

폐암 세포주에서 lovastatin이
세포 성장에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의과학사업단

박 광 주

폐암 세포주에서 lovastatin이
세포성장에 미치는 영향

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2000년 12월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

박 광 주

박광주의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2000년 12월 일

감사의 글

지금 이렇게 논문을 끝맺음하는 순간은 긴 여정을 마치는 것과 같은 감회가 느껴집니다. 큰 잘못 없이 목적지에 도달할 수 있도록 그동안 세심하고 자상하게 지도해주신 김성규 교수님께 먼저 감사 드립니다. 그리고 실험의 전 과정을 이끌어주신 하만준 교수님께도 특별한 감사를 드립니다. 그리고 더 좋은 논문이 될 수 있도록 다듬어주신 김주향 교수님, 장 준 교수님, 김형중 교수님께도 감사 드리며, 실험을 도와주신 이기범 교수님, 김영선 연구원과 많은 격려와 지원을 주신 아주의대 호흡기내과에서 같이 근무하는 선후배님들께도 감사의 마음의 전합니다.

오늘이 있기까지 항상 인내와 사랑으로 조용히 곁에 있어 주었던 가족들과 멀리서 지켜보고 계시는 어머님과 함께 기쁨과 보람을 나누고 싶습니다. 그리고 아버님의 영전에 이 논문을 바칩니다.

저 자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	5
1. 세포 배양	5
2. 폐암세포주에 lovastatin의 처리	5
3. 세포의 형태적 변화 관찰	5
4. 생존 세포수 측정	5
5. 세포주기 분석	5
6. Western blot 분석	6
7. Northern blot 분석	6
8. Kinase assay	6
9. DNA fragmentaion 분석	7
10. Co-immunoprecipitation	7
11. 통계적 분석	7
III. 결 과	7
1. 세포의 형태적 변화	7
2. 생존 세포수의 변화	9
3. 세포주기의 변화	9
4. G1기 관련 세포주기 조절 단백질의 변화	12
5. G2기 관련 세포주기 조절 단백질의 변화	15
6. 세포사멸의 양상	16
7. Lovastatin에 의한 p21의 절단 현상	17
IV. 고 찰	17
V. 결 론	20
참고문헌	20
영문요약	24

그림 차례

Fig. 1. Morphologic changes of A549 by lovastatin treatment	8
Fig. 2. Morphologic changes of NCI-H23 by lovastatin treatment	8
Fig. 3. Morphologic changes of Calu-3 by lovastatin treatment	9
Fig. 4. Effects of lovastatin on viability of lung cancer cell lines	10
Fig. 5. Effect of lovastatin on expressions of G1-related cell cycle regulatory proteins	11
Fig. 6. Dose- and time-dependent effect of lovastatin on expressions of p21 and p27	12
Fig. 7. Effect of lovastatin on expressions of p21 and p27 (Northern blot analysis)	13
Fig. 8. Effect of lovastatin on kinase activities of Cdk2 and Cdc2	14
Fig. 9. Effect of lovastatin on bindings of Cdk2 with p21 and p27	14
Fig. 10. Effect of lovastatin on expressions of G2-related cell cycle regulatory proteins	15
Fig. 11. Effect of lovastatin on expression of cyclin B1 (Northern blot analysis)	15
Fig. 12. Induction of apoptosis by lovastatin	16
Fig. 13. Cleavage of p21 by lovastatin	17

표 차례

Table 1. Effect of lovastatin on cell cycle distribution in lung cancer cell lines	11
---	----

폐암 세포주에서 lovastatin이 세포성장에 미치는 영향

세포의 성장과 증식은 세포주기의 진행을 통하여 이루어진다. 세포주기는 여러 가지 인자들에 의해 조절이 되는데 이중 세포주기 조절 단백질인 cyclin과 cyclin-dependent kinase (Cdk)의 복합체는 세포주기의 진행을 촉진하며, Cdk inhibitor (CKI)는 이 복합체와 결합하여 작용을 억제하는 역할을 한다. 악성 종양에서는 이러한 조절 작용이 균형을 잃고 과도한 세포 성장이 일어나게 된다.

Lovastatin은 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase의 길항 효소로서 고지혈증 치료제로 개발된 약제인데 세포주기의 정지 및 세포성장의 억제를 일으키는 작용이 알려져 최근에는 항암요법 또는 화학 예방요법체로서의 역할이 대두되고 있다. Lovastatin이 세포주기에 작용하는 주요 기전은 G1-S기 전환에 주로 작용하는 CKI인 p21과 p27을 유도하여 Cdk를 억제하고 그 결과 G1기 정지 및 세포성장의 억제를 일으키는 것으로 알려지고 있으며 이러한 작용은 여러 가지 세포주에서 연구가 되었으나 세포주기 조절 단백질의 구체적인 발현 변화의 양상에 있어서는 세포주의 종류에 따라 다소의 차이를 보인 바 있다. 또한 최근에는 lovastatin이 세포주기의 정지뿐만 아니라 세포사멸을 일으키는 작용이 있는 것으로 보고되고 있다. 폐암에 있어서는 lovastatin이 세포성장에 미치는 영향에 대한 연구가 일부 있었으나 구체적인 작용이나 기전에 대해서는 거의 알려져 있지 않다. 연구자는 폐암 세포주 A549, NCI-H23 및 Calu-3에서 lovastatin 처리후의 세포주기 및 세포증식 양상의 변화를 관찰하고 세포주기 조절 단백질의 발현 변화를 조사하였으며, 세포사멸에 대한 실험을 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Lovastatin 처리 후 A-549 및 NCI-H23 세포주에서 세포사를 동반한 형태적 변화가 나타났으며, Calu-3 세포주에서는 변화가 미약하였다.

2. 유세포분석의 결과 전 세포주에서 저농도의 lovastatin (1, 3 μ M) 처리 시에는 G2/M기의 증가를 보였고 고농도의 lovastatin (10, 30 μ M) 처리 시에는 더 현저한 G1기의 증가가 나타났다.

3. p53의 유무에 관계없이 p21은 전사 항진에 의한 단백질의 발현 증가를 보였으나 p27은 유의한 변화가 없었다. Cdk2는 단백질의 양적인 변화는 없었으나 kinase assay 결과 효소 활성도가 감소되었다. Cdk2/p27 복합체가 현저히 증가하였으며, Cdk2/p21도 발현 증가를 보였다.

4. Cyclin B1은 전사 억제에 의한 발현 감소가 있었고 Cdc2는 단백질의 양적인 변화는 없었으나 kinase assay상 효소 활성도의 감소가 나타났다.

5. 전 세포주에서 DNA fragmentation이 나타났고 NCI-H23에서 가장 현저하였다. NCI-H23에서 p21에 대한 Western blot 상 15 kDa 부위에 p21의 절단에 의한 band가

나타났다.

이상의 결과에서 lovastatin은 폐암 세포주에서 세포성장의 억제 및 세포사를 일으켰고, 이때 세포사의 현상은 p21의 절단 작용에 의한 세포사멸이 관여하는 것으로 나타났다. 세포주기에서는 현저한 G1기 정지와 상대적으로 미약한 G2기 정지 및 이에 상응하는 세포주기 조절 단백질의 발현 변화를 관찰할 수 있었다. 특히 G1기 정지작용은 p53의 유무에 관계 없이 lovastatin이 CKI를 유도하는 작용이 주요한 기전으로 나타났고 이때 p21은 전사 증가에 의한 단백질의 양적인 증가가 있었으나 p27은 자체의 양적인 변화는 없이 Cdk2와의 결합 증가가 나타났다.

핵심되는 말: 폐암, 세포주, lovastatin, 세포성장, 세포주기 조절 단백질, 세포사멸, p21, p27

폐암 세포주에서 lovastatin이 세포성장에 미치는 영향

<지도 김 성 규 교수>

연세대학교 대학원 의과학사업단

박 광 주

I. 서 론

세포의 성장을 위해서는 세포주기의 진행이 필요하며 이는 여러 가지 촉진 또는 억제 작용을 하는 단백질들에 의해서 조절이 된다. 정상 세포는 이러한 조절 단백질들의 균형 있는 상호 작용에 의해 유지되나 종양 세포에서는 이러한 조절 기능의 이상으로 인하여 과도한 성장과 증식이 일어나게 된다. 세포주기의 진행은 세포주기 조절 단백질인 cyclin과 cyclin-dependent kinase (Cdk)의 복합체에 의해서 촉진이 된다.¹⁻⁴ Cyclin/Cdk 복합체는 retinoblastoma 단백질 (pRb)과 같은 기질을 인산화시키고 인산화된 pRb는 전사인자인 E2F와의 상호작용을 통하여 세포주기의 진행, 특히 G1기의 통과 과정에 있어서 중요한 역할을 한다.^{5,6} Cyclin과 Cdk는 여러 가지가 알려져 있는데 cyclin D/Cdk4 및 cyclin D/Cdk6 복합체는 G1기내의 진행에 있어서, 그리고 cyclin E/Cdk2 복합체는 G1기에서 S기로의 전환을 촉진하여 세포주기의 진행을 유도하고, cyclin B/Cdk2 복합체는 G2-M기를 진행시키는 작용이 있다.^{3,6,7} 저인산화된 pRb는 E2F를 억제하여 종양 억제인자로서의 기능을 한다.^{8,9}

Cyclin/Cdk는 다양한 기전에 의하여 조절이 되며, 이러한 과정은 세포주기의 진행을 통제하는데 중요한 역할을 한다. 이러한 조절 기전에는 cyclin 단백질 자체의 합성이나 분해를 통한 직접적인 조절이 있고, cyclin/Cdk 복합체를 활성화하는 cyclin activating kinase (CAK)에 의한 촉진 작용도 있으며,¹⁰⁻¹² 또한 Cdk의 작용을 억제하는 Cdk inhibitor (CKI)에 의하여 조절되기도 한다.¹⁻³

CKI는 CIP/KIP계와 INK계 2가지로 크게 나뉜다. CIP/KIP계는 복합체를 이룬 cyclin/Cdk와 결합하여 길항 작용을 하는 CKI로서 p21^{CIP1/WAF1}, p27^{KIP1} 등이 있고, INK계는 Cdk와 결합하여 cyclin과의 복합체 형성을 방해하는 작용을 하며, p15^{INK4B}, p16^{INK4A} 등이 알려져 있다.^{2,3,13} p21과 p27은 세포주기 조절에 있어서 유사한 작용을 나타내며, 주로 Cdk2-6을 억제하는 기능을 가진다.¹³⁻¹⁵ p21은 DNA 손상 시에 p53에 의해서 유도되며, 또한 p53과는 무관

하게 혈장 결핍, TGF- β , lovastatin 등에 의해서 유도될 수도 있는 것으로 알려져 있다.¹⁶⁻¹⁹ p27도 p21과 유사하게 TGF- β , lovastatin 등에 의해 유도되는 것으로 보고된 바 있다.^{20,21}

Lovastatin은 콜레스테롤 생합성에 있어서 rate-limiting enzyme인 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase의 길항 효소로서 애초에는 고지혈증 치료제로 개발된 약제인데 세포성장 억제효과 및 세포주기에서 G1기 정지를 일으키는 작용이 알려져 세포주기를 동기화할 때 이용되고 있으며, 항암제 또는 화학예방제로서의 가능성이 제시되어 임상적 연구가 진행되고 있다.²²⁻²⁵ Lovastatin이 세포주기에 작용하는 주요 기전은 CKI인 p21과 p27을 유도하여 Cdk를 억제하고 그 결과 G1기 정지를 일으키는 것으로 알려지고 있다. 그러나 구체적인 작용의 양상은 세포의 종류마다 다소의 차이가 있는 것으로 보고되고 있는데 정상 유선세포에서는 p21 및 p27의 증가를 보였으나 HeLa 세포주에서는 p27의 증가만 나타났고 전립선암 세포주에서는 p21의 발현 증가는 있으나 p27의 변화는 없는 것으로 보고되었다.^{19,20,26,27} 유방암 세포주에서는 lovastatin이 G1기 정지를 일으켰지만 p21 및 p27 단백질의 발현 변화는 p53의 유무에 따라 다양하며, CKI 단백질 양 자체의 변화보다는 Cdk와의 결합의 증가 및 이로 인한 효소기능억제가 주기전인 것으로 보고하였고,^{19,20,28} HL-60 세포주에서는 여러 가지 Cdk 및 cyclin의 전반적인 양적 감소가 나타난 바 있다.²⁹

Lovastatin은 여러 세포에서 세포사를 유발하지만 p21은 세포주기의 정지만 일으키고 기본적으로 세포사멸 (apoptosis)을 유도하는 기능이 없는 것으로 알려져 있었기 때문에 lovastatin이 세포사를 일으키는 기전이 설명하기가 어려웠으나 여러 가지 요인으로 유도된 p21은 caspase에 의하여 절단이 되어 고유의 기능을 잃게되고 결국 세포사멸이 유발된다는 새로운 보고들이 최근에 있었다.^{30,31}

폐암에 있어서 HMG-CoA의 활성도가 증가되어 있다는 보고 및 lovastatin에 의해서 종양의 성장이 억제되었다는 보고 등은 있었으나 아직 lovastatin이 세포주기 조절 인자들에 작용하는 구체적인 기전이나 세포사멸에 관한 연구는 거의 알려져 있지 않다.^{32,33}

본 연구는 폐암 세포주에서 lovastatin 처리 후의 세포학적 및 분자생물학적인 변화를 관찰하여 세포주기 및 세포성장에 미치는 영향 및 작용 기전을 조사하는데 목적이 있다. 구체적으로는 lovastatin 처리 후에 폐암 세포주의 형태적인 변화 및 세포주기의 변화 양상과 세포주기의 변화에 이어지는 세포사의 유무 및 세포사멸의 양상을 관찰하고, 여러 가지 세포주기 조절 단백질의 발현 변화를 조사하며 이를 현재까지 보고된 여러 장기에서의 발현 양상과 비교 분석해 보고자 한다. 이러한 연구를 통하여 현재 항암 화학요법제로서의 역할이 대두되고 있는 lovastatin이 폐암 세포의 성장에 미치는 영향을 규명하고 나아가서는 폐암 치료제로서 임상적 이용의 기본 근거를 마련하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 세포 배양

사람 폐암(선암) 세포주인 A549, NCI-H23 및 Calu-3 세포주를 한국 세포주은행(서울대학교 의과대학 부설 암연구소, 서울, 한국)에서 구입하여 10% 우태아혈청과 항균제-항진균제 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, U.S.A.)을 함유한 RPMI-1640 (Gibco BRL) 배양액을 이용하여 37°C 5% CO₂의 조건 하에서 배양하였다. 배양액은 매 3일마다 교환하였고, 세포가 융합상태가 되면 trypsin/ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)를 사용하여 주기적으로 분주하였다.

2. 폐암 세포주에 lovastatin의 처리

배양한 세포에 lovastatin (Merck, Sharp and Dohme, Rathway, NJ, U.S.A.)을 농도별로는 1, 3, 10, 30 μ M을 처리하고 48시간 후에, 시간별로는 10 μ M을 처리하고 12, 24, 36, 48시간 후에 다음의 기술할 형태적 변화 관찰 및 세포주기 분석을 하였고 세포용해액을 만들어서 Western blot, Northern blot, kinase assay 및 co-immunoprecipitation 등의 실험들을 수행하였다.

3. 세포의 형태적 변화 관찰

각 세포주에 lovastatin 1, 3, 10, 30 μ M을 처리 후 시간에 따른 형태적 변화 및 세포사의 여부를 위상차 현미경으로 관찰하였다.

4. 생존 세포수 측정

각 세포주를 5×10^4 cells/well 씩 6 well plate에 분주 후 lovastatin 1, 3, 10, 30 μ M을 처리하고 배양하였다. 48시간 후에 phosphate-buffered saline으로 세척하고 trypsin으로 처리하여 세포를 떼어낸 후 동량의 0.4% trypan blue 용액으로 염색하고 10분 후에 혈구계수기로 생존 세포수를 측정하였다. 같은 방법으로 생존 세포수를 2회 더 측정하였다.

5. 세포주기 분석

세포를 수확하여 2×10^6 으로 세포수를 조정 후 cycle TESTTMPLUS DNA Reagent kit (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA)를 이용하여 세포를 염색하였다.

먼저 DNA cell cycle 시약 A (trypsin 77 mg, citrate buffer 250 ml)로 실온에서 10분간 처리한 후 DNA cell cycle 시약 B (trypsin inhibitor 125 mg, RNase 25 mg, citrate buffer 250 ml)로 다시 실온에서 10분간 반응시켰다. 마지막으로 DNA cell cycle 시약 C (propidium iodide 125 mg, spermine tetrahydrochloride 290 mg, citrate buffer 250 ml)를 넣고 냉장실 암소에서

10분간 염색 후 FACScan (fluorescence-activated cell sorter, Becton Dickinson Biosciences)으로 분석을 하였다.

6. Western blot 분석

세포를 수확한 다음 EBC buffer [(40 mM Tris-HCl pH 8.0, 120 mM NaCl, 0.5% NP-40, 2 μ g/ml leupeptin, 100 μ g/ml phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)]를 가하여 세포용해액을 만들고 10~12.5%의 polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동 및 전이(transfer) 후 anti-cyclin A, anti-cyclin E, anti-cyclin B1 단클론 항체, anti-cyclin D, anti-Cdk2, anti-Cdk4 다클론 항체 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.) 및 anti-p21 및 anti-p27 단클론 항체 (Transduction Laboratories, Lexington, KY, U.S.A.) 등의 1차 항체로 처리하고 peroxidase가 conjugation된 sheep anti-mouse IgG나 donkey anti-rabbit antibody로 2차 항체 반응 후 enhanced chemilluminescence를 시행하였다.

7. Northern blot 분석

배양세포를 lysis buffer [4 M guanidine thiocyanate, 25 mM sodium citrate (pH 7.0), 0.5% sodium N-lauroylsarcosinate, 0.1 M 2-mercaptoethanol]로 처리 후 2 M sodium acetate (pH 4.0)와 동량의 water-saturated phenol, 0.2배 분량의 chloroform-isoamyl alcohol mixture (49 : 1)를 가하여 총 RNA를 분리하였다. 여기에 2-propanol로 처리하고 원심분리 후 RNA pellet을 diethyl pyrocarbonate (DEPC)로 처리된 증류수에 녹였다. 10 μ g의 총 RNA를 formaldehyde가 포함된 1% agarose gel을 사용하여 80 volt로 2시간 전기영동 후 Nytran membrane으로 옮기고 auto-UV-cross linker를 이용하여 cross linking을 하였다. 표식자(probe)는 human full length cyclin B1, p21 및 p27의 cDNA를 template하여 ³²P로 표지된 dCTP를 이용해서 random hexamer formation 방법으로 합성하였다. Nytran membrane에 hybridization buffer (5 \times Denhardt's solution, 200 μ g/ml salmon sperm DNA, 5 \times SSPE, 0.5% SDS)를 넣은 후 68°C에서 2~4시간 전교잡(prehybridization)을 수행한 후 probe를 첨가하고 68°C에서 24시간 동안 교잡(hybridization) 시켰다. 교잡이 끝난 membrane을 2배량의 SSC, 0.1% SDS용액으로 상온에서 5분간 세 번 수세한 후 68°C에서 0.2배 분량의 SC, 0.1% SDS가 포함된 용액으로 20분간 수세하여 비 특이적 표식자의 결합을 제거하였다. 이를 건조시킨 다음 -70°C에서 2~3일간 자가방사기록법을 수행하였다.

8. Kinase assay

세포를 수확 후 단백질 세포용해액을 만들고 protein-A sepharose (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, U.S.A.)를 가하고 원심분리 후 상층액에 anti-Cdk2 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A) 또는 anti-Cdc2 antibody (Santa Cruz Biotechnology)를 넣고

4°C에서 1시간 동안 반응시켰다. Kinase buffer (Tris pH 7.4 25 mM, MgCl₂ 100 mM)로 수세한 후 pellet에 0.5 μl의 10 μCi/ml γ-³²P dATP와 5 μg의 histone H1을 넣고 37°C에서 30분간 반응시키고 2배량의 SDS sample buffer를 넣어 잘 섞어주었다. 이를 95°C에서 5분간 끓이고 10% SDS/polyacrylamide gel로 전기영동 후 자가방사기록법을 시행하였다.

9. DNA fragmentaion 분석

세포를 수확 후 세포용해액을 만들고 원심분리 후 상층액에 phenol, chloroform, isamyl alcohol (혼합비율 50 : 49 : 1, Gibco BRL)을 넣고 원심분리를 하였다. 상층액에 ethanol과 3 M sodium acetate를 섞고 원심분리 후 pellet에 TE buffer (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0)를 가하여 녹이고 RNase (10 mg/μl) 및 20 μl의 증류수를 가하여 DNA를 녹인 후 1.2% agarose gel로 전기영동하고 UV illuminator로 관찰하였다.

10. Co-immunoprecipitation

각 세포주의 세포용해액을 만들고 protein-A sepharose를 가하여 4°C에서 30분간 흔들어진 후 4,000 g에서 5분간 원심 분리하여 상층액만 취하였다. 여기에 1 μg이 되게 anti-Cdk2 antibody (Santa Cruz Biotechnology)를 넣고 4°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 protein-A sepharose를 다시 넣고 4°C에서 1시간 동안 흔들여 주었다. 이를 4,000 g에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 pellet에 차가운 EBC buffer로 4회 반복하여 수세 후 상층액을 완전히 제거하였다. 여기에 동량의 SDS sample buffer를 넣어 잘 섞고 원심분리한 후 상층액을 12.5% SDS/polyacrylamide gel로 전기영동 및 전이 후 anti-p21 및 anti-p27 항체를 1차 항체로 이용하여 Western blot을 수행하였다.

11. 통계적 분석

Lovastatin 처리 후 생존 세포수는 평균±표준편차로 표시하였고 각 군간의 비교는 one-way ANOVA를 시행하였다. 통계 프로그램은 SPSS for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.A) version 7.5를 사용하였다. p 값이 0.05보다 작은 경우에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. 세포의 형태적 변화

각 폐암 세포주에 lovastatin 10 μM을 처리하고 48시간 후에 형태적 변화를 관찰한 결과 A549에서는 세포수가 감소하였고 다형성이 심하여 원형이나 방추형 등의 불규칙한 형태가 많이 나타났다. 세포막이 불규칙하게 변하고 세포돌기가 길어졌으며, 사멸된 세포의 잔

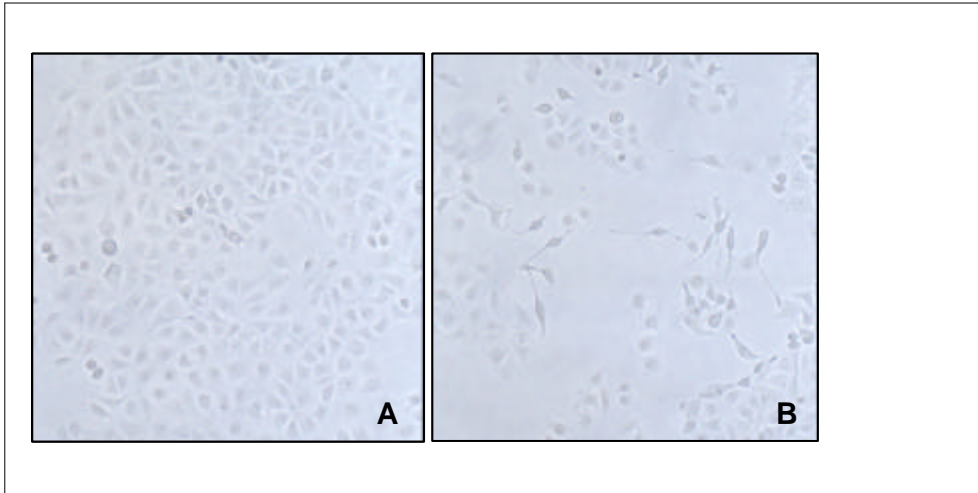


Fig. 1. Morphologic changes of A549 by lovastatin treatment. Photographs were taken before (A) and at 48 h after 10 μ M lovastatin treatment (B) with a phase-contrast microscope at a magnification of $\times 100$. The cells decrease in number and appear polymorphic with elongated, rounded forms and some debris.

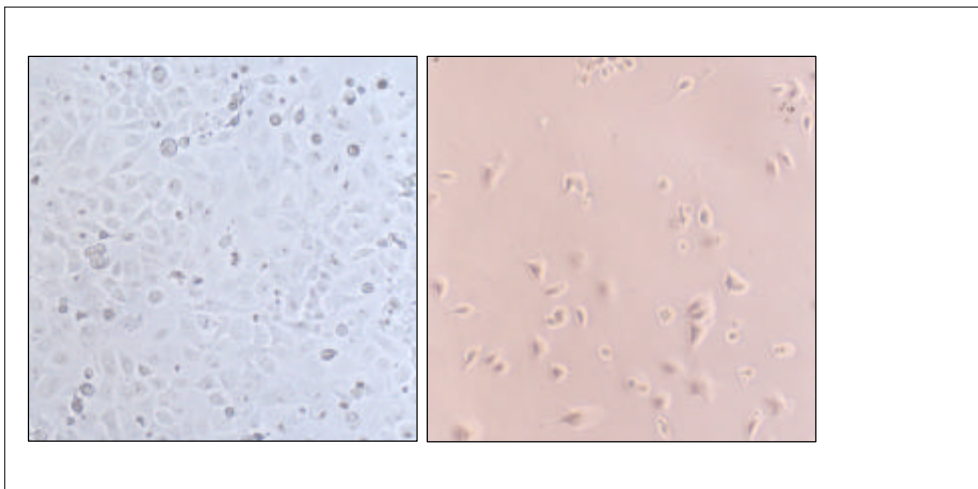


Fig. 2. Morphologic changes of NCI-H23 by lovastatin treatment. Photographs were taken before (A) and at 48 h after 10 μ M lovastatin treatment (B) with a phase-contrast microscope at a magnification of $\times 100$. The cells show the most remarkable reduction in number and morphologic changes in three cell lines.

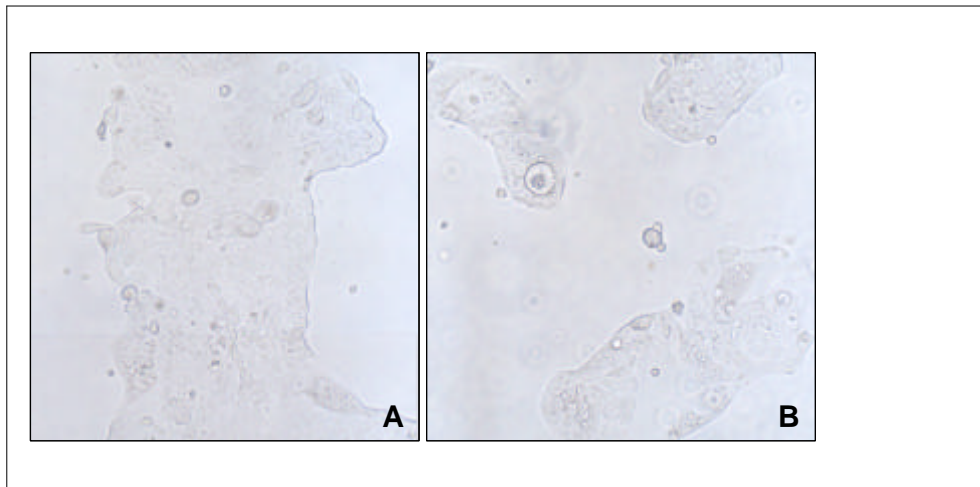


Fig. 3. Morphologic changes of Calu-3 by lovastatin treatment. Photographs taken before (A) and at 48 h after 10 μ M lovastatin treatment (B) with a phase-contrast microscope at a magnification of $\times 100$ show huge and bizarre appearance basically and reveal no significant morphologic changes.

유물이 자주 관찰되었다(Fig. 1). NCI-H23에서 세포수가 가장 현저하게 감소하였고 잔유 세포는 다형성이 심한 원형 및 방추형의 세포 등만 나타났고 정상적인 형태는 거의 관찰할 수가 없었다(Fig. 2). 그러나 Calu-3 세포주에서는 약간의 세포 다형성 및 일부 세포사의 형태가 관찰되었으나 전반적으로 뚜렷한 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 3).

2. 생존 세포수의 변화

각 폐암 세포주에 lovastatin 1, 3, 10, 30 μ M을 처리하고 48시간 후에 생존 세포수를 계수한 결과 A549의 세포수는 기저상태에서 $22.0 \pm 1.3 \times 10^4$ 이었는데 1 μ M에서 $20.4 \pm 0.7 \times 10^4$ 으로 유의한 변화가 없다가 3 μ M에서 $18.1 \pm 2.3 \times 10^4$, 10 μ M에서 $13.3 \pm 0.3 \times 10^4$, 30 μ M에서 $4.0 \pm 0.4 \times 10^4$ 으로 생존 세포수가 유의하게 감소하였다($p < 0.05$). NCI-H23의 세포수는 기저상태에서 $14.1 \pm 0.8 \times 10^4$ 이었는데 1 μ M에서 $5.7 \pm 0.3 \times 10^4$, 3 μ M에서 $3.1 \pm 0.4 \times 10^4$, 10 μ M에서 $1.7 \pm 0.4 \times 10^4$, 30 μ M에서 $1.1 \pm 0.4 \times 10^4$ 으로 모든 투여 농도에서 유의하게 감소하였다($p < 0.05$). Calu-3의 세포수는 기저상태에서 $7.1 \pm 0.8 \times 10^4$ 이었는데 1 μ M에서 $6.3 \pm 1.7 \times 10^4$, 3 μ M에서 $6.0 \pm 1.8 \times 10^4$ 으로 유의한 변화가 없다가 10 μ M에서 $3.5 \pm 0.4 \times 10^4$, 30 μ M에서 $3.4 \pm 0.1 \times 10^4$ 으로 유의하게 감소하였으나($p < 0.05$) 감소율이 가장 적었다(Fig. 4).

3. 세포주기의 변화

각 세포주에 lovastatin 1, 3, 10, 30 μ M을 처리하고 48시간 후에 유세포 분석을 시행하여

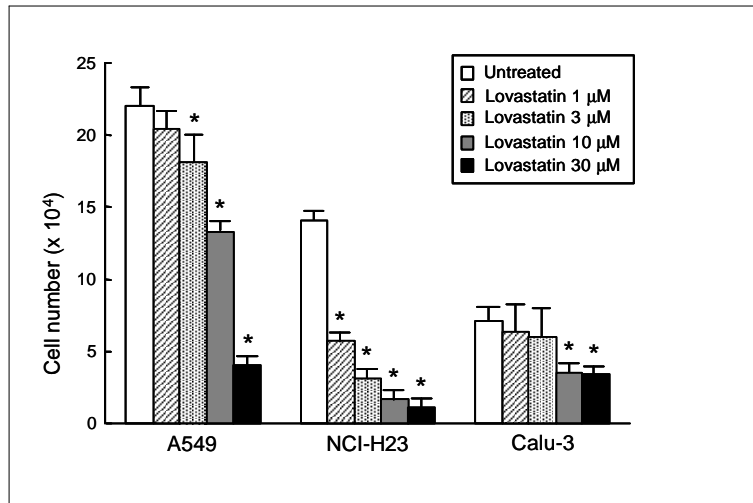


Fig. 4. Effects of lovastatin on viability of lung cancer cell lines. Cells were plated in each well of 6 well plates at a density of 5×10^4 cells/well, and then treated with lovastatin of indicated doses. Individual wells were trypsinized, and the number of viable cells was counted at 48 h after treatment using hemocytometer in triplicate. Data are presented as mean \pm SD. *P < 0.05 versus untreated.

lovastatin 투여량에 따른 세포주기의 변화를 비교하였다. 유세포 분석은 3회 시행하여 가장 대표적인 결과를 취하였다. 세포주기는 G0/G1, S 및 G2/M 등 3기로 나누었고 각각의 비율을 백분율로 표시하여 비교한 결과 다음과 같은 결과가 나타났다. A549에서는 기저상태에서 G0/G1기의 비율이 64.4%였는데 lovastatin 3 μ M까지는 뚜렷한 변화가 없다가 10 μ M에서 75.3%, 30 μ M에서 94.1%로 현저하게 증가하였다. G2/M기에 있어서는 기저상태에서 3.7%였는데 lovastatin 3 μ M에서 5.0%로 증가하였다가 이후는 다시 감소하는 양상이었다. NCI-H23에서는 기저상태에서 G0/G1기의 비율이 25.3%였고 10 μ M에서 34.1%, 30 μ M에서 36.0%로 현저하게 증가하였다. G2/M기에 있어서는 기저상태에서 32.4%였고 3 μ M에서 46.2%로 증가하였다가 이후는 감소하였다. Calu-3에서는 기저상태에서 G0/G1기의 비율이 57.2%였고 lovastatin 10 μ M에서 64.8%, 30 μ M에서 70.9%로 증가하였다. G2/M기에 있어서는 기저상태에서 13.5%였는데 1 μ M에서 18.4%, 3 μ M에서 19.5%로 증가하였다가 이후는 다시 감소하였다(Table 1). 이와 같이 전 세포주에서 lovastatin 처리 후에 G1기 및 G2/M기가 유의하게 증가하였고 상대적으로 S기의 감소하였다. 증가의 양상은 lovastatin 1, 3 μ M의 저농도에서는 G2/M가 증가하였고 그보다 높은 농도인 10, 30 μ M에서는 G1기의 현저하게 증가하면서 상대적으로 G2/M기의 비율은 감소하는 경향이였다. 세포주간의 비교에 있어서 G1기의 증가율은 A549와 NCI-H23에서 각각 146% 및 143%로 현저하였고 Calu-3는 124%로서 증가율이 상대적으로 낮았다. G2기의 변화에 있어서는 증가율이 A549 135%,

Table 1. Effect of lovastatin on cell cycle distribution in lung cancer cell lines*

	Doses of lovastatin (μM)				
	0	1	3	10	30
A549					
G0/G1 (%)	64.4	64.7	64.4	75.3	94.1
S (%)	31.9	30.9	30.6	26.6	3.3
G2/M (%)	3.7	4.4	5.0	3.2	2.6
NCI-H23					
G0/G1 (%)	25.3	27.0	29.5	34.1	36.0
S (%)	42.4	32.8	24.4	42.0	34.2
G2/M (%)	32.4	40.2	46.2	24.0	29.8
Calu-3					
G0/G1 (%)	57.2	58.2	58.2	64.8	70.9
S (%)	29.2	23.4	22.4	19.2	17.4
G2/M (%)	13.6	18.4	19.5	16.0	11.7

*All cell lines were treated with lovastatin of indicated doses. Flow cytometric cell cycle analysis was performed after 48 hours. Relative proportions of cell cycles in each cell line are described as percentage.

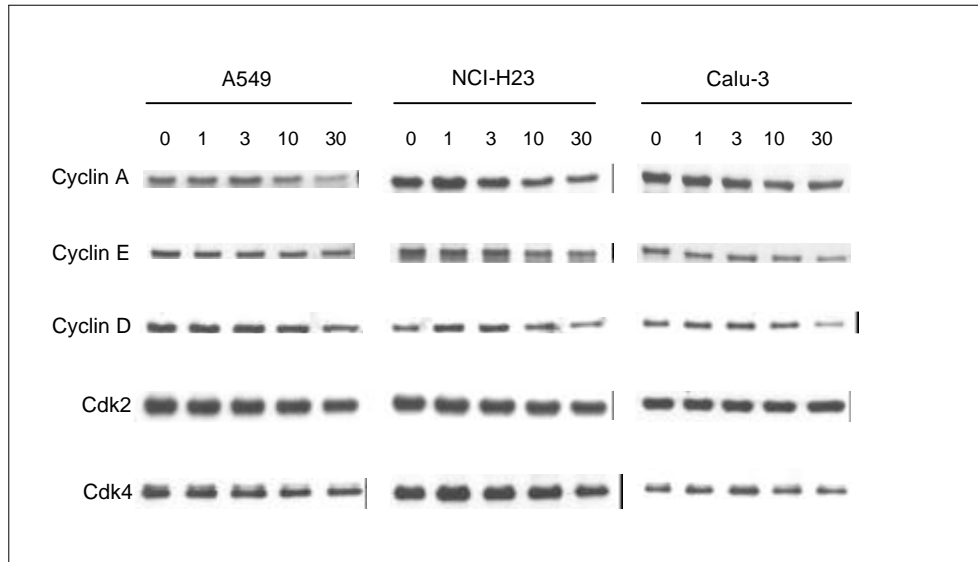


Fig. 5. Effect of lovastatin on expressions of G1-related cell cycle regulatory proteins. Western blot analysis was done at 48 h after treatment of all cells with lovastatin of indicated doses (μM).

NCI-H23 143%, Calu-3 143%로 비슷한 양상이었다.

4. G1기 관련 세포주기 조절 단백질의 변화

각 세포주에 lovastatin 1, 3, 10, 30 μM 을 처리하고 48시간 후에 세포용해액을 만든 후 여러 가지 G1기 관련 세포주기 조절 단백질의 항체를 이용하여 Western blot을 시행한 결과 cyclin A, cyclin E, cyclin D 등은 모든 세포주에서 처리 전과 발현의 변화가 없었고 Cdk2 및 Cdk4도 변화가 없었다(Fig. 5). 이때 일부 세포주기 조절 단백질에서는 lovastatin 30 μM 처리 후에 발현이 약간 감소하는 소견을 보였는데 이는 농도의 증가에 따른 점진적 변화가 아니므로 유의한 결과로 판정하기는 어려우며, lovastatin이 세포주기 조절 단백질에 직접 작용하여 나타난 발현 변화라기보다는 고농도의 lovastatin에 의한 세포 독성과 세포사로 인하여 비특이적으로 나타난 변화일 것으로 사료되었다.

G1기 관련 CKI인 p21의 lovastatin 투여량에 따른 발현 변화를 관찰하기 위하여 각 세포주에 lovastatin 1, 3, 10, 30 μM 을 처리하고 48시간 후에 p21에 대한 Western blot을 시행한 결과, A549 세포주에서는 lovastatin 3 μM 부터, NCI-H23은 1 μM 에서부터 발현이 증가하였고 Calu-3는 1 μM 에서 발현이 증가되었다가 10 μM 부터는 발현이 다시 감소하였다(Fig. 6). p21의 lovastatin 처리 후 시간에 따른 발현 변화를 관찰하기 위하여 각 세포주에 lovastatin 10 μM 투여 후 12, 24, 48시간 후에 p21에 대한 Western blot을 시행한 결과, A549

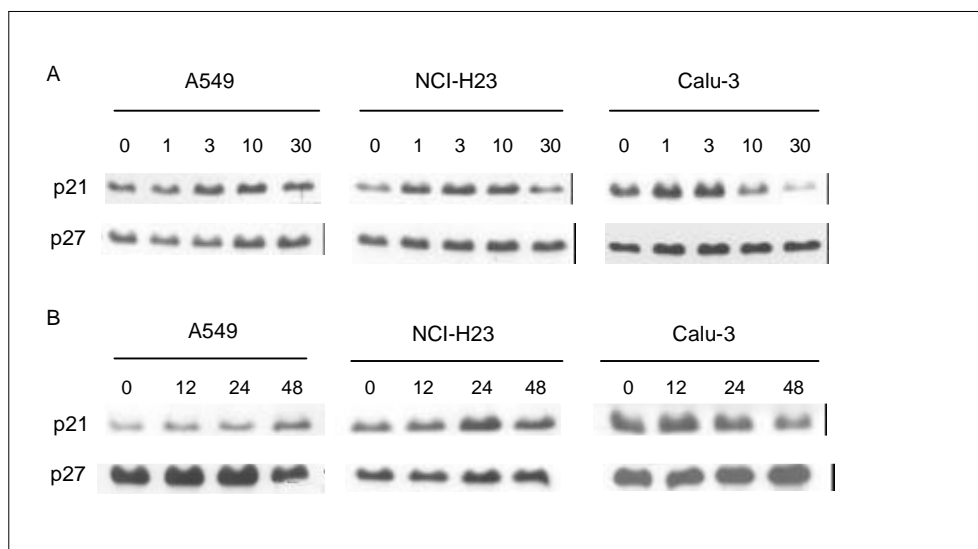


Fig. 6. Dose- and time-dependent effect of lovastatin on expressions of p21 and p27. (A) Western blot analysis was done at 48 h after treatment of all cells with lovastatin of indicated doses (μM). (B) Western blot analysis was done at the indicated time (h) after treatment of all cells with 10 μM of lovastatin.

에서 48시간 후, NCI-H23은 24시간 후에 발현이 증가하였고, Calu-3는 12시간 후에 발현이 약간 증가하였다(Fig. 6).

p21 mRNA의 변화를 관찰하기 위하여 각 세포주에 lovastatin 1, 3, 10, 30 μM 을 처리하고 48시간 후에 p21에 대한 Northern blot을 시행한 결과 A549 및 NCI-H23에서는 lovastatin 10 μM 및 30 μM 에서 현저하게 발현이 증가하였고, Calu-3에서는 10 μM 에서 미약하게 증가하였다. 이상의 결과에서 p21은 전사의 증가와 이에 따르는 단백질 합성의 증가가 있다는 사실을 알 수 있었다. 또 하나의 G1기 관련 CKI인 p27의 발현 변화를 관찰하기 위하여 위의 p21과 같은 방법으로 lovastatin을 처리하고 실험을 수행한 결과 Western blot 상 전 세포주에서 lovastatin의 투여량 및 시간에 따른 유의한 변화가 없었고, Northern blot 상으로도 발현 변화가 없었다(Fig. 7).

p53은 p21과 같은 CKI를 강력히 유도하는 작용이 있으므로 세포주에서 p53의 유무가 CKI의 발현 변화에 영향을 줄 수 있고, 실제로 유방암 세포주를 대상으로 한 연구에서는 p53의 유무에 따라 CKI의 발현이 다른 양상으로 나타난 바 있다.²⁸ 본 실험에 이용된 세포주에서 A549는 wild-type p53을 가지며, NCI-H23 및 Calu-3는 p53이 돌연변이 또는 결실된 세포주인데,^{34,35} lovastatin 처리 후 p21과 p27은 p53의 유무에 따라 뚜렷한 차이가 없었다.

G1기에 주로 작용하는 Cdk2는 Western blot 상으로 모든 세포주에서 lovastatin 처리에 따른 발현의 변화가 없었다(Fig. 5). 효소 활성도의 변화를 보기 위하여 각 세포주에 lovastatin 10 μM 을 처리하고 48시간 후에 kinase assay를 시행한 결과 전 세포주에서 현저한 Cdk2 효소 활성도의 감소를 보여 효소 자체의 양적인 변화는 없지만 인산화 효소 기능이 감소하

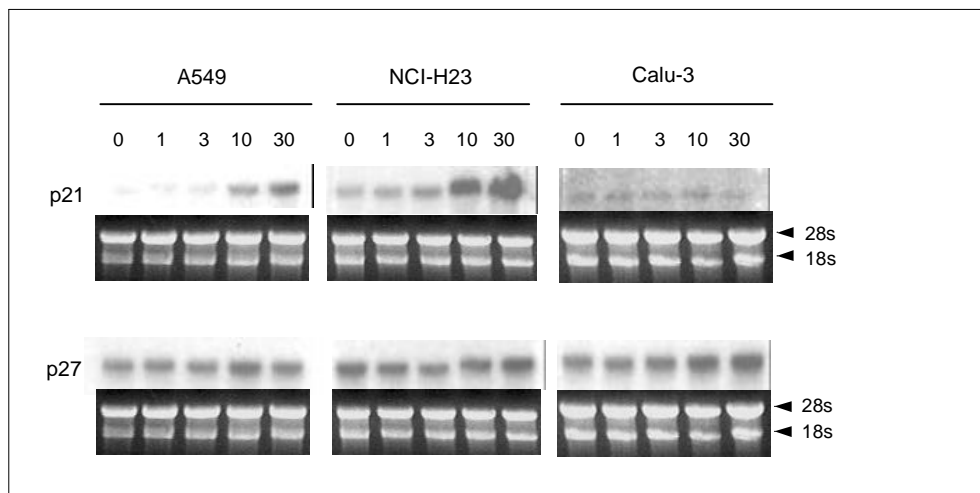


Fig. 7. Effect of lovastatin on expressions of p21 and p27. Northern blot analysis was done for p21 and p27 mRNA at 48 h after treatment of all cells with lovastatin of indicated doses (μM).

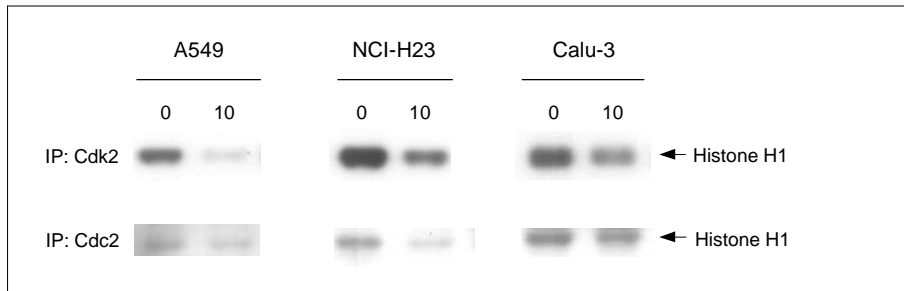


Fig. 8. Effect of lovastatin on kinase activities of Cdk2 and Cdc2. All cells were treated with 10 μ M lovastatin, and cell lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-Cdk2 and anti-Cdc2 antibodies, and kinase activity was assayed using histone H1 as substrate at indicated time (h) after treatment.

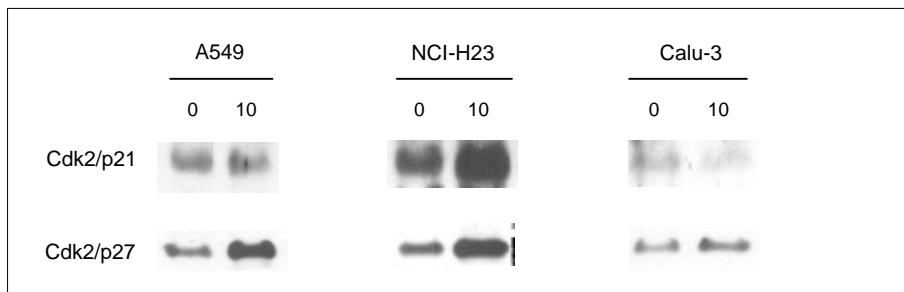


Fig. 9. Effect of lovastatin on bindings of Cdk2 with p21 and p27. Cells were treated with 10 μ M lovastatin for 48 hours, and cell lysates were immunoprecipitated with anti-Cdk2 antibody, and then reacted with anti-p21 and anti-p27 antibodies.

였다는 사실을 알 수 있었다(Fig. 8).

이상의 결과에서 얻어진 p21의 양적인 증가와 Cdk2의 효소 활성도 감소라는 두 가지 중요한 변화는 서로 밀접한 관련이 있고 이를 또한 G1기 정지와 연관지을 수 있다. 하지만 p21과 p27은 G1기 관련 cyclin/Cdk과 결합하여 억제하는 작용을 하기 때문에 각각의 양적인 변화만을 보는 것만으로 Cdk2의 효소활성도 감소를 설명하는 것은 불충분하며, 결합의 변화 즉 Cdk/CKI 복합체 형성의 변화 양상이 실제적으로 중요한 의미를 갖기 때문에 이를 확인하기 위하여 co-immunoprecipitation을 시행하였다. Cdk2/p21 복합체 형성의 변화를 확인하기 위해서 각 세포주에 lovastatin 10 μ M을 처리하고 48시간 후에 anti-Cdk2 antibody로 immunoprecipitation을 시행하고 여기에 다시 anti-p21 antibody로 Western blot을 시행하여 발현을 관찰한 결과 NCI-H23에서 복합체의 발현이 증가하였으나 다른 세포주에서는 발현의 변화가 없었다. Cdk2/p27의 복합체 형성에 대한 평가를 위해 같은 방법으로 co-immunoprecipitation을 시행한 결과 전 세포주에서 발현이 증가하였고 이는 p21보다 더 현저하였다

(Fig. 9). p27

Cdk2

가가 p21

G1

5. G2

Lovastatin G2

cyclin B1

lovastatin

lovastatin 1,

3, 10, 30 μ M

48

cyclin B1

Western blot

10 μ M

12, 24, 48

48

lovastatin 10 μ M

(Fig. 10). Lovastatin cyclin B1 mRNA

가

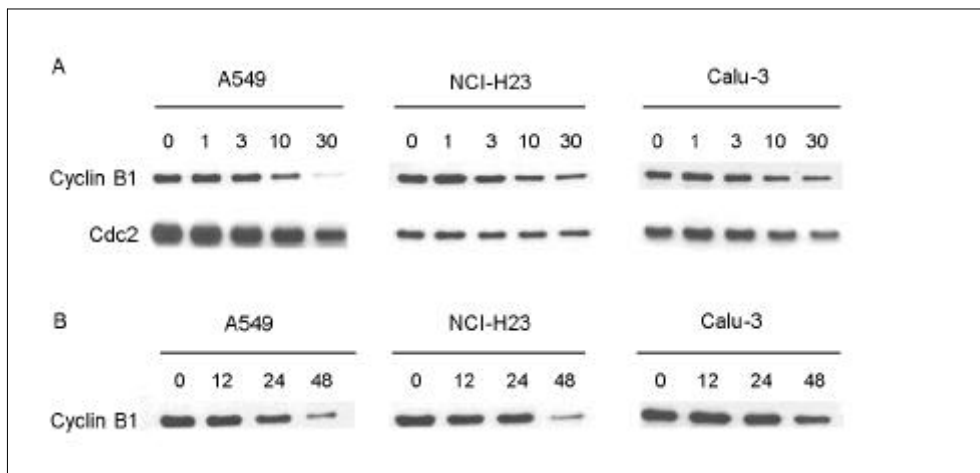


Fig. 10. Effect of lovastatin on expressions of G2-related cell cycle regulatory proteins. (A) Western blot analysis was done at 48 h after treatment of all cells with lovastatin of indicated doses (μ M). (B) Western blot analysis was done at the indicated time (h) after treatment of all cells with 10 μ M of lovastatin.

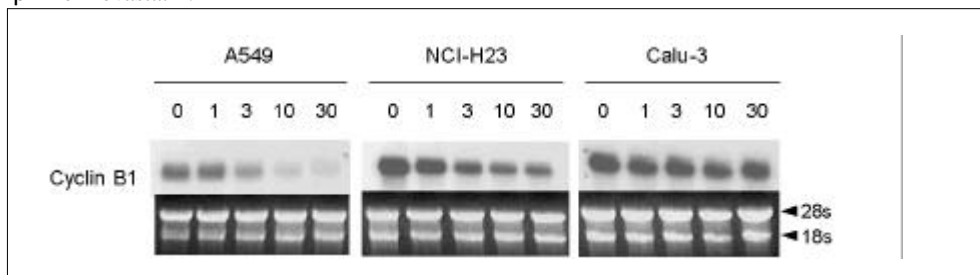


Fig. 11. Effect of lovastatin on expression of cyclin B1. Northern blot analysis was done for p21 mRNA at 48 h after treatment of all cells with lovastatin of indicated doses (μ M).

Northern blot
가 Calu-3
G2
blot 가
NCI-H23
(Fig. 8). Cdc2 cyclin B1
lovastatin G2
cyclin B1 가

A549
Cdc2
kinase assay 가

NCI-H23
lovastatin 1, 3, 10, 30 μ M
lovastatin 10 μ M
Calu-3

3 μ M
(Fig. 11).
lovastatin 1, 3, 10, 30 μ M
48
Western
A549
co-immunoprecipitation
가

6.

Lovastatin 가
lovastatin 1, 3, 10, 30 μ M 48
DNA DNA fragmentation A549
lovastatin 30 μ M DNA ladder가
 μ M DNA ladder가 가
fragmentation NCI-H23
Calu-3 lovastatin 10 μ M 30
DNA
(Fig. 12).

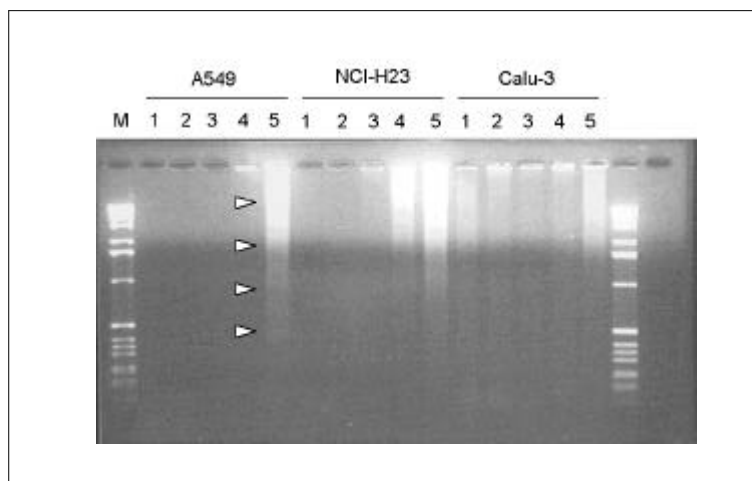


Fig. 12. Induction of apoptosis by lovastatin. Electrophoretic analysis of DNA from cells at 48 h after treatment with lovastatin of indicated doses for detection of DNA fragmentation. Cells were treated with following doses of lovastatin; lane 1, untreated; lane 2, 1 μ M; lane 3, 3 μ M; lane 4, 10 μ M; lane 5, 30 μ M.

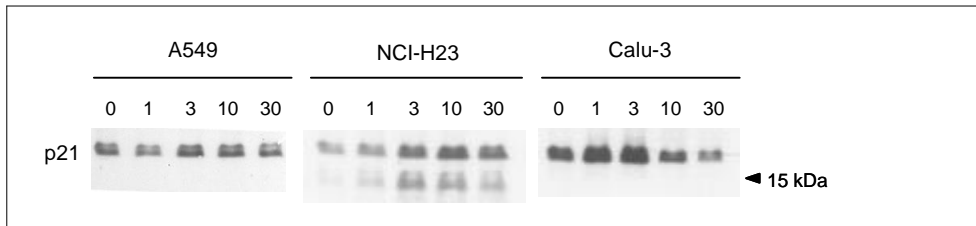


Fig. 13. Cleavage of p21 by lovastatin. All cells were treated with lovastatin of indicated doses (μM), and subjected to Western blot analysis using anti-p21 antibody at 48 h after treatment. 15 kDa fragments of p21 were identified in NCI-H23 corresponding to apoptosis described in figure 12.

7. Lovastatin에 의한 p21의 절단 현상

Lovastatin에 의해서 p21의 절단되어 cleavage fragment가 발현되는지 확인하기 위해 각 세포주에 lovastatin 1, 3, 10, 30 μM 을 처리하고 48시간 후 anti-p21 antibody로 Western blot을 시행한 결과 NCI-H23에서 1 μM 처리 후 정상적인 p21의 band보다 아래의 15 kDa 부위에 미약한 band가 관찰되었고 3, 10, 30 μM 에서는 저명한 band가 같은 부위에 지속적으로 관찰되어 상기의 DNA fragmentation 양상과 상응하는 결과를 보였다(Fig. 13).

IV. 고 찰

Lovastatin이 여러 세포주에서 세포주기의 진행을 차단하고 세포성장을 억제하는 작용은 p21 및 p27과 같은 CKI를 유도하여 G1기 정지를 일으키는 것이 주 기전으로 알려져 있으며, 본 연구에서도 기본적으로는 같은 결과를 확인하였다. 하지만 구체적인 세포주기 조절 단백질들의 발현 변화는 세포주의 종류에 따라 다양한 양상을 보인 바 있으며,^{19,20,26-29} 본 연구에서 대상으로 한 폐 선암 세포주에서도 기존의 보고들과는 일치하지 않는 또 다른 양상이 나타났다. G1기 관련 세포주기 조절단백질에 있어서는 Cdk2의 효소활성도가 감소하였고 p53의 유무에 관계없이 p21은 양적으로 증가하였다. 이러한 결과에서 폐암 세포주는 유방암과는 달리 p53의 유무가 lovastatin에 의한 p21의 유도작용에 별다른 영향이 없다는 것을 알 수 있었다. 유방암 세포주에서는 wild-type p53이 있는 경우에는 그 영향으로 인해 기저 상태부터 p21의 발현이 증가되어 있고 lovastatin 처리 후에도 변화가 없었으나 p53이 결실되거나 돌연변이가 있는 세포주에서는 lovastatin에 의해 p21의 발현이 증가하는 것으로 보고된 바 있다.²⁸ 그리고 p53이 결실된 전립선암 세포주인 PC-3-M에서 p21의 발현이 증가하는 것으로 나타나 이와 상응하는 결과를 보인 바 있다.²⁷ p21과 Cdk와의 상호작용에 있어서는 NCI-H23 세포주에서 Cdk2/p21 복합체의 형성이 증가하였으나 다른 세포주에서는 뚜렷하게 관찰되지 않았다. 또한 유방암 세포주에서는 lovastatin 처리후에 Cdk4가

감소하며 그 결과 p21과 Cdk4의 결합이 감소하여 유리된 p21과 Cdk2와의 결합이 증가되는 현상이 보고된 바 있으나 본 실험에서는 Cdk4의 변화는 나타나지 않았다.²⁸ Gray-Bablin 등¹⁹은 lovastatin에 의한 p21 및 p27의 발현 증가는 전사 수준에서의 증가가 아니고 전사후 조절 즉 번역(translation)의 증가에 의하는 것으로 보고하였으나 본 폐암 세포주에서는 p21 mRNA의 발현 증가가 관찰되어 전사의 향진이 있는 것으로 나타났다. 한편 p27은 lovastatin 처리후에 모든 세포주에서 단백질 자체의 양적 변화는 관찰되지 않았으나 Cdk2와의 결합에 의한 복합체 형성은 p21의 경우보다 더 현저하게 증가하였다. 결론적으로 폐암 세포주에서는 p21은 전사 증가 및 이에 따른 번역의 증가가 뚜렷하게 나타나 양적인 증가가 주요한 변화로 볼 수 있으며, p27은 단백질 자체의 양적 변화보다는 Cdk2와 결합의 증가가 주작용인 것으로 나타났다. 이상과 같이 lovastatin이 CKI를 유도하고 그 결과 Cdk2를 억제하여 G1기 정지를 일으키는 현상은 폐암 세포주를 포함한 거의 모든 세포주에서 공통적으로 나타나는 현상이나 p21과 p27을 유도하는 작용 및 Cdk와의 상호작용의 세부적인 기전과 양상은 다양하게 나타난다는 사실을 알 수 있으며, 그러한 차이를 설명하기 위해서는 더 많은 연구가 필요하다고 할 것이다. Lovastatin이 CKI를 유도하는 기전에 있어서는 lovastatin이 TGF- β 를 유도하고 이것이 다시 p21의 전사를 유도한다는 가설이 있으며, lovastatin에 의한 p21 promoter의 유도에는 pRb 및 전사인자 Sp1의 상호작용이 중요한 역할을 한다는 보고 및 proteasome의 억제작용에 의해 p21 및 p27이 유도된다는 연구 등의 일부 보고가 있었으나 아직 명확한 기전은 밝혀져 있지 않은 상태이다.^{27,28}

Lovastatin은 cholesterol 생합성에 있어서 mevalonate 경로를 억제하는 작용 이외에도 Ras, Rap 및 G 단백질과 같은 여러 가지 신호전달 단백질의 farnesylation 및 geranylgeranylation을 억제하기 때문에 이러한 작용이 세포주기 진행의 저하에 관여할 수 있다.^{36,37} 또한 Ras는 G1-S기의 전환을 촉진하는 작용이 있기 때문에 lovastatin에 의한 Ras의 isoprenylation의 저하 및 이로 인한 불활성화가 G1기 정지의 기전으로 고려될 수 있으나 Ras 형질전환 세포를 이용한 실험의 결과 Ras가 lovastatin 작용의 주요 매개체가 아닌 것으로 나타났고, 또한 lovastatin에 의한 CKI의 유도 작용 또한 Ras 경로와는 별개의 것으로 밝혀진 바 있다.^{23,38} DNA 손상 후에 p53에 의해 p21이 유도되어 G1기 정지가 일어나는 현상은 잘 알려져 있지만 p21의 발현 증가는 p53과는 독립적으로도 나타나며, lovastatin의 경우에도 p53과는 무관하게 유도되는 것으로 보고된 바 있다.^{16,27,28} 그리고 lovastatin에 의한 CKI의 유도는 double thymidine 차단법이나 혈청 결핍 등의 경우와 같이 G1기 정지 현상에 속발하여 나타나는 비특이적이고 이차적인 현상이 아니고 세포주기와는 독립적인 작용임이 밝혀진 바 있다.¹⁹

Lovastatin의 작용에 있어서 주요 역할을 하는 p21이나 p27 등은 주로 G1기 관련 세포주기 조절 단백질들과 상호작용을 하며, 실제로 lovastatin의 작용에 대한 대부분의 보고에서

는 G1기 정지가 나타나는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서도 G1기 정지가 현저하게 나타났고 이와 관련된 세포주기 조절 단백질들의 변화가 관찰되었으나 G2기 정지 현상이 또한 관찰되었다. 그 정도가 G1기 정지만큼 현저하지는 않았고 세포성장 억제를 초래하는 주요 부위는 역시 G1-S기 전환의 차단에 의하는 것으로 생각이 되지만 G2기의 정지 작용도 lovastatin의 작용에 관여를 할 것으로 기대되며, 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것이다. 그리고 G2/M기에 주로 작용하는 cyclin B1과 Cdc2 활성화도 감소 등이 확인되어 이러한 G2기 정지 현상을 설명할 수 있는 충분한 근거가 되는 것으로 사료된다. 즉 cyclin B1의 전사 감소에 의한 발현 저하 및 이에 따른 Cdc2의 활성화도 저하가 G2기 정지를 초래한다는 것이 본 실험에서 확인된 G2기 정지의 기전이다. Lovastatin이 방광암 세포주에서 G1기 정지와 동반하여 G2 정지도 미약하게 일으켰다는 보고가 있었으며, HEK-293 세포주에서 calcitonin 처리 후에 p21의 유도 및 Cdc2 kinase 활성화도 감소가 나타났고 세포주기에 있어서는 G2/M기의 정지가 일어났다는 보고에서 p21과 G2기 관련 세포주기 조절 단백질과의 관련성을 제시한 바 있으나 아직까지는 그러한 관련성이 규명된 바는 없고, 또한 G2기 관련 세포주기 조절 단백질의 발현 변화가 명확하게 뒷받침된 보고는 알려져 있지 않다.^{39,40} 이러한 G2기의 변화 사실이 다른 보고에서 별로 언급이 되지 않았던 것은 세포주에 따른 작용기전 자체의 차이 때문인지 아니면 너무 강력한 G1기 정지작용에 의해 G2/M기의 변화가 차폐된 것인지는 추가적인 연구 및 확인 과정이 필요할 것으로 사료된다.

DNA 손상을 받은 세포에서 p53은 G1기 정지를 일으키고 세포사멸을 유발하는 작용이 잘 알려져 있다. 이러한 p53에 의한 G1기 정지에는 p21의 역할이 필요하지만 세포사멸을 유발하는데는 p21이 관여를 하지 않는 것으로 알려져 있고, 더구나 p21은 여러 가지 원인에 의한 세포사멸을 억제하는 작용이 있는 것으로 보고된 바 있다.⁴¹⁻⁴⁴ 하지만 최근에는 종양세포에서 세포사멸이 일어날 때 여러 가지 세포주기 조절 단백질들이 비전형적으로 활성화되며, p21 또한 세포사멸에 관여하고 조절하는 기능이 있다는 보고가 있다.^{30,45,46} 이러한 현상은 활성화된 caspase-3에 의해 p21이 절단되어 고유의 세포주기 정지의 기능을 잃게 되고 결국 기존의 개념과 반하는 세포사멸의 현상이 일어나는 것으로 설명하고 있다.^{30,31} 실제로 lovastatin의 작용에 대한 연구에서는 뇌 수질아세포종 세포주, 췌장암 세포주 등에서 세포사멸을 유발하는 것으로 보고된 바 있다.^{47,48} 본 연구에서는 NCI-H23 세포주에서 형태상으로 가장 현저한 세포사가 관찰되었고, 세포사멸에 대한 조사결과 DNA 절편이 뚜렷하게 관찰되었으며, lovastatin 처리 후 p21에 대한 Western blot 결과 p21의 절단 현상에 의한 15 kDa 부위의 발현이 관찰되었다. A-549 세포주에서도 lovastatin에 의한 세포사의 형태적 변화가 나타났고 고농도 투여시 세포사멸의 양상이 관찰되었지만 p21의 절단 현상은 뚜렷하지 않았다. Calu-3에서는 세포사멸이 미약하게 나타났고 p21의 절단 현상은 관찰되지 않았다. 이러한 세포주의 종류에 따른 차이에 대한 설명을 위해서는 좀 더 많은 연구가 필요하겠지만 lovastatin에 대한 각 세포주의 고유의 감수성 차이가 관여할 것으로 생각

된다. 결과적으로 lovastatin에 의한 폐암 세포주의 세포사 현상에는 세포사멸이 관여한다는 사실을 알 수 있고 lovastatin이 caspase를 활성화하여 p21을 절단한다는 사실을 추론할 수 있다. Calu-3 세포주에 있어서는 형태적으로도 세포사가 거의 나타나지 않았고 세포주기 변화도 가장 미약하였다. 그리고 p21의 발현도 저농도의 lovastatin 투여 시에 약간의 증가를 보였다가 고농도에서는 발현이 소실되는 양상을 보였고 여러 가지 세포주기 조절 단백질이나 CKI의 발현변화도 다른 세포주와 비교시 상대적으로 미약하고 비전형적인 양상을 보였다. 이러한 세포주에 따른 결과의 차이는 주로 세포주 자체의 특성이나 약제에 대한 감수성의 차이에 기인하는 것으로 사료된다.

결론적으로 본 실험의 결과, lovastatin은 폐암 세포주에서 세포성장의 억제 및 세포주기의 정지를 일으킨다는 사실을 확인하였으며, 이때 세포주기의 변화에 있어서 G1기의 정지가 주요한 과정으로 나타났지만 G2기의 정지도 동반되었으며 이와 상응하는 세포주기 조절단백질의 변화를 확인한 것은 의의 있는 결과로 사료된다. 또한 lovastatin에 의한 폐암 세포주의 세포사에 있어서 세포사멸이 관여한다는 사실을 확인하였으나 세포사멸의 기전에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것이다.

V. 결 론

Lovastatin은 폐암 세포주에서 세포증식의 억제 및 세포사가 일으켰고 이때 세포사에는 세포사멸이 관여하는 것으로 나타났다. 세포주기의 변화에 있어서는 저농도의 lovastatin은 cyclin B1의 전사 향진에 의한 G2기 정지를 일으켰고 고농도의 lovastatin은 CKI의 유도에 의한 강력한 G1기 정지 작용을 유발하였다. 이때 CKI의 변화는 p21의 전사향진에 의한 단백질의 양적인 증가와 Cdk2/p27 복합체 형성의 증가가 주요한 작용으로 나타났다.

참 고 문 헌

1. Peter M, Herskowitz I. Joining the complex: cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell* 1994;79:181-84.
2. Elledge SJ, Harper JW. Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6:847-52.
3. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996;274:1672-77.
4. Nasmyth K. Putting the cell cycle in order. *Science* 1996;274:1643-45.
5. Ewen ME, Sluss HK, Sherr CJ, Matsushime H, Kato J, Livingston DM. Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 1993;73:487-97.
6. Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 1994;79:551-55.
7. Bartek J, Bartkova J, Lukas J. The retinoblastoma protein pathway in cell cycle control and

- cancer. *Exp Cell Res* 1997;237:1-6.
8. Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 1989;246:603-8.
 9. Planas-Silva MD, Weinberg RA. The restriction point and control of cell proliferation. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:768-72.
 10. Fisher RP, Morgan DO. A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* 1994;78:713-24.
 11. Makela TP, Tassan JP, Nigg EA, Frutiger S, Hughes GJ, Weinberg RA. A cyclin associated with the CDK-activating kinase MO15. *Nature* 1994;371:254-57.
 12. Harper JW, Elledge SJ. Cdk inhibitors in development and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 1996;6:56-64.
 13. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993;75:805-16.
 14. Gu Y, Turck CW, Morgan DO. Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20 K regulatory subunit. *Nature* 1993;366:707-10.
 15. Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM, Smith JR. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* 1994;211:90-98.
 16. Dulic V, Kaufmann WK, Wilson SJ, Tlsty TD, Lees E, Harper JW, et al. p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* 1994;76:1013-23.
 17. Sheikh MS, Li XS, Chen JC, Shao ZM, Ordonez JV, Fontana JA. Mechanisms of regulation of WAF1/CIP1 gene expression in human breast carcinoma: role of p53-dependent and independent signal transduction pathways. *Oncogene* 1994;9:3407-15.
 18. Elbendary A, Berchuck A, Davis P, Havrilesky L, Bast RC Jr., Iglehart JD. Transforming growth factor beta 1 can induce CIP1/WAF1 expression independent of the p53 pathway in ovarian cancer cells. *Cell Growth Differ* 1994;5:1301-7.
 19. Gray-Bablin J, Rao S, Keyomarsi K. Lovastatin induction of cyclin-dependent kinase inhibitors in human breast cells occurs in a cell cycle-independent fashion. *Cancer Res* 1997;57:604-9.
 20. Hengst L, Dulic V, Slingerland JM, Lees E, Reed SI. A cell cycle-regulated inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1994;91:5291-95.
 21. Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, et al. p27^{Kip1}, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 1994;8:9-22.
 22. Stein EA, Lazkarzewski P, Steiner P. Lovastatin 5-year safety and efficacy study. Lovastatin Study Groups I through IV. *Arch Intern Med* 1993;153:1079-87.
 23. Keyomarsi K, Conte D Jr, Toyofuku W, Fox MP. Deregulation of cyclin E in breast cancer. *Oncogene* 1995;11:941-50.
 24. Rettersol K, Stugaard M, Gorbitz C, Ose L. Results of intensive long-term treatment of familial

- hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 1996;78:1369-74.
25. Thibault A, Samid D, Tompkins AC, Figg WD, Cooper MR, Hohl RJ, et al. Phase I study of lovastatin, an inhibitor of the mevalonate pathway in patients with cancer. *Clin Cancer Res* 1996;2:483-91.
 26. Hengst L, Reed SI. Translational control of p27^{Kip1} accumulation during the cell cycle. *Science* 1996;271:1861-64.
 27. Lee SJ, Ha MJ, Lee J, Nguyen P, Choi YH, Pirnia F, et al. Inhibition of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase pathway induces p53-independent transcriptional regulation of p21^{WAF1/CIP1} in human prostate carcinoma cells. *J Biol Chem* 1998;273:10618-23.
 28. Rao S, Lowe M, Herliczek TW, Keyomarsi K. Lovastatin mediated G1 arrest in normal and tumor breast cells is through inhibition of CDK2 activity and redistribution of p21 and p27, independent of p53. *Oncogene* 1998;17:2393-402.
 29. Park WH, Lee YY, Kim ES, Seol JG, Jung CW, Lee CC, et al. Lovastatin-induced inhibition of HL-60 cell proliferation via cell cycle arrest and apoptosis. *Anticancer Res* 1999;19:3133-40.
 30. Zhang Y, Fjita N, Tsuruo T. Caspase-mediated cleavage of p21^{Waf1/Cip1} converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene* 1999;18:1131-38.
 31. Chai F, Evdokiou A, Young GP, Zalewski PD. Involvement of p21^{Waf1/Cip1} and its cleavage by DEVD-caspase during apoptosis of colorectal cancer cells induced by butyrate. *Carcinogenesis* 2000;21:7-14.
 32. Bennis F, Favre G, Le Gaillard F, Soula G. Importance of mevalonate-derived products in the control of HMG-CoA reductase activity and growth of human lung adenocarcinoma cell line A549. *Int J Cancer* 1993;55:640-45.
 33. Hawk MA, Cesen KT, Siglin JC, Stoner GD, Ruch RJ. Inhibition of lung tumor cell growth in vitro and mouse lung tumor formation by lovastatin. *Cancer Letters* 1996;109:217-22.
 34. Takahashi T, Carbone D, Takahashi T, Nau MM, Hida T, Linnoila I, et al. Wild-type but not mutant p53 suppresses the growth of human lung cancer cells bearing multiple genetic lesions. *Cancer Res* 1992;52:2340-43.
 35. Pratesi G, Perego P, Polizzi D, Righetti SC, Supino R, Caserini C, et al. A novel charged trinuclear platinum complex effective against cisplatin-resistant tumours: hypersensitivity of p53-mutant human tumour xenografts. *Br J Cancer* 1999;80:1912-9.
 36. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990;343:425-30.
 37. Maltese WA. Posttranslational modification of proteins by isoprenoids in mammalian cells. *FASEB J* 1990;4:3319-28.
 38. DeClue JE, Vass WC, Papageorge AG, Lowy DR, Willumsen BM. Inhibition of cell growth by lovastatin is independent of *ras* function. *Cancer Res* 1991;51:712-17.
 39. Jakisiak M, Bruno S, Skierski JS, Darzynkiewicz Z. Cell cycle-specific effects of lovastatin. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1991;88:3628-32.

40. Evdokiou A, Raggatt LJ, Atkins GJ, Findlay DM. Calcitonin receptor-mediated growth suppression of HEK-293 cells is accompanied by induction of p21WAF1/CIP1 and G2/M arrest. *Mol Endocrinol* 1999;13:1738-50.
41. Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 1995;82:675-84.
42. Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res* 1995;55:5187-90.
43. Polyak K, Waldman T, He TC, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest. *Genes Dev* 1996;10:1945-52.
44. Gorospe M, Cirielli C, Wang X, Seth P, Capogrossi MC, Holbrook NJ. p21 (Waf1/Cip1) protects against p53-mediated apoptosis of human melanoma cells. *Oncogene* 1997;14:929-35.
45. Shi L, Nishioka WK, Th'ng J, Bradbury EM, Litchfield DW, Greenberg AH. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. *Science* 1994;263:1143-45.
46. Fotodar R, Flatt J, Gupta S, Margolis RL, Fitzgerald P, Messier H, et al. Activation-induced T-cell death is cell cycle dependent and regulated by cyclin B. *Mol Cell Biol* 1995;15:932-42.
47. Muler C, Bockhorn AG, Klusmeier S, Kiehl M, Roeder C, Kalthoff H, et al. Lovastatin inhibits proliferation of pancreatic cancer cell lines with mutant as well as with wild-type K-ras oncogene but has different effects on protein phosphorylation and induction of apoptosis. *Int J Oncol* 1998;12:717-23.
48. Macaulay RJ, Wang W, Dimitroulakos J, Becker LE, Yeger H. Lovastatin-induced apoptosis of human medulloblastoma cell lines in vitro. *J Neurooncol* 1999;42:1-11.

Abstract

The effect of lovastatin on growth of lung cancer cell lines

Kwang-Joo Park

*Brain Korea 21 Project for Medical Sciences
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Sung-Kyu Kim)

The cell growth and proliferation are characterized by the progression through the cell cycle which is orderly controlled by the interactions of various cell cycle regulatory proteins. The cyclin and the cyclin-dependent kinase (Cdk) form heterodimeric complexes which activate the cell cycle progression. Cdk inhibitors (CKI) negatively regulate the cell cycle by binding with cyclin/Cdk complexes.

Lovastatin is a potent inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase and has been originally used to treat hypercholesterolemia. It also has the ability to induce G1 arrest in the cell cycle resulting in growth inhibition. Lovastatin is under clinical trial as a potential anticancer and chemopreventive agent. Main mechanism of lovastatin in cell cycle blockage is considered to induce CKI such as p21 and p27 followed by inhibition of cell cycle regulatory proteins. Many studies concerning the effects of lovastatin on the cell growth have shown various results in detailed mechanisms of action, especially in expression of the cell cycle regulatory proteins. The biologic effects of lovastatin on the lung cancer cell lines were studied by evaluating the alterations of cellular morphology, cell cycle and expression of cell cycle regulatory proteins, which revealed following results.

1. After lovastatin treatment, morphological changes with cell death were demonstrated in A549 and NCI-H23 but rarely in Calu-3 cell line.
2. Flow cytometric analysis showed marked increase in the G1 proportion by higher doses of lovastatin and less degree of increase in the G2/M phase by lower doses.
3. Lovastatin treatment increased protein and mRNA levels of p21 regardless of p53 status but p27 showed no significant change. Cdk2 kinase activity was reduced and increased bindings of CKIs, especially p27 with Cdk2 were noted.
4. Protein and mRNA levels of cyclin B1 were decreased with reduced kinase activity of Cdc2.
5. DNA fragmentation was found in all cell lines, especially in NCI-H23 which is

accompanied by appearance of 15 kDa band of p21 cleavage fragment on Western blot analysis using anti-p21 antibody.

These results demonstrate that lovastatin induces growth arrest of lung cancer cell lines in which the process of apoptosis is considered to play a role, and causes cell cycle arrest mainly in G1 phase but less degree of G2 arrest was also found with corresponding alterations of the cell cycle regulatory proteins. Induction of p21 by lovastatin is of transcriptional activation but p27 inhibits Cdk2 activity mainly by increased binding rather than increase of its own expression.

Key Words: lung cancer, cell line, lovastatin, cell growth, cell cycle, cell cycle regulatory protein, apoptosis, p21, p27