억제된 것을 확인하여 Nrf2-HO-1 경로의 상위단계에 MAPK가 직접 관여함을 알 수 있었다. 실제 이러한 경로에 의해 증가된 HO-1의 발현을 HO-1의 활성억제제인 ZnPP와 HO-1 siRNA를 이용한 억제 방법을 통하여 cisplatin과 병합치료시 cisplatin의 항암제 감수성을 증가시키는지 여부를 확인한 결과 모두 유의 있는 생존율의 감소를 보였고, 이러한 배가효과는 활성산소종의 생성 증가와 HO-1의 발현억제에 의한 결과임을 확인하였다.

Cisplatin이 폐암치료의 표준치료로 이용되고 있으

나 내성발생으로 인해 임상적으로 생존율에 미미한 효과를 보여 치료에 한계를 보이고 있는 상황에서, cisplatin 치료시 증가하는 HO-1의 발현을 ZnPP 등의 활성억제제나 siRNA를 이용한 knock-down 방법으로 HO-1을 표적으로 억제하는 치료법을 통해 cisplatin의 항암제 감수성을 증가시키는 방법은 향후 새로운 표적치료로서의 가능성을 보여줄 것으로 기대된다.

## 요 약

**연구배경:** 다양한 고형암에서 HO-1의 높은 발현이 알려져 있고, 그것의 항산화와 항세포고사의 역할로 인해 빠른 암종의 성장에 중요한 역할이 있음이 보고되고 있다. 대표적인 활성산소종 생성 항암제인 Cisplatin은 현재까지 폐암치료에 가장 광범위하게 사용되고 있으나, 여러 내성발생이 임상치료의 주요문제로 대두되고 있다. 저자들은 A549 폐암세포주에서 HO-1의 발현이 증가되었고 HO-1 활성억제제나 siRNA 방법을 통해 생존율의 의미 있는 감소와 세포고사가 유도됨을 보고한 바 있다. 이 연구의 목적은 A549 폐암세포주에 cisplatin 처리시 HO-1의 발현의 증가유무와 기전을 규명하고 실제 HO-1의 억제가 cisplatin에 의한 항암제 감수성을 증가시키는지 알아보는 데 있다.

**방 법:** 비소세포폐암세포주인 A549, NCI-H23, NCI-H157, NCI-H460을 이용하였다. 세포독성은 MTT 방법으로 구하였고, HO-1, Nrf2, MAPK의 발현은 Western blotting으로 확인하였다. 또한 MAPK억제제들을 전처리한 후 cisplatin에 의해 유도된 Nrf2와 HO-1의 발현에 미치는 영향을 역시 Western blotting으로 관찰하였다. A549세포에 활성억제제인 ZnPP나 HO-1 small interfering RNA (siRNA)을 주입하여 cisplatin과의 병합요법시 생존율의 배가효과 유무를 MTT 방법으로 확인하였고, 이러한 효과가 ROS 형성과 HO-1의 발현변화와 관련되는지를 알아보기 위해 carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA 방법과 Western blotting을 통해 각각 확인하였다.

**결 과:** Cisplatin 처리시 다른 세포주에 비해 A549

세포가 의의 있게 내성을 보였다. 10 $\mu$ M의 농도에서 시간 의존적으로 HO-1, Nrf2, MAPK의 발현이 증가하였고, MAPK 억제제들을 전 처리하였을 때 cisplatin에 의해 유도된 HO-1과 Nrf2의 발현이 억제됨을 확인하였다. HO-1의 활성억제제인 ZnPP와 HO-1 siRNA를 통해 HO-1 mRNA를 직접 억제하는 방법으로 cisplatin과 병합치료시 단독치료에 비해 의의 있는 생존율의 감소를 보였다. 이러한 효과는 활성산소종의 생성 증가와 HO-1의 발현억제에 의한 결과임을 확인하였다.

**결 론:** Cisplatin 처리시 HO-1의 발현은 MAPK-Nrf2-HO-1의 경로를 통해 증가하였고, 부분적으로 치료에 대한 내성과 관련이 있었으며, ZnPP 등의 활성억제제나 siRNA를 통한 knock-down 방법으로 HO-1을 표적으로 억제하는 치료방법을 통해 cisplatin의 항암제 감수성을 증가시켰다.

## 참 고 문 헌

1. Jaiswal AK. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med* 2004;36:1199-207.
2. Huang HC, Nguyen T, Pickett CB. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J Biol Chem* 2002;277:42769-74.
3. Alam J, Stewart D, Touchard C, Boinapally S, Choi AM, Cook JL. Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem* 1999;274:26071-8.
4. Owuor ED, Kong AN. Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol* 2002;64:765-70.
5. Chen C, Yu R, Owuor ED, Kong AN. Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death. *Arch Pharm Res* 2000;23:605-12.
6. Yu R, Chen C, Mo YY, Hebbar V, Owuor ED, Tan TH, et al. Activation of mitogen-activated protein kinase pathways induces antioxidant response element-mediated gene expression via Nrf2-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2000;275:39907-13.
7. Motterlini R, Foresti R, Bassi R, Calabrese V, Clark JE, Green CJ. Endothelial heme oxygenase-1 induction by hypoxia: modulation by inducible nitric-oxide

- synthase and S-nitrosothiols. *J Biol Chem* 2000; 275:13613-20.
8. Doi K, Akaike T, Fujii S, Tanaka S, Ikebe N, Beppu T, et al. Induction of haem oxygenase-1 nitric oxide and ischaemia in experimental solid tumours and implications for tumour growth. *Br J Cancer* 1999; 80:1945-54.
  9. Elbirt KK, Whitmarsh AJ, Davis RJ, Bonkovsky HL. Mechanism of sodium arsenite-mediated induction of heme oxygenase-1 in hepatoma cells: role of mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 1998;273: 8922-31.
  10. Eyssen-Hernandez R, Ladoux A, Frelin C. Differential regulation of cardiac heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor mRNA expressions by hemin, heavy metals, heat shock and anoxia. *FEBS Lett* 1996;382:229-33.
  11. Keyse SM, Tyrrell RM. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:99-103.
  12. Lautier D, Luscher P, Tyrrell RM. Endogenous glutathione levels modulate both constitutive and UVA radiation/hydrogen peroxide inducible expression of the human heme oxygenase gene. *Carcinogenesis* 1992;13:227-32.
  13. Wagner M, Cadetg P, Ruf R, Mazzucchelli L, Ferrari P, Redaelli CA. Heme oxygenase-1 attenuates ischemia/reperfusion-induced apoptosis and improves survival in rat renal allografts. *Kidney Int* 2003; 63:1564-73.
  14. Choi BM, Pae HO, Chung HT. Nitric oxide priming protects nitric oxide-mediated apoptosis via heme oxygenase-1 induction. *Free Radic Biol Med* 2003; 34:1136-45.
  15. Amon M, Menger MD, Vollmar B. Heme oxygenase and nitric oxide synthase mediate cooling-associated protection against TNF-alpha-induced microcirculatory dysfunction and apoptotic cell death. *FASEB J* 2003;17:175-85.
  16. Ke B, Shen XD, Zhai Y, Gao F, Busuttill RW, Volk HD, et al. Heme oxygenase 1 mediates the immunomodulatory and antiapoptotic effects of interleukin 13 gene therapy in vivo and in vitro. *Hum Gene Ther* 2002;13:1845-57.
  17. Goodman AI, Choudhury M, da Silva JL, Schwartzman ML, Abraham NG. Overexpression of the heme oxygenase gene in renal cell carcinoma. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997;214:54-61.
  18. Maines MD, Abrahamsson PA. Expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in human prostate: normal, hyperplastic, and tumor tissue distribution. *Urology* 1996;47:727-33.
  19. Sahoo SK, Sawa T, Fang J, Tanaka S, Miyamoto Y, Akaike T, et al. Pegylated zinc protoporphyrin: a water-soluble heme oxygenase inhibitor with tumor-targeting capacity. *Bioconjug Chem* 2002;13:1031-8.
  20. Fram RJ. Cisplatin and platinum analogues: recent advances. *Curr Opin Oncol* 1992;4:1073-9.
  21. Jung JH, Kim HR, Kim EJ, Hwang KE, Kim SY, Park JH, et al. The role of heme oxygenase-1 in lung cancer cells. *Tuberc Respir Dis* 2006;60:304-13.
  22. Wang G, Reed E, Li QQ. Molecular basis of cellular response to cisplatin chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2004;12:955-65.
  23. So HS, Kim HJ, Lee JH, Lee JH, Park SY, Park C, et al. Flunarizine induces Nrf2-mediated transcriptional activation of heme oxygenase-1 in protection of auditory cells from cisplatin. *Cell Death Differ* 2006;13:1763-75.
  24. Kim HJ, So HS, Lee JH, Lee JH, Park C, Park SY, et al. Heme oxygenase-1 attenuates the cisplatin-induced apoptosis of auditory cells via down-regulation of reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol Med* 2006;40:1810-9.
  25. Fang J, Sawa T, Akaike T, Greish K, Maeda H. Enhancement of chemotherapeutic response of tumor cells by a heme oxygenase inhibitor, pegylated zinc protoporphyrin. *Int J Cancer* 2004;109:1-8.
  26. Eastman A. The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacol Ther* 1987;34:155-66.
  27. Sorenson CM, Eastman A. Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. *Cancer Res* 1988;48:4484-8.
  28. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003;22: 7265-79.
  29. Pae HO, Oh GS, Choi BM, Chae SC, Kim YM, Chung KR, et al. Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production. *J Immunol* 2004;172:4744-51.
  30. Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, et al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 2000;6:422-8.
  31. Berberat PO, Katori M, Kaczmarek E, Anselmo D, Lassman C, Ke B, et al. Heavy chain ferritin acts as an antiapoptotic gene that protects livers from ischemia reperfusion injury. *FASEB J* 2003;17:1724-6.
  32. Tsuji MH, Yanagawa T, Iwasa S, Tabuchi K, Onizawa K, Bannai S, et al. Heme oxygenase-1 expression in

- oral squamous cell carcinoma as involved in lymph node metastasis. *Cancer Lett* 1999;138:53-9.
33. Deininger MH, Meyermann R, Trautmann K, Duffner F, Grote EH, Wickboldt J, et al. Heme oxygenase (HO)-1 expressing macrophages/microglial cells accumulate during oligodendroglioma progression. *Brain Res* 2000;882:1-8.
  34. Torisu-Itakura H, Furue M, Kuwano M, Ono M. Co-expression of thymidine phosphorylase and heme oxygenase-1 in macrophages in human malignant vertical growth melanomas. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91:906-10.
  35. Fang J, Sawa T, Akaike T, Akuta T, Sahoo SK, Khaled G, et al. In vivo antitumor activity of pegylated zinc protoporphyrin: targeted inhibition of heme oxygenase in solid tumor. *Cancer Res* 2003; 63: 3567-74.
  36. Fang J, Akaike T, Maeda H. Antiapoptotic role of heme oxygenase (HO) and the potential of HO as a target in anticancer treatment. *Apoptosis* 2004;9: 27-35.
  37. Kweon MH, Adhami VM, Lee JS, Mukhtar H. Constitutive overexpression of Nrf2-dependent heme oxygenase-1 in A549 cells contributes to resistance to apoptosis induced by EGCG. *J Biol Chem* 2006. (In press)
  38. Nowis D, Legat M, Grzela T, Niderla J, Wilczek E, Wilczynski GM, et al. Heme oxygenase-1 protects tumor cells against photodynamic therapy-mediated cytotoxicity. *Oncogene* 2006;25:3365-74.
  39. Tanaka S, Akaike T, Fang J, Beppu T, Ogawa M, Tamura F, et al. Antiapoptotic effect of haem oxygenase-1 induced by nitric oxide in experimental solid tumour. *Br J Cancer* 2003;88:902-9.
  40. Sasaki T, Yoshida K, Kondo H, Ohmori H, Kuniyasu H. Heme oxygenase-1 accelerates protumoral effects of nitric oxide in cancer cells. *Virchows Arch* 2005;446: 525-31.
  41. Barr RK, Bogoyevitch MA. The c-Jun N-terminal protein kinase family of mitogen-activated protein kinases (JNK MAPKs). *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33:1047-63.
  42. Zanke BW, Boudreau K, Rubie E, Winnett E, Tibbles LA, Zon L, et al. The stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cis-platinum, UV irradiation or heat. *Curr Biol* 1996;6:606-13.
  43. Sanchez-Perez I, Murguia JR, Perona R. Cisplatin induces a persistent activation of JNK that is related to cell death. *Oncogene* 1998;16:533-40.
-