사람 간암세포주에서 과발현된 hexokinase II의 호기해당작용에서의 역할 및 항세포사멸과 연관된 PI3K/Akt 경로에 미치는 효과

연세대학교 대학원

의 학 과

황 희 성

사람 간암세포주에서 과발현된 hexokinase II의 호기해당작용에서의 역할 및 항세포사멸과 연관된 PI3K/Akt 경로에 미치는 효과

지도교수 이 종 두

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2008 년 12 월

연세대학교 대학원

의 학 과

황 희 성

황희성의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2008 년 12 월

감사의 글

본 연구를 수행하고 논문을 집필하면서 많은 분들의 도움을 받았습니다. 저에게 학위를 할 수 있는 기틀을 마련해 주시고, 논문을 쓰기까지 연구를 기획하시고 이끌어 주신 이종두 교수님께 지면을 빌어 깊은 감사를 드립니다. 그리고 연구 진행 과정에서 방향을 제시해 주시고 오류를 지적해 주신 미생물학교실 박전한 교수님께 감사 드립니다.

세세한 자문과 도움을 주신 박찬일 교수님, 한광협 교수님, 전태주 교수님께 감사 드립니다. 실험과정에 많은 조언과 도움을 주신 안근재 선생님께 감사 드립니다.

그리고 가정에서 부족한 저를 이해해 주는 남편 이성주와, 아들 영민, 딸 경민, 원민, 승민, 정민에게도 고마운 마음을 전합니다.

몸이 불편하시지만 항상 저를 응원해 주시는 어머님과 물심양면으로 도와 주시는 시부모님께 감사 드립니다. 이제는 양지바른 곳에 영면해 계신 아버님께도 감사의 뜻을 전합니다.

저 자 씀

차 례

국문요약.....1

Ⅰ. 서 론.....4

Ⅱ. 재료 및 방법.....8

1. 재료.....8
2. HK II 발현 벡터의 제작.....8
3. rhHK II (recombinant human HK II: rhHK II)의 박테리아 발현과 정제.....9
4. rhHK II 활성도 측정.....10
5. 세포 내 전체 HK 활성도의 측정.....10
6. HK II에 대한 단클론항체의 제작.....10
7. HK II를 약하게 발현하는 SNU-449 세포주에서 HK II 과발현 안정 세포주의 확립.....11
8. 전체 RNA 준비 및 역전사중합효소연쇄반응.....12
9. Western blot 분석.....13
10. 세포 내 ATP 함량과 lactate의 생성 측정.....14
11. Phospho-AMP-activated protein kinase (p-AMPK)의 활성도 측정 14
12. HK II의 면역형광분석.....15
13. F-18 FDG 섭취 측정.....16
14. Cisplatin 처리와 세포 생존능력 측정.....16
15. 세포질과 미토콘드리아 분획 단백질의 분리와 PI3K 억제제인 LY294002의 처리.....17

Ⅲ. 결 과.....18

1. 다양한 사람 간암세포주에서 HK II의 발현.....18
2. rhHK II와 SNU-449-HK II 세포주 내에서 과발현된 HK II의 효소활성도.....19

3. SNU-449-HK II 세포주와 Chang-HK II 세포주에서 HK II의 발현 21
4. 세포 내 과발현된 HK II가 포도당 대사와 관련된 다른 유전자의 발현에 미치는 영향 22
5. HK II 과발현이 ATP와 lactate 생성 및 AMPK 활성에 미치는 효과 23
6. 과발현된 HK II의 세포 내 위치결정 25
7. HK II 과발현 세포주에서 VDAC 발현의 변화 26
8. HK II 가 과발현된 세포주에서 PET을 이용한 F-18 FDG 섭취 결과 26
9. HK II 과발현이 세포의 증식 및 항암제에 대한 감수성에 미치는 효과 28
10. 과발현된 HK II의 세포사멸 조절 30

IV. 고 찰 33

Ⅴ. 결 론 40

참고문헌 42

영문요약 49

그림 차례

그림 1. 다양한 간암세포주에서 HK II의 발현. 18
그림 2. rhHK II와 SNU-449-HK II 세포주에서의 HK II 효소활성도 20
그림 3. . SNU-449-HK II 세포주와 Chang-HK II 세포주에서 HK II의 발현 21
그림 4. 세포 내 과발현된 HK II가 HK isoform과 Glut isoform 및 G-6-Pase에 미치는 영향. 22
그림 5. HK II가 과발현된 SNU-449-HK II 세포주에서 ATP와 lactate 및 p-AMPK의 변화 24
그림 6. 면역형광분석법으로 관찰한 HK II의 세포 내 분포 위치 25
그림 7. HK II 과발현 세포주에서 VDAC 발현의 변화 26
그림 8. HK II 과발현 세포주에서 F-18 FDG PET의 섭취 ... 27
그림 9. HK II 과발현 세포주에서 세포 성장과 cisplatin에 대한 감수성 변화 29
그림 10. HK II 과발현이 PI3K 활성에 미치는 영향 30
그림 11. PI3K 억제제인 LY294002로 처리 후 세포 내 전체 HK II 단백질량의 변화와, 세포질과 미토콘드리아 분획의 HK II 양의 변화. 32

표 차 례

표 1. 실험에서 사용된 primer의 nucleotide 염기서열과
기대되는 amplicon의 크기. 13

국문요약

사람 간암세포주에서 과발현된 hexokinase II 의 호기해당작용에서의 역할 및 항세포사멸과 연관된 PI3K/Akt 경로에 미치는 효과

Hexokinase II (HK II)는 악성종양에서 호기해당작용에 핵심적인 반응조절 효소이다. 세포의 증진된 해당작용을 반영하는 F-18 FDG 섭취의 증가는 간세포암의 악성도와 불량한 예후와 관련이 있으며, 악성도가 높은 암일수록 F-18 FDG섭취가 높다. 간암세포의 경우 HK II는 정상세포보다 100배 이상 증가되어 있다. HK II는 porin과의 복합체 상태 [HK- voltage dependent anion channel (VDAC)-adenine nucleotide translocator (ANT) complex]로 미토콘드리아에 결합하여 미토콘드리아 내 산화성 인산화와 포도당 해당과정을 원활히 연결시키며, 이 때 생성된 ATP와 포도당 분해산물이 암세포 분열에 필요한 에너지와 물질을 제공한다. VDAC-ANT 결합체가 미토콘드리아 투과성변이(mitochondrial permeability transition)와 세포사멸 인자의 방출을 조절하고, HK II가 세포사멸 통로를 조절하는 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 또한 HK II가 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt 신호전달 경로를 조절하여 항세포사멸 작용을 나타내는 것으로 보고되었으나, 간암세포에서 HK II의 Akt 관련 항세포사멸 작용의 분자생물학적 기전은 정립되어 있지 않다.

본 연구에서는 HK II 의 역할에 핵심적인 세포 내 미토콘드리아와의 결합과 포도당 인산화 과정을 밝히기 위하여 HK II 발현이 적은 간암세포인 SNU-449 세포주와 정상 간세포로 알려진 Chang 세포주에 HK II 유전자를 이입(transfection)시켜 해당작용과 이에 관련된 유전자 발현을 분석하고 항암제에 대한 항세포사멸 효과를 관찰하였다. 또한 과발현된 HK II 의 항세포사멸 작용과

관계된 세포 내 신호전달분자를 규명하기 위하여 PI3K/Akt 경로에 작용하는 PI3K 억제제를 처리하여 항세포사멸 작용의 기전을 밝히고자 하였다

HK II 가 저발현된 SNU-449 세포주와 정상 간세포인 Chang 세포주에 재조합 HK II 를 이입시켜 HK II 과발현 SNU-449 간암세포주(SNU-449-HK II)와 Chang 세포주(Chang-HK II)를 확립하여 HK II 의 발현과 기능을 RT-PCR, western blot 분석, ATP 와 lactate 생성, F-18 FDG 섭취, 면역형광분석법으로 조사하여 이입된 HK II 가 효과적으로 발현되고 기능함을 확인하였다. 세포 생존능과 항암제에 대한 감수성 평가는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 분석을 이용한 세포계산법으로 측정하였다. 또한 종양의 악성도와 관계되는 신호전달분자로 PI3K/Akt 경로를 연구하였다.

HK II 를 과발현하는 SNU-449-HK II 와 Chang-HK II 에서 HK II 가 높게 발현되었지만 포도당 대사에 관여하는 다른 유전자, 즉 HK I, HK III, glucose transporter-1, -2, glucose-6-phosphatase 의 발현은 변화하지 않았다. 세포 내 에너지 감지장치인 AMP-activated protein kinase (AMPK)는 SNU-449-HK II 에서 낮은 발현을 보였고, 24 시간 경과 후 ATP 양이 20% 증가하였으며 lactate 생성량이 45% 증가하여 AMPK 저하에 ATP 증가가 관여하였음을 확인하였다. HK II 의 작용 부위를 알아보기 위하여 면역형광시험법을 시행하여 과발현된 HK II 의 분포 위치가 세포 내 미토콘드리아와 일치되는 것을 관찰하였다. 그러나 HK II 가 결합하는 미토콘드리아의 VDAC 은 그 발현도가 변하지 않았다. SNU-449-HK II 에서 F-18 FDG 섭취가 대조군에 비하여 54% 증가하였고, 배양 3 일 후 세포증식이 1.5~2.0 배 항진되었다($p<0.005$). SNU-449-HK II 에 10 μg 의 cisplatin 을

처리한 결과 약물에 대한 감수성이 저하되었다. PI3K/Akt 의 신호전달분자인 활성 Akt (p-Akt)가 SNU-449-HK II 에서 대조군에 비하여 상당히 증가하였고, PI3K 억제제인 50 μM 의 NY294002 로 처리한 후 p-Akt 가 거의 소실되었다. PI3K 억제제 투여 후 세포 내 전체 HK II 의 양은 변화하지 않았으나 미토콘드리아 구획 HK II 가 현저히 감소하고 세포질 구획 HK II 는 증가하여 미토콘드리아에 결합한 HK II 가 세포질로 전위함을 확인하였다.

결론적으로 사람 간암세포주에서 HK II 의 과발현과 세포 내 해당작용 및 세포사멸에 관련된 신호전달체계의 관계를 분석하여, HK II 가 호기해당작용에 결정적인 반응조절효소로서 간암세포의 악성도와 밀접한 연관이 있음을 알 수 있었다. HK II 는 미토콘드리아에 결합하여 PI3K/Akt 신호전달체계와 연계되어 간암세포의 성장과 증식, 항암제에 대한 감수성 저하 등 항세포사멸 작용에 중요한 역할을 담당하는 것을 확인할 수 있었다.

핵심 되는 말: hexokinase II, 간세포암, 호기해당작용, 항세포사멸, PI3K/Akt

사람 간암세포주에서 과발현된 hexokinase II 의 호기해당작용에서의 역할 및 항세포사멸과 연관된 PI3K/Akt 경로에 미치는 효과

< 지도교수 **이 종 두** >

연세대학교 대학원 의학과

황 희 성

Ⅰ. 서 론

양전자방출단층촬영(positron emission tomography, PET)은 탄수화물, 단백질, 지방과 같은 생체 내 대사물질에 양전자 방출 방사성 핵종을 표지하여 인체 내에 투여하고, 방사성 핵종의 분포를 영상화하는 최신 진단장비이다. 1970 년대 후반 반감기가 비교적 긴 F-18 을 이용한 F-18 Fluorodeoxyglucose (FDG)가 개발된 이래 악성 종양의 진단에 PET 의 중요성이 더욱 부각되었다 [1]. 이의 근거는 1930 년대 초 Warburg 등이 보고한 학설로 악성종양에서 lactate 를 결과물로 생성하는 포도당 대사의 증가이다 [2]. 즉 암세포에서는 산소가 충분한 조건하에서도 호기해당작용(aerobic glycolysis)이 항진되어 주로 lactate 를 생성하며, 포도당은 세포의 생존을 유지하기 위한 에너지원과 세포구성에 필요한 탄소 공급원으로 중요한 역할을 한다는 것이다. 이 “Warburg 효과”가 양전자방출단층촬영술의 이론적 근거가 되었다 [3]. 근래에는 F-18 FDG PET 을 촬영하여 암의 악성도를 평가할 수 있게 되었으며, 암의 진단과 병기 결정, 암의 재발여부, 치료방향 결정 등에 이용되고 있다.

간세포암은 원발성 간암의 85~90%에 해당되며, 전 세계적으로 발생빈도가 증가하고, 1 년 생존율이 23%, 5 년 생존율이 5%로 예후가 좋지

않은 것으로 알려져 있다[4]. 간세포암의 40~50% 정도가 F-18 FDG PET 에서 위음성을 보이는데, 이는 상이한 조직병리학적 분화도로 인한 포도당 대사의 차이 때문으로 생각된다[5, 6]. 즉 조직 분화도가 좋은 간암세포는 F-18 FDG 섭취가 적은 반면, 분화가 나쁜 간암의 경우엔 F-18 FDG 의 섭취가 많다. 그러므로 F-18 FDG PET 을 이용하여 종양의 악성도를 평가하고 예후를 예측할 수 있다. F-18 FDG PET 영상에서 FDG 섭취도를 정량적으로 표시하는 표준섭취화계수(standardized uptake value, SUV)가 간암의 종양배가시간(tumor doubling time)과 전이, 생존율, 그리고 재발률과 관계가 깊은 것으로 보고되었다[7, 8]. 즉 분화가 좋지 않고 악성도가 높은 간암일수록 예후가 나쁘다[9, 10]. 간암에서 포도당 유도체인 F-18 FDG 섭취는 포도당 운반체인 Glut 보다는 HK 의 활성도와 더 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다[11, 12]. 이와 같이 간암세포에서 그 병태생리학적 기전은 복합적이지만 HK 가 간암의 악성도 결정에 핵심 역할을 하는 것으로 보인다.

F-18 FDG 를 이용한 PET 촬영에서 간암 진단에 관한 기전은 다음과 같다. 정상 간세포에서는 글리코겐 합성과 해당작용에 필요한 간 특이적 포도당 운반체인 glucose transporter (Glut)-1, -2 가 존재하여 포도당 항상성을 조절한다. 해당효소인 HK 는 포도당을 glucose-6-phosphate (G-6-P)로 인산화시켜 세포 활동에 필요한 ATP 를 생산하며, G-6-P 는 글리코겐, 아미노산, 지방산, 핵산의 합성에 필요한 핵심 분자가 된다. PET 에 이용되는 F-18 FDG 는 포도당 유도체로서 HK 에 의하여 대사된 후 더 이상 해당작용이 진행되지 않고, deoxyglucose-6-phosphate 형태로 세포 내에 고착됨으로써 이를 이용한 영상화가 가능하다.

보편적으로 암세포는 Glut 와 HK 가 증가되어 있으나, 간암세포에는 Glut 보다는 해당과정에 작용하는 첫 번째 효소인 HK 의 발현이 현저히 증가되어 있다. 대표적인 포도당 분해효소인 HK 에는 4 개의 isoenzyme (HK I~IV)이 존재하며 그 중 HK II 가 간암세포에서 현저히 증가한다.

간암세포의 경우 HK II 는 정상세포보다 100 배 이상 증가하고 저산소증일 때 더욱 발현이 높다 [5, 13, 14]. HK I~III 는 약 100 kDa 의 분자량으로 포도당에 대하여 높은 친화성을 가지며(Km=0.02~0.03mM) 그 활성도는 G-6-P 의 농도에 의하여 억제된다. HK IV 는 glucokinase 로 알려져 있으며, 분자량 50 kDa 이고 포도당에 대한 친화성이 낮고(Km=5~8mM) G-6-P 의 농도에 영향을 받지 않는다 [14].

간암세포의 포도당 대사에는 미토콘드리아에 결합된 HK (mtHK)의 역할이 중요한 것으로 알려져 있다. HK I 과 HK II 는 세포질 내 유리상태로 존재하거나 미토콘드리아 외막에 결합한 상태로 존재하며, 전체 HK II 의 50~75%가 미토콘드리아의 외막에 결합된 상태이다 [15-17]. 이는 산화성 인산화에 의하여 미토콘드리아에서 생성된 ATP 를 보다 용이하게 이용할 수 있는 구조이다 [15, 18, 19]. mtHK II 는 미토콘드리아에서 생성된 ATP 뿐만 아니라 세포질에서 유입된 ATP 를 이용하여 포도당 분해작용을 한다 [20]. HK II 가 미토콘드리아 외막에 결합하는 부위는 voltage dependent anion channel (VDAC)로 알려져 있다 [21]. 미토콘드리아 내막에 존재하는 adenine nucleotide translocator (ANT)가 세포질의 ADP 와 미토콘드리아의 ATP 를 교환하는 역할을 하며 [22, 23], HK II 와 porin 복합체(HK-VDAC-ANT complex)를 형성하여 ATP 를 이용한 해당작용을 진행한다. 즉 porin-HK II 결합체는 미토콘드리아 내 산화성 인산화와 포도당 해당과정을 원활히 연결시키며, 이때 생성된 ATP 와 포도당 분해산물이 암세포분열에 필요한 에너지와 물질을 제공한다 [24]. 최근에는 HK II-VDAC-ANT 결합체가 미토콘드리아 투과성변이(mitochondrial permeability transition)와 세포사멸 인자의 방출을 조절하는 것으로 알려져 있고, HK II 가 세포사멸 통로를 통제하는 역할을 담당하는 것으로 보고되었다 [25].

간세포암에서 HK II 의 항세포사멸 작용의 분자생물학적 기전은 아직까지 명백히 알려져 있지 않다. 최근 몇몇 보고에 따르면 mtHK II 가

phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt 신호전달 경로를 조절하여, 그 결과 세포사멸 분자인 Bax 와 Bak 가 미토콘드리아로 접근하는 것을 막고 cytochrome c 방출을 억제하게 된다 [26, 27]. 또한 저산소증에서는 약제 저항성이나 방사선 치료의 민감성을 감소시키는데, 이는 hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)의 상향조절(upregulation)을 통해 HK II 의 발현이 증가하고 Akt 와 nuclear factor-κB (NF-κB) 같은 세포 생존분자를 활성화시키는 것과 밀접한 연관이 있는 것으로 밝혀져 있다 [28, 29].

HK II 의 분자구조 중 N-말단은 hydrophobic α helix 를 형성하여 미토콘드리아에 결합되는 핵심 부위이다. HK I 은 NH_2- 말단에서만 포도당 촉매활성이 일어나지만, HK II 는 NH_2- 와 COOH- 말단에서 각각 포도당 촉매작용을 담당한다 [30]. 그리고 HK II promoter 의 근위부에 존재하는 조절부위에 HIF-1 와 c-Myc 및 변이된 종양억제인자인 p53 와 같은 여러 전사인자(transcription factor)가 작용하여 HK II 를 활성화시킨다 [31-33]. 이처럼 과발현된 HK II 와 전사인자들과의 상호작용이 암세포의 증식과 세포의 생존능력에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 HK II 의 역할에 핵심적인 세포 내 미토콘드리아와의 결합과 포도당 인산화 과정을 밝히기 위하여 HK II 발현이 적은 간암세포인 SNU-449 세포와 정상 간세포로 알려진 Chang 세포에 HK II 유전자를 이입(transfection)시켜 해당작용과 이에 관련된 유전자 발현을 분석하고 항암제에 대한 항세포사멸 효과를 관찰하였다. 또한 항세포사멸과 관련된 신호전달분자로 알려진 PI3K/Akt 경로와의 연관성을 알기 위하여 PI3K 억제제로 처리하여 항세포사멸 작용을 나타내는 기전을 규명하고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

DEAE-Sepharose Fast Flow와 CM-Sepharose Fast Flow, Sephacryl S-200 High Resolution 을 Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden)에서 구입하였고, Ni-NTA resin 과 isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane sulfonic acid (HEPES) 완충용액, dithioerythritol (DTE), cisplatin은 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Leupeptin, pepstatin과 phenyl-methyl sulfonyl fluoride (PMSF), imidazole은 Boehringer Manheim (Manheim, Germany)에서 구입하였다. Glucose와 *Leuconostoc mesentroides* glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDase), adenosine triphosphate (ATP, disodium salt)는 Roche Chemical Company (Mannhein)에서 구입하였다. Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+, disodium salt)는 Fluka Chemical Company (Buchs, Switzerland)에서 구입하였다.

SNU-449 세포주와 SNU-475 세포주를 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하였다. Chang 세포주와 HepG2, Hep3B 세포주는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였다.

HK I와 Akt, p-Akt, PI3K, p-AMPK에 대한 다클론항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였고, HK III와 Glut-1, -2, G-6-Pase에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. 모든 horseradish peroxidase (HRP) conjugated 2차 항체는 Zymed Laboratory (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다.

2. HK II 발현 벡터의 제작

HK II 단백질의 coding부위를 제한효소부위(밑줄 친 부분)를 포함한 5'-oligonucleotide primer CGAGCTC**CATATG**ATTGCCTCGCATCTGCT와 3'-oligonucleotide primer CG**GAATTC**TTAATGATGATGATGATGTCGCTGTCCA GCCT를 이용하여 PCR 방법으로 증폭시켰다. 증폭된 DNA를 gel로 정제하

고, 적절한 제한효소로 분해시킨 후, 제한효소로 처리한 pRSET A bacterial expression vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 연결시켰다(pRSET A-HK II).

Mammalian expression plasmid DNA을 얻기 위하여, HK II DNA를 Nde I / Klenow enzyme과 EcoR I로 처리하여 pRSET A로부터 분리한 다음, EcoR V와 EcoR I로 처리한 pcDNA 3.1/Myc-His (Invitrogen)에 연결시켰다(pcDNA-HK II). 모든 결과물은 DNA sequencing으로 확인하였다.

3. 재조합 사람 HK II (recombinant human HK II: rhHK II)의 박테리아 발현과 정제

rhHK II를 제조하기 위하여 pRSET A-HK II를 *Escherichia coli* (BL21)에 형질전환시켜 BL21에서 발현시키고 제조사(Sigma)의 권장방법으로 재조합 단백질을 Ni-NTA resin을 이용하여 정제하였다. 약술하면, 형질전환된 박테리아를 100 μg/ml ampicillin이 첨가된 Luria-Bertani (LB) broth medium에서 22℃ 조건으로 배양하여 A_{600} 0.6이 될 때 0.5 mM IPTG로 재조합 단백질 발현을 유도시킨 후 추가로 4시간 이상 배양하였다. 세포들을 10분 동안 10,000 rpm으로 원심분리시켜 획득하였고, 인산완충식염수(PBS, pH 7.4)에서 재부유한 후, 초음파처리로 파괴하였다. 세포잔여물을 제거한 후 상층액을 0.3 M NaCl과 10 mM imidazole을 포함한 50 mM PBS (pH 8.0)로 처리하고 Ni-NTA column에 평형시켰다. 0.3 M NaCl과 50~100 mM imidazole을 포함한 50 mM PBS (pH 8.0)로 column을 씻어낸 후, 단백질을 loading 완충용액에서 250 mM imidazole로 추출하였다. 모든 재조합 단백질들을 pH 7.4에서 PBS로 사전 평형된 Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC) gel-filtration column (GE healthcare, Stockholm, Sweden)을 통하여 정제하고 Centricon apparatus (Amicon, Beverly, MA, USA)로 농축시켰다. 농축된 재조합 단백질을 BCA 분석(Pierce, Rockford, IL, USA)으로 정량화하고 -70℃에 보관하였다.

4. rhHK II 활성도 측정

rhHK II 0.5~1.5 μg을 이용하여 HK II 활성도를 측정하였다. HK II에 의한 G-6-P 형성은 과량의 G-6-PDase (EC 1.1.1.49)의 존재 하에 NADPH 생성과 연계되어 나타난다. HK II 활성도 분석은 수정된 protocol에 따라 수행하였으며, VersaMax microplate 판독기(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 30℃, 340 nm에서 200 μl의 반응 혼합물(50mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 2.5 mM DTT, 0.3 mM NAD^+, 5 mM ATP, 1 U/μl G-6-PDase from *Leuconostoc mesenteroides*, 4 mM glucose)에서 NAD^+의 환원을 측정하면서 수행하였다. 1 unit의 효소 활성도란 분당 1 μM의 G-6-P를 생성시키는 효소 농도를 일컬으며 효소 농도는 mU/mg protein으로 표현하였다.

5. 세포 내 전체 HK 활성도의 측정

세포 내 전체 HK 활성도는 Waki등이 수정하고[34] Vinuela 등이 제안한 방법[35]을 이용하여 측정하였다. 50 mM triethanolamine과 5 mM $MgCl_2$를 함유한 pH 7.6 완충용액에서 세포를 용해시키고, 4℃에서 5분간 1,000 g로 원심분리하여 세포질에 유리 상태로 존재하는 HK와 mtHK를 포함한 상층액을 얻었다. 세포 내 전체 HK 활성도를 측정하기 위해 균질화 완충용액(0.5 mM glucose, 5 mM ATP, 0.25 mM reduced nicotineamide adenine dinucleotide phosphate, 6 U G-6-PDase)을 20℃에서 15분간 사전 배양 시킨 후 10,000 g로 원심분리하고 위에서 얻은 상층액 0.5~1.5 μg을 첨가하였다. HK 활성도는 340 nm에서의 흡광도로 측정하였다. HK 활성도 측정은 표준 곡선을 사용하였는데, 1 unit의 HK 활성도란 20℃에서 분당 1 μM의 포도당을 인산화시키는 효소 농도를 일컬으며 효소 농도는 mU/mg protein으로 표현하였다.

6. HK II에 대한 단클론항체의 제작

HK II에 대한 단클론항체가 상품화되지 않았으므로 실험실에서 직접

단클론항체를 제조하였다. 정제된 rhHK II 단백질을 BALB/c mice에 면역시켜 hybridoma를 기존에 제시된 방법으로 제작하였다[36]. 약술하면, 마우스는 3주 간격으로 20 μg의 rhHK II 단백질을 3번 복강 주사하여 면역시켰고, 이어서 마지막 면역 후 10일째 복강 내로 추가 접종하였다. 첫 번째 면역에서는 rhHK II 단백질을 complete Freund adjuvant와 유탁액을 만들어 주사하였으며 두 번째 면역부터는 incomplete Freund adjuvant를 사용하였다. 추가 접종은 adjuvant 없이 주사하였다. 면역된 마우스로부터 비장세포를 얻어 SP2/0 mouse myeloma 세포와 융합시켰다. Hybridoma는 RPMI 1640 배지(Invitrogen)에서 배양하였으며, Solid phase ELISA 방법으로 면역글로불린을 screening하였다. ELISA 양성 hybridoma는 limiting dilution 방법으로 4차례 subcloning하였다. 그 다음 다시 ELISA로 선별하였다. 양성 클론들을 24-well과 75-cm^2 flask (Nunc, Nagel Inc., Roskilde, Denmark)에서 배양하거나, 마우스에 복강 주사하여 증식시켰다. Ig isotype은 isotype kit (ISO-2, Sigma)을 사용하여 결정하였다.

Hybridoma 상층액의 ELISA 분석을 위하여 Microtiter polystyrene plate를 pH 9.6 0.05 M carbonate/bicarbonate 완충용액에서 5 μg/ml rhHK II로 coating 시키고, 4℃에서 밤새 배양하였다. 다음 날 다양하게 희석된 hybridoma 상층액 100 μl를 첨가한 후 실온에서 1~2시간 반응시켰다. 일차 항체 검출을 위하여 peroxidase로 표지 된 goat 항-mouse IgM 항체(1:2000; DAKO, Glostrup, Denmark)를 사용하였고 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) 기질(Sigma)을 발색원으로 사용하였다. 결과는 microplate 판독기(BIO-RAD, Hercules, CA, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

7. HK II를 약하게 발현하는 SNU-449 세포에서 HK II 과발현 안정 세포주의 확립

내인성 HK II 양이 매우 적은 SNU-449 세포를 10% 열 불활성화 fetal bovine serum (FBS)과 penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μg/ml)을 첨가한

RPMI 1640배지에서 배양하였다. 정상 간세포인 Chang 세포주와 HepG2, Hep3B 세포주는 37℃ humidified 5% CO_2 incubator에서 10% FBS와 penicillin-streptomycin을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에서 보존하였다. HK II를 안정적으로 과발현하는 세포주를 확립하기 위하여, 각각 15 × 10^4개의 SNU-449 세포와 Chang 세포를 20시간 동안 60-mm 배양접시에서 배양하였다. 유전자 이입을 위하여 4 μg의 pcDNA-HK II plasmid DNA에 15 μl의 Lipofectamine (Invitrogen)을 첨가하여 세포를 4시간 동안 37℃ 에서 배양한 후 FBS가 없는 RPMI 1640로 한 차례 세척하였다. 1 mg/ml Geneticin (G418, Invitrogen)을 함유한 배지에서 14～20일간 분할(splitting) 배양한 후, Geneticin 저항성 클론을 cloning ring으로 분리하고 다른 배양접시에서 증식시켰다.

8. 전체 RNA 준비 및 역전사중합효소연쇄반응

각각 2 × 10^6 개의 세포로부터 전체 RNA를 추출하기 위하여 Qiagen RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany)을 사용하였다. 세포주에서 분리된 전체 RNA로부터 cDNA를 합성하기 위하여 Superscript II RT-PCR kit (Invitrogen)을 사용하였고, 합성된 최종 cDNA 양은 분광광도계로 측정하였다. PCR은 5 μl 10× PCR 완충용액[100 mM Tris-HCl pH 8.8, 500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 30 mM DTT, 1 mg/ml bovine serum albumin (BSA)], 1 μl 10 mM dNTPs, 1 μl each primer (10 mM), 0.5 ml Taq DNA polymerase (5 U/μl, Roche BMB, Indianapolis, IN, USA), 500 ng cDNA template, deionized-distilled H_2O (ddH_2O)로 구성된 반응혼합물에서 35 cycle을 수행하였으며(각 cycle당 94℃에서 40 s, 55℃에서 40 s, 72℃에서 60 s), 전체 부피가 50 μl이 되게 하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel 전기영동법으로 분석하였고 반응산물을 BLAST 검색으로 확인하였다.

PCR에 사용된 각 primer의 염기서열과 amplicon의 크기는 표 1 에 제시하였다.

표 1. 실험에서 사용된 primer의 nucleotide 염기서열과 기대되는 amplicon의 크기.

Primer	Sequence	Length (bp)
GAPDH (S)	TGA TGA CAT CAA GAA GGT GGT	240
GAPDH (AS)	TCC TTG GAG GCC ATG TGG GCC AT	
Glut1 (S)	CAT TGG CTC CGG TAT CGT CA	250
Glut1 (AS)	TTC AGC CAC GAT GAA CCA TG	
Glut2 (S)	TGC TCA ACT AAT CAC CAT GC	221
Glut2 (AS)	AGT CCT GAT ATG CTT CTT CC	
HK I (S)	CCT GGG AGA TTT CAT GGA GA	240
HK I (AS)	GTG CCC ACT GTG TCA TTC AC	
HK II (S)	CCA GTA TCT CTA CCA CAT GC	157
HK II (AS)	TGT CCC ATC TGG AGT GGA CC	
HK III (S)	TTC ATC ACA GTA AGG TCT CC	199
HK III (AS)	CTG CTG TGA TAA TCA CTA GG	
G-6-Pase (S)	GGG TGT AGA CCT CCT GTG GA	187
G-6-Pase (AS)	GAG CCA CTT GCT GAG TTT CC	

9. Western blot 분석

세포를 완충용액[50 mM Tris pH 8.0, 110 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, PMSF (100 μg/ml), 10% glycerol, 1.5 mM $MgCl_2$, protease inhibitor cocktail (Roche)]으로 용해시켰으며, 단백질은 BCA 분석을 사용하여 정량하였다. 40~80 μg 단백질의 전체 세포 용해질을 동량의 loading 완충용액(125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-β-mercaptoethanol)과 섞고 가열하였다. 단백질은 7.5~10% denaturating polyacrylamide gel에서 전기영동법으로 분리시키고, BioRad Mini-Gel system을 이용하여 Hybond ECL

nitrocellulose membrane (Amersham)에 전이시켰다. 단백질 전이된 막을 1시간 동안 Tris-buffered saline (TBS)에서 5% non-fat dried milk로 차단하였다. 1:1000으로 희석된 1차 항체[HK II (Chemicon, ab3279) 와 자체 제작된 9-15 항체]를 1:2000 ~ 1:5000으로 희석하여 1시간 동안 반응시켰다. 0.05% Tween 20을 함유한 TBS (TTBS)로 2번 세척 후 1:2000으로 희석된 peroxidase conjugated 2차 항체 (Zymed, Carlsbad, CA, USA)를 1:5000 ~ 1:10,000으로 희석하여 1시간 동안 반응시켰다. 다시 10분간 TTBS로 2번 세척한 후, commercial enhanced chemiluminescence reagents (ECL, Pierce. Rockford, IL, USA)에서 반응시키고, 사진을 촬영하여 보관하였다.

10. 세포 내 ATP 함량과 lactate의 생성 측정

세포 내 ATP는 CellTiter-Glo luminescent cell viability assay (Promega, Madison, WI. USA)로 측정하였다. 요약하면 96-well microtiter plate에서 200 μl RPMI 1640 완전 배지로 well 당 2×10^4개의 세포를 평판배양하였다. 37℃, humidified 5% CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양시키고 CellTiter-Glo kit reagent 100 μl를 첨가하고 10~30분 동안 배양하였다. Luciferase-catalyzed luciferin과 ATP 반응에 의하여 생성되는 발광은 MicroLumat LB96P luminometer (EG&G Berthold, Badwildbad, Germany)를 사용하여 검출하였다.

세포 내 lactate는 lactate assay kit (Biovision, Mountain View, CA, USA)을 사용하여 측정하였다. 즉, 세포를 96-well microtiter plate에서 200 μl의 RPMI 1640 완전 배지로 well 당 2×10^4개의 세포를 평판 배양하였다. 37℃의 humidified CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양시키고 lactate assay kit reagent 50 μl를 첨가하고 10~30분 동안 배양하였다. 흡광도는 570 nm에서 microplate 판독기로 측정하였다.

11. Phospho-AMP-activated protein kinase (p-AMPK)의 활성도 측정

AMPK의 활성화 형태인 p-AMPK의 단백질 활성을 알기 위하여 western blot 분석을 시행하였다. 전기영동법으로 단백질을 분리한 후

완충용액으로 차단하고 p-AMPK 항체(Cell Signaling Technology)로 4℃에서 1시간 반응시킨 후, 이차 항체 (Zymed)로 상온에서 1시간 반응시켰다. ECL을 사용하여 단백질 발현을 확인하였다. 막을 항-actin 항체와 반응시켜 일정한 양의 단백질을 사용하였는지 확인하였다. ATP synthase를 억제하는 약물인 0.5 μM의 oligomycin을 30분간 처리한 후 ATP 변화에 의해 p-AMPK의 활성이 변화하는 양상을 관찰하였다.

12. HK II의 면역형광분석

공초점(confocal) 레이저주사현미경 분석을 위하여 세포들을 8-well Laboratory-Tek® German borosilicate coverglass (Nunc, Nagel Inc.)에 5×10^4 세포/cm^2로 분주하고, 24시간 동안 완전 배지에서 배양하였다. 그 다음 세포들을 세척하고 200 μl RPMI으로 37℃에서 30분간 사전 배양한 후 15분간 2% glutaraldehyde와 2% formaldehyde가 함유된 PBS로 고정시켰다. 10 mM EDTA를 함유한 PBS로 3번 세척하고, -20℃에서 10분간 methanol로 고정시키고 10 mM EDPA를 함유한 PBS로 3번 세척하였다. 세포들은 1시간 동안 5% BSA를 포함한 PBS로 차단시켰다. 그 후 4℃에서 밤새 1차 항체(anti-HK II Ab, 1:250 dilution)로 반응시키고, PBS로 3번 세척하고 5% BSA를 포함한 PBS로 15분간 다시 차단시켰다. 실온에서 2시간 동안 2차 항체 (Alexa 594 goat-antimouse Ab, 1:2000 dilution, Molecular probes, Eugene, OR, USA)로 배양하고 PBS로 3번 세척하였다. 이어 Mito Tracker Green FM (Molecular Probes) 염색액을 첨가하였다. 세포를 PBS로 1회 세척한 후, 37℃, 5% CO_2 암실에서 0.05%의 BSA를 포함한 0.1 M Tris/NaCl 완충용액(pH 8.0)에서 15분간 100 nM Mito Tracker Green FM으로 배양하였다. 세포들을 세척하고 얼음으로 식힌 PBS에 올려 놓고 공초점 레이저주사현미경(Carl Zeiss LSM 510 Axiovert S 100 inverted, Carl Zeiss B.V., Sliedrecht, Netherlands)을 이용해 촬영하였다.

13. F-18 FDG 섭취 측정

세포의 F-18 FDG 섭취 정도를 측정하기 위하여 5 × 10^4 의 세포를 24 well plate (Greiner, Frickenhausen, Germany)에 분주하고 37℃, humidified 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. F-18 FDG를 37℃에서 30분간 185 kBq (5 μCi)/ml의 용량으로 세포와 배양시키고 얼음에 식힌 5 ml의 PBS로 5회 세척하였다. 12-well plate를 PET 영상기(Allegro, Philips-ADAC medical system, Cleveland, OH, USA)에 놓고 3분간 방출영상을 얻고, 저용량 CT를 이용한 투과영상을 4초간 촬영하여 감쇄 교정하였다. Allegro 시스템의 reconstruction using a low action maximal likelihood algorithm (RAMLA)으로 영상을 재구성하였다. 이어서 세포를 얼음에 식힌 PBS로 5회 세척한 후 1% SDS에서 0.5 ml 0.1 M NaOH로 용해시킨 후 Cobra II 감마 계측기(Canberra-Packard, Meriden, CT, USA)로 방사능을 측정하였다. 단백질은 BSA을 기준으로 하여 BCA 단백질 분석 kit을 사용하여 정량하였다.

14. Cisplatin 처리와 세포 생존능력 측정

시험관 내 세포 생존능력에 미치는 cisplatin의 효과는 세포 성장 곡선과 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 분석을 이용하여 측정하였다. 세포 성장곡선은 세포를 trypsin화시켜 수확하고 세포 수 계산법으로 세포 수를 측정하였다. Cisplatin에 대한 세포 생존능을 분석하기 위하여 MTT 분석을 사용하였는데, well 당 1 × 10^4 의 세포를 10 μg/ml의 cisplatin이 첨가된 96-well microtiter plate의 200 μl RPMI 1640 완전 배지에 분주하고, 37℃의 humidified CO_2 incubator에서 24~72시간 배양하여 세포 생존능력을 MTT로 측정하였다. 즉, 4 μl의 MTT 시약(5 mg/ml in PBS)을 각 well에 첨가하여 2시간 동안 반응시키고 37℃에서 5분간 1800 rpm의 속도로 원심분리시켰다. MTT 용액을 well에서 제거하고 Formazan crystal을 150 μl의 DMSO에서 용해시킨 후 540 nm에서 흡광도를

측정하였다.

15. 세포질과 미토콘드리아 분획 단백질의 분리와 PI3K 억제제인 LY294002의 처리

세포를 25-cm^2 flask에 최종 농도가 1.5 × 10^6 세포/flask가 되게 평판 배양하였다. 그 후, 세포를 trypsin화 시켜 수확하고 4℃에서 10분간 600 × g으로 원심분리시켰다. 세포 침전물을 PBS로 1회 세척하고 3 volume의 분리 완충용액(20 nM HEPES pH 7.4, 250 mM sucrose, 10 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM sodium EDTA, 1 mM DTT, 10 mM PMSF, 10 μM leupeptin, 10 μM aprotinin)에서 재부유하였다. 3분간 얼음으로 식힌 후 세포를 60 stroke의 glass homogenizer로 파괴시켰다. 파괴되지 않은 세포와 핵을 제거하기 위하여 세포 용해액을 4℃에서 1,500 × g으로 2번 원심분리하였다. 미토콘드리아 농축 분획(heavy membrane fraction)을 30분간 1,200 × g으로 원심분리시킴으로써 침전시켰다. 상층액을 제거하고 0.2-μm와 0.1-μm Ultrafree MC filter (Millipore Corp., Bedford, MA, USA)로 여과하여 세포질 분획을 얻었다. 미토콘드리아 농축 분획을 분리하여 용해 용액에 부유시키고 최종 농도가 0.5 mg/ml가 되게 하였다. 24시간 후, 37°C에서 0.5 μM의 LY294002로 1시간 동안 처리하여 HK II 발현의 변화를 관찰하였다. Sample을 12% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동 한 후 nitrocellulose로 electroblotting하였다. HK II는 anti-HK II(9-15) mouse MoAb와 rabbit anti-mouse horseradish peroxidase conjugated Ab로 검출하였다. Membrane을 stripping하고 항-β-actin 항체를 loading 대조군으로 하여 reprobing 하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 다양한 사람 간암세포주에서 HK II의 발현

HK II는 많은 암세포에서 발현이 증가되어 있으며 암의 악성도를 반영하는 주요 인자로 간주되고 있다[5, 14]. 따라서 사람 간암세포주인 SNU-449, SNU-475, HepG2, Hep3B의 4 종류 세포주에서 HK II의 발현 정도를 RT-PCR과 western blot으로 측정하였다.

HepG2와 Hep3B에서 HK II mRNA의 발현이 높게 나타났고, SNU-449 세포주의 경우 가장 낮은 HK II의 발현을 보였다 (그림 1가). Western blot 분석에서도 SNU-449의 단백질 발현이 가장 낮았다(그림 1나).

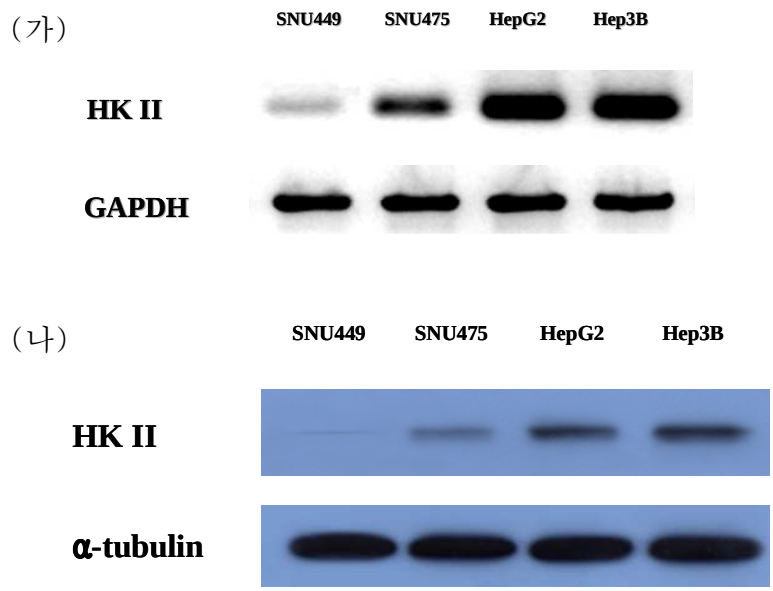


그림 1. 다양한 간암세포주에서 HK II의 발현. 사람 간암세포주에서 HK II mRNA에 특이적인 primer를 사용한 (가) RT-PCR 방법과 (나) western blot 방법으로 HK II의 발현도를 측정한 결과. HepG2와 Hep3B 세포주에서 HK II의 mRNA와 단백질 발현이 강하게 보인 반면, SNU-449 세포주는 가장 약한 HK II의 발현을 나타냄. GAPDH와 α-tubulin은 대조군.

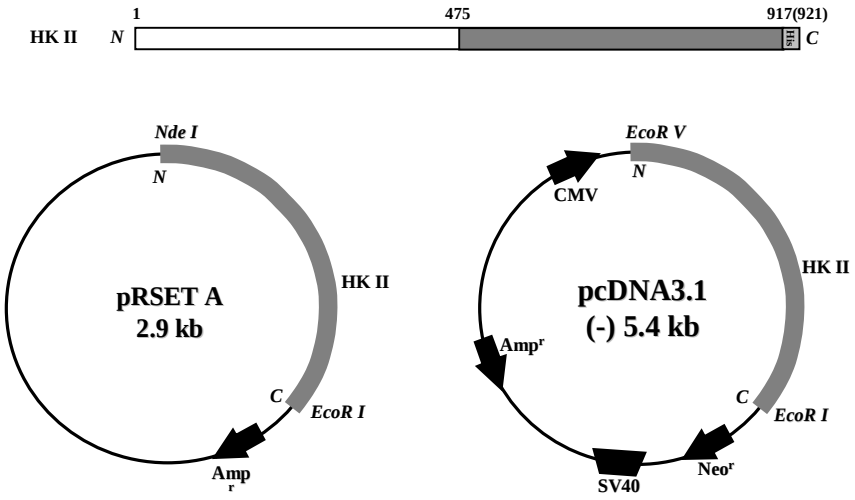
2. rhHK II와 SNU-449-HK II 세포주 내에서 과발현된 HK II의 효소 활성도

rhHK II를 분리, 정제하여 효소 활성도를 측정하였고, HK II의 발현이 낮은 SNU-449 세포주에 HK II를 이입시킨 후 그 발현도를 측정하였다.

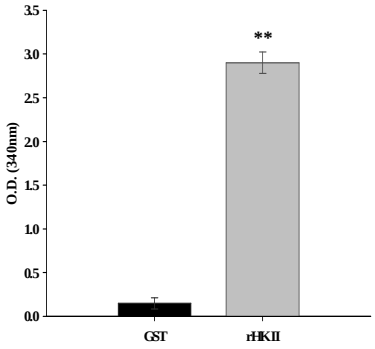
HK II 유전자 입체분자구조의 변형을 방지하고, 단백질 분리 정제를 용이하게 하기 위하여 HK II 유전자의 C 말단에 5X histidine을 표지 시켰다. pRSET A-HK II를 이용하여 HK II를 *E. coli*에 과발현 시킨 후(그림 2가) Ni-NTA resin column과 고식적 column chromatography 방법으로 정제하였고 고도로 정제된 단백질은 전기영동(SDS-PAGE)으로 확인하였다. 분리 정제된 rhHK II는 특이적 효소 활성도를 잘 나타내었다(그림 2나).

pcDNA-HK II를 HK II 발현이 적은 SNU-449 세포에 이입시킨 후, HK II 과발현 SNU-449 간암세포주 내에서 HKII의 활성도가 그대로 발현되는지를 알아보고자 세포 내 효소 활성도를 측정하였다. SNU-449-HK II는 대조군과 비교하여 높은 HK II 효소 활성도를 보였다(그림 2다).

(가)



(나)



(다)

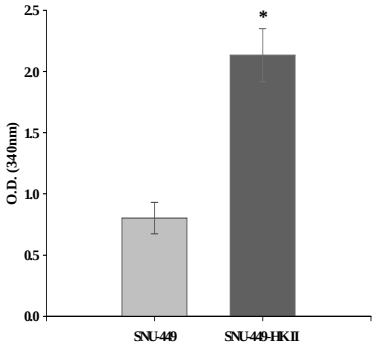


그림 2. rhHK II와 SNU-449-HK II 세포주에서 HK II 효소 활성도. (가) 사람 HK II cDNA (2754 bp, 100 kDa)의 모식도. 5X histidine motif를 HK II C-말단에 표지함. pRSET A bacterial expression vector를 이용하여 pRSET A-HK II를 제작하였고, pRSET A-HK II를 EcoR V 와 EcoR I으로 처리하여 pcDNA3.1/Myc-His에 결합시켜 pcDNA-HK II를 제작함. (나) 정제된 rhHK II의 효소 활성도와 (다) SNU-449-HK II 세포주의 HK II의 효소 활성도. SNU-449-HK II는 대조군에 비하여 높은 HK II 효소 활성도를 보임. 5회 측정 후 평균±표준오차로 표시. *대조군에 비하여 $P < 0.01$; **$P < 0.001$.

3. SNU-449-HK II 세포주와 Chang-HK II 세포주에서 HK II의 발현

HK II 과발현이 간암세포의 성장과 증식을 항진시키고 항세포사멸을 유도하는 것을 알아보기 위하여 HK II를 적게 발현하는 SNU-449 세포와 정상 간세포주인 Chang 세포에 pcDNA-HK II plasmid DNA를 세포 내로 이입시켜 안정세포주를 확립하였다.

HK II 유전자 이입 후 HK II 과발현 SNU-449-HK II 간암세포주(SNU-449-HK II)와 정상 간세포인 Chang 세포주(Chang-HK II)에서 HK II mRNA가 높게 발현되었고, 이는 HepG2에서의 HK II mRNA 발현에 필적하는 정도였다(그림 3가). Western blot으로도 단백질 발현의 증가를 확인할 수 있었다(그림 3나).

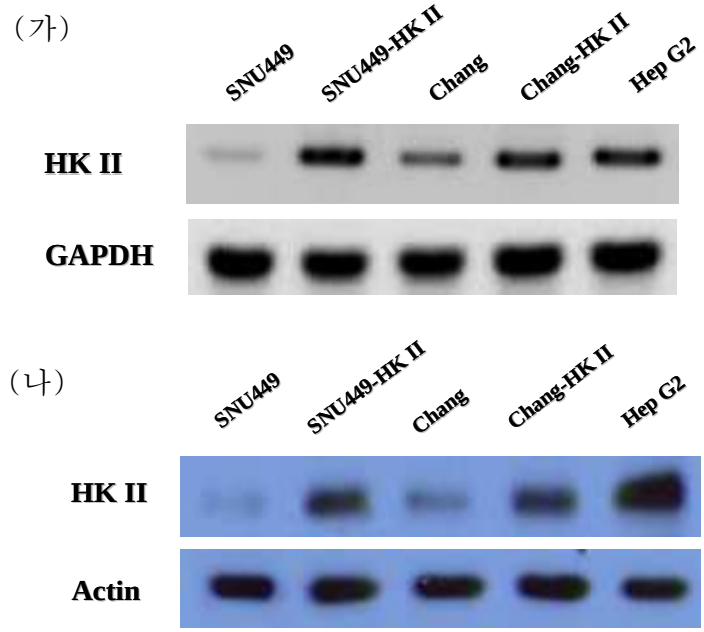


그림 3. SNU-449-HK II 세포주와 Chang-HK II 세포주에서 HK II의 발현. (가) RT-PCR을 이용한 SNU-449-HK II 세포주와 Chang 세포주에서 HK II mRNA의 발현. HepG2는 HK II에 대한 양성 대조군. GAPDH는 loading 대조군. (나) 항-HK II (9-15) 항체를 사용한 western blot 분석. HK II 유전자 이입 후 SNU-449-HK II와 Chang-HK II 세포주의 단백질 발현이 증가함. β-actin은 loading 대조군.

4. 세포 내 과발현된 HK II가 포도당 대사와 관련된 다른 유전자의 발현에 미치는 영향

SNU-449-HK II와 Chang-HK II에서 HK II 과발현이 포도당 대사와 관련된 다른 유전자들의 발현에 미치는 영향을 알아보았다. HK의 다른 isoform인 HK I, HK III, 포도당 전달체인 Glut-1, Glut-2와 포도당신합성과 해당작용에 관여하는 가수분해 효소인 G-6-Pase의 mRNA 및 단백질 발현을 조사하였다. 이들 유전자의 mRNA 발현 정도는 SNU-449 세포와 Chang 세포에 HK II 유전자를 이입하기 전과 후에 변화를 보이지 않았고(그림 4가), Western blot으로 측정한 단백질 발현에서도 의미 있는 변화를 보이지 않았다(그림 4나).

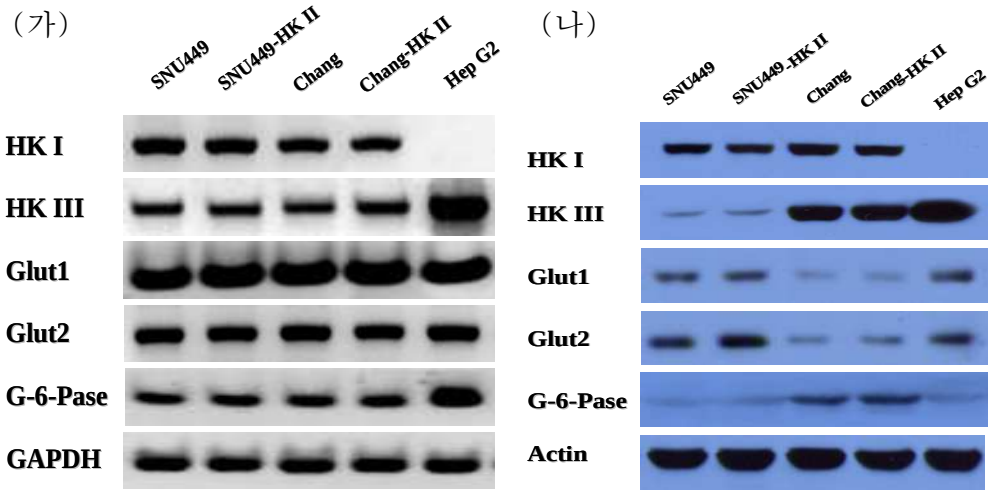


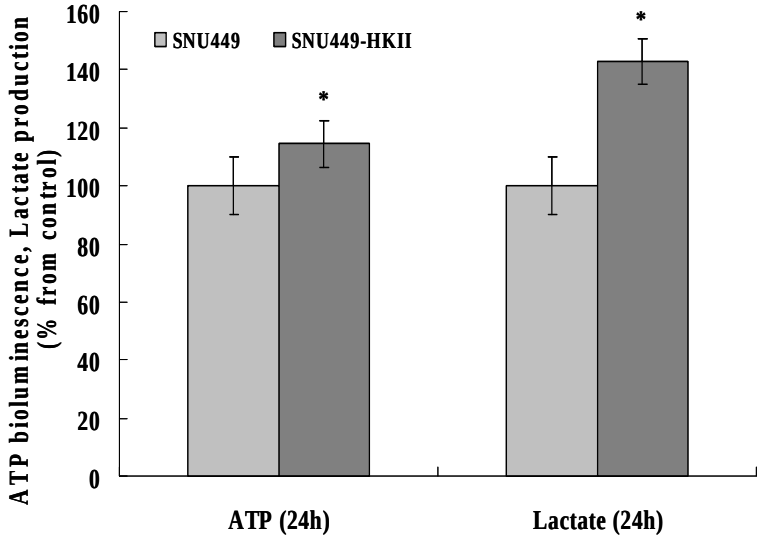
그림 4. 세포 내 과발현된 HK II가 HK isoform과 Glut isoform 및 G-6-Pase에 미치는 영향. HK I, HK III, Glut1, Glut 2, G-6-Pase의 발현에 미치는 영향을 RT-PCR (가)와 western blot (나)으로 측정. 포도당대사에 관여된 유전자 중 HK II를 제외한 다른 유전자는 그 발현 정도에 변화를 보이지 않음. GAPDH와 actin은 loading 대조군.

5. HK II 과발현이 ATP와 lactate 생성 및 AMPK 활성에 미치는 효과

HK II의 과발현과 해당작용의 연관성을 규명하기 위하여 ATP 양과 lactate 생성량을 측정하였다. SNU-449-HK II의 경우 배양 24시간 경과 후 ATP 양이 대조군에 비해 20% 증가하였고, lactate 생산량이 45% 증가하였다(그림 5가). 이는 과발현된 HK II가 해당작용을 항진시키는 것을 반영하는 결과이다.

p-AMPK는 세포의 에너지 수준을 감지하는 역할을 하는 유전자로 세포 내 에너지 항상성을 조절하며 ATP 결핍에 의해 활성화된다[38]. HK II 과발현이 p-AMPK 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 SNU-449-HK II와 대조군인 SNU-449에서 p-AMPK 활성을 측정하였다. 해당작용이 항진되어 ATP 소모량이 많은 SNU-449-HK II의 경우 대조군에 비하여 p-AMPK의 활성도가 상대적으로 낮았으며(그림 5나), ATP synthase 억제제인 0.5 μM의 oligomycin 투여 후 p-AMPK 활성도가 증가하였다.

(가)



(나)

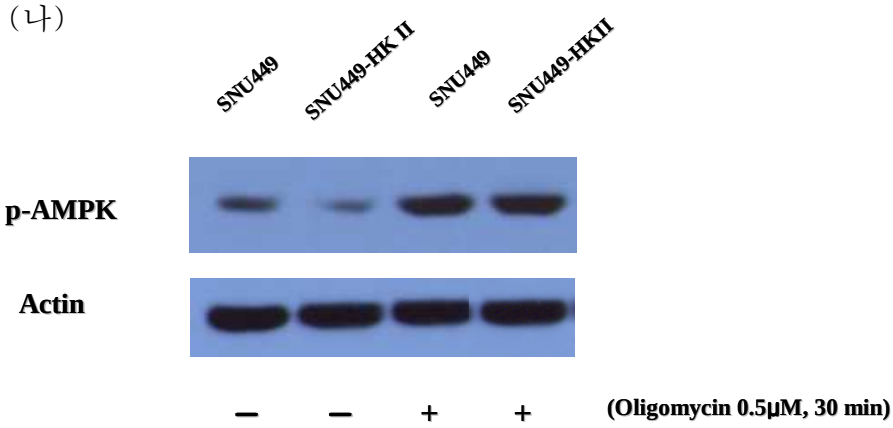


그림 5. HK II가 과발현된 SNU-449-HK II 세포주에서 ATP와 lactate 및 p-AMPK의 변화. (가) HK II가 과발현된 SNU-449-HK II 세포주에서 배양 24시간 경과 후 세포 내 ATP 양은 20% 증가, lactate 생성량은 45% 증가함 (나) 해당작용이 항진된 SNU-449-HK II 세포주에서 p-AMPK 의 활성이 감소함. 0.5 μM의 oligomycin 첨가 후 p-AMPK 의 발현이 증가함.

6. 과발현된 HK II의 세포 내 위치결정

암세포 내에서 HK II의 50~75% 정도가 미토콘드리아에 결합되어 있는데, 어떠한 외부 자극이나 신호가 암세포 세포질의 HK II를 미토콘드리아 외막으로 변이시키는 것으로 추측된다[15-17].

SNU-449-HK II에서 HK II가 과발현 되는 위치를 면역형광분석법(confocal microscopic analysis)을 이용하여 분석하였다.

SNU-449 HK II에서의 HK II의 발현은 대조군인 SNU-449 세포주에 비하여 증가되었는데, 과발현된 HK II의 위치가 미토콘드리아 부위와 많은 부분이 일치되는 것을 관찰할 수 있었다(그림 6).

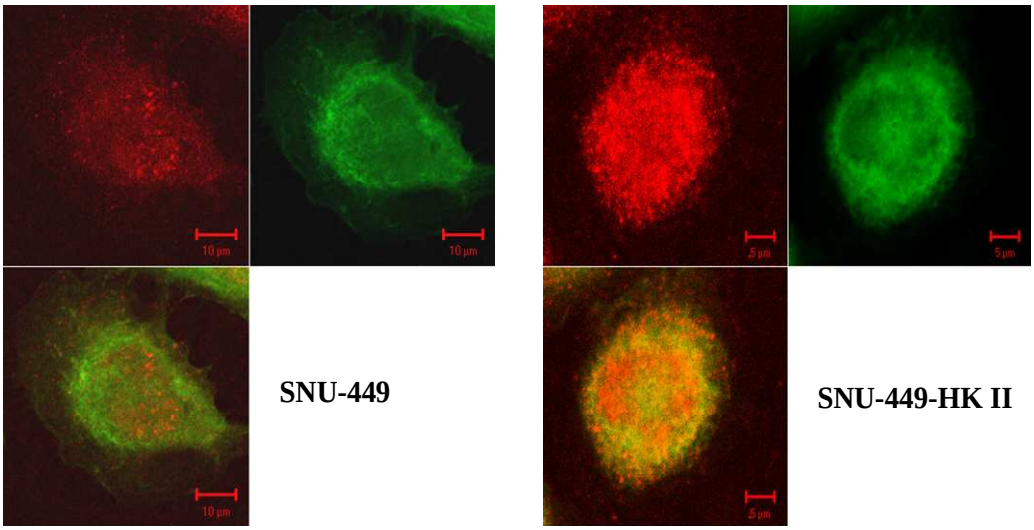


그림 6. 면역형광분석법으로 관찰한 HK II의 세포 내 분포 위치. HK II 발현은 적색으로 표시되고, MitoTracker를 사용한 미토콘드리아 염색은 녹색으로 표시었으며, 미토콘드리아와 HK II의 위치가 일치된 부위는 적황색으로 표시됨. HK II의 세포 내 분포 위치는 미토콘드리아 부위와 많은 부분이 일치됨. 사용된 항체는 항-HK II (9-15) 마우스 단클론항체이며, 눈금자는 5 or 10 μm임.

7. HK II 과발현 세포에서 VDAC 발현 변화

미토콘드리아 permeability transition(MTP) pore의 구성요소로 알려진 VDAC은 HK II가 미토콘드리아 외막에 결합하는 단백질로 알려져 있다[21].

HK II 과발현이 VDAC 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 HK II 과발현 세포주에서 VDAC의 발현 변화를 조사하였다. SNU-449-HK II와 Chang-HK II에서 VDAC 단백질 발현의 정도는 대조군과 차이를 보이지 않았다(그림 7)

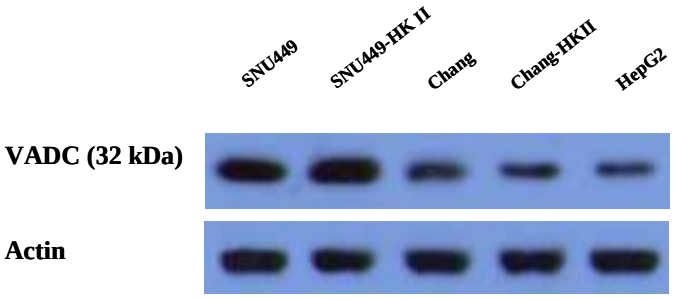


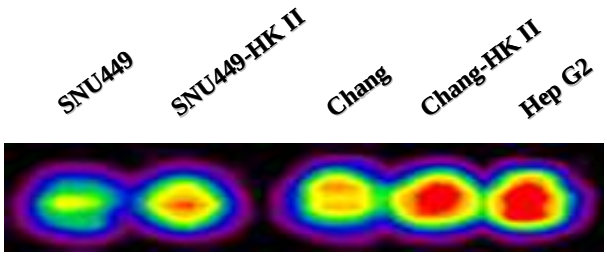
그림 7. HK II 과발현 세포주에서 VDAC 발현의 변화. SNU-449-HK II와 Chang-HK II 세포주에서 VDAC의 발현은 대조군에 비하여 변화하지 않음.

8. HK II가 과발현된 세포주에서 PET을 이용한 F-18 FDG 섭취 결과

암세포의 포도당 대사를 반영하는 영상검사인 F-18 FDG 양전자단층촬영술을 촬영하여 HK II 과발현 세포주에서 해당작용이 항진되었는지를 관찰하였다.

F-18 FDG PET 영상에서 SNU-449-HK II와 Chang-HK II의 경우 각각의 대조군에 비해 F-18 FDG 섭취가 항진되었다(그림 8가). 단위세포질량 당 F-18 FDG 섭취율을 정량적으로 측정한 결과, SNU-449-HK II의 F-18 FDG 섭취는 147,652 ± 23,148 cpm/mg로 SNU-449 세포의 섭취율인 95,779 ± 4,087 cpm/mg보다 54% 증가하였다. Chang-HK II의 섭취율은 300,055 ± 23,984 cpm/mg로 대조군의 214,070 ± 19,875 cpm/mg보다 40% 증가하였다(그림 8나).

(가)



(나)

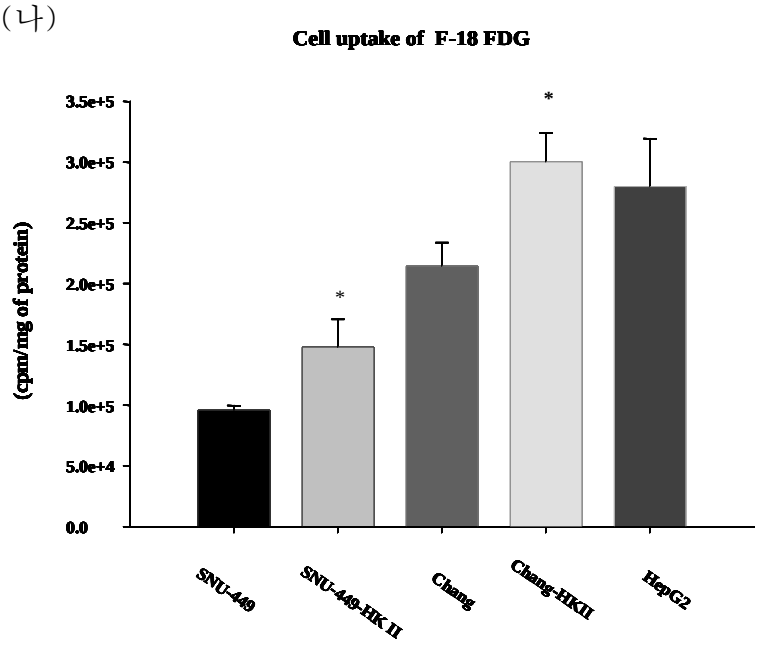


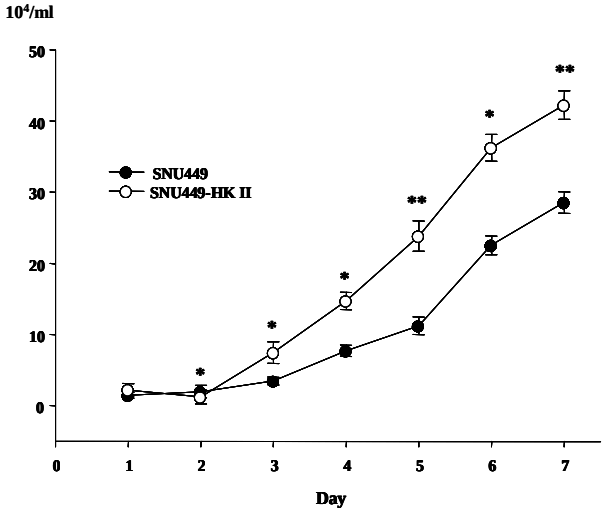
그림 8. HK II 과발현 세포주에서 F-18 FDG의 섭취. (가) 185 kBq/ml (5 μCi/ml)의 F-18 FDG로 37℃에서 30분간 배양 후 촬영한 PET 영상에서 HK II 과발현 세포주의 F-18 FDG 섭취가 증가함. (나) HK II를 과발현 시킨 후 cobra II gamma counter로 측정한 방사능 수치. 단위세포질량 당 F-18 FDG 섭취율이 대조군에 비하여 SNU-449-HK II는 54%, Chang-HK II는 40% 증가함. 3회 중복 실험 후의 결과값이며 단위는 mean ± SD of cpm/mg protein. *대조군에 비하여 *p< 0.05; **p< 0.01.

9. HK II 과발현이 세포의 증식 및 항암제에 대한 감수성에 미치는 효과

HK II의 과발현이 세포 증식에 미치는 효과를 세포수계산법으로 성장곡선을 그려 정량적으로 분석하였다. SNU-449-HK II에서 대조군인 SNU-449에 비해 3일 후 1.5~2.0배 정도 세포 증식이 항진됨을 관찰할 수 있었다(그림 9가). 이와 대조적으로 Chang-HK II에서의 발현은 대조군과 별다른 차이를 보이지 않았다.

HK II는 미토콘드리아와 특이적으로 결합하여 cytochorome c와 apoptosis inducing factor (AIF)를 포함하는 막 사이(intermembrane space) 단백질들의 출입을 조절하고 세포사멸을 억제하는 것으로 알려져 있다[37]. HK II의 항세포사멸 작용을 규명하기 위하여, SNU-449-HK II에 항암제인 10 μg의 cisplatin을 처리하여 세포사멸을 유도하고, MTT 분석을 이용하여 세포생존능을 측정하였다. Cisplatin 10 μg으로 처리한 3일 후 SNU-449-HK II 세포주의 52%가 생존하였고, SNU-449 세포는 8%가 생존하여 SNU-449-HK II의 항암제에 대한 감수성이 감소하였다(그림 9나).

(가)



(나)

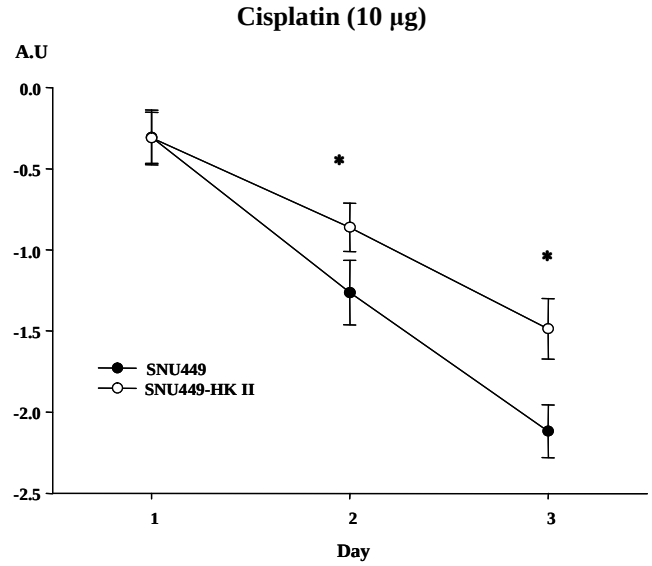


그림 9. HK II 과발현 세포주에서 세포 성장과 cisplatin에 대한 감수성 분석. (가) 세포수계산법으로 측정한 세포성장곡선에서 3일 후 SNU-449-HK II의 세포증식이 대조군 보다 1.5~2.0배 항진됨. (나) 항암제인 cisplatin (10 μg) 처리 후 MTT 분석을 이용하여 측정한 세포생존곡선. cisplatin으로 처리 3일 후 SNU-449-HK II의 52%가 생존하였고, SNU-449는 8%가 생존함. 결과는 negative slope로 표현. 모든 측정은 3회 반복 시행함. *P < 0.05, **P < 0.01.

10. 과발현된 HK II의 세포사멸 조절

HK II에 의한 항세포사멸의 분자생물학적 기전은 명확히 밝혀져 있지 않으며, 미토콘드리아 결합 HK II 활성은 PI3K/Akt 경로와 연계되어 세포사멸 분자인 Bax와 Bak가 미토콘드리아에 접근하는 것을 통제하여 cytochrome c의 방출을 억제하는 것으로 알려져 있다[27, 39]. HK II 과발현과 관계되는 세포사멸 경로를 규명하기 위하여, SNU-449-HK II에서 PI3K와 Akt의 변화를 관찰하고 PI3K의 억제제인 50 μM의 LY294002를 처리하여 그 결과를 비교하였다. SNU-449-HK II 에서 Akt의 활성화 형태인 p-Akt의 활성도가 대조군에 비하여 상당히 증가하였다. 이는 과발현된 HK II의 작용에 의하여 Akt가 활성화되는 것을 명시한다. 또한 LY294002 처리 후에 p-Akt가 거의 소실됨을 관찰할 수 있었다(그림 10).

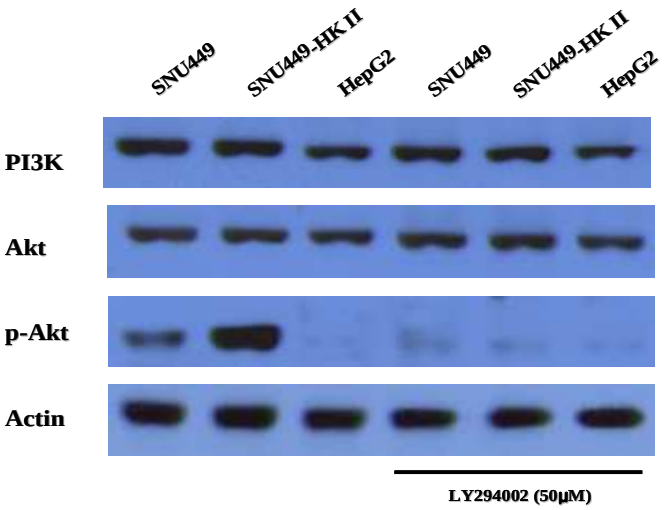


그림 10. HK II 과발현이 PI3K 활성에 미치는 영향. SNU-449와 SNU-449-HK II에서의 Akt의 활성을 western blot으로 분석함. SNU-449-HK II에서 p-Akt의 활성도가 대조군에 비하여 상당히 증가하였고, LY294002로 처리한 후 p-Akt가 거의 소실됨.

PI3K의 억제제인 LY294002 (50 μM)로 처리하기 전과 후의 HK II 변화를 관찰한 결과, 세포 내 전체 HK II 양의 변화는 관찰되지 않았다(그림 11가). SNU-449-HK II에서 과발현되는 HK II와 PI3K/Akt 경로의

연관성을 밝히기 위하여 HK II를 세포질 구획과 미토콘드리아 구획으로 나누어 그 활성도를 측정하였다. LY294002로 처리 후 미토콘드리아 구획의 HK II가 현저히 감소하고, 세포질 구획 HK II는 증가함을 확인할 수 있었다. 이것은 LY294002가 Akt의 upstream 분자인 PI3K를 억제함으로써 HK II가 미토콘드리아 외막으로 전위하는 것을 방해하거나 미토콘드리아 외막에 결합된 HK II를 미토콘드리아 외막으로부터 분리시키는 것으로 해석할 수 있다(그림 11나).

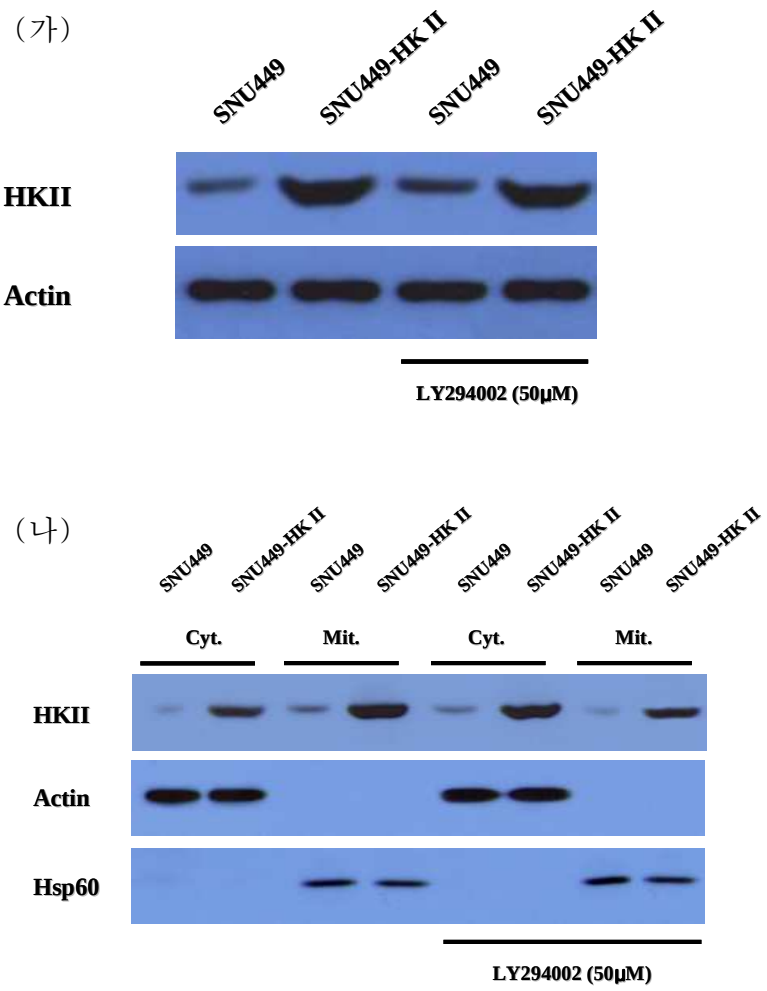


그림 11. PI3K 억제제인 LY294002 (50 μM)로 처리 후 세포 내 전체 HK II 단백질량의 변화와, 세포질과 미토콘드리아 분획의 HK II 양의 변화. (가) 세포 내 전체 HK II의 단백질량은 LY294002 처리 전과 후에 변화가 없음. (나) LY294002로 처리 후 미토콘드리아 구획의 HK II가 감소하고 세포질 구획 HK II는 증가함. HK II와 PI3K/Akt 경로의 연관성

이와 같이 HK II의 과발현은 PI3K/Akt 신호전달경로와 밀접한 연관이 있으며 이것은 간암세포의 억제되지 않은 증식과 항세포사멸, 그리고 항암제의 저항성 등을 설명하는 하나의 열쇠가 될 것이다.

IV. 고 찰

일반적으로 암세포의 포도당 대사는 포도당 운반체인 Glut와 해당과정의 효소인 HK가 중요한 요소로 알려져 있지만 암의 종류에 따라 이들이 기여하는 정도는 다르다. 양전자방출단층촬영에서 악성도를 반영하는 F-18 FDG 섭취의 주요 요인이 포도당 운반체에 의한 포도당 운반인지 HK에 의한 포도당 인산화인지에 대한 많은 연구가 진행되었다. 간의 원발성암인 간세포암과 담관암의 비교 연구에서 Glut-1의 발현이 간담도암에서 높지만 간암세포는 매우 낮으며, HK II의 발현이 담관암에서는 거의 발현되지 않고 간암세포에서 높게 발현되었다[40,41]. 즉 간세포암에서는 HK II의 증가가 F-18 FDG 섭취에 중요한 역할을 한다. 최근 미토콘드리아 결합 HK II가 간암세포의 악성도와 예후에 관계된다는 보고가 있어[42], HK II의 발현이 적은 SNU-449 세포주에 HK II를 과발현시켜 종양의 악성도와 관련된 HK II의 세포 내 역할과 항세포사멸 작용에 관련된 세포 내 신호전달분자를 연구하였다.

본 연구에서 다양한 간암세포를 선택하여 HK II 발현을 측정하였다. 선택된 4 종류의 간암세포주 중 HepG2와 Hep3B 세포주에서 HK II 발현이 높게 나타났고 SNU-475 세포주의 HK II 발현은 중등도 였으며, SNU-449 세포주에서만 HK II의 발현이 적었다. 그러므로 본 실험에서는 SNU-449 세포주를 선택하여 HK II를 과발현시켜 HK II가 포도당대사 관련 유전자 및 세포사멸에 미치는 효과를 연구하였다.

HK II 과발현이 세포 성장과 증식을 항진시키는 것을 확인하기 위하여 SNU-449 세포주와 정상세포인 Chang 세포주에 HK II expression plasmid DNA를 이입시켜 안정세포주인 SNU-449-HK II와 Chang-HK II를 확립하였다. 이들 세포주에서 HK II의 활성도는 rhHK II의 활성도와 유사하였다. SNU-449-HK II와 Chang-HK II는 대조군에 비하여 HK II의 mRNA와 단백질 발현이 강하게 나타났으며, 이는 HepG2 세포의 HK II 발현도에 근접하였다.

그렇지만 HK II 이외의 HK의 isoform들인 HK I과 HK III의 발현이나 포도당운반체인 Glut-1와 Glut-2의 발현 및 포도당신합성에 관계되는 G-6-Pase의 발현들은 대조군에 비하여 증가되지 않았다. 따라서 간암세포의 악성도에 관여되는 핵심 효소로서 HK II의 역할을 중점적으로 연구할 수 있었다.

HK II의 과발현과 호기해당과정의 연관성을 보기 위하여 세포 내 ATP 양과 lactate 생성량을 측정하였다. SNU-449-HK II의 경우 배양 24시간 경과 후 세포 내 ATP양이 대조군에 비해 20% 증가하였고, lactate 생성량이 45% 증가하였다. 이는 과발현된 HK II가 호기해당작용을 항진시키는 것을 반영하는 결과이다. HK II가 미토콘드리아 외막의 VDAC에 결합하여 미토콘드리아 내막의 ATP synthasome에서 생성되는 ATP를 adenine nucleotide translocator (ANT)를 통하여 충분히 공급받음으로써[20], 암세포의 해당과정 동안 세포 내 ATP의 함량이 증가하는 것으로 생각된다. 호기해당작용이 항진되면 그 결과로 산성화가 진행되고 lactate가 생성된다. 정상 세포에서는 미토콘드리아의 막 사이 영역에 존재하는 Na^+-driven Cl^-/HCO_3^- exchanger-1 (NHE1)과 Na^+-independent Cl^-/HCO_3^- exchanger가 작동하여 세포 내 pH (intracellular pH, pHi)가 유지되지만, 암세포에서는 NHE1의 작용이 왕성하여 pHi를 증가시켜 세포 외 공간을 산성화시킨다. pHi가 증가되면 해당작용이 촉진되고 lactate가 H^+/lactate co-transporter에 의하여 암세포 밖으로 이동되는 기전으로 ATP와 lactate의 생성 증가를 설명할 수 있다[43].

AMPK는 세포의 저에너지를 검문하는 역할을 담당하는 효소이며 세포의 손상을 방지하기 위하여 낮은 ATP 농도를 감지한다. AMPK는 ATP가 감소하고 AMP가 증가되는 상황에서 활성화 된다[38] [44]. SNU-449-HK II에서 활성화 형태인 p-AMPK의 변화를 관찰한 결과, 대조군에 비하여 p-AMPK의 발현이 낮았다. 이는 해당작용을 효과적으로 수행하기 위하여 필요한 ATP의 공급이 증가하여 AMP/ATP 비를 감소시켜 p-AMPK의 활성도가 감소하는 것으로 생각된다. AMPK는 성장인자와 Akt가

풍부하더라도 Akt의 downstream인 mTOR (mammalian target of rapamycin) 활성을 억제하여 세포사멸을 유도한다[38]. 암세포에서는 높은 ATP 농도를 감지하여 AMPK 활성이 감소하고 mTOR의 활성이 항진되며 Akt를 활성화시켜 HK II가 미토콘드리아로 전위된다. 또한 Akt는 Bad, FoxO족 인자를 불활성화시키고 NF-κB를 활성화시켜 항세포사멸을 유도하여 세포를 증식시킨다[45].

세포 내에서 HK II의 작용부위를 알기 위하여 면역형광분석법을 시행하였고, HK II가 존재하는 위치가 간암세포 내 미토콘드리아임을 알 수 있었다. 시험관 내 연구에서 HK II의 N-말단에 있는 15개의 아미노산이 미토콘드리아 외막의 VDAC와 결합하는 부위로 알려져 있다[16, 46]. mtHK II는 미토콘드리아 외막의 안정성을 유지시켜 미토콘드리아 막 사이 영역에 존재하는 세포사멸 분자의 방출을 억제하는 역할을 담당하며[37], HK II가 VDAC과 결합함으로써 G-6-P의 음성되먹임 기전의 영향을 받지 않고 해당과정을 항진시킨다[15]. VDAC의 pore의 크기는 2.5~3 nm로 양이온, 음이온, Ca^{2+}, adenine nucleotide와 다른 대사 산물의 이동통로가 된다. VDAC은 미토콘드리아 막 사이 영역에 존재하는 pro-apoptotic Bax/Bak 단백질과 경쟁하는데, 성장인자를 제거하면 미토콘드리아 외막에 통로를 형성하여 세포사멸 단백질을 방출한다[39, 46]. HK II가 VDAC에 결합하여 구조적 변화를 일으킴으로써 MPT pore를 폐쇄시켜 pro-apoptotic 인자의 방출을 막는다[47, 48]. 근래에 여러 연구보고에서 HK II VDAC 복합체가 Bax and/or Bak가 미토콘드리아에 결합하는 것을 방해하고 cytochrome c의 방출을 억제하는 항세포사멸 작용을 보고하였다[35]. HK II가 단독으로 Bax의 미토콘드리아로의 전위를 방해하고 tBID 유도 Bax 결합을 저해하여 세포사멸을 억제하기도 한다[18, 46].

일반적으로 악성 종양에서는 세포 내 전체 HK II의 50~75%가 미토콘드리아와 결합상태로 존재하고 주로 VDAC에 결합한 상태이다[15-17]. SNU-449-HK II와 Chang-HK II에서 VDAC의 발현은 대조군에 비하여

변화를 보이지 않아 또한 VDAC의 효과를 배제할 수 있었다.

종양의 악성도와 예후를 반영하는 F-18 FDG PET 영상검사를 수행하였으며 SNU-449-HK II와 Chang-HK II의 F-18 FDG 섭취가 대조군에 비하여 유의하게 높았다. 이는 F-18 FDG의 섭취 증가가 HK II 과발현에 의하여 증가한 것을 나타낸다. F-18 FDG 섭취 정도를 정량적으로 분석하였을 때 세포단위질량 당 측정한 방사능 수치가 SNU-449-HK II에서는 대조군에 비하여 54% 증가하였고, Chang-HK II는 40% 증가하였다.

HK II 과발현이 세포증식에 미치는 영향을 조사한 결과, SNU-449-HK II가 대조군에 비하여 배양 3일 후 세포증식이 1.5~2.0배 항진되었다. 또한 HK II의 항세포사멸 작용을 조사하기 위하여 cisplatin 10 μg으로 처리하였을 때 배양 3일 후 SNU-449-HK II의 52%가 생존하였고 SNU-449는 8%가 생존하여 항암제에 대한 감수성이 저하되었음을 증명하였다. 이는 HK II의 역할이 세포를 증식시키고 세포사멸을 억제하여 종양세포의 악성 진행에 중요한 분자 중의 하나임을 의미한다.

암세포는 생존하기 위하여 성장인자를 필요로 하는 데 성장인자와 관계된 항세포사멸의 중요한 기전이 PI3K/Akt 경로이다[49]. SNU-449-HK II에서 Akt의 활성형태인 p-Akt의 발현이 대조군에 비하여 상당히 증가하였다. 그리고 PI3K 억제제인 LY294002로 처리한 후 p-Akt의 양이 현저히 감소하였다. LY294002로 처리하기 전, 후의 세포 내 전체 HK II의 양은 변화가 없었지만, PI3K 억제제 투여 후 미토콘드리아 구획의 HK II가 현저히 감소하고 세포질 구획 HK II는 증가하였다. 이는 PI3K/Akt 신호에 의하여 과발현된 HK II가 미토콘드리아로 전위되어 VDAC과 결합하게 되며[50], PI3K 억제제가 p-Akt를 감소시켜 HK II가 미토콘드리아에서 분리되어 세포질 내로 이동하는 것을 명시한다. 여러 연구에서 Akt를 매개로 한 세포 생존유전자가 HK II와 VDAC 결합을 항진시킨다고 보고하였다[18, 22, 38, 51]. Akt는 항세포사멸 기능을 가진 Bcl-X_L이 VDAC로 이동하는 것에 관여하고, 세포사멸 작용제인 truncated BH3-related domain

(tBID)과, Bcl-2 대항제(BAD)에 길항작용을 하여 항세포사멸을 유도한다는 보고도 있다[52].

최근 PI3K에 대한 여러 연구에서 PI3K는 세포이동, 혈관신생, 세포성장과 증식, 세포사멸, 포도당대사와 같은 여러 세포작용에 관여한다고 보고하였다. PI3K의 downstream 유전자인 Akt는 전사와 유전암호해독(translation)을 조절한다. Akt는 평상시에는 세포질에 존재하지만 PI3K가 활성화되어 수용체 매개 phosphoinositide PtdIns(3,4,5)P_3[$(PIP)_3$]가 형성되면 세포막으로 전위되어 인산화되고 활성화된다[53]. Akt는 phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1)에 의하여 활성화되고 Akt는 serine과 threonine기를 가진 여러 단백질들을 인산화시킨다. 미토콘드리아 호흡이 중단되면 NADH가 증가하고 산화환원(redox) 작용을 변성시켜 Akt를 활성화 시킴으로써 암 억제유전자인 PTEN을 불활성화시킨다[54]. mTOR는 PI3K/Akt 경로의 downstream 유전자로 영양소와 성장인자를 조절하여 세포의 증식과 생존능을 유지시킨다. mTOR는 세포 에너지 감지 효소인 AMPK와 tuberous sclerosis 1 & 2 (TSC1-TSC2) 복합체, ras homolog enriched in brain (RHEB)와 같은 여러 인자에 의하여 조절된다[55, 56]. mTOR는 세포 에너지 감지장치인 AMPK에 의해 억제된다[39]. HK II에 의하여 해당작용이 항진되고 ATP 생성이 많아지면 p-AMPK의 활성이 감소하고 mTOR의 활성이 항진되어 Akt를 활성화시켜 암 진행을 증가시킨다. mTOR는 HIF-1α의 upstream 활성제로서도 작용한다. 또한 Akt가 TSC-2를 인산화시켜 mTOR의 활성을 자극한다는 보고도 있다[57, 58]. 본 연구에서 Akt를 활성화 시킬 다른 요인을 유도하지 않았음에도 Akt가 활성화되어 HK II를 미토콘드리아로 전위시켰다. 이는 HK II가 VDAC에 결합하여 호기해당작용을 항진시키고 세포 내 ATP와 lactate 생성량을 증가시켜 AMPK를 감소시키며, mTOR와 Akt를 활성화시켜 HK II를 다시 미토콘드리아로 전위시키는 악순환이 일어나 세포의 증식이 촉발되고 항세포사멸 작용을 나타내는 것으로

설명할 수 있다.

Akt가 HK II의 기능에 미치는 영향이나 mtHK II가 MPT pore를 제어하는 기전은 아직 정확히 밝혀지지 않았다. Akt 활성과 HK II와의 관계에 대한 심근세포의 연구에서, HK II가 Akt 인산화 일치 염기서열(Thr^{473})을 가지고 있어서 활성화된 Akt가 HK II를 인산화시킨다는 보고가 있다[59]. 또한 Akt가 mtHK II 활성을 항진시켜 mtHK II를 Bax나 Bak 같은 Bcl-2 단백질로부터 방어하는 역할을 하는 것으로도 알려져 있다[27, 39, 46]. 최근 HK II를 G-6-P나 mtHK II 작용 저해 peptide로 처리하여 HK II를 미토콘드리아로부터 분리시킨 결과 Ca^{2+} 유발 cytochrome c 방출을 유발시킨다는 연구가 있어, HK II가 Akt를 매개로 한 미토콘드리아 보호작용의 핵심 표적 분자로 간주되고 있다[59].

HK II가 미토콘드리아에 결합하는데 관여하는 Akt 기전으로 glycogen synthase kinase 3β (GSK3β)와 VDAC의 인산화 가설도 있다[60]. 미토콘드리아 기능장애와 세포손상으로 인하여 GSK3β가 활성화된다고 하며, 심근과 종양세포에서 GSK3β 억제로 인한 항세포사멸 작용은 HK II가 미토콘드리아에 결합함으로써 이루어진다[60, 61]. 또한 GSK3β가 VDAC의 threonine[51] 부위를 직접 인산화시켜 HK II를 VDAC에서 해리시키고 암세포를 감작시키는 것이 항암제인 paclitaxel과 doxorubicin에서 관찰되었다[60]. 이와 같이 GSK-3β에 의하여 세포사멸이 유도되며, GSK-3β에 길항하는 Akt에 의하여 세포사멸이 억제된다.

정상 세포의 에너지 공급은 미토콘드리아에서의 산화성 인산화 과정이 담당하지만 암세포에서는 호기해당작용으로 변환된다. 이러한 대사의 변환은 특정한 전사 프로그램으로 인해 유발되는 것으로 생각되며, HIF-1, c-Myc, mutated p53가 중요한 전사인자로 보고되었다[61]. 이러한 전사요소들이 상호작용하여 해당작용에 관여하는 여러 효소의 발현을 자극하여 산소가 풍부한 상황에서도 미토콘드리아에서 ATP를 생산하지 않고 해당작용을 거치게 된다[62]. 포도당이 세포 내로 유입되는 것은 Glut-1을 포함한 포도당

전달체에 의해 조절되고 HIF-1에 의하여도 조절된다. HK II의 upstream 조절 요소로는 carbohydrate response element (ChoRE)와 protein kinase A, protein kinase C, HIF-1, mutated p53 등이 있다[63, 64]. HIF-1이 HK II의 작용에 주요 전사인자로 작용하고, 포도당에서부터 lactate에 걸친 해당작용을 담당하는 효소의 전사를 관장한다[65]. Pyruvate도 HIF-1의 분해를 억제하여 HIF-1의 농도를 높인다[66]. HK II는 mutated p53, ras, c-Myc 등의 여러 종양유전자에 의하여 활성화된다고 알려져 있으며 간세포암에서도 이러한 유전자 및 단백질에 의해 HK II가 항진되고, 과발현된 HK II에 의하여 세포증식과 항세포사멸 작용을 일으키는 것으로 판단할 수 있다.

이와 같이 악성도가 높은 간암세포에서 HK II의 과발현은 여러 종양유전자들이 관여하여 유도되는 것을 알 수 있었다. 이러한 종양유전자들과 단백질들이 증가하여 HK II의 전사를 증가시키고 기타 여러 효소들이 작용하여 세포증식을 일으키는 것으로 추정되며 아직 밝혀지지 않은 부분은 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다

HK II의 과발현이 악성종양의 항세포사멸 작용과 암 진행에 핵심적인 역할을 하므로, HK II의 작용을 겨냥한 약제의 연구가 진행되어 왔다. HK II의 합성을 직접 억제하는 siRNA(small interfering RNA)를 사용한 유전자억제 기술이 보고되었으며[67], HK 활성을 억제하는 소분자 약제인 lonidamine[68]과, HK-VDAC 결합을 방해하는 azole 유도체인 clotrimazole [1-(alpha-2-chlorotrityl) imidazole], bifonazole [1-(alpha-biphenyl-4-ylbenzyl) imidazole][69]이 개발되었다. 그리하여 직접 HK II의 작용을 억제하거나 mtHK의 세포보호 작용을 간섭하여 세포사멸을 유도하는 약제가 개발됨으로써 F-18 FDG PET 촬영에서 강한 섭취를 보이는 악성도가 높은 암을 선택적으로 치료할 수 있는 길이 열릴 것으로 전망된다.

결론적으로 HK II 저발현 간암세포주에 HK II를 과발현 시킨 후 악성도가 증가하고, PI3K/Akt 경로가 활성화되고, 세포사멸이 억제되었다. 이러한 결과는 종양의 악성도 결정에 HK II 과발현이 중요한 요소이며, 더

나아가 HK II가 간암의 악성도와 예후를 예견하는 지표 중의 하나가 될 수 있음을 제시하는 바이다.

Ⅴ. 결 론

HK II의 과발현과 간세포암의 악성도와의 관계를 규명할 목적으로, HK II의 발현이 적은 SNU-449 간암세포주와 정상간세포인 Chang 세포주에 HK II를 이입시킨 후 세포 내 호기해당작용 및 세포사멸에 관련된 분자들의 기능에 관련된 특성을 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 사람재조합HK II (rhHK II)를 만들어 효소 활성도를 측정하고, HK II의 발현이 적은 SNU-449 세포주와 정상 간세포인 Chang 세포주에 HK II 유전자를 이입하여 과발현 시켰다. HK II이 과발현된 SNU-449-HK II 간암세포주(SNU-449-HKII)와 Chang-HK II 세포주(Chang-HKII)에서 HK II 효소 활성도를 측정한 결과 본질적으로 HK II가 과발현된 간암세포주와 같은 정도의 높은 HK II의 발현도를 나타내었다.

2. HK II 과발현은 해당작용과 포도당신합성에 관여하는 다른 유전자인 HK I, HK III, Glut-1, Glut-2, G-6-Pase의 발현에 영향을 주지 않았다. HK II와 결합하는 미토콘드리아 외막의 VDAC 단백질의 양도 영향을 받지 않았다.

3. ATP 결핍 시 세포를 보호하는 작용을 지닌 p-AMPK를 측정하였을 때 SNU 449- HK II에서 상대적으로 낮은 활성을 보였다. 또한 24시간 경과 후에 세포 내 ATP 양이 20% 증가하였고, lactate 생성량이 45% 증가하여 과발현된 HK II가 호기해당작용을 증가시키는 양상을 확인하였다.

4. SNU-449-HK II에서 공초점 레이저 주사현미경을 이용하여 HK II의 세포 내 발현 위치를 확인한 결과, 과발현 HK II의 세포 내 발현부위는 주로 미토콘드리아임을 알 수 있었다.

5. F-18 FDG PET 촬영 영상에서 HK II가 과발현된 세포의 18-FDG 섭취가 증가됨을 보였다. 세포단위질량 당 F-18 FDG 섭취(cpm/mg)가 유의하게 증가되었으며, 대조군에 비하여 SNU-449-HK II인 경우는 54%, Chang-HK II의 경우는 40% 섭취율이 증가하였다.

6. SNU-449-HK II는 대조군에 비하여 배양 3일 후 세포 증식이 1.5~2.0배 항진되었다($p<0.005$). SNU-449-HK II에 항암제인 10 μg의 cisplatin을 처리한 결과, 항암제에 대한 감수성이 감소하였다($p<0.005$).

7. SNU-449-HK II에서 p-Akt의 활성도가 대조군에 비하여 현저히 증가하였고, PI3K 억제제인 50 μM의 NY294002를 처리했을 때 p-Akt가 거의 소실되었다. PI3K 억제제 투여 후 세포 내 전체 HK II의 양은 변화하지 않았지만 미토콘드리아 구획의 HK II가 감소하고 세포질 구획의 HK II는 증가하였다.

이상과 같이 간암세포주에서 과발현된 HK II 유전자와 세포 내 호기해당작용 및 세포사멸과 관련된 신호전달체계를 분석한 결과, HK II는 호기해당작용에 결정적인 반응조절 효소로서 미토콘드리아에 결합하여 PI3K/Akt 신호전달체계와 연계되어 간암세포의 성장과 증식, 항암제에 대한 감수성 저하 등 항세포사멸 작용에 중요한 역할을 담당하는 것을 확인할 수 있었다.

참고 문헌

1. Gallagher BM, Fowler JS, Gutterson NI, MacGregor RR, Wan CN, Wolf AP. Metabolic trapping as a principle of oradiopharmaceutical design: some factors responsible for the biodistribution of [18F] 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. J Nucl Med 1978;19:1154-61.
2. Warburg O WF, Negleis E. On the metabolism of tumors in the body. London Constable Co Ltd; 1930. p. 254-70.
3. Pedersen PL. Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. J Bioenerg Biomembr 2007;39:211-22.
4. Wong R, Corley DA. Racial and ethnic variations in hepatocellular carcinoma incidence within the United States. Am J Med 2008;121:525-31.
5. Smith TA. Mammalian hexokinases and their abnormal expression in cancer. Br J Biomed Sci 2000;57:170-8.
6. Khan MA, Combs CS, Brunt EM, Lowe VJ, Wolverson MK, Solomon H, et al. Positron emission tomography scanning in the evaluation of hepatocellular carcinoma. J Hepatol 2000;32:792-7.
7. Shiomi S, Nishiguchi S, Ishizu H, Iwata Y, Sasaki N, Tamori A, et al. Usefulness of positron emission tomography with fluorine-18-fluorodeoxyglucose for predicting outcome in patients with hepatocellular carcinoma. Am J Gastroenterol 2001;96:1877-80.
8. Seo S, Hatano E, Higashi T, Hara T, Tada M, Tamaki N, et al. Fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography predicts tumor differentiation, P-glycoprotein expression, and outcome after resection in hepatocellular carcinoma. Clin Cancer Res 2007;13:427-33.
9. Peng SY, Lai PL, Pan HW, Hsiao LP, Hsu HC. Aberrant expression of the glycolytic enzymes aldolase B and type II hexokinase in hepatocellular carcinoma are predictive markers for advanced stage, early recurrence and poor prognosis. Oncol Rep 2008;19:1045-53.

10. Paudyal B, Paudyal P, Oriuchi N, Tsushima Y, Nakajima T, Endo K. Clinical implication of glucose transport and metabolism evaluated by 18F-FDG PET in hepatocellular carcinoma. Int J Oncol 2008;33:1047-54.
11. Smith TA. The rate-limiting step for tumor [18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) incorporation. Nucl Med Biol 2001;28:1-4.
12. Aloj L, Caraco C, Jagoda E, Eckelman WC, Neumann RD. Glut-1 and hexokinase expression: relationship with 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose uptake in A431 and T47D cells in culture. Cancer Res 1999;59:4709-14.
13. Ko YH, Pedersen PL, Geschwind JF. Glucose catabolism in the rabbit VX2 tumor model for liver cancer: characterization and targeting hexokinase. Cancer Lett 2001;173:83-91.
14. Pedersen PL, Mathupala S, Rempel A, Geschwind JF, Ko YH. Mitochondrial bound type II hexokinase: a key player in the growth and survival of many cancers and an ideal prospect for therapeutic intervention. Biochim Biophys Acta 2002;1555:14-20.
15. Bustamante E, Pedersen PL. High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: role of mitochondrial hexokinase. Proc Natl Acad Sci U S A 1977;74:3735-9.
16. Gelb BD, Adams V, Jones SN, Griffin LD, MacGregor GR, McCabe ER. Targeting of hexokinase 1 to liver and hepatoma mitochondria. Proc Natl Acad Sci U S A 1992;89:202-6.
17. Nelson BD, Kabir F, Muchiri P. Altered metabolic states do not change the intracellular distribution of hexokinase in Zajdela hepatoma ascites cells. Biochem J 1984;219:159-64.
18. Pastorino JG, Hoek JB. Hexokinase II: the integration of energy metabolism and control of apoptosis. Curr Med Chem 2003;10:1535-51.
19. Rempel A, Mathupala SP, Griffin CA, Hawkins AL, Pedersen PL. Glucose catabolism in cancer cells: amplification of the gene encoding type II hexokinase. Cancer Res 1996;56:2468-71.
20. Arora KK, Pedersen PL. Functional significance of mitochondrial bound hexokinase in tumor cell metabolism. Evidence for preferential phosphorylation

of glucose by intramitochondrially generated ATP. J Biol Chem 1988;263:17422-8.
21. Nakashima RA, Mangan PS, Colombini M, Pedersen PL. Hexokinase receptor complex in hepatoma mitochondria: evidence from N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-labeling studies for the involvement of the pore-forming protein VDAC. Biochemistry 1986;25:1015-21.
22. Vyssokikh M, Brdiczka D. VDAC and peripheral channeling complexes in health and disease. Mol Cell Biochem 2004;256-257:117-26.
23. Shinohara Y, Ishida T, Hino M, Yamazaki N, Baba Y, Terada H. Characterization of porin isoforms expressed in tumor cells. Eur J Biochem 2000;267:6067-73.
24. Golshani-Hebroni SG, Bessman SP. Hexokinase binding to mitochondria: a basis for proliferative energy metabolism. J Bioenerg Biomembr 1997;29:331-8.
25. Juhaszova M, Wang S, Zorov DB, Nuss HB, Gleichmann M, Mattson MP, et al. The identity and regulation of the mitochondrial permeability transition pore: where the known meets the unknown. Ann N Y Acad Sci 2008;1123:197-212.
26. Robey RB, Hay N. Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. Oncogene 2006;25:4683-96.
27. Majewski N, Nogueira V, Robey RB, Hay N. Akt inhibits apoptosis downstream of BID cleavage via a glucose-dependent mechanism involving mitochondrial hexokinases. Mol Cell Biol 2004;24:730-40.
28. Gottlob K, Majewski N, Kennedy S, Kandel E, Robey RB, Hay N. Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. Genes Dev 2001;15:1406-18.
29. Bryson JM, Coy PE, Gottlob K, Hay N, Robey RB. Increased hexokinase activity, of either ectopic or endogenous origin, protects renal epithelial cells against acute oxidant-induced cell death. J Biol Chem 2002;277:11392-400.
30. Ardehali H, Yano Y, Printz RL, Koch S, Whitesell RR, May JM, et al. Functional organization of mammalian hexokinase II. Retention of catalytic and regulatory functions in both the NH2- and COOH-terminal halves. J Biol Chem 1996;271:1849-52.
31. Mathupala SP, Heese C, Pedersen PL. Glucose catabolism in cancer cells. The type II hexokinase promoter contains functionally active response elements for

the tumor suppressor p53. J Biol Chem 1997;272:22776-80.

32. Lee MG, Pedersen PL. Glucose metabolism in cancer: importance of transcription factor-DNA interactions within a short segment of the proximal region of the type II hexokinase promoter. J Biol Chem 2003;278:41047-58.
33. Mathupala SP, Rempel A, Pedersen PL. Glucose catabolism in cancer cells: identification and characterization of a marked activation response of the type II hexokinase gene to hypoxic conditions. J Biol Chem 2001;276:43407-12.
34. Waki A, Fujibayashi Y, Yonekura Y, Sadato N, Ishii Y, Yokoyama A. Reassessment of FDG uptake in tumor cells: high FDG uptake as a reflection of oxygen-independent glycolysis dominant energy production. Nucl Med Biol 1997;24:665-70.
35. Chen YT, Stockert E, Chen Y, Garin-Chesa P, Rettig WJ, van der Bruggen P, et al. Identification of the MAGE-1 gene product by monoclonal and polyclonal antibodies. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:1004-8.
36. Vinuela E, Salas M, Sols A. Glucokinase and hexokinase in liver in relation to glycogen synthesis. J Biol Chem 1963;238:1175-7.
37. Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. Oncogene 2006;25:4777-86.
38. Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. Cell Metab 2005;1:15-25.
39. Majewski N, Nogueira V, Bhaskar P, Coy PE, Skeen JE, Gottlob K, et al. Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak. Mol Cell 2004;16:819-30.
40. Lee JD, Yang WI, Park YN, Kim KS, Choi JS, Yun M, et al. Different glucose uptake and glycolytic mechanisms between hepatocellular carcinoma and intrahepatic mass-forming cholangiocarcinoma with increased (18)F-FDG uptake. J Nucl Med 2005;46:1753-9.
41. Paudyal B, Oriuchi N, Paudyal P, Tsushima Y, Higuchi T, Miyakubo M, et al. Clinicopathological presentation of varying 18F-FDG uptake and expression of

glucose transporter 1 and hexokinase II in cases of hepatocellular carcinoma and cholangiocellular carcinoma. Ann Nucl Med 2008;22:83-6.

42. Paudyal B, Paudyal P, Oriuchi N, Tsushima Y, Nakajima T, Endo K. Clinical implication of glucose transport and metabolism evaluated by 18F-FDG PET in hepatocellular carcinoma. Int J Oncol. 2008/10/25 ed; 2008. p. 1047-54.
43. Cardone RA, Casavola V, Reshkin SJ. The role of disturbed pH dynamics and the Na+/H+ exchanger in metastasis. Nat Rev Cancer 2005;5:786-95.
44. Hahn-Windgassen A, Nogueira V, Chen CC, Skeen JE, Sonenberg N, Hay N. Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. J Biol Chem 2005;280:32081-9.
45. Thompson JE, Thompson CB. Putting the rap on Akt. J Clin Oncol 2004;22:4217-26.
46. Pastorino JG, Shulga N, Hoek JB. Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. J Biol Chem 2002;277:7610-8.
47. Bernardi P, Krauskopf A, Basso E, Petronilli V, Blachly-Dyson E, Di Lisa F, et al. The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. FEBS J 2006;273:2077-99.
48. Rasola A, Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. Apoptosis 2007;12:815-33.
49. Watton SJ, Downward J. Akt/PKB localization and 3' phosphoinositide generation at sites of epithelial cell-matrix and cell-cell interaction. Curr Biol 1999;9:433-6.
50. Zhou H, Hou Q, Chai Y, Hsu YT. Distinct domains of Bcl-XL are involved in Bax and Bad antagonism and in apoptosis inhibition. Exp Cell Res 2005;309:316-28.
51. Rathmell JC, Fox CJ, Plas DR, Hammerman PS, Cinalli RM, Thompson CB. Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival. Mol Cell Biol 2003;23:7315-28.
52. Kim JW, Dang CV. Multifaceted roles of glycolytic enzymes. Trends Biochem Sci 2005;30:142-50.
53. Kunkel MT, Ni Q, Tsien RY, Zhang J, Newton AC. Spatio-temporal dynamics of protein kinase B/Akt signaling revealed by a genetically encoded fluorescent reporter. J Biol Chem 2005;280:5581-7.

54. Pelicano H, Xu RH, Du M, Feng L, Sasaki R, Carew JS, et al. Mitochondrial respiration defects in cancer cells cause activation of Akt survival pathway through a redox-mediated mechanism. J Cell Biol 2006;175:913-23.
55. Albanell J, Dalmases A, Rovira A, Rojo F. mTOR signaling in human cancer. Clin Transl Oncol 2007;9:484-93.
56. Chiang GG, Abraham RT. Targeting the mTOR signaling network in cancer. Trends Mol Med 2007;13:433-42.
57. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. Cell 2006;124:471-84.
58. Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signaling controls tumour cell growth. Nature 2006;441:424-30.
59. Miyamoto S, Murphy AN, Brown JH. Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II. Cell Death Differ 2008;15:521-9.
60. Pastorino JG, Hoek JB, Shulga N. Activation of glycogen synthase kinase 3beta disrupts the binding of hexokinase II to mitochondria by phosphorylating voltage-dependent anion channel and potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity. Cancer Res 2005;65:10545-54.
61. Nishihara M, Miura T, Miki T, Tanno M, Yano T, Naitoh K, et al. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK-3beta-mediated myocardial protection. J Mol Cell Cardiol 2007;43:564-70.
62. Yeung SJ, Pan J, Lee MH. Roles of p53, Myc and HIF-1 in Regulating Glycolysis - the Seventh Hallmark of Cancer. Cell Mol Life Sci 2008.
63. Dang CV, Semenza GL. Oncogenic alterations of metabolism. Trends Biochem Sci 1999;24:68-72.
64. Dang CV, Lewis BC, Dolde C, Dang G, Shim H. Oncogenes in tumor metabolism, tumorigenesis, and apoptosis. J Bioenerg Biomembr 1997;29:345-54.
65. Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. J Biol Chem 1994;269:23757-63.
66. Lu H, Forbes RA, Verma A. Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic

glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. J Biol Chem 2002;277:23111-5.

67. Sui D, Wilson JE. Selective depletion of the Type I, Type II, and Type III isozymes of hexokinase in mammalian cells using small interfering RNAs. Biochem Biophys Res Commun 2004;319:768-73.
68. Fanciulli M, Valentini A, Bruno T, Citro G, Zupi G, Floridi A. Effect of the antitumor drug lonidamine on glucose metabolism of adriamycin-sensitive and -resistant human breast cancer cells. Oncol Res 1996;8:111-20.
69. Penso J, Beitner R. Clotrimazole and bifonazole detach hexokinase from mitochondria of melanoma cells. Eur J Pharmacol 1998;342:113-7.

Abstract

The role of overexpressed hexokinase II in elevated aerobic glycolysis and its effect on the PI3K/Akt pathway related to anti-apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell lines

Hee Sung Hwang

Department. of Medicine
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Jong Doo Lee)

Hexokinase II (HK II) plays a critical role and rate limiting enzyme in aerobic glycolysis. Most malignant cells obtain their ATP by metabolizing glucose directly to lactic acid, even in the presence of oxygen. Many malignant cells display increased F-18 FDG uptake reflecting enhanced glycolytic activity. Hepatocellular carcinoma (HCC) cells have been shown to exhibit very high concentrations of HK II more than 100-fold normal. F-18 FDG uptake is increased in high grade and poorly differentiated hepatocellular carcinoma, and known to be a prognostic marker. HK II binds to the mitochondrial outer membrane as a form of HK II-voltage dependent anion channel (VDAC)-adenine nucleotide translocator (ANT) complex, and mitochondrial oxidative phosphorylation is closely coupled to the glycolytic pathway via direct channeling. Energy production in the form of ATP and glycolytic metabolites supports cancer cell growth. Recently, HK II-VDAC-ANT complex has been reported to regulate mitochondrial permeability transition and pro-apoptotic protein release. Mitochondrially bound HK II

plays a role in anti-apoptotic effect, and growth factors and Akt require glucose to prevent apoptosis and promote cell survival. However the molecular mechanism is not clarified as to Akt regulated pathway and mitochondrial HK II association.

In order to evaluate the role of mitochondrially bound HK II and the molecular pathway related to anti-apoptosis in HCC, two HK II overexpressing stable cell lines were established by transfection of full length DNA of HK II to a HCC cell line that expresses low level of HK II (SNU-449 cells) and a normal hepatic cell line (Chang cells). The roles of overexpressed HK II in elevated aerobic glycolysis, cellular proliferation, anti-apoptotic effect were examined. The effect of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor was also examined to evaluate PI3K/Akt pathway related to anti-apoptosis induced by overexpressed HK II.

The HK II genes were stably transfected to SNU-449 cells and Chang cells with expression vector. The HK II expression and its functions in these cells were determined by RT-PCR, western blot analysis, ATP and lactate production, F-18 FDG uptake measurement and confocal microscopy. The cellular proliferation activity and response to an anticancer drug, cisplatin, were evaluated by cell counting using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. For the evaluation of molecular pathway involved in cell proliferation, PI3K/Akt pathway was investigated.

The stable cell lines of SNU-449 HK II and Chang-HK II expressed HK II effectively, but other enzymes or transporters for glycolysis, glucose transport and gluconeogenesis such as HK I, HK III, glucose transporter-1, -2, and glucose-6-phosphatase did not show any change. The cellular energy sensor, phospho-AMP-activated protein kinase (p-AMPK) expression was decreased in SNU-449-HK II. The production of ATP and lactate was also increased by 20% and 45%, respectively, following incubation for 24 hours, reflecting

elevated glycolytic activity. The site of overexpressed HK II was associated with mitochondria on confocal microscopy. The F-18 FDG uptake value was increased to 54% in SNU-449-HK II cells, compared with control cells. Cell growth and proliferation analysis showed that cell growth rate was markedly increased compared to control, by 1.5~2.0 folds ($p<0.005$). After treatment of an anticancer drug, cisplatin, HK II overexpressed cells showed decreased susceptibility compared to control group ($p<0.005$). In molecular study to confirm HK II regulation mechanism, the activated form of Akt (p-Akt) was increased after transfection, but the p-Akt activity was much decreased following PI3K inhibitor (NY294002) treatment. PI3K inhibitor had no effect on cellular total HK II, but HK II was translocated from the mitochondria to the cytoplasm, and so it was demonstrated that overexpressed HK II induced PI3K/Akt pathway.

This study represents that HK II has an important role in malignancy as a result of analysis of molecules and products related to aerobic glycolysis and anti-apoptosis. Also, HK II is bound to mitochondria, and closely related to PI3K/Akt signal pathway in hepatocellular carcinoma, which suggests that these molecular mechanisms could play a key role in unsuppressed growth of tumor cells, inhibition of cell death and decreased susceptibility to the anticancer drug.

Key words: hexokinase II, hepatocellular carcinoma, aerobic glycolysis, anti-apoptosis, PI3K/Akt