

인체 전립선 상피세포에서 HDAC 저해제 trichostatin A의 caspase 및 NF- κ B의 활성화를 통한 apoptosis 유도

박철 · 김성윤¹ · 최병태² · 이원호 · 최영현^{1*}

부산대학교 자연과학대학 생물학과, ²한의학전문대학원 해부학교실

¹동의대학교 한의과대학 생화학교실 및 동의대학교 대학원 바이오물질제어학과(BK21)

Received January 19, 2008 / Accepted February 20, 2008

Induction of Apoptosis by HDAC Inhibitor Trichostatin A through Activation of Caspases and NF- κ B in Human Prostate Epithelial Cells. Cheol Park, Cheng-Yun Jin¹, Byung Tae Choi², Won Ho Lee and Yung Hyun Choi^{1*}. Department of Biological Sciences, ²Department of Anatomy, Graduate School of Oriental Medicine, Pusan National University, Busan 609-735, Korea; ¹Department of Biochemistry, Donggeui University College of Oriental Medicine and Department of Biomaterial Control (BK21 Program), Donggeui University Graduate School, Busan 614-052, Korea - Histone deacetylases (HDACs) inhibitors have emerged as the accessory therapeutic agents for various human cancers, since they can block the activity of specific HDACs, restore the expression of some tumor suppressor genes and induce cell differentiation, cell cycle arrest and apoptosis *in vitro* and *in vivo*. In the present study, we investigated that the effect of trichostatin A (TSA), an HDAC inhibitor, on the cell growth and apoptosis, and its effect on the nuclear factor-kappaB (NF- κ B) activity in 267B1 human prostate epithelial cells. Exposure of 267B1 cells to TSA resulted in growth inhibition and apoptosis induction in and dose-dependent manners as measured by fluorescence microscopy, agarose gel electrophoresis and flow cytometry analysis. TSA treatment inhibited the levels of IAP family members such as c-IAP-1 and c-IAP-2 and induced the proteolytic activation of caspase-3, -8 and -9, which were associated with concomitant degradation of poly (ADP-ribose)-polymerase, β -catenin and laminin B proteins. The increase in apoptosis by TSA was connected with the translocation of NF- κ B from cytosol to nucleus, increase of the DNA binding as well as promoter activity of NF- κ B, and degradation of cytosolic inhibitor of kappaB (I κ B)- α protein. We therefore concluded that TSA demonstrated anti-proliferative and apoptosis-inducing effects on 267B1 cells *in vitro*, and that the activation of caspases and NF- κ B may play important roles in its mechanism of action. Although further studies are needed, these findings provided important insights into the possible molecular mechanisms of the anti-cancer activity of TSA.

Key words : Histone deacetylases inhibitor, 267B1, apoptosis, caspase, nuclear factor-kappaB

서 론

Histone deacetylases (HDACs) 저해제 중, *Streptomyces*에서 유래된 trichostatin A (TSA)는 항균제로서 처음 개발된 것이었으나 저농도 처리 조건에서 포유동물 세포 histone 단백질의 acetylation 유도효과가 매우 높았으며, HDAC의 활성 또한 효과적으로 억제하는 것으로 알려진 후 대표적인 HDAC 억제제로 사용되는 물질이다[33]. 현재까지 알려진 HDAC 저해제는 약 20여 가지 이상이 보고되었으며[17], HDAC 저해제의 대부분은 암세포를 포함한 형질 전환된 세포들에서 세포주에 따른 다소 약간의 감수성 차이는 있으나, 세포주기 교란 및 apoptosis 유발과 동물 모델에서 종양 증식억제 효과가 있는 것으로 보고되어지고 있다[2,4,8,16,18,19,21,30,31]. Apoptosis는 개체의 발생이나 항상성 유지 조절에 중요한 역할을 하는 정상적인 생리학적 현상이다. 최근

apoptosis 조절에는 많은 유전자들이 관여하고 있으며, 이들 유전자 산물들의 기능과 특징을 조사함으로써 apoptosis 현상의 분자생물학적 설명이 가능해 지고 있다. 따라서 효과적인 암의 치료와 예방에 있어서 비정상적인 세포나 암세포의 apoptosis 유발은 많은 치료제의 표적이 되고 있다[3]. Apoptosis는 세포주기 교란 의존적 및 비의존적으로 일어날 수 있으며[7], apoptosis의 현상으로 세포질 및 염색질 응축, 세포막 수포화 현상, DNA 단편화 등이 수반되는데 이러한 현상은 세포내부의 정교한 신호전달에 의해 조절된다[28,32]. Apoptosis 조절에 관여하는 가장 중요한 인자는 Bcl-2/Bax family에 속하는 단백질들로서 apoptosis의 유도과 억제를 동시에 조절하는 인자들로 구성되어 있다[1]. 또한, caspase라고 이름 붙여진 protease 역시 apoptosis 유발에 중요한 역할을 하는데, 이들은 정상적으로 증식 중인 세포에서는 pro-enzyme 형태로 존재한다[6,24,20]. 이들은 apoptosis 유도 신호에 의해 활성화되어 직접 또는 간접적으로 세포 내 존재하는 많은 표적 단백질의 분해에 관여한다[9,24]. 이외에도 apoptosis에 관여하는 여러 인자들 중에서 inhibitor of

*Corresponding author

Tel : +82-51-850-7413, Fax : +82-51-853-4036

E-mail : choiyh@deu.ac.kr

apoptosis proteins (IAPs) family에 속하는 단백질들은 외부 신호에 의한 세포 내 anti-apoptotic 활성을 지닌다. 이들 중 몇몇 IAPs는 caspase와의 직접적인 결합을 통하여 그들의 apoptotic 활성을 억제할 수 있는 것으로 알려져 있다[25].

한편 nuclear factor-kappaB (NF- κ B) 신호전달계는 암의 발생, 세포의 증식, 분화 apoptosis, 염증반응 및 세포 내 신호전달계를 포함한 다양한 생물학적 반응의 중심적인 역할을 하는 전사조절인자이다. 많은 선행연구들에서 NF- κ B 활성의 차단으로 발암원에 의한 암의 발생을 억제하거나 암세포의 증식을 억제하고 apoptosis를 유도하는 것으로 알려져 왔으며, NF- κ B 저해제는 항암제 내성을 극복할 수 있는 새로운 수단으로 사용되어져 오고 있다[26]. 또한 최근 연구에 의하면 NF- κ B는 종양 억제인자로서 작용함이 알려져 NF- κ B의 활성으로 인하여 암세포의 증식이 억제되거나 apoptosis가 촉진될 수 있다는 상반된 연구 결과들이 발표되고 있어 암에서 NF- κ B의 역할에 대한 재정립의 필요성을 제시하고 있다 [15]. 특히 HDACs 저해제에 의한 암세포의 증식억제와 연관된 apoptosis 유도에서도 NF- κ B 활성 조절에 대한 상반된 결과들이 많이 보고되어지고 있어 이에 대한 구체적인 연구의 필요성이 요구되고 있다[6,11,23,27,29].

본 연구에서는 대표적인 HDAC 저해제인 TSA에 의한 apoptosis 유도에 관여하는 기본적인 apoptosis 경로를 조사하고 여기에 NF- κ B의 활성 변화가 어떻게 나타나는지를 조사하였다. 이를 위하여 형질 전환된 267B1 전립선 상피세포가 사용되어 졌으며, TSA에 의한 267B1 세포의 증식억제에 따른 apoptosis 유도에 IAP family 인자들의 발현 변화와 연관된 caspase 활성 증가뿐만 아니라 NF- κ B 역시 TSA 처리에 따라 활성화되었음을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

267B1 세포의 배양 및 TSA의 처리

본 연구에 사용된 267B1 인체 전립선 상피세포는 Georgetown 대학의 Dr. Jung에게 제공받았으며, 선행연구 방법에 제시된 바와 같이[22], 90%의 RPMI-1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY)에 10% fetal bovine serum (FBS), 1%의 penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD) 과 0.7 μ g/mL geneticin (G418 sulfate, Sigma Chemical Co., St. Luis, MO)이 함유된 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. TSA는 Sigma에서 구입하였으며, dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma)에 용해하여 -20°C에 보관하였고, 매회 처리 전 배지에 희석 후 사용하였다.

Flow cytometer에 의한 sub-G1 세포의 빈도 측정

TSA가 함유된 배지에서 적정시간 동안 배양시킨 267B1 세포들을 모아 고정시킨 후 핵산에 특이적으로 결합하는 형

광물질인 propidium iodide (PI, concentration, 50 μ g/ml; Sigma)와 10 kunit의 RNase (Sigma)를 처리하여 암실, 4°C에서 1시간 동안 염색하였다. 다시 phosphate-buffered saline (PBS)로 세척 과정을 거친 후 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 ModiFit LT (Becton Dickinson) program을 사용하여 분석하였다.

DAPI 염색에 의한 핵의 형태 변화 관찰

준비된 세포를 3.7% formaldehyde 용액으로 10분 동안 고정 후, cytospin으로 slide glass 위에 부착시켰다. PBS로 수세 후 0.2%의 Triton X-100 (Amresco)을 첨가하여 상온에서 10분간 고정하였다. 그 후 다시 PBS로 수세하고 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) 용액으로 암하에서 15분 정도 염색시킨 후, PBS로 DAPI 용액을 충분히 세척하고 absolute alcohol을 이용하여 탈수 및 slide glass 위에 mounting solution을 처리한 후 형광 현미경(Carl Zeiss)을 이용하여 400배의 배율로 각 조건에 따른 암세포 핵의 형태 변화를 관찰하였다.

DNA 단편화 분석을 위한 agarose gel 전기영동

Apoptosis가 유발된 세포에서 관찰될 수 있는 DNA 단편화 분석을 위하여 준비된 세포에 lysis buffer [5 mM tris-HCL (pH 7.5), 5 mM EDTA, 0.5% triton X-100]를 4°C에서 30분간 처리하였다. 그 후 14,000 rpm에서 20분간 원심분리하고, 그 상층액에 proteinase K (sigma)를 0.5 mg/ml의 농도로 처리하였다. 여기에 phenol:chloroform:isoamylalcohol 혼합 용액(25:24:1, Sigma)을 첨가하고 30분간 rotate시킨 다음 14,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. 여기서 얻어진 상층액에 적정량의 isopropanol과 5 M NaCl를 첨가하였다. 24 시간 정도 냉장 보관 후, 14,000 rpm (4°C)에서 30분간 원심분리 시킨 후 상층액을 버리고, RNase A를 이용하여 pellet을 녹이고 여기에 5X gel loading dye (Bioneer, Daejeon, Korea)를 섞어 주었다. 준비된 시료를 1.0% agarose gel을 이용하여 1시간 가량 50V로 전기영동 시킨 후 ethidium bromide (EtBr, Sigma)로 염색하여 ultra violet (UV) 하에서 사진 촬영하였다.

Western blot 분석

단백질 발현 분석을 위하여 준비된 세포들을 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM dithiothreitol (DIT)]로 용해한 후(세포질과 핵 내 단백질 추출은 아래 참고), 정량하고 동량의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell,

Keene, NH)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 특정 단백질에 대한 항체와 그에 따른 이차 항체 반응을 실시한 후 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액(Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL)을 적용시킨 다음 암실에서 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 양을 분석하였다. 본 실험에 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA) 및 Calbiochem (Cambridge, MA)에서 구입하였으며, 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Life Science에서 구입하였다.

In vitro caspase 활성의 측정

준비된 세포들로부터 단백질을 추출하고 정량하여 각각 150 µg의 단백질을 fluorogenic peptide 기질 100 µM이 함유된 extraction buffer [40 mM HEPES (pH 7.4), 20% glycerol (v/v), 1 mM EDTA, 0.2% NP-40 and 10 mM DL-DTT] 50 µl에 혼합하였으며, microtiter plate에 다시 extraction buffer에 희석하여 각 sample 당 총 volume이 100 µl가 되게 하였다. 실험에 사용된 기질[caspase-1, Z-Val-Ala-Asp (Z-VAD)-p-nitroaniline (pNA); caspase-3, Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-pNA; caspase-8, Ile-Glu-Thr-Asp (IETD)-pNA; caspase-9, Leu-Glu-His-Asp (LEHD)-pNA] 및 caspase 특이적 저해제 (caspase-1, Ac-AAVALLPAVLLALLAP-IETD-CHO; caspase-2, Ac-YVAD-CMK; caspase-3, Ac-DEVD-CHO 및 Z-DEVD-FMK)는 Calbiochem에서 구입하였다. 제공된 실험 방법에 의하여 준비된 plate를 37°C에서 3시간 동안 incubation 시킨 후 ELISA reader를 이용하여 흡광도에 따른 반응의 정도를 비교하였다.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

NF-κB 활성 측정을 위한 EMSA를 위하여 100 mm dish에 1×10^7 개의 세포를 분주하여 24시간 안정화시키고 다양한 농도의 TSA를 적정 시간 동안 처리한 후, PBS로 수세하고 pellet을 준비하였다. 준비된 pellet을 ice-cold lysis buffer (10 mM Tris-Cl, pH 7.4, 3 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 0.5 mM PMSF, 5 µg/ml of leupeptin, pepstatin, and aprotinin, respectively)로 resuspend하고 일정 간격으로 vortexing하면서 -4°C에 15분 정도 방치하였다. 35,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 핵을 수거 후, washing buffer (10 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 5 µg/ml of leupeptin, pepstatin, and aprotinin, respectively)를 5분간 처리하고 적정량의 hypertonic buffer (20 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 25% Glycerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 5 µg/ml of leupeptin, pepstatin, and aprotinin, respectively)를 첨가하여 40분간 반응시켰다. 14,000 rpm로 30분간 원심분리

하여 얻은 핵 단백질을 정량하여 각각의 sample에 대한 5 µg을 EMSA에 사용하였다. 이때 사용된 oligonucleotide NF-κB probe (5'-CAAAACAGGGGCTTTCCTCCTCA-3')는 Santa Cruz Biotechnology Inc.에서 구입하였으며, binding reaction 후 6% native polyacrylamide gel을 이용하여 분리 후 autoradiography에 적용하였다.

NF-κB luciferase assay

NF-κB 전사활성의 정량적 비교를 위하여 NF-κB promoter의 활성에 미치는 TSA의 영향을 조사하였다. 이를 위하여 1×10^6 개의 세포를 대상으로 2 µg NF-κB-luciferase reporter plasmids (BD Sciences, San Jose, CA)를 Lipofectamine (Gibco BRL)을 이용하여 주어진 방법에 준하여 transfection을 실시하였다. DNA-Lipofectamine mixtures로 적정 시간 반응시킨 후, 관찰 대상 세포들에 다양한 농도의 TSA를 적정 시간동안 처리하였다. 준비된 세포들을 모아 수세하고 lysis시켜 microplate luminometer LB96V (Perkin Elmer, Foster City, CA)를 이용하여 Promega사의 Luciferase Assay System kit를 이용하여 luciferase 활성을 분석하였다.

결과 및 고찰

HDAC 저해제 TSA에 의한 267B1 세포의 apoptosis 유발

HDAC 저해제인 TSA의 처리에 의한 267B1 세포의 증식 억제와 apoptosis 유도 및 연관성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 선행연구의 조건에 준하여[13] 적정시간 또는 다양한 농도의 TSA를 처리하여 267B1 세포의 증식억제 여부를 조사하였다. 본 연구 조건에서도 선행연구의 결과에서와 유사하게 400 ng/ml TSA의 24시간 동안 처리에 의하여 정상 배지에서 배양된 대조군에 비하여 약 50% 이상의 증식억제 현상을 관찰할 수 있었다(data not shown). 이러한 TSA 처리에 따른 267B1 세포의 증식억제가 apoptosis 유도에 의한 것임을 제시하기 위하여 apoptosis 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 염색질의 응축 및 DNA 단편화 현상[28,32]의 여부를 조사하였다. 이를 위하여 200 및 400 ng/ml의 TSA가 24시간 처리된 세포를 대상으로 DAPI 염색을 실시하여 핵의 형태변화를 관찰하였으며, 다양한 조건에서 TSA가 처리된 배지에서 배양된 세포들의 핵 내 DNA를 분리하여 DNA 단편화 여부 조사를 위하여 agarose 전기영동을 실시하였다. Fig. 1A 및 B에서 알 수 있듯이 TSA의 처리 농도 및 시간의 증가에 따라 염색질의 응축에 의한 핵의 깨짐 현상 및 DNA 단편화의 증가 현상을 관찰할 수 있었다. 이러한 TSA 처리에 의한 267B1 세포의 apoptosis 유발의 정도를 정량화하기 위하여 flow cytometry 분석을 실시한 결과는 Fig. 1C에 나타난 바와 같으며, 이와 같은 연구결과들은 TSA에 의한 267B1

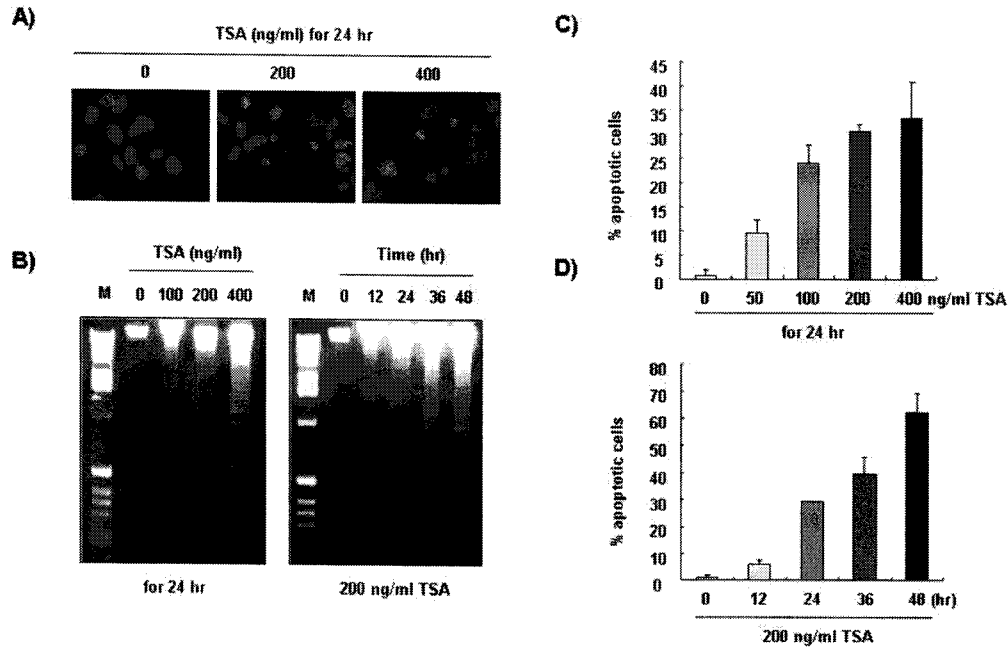


Fig. 1. Apoptosis induction by HDAC inhibitor trichostatin A (TSA) treatment in 267B1 cells. (A) 267B1 cells were plated at 1×10^5 cells per 60-mm plate, and incubated for 24 hr. The cells were treated with 200 ng/ml and 400 ng/ml TSA for 24 hr and then stained with DAPI solution. After 15 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescent microscope using blue filter. Magnification, X400. (B) For the analysis of DNA fragmentation, the cells were treated with various concentrations of TSA for 24 hr or 200 ng/ml TSA for the indicated times, respectively. The genomic DNA was extracted, separated on 1.0% agarose gel electrophoresis and visualized under UV light after staining with EtBr. M indicates a size marker of the DNA ladder. (C) The cells were grown under the same conditions as (B), trypsinized and pellets were collected. The cells were fixed and digested with RNase, and then cellular DNA was stained with PI. DNA flow cytometric cell cycle analysis was performed. Results were expressed as the means \pm S.D. of three independent experiments.

세포의 증식 억제가 apoptosis 유발과 직접적인 연관성이 있음을 보여 주는 것이다.

Bcl-2 및 IAP family 인자들의 발현에 미치는 HDAC 저해제 TSA의 영향

이상에서 관찰된 TSA 처리에 의한 267B1 세포의 apoptosis 유발에 관여하는 기전 해석의 시도를 위하여 먼저 Bcl-2 및 IAP family에 속하는 몇 가지 단백질들의 발현 변화를 조사하였다. Bcl-2 family에 속하는 몇 가지 인자들은 apoptosis 유발 조절에 가장 대표적인 유전자로 알려져 있는데, 그중 Bcl-2는 anti-apoptotic 분자로서 apoptosis의 유발을 억제하는 기능을 가지며, Bax는 pro-apoptotic 분자로 Bax 단백질 발현의 증가는 apoptosis의 유발을 유도한다. 이들 두 유전자는 세포 내 소기관 중 mitochondria로부터의 cytochrome c를 유리시켜 cysteine-related protease인 caspase, 종양억제 유전자인 p53, DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성을 상호 조절한다[1]. 이들은 서로 dimer의 형태로 존재하며 그들의 발현 수준에 변화가 초래되면 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다. 그러나 Fig. 2에 나타난 바와 같이

본 실험의 조건에서 TSA의 처리에 따라 Bax 및 Bcl-2의 단백질 발현 변화는 유의적인 차이를 보여주지 않았다. 그리고 IAP family에 속하는 여러 유전자 산물은 세포 내 anti-apoptotic 활성을 지니는데, 이들은 caspase와의 직·간접적인 결합을 통하여 그들의 apoptotic 활성을 억제할 수 있을 것으로 밝혀져 있다[25]. 특히 이들 IAP family의 발현은 전사 조절 인자인 nuclear factor kappa B (NF- κ B)에 의해 조절 받는 것으로 밝혀져 apoptosis의 신호전달 연구에서 많은 표적인자로 관심을 받고 있다[14]. Bcl-2 family와는 달리, TSA 처리 농도 및 시간의 증가에 따라 조사된 두 가지 IAP family 중, c-IAP-1은 현저하게 감소되었으며 c-IAP-2의 발현도 다소 감소되었다(Fig. 2). 이상의 결과에서 TSA 처리에 따른 267B1 세포의 apoptosis 유발에 Bax 및 Bcl-2의 발현 변화보다는 IAP family 인자의 발현 감소가 더 직접적인 원인이 될 수 있을 것 같으며, IAP family의 발현 감소는 caspase 활성을 유도할 것으로 추정되어진다. 그러나 Bax 및 Bcl-2의 경우 총 단백질에 대한 발현의 양적 변화만을 조사한 것이므로 미토콘드리아로의 이동과 관련된 세포 내에서의 분포 변화에 대한 추가적인 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

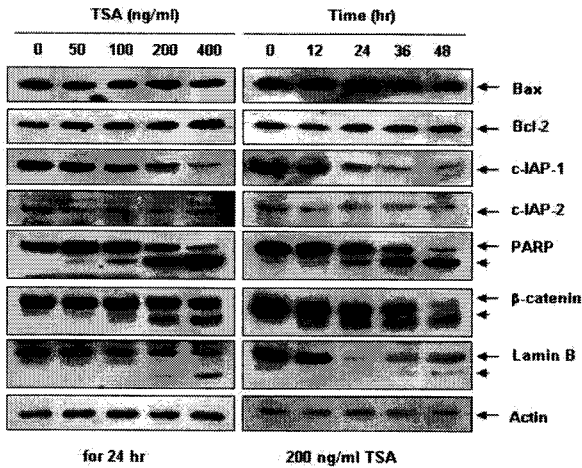


Fig. 2. Effects of HDAC inhibitor TSA on the levels of Bcl-2 and IAP family proteins, and caspase-3 substrate proteins in 267B1 cells. Exponentially growing cells were incubated with various concentrations of TSA for 24 hr or 200 ng/ml TSA for the indicated times, respectively. The cells were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

Caspase의 활성화에 미치는 HDAC 저해제 TSA의 영향

Caspase protease 역시 apoptosis 유발에 중요한 조절인자로, 이들은 세포 내에서 핵과 mitochondria의 외막에 불활성 상태로 존재하며, Bcl-2 family 발현의 변화에 따라 이들의 활성도가 조절될 수 있다[6,20,24]. 이들은 proenzyme 형태로 존재하다가 apoptosis 유도를 활성화시키는 신호에 의해 활성화된 protease로 전환되어 직접 또는 간접적으로 세포 내에 존재하는 많은 표적 단백질의 분해에 관여한다[9,24]. 현재까지 알려진 약 14종의 caspase는 크게 3가지의 부류로 나누어질 수 있는데, 본 연구에서는 inflammatory mediator에 속하는 caspase-1, activator caspase에 속하는 caspase-8 및 -9 그리고 executioner caspase에 속하는 caspase-3을 대상으로 TSA 처리에 따른 활성 변화를 조사하였다. Fig. 3A에 나타낸 바와 같이 caspase-1의 경우 TSA 처리 농도의 증가에 따라 비활성형의 감소나 활성형 caspase-1의 발현 증가는 관찰할 수 없었다. 그러나 나머지 조사된 caspase-8, -9 및 -3은 모두 TSA의 처리 농도가 증가할수록 활성형 단백질의 발현이 모두 증가되거나 비활성형의 발현이 감소되었다. 이러한 Western blot 분석에 의한 결과의 재확인 을 위하여 각 caspase에 해당되는 기질을 이용한 *in vitro* caspase 활성을 측정 결과에서도 이와 유사하게 나타났으며, 특히 caspase-3의 활성이 가장 높게 나타났으며, caspase-8 및 -9는 서로 유사한

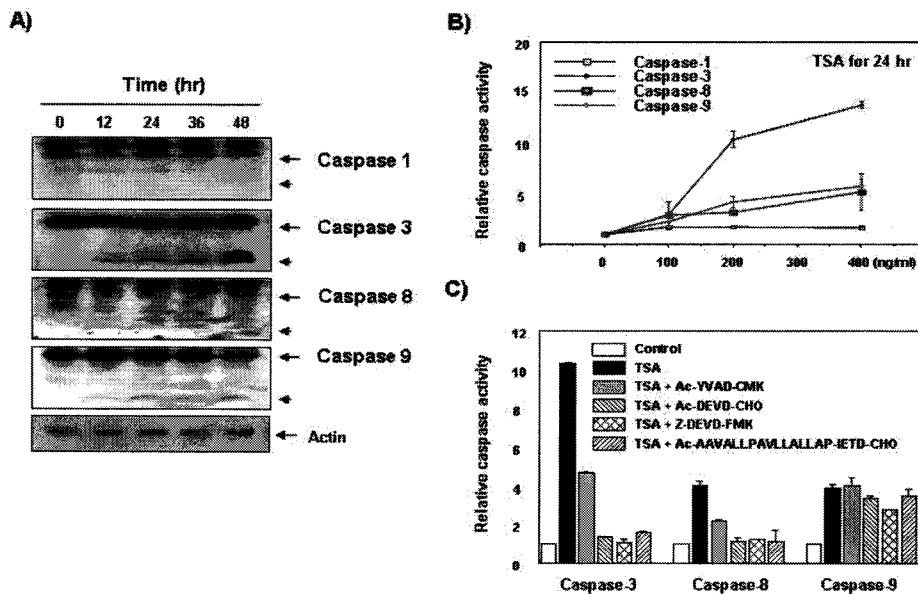


Fig. 3. Effects of HDAC inhibitor TSA on the levels and activities of caspases in 267B1 cells. (A) 267B1 cells were incubated with 200 ng/ml TSA for the indicated times. The cells were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control. (B) After treatment with various concentrations of TSA for 24 hr, aliquots were incubated with substrates, Z-VAD-pNA, DEVD-pNA, IETD-pNA and LEHD-pNA for *in vitro* caspase-1, -3, -8 and -9 activity, respectively, at 37°C for 1 hr. The released fluorescent products were measured. Data were means±SD of three independent experiments. (C) The cells were pretreated with the indicated caspase inhibitors (50 μM) for 1 hr before challenge with 200 ng/ml TSA for 24 hr. The cell lysates were extracted and used to measure the caspase-3, -8 and -9 activity with the indicated substrates. Data were reported as mean±S.D. of three independent experiments.

활성도를 보여주었다. 이러한 TSA 처리에 따른 caspase-3 활성의 증가로 인하여 caspase-3의 기질 단백질들[poly(ADP-ribose)-polymerase, β -catenin 및 laminin B]의 분해 현상도 TSA 처리 농도 및 시간의 증가에 따라 현저히 증가되었다 (Fig. 2). 그리고 TSA에 의하여 증가된 caspase-3 및 -8은 활성을 다양한 caspase 선택적 저해제들에 의하여 다시 감소되었으나, caspase-9는 큰 영향이 없었다(Fig. 3C). 그러나 caspase-9와는 달리, caspase-3의 경우 caspase-1 및 -2의 저해제에 의하여서도 활성이 감소된 결과와, caspase-8의 경우 다양한 저해제들에 의하여 활성이 모두 감소된 결과에 대한 의문의 해결을 위하여 각각의 caspase에 대한 좀 더 구체적인 연구를 더 해야 할 필요성을 있음을 보여주었다. 하지만 caspase-8의 활성에 대한 결과로 미루어 267B1 세포에서 TSA에 의한 apoptosis 유도에는 death receptor 경로가 관여할 가능성이 매우 높음을 시사하여 주었으며, 이는 선행 연구의 결과를 잘 뒷받침하여 주는 것이다[5,10,12].

NF- κ B의 활성화에 미치는 HDAC 저해제 TSA의 영향

최근까지 전사조절인자 NF- κ B는 apoptosis가 유도된 많은 경우에 활성이 저하될 것으로 보고되어져 왔다. 이는 아마도 NF- κ B가 대부분의 세포증식 촉진이나, anti-apoptotic 인자들의 발현 조절을 전사수준에서 조절가능하다는 보고들에 기초를 둔 것이며, 많은 항암활성을 가지는 약물들에 의한 apoptosis 유도에 NF- κ B의 활성 감소가 관여하는 것으로 보고되어지고 있다[26]. 하지만 최근 연구들에 의하면 NF- κ B는 오히려 종양억제인자로서 작용할 가능성도 있으며, HDAC 저해제를 포함한 항암제 후보 약물들에 의한 apoptosis 유도에 NF- κ B 활성의 증가에 대한 관한 구체적 증거들이 제시되어져 오고 있다[11,15,23,27,29]. 따라서 특정 세포의 apoptosis 유도에서 NF- κ B는 대상 세포 및 약물의 종류에 따라 NF- κ B 활성은 정반대의 결과를 보여 줄 수 있음을 의미한다. 따라서 본 연구에서 267B1 세포에서 TSA에 의한 apoptosis 유도에 NF- κ B의 활성 변화 여부를 조사하기 위하여 먼저 NF- κ B의 핵내 이동 여부를 Western blot 분석 방법으로 조사하였으며, Fig. 4A에 나타낸 바와 같이 TSA의 처리 농도 및 시간이 증가할수록 세포질에서 핵으로의 NF- κ B 이동이 증가하였음을 알 수 있었고, 이와는 반대로 I κ B- α 의 발현은 상대적으로 분해가 많이 일어나 발현의 정도가 매우 감소되었음을 알 수 있었다. 핵 내로 전이된 NF- κ B의 전사활성 정도를 조사하기 위하여 EMSA 및 NF- κ B promoter assay를 실시한 결과, Fig. 4B 및 C에서 알 수 있듯이 TSA의 처리 시간 및 농도가 증가할수록 NF- κ B의 binding의 정도나 promoter의 활성이 매우 증가하였음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 일부 선행연구의 결과와 상반되거나 유사한 경향성이기도 하기 때문에 HDAC 저해제에 의한 apoptosis 유도에서 NF- κ B의 활성화에 대한 보다 폭 넓은 연구가 지속되어야 할

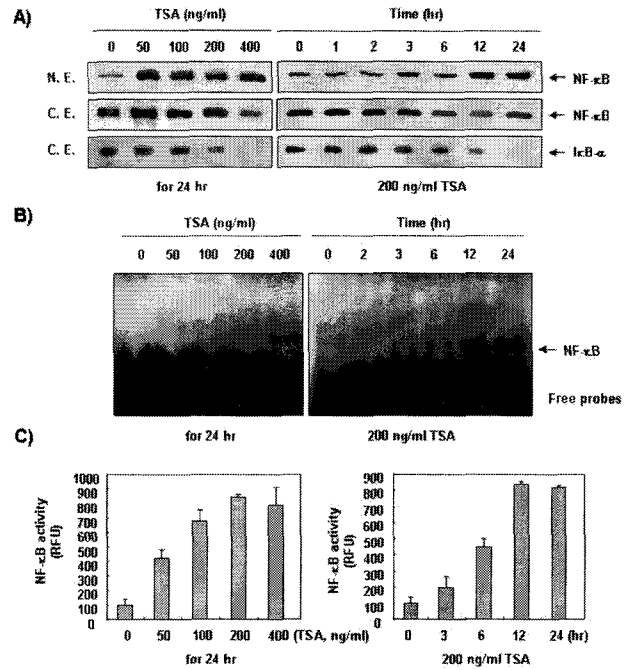


Fig. 4. Activation of NF- κ B and degradation of I κ B- α proteins by HDAC inhibitor TSA in 267B1 cells. (A) 267B1 cells were incubated with various concentrations of TSA for 24 hr or 200 ng/ml TSA for the indicated times, respectively. The nuclear (N.E.) and cytosolic (C.E.) fractions were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with anti-NF- κ B and anti-I κ B- α antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. (B) Nuclear extracts were analyzed for NF- κ B DNA binding ability using NF- κ B specific oligonucleotide by EMSA. 267B1 cells were incubated with the indicated concentrations of TSA for 24 hr or 200 ng/ml TSA for the indicated times. Then the nuclear proteins were isolated and subjected to EMSA to assay for NF- κ B activation. (C) The NF- κ B promoter constructs fused to the luciferase gene were transiently transfected into 267B1 cells as described in materials and methods. The cells were incubated with various concentrations of TSA for 24 hr or 200 ng/ml TSA for the indicated times, respectively, and NF- κ B activities were examined. The results were expressed as the mean \pm S.D. of data from three separate experiments.

것으로 생각된다.

요 약

본 연구에서는 인체전립선 상피세포인 267B1 세포에서 HDAC 저해제인 TSA에 의한 증식억제가 apoptosis 유도에 의한 것임을 제시하였다. 이러한 TSA에 의한 267B1 세포의 apoptosis에는 c-IAP-1 및 c-IAP-2와 같은 IAP family의 발현

감소가 동반되었으나 Bax 및 Bcl-2와 같은 Bcl-2 family의 발현에는 큰 변화가 없었다. 그리고 TSA에 의한 267B1 세포의 apoptosis는 caspase의 활성화에 의한 표적 단백질들의 분해와 연관성이 있었다. 또한 TSA에 의한 apoptosis 유도에서 NF- κ B의 활성이 증가된다는 것을 세포질에서 NF- κ B의 핵 내로의 이동에 따른 전사활성의 증가 현상에 의한 것임을 다양한 방법으로 제시하였다. 본 연구의 결과는 TSA와 같은 HDAC 저해제에 의한 apoptosis 유도에는 NF- κ B의 활성 증가가 동반될 수 있음을 보여주는 결과로서 HDAC 저해제의 항암활성에 대한 NF- κ B의 새로운 역할 가능성을 제시하여 주는 것으로서 이에 관한 추가적인 연구의 필요성을 제시하였다.

감사의 글

김성윤은 2006년도 2단계 두뇌한국21사업의 박사후연구원 지원을 받았으며, 본 논문은 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구의 일부임(KRF-2007-521-E00015).

References

1. Antonsson, B. and J. C. Martinou. 2000. The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell Res.* **256**, 50-57.
2. Baradari, V., A. Huether, M. Höpfner, D. Schuppan and H. Scherübl. 2006. Antiproliferative and proapoptotic effects of histone deacetylase inhibitors on gastrointestinal neuroendocrine tumor cells. *Endocr. Relat. Cancer* **13**, 1237-1250.
3. Barisic, K., J. Petrik and L. Rumora. 2003. Biochemistry of apoptotic cell death. *Acta. Pharm.* **53**, 151-164.
4. Donadelli, M., C. Costanzo, L. Faggioli, M. T. Scupoli, P. S. Moore, C. Bassi, A. Scarpa and M. Palmieri. 2003. Trichostatin A, an inhibitor of histone deacetylases, strongly suppresses growth of pancreatic adenocarcinoma cells. *Mol. Carcinog.* **38**, 59-69.
5. Facchetti, F., S. Previdi, M. Ballarini, S. Minucci, P. Perego and C. A. La Porta. 2004. Modulation of pro- and anti-apoptotic factors in human melanoma cells exposed to histone deacetylase inhibitors. *Apoptosis* **9**, 573-582.
6. Fan, T. J., L. H. Han, R. S. Cong and J. Liang. 2005. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta. Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* **37**, 719-727.
7. Fulda, S. and K. M. Debatin. 2004. Apoptosis signaling in tumor therapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1028**, 150-156.
8. Greenberg, V. L., J. M. Williams, J. P. Cogswell, M. Mendenhall and S. G. Zimmer. 2001. Histone deacetylase inhibitors promote apoptosis and differential cell cycle arrest in anaplastic thyroid cancer cells. *Thyroid* **11**, 315-325.
9. Kaufmann, S. H., S. Desnoyers, Y. Ottaviano, N. E. Davidson and G. G. Poirier. 1993. Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* **53**, 3976-3985.
10. Kim, H. R., E. J. Kim, S. H. Yang, E. T. Jeong, C. Park, J. H. Lee, M. J. Youn, H. S. So and R. T. Park. 2006. Trichostatin A induces apoptosis in lung cancer cells via simultaneous activation of the death receptor-mediated and mitochondrial pathway? *Exp. Mol. Med.* **38**, 616-624.
11. Kim, Y. K., E. K. Lee, J. K. Kang, J. A. Kim, J. S. You, J. H. Park, D. W. Seo, J. W. Hwang, S. N. Kim, H. Y. Lee, H. W. Lee and J. W. Han. 2006. Activation of NF-kappaB by HDAC inhibitor apicidin through Sp1-dependent de novo protein synthesis: its implication for resistance to apoptosis. *Cell Death Differ.* **13**, 2033-2041.
12. Komata, T., T. Kanzawa, T. Nashimoto, H. Aoki, S. Endo, T. Kon, H. Takahashi, S. Kondo and R. Tanaka. 2005. Histone deacetylase inhibitors, N-butyric acid and trichostatin A, induce caspase-8- but not caspase-9-dependent apoptosis in human malignant glioma cells. *Int. J. Oncol.* **26**, 1345-1352.
13. Kwon, O., K. A. Kim, S. O. Kim, R. Ha, W. K. Oh, M. S. Kim, H. S. Kim, G. D. Kim, J. W. Kim, M. Jung, C. H. Kim, J. S. Ahn and B. Y. Kim. 2006. NF-kappaB inhibition increases chemosensitivity to trichostatin A-induced cell death of Ki-Ras-transformed human prostate epithelial cells. *Carcinogenesis* **27**, 2258-2268.
14. LaCasse, E. C., S. Baird, R. G. Korneluk and A. E. MacKenzie. 1998. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* **17**, 3247-3259.
15. Lee, C. H., Y. T. Jeon, S. H. Kim and Y. S. Song. 2007. NF-kappaB as a potential molecular target for cancer therapy. *Biofactors* **29**, 19-35.
16. Li, G. C., X. Zhang, T. J. Pan, Z. Chen and Z. Q. Ye. 2006. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A inhibits the growth of bladder cancer cells through induction of p21WAF1 and G1 cell cycle arrest. *Int. J. Urol.* **13**, 581-586.
17. Pan, L. N., J. Lu and B. Q. Huang. 2007. HDAC Inhibitors: A potential new category of anti-tumor agents. *Cell Mol. Immunol.* **4**, 337-343.
18. Marks, P. A., V. M. Richon, T. Miller and W. K. Kelly. 2004. Histone deacetylase inhibitors. *Adv. Cancer Res.* **91**, 137-168.
19. Peltonen, K., T. M. Kiviharju, P. M. Järvinen, R. Ra and M. Laiho. 2005. Melanoma cell lines are susceptible to histone deacetylase inhibitor TSA provoked cell cycle arrest and apoptosis. *Pigment Cell Res.* **18**, 196-202.
20. Philchenkov, A., M. Zavelevich, T. J. Krocak and M. Los. 2004. Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities. *Exp. Oncol.* **26**, 82-97.
21. Platta, C. S., D. Y. Greenblatt, M. Kunnimalaiyaan and H. Chen. 2007. The HDAC inhibitor trichostatin A inhibits growth of small cell lung cancer cells. *J. Surg. Res.* **142**, 219-226.
22. Ramsamooj, P., M. Kuettel, A. Dritschilo and M. Jung. 1997. p53-Independent tumorigenic progression of human prostate cells. *Radiat. Oncol. Investig.* **5**, 269-274.
23. Rundall, B. K., C. E. Denlinger and D. R. Jones. 2004.

- Combined histone deacetylase and NF-kappaB inhibition sensitizes non-small cell lung cancer to cell death. *Surgery* **136**, 416-425.
24. Rupinder, S. K., A. K. Gurpreet and S. Manjeet. 2007. Cell suicide and caspases. *Vascul. Pharmacol.* **46**, 383-393.
25. Salvesen, G. S. and C. S. Duckett. 2002. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **3**, 401-410.
26. Sarkar, F. H. and Y. Li. 2008. NF-kappaB: a potential target for cancer chemoprevention and therapy. *Front. Biosci.* **13**, 2950-2959.
27. Savickiene, J., G. Treigyte, V. Borutinskaite, R. Navakauskiene and K. E. Magnusson. 2006. The histone deacetylase inhibitor FK228 distinctly sensitizes the human leukemia cells to retinoic acid-induced differentiation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1091**, 368-384.
28. Schulze-Osthoff, K., D. Ferrari, M. Los, S. Wesselborg and M. E. Peter. 1998. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem.* **254**, 439-459.
29. Shetty, S., B. A. Graham, J. G. Brown, X. Hu, N. Vegh-Yarema, G. Harding, J. T. Paul and S. B. Gibson. 2005. Transcription factor NF-kappaB differentially regulates death receptor 5 expression involving histone deacetylase 1. *Mol. Cell Biol.* **25**, 5404-5416.
30. Vanhaecke, T., P. Papeleu, G. Elaut and V. Rogiers. 2004. Trichostatin A-like hydroxamate histone deacetylase inhibitors as therapeutic agents: toxicological point of view. *Curr. Med. Chem.* **11**, 1629-1643.
31. Wetzel, M., D. R. Premkumar, B. Arnold and I. F. Pollack. 2005. Effect of trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, on glioma proliferation in vitro by inducing cell cycle arrest and apoptosis. *J. Neurosurg.* **103**, S549-S556.
32. Wylie, A. H., J. F. Kerr and A. R. Currie. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**, 251-306.
33. Yoshida, M., M. Kijima, M. Akita and T. Beppu. 1990. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both *in vivo* and *in vitro* by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* **265**, 17174-17179.