

폐암에 있어서 세포주기조절 단백질의 이상

아주대학교 의과학연구소 의학유전학연구실,
¹아주대학교 의과대학 호흡기내과학교실 및 ²해부병리학교실

하만준 · 황성철¹ · 박광화² · 김현주

Alterations of Cell Cycle Regulatory Proteins in Lung Cancer

Mahn Joon Ha, Sung Chul Hwang¹, Kwang Hwa Park²
and Hyon Ju Kim

Laboratory of Medical Genetics, Institute for Medical Sciences, Ajou University

¹Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, Ajou University School of Medicine

²Department of Pathology, Ajou University School of Medicine

With the discovery of cyclins and cyclin-dependent kinases (cdk), key regulators of cell cycle, it is now possible to test whether the deregulation of any or all of these molecules could lead to oncogenesis. Information regarding the clinical significance of the cyclins and cdk is beginning to unfold. It has been found that certain cyclins or cdk are overexpressed in some tumor tissues including liver, parathyroid, and breast cancer. However, data on the expression of cyclins or cdk in lung cancer have not been reported. In this study, we examined the expression of cyclins and cdk in various primary lung cancer tissues by Western blot analysis to determine if there was an altered expression in those tissues. Human lung cancer tissues consisted of 16 adenocarcinomas, 18 squamous cell carcinomas, 2 small cell carcinomas, 1 large cell carcinoma, and 1 with sarcoma. Western blot analysis showed that the levels of cyclin A and B1, and cdk2 expression were not elevated as compared to normal tissues. However, overexpression of cyclin D1 (8/38, 21%), cdk4 (8/38, 21%), and cdc2 (12/38, 32%) was observed in cancer tissues as compared to normal tissues. The expression of cyclin E was higher in all the cancer tissues tested than in normal tissues. These data implicate dysregulated expression of several cyclin and cdk genes, particularly cyclin E, as a potential factor in the pathogenesis of lung cancer. (Ajou Med J 1997; 2(2): 159~164)

Key Words: Cyclins, Cyclin-dependent kinases, Lung cancer, Overexpression

서 론

최근의 분자생물학적인 기술의 급속한 발달은 암의 연구에 있어서도 진전을 가능하게 하였는데 암발생에 관계된 유전자들이 밝혀지고, 이것을 응용한 새로운 개념의 항암물질들이 개발되고 있다. 암발생과정에 있어서 세포의 주기를 조절하는 단백질들의 변이는 중요한 요소인데 cyclin과 cyclin 의존성 인산화효소(cdk)가 발견

된 후 이 단백질 들이 세포주기를 직접적으로 조절하기 때문에 많은 연구자 들은 이들 중 어떤 것들의 deregulation이 암발생과정에 관계 되지 않을까 하는 의문을 가지게 되었다¹.

암발생과정에 있어서 cyclin이 관계 된다는 점은 몇 가지의 cyclin 들이 어떤 종양에서 과다하게 발현되어 있다는 사실에 의해 밝혀지게 되었다^{1,2}. 간암에 있어서 hepatitis B 바이러스 유전물질의 일부분이 cyclin A 유전자로 통합되어 이 단백질이 분해되는 것을 억제함으로써 세포주기의 조절이 파괴되는 경우가 알려져 있으며³, 어떤 부갑상선종양의 경우에 있어서는 *Prad1*(cyclin D1) 이 부갑상선 호르몬 유전자의 enhancer 부분으로 전좌

저자연락처: 하만준, (442-749) 경기도 수원시 팔달구 원천동 산 5, 아주대학교 의과학연구소 의학유전학연구실, Tel: (0331) 219-4520, Fax: (0331) 219-5299

[†]본 연구의 일부는 과학재단의 '97 핵심전문연구(971-0710-087-2)의 지원에 의해 이루어짐.

된 염색체의 재배열로 인하여 과발현되어 있다⁴⁻⁶. 또한 최근에 Keyomarsi들⁷(1994)은 유방암 환자에서 적출한 종양 조직을 조사하여 cyclin E가 이 종양에 대한 진단마커로서 사용될 수 있을 정도로 정상의 조직과 차이가 있다는 것을 밝혔으며, Gong들⁸(1994)은 백혈병 및 수종의 고형암 세포주에 있어서 cyclin B1과 E가 세포주기에 있어서 정상적인 발현 단계인 G2와 G1 단계에서 뿐만 아니라 S나 M과 같은 세포주기의 단계에서도 과발현 됨으로써 이들 암의 발생에 직접 관계한다는 것을 보고하였다.

한편 본 연구실에서의 림프종양에 있어서의 세포주기 조절물질의 발현에 대한 연구에 의하면 cyclin E가 low grade의 림프종양에서와는 달리 high grade에서는 과발현되며, 이 단백질의 발현 정도가 예후와도 관계가 있었다. 따라서 암에 있어서의 이러한 세포주기 조절단백질 발현의 연구는 새로운 암의 진단 또는 예후인자로서 이용될 수 있을 뿐만 아니라 새로운 합암제를 개발하는데 중요한 기초 재료가 되리라 기대된다. 그러나 현재까지 국.내외를 통하여 폐암에 대한 이러한 연구는 거의 없는 실정이므로 이에 대한 연구가 시급하리라 생각된다. 따라서 본 연구에서는 폐암조직에서의 cyclin과 cdk와 같은 세포주기조절물질들의 발현양상을 정상조직과 비교하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

아주대학교 의료원에서 폐암으로 진단 받고 수술로 절제된 조직 중 해부병리학적으로 피사가 관찰되지 않은 신선한 조직을 대상으로하였는데 이 중 16예는 선암종(adenocarcinoma), 18예는 편평세포암종(squamous cell carcinoma), 2예는 소세포암종(small cell carcinoma), 1예는 대세포암종(large cell carcinoma), 1예는 섬유육종(fibrosarcoma)이었다. 적출된 종양조직 주변의 정상조직을 채취하여 정상 대조군으로 사용하였다.

2. 단백질 sample 준비

폐암환자로 부터 수술로 적출한 폐암조직과 주변의 정상조직을 전기영동에 의한 단백질 분석을 위해 먼저 EBC buffer(40 mM Tris-HCl, pH 8.0, 120 mM NaCl, 0.5% NP-40, 2 µg/ml aprotinin, 2 µg/ml pepstatin, 2 µg/ml leupeptin, 100 µg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride)를 가한 후 glass homogenizer를 이용하여 파쇄하였다. 이것을 얼

음 위에서 30분 동안 방치 한 후 미세원심분리기를 이용하여 15,000 rpm에서 20분간 원심분리 한 상층액을 취하였다. Bovine serum albumin(BSA)를 표준용액으로 하여 각 단백질 sample들의 단백질 양을 측정 한 후 동일 양의 단백질을 취하여 새 시험관에 옮긴 뒤 동일 volume의 2 x sodium lauryl sulfate(SDS) sample buffer(0.125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 10% β-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.004% bromophenol blue)를 가한 후 5분간 끓여서 SDS/polyacrylamide 젤 전기영동을 위한 sample로 사용하였다.

3. SDS/polyacrylamide 젤 전기영동

전기영동은 10%의 polyacrylamide 젤을 사용하였으며, discontinuous buffer system은 Laemmli(1970)⁹의 방법에 따랐다. 전기영동 system은 mini-gel Kit(Bio-Rad)를 사용하였으며, 각 well당 15~50 µg의 단백질 sample를 가하여 100V에서 3시간 동안 running하였다.

4. Transfer of the proteins on nitrocellulose membrane

Running이 끝난 단백질은 20% 메탄올을 포함한 transfer buffer(12.5 mM Tris, 0.1 M glycine, pH 8.3)를 이용하여 40V에서 2시간 동안 nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Keene, NH)으로 transfer하였다.

5. Labelling with antibodies

Western blot 분석을 위하여 nitrocellulose membrane을 먼저 blocking solution {5% Carnation Nonfat dry milk, 0.1% Tween 20 in TNE(10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 50 mM NaCl)}으로 1시간 동안 흔들어 주었다. blocking이 끝난 membrane은 blocking solution에 1 µg/ml되게 첨가된 cyclin A(BF683; Calbiochem, Cambridge, MA), B1(GNS1; Santa Cruz, Santa Cruz, CA), D1(G124-326; PharMingen, Los Angeles, CA) 또는 E(HE12, Santa Cruz)와 cdc2(cdc2.1; Calbiochem), cdk2(sc-163; Santa Cruz) 및 cdk4(sc-260; Santa Cruz) 항체 용액에서 1시간 동안 다시 흔들어 주었다. 항체로 표지가 끝난 membrane은 0.05% Tween 20가 함유된 TNE buffer로 5회 수세하고 20분 동안 blocking solution에서 흔들어 주었다. 여기에 1 µg/ml되게 peroxidase가 conjugation된 sheep anti-mouse IgG(Amersham)를 가 후 다시 1시간 동안 흔들어 주었다. 반응이 끝난 후 5회 TNE buffer로 수세하고 ECL reagent(Amersham)가 들어 있는 plas-

tic bag에 넣은 후 Kodak X-OMAT AR film에 exposure하였다.

결 과

Fig. 1은 본 연구에 사용된 16예의 선암종(adenocarcinoma), 18예의 편평세포암종(squamous cell carcinoma), 2예의 소세포암종(small cell carcinoma), 1예의 대세포암종(large cell carcinoma), 1예의 섬유육종(fibrosarcoma)중 4예의 선암종(cases 1-4), 4예의 편평세포암종(cases 5-8), 2예의 소세포암종(cases 9 and 10), 1예의 대세포암종(case 11) 및 1예의 섬유육종(case 12)에 있어서 종양조직과 주변의 정상조직에서의 cyclin A의 발현 양상을 보인 것이다. Cyclin A 단백질은 폐암조직 뿐만아니라 정상조직에서도 Western blot 분석으로 쉽게 확인 가능하였는데 조사된 전 경우에서 암조직과 정상조직 간의 발현의 차이는 관찰되지 않았다.

Fig. 2는 폐암조직과 정상조직에서의 cyclin B1의 발현 양상을 비교한 것으로 발현의 정도는 조사된 전 경우에서 암조직과 정상조직에서 유사하게 나타났다.

Cyclin D1은 정상조직의 경우에 있어서는 조사된 전 경우에서 본 연구의 Western blot 분석 조건 하에서는

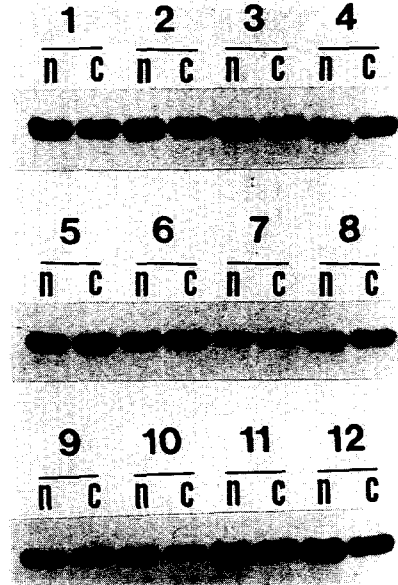


Fig. 2. Western blot analysis of cyclin B1 in total lysates from normal mucosa and lung cancer tissues. Cases 1-4, adenocarcinoma; Cases 5-8, squamous cell carcinoma; Cases 9 and 10, small cell carcinoma; Case 11, large cell carcinoma; Case 12, fibrosarcoma.



Fig. 1. Western blot analysis of cyclin A in total lysates from normal mucosa and lung cancer tissues. Cases 1-4, adenocarcinoma; Cases 5-8, squamous cell carcinoma; Cases 9 and 10, small cell carcinoma; Case 11, large cell carcinoma; Case 12, fibrosarcoma.

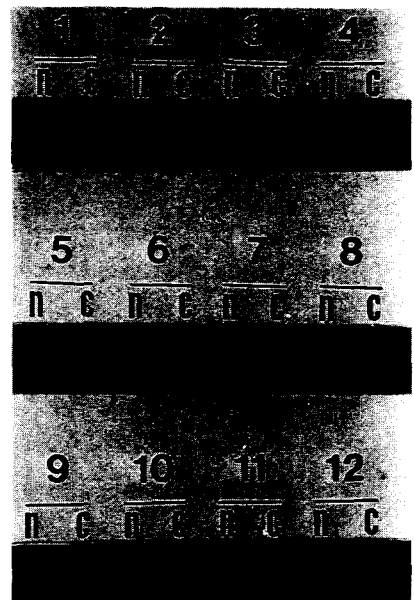


Fig. 3. Western blot analysis of cyclin D1 in total lysates from normal mucosa and lung cancer tissues. Cases 1-4, adenocarcinoma; Cases 5-8, squamous cell carcinoma; Cases 9 and 10, small cell carcinoma; Case 11, large cell carcinoma; Case 12, fibrosarcoma.



Fig. 4. Western blot analysis of cyclin E in total lysates from normal mucosa and lung cancer tissues. Cases 1-4, adenocarcinoma; Cases 5-8, squamous cell carcinoma; Cases 9 and 10, small cell carcinoma; Case 11, large cell carcinoma; Case 12, fibrosarcoma.

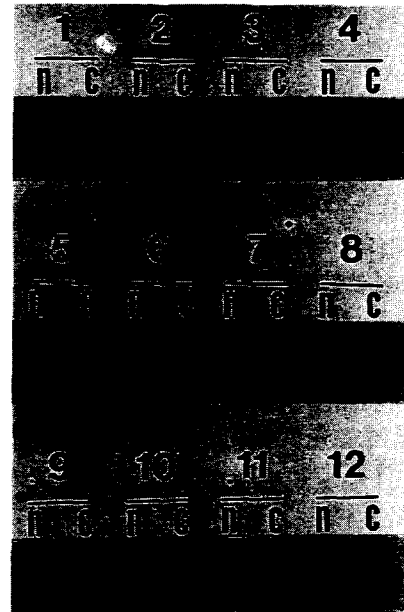


Fig. 6. Western blot analysis of cdk4 in total lysates from normal mucosa and lung cancer tissues. Cases 1-4, adenocarcinoma; Cases 5-8, squamous cell carcinoma; Cases 9 and 10, small cell carcinoma; Case 11, large cell carcinoma; Case 12, fibrosarcoma.

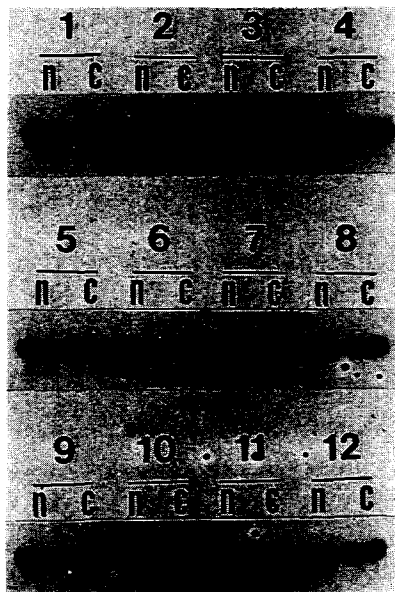


Fig. 5. Western blot analysis of cdk2 in total lysates from normal mucosa and lung cancer tissues. Cases 1-4, adenocarcinoma; Cases 5-8, squamous cell carcinoma; Cases 9 and 10, small cell carcinoma; Case 11, large cell carcinoma; Case 12, fibrosarcoma.



Fig. 7. Western blot analysis of cdc2 in total lysates from normal mucosa and lung cancer tissues. Cases 1-4, adenocarcinoma; Cases 5-8, squamous cell carcinoma; Cases 9 and 10, small cell carcinoma; Case 11, large cell carcinoma; Case 12, fibrosarcoma.

거의 관찰되지 않았으나 조사된 38예의 폐암조직 중 8예(약 21%)에서는 정상조직과는 달리 발현이 관찰되었는데 종양의 해부병리학적인 형태나 암의 진행 단계에 따른 유의한 차이는 없었다(Fig. 3). 본 연구에서 각 sample들 간의 세포주기 조절단백질의 발현 차이를 Western blot 분석으로 비교함에 있어 단백질의 loading 상태를 확인하기 위해 시도한 β -actin(결과는 실지 않음)의 Western blot 분석과 cyclin A의 발현 양상이 서로 다른 환자에서 적출된 폐암조직들 간에 비슷하였을 뿐만 아니라 정상조직과 폐암조직을 비교할 때 비슷하였으므로 정상조직에 대한 폐암조직에서의 cyclin D1의 발현 차이는 유의한 것으로 생각된다.

Fig. 4는 cyclin E의 발현을 조사한 것으로 조사된 38예의 전 폐암조직에서 주변의 정상조직에 비해 cyclin E 단백질의 과발현이 관찰되었는데 특히 10예(약 26%)에서는 현저한 과발현 양상을 보여주었다. 폐암조직에서 cyclin E는 과발현되어 있을 뿐만아니라 일부의 조직에서는 질적인 면에서도 주변 정상조직과 차이가 있었는데 정상조직에 있어서는 분자량 50K dalton의 한 band만 관찰된 반면 3예(약 8%)의 폐암조직에서는 50K 뿐만아니라 48K 및 42K dalton의 cyclin E가 관찰되었다.

Fig. 5는 cdk2의 Western blot 분석 결과로 폐암조직과 주변의 정상조직과는 유의한 발현의 차이가 관찰된 반면에 cdk4의 경우는 조사된 38예중 8예(약 21%)에서 과발현이 관찰되었는데 과발현된 경우는 16예의 선암종 중 3예, 18예의 편평세포암종 중 3예, 2예의 소세포암종 중 1예 및 1예의 육종으로 종양의 해부병리학적인 형태에 따른 유의한 차이는 없었다(Fig. 6).

Cdc2 단백질은 조사된 38예 중 12예(약 32%)의 종양 조직에서 정상조직에 비해 과발현되어 있었는데 cdk4와 마찬가지로 종양의 해부병리학적인 형태에 따른 유의한 차이는 없었다(Fig. 7).

고 찰

세포주기의 조절에 관계하는 key enzyme은 serine/threonine kinase인 cdk로 현재까지 7 종류가 알려져 있는데 세포주기가 진행되는 동안 cdk들은 세포주기의 특정한 시기에 복잡한 방법으로 활성화되거나 불활화된다. 이와 같은 cdk의 조절 기작은 세포주기를 M phase로 진행시키는 cyclin B/cdc2 complex(maturation-promoting factor, MPF 로도 알려짐)의 연구로 알려지게 되었다¹⁰. 세포주기의 S phase에서 G2 phase 동안에 걸쳐 cyclin B는 합성되어 cdc2와 complex를 형성하게 된다음 cdk7과 cyclin H로 구성된 complex activating kinase(CAK)에 의해

인산화되어 활성화된 인산화 효소로 작용하게 된다¹¹⁻¹². 이렇게 하여 활성을 가진 cdc2는 여러 단백질들을 인산화시키는데 M phase 동안 cdc2에 의하여 인산화되는 단백질에는 histone H1, nuclear lamin, vimentin 및 caldesmon 등이 있는데 이들의 인산화는 각각 chromosome condensation, nuclear lamina disassembly, intermediate filament disassembly 및 microfilament reorganization에 중요하다. 그리고 이러한 현상들은 M phase의 진행에 중요한 것으로 알려져 있다¹³. 인산화 효소인 p60^{src}, p150^{abl} 및 casein kinase II도 cdc2에 의하여 인산화되나 M phase 진행에 있어서 이들 단백질의 기능은 알려져 있지 않다. 세포가 유사분열의 중기가 시작되면 cyclin B와 A는 ubiquitin pathway에 의하여 분해되어 cdc2의 활성은 중지되고 이어서 세포질 분열이 일어나게 된다¹⁴.

포유동물의 세포들은 G1/S 단계에서는 다른 set의 cyclin/cdk complex를 이용하여 세포주기를 조절하게 된다. 현재까지의 연구로 cyclin D, E 및 C가 G1 단계에서 S 단계로 진행되는 데 중요하다는 것이 알려지게 되었다^{15,16}. cyclin D들(D1, D2 및 D3)은 growth factor 등의 외부 신호의 자극에 의하여 그 합성이 촉진되는데 주로 cdk4나 cdk6와 complex를 형성하게 된다¹⁷⁻¹⁹. 세포주기의 G1 phase에 cyclin D 보다는 약간 늦게 cyclin E가 발현되는데 이것은 cdk2와 complex를 형성한다²⁰. 세포주기가 S phase로 넘어감에 따라 cyclin E 단백질은 분해되고 cyclin E에서 유리된 cdk2는 cyclin A와 결합하여 그 활성이 유지된다.

이와 같이 세포주기는 cyclin과 cdk 들에 의하여 직접 조절되기 때문에 이들의 이상 발현은 종양의 형성에 관련될 것으로 생각되어 최근에 와서 이 분야의 연구가 시작되었는데 현재까지의 연구로 간암³, 부갑상선 종양⁴⁻⁶, 유방암⁷ 및 백혈병⁸ 등에서 여러 cyclin 들의 과발현이 이들 종양의 형성을 유발하였다는 것이 알려져 있다. 본 연구실에서의 림프종양에 있어서의 세포주기 조절물질의 발현에 대한 연구에 의하면 cyclin E가 low grade의 림프종양에서와는 달리 high grade에서는 과발현되며, 이 단백질의 발현 정도가 예후와도 관계가 있었다²¹.

본 연구의 결과로 볼 때 폐암에 있어서도 세포주기 조절 단백질들의 이상 과발현이 종양형성과 관계되어 있는 것을 알 수 있는데 특히 cyclin E의 과발현은 조사된 대부분의 경우에서 현저하였기 때문에 폐암에 대한 표지자로 활용될 수 있으며, 또한 anti-sense를 이용한 유전자치료법과 같은 새로운 치료법 개발을 위한 대상 유전자로 활용할 수 있을 것이다. 그러나 본 연구로 밝혀진 이들 세포주기조절 단백질들의 과발현이 유전자의 증폭(amplification)이나 유전자의 전좌(translocation)에

의한 것인 지에 대한 연구는 계속되어야 할 것이다. 또한 대부분의 폐암 조직에서 cyclin E가 과발현되어 있기 때문에 이것을 이용한 폐암의 조기진단을 위한 방안이 모색되어야 할 것으로 생각되는데 가장 손쉽고 경제적인 방법의 하나로 혈청에서의 ELISA를 통한 이 단백질의 정량이 가능할 것으로 사료된다. 유사한 시도로 현재 그 가능성이 연구되고 있는 p53 단백질의 경우는 혈청에서 측정이 가능하기 위해서는 이 단백질의 돌연변이에 의한 과발현이 필수적인 요소이나 대부분의 암들에서의 돌연변이 정도가 50% 이하이기 때문에 효율성에 문제가 있다 하겠다. 그러나 본 연구에서 밝혀진 바와 같이 cyclin E는 대부분의 폐암조직에서 과발현되어 있을 뿐만아니라 과발현 정도가 정상조직과 비교할 때 현저하기 때문에 혈청을 이용한 cyclin E의 정량 분석이 폐암의 진단에 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

폐암의 발생에 세포주기조절 단백질인 cyclin D1과 E 그리고 cdc2 및 cdk4의 이상 발현이 관련되어 있으며, 특히 cyclin E는 폐암에 대한 진단표지자로 사용될 수 있을 정도로 현저하게 과발현되어 있어 과발현의 기전을 규명하는 연구와, cyclin E의 과발현을 이용한 혈청 등에서의 ELISA를 통한 이 단백질의 확인 및 임상적인 의의에 대한 연구는 계속되어야 할 것이다.

참 고 문 헌

- Hunter T and J Pines: Cyclins and cancer. *Cell* 66: 1071-1074, 1991
- Hunter T: Oncogenes and cell proliferation. *Curr Opin Genet Dev* 3: 1-4, 1993
- Wang JX: Chenivisse, B. Henglein, and C. Brechot. Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature* 343: 555-557, 1990
- Quelle DE, RA, Ashmun SA, Shurleff J-Y, Kato D, Bar-Sagi MF, Roussel and CJ Sherr: Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev* 7: 1559-1571, 1993
- Motokura T, T Bloom, HG Kim, H Juppner, JV Ruderman, HM Kronenberg and A Arnold: A novel cyclin encoded by a bcl-1 linked candidate oncogene. *Nature* 350: 512-515, 1991
- Matsushime H, MF Roussel, RA Ashman and CJ Sherr: Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 65: 701-713, 1991
- Keyomarsi K, N O'Leary, G Molnar, E Lees, HJ Fingert, and AB Pardee: Cyclin E, a potential prognostic marker for breast cancer. *Cancer Res* 54: 380-385, 1994
- Gong J, B Ardel, F Traganos, Z Darzynkiewicz: Unscheduled expression of cyclin B1 and cyclin E in several leukemia and solid tumor cell lines. *Cancer Res* 54: 4285-4288, 1994.
- Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970
- Nobury C, Nurse P: Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem* 61: 441, 1992
- Fisher RP, Morgan DO: A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* 78: 713-724, 1994
- Makela TP, Tassan JP, Nigg EA, Frutiger S, Hughes, GJ, Weinberg RA: A cyclin associated with the CDK-activating kinase MO15. *Nature* 371: 254-257, 1994
- Nigg EA: Cellular substrates of p34cdc2 and its companion cyclin-dependent kinases. *Trends Cell Biol* 3: 296, 1993
- King RW, Jackson PK and Kirschner MW: Mitosis in transition. *Cell* 79: 563-571, 1994
- Sherr CJ: Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73: 1059-1065, 1993
- Sherr CJ: G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79: 551-555, 1994
- Xiong Y, Zhang H and Beach D: D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 71: 505-514, 1992
- Meyerson M and Harlow E: Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol* 14: 2077-2086, 1994
- Matsushime H, Quelle DE, Shurtleff SA, Shibuya M, Sherr CJ and Kato JY: D-type cyclin-dependent kinases activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 14: 2066-2076, 1994
- Dulic V, Lees E and Reed SI: Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science* 257: 1958-1961, 1992
- 김현수, 하만준, 강영모, 박광화, 박재후, 임호영, 김현주 및 김효철: Non-Hodgkin 림프종에서의 Cyclin E의 발현. *대한내과학회지* 47(suppl.1): 121, 1995