

비스테로이드성 소염제(NSAIDs)에 의한  
세포사멸과정에서 Mitogen-activated  
Protein Kinase (MAPK) 활성화의 역할

연세대학교 대학원

의과학사업단

김 태 일

비스테로이드성 소염제(NSAIDs)에 의한  
세포사멸과정에서 Mitogen-activated  
Protein Kinase (MAPK) 활성화의 역할

지도 김 원 호 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2001년 12월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

김 태 일

# 김태일의 박사 학위논문을 인준함

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

연세대학교 대학원

2001년 12월 일

## 감사의 글

작으나마 논문으로 정리된 결과를 보게 되니 먼저 기쁜 마음과 함께 그 동안 도움을 주신 많은 분들이 생각납니다. 항상 새로운 면을 깨우쳐 주시고 용기와 격려를 주신 김원호 교수님과 송시영교수님께 깊은 감사를 드리며, 많은 관심과 조언을 아끼지 않으셨던 노성훈 교수님, 이원재 교수님, 최재원 교수님께 진심으로 감사드립니다. 그리고 항상 많은 격려와 지도로 이끌어 주시는 여러 교수님께도 깊은 감사를 드립니다.

실험 중 부족한 부분을 많이 도와주신 진수현 연구원, 이광형 연구원과 실험실의 연구원 여러분께 진심으로 감사드리며, 항상 의지와 도움이 되어준 친구들에게도 고마움을 전하고 싶습니다.

저에게 항상 믿음과 용기를 주셨던 부모님과 처가 부모님께 감사드리며, 함께 있는 시간이 적어도 항상 웃는 얼굴로 저에게 큰 힘을 주는 준영과 석영에게 고맙고, 늦은 귀가에도 항상 저에게 사랑과 행복을 느끼게 해 주는 아내에게 미안하고 감사한 마음을 전하고 싶습니다.

저 자 씬

# 차 례

국문 요약.....	1
I. 서 론 .....	3
II. 재료 및 방법 .....	5
1. 세포주 및 세포 배양 .....	5
2. 실험약제 .....	5
3. Western blot 분석 .....	6
4. p38 MAPK 활성화 분석 .....	7
5. DNA fragmentation 분석 .....	7
6. Caspase-3 활성화 분석 .....	7
7. Transient transfection과 luciferase 분석 .....	8
8. 면역형광염색 .....	8
9. 통계분석 .....	9
III. 결 과 .....	9
1. 비스테로이드성 소염제에 의한 MAPK의 활성화 .....	9
2. ERK 및 JNK/SAPK 활성화와 indomethacin에 의한 세포사멸과의 관계 .....	11
3. Indomethacin으로 유발된 세포사멸에서 p38 MAPK 억제제에 의한 세포사멸 억제효과 .....	13
4. Indomethacin에 의한 세포사멸 과정에서 p38 MAPK와 caspase-3 활성화의 관계 .....	15
5. Indomethacin에 의한 PPAR $\gamma$ 활성화 및 세포사멸에 대한 p38 MAPK 억제 및 PPAR $\gamma$ 억제의 영향 .....	16
6. Indomethacin에 의한 NF $\kappa$ B 억제에 대한 p38 MAPK 억제 및 PPAR $\gamma$ 억제의 영향 .....	19
IV. 고 찰 .....	19
V. 결 론 .....	24
참고문헌 .....	24
영문요약 .....	34

## 그 립 차 례

그림 1. Indomethacin을 처리한 HT-29 대장암 세포에서 ERK, JNK/SAPK, 그리고 p38 MAPK의 인산화 .....	10
그림 2. Indomethacin에 의한 p38 MAPK 활성화 .....	10
그림 3. Sulindac 또는 nabumetone을 처리한 HT-29 세포에서 p38 MAPK의 인산화 .....	11
그림 4. Indomethacin에 의한 세포사에서 MEK1 억제제 (PD098059)의 영향 .....	11
그림 5. Indomethacin에 의한 DLD-1 세포사멸에서 JNK/SAPK의 영향 .....	12
그림 6. Indomethacin에 의한 HT-29 세포사멸에서 p38 MAPK 억제제(SB203580)에 의한 세포사멸 억제효과 .....	14
그림 7. Indomethacin에 의한 HT-29 세포사멸과정에서 caspase-3 활성화에 대한 p38 MAPK 억제제의 효과.....	15
그림 8. Indomethacin에 의한 p38 MAPK 활성화에 caspase 억제제의 효과 .....	15
그림 9. Indomethacin의 PPAR $\gamma$ ligand로서의 작용과 p38 MAPK 활성화와의 관계 .....	17
그림 10. Indomethacin의 NF $\kappa$ B 억제작용과 p38 MAPK 또는 PPAR $\gamma$ 활성화와의 관계 .....	18
그림 11. Indomethacin에 의한 HT-29 세포주의 세포사멸에서 p38 MAPK, NF $\kappa$ B 및 PPAR $\gamma$ 의 역할과 상호관계.....	23

## 국문요약

### 비스테로이드성 소염제(NSAIDs)에 의한 세포사멸과정에서 Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) 활성화의 역할

비스테로이드성 소염제에 의한 항암효과의 기전은 아직 알려지지 않은 부분이 많으며, 이러한 기전 중의 하나로 세포사멸 유발이 보고되어왔다. 본 연구는 세포 증식과 사멸과정의 중요한 매개체 중의 하나로 알려져 있는 mitogen-activated protein kinase (MAPK)가 비스테로이드성 소염제에 의한 대장암 세포의 사멸과정에서 어떠한 역할을 하는지 규명하고, 세포사멸에 의미있는 MAPK 활성화와 가능성 있는 관련 신호전달 경로로서 nuclear factor kappa B (NFκB) 및 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR $\gamma$ )의 연관성을 알아보려고 하였다. 대장암 세포주인 HT-29에 indomethacin을 농도 및 시간별로 처리한 후 trypan blue dye exclusion 방법으로 세포사를 측정하였고, 세포사멸은 agarose gel 전기영동상의 DNA 분절로 확인하였다. MAPK 활성화는 MAPK에 대한 인산화 특이항체를 이용한 Western blot으로 측정하였고, extracellular signal-regulated kinase (ERK)와 p38 MAPK의 억제제를 위하여 각각 PD098059와 SB203580을 사용하여 이에 의한 세포사멸의 변화를 관찰하였으며, 이 과정에서 caspase-3 활성의 변화도 측정하였다. Hemagglutinin (HA)이 표식된 c-Jun N-terminal kinase (JNK) 발현 plasmid와 JNK dominant negative plasmid를 transfection시킨 후 fluorescein isothiocyanate (FITC)가 표식된 HA에 대한 항체와 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)를 이용한 면역형광염색법으로 JNK가 과발현 또는 억제된 세포에서의 핵모양을 관찰하여 세포사멸에 대한 JNK의 역할을 알아보았다. 그리고 NFκB 결합 부위를 가진 luciferase reporter 또는 PPRE3-tk-luciferase reporter plasmid를 transfection시킨 후 indomethacin, SB203580 그리고 PPAR $\gamma$ 길항제(BADGE)에 의한 전사 활성화의 변화를 luciferase assay로 분석하였다. 이상의 방법으로 다음의 결과를 얻었다.

1. HT-29 세포주에 indomethacin (0.1~1 mM)을 처리하였을 때 세포사멸 소견과 함께 시간별, 농도별로 ERK, JNK/SAPK, 그리고 p38 MAPK의 지속적인 활성화 소견이 관찰되었다.

2. p38 MAPK 억제제(SB203580)를 전처리 한 경우 indomethacin에 의한 세포사가 43% 감소하였으며, agarose gel 전기영동상의 DNA 분절소견도

유사한 정도로 감소하였다. 그러나 MAPK/ERK kinase 1 (MEK1) 억제제 (PD098059)의 전처치는 indomethacin에 의한 세포사멸에 영향을 주지 못하였고, JNK 발현 plasmid와 JNK dominant negative plasmid의 transfection에 의한 JNK 과발현과 억제도 세포사멸과정에 영향을 주지 못하였다.

3. Indomethacin을 처리한 HT-29 세포에서 p38 MAPK 억제제 (SB203580)의 전처치는 caspase-3 활성화를 억제하지 못하였으며, 반대로 caspase 억제제(Ac-DEVD-CHO, Ac-YVAD-CHO, Z-VAD-FMK)의 전처치도 p38 MAPK 활성화에 영향을 주지 못하였다. 이로서 p38 MAPK 활성화와 caspase-3 활성화는 상호 유의한 연관관계가 없음을 확인하였다.

4. Tumor necrosis factor $\alpha$  (TNF $\alpha$ )에 의해 활성화된 NF $\kappa$ B 매개 유전자 발현이 indomethacin에 의해 억제되었으나 p38 MAPK 억제제 (SB203580) 또는 PPAR $\gamma$ 길항제(BADGE)는 indomethacin의 NF $\kappa$ B 억제 작용에 영향을 주지 못하였다.

5. Indomethacin은 PPAR $\gamma$ 매개 유전자 발현을 증가시켰으나 p38 MAPK 억제제(SB203580) 전처치의 의미있는 영향이 없었으며, indomethacin에 의한 세포사멸에서도 PPAR $\gamma$ 길항제(BADGE)의 세포사멸 억제효과는 없었다.

이상의 결과를 요약하면, indomethacin은 대장암세포주 HT-29에서 3가지 MAPK (ERK, JNK/SAPK, p38 MAPK)를 모두 활성화시켰다. 이 중에서 p38 MAPK 활성화는 indomethacin에 의한 세포사멸과정에서 부분적이지만 중요한 역할을 하며, caspase 활성화 경로와는 독립적으로 작용할 것으로 생각된다. 이러한 p38 MAPK의 활성화는 indomethacin에 의한 NF $\kappa$ B 억제 작용이나 PPAR $\gamma$ 활성화 작용과 의미있는 연관관계는 없었다.

---

핵심되는 말: 비스테로이드성 소염제, mitogen-activated protein kinase (MAPK), 세포사멸



# 비스테로이드성 소염제(NSAIDs)에 의한 세포사멸과정에서 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 활성화의 역할

<지도 김 원 호 교수>

연세대학교 대학원 의과학사업단

김 태 일

## I. 서 론

비스테로이드성 소염제는 대장의 선종이나 대장암의 발생을 감소시키며,<sup>1-3</sup> 역학 및 임상연구와 동물 실험에서 대장의 암화과정을 억제한다고 알려져 있다.<sup>4-6</sup> 비스테로이드성 소염제에 의한 항암효과의 기전에 대해서는 아직 알려지지 않은 부분이 많으나, 지금까지의 여러 보고에서 세포사멸 유발이 비스테로이드성 소염제에 의한 항암효과의 중요 기전중의 하나로 알려져 있으며,<sup>7-10</sup> 그 분자생물학적 기전에 대해 여러 논문이 발표되어 왔다. Cyclooxygenase (COX) 억제와 관련된 기전으로는 ceramide 신호전달계의 활성화,<sup>11</sup> prostaglandin 생성 변화,<sup>12</sup> 신생혈관생성 억제<sup>13</sup> 등이 보고되었고, COX 억제와는 독립적인 기전으로 nuclear factor kappa B (NFκB) 억제,<sup>14</sup> peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) δ 억제,<sup>15</sup> 신생혈관생성 억제<sup>16</sup> 등이 보고되어 왔다. 이외에도 caspase-3 활성화,<sup>17,18</sup> 섬유아세포에서 p38 MAPK의 활성화<sup>19,20</sup> 세포주기 억제<sup>21-23,24</sup> 등 비스테로이드성 소염제에 의한 세포증식 억제와 세포사멸의 기전에 관한 여러 보고가 있다. 그러나 이러한 연구들은 단편적으로 보고되어 왔고 각각의 상호관계 및 구체적인 단계에서는 아직 알려지지 않은 부분이 많다.

Mitogen-activated protein kinase (MAPK)는 다양한 외부자극에 대한 세포 반응의 매개체로서 중요한 기능을 하는 serine-threonine kinase이며, 포유류 세포에서 구조적으로 관련이 있는 MAPK의 3가지 종류로서 extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase /stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) 그리고 p38 MAPK가 알려져

있다. 이런 MAPK는 기질의 proline 부위 옆에 위치한 serine과 threonine 부위를 인산화 시키며, MAPK kinase나 MAPK kinase kinase 같은 상위의 dual-specificity kinase에 의한 threonine과 tyrosine 부위의 인산화에 의해 활성화된다. ERK는 특징적으로 다양한 성장인자에 의해 활성화되어 세포증식, 분화 그리고 세포사멸 억제 등을 유도하는 것으로 알려져 있고, JNK/SAPK와 p38 MAPK는 자외선 조사, 열 충격, 고삼투압, 화학요법제, 염증성 사이토카인 등의 다양한 세포 스트레스에 의해 활성화되며 성장억제와 세포사멸 유발 등과 관련되어 있다.<sup>25-28</sup> ERK, JNK/SAPK, p38 MAPK의 많은 기능이 알려져 있지만, 각각에 대한 활성화 자극의 기능에 대한 특이성이 절대적인 것은 아니다. 즉 3가지 MAPK의 기능에 있어서 일부에서 뚜렷이 구분되지 않고, JNK/SAPK 활성화의 경우 세포사멸과도 관련이 있지만 증식, 분화 등의 역할에도 관여하므로 동일 MAPK도 세포와 상황에 따라 상반된 기능을 보일 수 있다. 따라서 다양한 세포의 고유기능 및 자극 종류, 그리고 여러 가지 다른 경로와의 상호관계 등이 밀접하게 관계하므로 모든 세포 및 자극에 대해 그 기능을 일반화시키기는 어렵다.<sup>29</sup> 여러 보고에서 다양한 자극에 의한 세포사멸 유발시 JNK/SAPK 또는 p38 MAPK 활성화가 언급되어 왔으나 비스테로이드성 소염제에 의한 대장암세포주의 세포사멸에서 각 MAPK의 역할은 아직 알려지지 않은 부분이 많다.

NFκB 경로는 cytokine, 세균 및 바이러스 감염, 스트레스 등의 여러 자극에 대한 세포 반응을 조절하며,<sup>30,31</sup> 세포사멸 억제 등의 세포성장 조절에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>32-36</sup> Tumor necrosis factor α (TNFα), interleukin-1 (IL-1), lipopolysaccharide 등의 자극은 NFκB inducing kinase (NIK)와 MAPK/ERK kinase kinase 1 (MEKK1) 같은 상위 kinase 활성화를 통해 IκB kinase (IKKα, IKKβ)를 활성화시키며 IκB가 인산화되면서 분해되고, IκB에 결합되어 억제되었던 NFκB가 핵내로 이동하게 되어 consensus DNA element에 결합하게 됨으로써 유전자 발현을 활성화시키게 된다.<sup>37,38</sup> 이렇게 활성화된 NFκB는 염증반응이나 세포증식에 관여하며, aspirin, sodium salicylate, sulindac 등의 여러 비스테로이드성 소염제에 의해 억제되므로 이들 약제의 항염증작용과 중앙억제효과에 관여할 것으로 알려져 있다.<sup>14,39,40</sup>

Peroxisome proliferator-activated receptorγ (PPARγ)는 ligand 결합에 의해 유전자발현이 조절되는 핵내 호르몬 수용체군의 한 종류이다.

Prostaglandin (PG) J<sub>2</sub>, thiazolidinedione 등의 PPAR $\gamma$  ligand가 retinoid X 수용체와 heterodimer를 이루며 PPAR response element (PPRE)에 결합함으로써 유전자 발현을 활성화시킨다.<sup>41,42</sup> PPAR $\gamma$ 의 활성화는 activator protein-1 (AP-1)과 NF $\kappa$ B 매개 유전자의 발현을 억제하고,<sup>43-46</sup> 포도당 homeostasis,<sup>47</sup> 세포분화,<sup>48,49</sup> 세포사멸<sup>50-52</sup> 그리고 항염증 반응에 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>43,44,53</sup> 현재 일부 PPAR $\gamma$  ligand는 2형 당뇨병의 치료제로 이용되고 있으며, 항염증작용과<sup>43,44,53</sup> 종양억제효과에<sup>48-51,54-58</sup> 대한 여러 실험적 보고가 있다.

최근 몇 보고에 의하면 NF $\kappa$ B 억제 또는 PPAR $\gamma$ 활성화가 COX-2 발현 억제와 연관성이 있다고 알려져 있으며,<sup>59,60</sup> 일부 비스테로이드성 소염제는 NF $\kappa$ B 억제와 PPAR $\gamma$  ligand로서 PPAR $\gamma$ 활성화에 관여함이 보고되어 있으므로 NF $\kappa$ B와 PPAR $\gamma$ 는 비스테로이드성 소염제에 의한 항염증 및 종양억제효과의 중요한 매개체로서 작용할 것으로 생각된다.

본 연구자는 비스테로이드성 소염제에 의한 세포사멸과정에서 각 MAPK 활성화의 역할을 알아보고, 세포사멸에 의미있는 MAPK 활성화와 다른 가능성 있는 관련 신호전달경로로서 NF $\kappa$ B 및 PPAR $\gamma$ 의 연관성을 밝힘으로써 비스테로이드성 소염제의 세포사멸 유발 기전에서 MAPK의 구체적인 역할을 알아보고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 세포주 및 세포 배양

인체에서 기원한 대장 선암세포주인 HT-29 세포주(ATCC HTB38)과 DLD-1세포주(ATCC CCL-221)를 ATCC(Rockville, MD., USA)로 부터 분양받아 100 IU/ml penicillin, 100 $\mu$ g/ml streptomycin 및 10% 열 비활성화 우태아혈청이 포함된 RPMI-1640 배지(pH 7.4)(Gibco-BRL, Gaithersburg, MD., USA)로 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양하였다.

### 2. 실험약제 (비스테로이드성 소염제, MAPK 특이억제제, caspase 억제제, PPAR $\gamma$ 길항제)

HT-29 세포에 비스테로이드성 소염제로서 indomethacin (Sigma, St. Louis, MO., USA), sulindac (Sigma), 또는 nabumetone (한독, 서울, 대한민국

국)을 처리하였다. 그리고 여러 중간 매개체의 억제효과를 보기위해 indomethacin 처리 전, 전처치에 사용된 약제로서 p38 kinase 억제제, SB203580 (Calbiochem, La Jolla, CA, USA), MEK1 억제제, PD098059 (Calbiochem), PPAR $\gamma$  길항제, bisphenol A diglycidyl ether (BADGE)<sup>61</sup>(Fluka, Milwaukee, WI, USA) 그리고 caspase-3 억제제로서 Ac-DEVD-CHO, Ac-YVAD-CHO와 Z-VAD-FMK (Calbiochem)를 이용하였다. Indomethacin에 의한 NF $\kappa$ B 활성화 억제를 보기위해 NF $\kappa$ B 활성화 유발을 위해 전처치로서 TNF $\alpha$  (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)를 처리하였다. 그리고 PPAR $\gamma$ ligand로서 15-deoxy- $\Delta$ <sup>12,14</sup>prostaglandin J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) (BIOMOL, Plymouth Meeting, PA, USA)를 이용하였다.

### 3. Western blot 분석

MAP kinase 활성화 분석을 위하여 대장암세포주인 HT-29 세포에 indomethacin을 시간 및 농도별로 처리 후 세포를 수거하였다. 수거된 세포는 50 mM Tris (pH 7.4), 1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 25  $\mu$ g/mL leupeptin, 20  $\mu$ g/mL pepstatin이 함유된 용해완충액에서 용해시켜 얼음에서 30분 동안 반응한 후, 12,000 rpm 에서 20분간 원심 분리하여 상층액만을 취하였다. 추출된 단백질을 100 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열한 후 10% SDS가 포함된 polyacrylamide gel에서 전기영동하고, polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)에 단백질을 이동시켰다. 그 후 membrane을 5% 탈지분유가 함유된 TBST [10 mM Tris (pH7.4), 100 mM NaCl, 0.5 % Tween 20]로 30분간 차단하고 1:1000으로 희석된 1차 항체(phospho-specific 또는 non-phospho-specific MAP kinase 항체)를 1시간동안 표적시킨 후 TBST로 3회 세척하여 결합되지 않은 항체를 제거하였다. HRP가 결합된 2차 항체[HRP-conjugated anti-rabbit IgG (Amersham LifeScience, Arlington Heights, IL, USA)]를 1:2000으로 희석하여 membrane에 1시간 동안 반응시킨 후 TBST로10분간 3회 세척하여 결합되지 않은 항체를 제거하였다. Peroxidase 기질이 함유된 enhanced chemiluminescence (ECL)용액을 처리한 후 X-ray필름에 감광하여 분석하였다. 1차 항체로는 ERK, JNK/SAPK, p38 MAPK 각각에 대한 phospho-specific MAPK 항체(New England Biolabs, Beverly, MA, USA)와 non-phospho-specific MAPK 항

체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 이용하였다.

#### 4. p38 MAPK 활성 분석 (*in vitro* kinase assay)

p38 MAPK assay kit (New England Biolabs)를 이용하여 분석하였다. 제품설명서에 따라 indomethacin을 처리한 HT-29 세포를 용해시킨 후 인산화된 p38 MAPK를 면역침전(immunoprecipitation) 시켰다. 그 후 *in vitro* kinase 반응으로서 activating transcription factor-2 (ATF-2) 인산화 반응을 거친 후 반응혼합물을 SDS polyacrylamide gel에서 전기영동으로 분리하고, membrane에 이동시킨 후 phospho-ATF-2 항체를 이용하여 표지하고 ECL 발색에 의해 ATF-2 인산화정도를 측정하였다.

#### 5. DNA fragmentation 분석

HT-29 세포의 세포사멸은 agarose gel electrophoresis법에 의한 DNA 분절을 확인하여 평가하였다. 세포를 10 mM Tris (pH 7.6), 10 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0.2% SDS 및 200 µg/mL proteinase K로 구성된 용해완충액으로 42°C에서 서서히 흔들면서 밤새 용해 시킨 후 4°C, 16,000 g에서 20분간 원심분리하여 취한 상층액으로 부터 phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1, Sigma)를 이용하여 저분자량 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA를 0.3 M sodium acetate를 함유하는 ethanol로 침전 시킨 후 원심분리하여 핵산 침사를 얻었다. 핵산 침사를 100 µg/ml RNase A (Sigma)를 첨가한 TE 완충액 [10 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 8.0)]에 녹여 37°C에서 30 분간 반응시켜 RNA를 제거하고, 2 % agarose gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 관찰하였다. 세포생존과 세포사(cell death)는 trypan blue dye exclusion에 의해서 평가하였다.

#### 6. Caspase-3 활성 분석

HT-29 대장암세포주에 indomethacin을 단독 또는 여러 억제제의 전처리와 함께 처리하였다. 수거된 세포는 10 mM Tris (pH 7.5), 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.5), 130 mM NaCl, 1% Triton X-100, 그리고 10 mM NaPPi가 함유된 용해완충액에서 용해시켜 얼음에서 30분 동안 반응한 후, 12,000 rpm 에서 10분간 원심분리하여 상층액만을 취하여 caspase-3 활성 분석에 사용하였다. Caspase 활성은 300 µg의 용해액내

단백질을 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 fluorogenic peptide 기질인, Ac-DEVD-AMC와 37°C에서 1시간 반응시킨 후 최종 500  $\mu\text{l}$ 가 되도록 phosphate-buffered saline (PBS)을 첨가하였다. 유리되어 나오는 AMC의 양을 spectrofluorometer (SPF-500CTM, SLM Instruments Inc., Urbana, IL, USA)를 이용하여 380 nm에서의 excitation, 450 nm에서의 emission으로 측정하였다.

## 7. Transient transfection과 luciferase 분석

PPAR $\gamma$ 와 NF $\kappa$ B에 의한 전사활성화를 보기 위해 PPRE3-tk-luciferase 또는 NF $\kappa$ B 결합부위를 가진 luciferase reporter plasmid를 이용하였고, JNK/SAPK 발현과 억제를 위해 JNK 발현 plasmid인 pcDNA3-HA-JNK와 JNK의 dominant negative plasmid인 pSR2-HA-JNK(DN)를 이용하였다. Transfection 효율 대조를 위해 pCMV- $\beta$ -gal을 같이 transfection하였으며, JNK/SAPK 활성화에 대한 대조 plasmid로 pcDNA3를 이용하였다. JNK/SAPK 활성화에 의한 전사활성화와 dominant negative JNK plasmid transfection에 의한 억제효과를 확인하기 위해 PathDetect c-Jun *trans*-Reporting System (Stratagene, La Jolla, CA, USA)를 이용하여 pFR-Luc plasmid와 pFA2-cJun plasmid를 같이 transfection시켰다.

HT-29 또는 DLD-1 세포가 6 well 세포배양 plate에 50 % 정도 차면 LipofectAMINE PLUS (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 설명서에 따라 plasmid DNA 0.7  $\mu\text{g}$ 과 pCMV- $\beta$ -gal 0.2  $\mu\text{g}$ 을 같이 transfection하였다. PathDetect c-Jun *trans*-Reporting System에서는 pcDNA3-HA-JNK 또는 pSR2-HA-JNK(DN)를 0.7  $\mu\text{g}$  그리고 pFR-Luc plasmid와 pFA2-cJun plasmid는 각각 0.7  $\mu\text{g}$ 과 30 ng을 pCMV- $\beta$ -gal 0.15  $\mu\text{g}$ 과 같이 transfection하였다. Transfection 5시간 후 새로운 배지로 바꾸어 주고, 24-36 시간 후 필요한 약제를 처리하고 luciferase (Luciferase assay system, Promega, Madison, WI, USA)와  $\beta$ -galactosidase의 활성을 측정하였다. 모든 luciferase 활성결과는  $\beta$ -galactosidase 활성결과로 나누어 보정하였다.

## 8. 면역형광염색

우선 chamber slide에 배양한 DLD-1 대장암세포에 대조 plasmid로 pcDNA3, JNK 발현 plasmid로서 pcDNA3-HA-JNK, 그리고 dominant

negative JNK plasmid로서 pSR2-HA-JNK(DN)를 transfection시켰다. 그 후 24-36시간에 indomethacin (800  $\mu$ M)을 pcDNA3 또는 pSR2-HA-JNK(DN)가 transfection된 well에 12-24 시간 처리하였다. 배지를 제거하고 PBS에 희석한 3.7% formaldehyde 용액에 10분간 고정하고, PBS에 희석한 0.1% Nonidet P-40 용액에 1분간 둔 후 PBS로 세척하고, PBS에 1:100으로 희석된 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-HA 마우스 단클론 항체(Santa Cruz Biotech)에 상온에서 30분간 반응시켰다. 그 후 PBS에 희석된 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (Sigma)를 첨가하여 5분간 염색한 후 PBS로 2분씩 3회 세척하였다. 그리고 형광현미경을 이용하여 pcDNA3-HA-JNK 또는 pSR2-HA-JNK(DN)이 발현되는 세포를 FITC에 의한 초록색 형광으로 확인하고 이 세포에서 DAPI에 염색된 핵의 모양을 주위의 transfection이 안된 세포와 비교하여 JNK가 과발현 또는 억제된 세포에서 indomethacin에 의한 세포사멸의 변화를 관찰하였다.

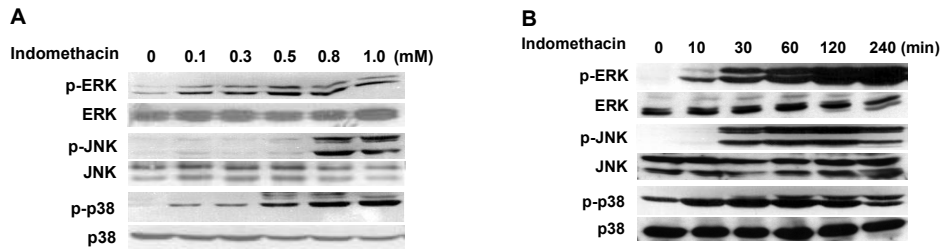
## 9. 통계 분석

모든 통계 내용은 3회 이상의 독립적인 실험에 의한 평균  $\pm$  표준편차로 나타냈으며, Mann-Whitney U test를 이용하여 두 그룹간의 통계적 차이를 검증하였다. 통계적 유의성은  $p < 0.05$ 로 정의하였다.

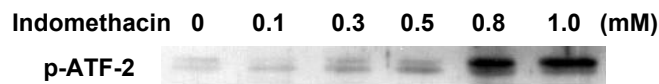
## III. 결 과

### 1. 비스테로이드성 소염제에 의한 ERK, JNK/SAPK 및 p38 MAPK의 활성화

MAPK가 비스테로이드성 소염제에 의한 세포사멸 과정에 관여하는 지를 알기위하여 우선 ERK, JNK/SAPK, p38 MAPK에 대한 인산화 특이 항체를 이용한 Western blot으로 비스테로이드성 소염제를 처리한 HT-29 대장암 세포주에서 3가지MAPK의 활성화 여부를 관찰하였다. 대조군의 세포에서는 인산화된 MAPK 활성이 매우 적게 보이거나 관찰되지 않았으며, indomethacin 0.1 mM을 처리했을 때 3가지 MAPK 모두에서 인산화된 MAPK가 관찰되었고 처리농도를 증가시킴에 따라 각 MAPK의 활성화도



**그림 1.** Indomethacin을 처리한 HT-29 대장암 세포에서 ERK, JNK/SAPK, 그리고 p38 MAPK의 인산화. **A.** HT-29 세포를 여러 농도의 indomethacin (0.1-1.0 mM)으로 1 시간 처리한 후 세포를 용해시켜 ERK, JNK/SAPK, p38 MAPK에 대한 인산화 특이 항체(상단)와 인산화에 관계없이 각 MAPK를 인식하는 대조 항체(하단)를 이용하여 Western blot을 시행하였다. **B.** 동일한 indomethacin 농도(1 mM)를 HT-29 세포에 처리한 후 시간별로 세포를 수거하여 동일한 방법으로 Western blot을 시행하였다.

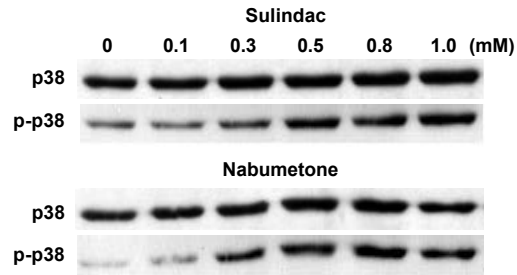


**그림 2.** Indomethacin에 의한 p38 MAPK 활성화. HT-29 세포에 여러 농도의 indomethacin (0-1.0 mM)을 1시간 처리한 후 세포를 용해시켜 인산화된 p38 MAPK를 면역침전 시켰다. 그 후 ATF-2 fusion protein을 기질로 이용하여 *in vitro* kinase assay를 시행하였다.

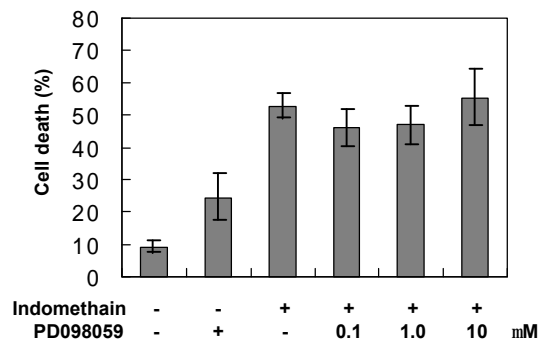
증가하였다(그림 1A). Indomethacin에 의한 MAPK 활성화는 처리 후 10분 경부터 관찰되어 최소 240분까지 활성화된 형태로 유지되었다(그림 1B). ATF-2를 기질로 이용한 *in vitro* kinase assay 방법으로 p38 MAPK 활성화를 재확인할 수 있었으며, Western blot 결과와 유사하게 indomethacin 처리 농도 증가에 따라 ATF-2의 인산화 증가를 관찰하였다(그림 2).

p38 MAPK 활성화과정이 indomethacin 처리에만 특이한 소견인지를 확인하기 위하여 비선택적 COX 억제제인 sulindac과 선택적 COX-2억제제인 nabumetone과 같은 다른 비스테로이드성 소염제를 처리하고 HT-29 세포에서 p38 MAPK의 활성화를 알아보았다. Sulindac과 nabumetone 모두에서 처리농도의 증가에 따라 p38 MAPK의 전체 양에는 변화 없이 인산화된 p38





**그림 3.** Sulindac 또는 nabumetone을 처리한 HT-29 세포에서 p38 MAPK의 인산화. 농도별 약제 처리 1시간 후 세포를 용해시켜 p38 MAPK에 대한 인산화 특이 항체(하단)와 인산화에 관계없이 p38 MAPK를 인식하는 대조 항체(상단)를 이용하여 Western blot을 시행하였다.

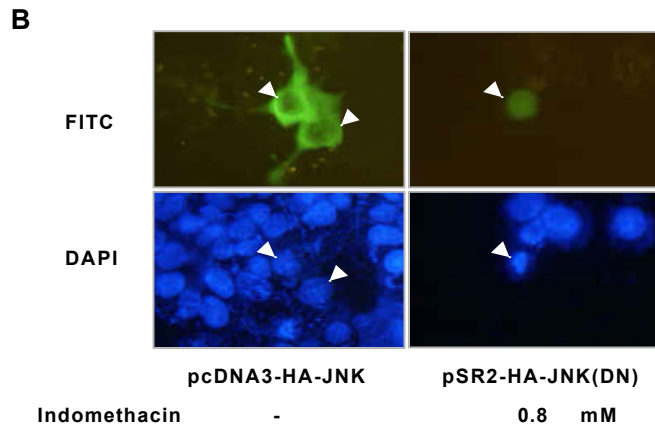
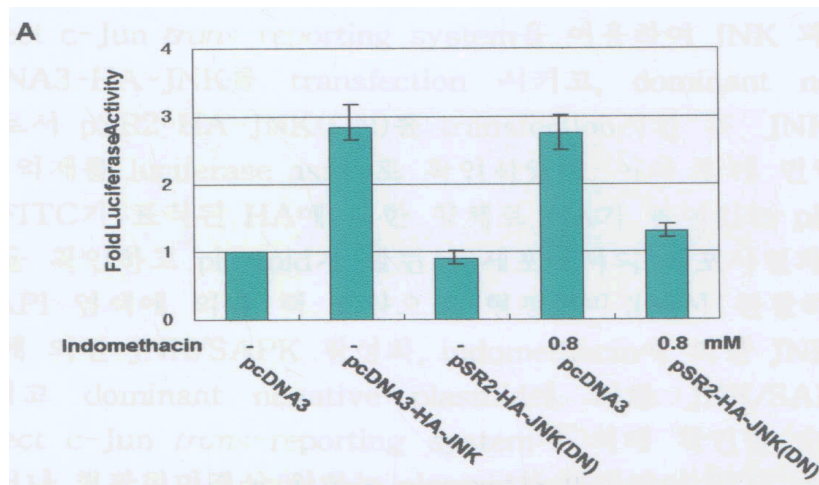


**그림 4.** Indomethacin에 의한 세포사멸에서 MEK1 억제제(PD098059)의 영향. HT-29 세포에 0.8 mM indomethacin을 24시간 처리한 후 세포사멸 비율을 trypan blue dye exclusion 방법으로 평가하였다. 이 때 indomethacin 처리 30 분전 PD098059를 농도별로 처리하여 세포사멸에 미치는 영향을 평가하였다.

MAPK의 양을 증가시킴으로서 indomethacin 처리에서와 유사한 p38 MAPK의 활성화를 관찰할 수 있었다(그림 3).

## 2. ERK 및 JNK/SAPK 활성화와 indomethacin에 의한 세포사멸과의 관계

Indomethacin에 의한 대장암 세포사멸에서 ERK활성화의 역할을 알아보기 위해 MEK1 억제제인 PD098059를 전처리하였으나 세포사멸에 대한 의미

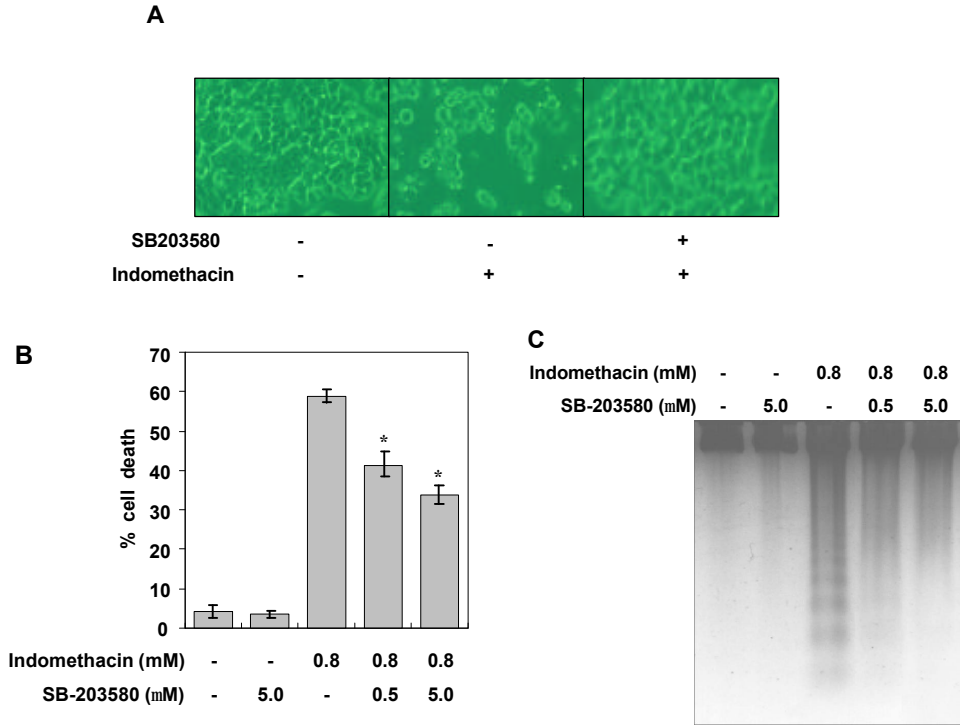


**그림 5.** Indomethacin에 의한 DLD-1 세포사멸에서 JNK/SAPK의 영향. **A.** DLD-1 세포가 6 well 세포배양 plate에 50 % 정도 차면 LipofectAMINE PLUS를 이용하여 transfection하였다. PathDetect c-Jun *trans*-reporting system을 이용하여 pFR-Luc plasmid, pFA2-cJun plasmid, pCMV- $\beta$ -gal plasmid를 각각 0.7  $\mu$ g, 30 ng, 150 ng 을 공통적으로 transfection하고, pcDNA3, pcDNA3-HA-JNK 또는 pSR2-HA-JNK(DN)를 0.7  $\mu$ g 씩 추가하여 같이 transfection 시켰다. Transfection 5시간 후 새로운 배지로 바꾸어 주고, 24-36 시간 후 indomethacin (0.8 mM)을 2시간 처리하고 세포를 수거하여 luciferase와  $\beta$ -galactosidase 활성을 측정하였다. **B.** DLD-1 세포에 pcDNA3-HA-JNK(왼쪽) 또는 pSR2-HA-JNK(DN)(오른쪽)를 각각 transfection시키고 24-36시간 후 pSR2-HA-JNK(DN)을 transfection시킨 well에 indomethacin (800  $\mu$ M)을 12-24 시간 처리하였다. FITC-conjugated anti-HA 마우스 단클론 항체와 DAPI로 염색하여 transfection된 plasmid가 발현된 세포(초록색)와 transfection이 안된 세포에서 핵모양(파란색)을 형광현미경으로 비교관찰하였다(x 400).

있는 영향은 없었다(그림 4). JNK/SAPK 활성화의 역할을 알아보기 위해 PathDetect c-Jun *trans*-reporting system을 이용하여 JNK 과발현 plasmid로 pcDNA3-HA-JNK를 transfection 시키고, dominant negative JNK plasmid로서 pSR2-HA-JNK(DN)를 transfection시킨 후 JNK/SAPK의 활성화 및 억제를 luciferase assay로 확인하였다. 이와 함께 면역형광법을 이용하여 FITC가 표식된 HA에 대한 항체로 HA가 붙어있는 plasmid의 세포 내 발현을 확인하고 plasmid가 발현된 세포에서의 세포사멸과 세포사멸 억제제를 DAPI 염색에 의한 핵 모양으로 형광현미경에서 관찰하였다. 과발현 plasmid에 의한 JNK/SAPK 활성화, indomethacin에 의한 JNK/SAPK 활성화, 그리고 dominant negative plasmid에 의한 JNK/SAPK의 억제를 PathDetect c-Jun *trans*-reporting system에 의해 확인할 수 있었다(그림 5A). 그러나 형광현미경상 원하는 plasmid가 발현되어 FITC 형광이 있는 세포와 주위의 발현이 안된 세포간에 DAPI 염색으로 관찰한 세포 핵의 모양에는 차이가 없었다(그림 5B). 즉 transfection에 의해 유발된 JNK 활성화에 의한 세포사멸유발은 없었으며, dominant negative JNK plasmid transfection에 의한 JNK 억제도 indomethacin에 의한 세포사멸에 영향을 미치지 못하였다. 따라서 indomethacin에 의한 세포사멸과정에 ERK나 JNK/SAPK 활성화는 직접적인 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.

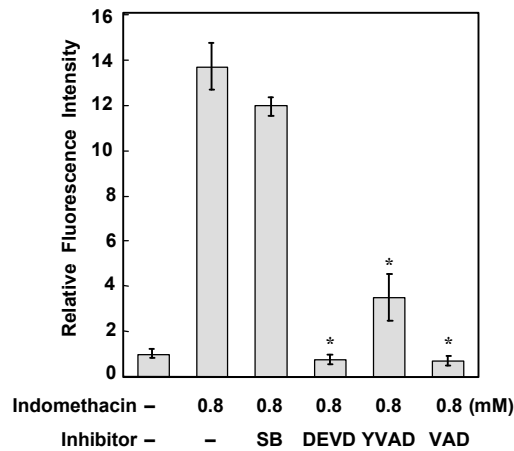
### 3. Indomethacin으로 유발된 세포사멸에서 p38 MAPK 억제제(SB203580)에 의한 세포사멸 억제효과

p38 MAPK 활성화 과정이 비스테로이드성 소염제에 의한 세포사멸에 필요한 과정인지를 알아보기 위하여 p38 MAPK의 특이억제제인 SB203580이<sup>62</sup> indomethacin에 의한 세포사멸 과정에 영향을 주는 지를 관찰하였다. 우선 indomethacin 단독처리에 비해 SB203580을 전처리할 경우 위상차현미경상 육안적으로 세포사멸이 줄어들음을 관찰하였다(그림 6A). Indomethacin을 처리한 HT-29 세포에서 SB203580 0.5  $\mu$ M과 5  $\mu$ M을 전처리하면 전처리 농도의 증가에 따라 trypan blue dye exclusion 방법으로 평가한 세포사 비율이 각각 30 %와 43 % 씩 감소하였다(그림 6B). 이러한 소견은 SB203580 전처리 농도의 증가에 따른 DNA 분절 현상의 감소와 일치하였다(그림 6C). 이 결과로 p38 MAPK의 특이 억제제가 indomethacin에 의한 세포사멸을 의미 있게 억제함을 알 수 있으나 이런 세포사멸 억제효과는 부분적 억제 효과로

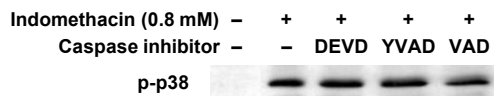


**그림 6.** Indomethacin에 의한 HT-29 세포사멸에서 p38 MAPK 억제제(SB203580)에 의한 세포사멸 억제효과. **A.** HT-29 세포에 SB203580 (5  $\mu$ M)을 30분간 전처리하거나 하지 않은 상태로 0.4 mM indomethacin을 처리하고 36 시간 배양 후 위상차현미경으로 세포모양을 관찰하였다(x 100). **B.** HT-29 세포에 SB203580 (0.5  $\mu$ M 또는 5.0  $\mu$ M)을 30 분간 전처리하고 24 시간동안 0.8 mM indomethacin을 처리하고 배양하였다. 그리고 세포사멸을 trypan blue dye exclusion 방법으로 측정하였다(\*  $p < 0.05$ , indomethacin을 단독처리한 HT-29 세포와 비교). **C.** B와 동일한 방법으로 HT-29 세포를 처리한 후 agarose gel 전기영동으로 DNA 분절화의 변화를 관찰하였다.

만 나타났다. 그림 6 에서 보다 더 높은 농도(10  $\mu$ M)의 SB203580을 전처리 하여도 세포사의 억제를 더 증가시키지는 못 하였다. 이상과 같이 p38 MAPK의 활성화는 indomethacin에 의한 세포사멸 과정에서 부분적이지만 의미있는 경로임을 알 수 있었다.



**그림 7.** Indomethacin에 의한 HT-29 세포사멸과정에서 caspase-3 활성화에 대한 p38 MAPK 억제제(SB203580)의 효과. HT-29 세포에 p38 MAPK 억제제(SB203580, 10  $\mu$ M) 또는 caspase 억제제(10  $\mu$ M)들을 전처리하고 0.8 mM의 indomethacin을 4시간 동안 처리하였다. 그리고 caspase-3 활성을 fluorogenic assay 방법으로 측정하였다(\*  $p < 0.05$ , 전처리 없이 indomethacin을 처리한 HT-29 세포와 비교).



**그림 8.** Indomethacin에 의한 p38 MAPK 활성화에 caspase 억제제의 효과. HT-29 세포에 caspase 억제제들(10  $\mu$ M)을 1시간 전처리하고 0.8 mM indomethacin을 처리하였다. 그리고 p38 MAPK에 대한 인산화 특이 항체를 이용하여 Western blot을 시행하였다.

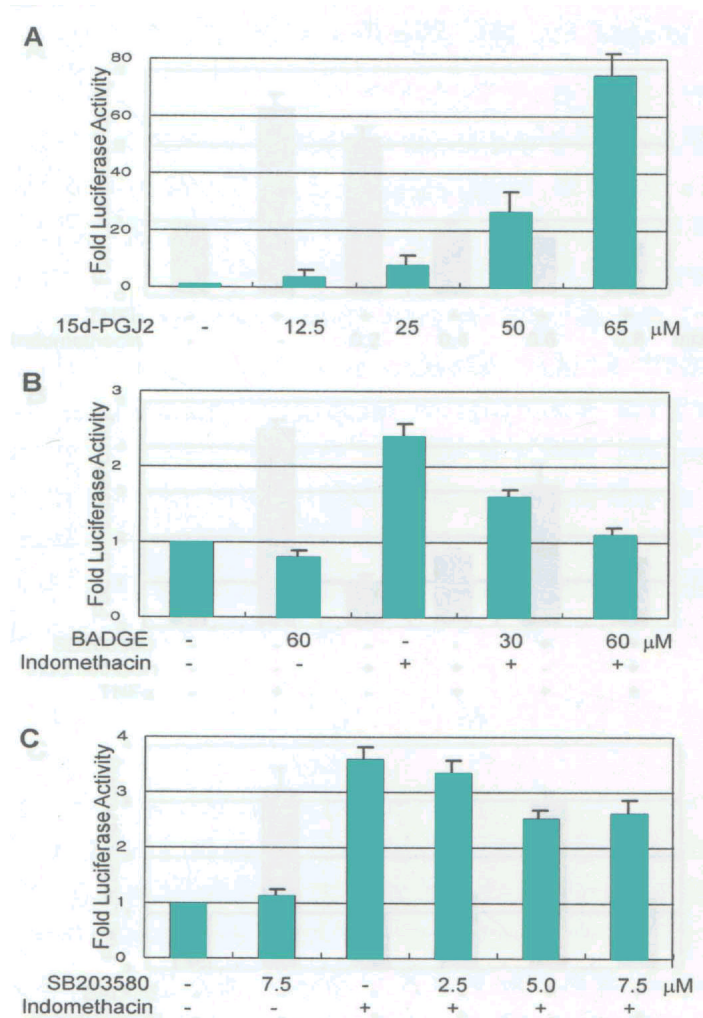
#### 4. Indomethacin에 의한 세포사멸 과정에서 p38 MAPK와 caspase-3 활성화의 관계

본 교실에서는 HT-29 세포의 비스테로이드성 소염제에 의한 세포사멸 과정에서 caspase-3 활성화가 중요하다는 사실을 보고한 바 있으며,<sup>18</sup> 위 결과에서처럼 p38 MAPK 활성화도 부분적이지만 indomethacin에 의한 세포사멸 과정에서 의미있는 역할을 한다. 따라서 p38 MAPK 활성화 과정이 caspase-3 활성화와 연관된 상위 또는 하위 신호전달 체계의 일부분인지를

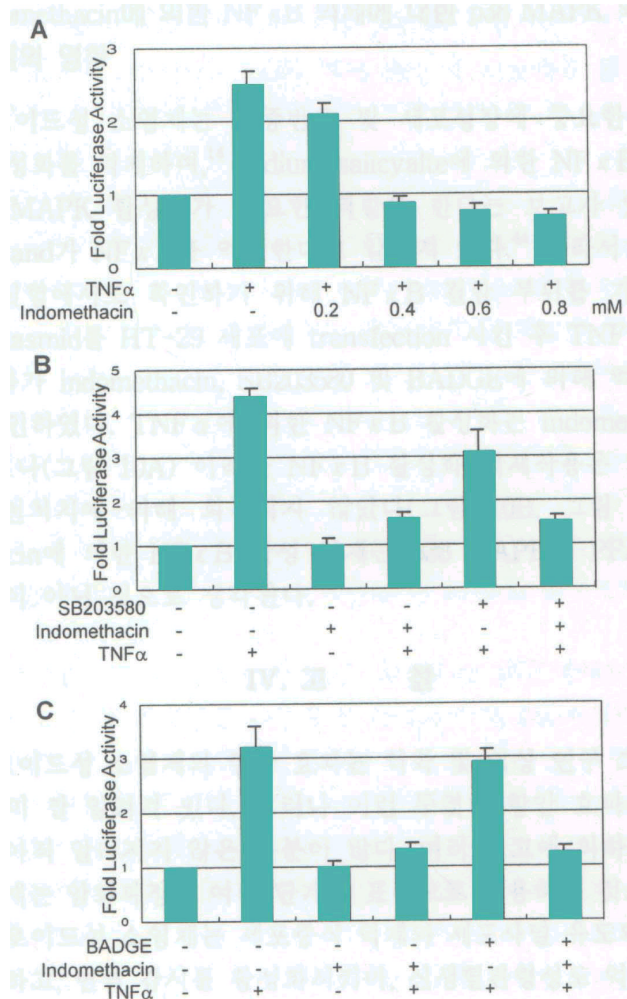
알아보고자 하였다. p38 MAPK 억제제인 SB203580 (10  $\mu$ M) 또는 각각 다른 특이성을 가진 3가지 종류의 caspase 억제제(Ac-DEVD-CHO, Ac-YVAD-CHO, Z-VAD-FMK)를 30분간 전처리한 후 4시간 동안 indomethacin (0.8 mM)을 처리하였으며, caspase-3 활성은 fluorogenic assay로 측정하였다. Caspase 억제제는 caspase-3의 활성을 의미있게 억제 하였으나 p38 MAPK 억제제인 SB203580은 caspase-3 활성화를 억제하지 못하였다(그림 7). 반대로 p38 MAPK 활성화에 대한 caspase 활성화의 영향을 알아보려고 HT-29 세포에 3가지 caspase 억제제(Ac-DEVD-CHO, Ac-YVAD-CHO, Z-VAD-FMK) 10  $\mu$ M을 30분간 전처리하고 indomethacin (0.8 mM)을 1시간 동안 처리한 후 p38 MAPK의 인산화 정도를 Western blot으로 측정하였으나 p38 MAPK 활성화 정도에 아무런 영향을 주지 못하였다(그림 8). 이러한 결과로 caspase-3와 p38 MAPK 활성화는 모두 indomethacin에 의한 HT-29 세포의 세포사멸 과정에서 각각 분명한 역할을 하지만, 서로 간의 의미있는 연관관계는 없음을 알 수 있었다.

#### 5. Indomethacin에 의한 PPAR $\gamma$ 활성화 및 세포사멸에 대한 p38 MAPK 억제 및 PPAR $\gamma$ 억제의 영향

Indomethacin등의 일부 비스테로이드성 소염제는 PPAR $\gamma$ ligand로서 작용하며,<sup>63</sup> PPAR $\gamma$ ligand는 세포 분화, 세포사멸 등에 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>48-52</sup> 그리고 PPAR $\gamma$ 활성은 ERK 또는 JNK/SAPK 활성화에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다.<sup>64,65</sup> 따라서 우선 PPRE3-tk-luc를 reporter plasmid로 transfection한 HT-29 세포에서 PPAR $\gamma$ ligand로 잘 알려진 15d-PGJ<sub>2</sub>에 의해 PPAR $\gamma$  매개 유전자 발현이 활성화됨을 확인하였고(그림 9A) 이와 함께 세포사도 증가함을 볼 수 있었다. 그리고 indomethacin도 PPAR $\gamma$  매개 유전자 발현을 활성화시켰으며 이 활성화는 PPAR $\gamma$ 길항제로 알려진 BADGE (bisphenol A diglycidyl ether)에 의해 억제됨을 확인하였다(그림 9B). 그러나 indomethacin에 의한 HT-29 세포사멸에서 BADGE 전처리에 의한 유의한 세포사멸 억제효과는 없었다. 그리고 PPAR $\gamma$  매개 유전자 발현의 활성도 p38 MAPK억제제(SB203580)의 전처리에 의해 유의한 영향을 받지 않았다(그림 9C).



**그림 9.** Indomethacin의 PPAR $\gamma$ ligand로서의 작용과 p38 MAPK 활성화와의 관계. **A.** PPRE3-tk-luciferase를 transfection시킨 HT-29 세포에 PPAR $\gamma$ ligand인 15d-PGJ<sub>2</sub>를 농도별로 24시간 동안 처리한 후 luciferase 활성을 측정하였다. **B.** A와 동일하게 transfection된 HT-29 세포에 PPAR $\gamma$ 길항제(BADGE)를 5시간 동안 농도별로 전처리하고 indomethacin (0.2 mM)을 24시간 처리한 후 luciferase 활성을 측정하였다. **C.** A와 동일하게 transfection된 HT-29 세포에 p38 MAPK억제제(SB203580)을 농도별로 5시간 전처리하고 indomethacin (0.2 mM)을 24시간 처리한 후 luciferase 활성을 측정하였다. 모든 transfection시 pCMV $\beta$ -gal을 같이 transfection하여 luciferase 활성을  $\beta$ -galactosidase 활성으로 나누어 보정하였다.



**그림 10.** Indomethacin의 NF $\kappa$ B 억제작용과 p38 MAPK 또는 PPAR $\gamma$ 활성화와의 관계. **A.** NF $\kappa$ B 결합부위를 가진 luciferase reporter plasmid를 transfection시킨 HT-29 세포에 indomethacin을 농도별로 1시간 동안 전처리하고 TNF $\alpha$  (20 ng/ml)를 6시간 처리한 후 luciferase 활성을 측정하였다. **B.** A와 동일하게 transfection된 HT-29 세포에 p38 MAPK억제제(SB203580, 5  $\mu$ M)를 2시간 동안, 그리고 indomethacin (0.4 mM)을 1시간 전처리하고 TNF $\alpha$ 를 6시간 처리한 후 luciferase 활성을 측정하였다. **C.** A와 동일하게 transfection된 HT-29 세포에 PPAR $\gamma$ 길항제(BADGE, 60  $\mu$ M)를 2시간 전처리하고 indomethacin (0.4 mM)을 1시간 전처리하고 TNF $\alpha$ 를 6시간 처리한 후 luciferase 활성을 측정하였다. 모든 transfection시 pCMV $\beta$ -gal을 같이 transfection하여 luciferase 활성을  $\beta$ -galactosidase 활성으로 나누어 보정하였다.



## 6. Indomethacin에 의한 NFκB 억제에 대한 p38 MAPK 억제 및 PPARγ 억제의 영향

비스테로이드성 소염제는 염증반응 및 세포성장에 중요한 역할을 하는 NFκB 활성화를 억제하며,<sup>14</sup> sodium salicylate에 의한 NFκB 활성 억제작용에 p38 MAPK 활성화가 중요한 역할을 한다는 보고가 있다.<sup>20</sup> 그리고 PPARγligand가 NFκB를 억제한다고 알려져 있다.<sup>44</sup> 따라서 이들 간의 관계를 본 실험에서도 확인하기 위해 NFκB 결합 부위를 가진 luciferase reporter plasmid를 HT-29 세포에 transfection 시킨 후 TNFα에 의한 NFκB 활성화가 indomethacin, SB203580 및 BADGE에 의해 억제 및 변화하는지를 확인하였다. TNFα에 의한 NFκB 활성화는 indomethacin에 의해 억제되었으나(그림 10A) 이러한 NFκB 활성화 억제작용은 SB203580이나 BADGE 전처치에 의해 회복되지 않았다(그림 10B, 그림 10C). 따라서 indomethacin에 의한 NFκB 활성 억제는 p38 MAPK나 PPARγ활성화와 연관된 것이 아닌 것으로 생각된다.

## IV. 고 찰

비스테로이드성 소염제의 항암 효과는 역학 및 임상 연구 그리고 동물 실험에서 이미 잘 알려져 있다. 그러나 이런 뚜렷한 항암 효과의 작용기전에 대해서는 아직 알려지지 않은 부분이 많다. 여러 보고에 의하면 비스테로이드성 소염제는 암화과정의 여러 단계를 표적으로 작용하는 것으로 생각된다. 즉 비스테로이드성 소염제는 세포증식 억제와 세포사멸 유도 및 세포순환을 억제하고, 면역 감시를 활성화시키며, 신생혈관형성도 억제하는 것으로 알려져 있다.<sup>7-9,66-68</sup>

항암 효과에는 일반적으로 비스테로이드성 소염제의 COX-2 억제작용이 중요한 역할을 할 것으로 생각되어 왔으며,<sup>69</sup> 이를 시사하는 증거로 eicosanoid가 대장암세포주의 증식 속도를 증가시키고,<sup>70</sup> prostaglandin 생성과 COX-2 발현이 정상 대장 점막조직보다 대장암 조직에서 더 높으며,<sup>71,72</sup> 상피세포에서 COX-2를 과발현시키면 세포사멸을 억제하는 것 등을 들 수 있다.<sup>73,74</sup> 그러나 비스테로이드성 소염제에 의한 대장암 세포의 세포사멸이 prostaglandin 생성억제 작용과는 독립적인 기전에 의해 유발된다는 견해가

많다.<sup>8,21-23</sup> 비스테로이드성 소염제에 의한 암세포 증식 억제와 신생혈관생성 억제조건이 prostaglandin 첨가에 의해 감소되지 않거나<sup>19,68,75</sup> sulindac의 대사산물인 sulindac sulfone은 COX 억제 작용이 없음에도 불구하고 대장암 세포의 증식과 신생혈관생성을 억제하는 보고 등이 COX-2와 독립적인 기전을 시사하는 내용들이다.<sup>16,22</sup>

다양한 자극에 대한 여러 세포의 신호전달 체계에서 세포성장과 사멸과정의 중요한 매개체의 일부로서 MAPK가 잘 알려져 왔다. Schwenger 등은 FS-4 섬유아세포에서 sodium salicylate가 p38 MAPK 활성화를 통해 세포사멸을 유발하며, TNF $\alpha$ 에 의한 ERK, JNK/SAPK 활성화는 억제하는 것으로 보고하였고,<sup>19</sup> sodium salicylate에 의한 p38 MAPK 활성화가 TNF $\alpha$ 에 의한 NF $\kappa$ B 활성화를 억제한다는 보고도 있다.<sup>20,76</sup> 그리고 Jones 등은 indomethacin과 COX-2 특이 억제제인 NS-398이 내피세포에서 ERK2의 활성을 억제하며, ERK 억제와 신생혈관 생성억제와의 관련성을 언급한 바 있다.<sup>68</sup> 그러나 비스테로이드성 소염제의 중요 효과인 대장암 억제효과에 대한 연구에서 대장암세포의 세포사멸과 관련된 각 MAPK 활성화의 역할은 알려져 있지 않다.

본 연구의 결과에서 indomethacin은 3가지 MAPK (ERK, JNK/SAPK, p38 MAPK)를 모두 처리시간과 농도에 비례하여 활성화시켰다. 많은 연구에서 JNK/SAPK 및 p38 MAPK의 활성화가 여러 자극에 의한 세포사멸과정에 관여하는 반면, ERK의 활성화는 세포사멸을 억제하는 것으로 알려져 있다.<sup>26,28,77</sup> 그러나 MAPK에 대한 활성화 자극의 특이성은 절대적이 아니며 각 MAPK의 기능을 모든 세포의 모든 상황에 일반화 시키는 어렵다. 따라서 ERK 활성화에 대한 본 연구와 일부 다른 연구에서의 차이는 다양한 자극에 대한 여러 세포에서의 각기 다른 ERK의 역할에 기인하거나 세포내에서 서로 연관된 많은 다른 신호전달체계의 활성화에 의한 영향으로 생각되며,<sup>10,29</sup> 이런 차이점의 역할에 대해서는 더 많은 연구가 필요할 것이다. 비록 본 연구에서 indomethacin에 의한 ERK 활성화 소견이 관찰되었지만 신호전달 체계상 ERK의 상위에 해당되는 MEK1의 억제제인 PD098059는 indomethacin에 의한 세포사멸 과정에서 의미있는 영향을 주지 못하였다. 따라서 indomethacin에 의한 대장암 세포사멸과정에서 ERK 활성화는 직접적인 역할은 하지 않는 것으로 생각된다.

JNK/SAPK는 세포사멸의 신호전달 뿐만 아니라 세포증식과 분화과정에

도 관련이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>78,79</sup> 이러한 양면성은 각각의 다른 상황에서 활성화된 상, 하위 신호전달 체계의 차이와 JNK/SAPK의 활성화된 isoform의 차이에 기인할 것으로 생각된다. 비스테로이드성 소염제에 의한 세포사멸에서 JNK의 역할에 대한 보고로서 sodium salicylate에 의한 eosinophil의 세포사멸과 JNK 및 p38 MAPK의 활성화는 연관관계가 없었으며,<sup>80</sup> 섬유아세포, HT-29 등의 세포에서 salicylate에 의한 MAPK의 활성화를 비교하여 세포의 종류에 따라 JNK나 p38 MAPK의 활성화에 차이가 있음을 보고하였지만<sup>81</sup> 비스테로이드성 소염제에 의한 대장암 세포의 세포사멸 과정에서 JNK 활성화의 역할은 잘 알려져 있지 않았다. 아직 적당한 JNK 특이억제제가 없으므로 본 연구에서는 DLD-1 대장암세포주에 HA발현 유전자를 붙인 JNK 과발현 plasmid와 dominant negative JNK plasmid를 transfection시킨 후 FITC가 붙은 HA에 대한 항체를 이용하여 transfection된 plasmid의 발현을 확인하고 발현이 된 세포와 안된 세포간의 세포사멸의 차이를 핵의 DAPI 염색 모양으로 형광현미경상 비교하여 판단하였다. 이 결과 JNK 발현 plasmid와 dominant negative plasmid 모두 indomethacin에 의한 세포사멸에 영향을 주지 못하였다. HT-29 세포주를 포함한 일부 세포에서 indomethacin에 의해서는 JNK와 p38 MAPK가 활성화되지 않는다는 보고도 있었으나<sup>81</sup> 본 실험에서는 JNK와 p38 MAPK가 활성화 됨을 Western blot 분석과 Path Detect c-Jun *trans*-reporting system 및 kinase assay로 확인하였고, 아마 이런 차이는 처리 농도 및 시간상의 차이가 관여할 것으로 생각된다.

p38 MAPK 활성화의 역할은 p38 MAPK의 특이 억제제인 SB203580을 전 처치하여 확인하였으며, 그 결과로 indomethacin에 의한 HT-29 세포주의 세포사멸을 부분적이지만 유의하게 억제하는 것을 관찰하였다. 세포사멸 과정에서 p38 MAPK의 중요성은 sodium salicylate에 의한 FS-4 섬유아세포의 세포사멸에서 보고된 바와 유사하다.<sup>19</sup>

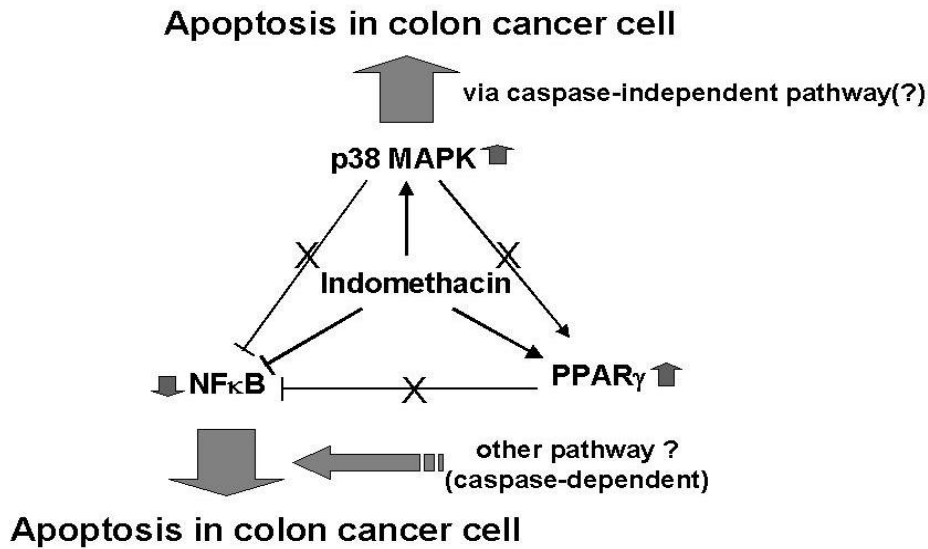
본 교실에서는 indomethacin에 의한 대장암 세포사멸과정에서 caspase-3 활성화의 역할을 보고한 바 있으므로<sup>18</sup> 세포사멸의 최종단계에 작용하는 caspase-3와 p38 MAPK 활성화와의 연관성을 알아보았으나 caspase-3와 p38 MAPK 활성화간에 유의한 상관관계를 관찰할 수 없었다. 따라서 indomethacin에 의한 HT-29 세포사멸과정에서 caspase-3와 p38 MAPK는 각각 의미있는 역할을 하지만 독립적으로 작용할 것으로 생각되며, 최근 보

고된 caspase 경로와 독립적인 세포사멸 과정과의<sup>82,83</sup> 연관성에 대한 연구가 필요할 것이다. 이상의 결과로 비스테로이드성 소염제는 ERK, JNK/SAPK, p38 MAPK를 활성화시키지만 이중에서 p38 MAPK만이 indomethacin에 의한 대장암세포의 세포사멸에 관여하며 caspase와는 독립적인 경로로 세포사멸과 관계함을 알 수 있었다.

다음 단계로 비스테로이드성 소염제에 의한 세포사멸에서 p38 MAPK의 활성화와 관계가 있을 수 있는 매개체로서 NFκB와 PPARγ의 연관성을 알아보고자 하였다.

NFκB는 염증반응과 세포성장과 관련된 중요한 매개체로서 비스테로이드성 소염제인 sodium salicylate, aspirin, sulindac 등에 의해 억제되며 이는 IκB 활성화를 억제하는 작용에 의한다고 알려져 있다.<sup>14</sup> 이와 관련하여 FS-4 섬유아세포에서 sodium salicylate에 의해 p38 MAPK가 활성화되고,<sup>19</sup> salicylate에 의해 억제되었던 NFκB 활성화가 p38 MAPK 억제제인 SB203580에 의해 다시 회복됨을 보임으로서 p38 MAPK 활성화에 의한 NFκB 억제 작용이 sodium salicylate에 의한 항염증 및 압억제 기전과 관련됨을 보인 보고가 있다.<sup>20</sup> 그러나 본 연구의 결과 indomethacin을 처리한 HT-29 세포에서는 억제된 NFκB 활성이 p38 MAPK 억제제에 의해 회복되지 않았으므로 p38 MAPK 활성화와 NFκB의 관련성은 없는 것으로 생각된다. TNFα에 의한 일시적인 p38 MAPK의 활성화에 의해 NFκB 활성화가 유도되고 이에 의해 세포생존 및 염증반응이 활성화된다는 의견이 있으나<sup>84,85</sup> 세포 종류에 따라 차이가 있으며,<sup>86</sup> 특히 지속적인 p38 MAPK 활성화의 경우 NFκB를 억제한다는 상반된 견해도 있다.<sup>76</sup>

Indomethacin을 포함한 비스테로이드성 소염제는 PPARγligand이고, PPARγ에 의한 압억제 작용중의 하나인 세포사멸이 caspase와 독립적이며,<sup>87</sup> PPARγligand가 IκB 활성화 억제를 통해 NFκB 활성을 억제하는 것으로 알려져 있다.<sup>44</sup> 그리고 ERK, JNK/SAPK에 의한 인산화가 PPARγ의 활성화를 억제하는 것으로 알려져 있다.<sup>64,65</sup> 따라서 PPARγ와 p38 MAPK 및 NFκB의 관련성을 알아본 결과, 본 연구에서는 indomethacin은 PPARγligand로 작용하나 PPARγ길항제(BADGE) 전처치에 의한 세포사멸 억제효과가 없었고, indomethacin에 의한 PPARγ활성화 작용은 p38 MAPK 억제제 전처치에 의해 의미있는 영향을 받지 않았다. Indomethacin 처리에 의한 NFκB 활성화 억제효과도 PPARγ길항제 전처치에 의해 영향을 받지 않았으



**그림 11.** Indomethacin에 의한 HT-29 세포주의 세포사멸에서 p38 MAPK, NFκB 및 PPAR $\gamma$ 의 역할과 상호관계. Indomethacin에 의한 세포사멸과정에서 p38 MAPK 활성화는 caspase 활성화와는 독립적으로 부분적이지만 의미있게 세포사멸에 관여할 것으로 생각된다. Indomethacin은 NFκB 활성화를 억제하고 PPAR $\gamma$ 를 활성화 시키지만 indomethacin에 의한 p38 MAPK 활성화, NFκB 억제 그리고 PPAR $\gamma$ 활성화의 상호간의 유의한 연관관계는 없었다. NFκB 억제를 포함한 다른 세포사멸 경로 또한 caspase를 활성화시키는 경로를 통하여 indomethacin에 의한 세포사멸에 관여할 것으로 생각된다.

므로 indomethacin에 의한 NFκB억제는 PPAR $\gamma$ ligand로서의 작용과는 직접적인 상관관계가 없는 것으로 생각된다. PPAR $\gamma$ 발현이 많은 지방세포나 PPAR $\gamma$ 발현 plasmid를 transfection 시킨 세포에 비하여 PPAR $\gamma$ 발현이 적은 HT-29세포에서는 PPAR $\gamma$ ligand에 의한 활성화반응과 그 효과가 상대적으로 적을 수 있을 것으로 생각된다.<sup>88</sup> 또한 indomethacin 자체가 다른 PPAR $\gamma$  ligand에 비해 그 활성화 효과가 상대적으로 적을 수 있다고 생각된다.

본 연구결과를 요약하면(그림11) 비스테로이드성 소염제는 MAPK (ERK, JNK/SAPK, p38 MAPK)를 활성화시키고, 이중에서 p38 MAPK 활성화는

indomethacin에 의한 세포사멸과정에서 부분적이지만 의미있는 역할을 하며, caspase 활성화와는 독립적으로 세포사멸에 관여할 것으로 생각된다. 그리고 HT-29 세포에서 indomethacin은 NF $\kappa$ B 활성화를 억제하고 PPAR $\gamma$ 를 활성화 시키지만 indomethacin에 의한 p38 MAPK 활성화, NF $\kappa$ B 억제 그리고 PPAR $\gamma$ 활성화의 서로간의 유의한 연관관계는 없음을 확인하였다. 최근 보고된 caspase와 독립적인 세포사멸 경로와<sup>82,83</sup> ceramide 신호전달 경로<sup>11,89</sup> 등의 다른 경로가 비스테로이드성 소염제에 의한 p38 MAPK 활성화와 세포사멸에 어떻게 관여할 지는 앞으로 더 연구가 필요한 부분이다.

## V. 결 론

비스테로이드성 소염제에 의한 암억제효과의 기전은 아직 알려지지 않은 부분이 많으며, 이러한 기전 중의 하나로 세포사멸 유발이 보고되어왔다. 본 연구는 세포 증식과 사멸과정의 중요한 매개체 중의 하나로 알려져 있는 mitogen-activated protein kinase (MAPK)가 비스테로이드성 소염제에 의한 대장암 세포의 사멸과정에서 어떠한 역할을 하는지 규명하고, 세포사멸에 의미있는 MAPK 활성화와 가능성 있는 관련 신호전달 경로로서 NF $\kappa$ B 및 PPAR $\gamma$ 의 연관성을 알아보려고 하였다.

본 연구 결과 비스테로이드성 소염제는 3가지 MAPK (ERK, JNK/SAPK, p38 MAPK)를 모두 활성화시키고, 이중에서 p38 MAPK 활성화는 indomethacin에 의한 세포사멸과정에서 부분적이지만 의미있는 역할을 하며, caspase 활성화와는 독립적으로 세포사멸에 관여할 것으로 생각된다. 그리고 HT-29 세포에서 indomethacin은 NF $\kappa$ B 활성화를 억제하고 PPAR $\gamma$ 를 활성화 시키지만 indomethacin에 의한 p38 MAPK 활성화, NF $\kappa$ B 억제 그리고 PPAR $\gamma$ 활성화의 서로간의 유의한 연관관계는 없음을 알 수 있었다.

## 참 고 문 헌

1. Greenberg ER, Baron JA, Freeman DH, Mandel JS, Haile R. Reduced risk of large-bowel adenomas among aspirin users. The Polyp Prevention Study Group. J Natl Cancer Inst 1993;85:912-6.
2. Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ, Piantadosi S, Hyland LM,

- Celano P, et al. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993;328:1313-6.
3. Thun MJ. NSAID use and decreased risk of gastrointestinal cancers. *Gastroenterol Clin North Am* 1996;25:333-48.
  4. Rao CV, Tokumo K, Rigotty J, Zang E, Kelloff G, Reddy BS. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary administration of piroxicam, alpha-difluoromethylornithine, 15 alpha-fluoro-5-androsten-17-one, and ellagic acid individually and in combination. *Cancer Res* 1991;51:4528-34.
  5. Barnes CJ, Cameron IL, Hardman WE, Lee M. Non-steroidal anti-inflammatory drug effect on crypt cell proliferation and apoptosis during initiation of rat colon carcinogenesis. *Br J Cancer* 1998;77:573-80.
  6. Mahmoud NN, Dannenberg AJ, Mestre J, Bilinski RT, Churchill MR, Martucci C, et al. Aspirin prevents tumors in a murine model of familial adenomatous polyposis. *Surgery* 1998;124:225-31.
  7. Shiff SJ, Qiao L, Tsai LL, Rigas B. Sulindac sulfide, an aspirin-like compound, inhibits proliferation, causes cell cycle quiescence, and induces apoptosis in HT-29 colon adenocarcinoma cells. *J Clin Invest* 1995;96:491-503.
  8. Piazza GA, Rahm AK, Finn TS, Fryer BH, Li H, Stoumen AL, et al. Apoptosis primarily accounts for the growth-inhibitory properties of sulindac metabolites and involves a mechanism that is independent of cyclooxygenase inhibition, cell cycle arrest, and p53 induction. *Cancer Res* 1997;57:2452-9.
  9. Hong SP, Ha SH, Park IS, Kim WH. Induction of apoptosis in colon cancer cells by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Yonsei Med J* 1998;39:287-95.
  10. Smith M, Hawcroft G, Hull MA. The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human colorectal cancer cells; evidence of different mechanisms of action. *Eur J Cancer* 2000;36(5):664-74.

11. Chan TA, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mechanisms underlying nonsteroidal anti-inflammatory drug-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:681-6.
12. Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1998;58:362-6.
13. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998;93:705-16.
14. Yamamoto Y, Yin M-J, Lin K-M, Gaynor RB. Sulindac inhibits activation of the NF-kappaB pathway. *J Biol Chem* 1999;274:27307-14.
15. He T-C, Chan TA, Vogelstein B, Kinzler KW. PPAR-delta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* 1999;99:335-45.
16. Skopinska-Rozewska E, Piazza GA, Sommer E, Pamukcu R, Barcz E, Filewska M, et al. Inhibition of angiogenesis by sulindac and its sulfone metabolite (FGN-1): a potential mechanism for their antineoplastic properties. *Int J Tissue React* 1998;20:85-9.
17. Klampfer L, Cammenga J, Wisniewski HG, Nimer SD. Sodium salicylate activates caspases and induces apoptosis of myeloid leukemia cell lines. *Blood* 1999;93(7): 2386-94.
18. Kim WH, Yeo M, Kim MS, Chun SB, Shin EC, Park JH, et al. Role of caspase-3 in apoptosis of colon cancer cells induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Int J Colorectal Dis* 2000;15:105-11.
19. Schwenger P, Bellosta P, Vietor I, Basilico C, Skolnik EY, Vilcek J. Sodium salicylate induces apoptosis via p38 mitogen-activated protein kinase but inhibits tumor necrosis factor-induced c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2869-73.
20. Schwenger P, Alpert D, Skolnik EY, Vilcek J. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by sodium salicylate leads to inhibition of tumor necrosis factor-induced I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation and



- degradation. *Mol Cell Biol* 1998;18:78-84.
21. Elder DJE, Hague A, Hicks DJ, Paraskeva C. Differential growth inhibition by the aspirin metabolite salicylate in human colorectal tumor cell lines: enhanced apoptosis in carcinoma and in vitro-transformed adenoma relative to adenoma cell lines. *Cancer Res* 1997;56:2273-6.
  22. Piazza GA, Rahm AL, Krutzsch M, Sperl G, Paranka NS, Gross PH, et al. Antineoplastic drugs sulindac sulfide and sulfone inhibit cell growth by inducing apoptosis. *Cancer Res* 1995;55:3110-6.
  23. Goldberg Y, Nassif II, Pittas A, Tsai LL, Dynlacht BD, Rigas B, et al. The anti-proliferative effect of sulindac and sulindac sulfide on HT-29 colon cancer cells: alterations in tumor suppressor and cell cycle-regulatory proteins. *Oncogene* 1996;12: 893-901.
  24. Suzuki A, Tsutomi Y, Akajane T, Miura M. Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase-3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP. *Oncogene* 1998;17:931-9.
  25. Graves JD, Draves KE, Craxton A, Saklatvala J, Krebs EG, Clark EA. Involvement of stress-activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in mIgM-induced apoptosis of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93: 13814-8.
  26. Kinoshita T, Yokota T, Arai K, Miyajima A. Suppression of apoptotic death in hematopoietic cells by signalling through the IL-3/GM-CSF receptors. *EMBO J* 1995;14: 266-75.
  27. Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, et al. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 1995;270:7420-6.
  28. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995;270:1326-31.
  29. Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current Opin Cell Biol* 1997;9:180-6.

30. Baeuerle PA, Baltimore D. NF- $\kappa$ B: ten years after. *Cell* 1996;87:13-20.
31. Baldwin AS. The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14: 649-81.
32. Lu X, Xie W, Reed D, Bradshaw WS, Simmons DL. Nonsteroidal antiinflammatory drugs cause apoptosis and induce cyclooxygenases in chicken embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7961-5.
33. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. NF- $\kappa$ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998;281:1680-3.
34. Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF- $\kappa$ B. *Nature* 1995;376:167-70.
35. Chu ZL, McKinsey TA, Liu L, Gentry JJ, Malim MH, Ballard DW. Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF- $\kappa$ B control. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:10057-62.
36. Wu M, Lee H, Bellas RE, Schauer SL, Arsura M, Katz D, et al. Inhibition of NF- $\kappa$ B/Rel induces apoptosis of murine B cells. *EMBO J* 1996;15:4682-90.
37. Brown K, Gerstberger S, Carlson L, Fransozo G, Siebenlist U. Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science* 1995;267:1485-8.
38. Chen Z, Hagler J, Palombella VJ, Melandri F, Scherer D, Ballard D, et al. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 1995;9:1586-97.
39. Grilli M, Pizzi M, Memo M, Spano P. Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF- $\kappa$ B activation. *Science* 1996;274:1383-5.
40. Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature* 1998;396:77-80.
41. Kerstein S, Desvergne B, Wahli W. Roles of PPARs in health and

- disease. *Nature* 2000;405:421-4.
42. Meade EA, McIntyre TM, Zimmermann GA, Prescott SM. Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells. *J Biol Chem* 1999;274:8328-34.
  43. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998;391:79-82.
  44. Su CG, Wen X, Bailey ST, Jiang W, Rangwala SM, Keilbaugh SA, et al. A novel therapy for colitis utilizing PPAR $\gamma$  ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J Clin Invest* 1999;104:383-9.
  45. Li M, Pascual G, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol Cell Biol* 2000;20:4699-707.
  46. Inoue H, Tanabe T, Umesono K. Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPAR $\gamma$ . *J Biol Chem* 2000;275:28028-32.
  47. Nolan JJ, Ludvik B, Beerdsen P, Joyce M, Olefsky J. Improvement in glucose tolerance and insulin resistance in obese subjects treated with troglitazone. *N Engl J Med* 1994;331:1188-93.
  48. Tontonoz P, Singer S, Forman BM, Sarraf P, Fletcher JA, Fletcher CDM, et al. Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:237-41.
  49. Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, Evans RM, Martin KJ, Zhang M, et al. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR. *Mol Cell* 1998;1:465-70.
  50. Bishop-Bailey D, Hla T. Endothelial cell apoptosis induced by the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand 15-deoxy-12,14-prostaglandin J<sub>2</sub>. *J Biol Chem* 1999;274:17042-8.
  51. Chang TH, Szabo E. Induction of differentiation and apoptosis by ligands of peroxisome proliferator-activated receptor in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2000;60:1129-38.
  52. Tsubouchi Y, Sano H, Kawahito Y, Mukai S, Yamada R, Kohno M,

- et al. Inhibition of human lung cancer cell growth by the peroxisome proliferator-activated receptor- agonists through induction of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;270:400-5.
53. Kawahito Y, Kondo M, Tsubouchi Y, Hashiramoto A, Bishop-Bailey D, Inoue K, et al. 15-deoxy-12,14-PGJ2 induces synoviocyte apoptosis and suppresses adjuvant-induced arthritis in rats. *J Clin Invest* 2000;106:189-97.
54. Xin X, Yang S, Kowalski J, Gerritsen ME. Peroxisome proliferator-activated receptor ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 1999;274:9116-21.
55. Brockman JA, Gupta RA, Dubois RN. Activation of PPAR leads to inhibition of anchorage-independent growth of human colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 1998;115:1049-55.
56. Kubota T, Koshizuka K, Williamson EA, Asou H, Said JW, Holden S, et al. Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1998;58:3344-52.
57. Demetri GD, Fletcher CDM, Mueller E, Saraf P, Naujoks R, Campbell N, et al. Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor-ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:3951-6.
58. Suh N, Wang Y, Williams CR, Risingsong R, Gilmer T, Willson TM, et al. A new ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ), GW7845, inhibits rat mammary carcinogenesis. *Cancer Res* 1999;59:5671-3.
59. Lim JW, Kim H, Kim KH. Nuclear Factor- $\kappa$ B regulates cyclooxygenase-2 expression and cell proliferation in human gastric cancer cells. *Lab Invest* 2001;81:349-60.
60. Subbaramaiah K, Lin DT, Hart JC, Dannenberg AJ. Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ ligands suppress the transcription activation of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 2001;276:12440-8.
61. Wright HM, Clish CB, Mikami T, Hauser S, Yanagi K, Hiramatsu R, et al. A synthetic antagonist for the peroxisome

- proliferator-activated receptor $\gamma$  inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 2000;275:1873-7.
62. Cuenda A, Rouse J, Doza YN, Meier R, Cohen P, Gallagher TF, et al. SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett* 1995;364:229-33.
63. Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA. Peroxisome proliferator-activated receptors and are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 1997;272:3406-10.
64. Camp HS, Tafuri SR. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor activity by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1997;272:10811-6.
65. Camp HS, Tafuri SR, Leff T. c-Jun N-terminal kinase phosphorylates peroxisome proliferator-activated receptor-1 and negatively regulates its transcriptional activity. *Endocrinology* 1999;140:392-7.
66. Tanaka K, Tanaka H, Kanemoto Y, Tsuboi I. The effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on immune functions of human peripheral blood mononuclear cells. *Immunopharmacology* 1998;40(3):209-17.
67. Shiff SJ, Rigas B. Aspirin for cancer. *Nature Med* 1999;5:1348-9.
68. Jones MK, Wang H, Peskar BM, Levin E, Itani RM, Sarfeh IJ, et al. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nature Med* 1999;5:1418-23.
69. Watson AJ. Chemopreventive effects of NSAIDs against colorectal cancer: regulation of apoptosis and mitosis by COX-1 and COX-2. *Histol Histopathol* 1998;13:591-7.
70. Qiao L, Kozoni V, Koutsos MI, Tsioulas GJ, Hanif R, Shiff SJ, et al. Eicosanoids increase the proliferation rate in human colon carcinoma cell lines and mouse colon cells (abstract). *Gastroenterology* 1995;108(suppl):A527.

71. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, Dubois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994;107:1183-8.
72. Yang VW, Shields JM, Hamilton SR, Spannhake EW, Hubbard WC, Hyland LM, et al. Size-dependent increase in prostanoid levels in adenomas of patients with familial adenomatous polyposis. *Cancer Res* 1998;58:1750-3.
73. Tsujii M, DuBois RN. Alteration in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 1995;83:493-501.
74. Subbaramaiah K, Zakim D, Weksler BB, Dannenberg AJ. Inhibition of cyclooxygenase: a novel approach to cancer prevention. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997;216:201-10.
75. Hanif R, Pittas A, Feng Y, Koutsos MI, Qiao L, Staiano-Coico L, et al. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway. *Biochem Pharmacol* 1996;52:237-45.
76. Alpert D, Schwenger P, Han J. Cell stress and MKK6b-mediated p38 MAP kinase activation inhibit tumor necrosis factor-induced I $\kappa$ B phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation. *J Biol Chem* 1999;274:22176-83.
77. Yamada T, Horiuchi M, Dzau VJ. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:156-60.
78. Sakata N, Patel HR, Terada N, Aruffo A, Johnson GL, Gelfand EW. Selective activation of c-Jun kinase mitogen-activated protein kinase by CD40 on human B cells. *J Biol Chem* 1995;270:30823-8.
79. Westwick JK, Weitzel C, Leffert HL, Brenner DA. Activation of Jun kinase is an early event in hepatic regeneration. *J Clin Invest* 1995;95:803-10.

80. Wong CK, Zhang JP, Lam CW, Ho CY, Hjelm NM. Sodium salicylate-induced apoptosis of human peripheral blood eosinophils is independent of the activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;121:44-52.
81. Schwenger P, Alpert D, Skolnik EY, Vilcek J. Cell-type-specific activation of c-Jun N-terminal kinase by salicylates. *J Cell Physiol* 1999;179:109-14.
82. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 2001;412:95-9.
83. Parrish J, Li L, Klotz K, Ledwich D, Wang X, Xue D. Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature* 2001;412:90-4.
84. Roulston A, Reinhard C, Amiri P, Williams LT. Early activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 Kinase regulate cell survival in response to tumor necrosis factor. *J Biol Chem* 1998;273:10232-9.
85. Beyaert R, Cuenda A, Vanden Berghe W, Plaisance S, Lee JC, Haegeman G, et al. The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor. *EMBO J* 1996;15:1914-23.
86. van den Blink B, Juffermans NP, ten Hove T, Schultz MJ, van Deventer SJ, van der Poll T, et al. p38 mitogen-activated protein kinase inhibition increases cytokine release by macrophages in vitro and during infection in vivo. *J Immunol* 2001;166:582-7.
87. Eibl G, Reber HA, Wente MN, Ohara H, Hines OJ. Activation of PPAR $\gamma$  inhibits growth of pancreatic cancer cells by induction of apoptosis. *Gastroenterology* 2001;120(suppl1):A722.
88. Kitamura S, Miyazaki Y, Shinomura Y, Kondo S, Kanayama S, Matsuzawa Y. Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$  induces growth arrest and differentiation markers of human colon cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 1999;90:75-80.
89. Basu S, Kolensnick R. Stress signals for apoptosis: ceramide and c-Jun kinase. *Oncogene* 1998;17:3277-85.

## Abstract

### **The role of mitogen-activated protein kinases in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis of colon cancer cell lines**

**Tae Il Kim**

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

(Directed by Professor Won Ho Kim)

The mechanisms of the anti-neoplastic effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) still remain unknown, but the induction of apoptosis is one of the possible mechanisms. We have attempted to demonstrate the role of mitogen-activated protein (MAP) kinases, which are generally considered to be important mediators of proliferative and apoptotic signals, in NSAIDs-induced colon cancer cell apoptosis. Furthermore we have evaluated the relation of other possible mediators such as NF $\kappa$ B and PPAR $\gamma$ , which were known to be associated with NSAIDs-induced cellular response. Apoptosis was detected by demonstration of DNA fragmentation in agarose gel electrophoresis. Cell death was assessed by trypan blue dye exclusion method. MAP kinase activation was assessed by Western blot using phospho-specific antibodies to MAP kinases. Kinase assay using activating transcription factor-2 (ATF-2) fusion protein as a substrate was also performed for the measurement of p38 MAP kinase activity. For the inhibition of ERK and p38 MAP kinase, PD098059 and SB203580 were utilized respectively. To demonstrate the role of JNK, HA epitope-tagged JNK or dominant negative JNK plasmid were transiently transfected, and the change of nuclear shape due to overexpressed or suppressed JNK activity was estimated by immunofluorescence study using the FITC-conjugated anti-HA monoclonal antibody and DAPI. Caspase-3 activity was measured using tetrapeptide fluorogenic substrate, Ac-DEVD-AMC. To evaluate the activities of NF $\kappa$ B and PPAR $\gamma$  and their association with MAPK activation, luciferase construct containing NF $\kappa$ B binding sites or PPRE3-tk-luciferase construct were transfected and transcriptional activities were measured by luciferase activity. Treatment of HT-29 cells with NSAIDs results in a time- and dose-dependent



induction of apoptosis, accompanied by a sustained activation of all three MAP kinase subfamilies. SB203580, a p38 MAP kinase inhibitor, reduced indomethacin-induced apoptosis by 43 %, while PD098059, MEK1 inhibitor, did not affect cell death. Overexpressed or suppressed JNK activity also did not affect indomethacin-induced apoptosis. p38 MAP kinase and caspase-3 activation were not significantly inter-linked in indomethacin-induced apoptosis. Indomethacin suppressed the transcriptional activation of NFκB and induced the transcriptional activation of PPARγ. However, the activity of NFκB and PPARγ were not affected by p38 MAPK inhibitor. From these results, we conclude that NSAIDs can induce the prolonged activation of MAP kinases in colon cancer cells and that of these, p38 MAP kinase may play a partial but significant role in indomethacin-induced apoptosis. Furthermore, indomethacin-induced and p38 MAPK-mediated apoptosis of colon cancer cells is independent of caspase activation and not associated with indomethacin-induced suppression of NFκB and activation of PPARγ.

---

Key Words: nonsteroidal anti-inflammatory drug, mitogen-activated protein kinase, apoptosis