

# 간암 세포주 및 위암 세포주에서 Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Activated Gene (*NAG-1*)의 기능 연구

장태정

동국대학교 의과대학 병리학교실

접 수 : 2007년 4월 17일

게재승인 : 2007년 7월 3일

책임저자 : 장 태 정

우 780-714 경상북도 경주시 석장동 707

동국대학교 의과대학 병리학교실

전화: 054-770-2410

Fax: 054-770-2447

E-mail: taejung@mail.dongguk.ac.kr

\*본 논문은 한국학술진흥재단 선도연구자 사업 프로그램(KRF-2005-041-E0009)으로 이루어졌습니다.

## Study on the Function of *NAG-1* in Hepatocellular and Gastric Carcinoma Cells

Tae Jung Jang

Department of Pathology, Dongguk University College of Medicine, Kyungju, Korea

**Background :** Nonsteroidal anti-inflammatory drug activated gene (*NAG-1*) has proapoptotic activities in the colon and also in gastric cancer cells that lack any endogenous COX-2 expression. Recent studies have suggested that the proapoptotic activity of *NAG-1* is cell type specific. I investigated the cell proliferation, invasiveness and apoptosis in Hep3B cells and SNU719 cells by determining the different expression levels of *NAG-1*. In addition, I examined the gene profile in the Hep3B cells that have a stable expression of *NAG-1*. **Methods :** SNU719 cells and several clones of Hep3B cells with a stable expression of *NAG-1* were used. I reduced the expression level of *NAG-1* via the RNAi method. An Agilent Human 22k microarray was used for studying the gene profile in Hep3B cells that had a stable expression of *NAG-1*. **Results :** The expression level of *NAG-1* did not influence apoptosis, cell proliferation and invasiveness in Hep3B cells. There was no correlation between the reduction of the endogenous *NAG-1* expression and cell proliferation, including invasiveness, in the SNU719 cells. However, a knocked-down *NAG-1* expression protected against apoptosis in the SNU719 cells. The microarray analysis results showed that 0.25% (58/22,575) of the genes were induced or repressed more than three fold in the Hep3B cells that had a stable expression of *NAG-1*. **Conclusions :** Proapoptotic activity of *NAG-1* is found in gastric cancer cells, but not in hepatocellular cancer cells.

**Key Words :** *NAG-1*; Cancer cell lines; Apoptosis; Proliferation; Invasiveness

약물이나 천연물을 이용하여 발암 과정을 예방하거나 억제하는 것을 화학예방요법이라 한다. 이 중에서도 비스테로이드성 항염증 약물(nonsteroidal antiinflammatory drug, NSAID)로 여러 가지 암을 예방하고 치료하는 데 관한 임상적 역학적 연구가 광범위하게 이루어지고 있다. NSAID의 화학예방효과는 주로 cyclooxygenase (COX) 억제를 통해서 일어난다고 알려져 있다. 그러나 NSAID는 COX 억제와 무관하게 다양한 유전자의 발현을 변화시켜서 항암효과를 낼 수 있다.<sup>1,2</sup> 최근에 Eling 등<sup>3</sup>은 COX의 발현이 거의 없고 야생형 p53 단백질을 발현하는 대장암 세포주인 HCT-116에 NSAID를 투여하여, 세포자멸사를 조장하고 세포증식을 억제하는 효과를 내는 새로운 유전자인 NSAID-activated gene (*NAG-1*)을 새롭게 발견하였다. 염기서열을 분석한 결과 *NAG-1*은 placental transforming growth factor beta, macrophage inhibitory cytokine 1 (*MIC-1*), bone

morphogenic protein과 같은 유전자임이 증명되었으며, transforming growth factor-beta (*TGF-beta*) 계열에 속하는 유전자라는 것을 알게 되었다.<sup>3</sup> *TGF-beta* 계열의 유전자는 세포주기 중 G1 후기에 주로 작용하여 종양세포의 성장을 억제하며 세포자멸사를 조장하는 효과가 있다.<sup>4</sup> *NAG-1*은 대장암세포에서뿐만 아니라 COX-2가 거의 발현되지 않는 위암세포(SNU601)에서도 sulindac sulfide에 의한 세포자멸사 과정에서 death receptor-4 (DR-4) 및 DR-5 발현과 연관하여 중요한 작용을 한다고 보고되었다.<sup>5</sup> 최근에는 *NAG-1*과 같은 유전자인 *MIC-1*이 위암 세포주인 SNU216의 침윤능을 증가시킨다는 보고가 있었고, 여러 가지 위암세포에서 내재성 *NAG-1*의 발현이 관찰되었으며, 간암 세포주에서는 *NAG-1*이 세포자멸사에 관여하지 않는다는 보고도 있었다.<sup>6,7</sup> 이러한 연구결과는 *NAG-1*의 기능이 세포의 종류에 따라서 다를 수 있다는 것을 시사한다.

따라서 이번 연구에서는 간암 세포주인 Hep3B와 내인성 NAG-1을 발현하는 위암 세포주인 SNU719를 선택하여 NAG-1의 발현 정도에 따른 세포자멸사, 세포침윤능 그리고 세포증식능의 변화를 살펴보고 NAG-1 과발현에 따른 유전자 발현의 변화를 조사하여 간암 및 위암세포에서 NAG-1이 하는 기능을 알아보려고 한다.

## 재료와 방법

### 세포배양 및 시약

한국 세포주 은행에서 위암 세포주(SNU601, 668, 719, MK-N28)와 간암 세포주인 Hep3B를 구입하여 가습한 37°C의 5% CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 10% 우혈청(fetal bovine serum, FBS)과 gentamycin (10 µg/mL)이 들어 있는 RPMI 1640 배지로 배양하였다.

### NAG-1을 발현하는 Hep3B 세포클론 확립

Lipofectamine 2000 (Life Technologies Inc., CA, USA)을 이용하여 pcDNA3.1에 클로닝되어 있는 NAG-1 cDNA (gift from Dr. Baek, University of Tennessee)와 NAG-1 cDNA가 없는 pcDNA3.1를 Hep3B 세포에 삽입하였다. 그 방법을 요약하면 다음과 같다. 6 well에 세포밀집도가 90% 정도 일 때 DNA 4 µg을 항생제와 우혈청이 들어 있지 않은 세포배양액 250 µL로 희석하고 같은 배지 250 µL로 희석된 10 µL의 lipofectamine 2000과 섞어서 실온에서 20분간 반응시켰다. 그 후 세포에 삽입하고 24시간이 지난 후 유전자가 성공적으로 삽입된 세포를 선택하기 위하여 geneticin (Life Technologies Inc.) 600 µg/mL을 21일간 투여하였다. 그런 다음 제한희석 (limited dilution)법으로 NAG-1을 발현하는 클론들을 선택하였다.

### NAG-1 siRNA를 이용한 NAG-1 발현 저하

NAG-1와 음성대조군의 siRNA를 Bioneer 회사에 의뢰하여 제작하였다.

#### NAG-1<sup>8</sup>

sense 5-ACA UGC ACG CGC AGA UCA A-3  
antisense 3-UGU ACG UGC GCG UCU AGU U-5  
음성대조군

sense 5-CCU ACG CCA CCA AUU UCG U-3  
antisense 3-GGA UGC GGU GGU UAA AGC A-5

Lipofectamine 2000 (Life Technologies Inc.)를 이용하여 위암 세포주 SNU719와 지속적으로 NAG-1을 발현하는 간암 세포주 Hep3B 클론에 삽입하였다.

### 세포침윤능 측정

Boyden chamber 법을 이용한 collagen-based cell invasion chamber (24 well, Chemicon, Temecula, CA, USA)를 사용하여 종양세포의 침윤 능력을 판정하였다. 위쪽 공간에 1.25 × 10<sup>5</sup>세포/0.25 mL (혈청없는 배지)를 넣고 아래쪽 공간에는 10%의 우혈청이 들어 있는 배양액 0.5 mL를 넣고 37°C의 5% CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 24시간 배양하였다. 막의 위쪽에 있는 세포를 제거한 후 염색시약(Chemicon)으로 막 아래쪽에 있는 세포를 염색하였다. 그런 다음 세포추출 완충액(Chemicon)으로 염색약을 추출한 후 560 nm에서 광학농도를 측정하였다.

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 투여 후 세포자멸사 측정

혈청이 없는 배지에서 대조군 세포에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 0, 0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM, 8 mM씩 2시간 동안 반응시킨 뒤 일반 배지에서 24시간 동안 배양하였다. 그런 다음 유세포 분석기로 subG1에 속하는 세포의 수를 측정하였다. 4 mM까지는 농도 의존적으로 subG1에 속하는 세포의 수가 증가하다가 8 mM에서는 감소하였다. 따라서 4 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 해당 세포주에 반응 시켜서 유세포 분석기로 subG1에 속하는 세포의 수를 측정 후 0 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>때 subG1에 속하는 세포의 수를 참고하여 증가 비율을 서로 비교하였다

### 세포증식능 측정

5-bromo-2'-deoxyuridine labeling detection kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)을 이용하여 370 nm에서 광학농도를 측정하였다.

### Western blot

세포를 단백질 분해효소 억제제(Roche Applied Science)가 포함되어 있는 4°C 용해 완충액[1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH7.4), 0.1% SDS, 1 mM EDTA]에 넣고 얼음 속에서 60분간 반응시킨 후 4°C에서 14,000 rpm으로 30분간 원심분리시킨다. 상층액을 추출하여 BCA법(Pierce, Rockford, IL, USA)으로 단백질의 양을 측정하였다. 40 µg의 단백질을 sample buffer [125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol 0.05% bromophenol blue]에 넣고 95°C에서 5분간 끓인 후 12% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동시켰다. Nitrocellulose membrane

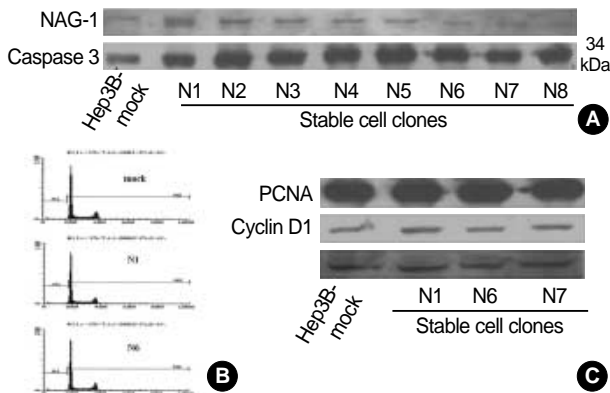
(Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA)에 transfer 시킨 후 5% skim milk (in TBS-0.05% Tween 20)로 실온에서 1시간 동안 비특이 반응을 억제하고 4°C에서 18시간 동안 일차 항체와 반응시켰다. TBS-0.05% Tween 20으로 세척한 후 이차 항체로 1시간 동안 반응시킨 다음 TBS-0.05% Tween 20으로 세척하고 chemiluminescence reagent (Pierce)로 발색하고 현상하였다. 실험에 사용된 일차 항체는 NAG-1 (1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Upstate, Charlottesville, VA, USA), caspase-3 (1:500, Upstate), PCNA (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA) cyclin D1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) 그리고 beta-actin (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) 등이다.

### cDNA microarray 분석

RNA 추출 kit (Sigma Chemical Co., MO, USA)를 이용하여 NAG-1을 지속적으로 발현하고 있는 Hep3B 클론과 대조군 Hep3B 세포에서 각각 RNA를 획득한 후 Digital Genomics (Seoul, Korea)에 분석을 의뢰하였다. 유전자 발현이 3배 이상 차이가 나는 유전자를 NAG-1에 의해 발현에 의미 있는 영향을 받는 유전자로 판단하였다.

### 통계학적 분석

지수는 평균±표준편차로 표시하였고, Kruskal Wallis test 및 Mann-Whitney test를 실시하여 p값이 0.05 이하인 경우를 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다.



**Fig. 1.** Apoptosis and proliferation of the Hep3B cells with stable expression of NAG-1. (A) Western blot analysis of NAG-1 and caspase 3. Forty  $\mu\text{g}$  of protein was separated by 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane. (B) the measurement of subG1 population by flow cytometry in mock, N1 clones and N6 clones. (C) Western blot analysis of PCNA and cyclin D1, 40  $\mu\text{g}$  of protein was separated by 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane. The bottom represents beta actin, which was used as a loading control.

## 결 과

### Hep3B 세포주에서 NAG-1의 지속적 발현으로 인한 세포자멸사, 세포침윤능과 세포증식능의 변화

Geneticin을 투여하여 NAG-1을 강하게 발현하는 Hep3B 클론 5개와 대조군 세포와 비슷하게 발현하는 클론 3개를 확립하였다(Fig. 1A). 세포자멸사를 분석하기 위해 NAG-1을 강하게 발현하는 클론(N1)과 NAG-1 발현이 미약한 클론(N6)을 선택하여 유세포 분석기로 subG1에 들어 있는 세포를 분석하였다. NAG-1의 발현 유무나 발현 정도와 subG1에 들어 있는 세포의 수 사이에는 상관관계가 없었다(Fig. 1B). Western blot 검사에서 procaspase-3의 발현이 NAG-1 발현과 연관하여 감소하지 않았으며 활성화된 caspase-3 분절이 관찰되지 않았다(Fig. 1A). 세포침윤능과 세포증식능은 NAG-1 발현 유무나 발현 정도와 상관관계가 없었다(Table 1). Western blot 검사에서도 NAG-1 발현에 따라 cyclin D1과 PCNA 발현에 변화가 나타나지 않았다(Fig. 1C).

### 지속적으로 NAG-1이 발현되는 Hep3B 세포주에 NAG-1 siRNA를 이용한 NAG-1 발현 감소에 따른 세포침윤능과 세포증식능 조사

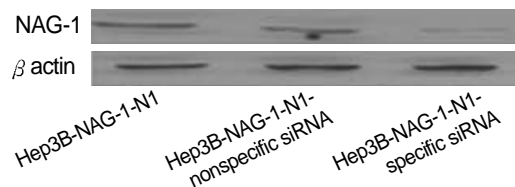
NAG-1을 강하게 발현하는 N1 클론에서 NAG-1의 siRNA 40 nM을 삽입하고 24시간 후 NAG-1의 발현을 조사하였다. 비특이 siRNA를 삽입한 음성대조군과 N1 클론에 비하여 NAG-1에 siRNA를 삽입한 세포(NAG-1-N1-specific siRNA)에서

**Table 1.** Invasiveness and proliferation of mock and Hep3B-NAG-1 (N1, N6, N7)

	Mock	N1 clone	N6 clone	N7 clone
Invasiveness*	0.27±0.10	0.27±0.05	0.30±0.13	0.34±0.13
Proliferation†	0.41±0.08	0.39±0.11	0.39±0.11	0.39±0.09

\*†, p>0.05.

The data was got from six experiments.



**Fig. 2.** Down-expression of NAG-1 in the Hep3B cells with stable expression of NAG-1 via the siRNA method. Western blot analysis of NAG-1 in the N1 clone and N1 clone transfected with nonspecific siRNA and NAG-1 siRNA. Forty  $\mu\text{g}$  of protein was separated by 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane. The bottom represents beta actin, which was used as a loading control.

NAG-1의 발현이 현저하게 감소하였다(Fig. 2). 세포침윤능과 세포증식능에는 이와 같은 NAG-1 발현의 감소로 인한 의미 있는 변화가 관찰되지 않았다(Table 2). 또 세포자멸사 역시 감소하거나 증가하지 않았다(data not shown). 세포자멸사를 유도하기 위해 4 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 반응시키자 subG1에 속하는 세포의 수는 대조군에서는 4.22±1.53배, N1에서는 3.94±1.33배 그리고 NAG-1-N1-specific siRNA는 4.54±0.55배씩 증가하였다(Fig. 3). 즉 세포자멸사를 유도하는 자극을 주었을 때도

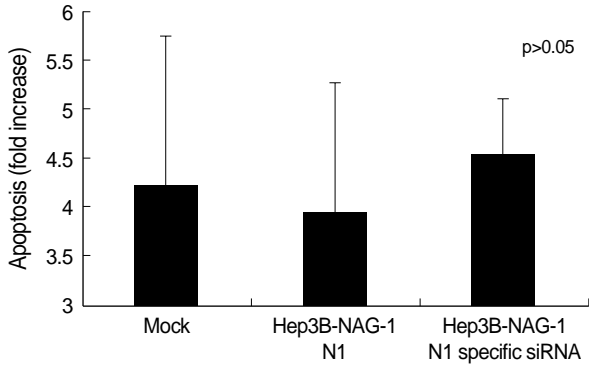


Fig. 3. Measurement of subG1 population of mock, Hep3B-N1 clone and Hep3B-NAG-1-N1 specific siRNA under 4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimuli for 2 h. There is no significant difference in fold increase of apoptosis among the cell groups (p>0.05).

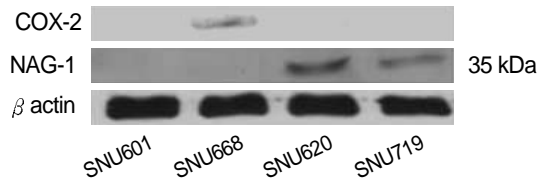


Fig. 4. Western blot analysis of COX-2 and NAG-1 expression in various gastric cancer cell lines. Forty  $\mu$ g of protein was separated by 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane. The bottom represents beta actin, which was used as a loading control.

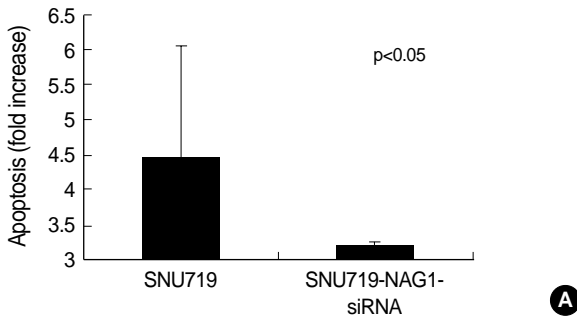


Fig. 6. Apoptosis of the SNU 719 cells and the SNU719 cells transfected with NAG-1 siRNA under 4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimuli for 2 h. (A) Fold increase of subG1 population is significantly higher in the SNU719 cells than in the cells transfected with NAG-1 siRNA (p<0.05). (B) Western blot analysis of endogenous NAG-1 and caspase-3 in the SNU719 cells and the SNU719 cells transfected with NAG-1 siRNA. Forty  $\mu$ g of protein was separated by 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane. The bottom represents beta actin, which was used as a loading control.

Hep3B 세포주에서는 NAG-1의 발현과 세포자멸사 사이에 관련이 없음을 알 수 있었다

**SNU719 세포주에서 NAG-1 siRNA를 이용한 NAG-1의 발현 감소에 따른 세포자멸사, 세포증식능과 세포침윤능의 변화**

네 종류의 위암 세포주 SNU601, SNU668, SNU620, SNU-

Table 2. Invasiveness and proliferation of Hep3B-NAG-1 (N1) and siRNA (NAG-1-N1 specific siRNA and NAG-1-N1 nonspecific siRNA)

	N1	NAG-1-N1 specific siRNA	NAG-1-N1 nonspecific siRNA
Invasiveness*	0.50±0.24	0.43±0.09	0.44±0.11
Proliferation†	0.58±0.16	0.54±0.10	0.53±0.07

\*,†, p>0.05. The data was got from six experiments.

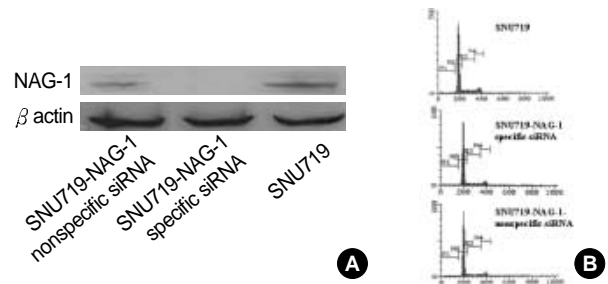


Fig. 5. Down-expression of endogenous NAG-1 in the SNU719 cells by siRNA and measurement of subG1 population. (A) Western blot analysis of endogenous NAG-1 in the SNU719 cells and the SNU719 cells transfected with nonspecific siRNA and NAG-1 siRNA. Forty  $\mu$ g of protein was separated by 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane. The bottom represents beta actin, which was used as a loading control. (B) SubG1 population is nearly absent in the three groups.

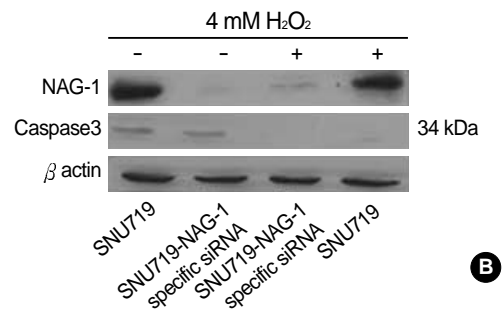


Fig. 6. Apoptosis of the SNU 719 cells and the SNU719 cells transfected with NAG-1 siRNA under 4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimuli for 2 h. (A) Fold increase of subG1 population is significantly higher in the SNU719 cells than in the cells transfected with NAG-1 siRNA (p<0.05). (B) Western blot analysis of endogenous NAG-1 and caspase-3 in the SNU719 cells and the SNU719 cells transfected with NAG-1 siRNA. Forty  $\mu$ g of protein was separated by 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane. The bottom represents beta actin, which was used as a loading control.

**Table 3.** Invasiveness and proliferation of SNU719 according to down-expression of NAG-1

	SNU719-NAG-1 specific siRNA	SNU719
Invasiveness*	0.41±0.05	0.43±0.09
Proliferation†	0.55±0.09	0.57±0.56

\*†, p>0.05.

The data was got from six experiments.

**Table 4.** Genes upregulated by the overexpression of NAG-1 in the Hep3B cells

Gene name	Fold increase	Gene bank no.
Aldo-keto reductase family 1, member C2	10.47	NM-001353
Aldo-keto reductase family 1, member C3	8.84	NM-003739
Glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)	5.59	NM-002083
Laminin, alpha 4	5.23	NM-002290
UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A9	4.26	NM-001072
Major histocompatibility complex, class II, DR beta 1	4.05	NM-022555
Transducin-like enhancer of split 3	3.78	NM-005078
Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	3.69	NM-001402
Brain expressed, X-linked 1	3.67	NM-018476
Major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	3.52	M57650
Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1	3.48	NM-002121
GDP-mannose 4,6-dehydratase	3.12	NM-001500
	3.01	BC000228

719 가운데 SNU620 및 SNU719 세포주에서 내인성 NAG-1이 발현되었다(Fig. 4). SNU719 세포에 NAG-1 siRNA를 삽입하여 내인성 NAG-1의 발현을 감소시켰다. 비특이 siRNA를 투여한 음성 대조군(SNU719-NAG-1 nonspecific siRNA)과 siRNA를 삽입하지 않은 세포주에 비하여 NAG-1에 siRNA를 투여한 세포(SNU719-NAG-1 specific siRNA)에서 NAG-1의 발현이 현저하게 감소하였다(Fig. 5A). NAG-1 발현이 감소했을 때 subG1에 속하는 세포를 유세포 분석기로 관찰하였는데 NAG-1 발현 감소가 세포자멸사를 증가시키거나 감소시키지 않았다(Fig. 5B). 0 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 비하여 4 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 반응시킨 경우 subG1에 속하는 세포의 수가 NAG-1 siRNA가 삽입되지 않은 SNU719 세포에서는 4.50±1.55배, NAG-1 siRNA가 삽입된 SNU719 세포에서는 3.22±0.06배 증가하였다. 즉 sub-G1에 속하는 세포의 수가 NAG-1 siRNA 삽입으로 통계적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 6A, p<0.05). Western blot 검사 결과 procaspase-3의 발현이 4 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 반응한 세포(SNU-719-NAG-1 specific siRNA와 SNU719)에서 감소하였지만 발현 감소의 정도에 차이는 없었다(Fig. 6B). SNU719 세포에서 내인성 NAG-1의 발현 감소로 인한 세포증식능과 세포침윤능에

**Table 5.** Genes downregulated by the overexpression of NAG-1 in the Hep3B cells

Gene name	Fold decrease	Gene bank no.
Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 13	0.01	NM-02391
Ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 1B	0.01	NM-18167
	0.01	A23P58157
Zinc finger protein 680	0.10	NM-178558
Transcription factor CP2	0.11	NM-005653
Neurotensin	0.14	NM-006183
COX17 cytochrome c oxidase assembly homog (S. cerevisiae)	0.16	NM-005694
Hypothetical protein FLJ22662	0.17	NM-024829
Insulin-like growth factor binding protein 7	0.17	NM-001553
LETM1 domain containing 1	0.18	NM-014033
Butyrophilin, subfamily 2, member A1	0.19	NM-078476
Natural cytotoxicity triggering receptor 1	0.20	NM-004829
Family with sequence similarity 20, member A	0.20	NM-017565
Natriuretic peptide precursor B	0.21	NM-002521
Glycine receptor, beta	0.21	NM-000824
Zinc finger protein 257	0.22	NM-033468
	0.22	THC2434786
	0.23	AK000420
	0.23	THC2377230
ATP-binding cassette sub-family A (ABC1), member 10	0.23	NM-080282
Serine peptidase inhibitor, Kazal type 1	0.24	NM-003122
Chromosome 15 open reading frame 5	0.26	NM-030944
Transcription elongation factor A (SII), 3	0.26	NM-003196
	0.27	NM-152472
Platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide	0.27	NM-002609
	0.28	A23P125301
	0.28	A23P125016
Polymerase (DNA directed ) iota	0.28	NM-007195
Synaptonemal complex protein 2	0.28	NM-014258
Coiled-coil domain containing 68	0.28	NM-025214
Histone 1, H3i	0.29	NM-003533
Zinc finger protein 85	0.29	NM-003429
	0.29	A23P66371
Lumican	0.30	NM-002345
Zinc finger protein 667	0.31	NM-022103
Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 3	0.31	NM-153377
Cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA, subunit 2, 64 kDa, tau variant	0.31	NM-015235
Zinc finger protein 442	0.31	NM-030824
Estrogen-related receptor gamma	0.31	NM-206594
Sal-like 1 (Drosophila)	0.32	NM-002968
		ENST
		00000267
	0.32	368
	0.32	THC2337941
ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 10	0.32	NM-080282
Zinc finger protein 588	0.32	NM-016220
Leprecan-like 1	0.33	NM-018192

변화가 일어나지 않았음을 알 수 있었다(Table 3).

### NAG-1을 지속적으로 발현하는 Hep3B-N1 clone 1 클론에서 유전자 발현

Hep3B-N1 clone 1 세포주에서 대조군 세포에 비하여 3배 이상 발현이 증가한 유전자는 13개였고, 3배 이상 감소한 유전자는 45개였다(Table 4, 5).

## 고찰

최근에 세포의 종류에 따라서 NAG-1이 하는 기능이 다르다는 연구가 있었기 때문에<sup>6,7</sup>, 간암 세포주인 Hep3B와 내인성 NAG-1을 발현하는 위암 세포주인 SNU719를 선택하여 NAG-1의 발현 정도에 따라 세포자멸사, 세포침윤능 그리고 세포증식능의 변화 및 NAG-1 과발현에 따른 유전자 발현의 변화를 조사하였다. 위암 세포주인 SNU601이나 대장암 세포주인 HCT-116에서는 NAG-1에 의한 세포자멸사 효과 때문에 NAG-1을 지속적으로 발현하는 세포주를 획득할 수 없었으나<sup>3,5</sup>, 이 연구에서는 내재성 NAG-1의 발현이 빈약한 간암 세포주인 Hep3B 세포주에서 genetin을 이용하여 NAG-1을 지속적으로 발현하는 클론을 획득할 수 있었다. 이러한 결과는 NAG-1 그 자체가 Hep3B 세포주에서는 세포자멸사를 유발하지 않는다는 것을 시사한다. 이는 최근에 연구된 Hep3B 세포주에서 NAG-1의 일시적인 발현 유도가 세포자멸사를 일으키지 않는다는 연구 결과와 일치한다.<sup>7</sup> 이 연구에서도 다시 이러한 사실을 확인하기 위해서 NAG-1의 발현 정도에 따라 세포자멸사를 측정하였으나 NAG-1을 강하게 발현하는 클론(N1)과 약하게 발현하는 클론(N6)에서 세포자멸사에 변화가 없었다. 또 NAG-1에 siRNA를 삽입하여 N1 클론에서 NAG-1의 발현을 감소시킨 후 세포자멸사에 변화가 일어나는지 조사하였지만 역시 의미 있는 결과를 발견할 수 없었다. 그러나 위암 및 대장암 세포주에서 NAG-1이 세포자멸사와 밀접한 관련이 있다고 알려져 있기 때문에, 세포자멸사를 유도하는 자극이 있을 경우 NAG-1의 발현 정도와 세포자멸사 사이에 관련이 있을 것으로 추측할 수 있다.<sup>3,5</sup> 4 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 이용하여 세포자멸사를 유발한 경우에는 대조군 세포, N1 클론 그리고 siRNA 삽입을 통하여 NAG-1의 발현이 감소한 N1 클론에서 세포자멸사가 발생하였다. 그렇지만 NAG-1 발현 정도에 따라 세포자멸사 발생 정도에 의미 있는 차이는 나타나지 않았다. 이상의 결과로 NAG-1은 Hep3B 세포에서는 세포자멸사와 관련이 없음을 알 수 있었다. 그러나 흥미롭게도 위암 세포주인 SNU719 세포에서는 NAG-1에 의해서 세포자멸사가 더욱 조장되었다(Fig. 6A). NAG-1이 세포자멸사에 미치는 효과가 세포의 종류에 따라 다른 이유는 더 많은 연구를 통해서 밝혀야 할 것으로 생각한다. 그러나 한 가지 가능한 설

명은, NAG-1은 TGF-beta 계열의 유전자이고 TGF-beta 계열의 유전자는 세포주기 중 G1 후기에 주로 작용하여 종양세포의 성장을 억제하며 세포자멸사를 조장하는 효과가 있지만 세포 종류에 따라 다른 효과를 보일 수 있다는 사실이다.<sup>4</sup>

NAG-1과 같은 유전자인 MIC-1은 위암 세포주인 SNU216의 침윤능을 증가시킨다고 보고된 바 있다.<sup>6</sup> 암의 세포증식능이 증가할수록 주위 조직으로 침윤할 수 있는 세포 또는 원격전이할 수 있는 세포가 출현할 확률이 증가하기 때문에 세포침윤능은 세포증식능과 밀접한 관련이 있다. 따라서 Hep3B 세포주 및 SNU719 세포주에서 NAG-1 발현과 세포침윤능 및 증식능의 관계를 살펴보았다. 그러나 NAG-1 발현 정도에 따른 세포 침윤능과 세포증식능의 차이는 관찰할 수 없었다.

Hep3B 세포에서 NAG-1이 하는 기능을 더욱 깊이 연구하기 위해서는 NAG-1의 과발현에 의해서 변화하는 유전자를 분석할 필요가 있다고 생각한다. Hep3B-N1 클론에서 가장 많이 발현되는 유전자는 aldo keto reductase (AKR)였다. AKR은 외인성 탄소화합물, 스테로이드, 프로스타글란딘의 대사에 관여하며, 또한 스테로이드 수용체나 peroxisome proliferator-activated receptor (PPARgamma)와 같은 핵수용체를 조절할 수 있고, 사람과 설치류의 지방암, 전립선암, 대장암, 폐암 그리고 간암의 발암에 관여한다고 알려져 있다.<sup>9-11</sup> 최근에 AKR family 1, C3의 작용이 NSAID에 의해서 차단되어서 사람의 골수성 백혈병 세포주인 HL-60의 분화가 일어난다고 보고된 바 있다.<sup>9</sup> 이러한 현상은 NSAID의 COX 억제와 무관한 화학예방효과 기전의 하나로 간주되고 있다. Laminin은 기저막의 주요한 당단백으로 세포접착, 분화, 이주, 전이 등에 중요한 작용을 한다.<sup>12</sup> 그러나 N1 클론과 대조군 세포에서 laminin과 결합할 수 있는 유전자의 발현에 유의한 차이를 발견할 수 없었고 더욱이 세포침윤능과 NAG-1 발현 정도 사이에 유의한 관련성을 발견할 수 없었기 때문에, NAG-1 과발현에 따라 laminin 유전자의 발현이 증가하는 이유를 밝히기 위해서는 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각한다. Glutathione peroxidase 2는 항산화제 역할을 하는데, 항산화제는 발암 과정을 억제하는 역할이 있다고 알려져 있지만 한편으로는 형질 전환된 암세포에서 항산화제의 발현 증가는 자유 라디칼의 손상을 극복할 수도 있다.<sup>13,14</sup> 즉 자유라디칼을 통해서 암세포를 살상하는 약제의 효과가, NAG-1에 의하여 증가한 glutathione peroxidase 2에 의해 억제될 가능성이 있다.

Hep3B-N1 세포주에서 발현이 감소한 유전자들 중에는 유전자의 전사를 조절하는 기능을 하는 zinc finger protein 계열의 유전자가 가장 많았다. 특히 zinc finger protein 680은 Epstein-Barr virus에 감염된 B 림프구의 암 형질 전환에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.<sup>15</sup> 중추신경계뿐 아니라 여러 부위에 존재하는 neurotensin은 위장관계에서 세포 성장, 분비, 위장관 운동성 그리고 장내 염증에 관여한다고 보고되었으며, 최근에는 대장암에서 early growth response gene-1과 epidermal growth factor receptor을 자극하여 대장암의 발생에 관여하는 것으로

알려졌다.<sup>16</sup> 또 neurotensin은 N-nitrosomorpholine에 의한 흰쥐의 간암 발생 과정을 촉진한다고 보고되었다.<sup>17</sup> 미토콘드리아의 호흡연쇄의 말단 부위의 환원형 cytochrome c에서 산소에 전자를 운반하는 cytochrome c oxidase assembly protein (COX17)은 폐암의 발생 과정에 관여한다고 보고되었다.<sup>18</sup> 유방암의 중앙 유전자로 알려진 LETM1 domain containing 1과 자연살해세포(natural killer cell)의 세포자멸사에 관여하는 natural cytotoxicity triggering receptor 1의 발현 감소는 암세포의 성장 억제 및 암세포에 대한 자연살해세포의 면역반응이 증가할 수 있다는 것을 의미한다.<sup>19,20</sup> 한편 설치류에서 SV40 T/t 항원으로 유발되는 간암의 발암 모델에서 insulin-like growth factor binding protein 7이 발현 감소가 관찰되었다.<sup>21</sup> 즉 NAG-1 발현 증가가 zinc finger protein, neurotensin, COX17, LETM1 domain containing 1, 그리고 natural cytotoxicity triggering receptor 1 유전자들의 발현을 감소시켜 발암 과정이나 암세포의 성장을 억제할 수 있지만 insulin-like growth factor binding protein 7 유전자의 발현 감소를 통해서 암세포의 성장을 촉진할 수도 있다.

결론적으로 NAG-1과 세포자멸사의 관계는 세포의 종류에 따라서 다르다. Hep3B 세포주에서 NAG-1이 하는 기능을 밝히기 위해서는 본 연구에서 조사한 유전자들과 NAG-1의 관계를 규명해야 한다고 생각한다.

## 참고문헌

- Goel A, Chang DK, Ricciardiello L, Gasche C, Boland CR. A novel mechanism for aspirin-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 383-90.
- Hanif R, Pittas A, Feng Y, *et al.* Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway. *Biochem Pharmacol* 1996; 52: 237-45.
- Baek SJ, Kim KS, Nixon JB, Wilson LG, Eling TE. Cyclooxygenase inhibitors regulate the expression of a TGF- $\beta$  superfamily member that has proapoptotic and antitumorigenic activities. *Mol Pharmacol* 2001; 59: 901-8.
- Wakefield LM, Roberts AB. TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12: 22-9.
- Jang TJ, Kang HJ, Kim JR, Yang CH. Nonsteroidal anti-inflammatory drug activated gene (NAG-1) expression is closely related to death receptor-4 and -5 induction, which may explain sulindac sulfide induced gastric cancer cell apoptosis. *Carcinogenesis* 2004; 25: 1853-8.
- Lee DH, Yang Y, Lee SJ, *et al.* Macrophage inhibitory cytokine-1 induces the invasiveness of gastric cancer cells by up-regulating the urokinase-type plasminogen activator system. *Cancer Res* 2003; 63: 4648-55.
- Jang TJ, Kim NI, Lee CH. Proapoptotic activity of NAG-1 is cell type specific and not related to COX-2 expression. *Apoptosis* 2006; 11: 1131-8.
- Shim M, Eling TE. Protein kinase C-dependent regulation of NAG-1/placental bone morphogenic protein/MIC-1 expression in LNCaP prostate carcinoma cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 18636-42.
- Bauman DR, Rudnick SI, Szewczuk LM, Jin Y, Gopishetty S, Penning TM. Development of nonsteroidal anti-inflammatory drug analogs and steroid carboxylates selective for human Aldo-Keto reductase isoforms: potential antineoplastic agents that work independently of cyclooxygenase isozymes. *Mol Pharmacol* 2005; 67: 60-8.
- Jin J, Krishack PA, Cao D. Role of Aldo-Keto reductases in development of prostate and breast cancer. *Front Biosci* 2006; 11: 2767-73.
- Scuric Z, Stain SC, Anderson WF, Hwang JJ. New member of Aldose reductase family proteins overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998; 27: 943-50.
- Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the seed and soil hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 453-8.
- Alia M, Ramos S, Mateos R, Granado-Serrano AB, Bravo L, Goya L. Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tetra-butyl hydroperoxide. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 212: 110-8.
- Ramakrishnan G, Raghavendran HR, Vinodhkumar R, Devaki T. Suppression of N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis by silymarin in rats. *Chem Biol Interact* 2006; 161: 104-14.
- Tune CE, Pilon M, Saiki Y, Dosch HM. Sustained expression of the novel EBV-induced zinc finger gene, ZNFEB, is critical for the transition of B lymphocyte activation to oncogenic growth transformation. *J Immunol* 2002; 168: 680-8.
- Zhao D, Zhan Y, Zeng H, Koon HW, Moyer MP, Pothoulakis C. Neurotensin stimulates expression of early growth response gene-1 and EGF receptor through MAP kinase activation in human colonic epithelial cells. *Int J Cancer* 2007; 120: 1652-6.
- Nakaizumi A, Uehara H, Baba M, Iishi H, Tatsuta M. Enhancement by neurotensin of hepatocarcinogenesis by N-nitrosomorpholine in Sprague-Dawley rats. *Cancer Lett* 1996; 110: 57-61.
- Suzuki C, Daigo Y, Kikuchi T, Katagiri T, Nakamura Y. Identification of COX17 as a therapeutic target for non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 7038-41.
- Jung SS, Park HS, Lee JJ, *et al.* The HCCR oncoprotein as a biomarker for human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 7700-8.
- Poggi A, Massaro AM, Negrini S, Contini P, Zocchi MR. Tumor-induced apoptosis of human IL-2-activated NK cells: role of natural cytotoxicity receptors. *J Immunol* 2005; 174: 2653-60.

21. Komatsu S, Okazaki Y, Tateno M, *et al.* Methylation and downregulated expression of mac25/insulin-like growth factor binding protein-7 is associated with liver tumorigenesis in SV40T/t antigen

transgenic mice, screened by restriction landmark genomic scanning for methylation (RLGS-M). *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 267: 109-17.