

백서 C6 뇌교종세포주에서  
dexamethasone에 의한 camptothecin  
유도 세포고사 억제 기전

연세대학교 대학원

의 학 과

조 재 호

백서 C6 뇌교종세포주에서  
dexamethasone 의한 camptothecin 유도  
세포고사 억제 기전

지도 서 창 옥 교수

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2005 년 12 월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

조 재 호

# 조재호의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 대학원

2005 년 12 월 일

## 감사의 글

실험의 시작부터 논문이 완성되기까지 여러 가지 어려움이 따랐지만 어려운 순간들을 그때마다 지혜롭게 극복하여 이 시간까지 올 수 있도록 인도하여 주신 내 주 하나님께 참으로 영광을 돌립니다. 부족한 저에게 항상 세심한 배려와 올바른 판단으로 오늘의 이 논문이 최종적으로 완성되도록 지도하여 주신 서창욱 교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 또한 방사선종양학을 시작하면서 지금까지 가까이에서 너무나도 큰 사랑과 격려를 늘 베풀어주신 김귀언 암센터 원장님께 머리 숙여 감사드립니다. 논문의 연구방향과 문제점에 대해서 냉철한 지적과 조언을 해 주셔서 본 논문을 보다 높은 수준으로 끌어주신 김건홍 교수님, 신전수 교수님, 김동석 교수님, 라선영 교수님께도 큰 감사를 드립니다. 본 실험에서 필요했던 dominant negative STAT5 adenovirus, AdStat5aΔ740을 친절히 제공하여 주신 Hiroko Yamshita (Nagoya City University Graduate School of Medical Science, Nagoya, Japan) 교수님께도 진심으로 감사드립니다. 항상 곁에서 큰 힘이 되어주시는 성진실 교수님, 이창걸 교수님, 금기창 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 그리고 환자 진료 및 과내 여러 일들을 열정으로 헌신하며 일하는 후배 이익재 강사, 심수정 강사에게도 큰 고마움을 전합니다. 환자 진료에 여념이 없는 우리 사랑하는 후배 의국원들 및 방사선치료실, 물리실, 간호부 선생님들에게도 심심한 감사를 드립니다. 이외에도 일일이 열거하지는 못하나 여러 모양으로 지도, 격려, 후원을 해 주신 모든 분들께 머리 숙여 감사드립니다.

가장 가까운 곁에서 사랑으로 내조하는 아내, 그 얼굴의 아름다운 미소가 이 세상 무엇보다도 큰 감사와 희열이 되는 큰 딸 희원이와 둘째 딸 희지, 이 가정의 근본이 되시는 부모님들, 믿음 안에서 서로 격려하는 누나와 동생에게 참 감사함으로 이 논문을 드립니다.

저자 씀

# 차 례

그림 차례 .....	iii
국문 요약 .....	1
I. 서론 .....	3
II. 재료 및 방법 .....	7
1. 재료 .....	7
2. 세포 배양 .....	7
3. 세포에 대한 약물치료 .....	7
4. Caspase-3 활성화도 측정 .....	8
5. DNA 분절화 분석 .....	9
6. Dominant negative STAT5 adenovirus, AdStat5a $\Delta$ 740 .....	9
7. Western blot 분석 .....	10
8. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) .....	11
9. Co-immunoprecipitation .....	11
III. 결과 .....	13
1. Dexamethasone에 의한 camptothecin 유도 세포고사 억제 .....	13
2. Dexamethasone 투여 후 시간에 따른 점차적인 Bcl-xL 증가 및 이에 상응하는 세포고사 억제 정도의 시간대별 변화 .....	15
3. Dexamethasone에 의한 camptothecin 유도 세포고사 억제의 glucocorticoid receptor에 의한 매개 .....	16

4. Dexamethasone에 의해 증가된 Bcl-xL의 camptothecin에 의한 감소 .....	18
5. Camptothecin 유도 세포고사 억제에 관여하는 Bcl-xL에 대한 신호전달체계상 상위조절자로서의 STAT5 .....	19
가. Dexamethasone에 의한 STAT5 활성화 및 DNA 결합능 증가 .....	20
나. Dominant negative STAT5 adenovirus, AdStat5a $\Delta$ 740에 의한 Bcl-xL 발현 감소 .....	21
6. Dexamethasone 투여 후 glucocorticoid receptor와 인산화된 STAT의 물리적 결합 .....	22
IV. 고찰 .....	25
V. 결론 .....	30
참고문헌 .....	31
영문요약 .....	38

## 그림 차례

그림 1. Hypothesis .....	6
그림 2. Dexamethasone에 의한 camptothecin 유도 Caspase-3 specific activity의 감소 .....	13
그림 3. Camptothecin 처리에 의한 nucleosome의 증가 및 dexamethasone 전처치에 의한 역전 .....	14
그림 4. Dexamethasone 노출 시간에 따른 Bcl-xL의 변화 .....	15
그림 5. Dexamethasone 노출시간에 따른 DNA 분절화 억제 정도 변화 .....	16
그림 6. RU486 전처치에 의한 dexamethasone의 세포고사 억제 기능 소실 .....	17
그림 7. Dexamethasone, camptothecin 및 RU486 등의 처치 및 이들의 조합에 따른 Bcl-xL의 변화 .....	18
그림 8. Dexamethasone에 의한 뇌교종세포주(C6)에서 인산화된 STAT5 증가 .....	19
그림 9. EMSA를 이용한 Dexamethasone의 노출시간에 따른 STAT5의 DNA binding activity 변화 .....	20
그림 10. Dominant negative STAT5 adenovirus, AdStat5aΔ740 감염에 의한 Bcl-xL 발현 감소 .....	22
그림 11. Dexamethasone 투여 후 발현이 증가된 인산화 STAT5의 glucocorticoid receptor antagonist 전처치에 의한 감소 .....	23

그림 12. Glucocorticoid receptor 와 인산화된 STAT5에 대한 Co-immunoprecipitation .....	24
그림 13. Dexamethasone에 대한 노출시간대별 Bcl-xL, 인산화된 STAT5 및 Camptothecin에 의한 세포고사 억제의 상대적 비교 .....	29



## 국문요약

### 백서 C6 뇌교종세포주에서 dexamethasone에 의한 camptothecin 유도 세포고사 억제 기전

중추신경계 종양의 50%를 차지하며 성인에서 가장 호발하는 악성교종은 수술, 항암제 및 방사선치료의 다병합요법에도 높은 재발률로 매우 불량한 예후를 보인다. 이는 종양 세포 자체 및 외적인 요소 등의 다양한 내성 기전에 의한 것으로 이들 내성 기전에 대한 연구는 질병의 완치율을 높이기 위해 필수적이다. 최근 뇌교종세포에서 dexamethasone이 camptothecin의 세포고사(apoptosis) 유도 효과를 감소시키며, 동시에 세포 생존신호인 Bcl-xL 상승을 동반함이 밝혀졌다. 임상에서 뇌종양 환자에서 부종을 감소시키기 위해 늘 쓰이고 있는 스테로이드가 세포내 anti-apoptotic signal인 Bcl-xL 발현을 증가시키는 것은 항암제나 방사선과 같이 세포고사를 유도하는 치료법의 암세포 사멸효과를 저하시키는 역할을 할 수 있다는 점에서 중요한 의미를 가진다고 할 수 있다. 따라서 본 논문은 뇌교종 세포에서 스테로이드 투여 후 Bcl-xL 발현 증가를 위한 세포내 신호전달 과정상 상위전사조절물질들에 대한 연구를 통해 dexamethasone에 의해 camptothecin 유도 세포고사가 억제되는 전체적인 신호전달 기전을 규명하고자 하였다.

뇌교종세포주인 백서 C6 교종세포를 대상으로 실험을 진행하였으며, 세포고사 유도를 위해 camptothecin 2  $\mu\text{M}$ 을 배지에 첨가하였다. Camptothecin에 의해 유도되는 세포고사의 확인 및 정량적 분석을 위해서 caspase-3 특이 활성도를 측정하는 CaspACE<sup>TM</sup>®(Promega, Madison, USA) system 과 DNA 분절 정도를 확인하는 Cell Death Detection ELISA Plus Kit®(Roche, Mannheim, Germany)를 이용하였다. Camptothecin에 의해 증가되었던 caspase-3 특이 활성도 및 DNA 분절 현상은 dexamethasone 전처치로 크게 감소하였다. Dexamethasone 투여 후 Bcl-xL의 시간대별 증가 양상을 재확인 하였으며, 세포고사 억제 효과도 이러한 Bcl-xL 발현의 시간에 따른 변화에 상응하는 양상이었다. Dexamethasone에 의한 세포고사의 유도 및 Bcl-xL의 상승은 glucocorticoid receptor antagonist인 RU486(Mifepristone)에 의해 역전되어, 이 기전의 초기 단계에 glucocorticoid

receptor (GR)가 관여함을 알 수 있었다. 일부 보고에서 STAT5가 Bcl-xL 유전자의 주된 조절자 중의 하나로 밝히고 있으며, 본 실험에서 사용된 뇌교종세포에서 dexamethasone에 의한 Bcl-xL 상승에 STAT5가 상위조절인자로 역할을 하는지를 보기 위한 실험을 진행하였다. Dexamethasone 투여 후 인산화로 활성화된 STAT5 단백질은 그 발현이 증가하였으며, electrophoretic mobility shift assay (EMSA)상 dexamethasone의 투여는 STAT5의 DNA 결합능도 증가시켰다. 또한 STAT5 단백질을 dominant negative 형태로 발현 가능한 재조합 아데노바이러스인 AdStat5 $\Delta$ 1740을 뇌교종 세포주인 C6에 감염시킨 후 세포내에서 Bcl-xL 단백질의 발현양이 확연히 감소됨을 확인하였다. 따라서 뇌교종세포주인 C6에 dexamethasone의 처리로 인하여 증가되는 Bcl-xL 단백질의 발현에 있어 STAT5 단백질이 전사 수준에서 직접적으로 관여하고 있다는 사실을 확인할 수 있었다. 또한 dexamethasone 처리 후 뇌교종세포주에서 STAT5와 GR 사이에 어떤 형태의 관련성이 있는지를 보고자 시행된 co-immunoprecipitation상 dexamethasone 투여 후 초기 2시간 이내에 STAT5와 GR의 물리적 결합이 이루어짐을 확인할 수 있었다.

결론적으로 C6 뇌교종세포주에서 dexamethasone이 투여되면 이는 GR에 ligand로서 결합을 하게 되고, GR은 STAT5의 활성을 유도하고, 이와 물리적 결합을 하게 된다. 이 두 단백질 복합체는 핵 내로 이동하여 Bcl-xL의 프로모터의 STAT5 단백질이 결합할 수 있는 DNA 영역에 붙어서 전사를 조절하게 된다. STAT5의 하위신호전달 물질인 Bcl-xL 단백질이 전사조절단계에서 조절되어 그 양이 증가되고, 결국 이는 camptothecin에 의해 유도되는 세포고사를 억제하는 것으로 생각된다.

따라서 임상에서 뇌종양 환자에서 흔히 쓰이고 있는 스테로이드 투여는 각종 항암제에 대해 세포사멸효과를 떨어뜨릴 수 있으므로 향후 이 기전 연구를 바탕으로 dexamethasone에 의해 생길 수 있는 가능한 내성요인을 극소화하는 방법을 모색해야 할 것이다.

---

핵심되는 말 : dexamethasone, 세포고사, 뇌종양, STAT5, Bcl-xL, camptothecin

# 백서 C6 뇌교종세포주에서 dexamethasone에 의한 camptothecin 유도 세포고사 억제 기전

<지도교수 서 창 옥>

연세대학교 대학원 의학과

## 조 재 호

### I. 서 론

중추신경계 종양의 약 50%를 차지하며 성인에서 가장 호발하는 악성 교종은 침윤성 성장을 하기 때문에 수술에 의해 육안종양을 완전히 제거하더라도 대부분 국소 재발을 하게 되므로 방사선치료 및 항암화학요법을 함께 시행하는 것이 표준치료법으로 되어 있다.<sup>1,2</sup> 방사선치료가 수술만을 시행한 환자에 비해 통계적으로 의미있는 생존기간 향상을 가져다주는 것은 많은 연구들이 뒷받침하고 있다. 항암화학제는 아직 제 3상 무작위임상연구를 통하여 증명이 되지는 않았지만, 생존기간을 연장하는데 도움을 주는 것으로 생각되고 있다.<sup>3,4</sup> 하지만, 이러한 수술, 방사선치료 및 항암화학요법의 다병합요법에도 불구하고 그 예후가 매우 불량하여 중앙생존기간이 약 14 개월 정도에 그치고 있다. 육안종양을 다 제거한 후 미세잔존 종양에 대해 방사선 및 항암화학제를 사용해도 재발율이 높은 것은 종양세포 자체 및 외적인 요소 등의 다양한 내성기전에 의한 것으로 생각되며, 이들 내성기전에 대한 연구는 이 질병의 생존기간을 증가시키기 위해서 필수적이라고 할 수 있다.

Glucocorticoids는 부종을 감소시키는 역할로서 뇌의 다양한 질병에 널리 쓰이고 있다. 특히 뇌종양의 경우에는 종양에 의한 뇌압의 증가 및 부종을 감소시키기 위해 수술 전후에 거의 필수적으로 사용되고 있다.<sup>5,6</sup>

Dexamethasone은 임상에서 가장 흔히 사용되는 Glucocorticoids의 일종으로, 최근 뇌교종세포에서 Dexamethasone이 topoisomerase I inhibitor인 camptothecin의 세포고사 유도 효과<sup>7</sup>를 감소시키고, 동시에 세포생존신호인 Bcl-xL의 증가가 동반한다는 것이 밝혀졌다.<sup>8</sup> 즉, 임상에서 늘 쓰이고 있는 glucocorticoids가 세포내에서 anti-apoptotic activity를 보이는 Bcl-xL를 증가시키는 것은 방사선이나 항암화학제와 같이 세포고사를 유도하는 치료법의 암세포 사멸효과를 저하시키는 역할을 할 수 있다는 점에서 중요한 의미를 가진다고 할 수 있다.

세포고사는 다세포 생물의 발생과 조직 항상성 유지에 필수적인 생체 세포내 기전이다. 세포고사는 이전에는 ICE-like protease라고도 불렀던 caspase의 활성화, 미토콘드리아의 탈분극, 세포 체적 감소, 염색체 농축 및 핵내의 DNA 분절 등이 특징이다. Bcl-2 family 유전자군은 세포고사의 핵심 조절자이다. 이들 유전자군의 단백질 중 anti-apoptotic activity를 보이는 것은 대표적으로 Bcl-2, Bcl-xL 등이며, pro-apoptotic activity를 보이는 것은 Bax, Bcl-xS 등이다. Bcl-xL은 anti-apoptotic 성질을 Bcl-2와 일부 공유하는 면이 있지만, 프로모터 (promoter)가 서로 다르다.<sup>9,10</sup> Bcl-xL은 조혈계 세포를 포함하는 다양한 세포주에서 세포고사를 억제함으로써 항암제의 세포고사 유도 효과를 떨어뜨릴 수 있는 것으로 알려져 있다.<sup>11</sup>

다양한 항암약제가 악성뇌교종의 치료에 이용되고 있지만, 뇌혈관장벽, 약제내성 등의 다양한 이유들로 인해 그 효과에 한계를 보이고 있다.<sup>12,13</sup> 이러한 항암약제 자체의 약제내성 및 뇌혈관장벽 투과성 등은 많이 연구되고 있지만, 뇌종양 환자에서 수술전후로 늘 투여되는 약제로서 세포의 종류에 따라서 세포고사를 유발시키기도 하고 억제하기도 하는 glucocorticoids<sup>14</sup>와 항암약제 효과의 상호관계를 연구한 보고는 거의 없는 실정이다. Glucocorticoids는 뇌종양의 치료에 있어서 필수적으로 쓰여지는 약제로서 세포고사와의 연관성이 보고 되어 있으므로 glucocorticoids의 항암약제 효과에 대한 영향을 연구하고 그 자세한 기전을 이해하는 것은 이

질병 치료에 있어서 반드시 밝혀져야 할 내용이라 할 수 있겠다. 따라서 본 연구에서는 glucocorticoids 투여 후 Bcl-xL 활성을 위해서 세포내에서 신호전달과정상 상위조절물질 (upstream regulator, e.g. STAT5, NF- $\kappa$ B, Glucocorticoids receptor) 등에 대한 연구를 통해서 dexamethasone 투여 후 신호전달기전을 밝히고자 하였다. 특히 Bcl-xL의 가능한 상위조절인자 중에서 STAT (Signal transduction and activation of transcription) 단백질이 교종 세포의 glucocorticoid 투여와 연관하여 어떠한 발현 양상을 보이는지 연구를 하고자 하였다. STAT은 리간드에 결합한 후 tyrosine 인산화가 되는 잠복성 세포질내 전사조절자 (latent cytoplasmic transcription factor)이다. 활성화된 STAT은 이량체가 되고, 핵 내로 이동하여, 특이조절유전자에 부착된 다음 반응 유전자의 활성을 일으키는 것으로 알려진 신호전달 매개체이다.<sup>15</sup> 현재까지 7가지의 아형 (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B, STAT6A)이 포유동물 세포에서 알려져 있다. 이 가운데 STAT5는 interleukin-2, -3 family, erythropoietin, thrombopoietin 및 growth hormone 등에 의해서 활성화되며, YY-1, Sp1, C/EBP $\beta$  및 glucocorticoid receptor 와 같은 전사조절자들과도 상호 작용하는 것이 보고 되고 있다.<sup>16-22</sup>

상기와 같은 배경을 바탕으로 본 연구는 백서 C6 뇌교종세포주에 dexamethasone 투여 후 camptothecin 유도 세포고사가 억제되는 현상과 Bcl-xL 상승이 동반되는 것을 재확인하고, 이러한 세포고사 억제와 동반되는 Bcl-xL 상위조절인자를 밝히고자 하였다. 특히 STAT5 및 glucocorticoid receptor의 상위조절물질로서의 역할을 규명하고자 하였다. 결과적으로 dexamethasone에 의한 항암화학약제 유도 세포고사 억제 효과의 기전을 체계적으로 정리 규명하고, 신호전달체계상 특이 경로 조절을 통한 향후 치료 효과 증진의 토대를 마련하고자 하였다. 아래 그림은 본 연구를 통해서 제시하고자 하는 가설의 도식화이다(그림1).

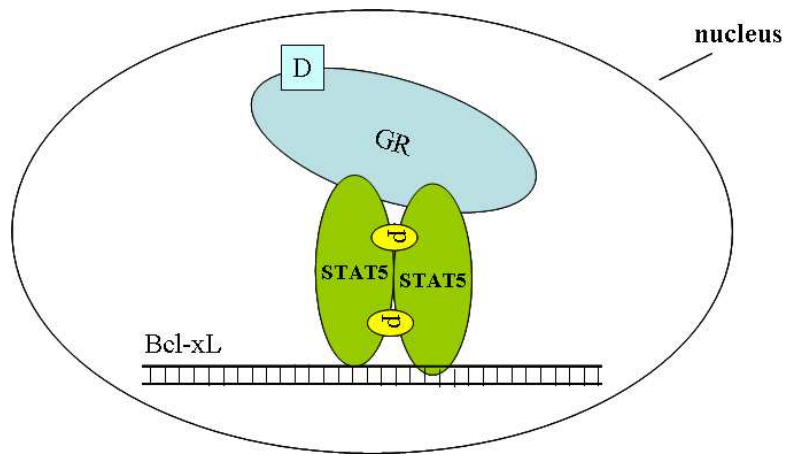


그림 1. Hypothesis. Dexamethasone에 활성화된 STAT5는 GR과 물리적 결합을 하여, 핵 내로 이동하고, Bcl-xL의 전사인자로서의 역할을 한다. 이렇게 하여 활성화된 세포생존 신호인 Bcl-xL은 뇌교종세포(C6)에서 세포고사 억제 역할을 할 것으로 추정한다.

D, Dexamethasone; GR, Glucocorticoid receptor; p, phosphorylation.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

실험에 사용된 세포주인 백서 C6 뇌교종 세포는 American Type Culture Collection 사 (Manassas, VA, USA)로부터 구입하였다. 구체적으로 재료 구입처가 명시되지 않은 모든 화합물은 Sigma 사 (St. Louis, MO, USA)로부터 구입되었다. Bcl-xL 에 대한 monoclonal antibody는 Trevigen 사 (Gaithersburg, MD, USA)로부터, polyclonal rabbit anti-phospho-STAT5 (Tyr694) antibody 는 Cell Signaling 사 (Beverly, MA, USA)로부터, monoclonal mouse anti-STAT5 antibody는 BD Transduction Laboratory 사 (San Diego, CA, USA) 로부터, Mouse anti-actin serum은 Santa Cruz Biotechnology 사 (Santa Cruz, CA, USA) 로부터, secondary anti-mouse or anti-rabbit antibody conjugated with alkaline phosphatase는 Promega 사 (Madison, WI, USA)로부터 구입하여 이용하였다. Enhanced chemiluminescence reagents는 Amersham 사 (Arlington Heights, IL, USA) 로부터 구입하여 사용하였다.

### 2. 세포 배양

C6 세포는 15% 마혈청 및 2.5% 우태아혈청 (이상 BioWhittaker, Walkersville, MD, USA), 0.15% 중탄산나트륨, 그리고 100 U/ml penicillin 및 100 g/ml streptomycin (Life technologies, Grand Island, NY, U.S.A.) 가 포함된 HAM's F12 배지 (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA)에서 5% CO<sub>2</sub>의 존재 하에 37°C 항온배양기에서 배양하였다.

### 3. 세포에 대한 약물 처리

세포고사를 유도하는 대표적인 항암약제로 topoisomerase I 억제제인 camptothecin과 topoisomerase II 억제제인 etoposide를 배지에 처리하여

최종 농도가 각각 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M 이 되도록 하였다. 이들 항암약제의 5 M stock solution은 dimethylsulphoxide (DMSO)에 만들어졌다. 대표적 glucocorticoid인 dexamethasone은 최종 농도가 1  $\mu$ M 이 되도록 하여 실험을 진행하였으며, GR antagonist인 RU486 (mifepristone) 은 최종 농도가 2  $\mu$ M이 되도록 하여 실험을 진행하였다. Dexamethasone은 DMSO 용액에, RU486 (mifepristone)은 ethanol에 녹여 준비하였다. 세포 배지의 DMSO 및 ethanol 농도가 0.1%를 넘지 않도록 유지하였다.

#### 4. Caspase-3 활성도 측정

Caspase-3는 포유동물에서 세포고사 유도에 중추적인 역할을 하는 cysteine aspartic acid-specific protease family의 한 구성원으로 DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) 아미노산 서열의 c-terminal을 특이적으로 절단하는 성질을 가지고 있다. 이러한 Caspase-3의 세포내 활성도 측정은 Colorimetric CaspACE<sup>TM</sup> Assay System (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 시행하였으며, CaspACE<sup>TM</sup> Assay System<sup>®</sup> 은 세포 내에 존재하는 caspase-3의 작용에 의해 발색단 (p-NA; nitroalanine)이 붙여져서 색깔반응을 보이는 기질 (colorimetric substrate, Ac-DEVD-pNA)을 제공하여 caspase-3의 정량적 분석이 가능하게 하였다.

이의 사용은 제조사의 지시에 따랐다. 실험과정을 간략히 소개하면, C6 세포가 자라는 배지에 약물을 처리한 후 정해진 시간에 세포를 회수하고, 용해 완충액에 넣은 상태로 20 분간 얼음 위에 두었다. 상층액이 용출물로 사용되었는데, 50 M caspase-3 substrate인 Ac-DEVD-p-Nitroalanine (pNA)를 첨가하여 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 유리되는 pNA의 양을 450 nm 파장에서 microplate reader를 통하여 정량화하였으며, 용출액 내 단백질 양은 우혈청알부민을 표준으로 하여 Lori 방법에 의해 측정하였다. Caspase-3 특이 활성도는 pmol/pNA/ $\mu$ g protein/hour 단위로 표현하였다.



## 5. DNA 분절화 분석

세포고사의 표지자인 DNA 분절화를 분석하기 위해 Cell Death Detection enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) PLUS kit<sup>®</sup> (Roche Applied Science, Germany)를 구입하여 이용하였다.

본 실험법은 세포사 유도 후 세포 용해물을 이용하여 세포질 내 histone-associated DNA 분절에 대한 정량적 분석을 하는 것으로,<sup>23,24</sup> histone 항체 및 monoclonal mouse anti-DNA 항체를 사용하는 sandwich-enzyme-immunoassay 프로토콜을 근거로 한다. 제조사의 지시를 따라서 실험 및 분석 하였다. 이를 간략히 정리하면, 24-well plate에 세포를 분주하여 배양 및 약물 투여가 이루어졌고, 정해진 시간에 각각의 well 에 있는 배지를 없애고, 1 ml의 용해 버퍼를 각각의 well 에 넣은 다음 30분 정도 상온에서 배양되었다. 세포용해물은 10분 동안 6,000 rpm 로 침강시켰다. 상층액 20 µl를 streptavidin-coated microplate로 옮기고, 80 µl의 immunoreagent를 각각의 well에 첨가한 후 상온에서 2시간 동안 300 rpm으로 shaker를 이용하여 반응시켰다. 이후 배양 버퍼로 씻은 후 100 µl의 ABTS 용액을 각 well에 첨가한 후 ABTS 용액에 의한 발색을 405 nm 파장에서 측정하였다.

## 6. Dominant-negative STAT5 adenovirus, AdStat5aΔ740 준비

본 연구에서 규명하고자 하는 가설에서 STAT5와 Bcl-xL의 직접적인 상관성을 규명하기 위해서 dominant-negative STAT5 adenovirus인 AdStat5aΔ740을 이용하였다. AdStat5aΔ740은 Hiroko Yamshita<sup>25,26</sup> (Nagoya City University Graduate School of Medical Science, Nagoya, Japan) 교수님으로부터 감사히 제공받았다. 일본에서 받은 AdStat5aΔ740 은 293 세포에서 증식 배양하여 CsCl density purification을 시행하고, 투석시킨 뒤 저장 완충액 (10 mM Tris, 4% sucrose 2 mM MgCl<sub>2</sub>)에 용해시켰고, 그 후 -70°C 냉동고에 저장하였다. 대조군 바이러스 (Ad control) 로는 E1A 유전자 부분에 LacZ 유전자를 발현하는 adenovirus를 제작하여 293 세포

에서 증식하였다. 각 바이러스의 역가 (titer)는 분광광도계를 이용하여 바이러스 genome의 흡광도에 의한 optical density (O.D.)에 근거하여 산출하였다. 공식  $O.D. \times \text{dilution factor} \times 1.1 \times 10^{10}$  plaque-forming unit (pfu/ml)에 의한 AdStat5a $\Delta$ 740의 역가는  $1.33 \times 10^{10}$  pfu/ml 이었으며, 대조군 adenovirus의 농도는  $1.13 \times 10^{11}$  pfu/ml 이었다. 증식되어 분리된 바이러스를 확인하고자 STAT5 특이적인 primer (Sense 5'-TGGCTGAGAAGCACCCAGAAGAC-3', Antisense 5'-GCTGAGATGATGTCCGTGATGG-3') 를 제작하여 PCR을 수행하였다.

## 7. Western Blot 분석

총 단백 및 핵단백질을 분리하고 30~50  $\mu$ g의 단백질을 동정단백질의 질량에 따라 10~15% SDS-PAGE (Sodium-dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 에 약 1 시간 정도 전기영동시켰다. 전기영동 후 gel에 단백질을 polyvinylidenedifluoride (PVDF) membranes에 electro-transfer 시킨 후 20 mM Tris-HCl, 5% 탈지 분유, 150 mM NaCl, 그리고 0.05% Tween 20를 포함하는 pH 7.5 의 TBS (Blocking 액)에 상온에서 1 시간 동안 방치하였다. 이후 membrane에서 찾고자 하는 단백질을 특이적으로 인지하는 일차 항체, 즉 primary mouse anti-Bcl-xL, rabbit anti-phosphoSTAT5, mouse anti-STAT5, or mouse anti-actin antiserum 등을 상온에서 1~2시간 동안 반응시켰다. 이후 membrane을 10분 간격으로 세 번 TBST로 세척하였고, 다시 alkaline phosphatase가 결합되어 있는 항 IgG 이차항체 (anti-rabbit or anti-mouse IgG, 1:5000 dilution)를 상온에서 1시간 동안 반응시킨 다음 Blot AP System (Promega, Madison, WI, U.S.A)을 이용한 색깔반응 혹은 ECL Western Detection System (Amersham, U.S.A)을 이용한 X-선 필름상의 band의 농담으로 단백질 발현을 조사하였다. Dominant negative STAT5 adenovirus 감염 후 Bcl-xL 발현 변화를 보기 위한 실험에서는

multiplicity of infection (MOI) 400 으로 72 시간이 지난 후 세포들을 회수하였다.

## 8. Electrophoretic Mobility Shift Assay

Dexamethasone 투여 후 활성화 된 STAT5가 DNA에 결합하는 정도를 보기 위해 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)를 시행하였다.  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP를 말단에 결합시킨 Bcl-xL 프로모터 영역의 STAT5 consensus oligonucleotide (5'- TTT GGA GAA AGG CAT TTC GGA GAA AAG -3')를 사용하였다. Dexamethasone 투여 후 활성화된 STAT5와 oligonucleotide probe 사이의 결합 반응은 10 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 5% glycerol을 포함하는 pH 7.6의 결합 완충용액과 0.0175 pmol of labeled probe (>10,000 cpm) 및 20  $\mu$ g의 핵단백질, 1  $\mu$ g of poly(dI-dC) 등이 모두 합하여진 20  $\mu$ l 혼합물에서 이루어졌다. 다음 혼합물을 약 20 상온에 둔 후 저 이온 세기 조건하에서 2 시간 동안 180 voltage 로 6% polyacrylamide gel에 전기영동 시켰다. Gel 을 건조시킨 후 autoradiography를 시행하였다. STAT5의 핵산결합 활성도의 특이성은 cold STAT5 oligonucleotide 가 100 배 농도 이상 존재 할 경우는 STAT5 결합이 완전히 차단되는 것으로 확인되었다.

## 9. Co-immunoprecipitation

총  $2 \times 10^7$  개의 세포를 침강시킨 후 얼음 위에 두고 30 분 동안 EBC lysis buffer (50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 120 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM orthovanadate, 10% glycerol, 1 mM DTT, 2 mM PMSF, 1  $\times$  protease inhibitor cocktail)에서 용출시켰다. 16,000 x g에서 15 분간 원심 분리 한 뒤 상층액은 2  $\mu$ g/ml 의 최종농도에 맞추어 4°C 에서 anti-glucocorticoid receptor antibody (1:50, Affinity Bioreagents Inc, Golden, USA)를 첨가하여 3시간동안 배양되었다. Protein G sepharose

가 항원-항체 혼합물에 더해지고, 약 1~2 시간 동안 부드럽게 흔들었다. 면역반응에 의해 생긴 침착물은 0.5 M NaCl 이 들어있는 500  $\mu$ L 용해완충액에 두 번, NaCl 이 없는 용해완충액에는 한 번 세척한 후 SDS loading 완충액에 부양시켜 SDS-PAGE에서 분리하고, PDVF membrane으로 electro-transfer 시켰다. 다음 anti-phospho STAT5 및 anti-STAT5 항체에 의해서 immunoblotting을 시행하였다.

### III. 결 과

#### 1. Dexamethasone에 의한 camptothecin 유도 세포고사 억제

Dexamethasone은 camptothecin (topoisomerase I) 및 etoposide (topoisomerase II) 와 같은 세포고사 유도 약제를 처리한 C6 뇌교종세포주에 대해 세포고사를 억제하는 보호 작용을 하였다. 관찰 된 세포사가 세포고사에 의한 것인지를 밝히기 위하여 세포고사의 대표적 표지자인 caspase-3 활성화도 및 DNA 분절을 확인하였다.

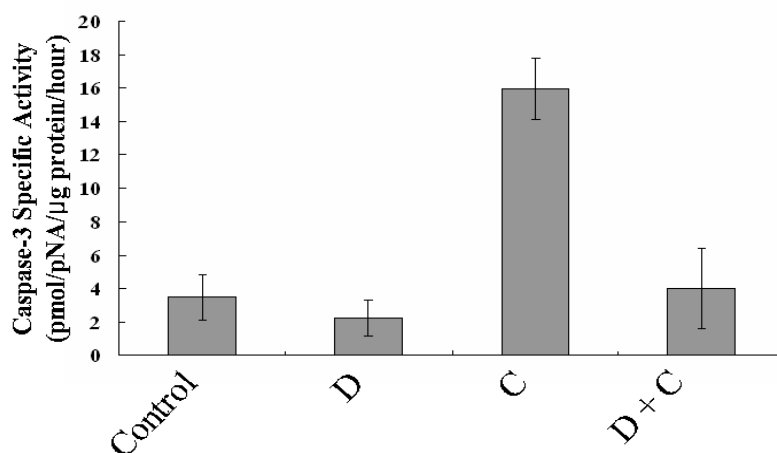


그림 2. Dexamethasone에 의한 camptothecin 유도 caspase-3 specific activity의 감소. Ac-DEVD-pNA에서 유리된 p-NA (nitroallanine)양에 따라 발색되는 정도를 405 nm 파장에서 photometer로 얻은 값을 제조사의 메뉴얼에 따라 caspase-3 specific activity로 환산하였다. Control, no treatment; D, 1 μM of dexamethasone 의 24시간 노출 ; C, 2 μM camptothecin의 20시간 노출 ; D + C, Camptothecin 투여 전 4시간 동안 dexamethasone을 전처치한 군.

Caspase-3 특이 활성도를 측정하였을 때, camptothecin 단독 투여는 15.9 pmol/pNA/μg protein/hour 정도의 caspase-3 활성화를 유도하였으나, 반대로 약제가 투여 되지 않은 세포들은 3.5 pmol/pNA/μg protein/hour 정도의 활성도만 보였다. Camptothecin 투여에 의해 증가된 caspase-3 활성

도는 1  $\mu$ M dexamethasone 전처치에 의해 억제되었다(그림 2).

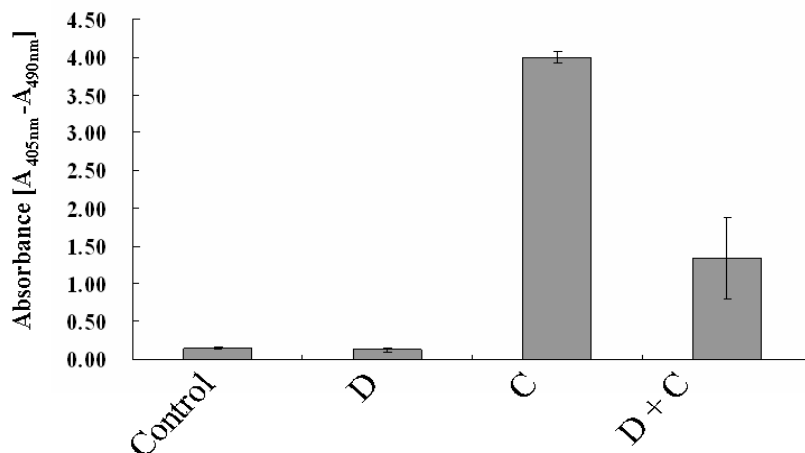


그림 3. Camptothecin 처리에 의한 nucleosome의 증가 및 dexamethasone 전처치에 의한 역전. 제조사에서 제공된 ABTS solution에 의한 발색반응을 405 nm 파장에서 분광광도계를 통해 측정하였다. 490 nm 는 blank로서의 reference wavelenth 이다. Control, no treatment; D, 1  $\mu$ M of dexamethasone 의 24 시간 노출 ; C, 2  $\mu$ M camptothecin의 20 시간 노출 ; D + C, Camptothecin 투여 전 4 시간 동안 dexamethasone을 전처치한 군.

DNA 분절 역시 caspase-3 와 같은 양상을 보였는데, dexamethasone 단독 투여는 아무런 약제를 투여 하지 않은 대조군과 거의 같은 값을 보였으나, camptothecin 투여 후 상당한 양의 internucleosomal DNA fragmentation을 확인하였으며, 세포고사 유도 항암약제 4시간 전에 전처치된 시료에서는 대조군에 훨씬 근접하도록 크게 감소된 DNA 분절 현상을 보였다(그림 3). 이로써 dexamethasone은 세포고사의 표지자라고 할 수 있는 caspase-3 활성 및 DNA 분절을 크게 감소시켜 뇌교종세포주에서 항암약제에 의해 유도 될 수 있는 세포고사를 억제하였다.

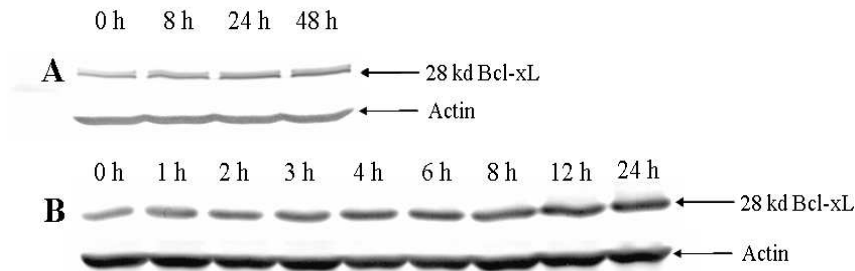


그림 4. Dexamethasone 노출 시간에 따른 Bcl-xL의 변화. A) Dexamethasone 노출 후 0 시간, 8 시간, 24 시간 및 48 시간의 Bcl-xL 발현을 보여 주고 있으며, Bcl-xL 발현 증가는 48시간까지 지속되었다. 이는 Gorman et al 등<sup>8</sup>에 의해 증명된 Bcl-xL의 dexamethasone에 의한 발현 증가 실험 재현. B) Dexamethasone 투여 후 24 시간 이내의 시간대를 세분하여 Bcl-xL의 점진적인 증가 양상을 확인하였다.

## 2. Dexamethasone 투여 후 시간에 따른 점차적인 Bcl-xL 증가 및 이에 상응하는 세포고사 억제 정도의 시간대별 변화

Dexamethasone 투여 후 C6 뇌교종세포주에서 세포생존신호인 Bcl-xL 증가 여부를 재확인 하였다. Dexamethasone 투여 후 Bcl-xL 은 점진적으로 증가하여 48시간 정도까지도 지속되었다. Dexamethasone에 대한 노출 시간을 세분하여 관찰한 결과 Bcl-xL 단백질이 노출 시간에 민감하게 변화하면서 증가되는 양상을 보였는데, 4시간 정도에서 구분이 가능한 증가를 보였으며, 12시간 정도에서는 확연한 차이를 보였고, 24시간 정도에서 최대로 발현되는 양상을 보였다(그림 4). 세포고사를 억제함으로써 항암제의 효과를 떨어뜨리는 것으로 알려진 Bcl-xL이 뇌교종세포주에서 dexamethasone 투여 후 시간에 의존하는 증가양상을 보이므로, 세포고사 억제도 dexamethasone에 대한 노출 시간에 따른 변화를 보이는지 확인하였다. Camptothecin 보다 2시간 앞서 dexamethasone이 투여된 경우에는 세포고사가 대조군에 비해서 차이를 보이지 않았으나, 4시간 먼저 투여된 시료에서부터 세포고사 억제가 관찰되기 시작했으며, 8시간, 12시간, 24시간으로 dexamethasone 전처치 시간이 길어질수록 세포고사 억제 효과는

증가되었다(그림 5). 이는 dexamethasone 투여 후 증가되는 Bcl-xL의 시간대별 증가와 정확하게 상응하는 소견으로서, Bcl-xL이 뇌교종세포주(C6)에서 dexamethasone에 의한 camptothecin 유도 세포고사의 주된 조절자 중 하나임을 암시한다.

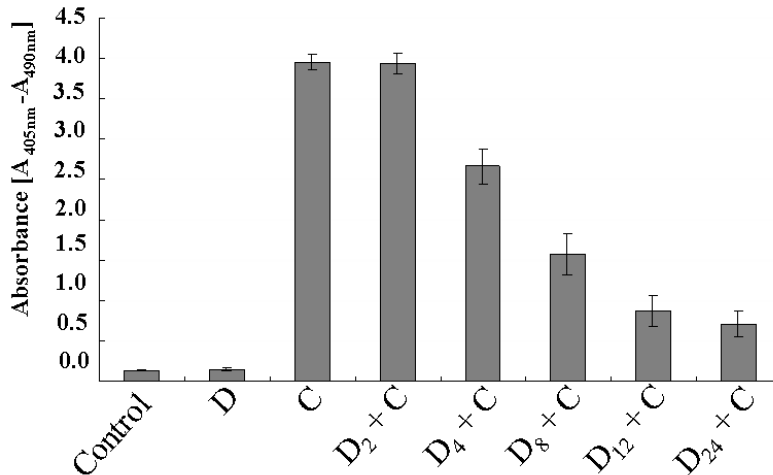


그림 5. Dexamethasone 노출시간에 따른 DNA 분절화 억제 정도 변화. 그림 4 에서 보여주고 있는 dexamethasone 투여 시간에 따른 Bcl-xL 증가와 상응하는 소견을 보였다. Control, no treatment; D, 1  $\mu$ M of dexamethasone 의 24 시간 노출 ; C, 2  $\mu$ M camptothecin의 20 시간 노출 ; D<sub>n</sub> + C, Camptothecin 투여 전 n시간 동안 dexamethasone을 전처치한 군.

### 3. Dexamethasone 에 의한 camptothecin 유도 세포고사 억제의 glucocorticoid receptor에 의한 매개

Glucocorticoid hormone, cortisol은 흔히 plasma membrane을 통과하여 세포질내로 이동하게 되고, 특이적인 GR에 강한 결합을 함으로써 세포내 다양한 신호 전달을 매개하기 시작한다. 본 연구에서도 dexamethasone에 의한 세포고사 억제가 GR을 매개로 하여 세포고사를 억제하였는지를 보기 위해서 GR 길항제인 RU486을 dexamethasone 처리 30분 전에 투여하여



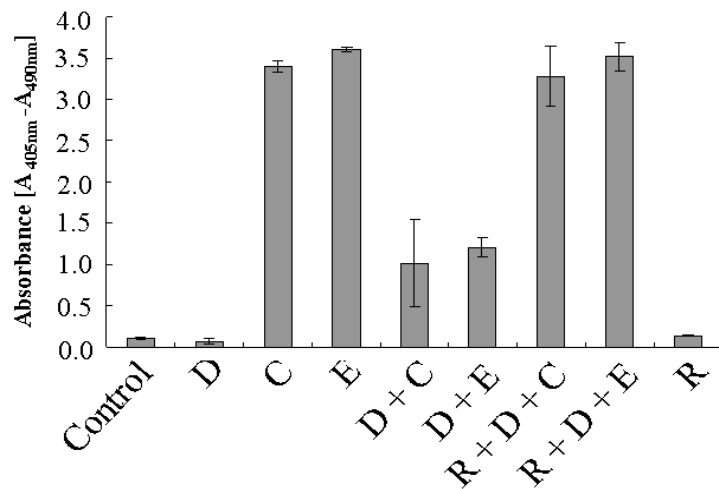


그림 6. RU486 전처치에 의한 dexamethasone의 세포고사 억제 기능 소실. RU486은 dexamethasone 투여 30 분전에 전처치 하였다. RU486은 dexamethasone에 의한 세포고사 억제 현상을 역전 시켰으며, RU486 단독투여는 세포고사를 유발하지 않았다. Control, no treatment; D, 1  $\mu$ M of dexamethasone 의 24 시간 노출 ; C, 2  $\mu$ M camptothecin의 20 시간 노출 ; E, 5  $\mu$ M etoposide 20 시간 노출 ; D + C, Camptothecin 투여 전 4 시간 동안 dexamethasone을 전처치한 군 ; D + E, Etoposide 투여 전 4 시간 동안 dexamethasone을 전처치한 군 ; R, 2  $\mu$ M RU486 (= glucocorticoid receptor antagoist).

실험을 진행하였다. 그 결과

dexamethasone 투여로 topoisomerase I 및 II inhibitor 에 의해 유발된 DNA 분절 현상이 크게 감소하였던 것이 dexamethasone 전에 RU486을 먼저 처리했던 시료에서는 다시 역전되어 DNA 분절이 크게 증가되었다. 같은 농도로 단독 투여된 RU486은 대조군과 차이를 보이지 않았다(그림 6). 따라서 RU486은 뇌교종세포주에서 dexamethasone의 camptothecin 유도 세포고사 억제 현상을 없애는 것을 보여줌으로, 이 작용의 초기 단계로 GR이 매개됨을 간접적으로 증명하였다.

#### 4. Dexamethasone에 의해 증가된 Bcl-xL의 camptothecin에 의한 감소

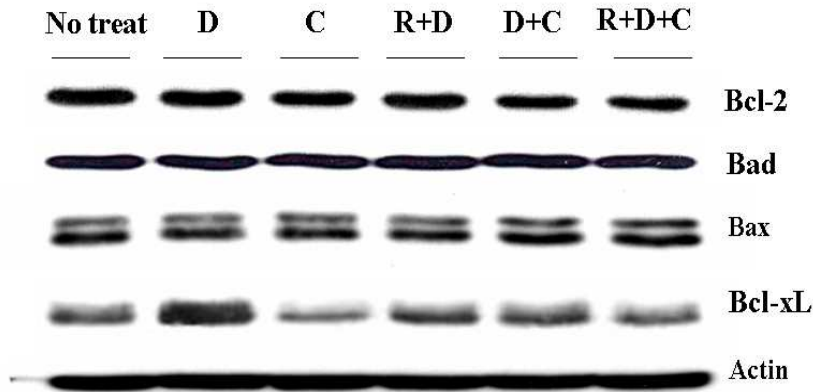


그림 7. Dexamethasone, camptothecin 및 RU486 등의 처치 및 이들의 조합에 따른 Bcl-xL의 변화. RU486은 dexamethasone 투여 30 분전에 처리되었다. Bcl-xL 은 dexamethasone 및 camptothecin 처리에 따른 변화를 민감하게 보였으나, 다른 Bcl-2 family 단백질들은 큰 변화를 보이지 않았다. D, 1  $\mu$ M dexamethasone; C, 2  $\mu$ M camptothecin; R, 2  $\mu$ M RU486; D + C, Camptothecin 투여 전 4 시간 동안 dexamethasone을 전처치한 군.

본 실험과 관련하여 뇌교종세포(C6)주에서 세포고사의 조절에 Bcl-xL의 보다 직접적인 역할을 규명하기 위하여 dexamethasone, camptothecin 및 RU486 등의 처치 혹은 이들의 조합에 따른 Bcl-xL의 변화를 보았다. 앞서 dexamethasone 투여 시간대별 Bcl-xL 증가 실험(그림 4)에서도 보였듯이 dexamethasone 단독 투여는 Bcl-xL의 상당한 증가를 보였으나, dexamethasone 전처치 후 camptothecin 투여는 dexamethasone에 의한 Bcl-xL 단백질 발현 상승 효과를 크게 낮추었다(그림 7). Camptothecin 단독 투여도 뚜렷하지는 않으나, 대조군에 비해 Bcl-xL 단백질 발현의 경미한 감소를 보였다. 이와 같이 Bcl-xL은 dexamethasone에 의해 민감하게 증가하고, 세포고사를 유발하는 camptothecin에 의해서 감소되는 양상을 보여 Bcl-xL이 dexamethasone에 의한 camptothecin 유도 세포고사에 중요한 역할을 하고 있음을 보다 강력히 암시하고 있다. RU486이 dexamethasone 투여 전에 함께 처리된 시료에서는 dexamethasone 단독

투여군에서 보여주었던 Bcl-xL 단백질의 상승이 없어 GR이 관여하는 것을 추가로 증명하고 있다. Bcl-xL 이외에도 Bcl-2 family 가운데 Bcl-2, Bad, Bax 등의 단백질에 대해서도 변화가 있는지 관찰해 보았으나, 치료 군에 따른 큰 차이를 보이지 않았다(그림 7).

## 5. Camptothecin 유도 세포고사 억제에 관여하는 Bcl-xL에 대한 신호 전달체계상 상위조절자로서의 STAT5

STAT5는 Bcl-xL 유전자의 주된 조절자 중의 하나로 알려져 있으며, 유전자발현을 조절함에 있어서 STAT5와 glucocorticoid 사이에 상승작용이 보고된 바도 있다. STAT5와의 상호작용을 하는 것으로 보고된 전사 조절자들에는 YY-1, Sp1, C/EBP, 그리고 GR 등이 있다. 따라서 dexamethasone의 세포고사 억제와 관련한 본 실험에서도 STAT5가 Bcl-xL의 주된 조절자인지를 밝히고자 하였다.

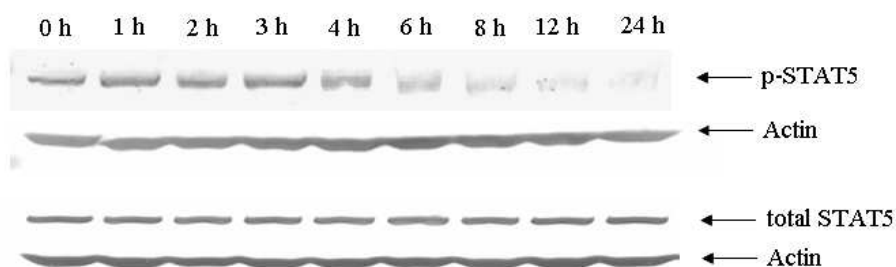


그림 8. Dexamethasone에 의한 뇌교종세포주(C6)에서 인산화된 STAT5 증가. 표시된 시간은 C6 세포에서 dexamethasone 노출 시간을 의미함. 핵단백질을 분리하여 phosphorylated STAT5에 대한 immunoblot 결과 dexamethasone 투여 후 2-4 시간 사이에 그 발현이 증가하다가 감소하는 경향을 보이지만, total STAT5는 그 발현양에 있어서 차이가 거의 없다. 따라서 dexamethasone은 투여된 후 뇌교종세포에서 짧은 시간 내에 STAT5 단백질의 새로운 생성보다는 세포 내에 이미 존재하던 STAT5의 인산화를 조절하고 있음을 시사한다.

가. Dexamethasone에 의한 STAT5 활성화 및 DNA 결합능 증가

Western blot 상 뇌교종세포(C6)주에 dexamethasone을 처리한 후 2시간 이내에 인산화를 통하여 활성화된 STAT5 단백질이 증가하기 시작하였고, 이후 4~6 시간이 지나면서 점차적으로 활성형이 감소하였다(그림 8). STAT5의 인산화가 Bcl-xL의 발현증가에 직접적인 영향을 미친다고 가정하고 시간대별 신호전달 과정을 정리 해 본다면, dexamethasone 투여 후 Bcl-xL의 증가와 camptothecin에 의한 세포고사 억제 효과가 4시간 정도부터 나타나는 앞서의 결과들을 생각할 때, dexamethasone 투여 후 활성화된 phosphorylated STAT5는 2시간 이내에 증가하여 세포내 신호전달 작용을 하다가 4시간 정도 지나면서 사라지고, STAT5에 의해 dexamethasone 투여 후 4시간 정도부터 증가되기 시작하는 Bcl-xL은 48시간까지 지속되면서 세포고사를 억제하는 형태의 신호체계를 형성할 것으로 예상할 수 있다.

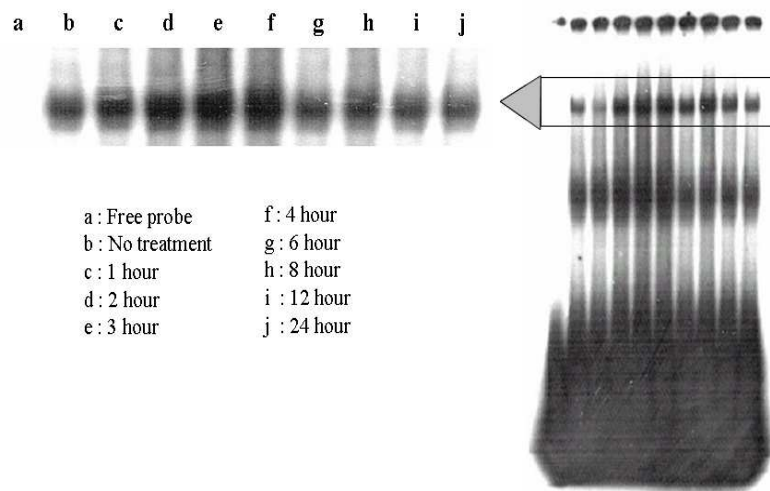


그림 9. EMSA를 이용한 dexamethasone의 노출시간에 따른 STAT5의 DNA binding activity 변화. STAT5의 DNA binding activity는 dexamethasone 투여 후 4 시간 정도에 최대를 보이다가 이후 감소한다. 이는 dexamethasone 투여 후 phosphorylated STAT5 단백질의 변화를 보여 주는 Western Blotting 결과와 일치하였다.

인산화된 STAT5의 전사조절자로서의 DNA 결합능을 확인하기 위하여 시행된 EMSA에서는 dexamethasone 투여 후 2시간 이내에 STAT5의 DNA 결합능이 증가하기 시작하여 4 시간에 정도에 최대치를 보이다가 이후로 점차 감소하는 경향을 보여, 앞서의 시간대별 신호전달체계 예상과 일치하는 결과를 보였다(그림 9).

#### 나. Dominant negative STAT5 adenovirus, AdStat5aΔ740 에 의한 Bcl-xL 발현 감소

STAT5 단백질을 dominant negative 형태로 발현 가능한 재조합 아데노바이러스인 AdStat5aΔ740을 뇌교종세포주인 C6에 감염시킨 후 세포내에서 변화하는 Bcl-xL 단백질의 발현양이 Dexamethasone 처리 여부에 따라 달라지는지 알아보기 위하여 Western blotting을 시행하였다. 일반적으로 STAT5 단백질은 생존 신호 단백질인 Bcl-xL 전사 유도 물질로 잘 알려져 있으며 STAT5 단백질을 dominant-negative 형태로 발현 가능한 재조합 아데노바이러스를 세포에 감염 시켰을 때 세포 자체의 야생형 STAT5와 외부에서 인위적으로 제공한 dominant-negative 형태의 STAT5 단백질이 서로 경쟁 반응하여 Bcl-xL 전사 유도 기능이 제대로 이루어 질 수 없으며 Bcl-xL 발현양이 감소하게 된다.<sup>25</sup> AdStat5aΔ740 감염 후 Bcl-xL 발현 감소는 배양 후 72시간 정도에서 두드러졌다. 따라서 AdStat5aΔ740 감염을 먼저 시킨 후 48 시간 정도 지난 후 dexamethasone 1 μM를 처리하여 24시간 동안의 dexamethasone의 Bcl-xL 단백질에 대한 영향을 분석하였다. 먼저 아무 처리도 하지 않은 C6 세포에서는 Bcl-xL 단백질이 소량 발현 되는 것을 확인할 수 있었으며 음성대조군 아데노바이러스, Ad control을 400 MOI로 처리 하였을 때에는 Bcl-xL 단백질양에 있어서 거의 변화가 없었다. 하지만 AdStat5aΔ740을 400 MOI로 처리하였을 때에는 세포 내의 Bcl-xL 단백질의 발현이 확연하게 감소하는 결과를 관찰할 수 있었다. Dexamethasone 처리 후 Bcl-xL 단백질의 발현양이 증가되는 현상이 STAT5 단백질이 전사 수준에서 직접적으로 관여하는지 알아보기 위하

여 AdStat5a $\Delta$ 740로 감염된 세포에 Dexamethasone을 처리한 후 세포 내에서의 Bcl-xL 단백질의 발현 여부를 측정하였다. Dexamethasone으로 증가된 Bcl-xL 단백질은 Ad control에 비하여 AdStat5a $\Delta$ 740의 처리로 확연하게 감소되는 현상을 관찰할 수 있었다(그림 10). 따라서 뇌교종 세포주인 C6에 Dexamethasone의 처리로 인하여 증가되는 세포 생존 신호 관련 단백질인 Bcl-xL 단백질의 전사 유도에 있어 STAT5 단백질이 전사 수준에서 직접적으로 관여하고 있다는 사실을 확인할 수 있었다.

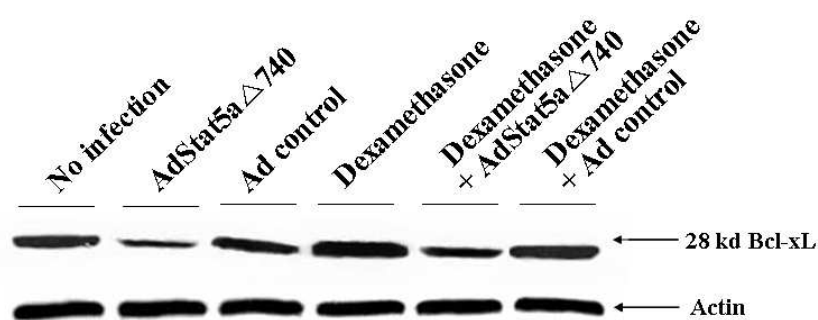


그림 10. Dominant negative STAT5 adenovirus, AdStat5a $\Delta$ 740 감염에 의한 Bcl-xL 발현 감소. AdStat5a $\Delta$ 740 감염 후 72 시간이 지난 후 세포를 회수하였으며, dexamethasone 노출 시간은 24 시간으로 하였다. Dominant negative STAT5 adenovirus 감염은 dexamethasone에 의한 Bcl-xL 상승을 억제하였다.

## 6. Dexamethasone 투여 후 glucocorticoid receptor와 인산화된 STAT5의 상호작용

Glucocorticoids는 STAT5-dependent transcription의 향진 및 STAT5와 함께 transcriptional co-activator로 역할을 하며,<sup>22,27,28</sup> GR에 의한 STAT5 활성의 향진이 STAT5 tyrosine residue의 인산화의 증가와 연관된다고 보고된 바도 있다.<sup>21</sup> 하지만, 현재까지는 GR과 STAT5의 관련성이 casein 유전자 전사조절과 관련하여 COS cell 이나 HC11 mammary epithelial cells 들에서만 주로 보고 되었으며, 특히 세포 특이적인 방식으

로 신호전달을 주로 매개하는 glucocorticoid의 뇌교중세포에서 STAT5와의 연관성은 보고된 적이 없다. 앞서의 실험 결과들을 통하여 dexamethasone에 의한 camptothecin 유도 세포고사 억제 및 Bcl-xL 상승에 STAT5의 활성화가 전제되며, GR도 관여하는 것을 알 수 있었다. 따라서 dexamethasone 처리 후 뇌교중세포주에서 STAT5와 GR 사이에 어떠한 상호작용이 일어나는지를 보기 위한 실험을 진행하였다. GR antagonist를 dexamethasone 처리 전에 투여 할 경우 dexamethasone 단

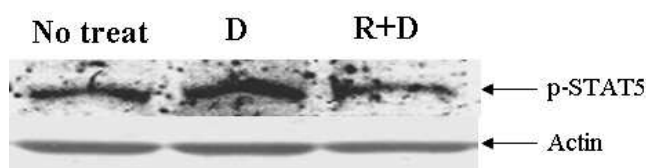


그림 11. Dexamethasone 투여 후 발현이 증가된 phosphorylated STAT5의 GR antagonist 전처치에 의한 감소. D, Dexamethasone incubation for 2 hours; R+D, RU486 pretreatment before dexamethasone administration.

독 투여에 의한 STAT5 인산화 효과도 소실되는 것을 확인하였다(그림 11). Glucocorticoid의 receptor에 대한 결합이 STAT5의 활성화를 일으킨다는 것을 시사하는 소견이다. 또한 STAT5와 glucocorticoid 사이에 물리적 결합도 이루어지는지를 보고자 co-immunoprecipitation을 시행하였다. 아무런 약제도 투여 받지 않은 대조군 시료에서는 phosphorylated STAT5가 거의 발현되지 않았으나, 2시간 정도 dexamethasone에 노출된 시료에서는 phosphorylated STAT5가 높게 발현됨으로 dexamethasone 투여에 의해 GR과 phosphorylated STAT5가 물리적으로 결합하게 됨을 알 수 있었다. Dexamethasone에 노출된 지 8시간 및 24 시간 지난 후의 시료에서는 phosphorylated STAT5가 거의 발견되지 않았다(그림 12).

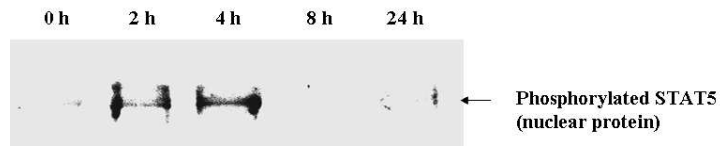


그림 12. Glucocorticoid receptor 와 phosphorylated STAT5에 대한 Co-immunoprecipitation. 표시된 시간은 뇌교종세포(C6)의 dexamethasone에 대한 노출시간을 의미한다. Dexamethasone 자극에 의해 활성화된 STAT5가 dexamethasone 투여 후 2 시간 및 4 시간대에 glucocorticoid receptor와 물리적으로 결합함을 보여주었다.



## IV. 고 찰

Glucocorticoid는 부종을 감소시키는 역할로서 뇌의 다양한 질병에 널리 쓰이며, 특히 뇌종양의 경우에는 종양에 의한 뇌압의 증가 및 부종을 감소시키기 위해 필수적으로 사용된다. 그 작용 기전으로는 blood-tumor barrier permeability 및 국소 뇌혈류 감소<sup>29</sup>, vascular endothelial growth factor (VEGF)의 작용 길항<sup>30</sup> 등이다. 스트레스에 의해 그 분비가 자극되는 steroid hormone인 glucocorticoid는 그 일차적인 역할이 스트레스성 자극에 반응하여 에너지를 이동하는 것이라고 할 수 있지만, 한편으로는 다양한 포유동물 세포에서 세포마다의 특이적인 방식으로 세포고사 및 cell growth에도 영향을 미치는 것으로 밝혀지고 있다. 예를 들어 thymocyte나 leukemia cell line들과 같은 혈액 계통 세포에서는 주로 세포고사를 유발하고<sup>31,32</sup>, mammary epithelial cell, gastric cancer cell, hepatoma cell 등의 고형암세포 등에서는 주로 세포고사를 억제하는 것이<sup>33-35</sup> 보고 되어왔다. 그리고 최근에는 astrocytoma나 glioma 세포에서도 dexamethasone 투여로 Bcl-xL 상승과 함께 세포고사가 억제됨이 밝혀졌다.<sup>8</sup> Dexamethasone에 의한 세포고사 억제는 다른 고형종양에서와는 달리 뇌종양에서는 그 의미가 다르다고 할 수 있는데, 이는 뇌종양의 경우 앞서의 언급에서처럼 거의 모든 환자에서 종양에 의한 이차적인 현상인 부종을 감소시키기 위해서 dexamethasone이 투여되기 때문이다. Dexamethasone 투여 후 세포 생존 신호인 Bcl-xL의 상승을 통한 세포고사 억제는 항암치료의 효과를 떨어뜨리는 결과를 초래할 수 있으므로, 이에 대한 기전 연구는 매우 중요하며 이에 대한 본 연구의 결과로서 GR 및 STAT5가 Bcl-xL의 상위조절인자로서 역할을 한다는 것이 규명되었다.

Bcl-2 family 단백질은 세포고사를 조절하는데 중추적인 역할을 한다. 이는 세포고사에 미치는 영향에 따라 크게 두 가지로 나누어볼 수 있다. Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 등은 세포생존신호이며, Bad, Bax, Bak, Bok, Bcl-xS 등은 세포사멸신호이다.<sup>36-38</sup> 본 연구에서 dexamethasone 투

여 후 Bcl-2 family 단백질의 변화를 western blot으로 확인하였는데, Bad, Bax, Bcl-2, Bcl-xL 가운데서 Bcl-xL만 증가되는 것을 확인하였다. Bcl-xL은 lipid membrane에 ion channel을 형성하여 voltage-dependent channel인 mitochondrial porin과 반응하면서 mitochondria로부터 cytochrome c의 방출을 억제하는 역할을 한다.<sup>39-41</sup> 이와 같은 방식으로 Bcl-xL은 caspase 활성을 막고, 세포고사를 억제하는 것으로 잘 알려져 있다. 본 실험에서 dexamethasone 투여 후 세포고사가 억제되는 정도가 노출시간에 따라 변화되고, GR이 매개한다는 사실은 특정 유전자가 dexamethasone에 의하여 전사조절을 통해 유도되는 것을 뒷받침하고 있으며, Bcl-xL의 dexamethasone 투여 후 시간에 따른 상승은 dexamethasone 투여 후 camptothecin 유도 세포고사 억제 정도의 시간대별 변화가 거의 정확하게 일치하였다. 특히 dexamethasone과 camptothecin의 병합투여와 각각의 약제의 단일 투여에 따른 Bcl-xL의 변화 양상, 즉 camptothecin 단독 투여에 의한 Bcl-xL 감소, dexamethasone 단독 투여 후 Bcl-xL 증가, dexamethasone 단독 투여에 비하여 camptothecin 병합 투여의 경우 Bcl-xL의 현저한 감소 등은 Bcl-xL 유전자가 dexamethasone에 의한 camptothecin 유도 세포고사 억제의 주된 조절 물질임을 강력히 시사한다.

Bcl-x 유전자는 주로 전사단계에서 그 발현이 조절되며, Bcl-x 유전자의 조절 영역에는 STAT 결합부위, NF- $\kappa$ B 결합부위 및 cytokine-responsive element 등이 있다.<sup>9,10</sup> 이 가운데서 STAT 단백질은 신호전달과 전사조절을 동시에 수행할 수 있는 특이한 단백질이다. STAT 단백질은 주로 조혈계 세포에서 다양한 cytokine들에 의한 영향을 받아 세포 성장, 생존, 분열 등을 조절하는 물질로 알려져 왔다.<sup>42,43</sup> 이러한 STAT 단백질의 가장 중요한 표적 유전자가 Bcl-xL임을 몇몇 연구에서 보고하고 있다. 하지만, Bcl-xL 유전자 조절을 위한 STAT 단백질들의 활성화는 각각의 cytokine에 특이적으로 반응하여 활성화되는데, 예를 들어 IL-3 유도 Bcl-xL 유전자 발현에는 STAT5가 관여하고<sup>44</sup>, cardiocytes에서 LIF의 Bcl-xL 유전자 발현은 STAT1이 조절하고<sup>45</sup>, U-266 myeloma 세포에서

IL-6 의존성 Bcl-xL 유전자 발현에는 STAT3가 역할을 하며<sup>46</sup>, IL-15 신호전달에 의한 Bcl-xL 유전자 조절은 STAT6에 의해서 이루어진다.<sup>47</sup> 본 연구에서는 dexamethasone에 의한 Bcl-xL 유전자 발현조절에 STAT5가 관여됨을 밝혔는데, EMSA를 통하여 Bcl-xL 유전자 프로모터에 있는 putative STAT5-binding site에 STAT5가 결합능이 증가하는 것을 확인하였고, dexamethasone 투여 후 STAT5 인산화가 증가되는 것도 확인하였다. 또한 dominant negative STAT5를 제공하는 재조합아데노바이러스의 뇌교중세포주내 transfection은 dexamethasone 투여에 따르는 Bcl-xL 단백질 유도 효과를 크게 감소시켰다.

Glucocorticoid는 hydrophobic한 성질 때문에 세포내로 자유롭게 들어가서 세포질 내에 존재하는 GR에 결합하여 리간드-수용체 복합체를 형성한다. Glucocorticoid와의 결합이 없을 경우 glucocorticoid receptor은 세포질 내에서 hsp90 및 immunophilin 등과 결합하여 핵 내로의 이동이 어렵게 되고, 세포질 내에서 비활성화 상태로 존재하게 된다. 하지만, 일반적으로 glucocorticoid가 GR에 결합하게 되면 hsp90 및 immunophilin이 떨어져서 GR이 활성화되고<sup>48,49</sup>, 활성화된 GR은 핵내로 이동하여<sup>50</sup> glucocorticoid responsive element (GRE)로 불리는 consensus site의 DNA에 결합하고, 유전자의 전사 활성화를 일으키게 된다.<sup>51</sup> 한편으로는, glucocorticoid의 결합으로 활성화된 GR은 다른 유전자와 상호작용을 통하여 그 유전자의 표적 유전자의 발현을 조절하는데 기여를 하기도 한다.<sup>52</sup> 특히 GR과 STAT5의 상호 작용은 주로 mammary epithelial cell에서 많이 연구되었는데, prolactin에 의해서 임신기간동안 활성화된 STAT5는 성장, 분화 및 모유 단백질 생성에 기여하게 된다.<sup>27</sup> 이 때 GR은 STAT5와 복합체를 형성하여, STAT5의 핵 내 DNA 결합 부위로 이동시켜 결과적으로 STAT5의 전사조절 작용을 도와주는 작용을 하는 것으로 밝혔다.<sup>22,28</sup> 본 연구에는 이전의 보고들에서 주로 유선 세포와 관련하여 STAT5와 glucocorticoid receptor의 상호 연관성을 보여주었던 경우와는 달리 뇌교중세포주에서 이 두 단백질 사이에 어떠한 연관성이 있는지를 제시하는 첫 번째 보고이다.

Co-immunoprecipitation 실험 상 이 두 단백질은 활성화된 상태에서 서로 물리적인 결합을 함을 알 수 있었고, GR antagonist 인 RU486의 처리는 STAT5의 인산화의 소실 및 dexamethasone에 의한 세포고사 억제 효과를 크게 줄였다. 따라서 뇌교종세포에서도 GR은 STAT5와 밀접한 연관을 유지하며, STAT5의 전사조절기능을 증가시키는 역할을 수행하는 것으로 이해된다. 그리고 GR은 본 실험에서 규명하고자 하는 신호전달체계상 맨 처음 신호전달 매개 물질로 생각할 수 있다.

따라서 본 연구를 통하여 밝혀진 dexamethasone 투여 후 camptothecin 유도 세포고사 억제에 관여하는 신호전달물질들의 활성화 및 발현 시간을 시간 순서대로 정리하여 보면 우선 dexamethasone 투여 후 glucocorticoid receptor와의 결합이 신호 전달의 시작이 이루어지고, 곧 이어 2시간 이내에 STAT5가 인산화를 통해서 활성화된다. 활성화된 STAT5는 4시간이 지나면서 인산화가 급격히 소실된다. Bcl-xL의 상위조절자인 인산화 STAT5 단백질의 급격한 감소가 dexamethasone 투여 후 4시간 정도에 시작하는 시점에 상응하여 Bcl-xL 단백질의 발현이 점차적으로 증가되기 시작하여 24시간 정도에서 최대로 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 본 실험에서 얻어진 결과들을 토대로 Bcl-xL, phosphorylated STAT5 및 세포고사 억제 정도를 dexamethasone 투여 후 시간에 따른 변화를 한 그래프에 정리하여 보았다(그림 13). Dexamethasone 투여 후 STAT5의 인산화는 1-2 시간 내에 급속히 일어나서 plateau를 이루고, 이는 Bcl-xL의 전사활성을 야기시키게 되는데, Bcl-xL의 양이 기저치 0.3에 비해서 0.6 정도로 두 배 정도 증가되면서 세포고사 억제 정도가 두드러지기 시작하였다.

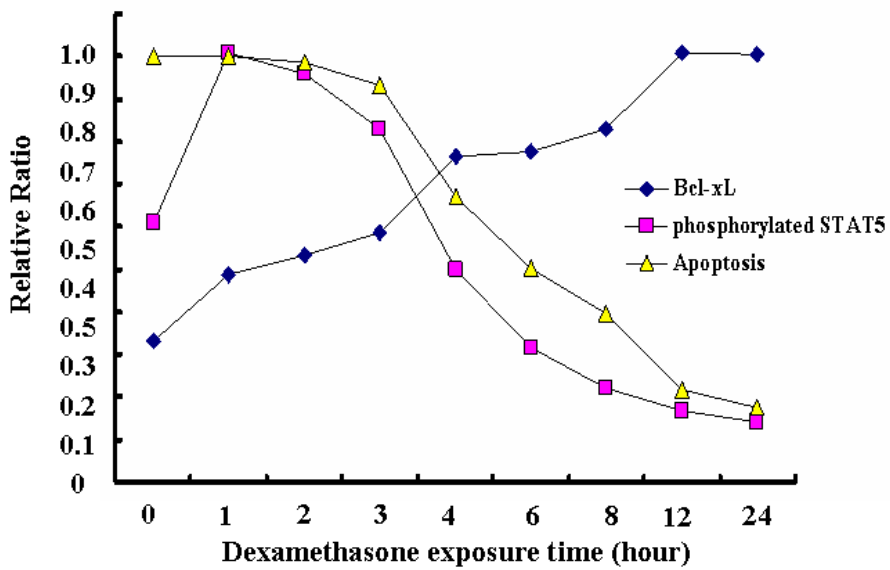


그림 13. Dexamethasone에 대한 노출시간대별 Bcl-xL, phosphorylated STAT5 및 Camptothecine에 의한 세포고사 억제의 상대적 비교. 그림 4의 Bcl-xL 및 그림 8의 STAT5에 대한 western blot 결과를 densitometry로 분석하여 최대치를 1.0 으로 하여 시간대별 상대적 발현양을 나타내었으며, 그림 5의 dexamethasone 전처치 시간에 따른 세포고사 억제 정도의 변화를 전혀 억제되지 않은 상태를 1.0 으로 두고 상대적인 변화를 그래프로 나타내었다.

## V. 결 론

결론적으로 뇌교종세포(C6)에서 dexamethasone에 의한 camptothecin 유도 세포고사 억제에 관련된 기전을 연구한 결과를 정리해 보면, dexamethasone이 투여되면 이는 GR에 ligand로서 결합을 하게 되고, GR은 STAT5의 활성을 유도하고, 이와 물리적 결합을 하게 된다. 이 두 단백질 복합체는 핵 내로 이동하여 Bcl-xL의 프로모터의 STAT5 단백질이 결합할 수 있는 DNA 영역에 붙어서 전사를 조절하게 된다. STAT5의 하위 신호전달 물질인 Bcl-xL 단백질이 전사조절단계에서 조절되어 그 양이 증가되고, 결국 이는 camptothecin에 의해 유도되는 세포고사를 억제하는 것으로 생각된다. 따라서 임상에서 뇌종양 환자에서 흔히 쓰이고 있는 스테로이드 투여는 각종 항암제에 대해 세포사멸효과를 떨어뜨릴 수 있으므로 향후 이 기전 연구를 바탕으로 dexamethasone에 의해 생길 수 있는 가능한 내성요인을 극소화하는 방법을 모색해야 할 것이다.

## 참 고 문 헌

1. Kleihues P, Soylemezoglu F, Schauble B, Scheithauer BW, Burger PC. Histopathology, classification and grading of gliomas. *Glia* 1995;15:211-221.
2. Fine HA. The basis for current treatment recommendations for malignant gliomas. *J Neurooncol* 1994;20:111-120.
3. Rajkumar SV, Buckner JC, Schomberg PJ, Pitot HC, Ingle JN, Cascino TL. Phase I evaluation of pre-irradiation chemotherapy with carmustine and cisplatin and accelerated radiation therapy in patients high-grade gliomas. *Neurosurgery* 1999;44:67-73.
4. Walker MD, Alexander E Jr, Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS Jr, Mealey J Jr, et al. Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *J Neurosurg* 1978;49:333-343.
5. Koehler PJ. Use of corticosteroids in neuro-oncology. *Anticancer Drugs* 1995;6:19-33.
6. Boucher Y, Salehi H, Witwer B, Harsh GR 4th, Jain RK. Interstitial fluid pressure in intracranial tumours in patients and in rodents. *Br J Cancer* 1997;75:829-836.
7. Pavillard V, Kherfella D, Richard S, Robert J, Montaudon D. Effects of the combination of camptothecin and doxorubicin or etoposide on rat glioma cells and camptothecin-resistant variants. *Br J Cancer* 2001;85:1077-1083.
8. Gorman AM, Hirt UA, Orrenius S, Ceccatelli S. Dexamethasone pre-treatment interferes with apoptotic death in glioma cells. *Neuroscience* 2000;96:417-425.

9. Grillot DA, Gonzalez-Garcia M, Ekhterae D, Duan L, Inohara N, Ohta S, et al. Genomic organization, promoter region analysis, and chromosome localization of the mouse bcl-x gene. *J Immunol* 1997;158:4750-4757.
10. Grad JM, Zeng XR, Boise LH. Regulation of Bcl-xL: a little bit of this and a little bit of STAT. *Curr Opin Oncol* 2000;12:543-549.
11. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 1999 1;13:1899-1911.
12. Buckner JC, Reid JM, Wright K, Kaufmann SH, Erlichman C, Ames M, et al. Irinotecan in the treatment of glioma patients: current and future studies of the North Central Cancer Treatment Group *Cancer* 2003;97(9 Suppl):2352-2358.
13. Yang DI, Yin JH, Mishra S, Mishra R, Hsu CY. NO-mediated chemoresistance in C6 glioma cells. *Ann N Y Acad Sci* 2002;962:8-17.
14. Amsterdam A, Tajima K, Sasson R. Cell-specific regulation of apoptosis by glucocorticoids: implication to their anti-inflammatory action. *Biochem Pharmacol* 2002;64:843-850.
15. Legendre F, Dudhia J, Pujol JP, Bogdanowicz P. JAK/STAT but not ERK1/ERK2 pathway mediates interleukin (IL)-6/soluble IL-6R down-regulation of Type II collagen, aggrecan core, and link protein transcription in articular chondrocytes. Association with a down-regulation of SOX9 expression. *J Biol Chem* 2003 31;278:2903-2912.
16. Arnould C, Philippe C, Bourdon V, Gr goire MJ, Berger R, Jonveaux P. The signal transducer and activator of transcription STAT5b gene is a new partner of retinoic acid receptor alpha in acute promyelocytic-like leukaemia. *Hum Mol Genet* 1999;8:1741-1749.



17. Asao H, Okuyama C, Kumaki S, Ishii N, Tsuchiya S, Foster D, et al. Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex. *J Immunol* 2001;167:1-5.
18. Schindler C, Strehlow I. Cytokines and STAT signaling. *Adv Pharmacol* 2000;47:113-174.
19. Meier VS, Groner B. The nuclear factor YY1 participates in repression of the beta-casein gene promoter in mammary epithelial cells and is counteracted by mammary gland factor during lactogenic hormone induction. *Mol Cell Biol* 1994;14:128-137.
20. Martino A, Holmes JH, Lord JD, Moon JJ, Nelson BH. Stat5 and Sp1 regulate transcription of the cyclin D2 gene in response to IL-2. *J Immunol* 2001;166:1723-1729.
21. Wyszomierski SL, Rosen JM. Cooperative effects of STAT5 and C/EBP  $\beta$  on  $\beta$ -casein gene transcription are mediated by the glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* 2001;15:228-240.
22. Stoecklin E, Wissler M, Gouilleux F, Groner B. Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature* 1996;383:726-728.
23. Duke RC, Cohen JJ. IL-2 addiction: withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependent T cells. *Lymphokine Res.* 1986;5:289-299.
24. Leist M, Gantner F, Bohlinger I, Germann PG, Tiegs G, Wendel A. Murine hepatocyte apoptosis induced in vitro and in vivo by TNF-alpha requires transcriptional arrest. *J Immunol.* 1994;153:1778-1788.
25. Yamashita H, Iwase H, Toyama T, Fujii Y. Naturally occurring dominant-negative Stat5 suppresses transcriptional activity of estrogen receptors and induces apoptosis in T47D breast cancer

- cells. *Oncogene* 2003;22:1638-1652.
26. Yamashita H, Nishio M, Fujii Y, Iwase H. Dominant-negative Stat5 inhibits growth and induces apoptosis in T47D-derived tumors in nude mice. *Cancer Sci* 2004;95:662-665.
  27. Bromberg J, Darnell Jr. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 2000;19:2468-2473.
  28. Cella N, Groner B, Hynes NE. Characterization of Stat5a and Stat5b homodimers and heterodimers and their association with the glucocorticoid receptor in mammary cells. *Mol Cell Biol* 1998;18:1783-1792.
  29. Ostergaard L, Hocherg FH, Rabinov JD, Sorensen AG, Lev M, Kim L, et al. Early changes measured by magnetic resonance imaging in cerebral blood flow, blood volume, and blood-brain barrier permeability following dexamethasone treatment in patients with brain tumors. *J Neurosurg* 1999;90:300-305.
  30. Heiss JD, Papavassiliou E, Merrill MJ, Nieman L, Knightly JJ, Walbrige S, et al. Mechanism of dexamethasone suppression of brain tumor-associated vascular permeability in rats. Involvement of the glucocorticoid receptor and vascular permeability factor. *J Clin Invest* 1996;98:1400-1408.
  31. Borski RJ. Nongenomic membrane actions of glucocorticoids in vertebrates. *Trends Endocrinol Metab.* 2000;11:427-436.
  32. Miyoshi H, Ohki M, Nakagawa T, Honma Y. Glucocorticoids induce apoptosis in acute myeloid leukemia cell lines with A t(8;21) chromosome translocation. *Leuk Res* 1997;21:45-50.
  33. Feng Z, Marti A, Jehn B, Altermatt HJ, Chicaiza G, Jaggi R. Glucocorticoid and progesterone inhibit involution and programmed

- cell death in the mouse mammary gland. *J Cell Biol* 1995;131:1095-1103.
34. Chang TC, Chang TC, Hung MW, Jiang SY, Chu JT, Chu LL, et al. Dexamethasone suppresses apoptosis in a human gastric cancer cell line through modulation of bcl-x gene expression. *FEBS Lett* 1997;415:11-15.
  35. Yamamoto M, Fukuda K, Miura N, Suzuki R, Kido T, Komatsu Y. Inhibition by dexamethasone of transforming growth factor beta1-induced apoptosis in rat hepatoma cells: a possible association with Bcl-xL induction. *Hepatology*. 1998;27:959-966.
  36. Vaux DL, Strasser A. The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2239-2244.
  37. Nunez G, Clarke MF. The Bcl-2 family of proteins: regulators of cell death and survival. *Trends Cell Biol* 1994;4(11):399-403.
  38. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten G, Turka LA, et al. *Cell* 1993;74:795-808.
  39. Minn AJ, Velez P, Schendel SL, Liang H, Muchmore SW, Fesik SW, et al. Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 1997;385:353-357.
  40. Schimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 1999;399:483-487.
  41. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:1899-1911.
  42. Coffey PJ, Koenderman L, de Groot RP. The role of STATs in myeloid differentiation and leukemia. *Oncogene*. 2000;19:2511-2522.
  43. Smithgall TE, Briggs SD, Schreiner S, Lerner EC, Cheng H, Wilson MB. Control of myeloid differentiation and survival by Stats.

- Oncogene 2000;19:2612-2618.
44. Dumon S, Santos SC, Debierre-Grockiego F, Gouilleux-Gruart V, Cocault L, Boucheron C. et al. IL-3 dependent regulation of Bcl-xL gene expression by STAT5 in a bone marrow derived cell line. *Oncogene* 1999;18:4191-4199.
  45. Fujio Y, Kunisada K, Hirota H, Yamauchi-Takahara K, Kishimoto T. Signals through gp130 upregulate bcl-x gene expression via STAT1-binding cis-element in cardiac myocytes. *J Clin Invest* 1997;99:2898-2905.
  46. Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, et al. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 1999;10:105-115.
  47. Masuda A, Matsuguchi T, Yamaki K, Hayakawa T, Yoshikai Y. Interleukin-15 prevents mouse mast cell apoptosis through STAT6-mediated Bcl-xL expression. *J Biol Chem*. 2001;276:26107-26113.
  48. Caldenhoven E, Liden J, Wissink S, Van de Stolpe A, Raaijmakers J, Koenderman L, et al. Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 1995;9:401-412.
  49. McEwan IJ, Wright AP, Gustafsson JA. Mechanism of gene expression by the glucocorticoid receptor: role of protein-protein interactions. *Bioessays* 1997;19:153-160.
  50. Beato M, Chavez S, Truss M. Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids* 1996;61:240-251.
  51. Truss M, Beato M. Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr Rev*

1993;14:459-479.

52. Heck S, Kullmann M, Gast A, Ponta H, Rahmsdorf HJ, Herrlich P, et al. A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1. EMBO J 1994;13:4087-4095.

## **Abstract**

Mechanism of inhibition of camptothecin-induced apoptosis by dexamethasone in C6 glioma cells

Jae Ho Cho

*Department of Medicine  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Chang-Ok Suh)

Malignant glioma, which is the most common primary central nervous system tumor in adults, carries extremely poor prognosis despite aggressive treatment with surgery, irradiation, and/or chemotherapy. These tumor cells are notoriously resistant to apoptosis. Resistance to apoptosis can be achieved via the up-regulation and/or down-regulation of anti-apoptotic or pro-apoptotic Bcl-2 family members, respectively. Recently dexamethasone, a synthetic glucocorticoid, is reported to induce partial resistance to anticancer drugs in glioma cells by transcriptional activation of Bcl-xL gene. The notion that the steroid, used commonly to relieve edema associated with brain tumor, protects cells from camptothecin, directed this study to investigate the upstream regulators for Bcl-xL transactivation after dexamethasone treatment.

For the induction of apoptosis in C6 glioma cells, 2  $\mu$ M of camptothecin was added to the culture medium. Apoptotic cell death

was confirmed by a colorimetric caspase-3 assay with CaspACE™<sup>®</sup> (Promega, Madison, USA), and DNA breakage by Cell Death Detection Elisa Kit<sup>®</sup> (Roche, Mannheim, Germany). Increased caspase-3 activity and DNA fragmentation after camptothecin alone was markedly reduced in cells pre-treated with 1  $\mu$ M of dexamethasone. This effect was abolished by glucocorticoid receptor (GR) antagonist RU486, indicating that the protection due to dexamethasone is mediated via this receptor. Bcl-xL, which is markedly up-regulated in a time-dependent fashion following exposure to dexamethasone. The extent of apoptosis inhibition by dexamethasone corresponded well with the change of Bcl-xL expression according to exposure time to dexamethasone. In order to study the role of STAT5 in this signaling cascade, we determined Bcl-xL expression with introduction of dominant-negative STAT5. C6 glioma cells infected with the dominant negative STAT5 adenovirus, AdStat5a $\Delta$ 740, suppressed strongly expression of Bcl-xL gene, indicating that Bcl-xL expression was controlled in transcriptional level by STAT5. Upon dexamethasone treatment, phosphorylated STAT5 increased within 2 hour and gradually decreased from 4-6 hour on western blot. On electrophoretic mobility shift assay (EMSA) to investigate nuclear DNA binding activity of STAT5 protein, the binding activity increased gradually up to 4 hour and then decreased thereafter. Nuclear extract was immunoprecipitated with a GR receptor specific antiserum, and developed on immunoblot with a STAT5 specific antiserum. Untreated control cells showed minimal activity of phosphorylated STAT5, whereas cells treated with dexamethasone for 2-4 hour had increased phosphorylated STAT5 activity. In summary, dexamethasone binds to GR, which then activates STAT5. Activated GR complexes with STAT5, and helps it to direct

the STAT5 DNA binding site, providing positive enhancement of STAT5 transactivation for Bcl-xL regulation. Ultimately this mechanism study will have a role to identify therapeutic drugs or methods to reverse the effect of inhibition of camptothecin-induced apoptosis by dexamethasone which is needed essentially in the treatment with brain tumor.

---

Key Words : dexamethasone, apoptosis, brain tumor, STAT5, Bcl-xL, camptothecin