

위암 세포에서 Bcl-w의 발현, 세포  
사멸 억제 기능 및 그 작용 기전

연세대학교 대학원

의 과학 사업 단

이 혜 원

위암 세포에서 Bcl-w의 발현, 세포  
사멸 억제 기능 및 그 작용 기전

지도교수 김 호 근 교수님

이 논문을 석사 학위 논문으로 제출함

2002 년 12 월 일

연세대학교 대학원

의 과 학 사 업 단

이 혜 원

이혜원의 석사 학위 논문을 인준함

심사위원           김 호 근 교수님           인

심사위원           엄 홍 덕 교수님           인

심사위원           노 성 훈 교수님           인

연세대학교 대학원

2002 년 12 월 일

## 감사의 글

길게만 느껴졌던 석사 과정 생활도 어느덧 졸업을 앞두고 있습니다. 2년 남짓한 시간 동안 항상 따뜻하고 자상하게 지도해 주시고 묵묵히 지켜봐 주신 엄홍덕 교수님께 진심으로 감사드립니다. 그리고 여러 가지 일로 애써 주시고 논문 심사해 주신 김호근 교수님께도 깊이 감사드리며, 부족한 논문을 심사해 주신 노성훈 교수님께도 진심으로 감사드립니다.

실험에 대해 자상하게 가르쳐 주신 이승범 선배님, 조은숙 선생님과 김도균 선생님께 감사드리고 귀여운 후배 상희와 많은 힘이 되어준 송경섭 선배님과 기쁨을 함께 나누고 싶습니다.

짧은 시간이었지만 원자력 병원에서의 실험 병리학 실험실의 가족들, 이승숙 실장님, 정진행 선생님, 박선후 선생님과 김민석 선생님께 진심으로 감사드립니다. 또한 실험실의 정신적 지주이자 푸근한 옆집 아저씨 같은 장원석 선생님, 큰 언니 같고 때론 엄마처럼 자상하신 이선주 선생님, 귀여운 쌍둥이 같은 용훈이 오빠와 상윤이 오빠, 마지막으로 가장 많은 시간을 나눈 진영이 언니, 모두에게 깊은 감사의 말씀을 드립니다.

석사 과정에도 같이 입학해서 든든한 힘이 되어준 친구 정안이와 그 외 은정, 영경, 미선, 수호, 정호, 재일이와 기쁨을 함께 나누고 싶습니다.

마지막으로 지금까지 키워주신 존경하는 부모님과 사랑하는 동생들, 향원, 진원이와 사랑하는 친구들 희연, 영민, 일환, 석호, 수정, 영재, 윤전, 명재, 효령이와 귀태 오빠에게 이 논문을 바칩니다.

저자 씀

## 차 례

그림 및 표 차례 .....	ii
국문요약 .....	1
I. 서론 .....	3
II. 재료 및 방법 .....	7
1. 세포, 항체 및 시약 .....	7
2. 세포 배양, transfection 및 처리 .....	7
3. 세포 사멸 측정 .....	8
4. Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 분석 .....	8
5. Western blot analysis .....	9
6. In vitro kinase assay .....	10
7. 면역 조직 화학 염색 .....	10
8. DNA microarray assay .....	11
III. 결과 .....	12
1. 사멸 자극들에 대한 위암 세포주들의 반응도 비교 .....	12
2. DNA microarray assay를 통한 유전자 발현 비교 .....	12
3. c-met의 기능 분석 .....	12
4. 위암 세포주에서 Bcl-w의 발현 및 기능 .....	13
5. 위암 세포 사멸에서 SAPK/JNK의 역할 .....	14
6. Bcl-w에 의한 SAPK/JNK의 활성화 억제 .....	15
7. 위암 환자 조직에서 Bcl-w의 발현 .....	16
IV. 고찰 .....	17
V. 결론 .....	20
참고문헌 .....	33
영문요약 .....	42

## 그림 차례

그림 1. Differential susceptibility of SNU-1 cells, SNU-16 cells, SNU-620 cells to death stimuli .....	21
그림 2. Expression and function of c-met and differential susceptibility in gastric cancer cells to death stimuli ..	22
그림 3. Comparison of Bcl-2 family member levels between SNU-1, SNU-16, SNU-620 cells .....	23
그림 4. SAPK/JNK is a common mediator of the SNU-16 cell death induced by anti-Fas, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , etoposide, serum withdrawal .....	24
그림 5. Bcl-w suppresses gastric cancer cell death by blocking the SAPK/JNK activation .....	25
그림 6. Suppression of SAPK/JNK activation in SNU-620 cells .....	26
그림 7. Expression of Bcl-w in AGC patients .....	27

## 표 차례

표 1. Comparison of DNA microarray analysis between SNU-1 cells and SNU-620 cells - Expression of high levels of 114 genes in SNU-620 cells than SNU-1 cells .....	28
---	----

## 국문 요약

위암 세포에서 Bcl-w의 발현, 세포 사멸 억제 기능 및 그 작용 기전

위암 세포의 생존 기전을 조사하기 위하여 SNU-1, SNU-16, SNU-620 위암 세포주들을 사용한 비교 연구를 실시하였다. 흥미롭게도 SNU-620 세포는 SNU-1과 SNU-16 세포들에 비하여 anti-Fas, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, etoposide, serum withdrawl과 같은 다양한 사멸 자극들에 저항함이 관찰되어 이러한 현상의 기전을 탐구하고자 하였다. 먼저, DNA microarray assay를 수행한 결과 SNU-620은 SNU-1에 비하여 c-met proto-oncogene을 포함한 114개의 유전자를 상대적으로 많이 발현함이 확인되었다. c-met의 이러한 발현 양상은 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)에 의해서도 다시 한번 확인되었으나 SNU-16 세포에 c-met의 ligand인 Hepatocyte growth factor (HGF)의 처리는 anti-Fas, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, etoposide, serum withdrawl의 모두에 대한 세포 보호 효과를 유도하지 않았다. 따라서, c-met이 이 모든 자극들에 대하여 SNU-620을 보호하는 인자는 아니라고 생각되었다. 그러한 인자를 확인하기 위한 또 다른 방법으로, anti-Fas, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, etoposide, serum withdrawl이 위암 세포를 사멸하는 기전을 조사하였다. 그 결과 이러한 자극들 모두 stress activated protein kinase/c-Jun NH<sub>2</sub> terminal kinase (SAPK/JNK)를 통하여 위암 세포의 사멸을 유도함이 확인되었다. Bcl-2가 SAPK/JNK의 활성화를 억제할 수 있다는 기존의 보고에 근거해서 SNU-16과 SNU-620에서 Bcl-2 family protein들의 발현 양상을 western blotting으로 비교하였다. 그 결과 Bad, Bak, Bax, Bid, Bcl-2, Bcl-xL의 발현 정도는 SNU-16, SNU-620에서 별다른 차이가 없었으나 유독 Bcl-w만이 SNU-16보다 SNU-620에서 높은 발현을 보였다. 또한 Bcl-w를 SNU-16에 과



발현했을 때는 anti-Fas, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, etoposide, serum withdrawal에 의한 SAPK/JNK의 활성화 및 세포 사멸이 감소됨이 관찰되었다. 따라서 Bcl-w가 실제로 위암 환자에서도 발현되는지를 조사하기 위하여 다섯 명의 advanced gastric adenocarcinoma (AGC) 환자로부터 획득한 조직을 면역 화학 염색으로 분석하였다. 이 모든 환자에서 Bcl-w는 정상 세포에서는 발현되지 않았지만 두 case에서는 암 세포 특이적으로 발현됨이 관찰되었다. 이 모든 연구 결과를 종합하면 Bcl-w가 위암 세포주 및 위암 환자에서 발현될 수 있는 하나의 생존 인자라고 생각된다.

---

핵심되는 말 : 위암, 세포 사멸, Bcl-w, SAPK/JNK

위암 세포에서 Bcl-w의 발현, 세포 사멸 억제 기능 및 그 작용 기전

Bcl-w supresses gastric cancer cell death by blocking SAPK/JNK  
activation

<지도교수 김호근>

연세대학교 대학원 의과학 사업단

이혜원

## I. 서론

위암은 전 세계적으로 가장 흔한 암종의 하나이다.<sup>1-3,7</sup> 위암의 발생 기전에 대한 이해는 아직도 부족한 실정이지만, *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 균의 중요성이 제기되어 왔고, World Health Organization은 이 균을 class I carcinogen으로 인정하였다.<sup>8</sup> 이에 대한 가설로는 *H. pylori*균에 의한 위 상피 세포 감염으로 인하여 lymphocytes, macrophages, polymorphonuclear cells와 같은 염증 세포들이 침윤되고, 그 결과 다양한 inflammatory cytokine과 활성 산소가 생성되는 미세 환경이 형성되리라 생각된다.<sup>4-7</sup> 이러한 상태에서 많은 위 상피 세포가 TNF $\alpha$ 와 같은 cytotoxic cytokine과 산화성 스트레스에 의해서 사멸되겠지만, 이러한 자극에 대한 저항성을 획득한 세포, 즉 homeostatic mechanism이 변형된 세포에 의하여 암이 발생될 가능성이 대두된다. 이러한 기전으로 발생된 암세포는 여러 가지 세포 사멸 자극들에 저항성을 나타내리라 예상되며, 암세포의 이러한 특

성은 암 치료의 효율성을 감소시키는 중요한 원인이 되리라 생각된다. 따라서 사멸 자극들로부터 암세포를 보호하는 인자들의 정체와 그 작용 기전을 규명함은 암의 발생 원인을 이해하고 또한 암 치료의 효율성을 증진하는 방안을 강구함에 반드시 필요한 사항이다. 그럼에도 불구하고, 위암 세포의 생존 기전에 대한 이해는 매우 부족한 실정이다.

세포의 생존을 조절할 수 있는 가장 대표적인 인자로는 Bcl-2 family protein들을 들 수 있다. Bcl-2는 이들 중 처음으로 확인된 family member이며, follicular B-cell lymphoma를 비롯한 다양한 암세포에서 과다 발현되는 proto-oncogene으로 믿어진다.<sup>9</sup> Bcl-2가 주목을 받은 가장 큰 이유는 기존의 proto-oncogene과는 달리 세포 성장에는 영향을 주지 않고 세포 사멸을 억제하는 특성 때문이었다. Bcl-2의 이러한 세포 보호 효과는  $\gamma$ - 및 ultraviolet-irradiation, cytokine withdrawal, dexamethasone, 그리고 다양한 cytotoxic drug을 포함하는 아주 다양한 사멸 자극들에 대하여 발휘되며,<sup>10</sup> 그 기전 역시 실험 조건에 따라서 다양하게 나타난다. 이에 대한 대표적인 예로 Bcl-2는 미토콘드리아에서 Bax와 결합하여 Bax-channel activity 및 cytochrome C release를 억제한다는 것이다.<sup>11,13-15</sup> Bcl-2는 또한 다양한 사멸 자극들로 유도되는 mitogen-activated protein kinase (MAPK) family의 한 member인 SAPK/JNK가 다양한 사멸 자극들로 활성화되는 것을 억제한다는 보고도 있다.<sup>11,12</sup> 그러나 이러한 세포 사멸 억제 효과는 Bcl-2에만 국한된 것이 아니라, 다른 Bcl-2 family member들인 Bcl-xL, Bcl-w등도 세포 사멸을 억제할 수 있다고 알려져 있다.<sup>9,16-19</sup> 또한 이 family members, Bax, Bad, Bid, Bak등은 오히려 세포 사멸을 촉진하는 것으로 알려져 있어서, Bcl-2 family member들은 세포 사멸을 촉진하는 인자와 억제하는 인자로 분류될 수 있다.

Bcl-2 family member들 중에 몇몇은 그것들의 작용 기전과 생리적,

병리적인 역할이 활발히 조사되어진 반면, 나머지는 상대적으로 낮은 주목을 받아왔다. 특히, Bcl-w에 대한 연구는 거의 이루어지지 않은 실정이다. Bcl-w를 hematopoietic cell에 과다 발현하면 5-fluorouracil,  $\gamma$ -irradiation, IL-3 deprivation, dexamethasone등과 같은 다양한 사멸 자극들의 작용이 억제됨은 보고 되었으나,<sup>20,21,26</sup> 다른 세포에서의 Bcl-w의 세포 사멸 억제 기능과 더욱이 그 작용 기전에 대한 이해는 매우 부족한 실정이다. 또한, Bcl-w의 생체 내에서 역할에 대한 보고 역시 매우 제한적이다. Bcl-w가 mouse의 고환, 췌장, 심장, 대장 등의 조직에서 발현됨이 관찰되었으나,<sup>22</sup> Bcl-w 유전자의 파괴 (knockout)는 오직 spermatogenesis에만 이상을 초래하였다. 이러한 실험 결과는 Bcl-w가 spermatogenesis를 제외한 정상적인 development 과정에 불필요함을 암시한다.<sup>22-24</sup> 그러나 이 Bcl-w knockout mouse에 5-fluorouracil,  $\gamma$ -radiation 처리를 하였을 때는 장 상피 세포가 정상 mouse에서 보다 상대적으로 민감하게 사멸하였다.<sup>25</sup> 그러므로 Bcl-w는 정상 상태보다는 스트레스 조건 하에서 장 상피 세포의 생존에 더 중요하리라 생각된다. Bcl-w는 또한 병리적인 상태, 특히 암에서 중요한 역할을 수행하리라는 것을 암시하는 보고도 있다. 일례로, 다양한 암 세포주들을 western blotting으로 분석하였을 때, Bcl-w는 암세포, 특히 대장암 세포에서 과 발현될 수 있음이 관찰되었다.<sup>26,27</sup> 또한, 대장암 환자의 조직을 면역화학 염색으로 분석한 결과, Bcl-w는 정상 점막 세포보다 암 세포에서 상대적으로 높게 발현됨이 보고 되었다.<sup>26</sup> 이러한 연구 결과들은 Bcl-w가 대장암 세포에서 생존 인자로 작용할 가능성을 시사하지만, 다른 암에서 Bcl-w의 역할을 체계적으로 분석한 보고는 없다.

암세포에서 종종 발현이 증가되는 또 다른 생존 인자로는 c-met proto-oncogene을 들 수 있다. c-met은 tyrosine kinase receptor family에 속하는 세포 표면의 수용체이며,<sup>27-29</sup> 이에 그 ligand인 HGF가 부착되면 다

양한 세포에서 phosphoinositide 3-kinase를 통한 세포 생존 신호가 유도되는 것으로 알려져 있다.<sup>30-33</sup> c-met이 대장암 및 간암, 식도암, 췌장암 등의 암에서 과다 발현되는 것으로 보고 되었지만,<sup>28,34-36</sup> 위암에서의 역할에 대한 이해는 부족한 실정이다.

위암 세포의 생존 기전을 이해하기 위하여 Bcl-2 family proteins 및 c-met과 같이 다른 암과의 관련성이 확인된 특정 인자를 조사할 수도 있겠지만, 다른 인자들의 작용 가능성도 배제할 수 없는 사항이다. 이러한 후보 인자들을 일시에 대량으로 분석할 수 있는 방법으로는 DNA microarray assay를 들 수 있다. 이것은 수많은 유전자를 고밀도로 붙여 놓은 microchip을 사용하여 조건에 따른 유전자 발현의 차이를 일시에 대량으로 분석하는 기술이다. 따라서 정상 세포와 암 세포에서 유전자 발현의 차이, 세포가 사멸되어 가는 과정에서의 발현의 변화, 또한 많은 질병의 원인이 되는 미생물들의 검색 등 적용 범위가 넓다.

본 연구에서는 위암 세포의 생존에 관여하는 인자를 찾기 위해 위암 세포주들인 SNU-1, SNU-16, SNU-620 세포들을 사용한 비교 연구를 실시하였다. 흥미롭게도, SNU-620 세포는 SNU-1과 SNU-16 세포들보다 다양한 사멸 자극들에 대하여 상대적으로 높은 저항성을 보였다. 이런 SNU-620 세포의 특성을 결정짓는 생존 인자를 세포 생물학적, 생화학적, 그리고 DNA microarray assay 방법으로 분석한 결과, SNU-620 세포에서는 Bcl-w의 발현이 상대적으로 높다는 것이 확인되었다. 또한 Bcl-w는 위암 환자의 조직에서 위암 세포 특이적으로 발현될 수 있음도 관찰되었고, 더욱이 Bcl-w는 SAPK/JNK의 활성화를 억제함으로써 다양한 사멸 자극들로부터 위암 세포를 보호할 수 있음이 확인되었다. 이 모든 실험 결과에 미루어 Bcl-w가 위암 세포에서 하나의 생존 인자로 작용할 수 있으리라 사료된다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 세포, 항체 및 시약

위암 세포주인 SNU-1, SNU-16, SNU-620은 한국 세포주 은행에서 획득하였다. 본 연구에 사용된 모든 1차 항체들은 human antigens을 사용하여 획득되었으며, 이들중 Bcl-2, Bid, Bad, Bax, Bak과 SAPK/JNK 항체들은 Pharmingen/Transduction Laboratories (San Diego, CA, USA)에서 획득하였다. 또한, Bcl-w, Erk와 p38 항체들은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서, 그리고 anti-Fas는 upstate Biotechnology (Lake Placid, NY)에서, Bcl-xL은 Calbiochem (La Jolla, CA, USA)에서 각각 구입하였다. Recombinant c-Jun 단백질은 New England Biolabs (Beverly, MA, USA)에서, PD 98059와 SB 203580은 A.G.Scientific Incorporation (San Diego, CA, USA)에서, recombinant HGF는 R&D system Incorporation (Minneapolis, MN, USA)에서, 항암제인 etoposide는 Calbiochem (La Jolla, CA, USA)에서 획득하였다.

### 2. 세포 배양, transfection 및 처리

SNU-16 세포에 Bcl-w를 과다 발현하기 위해서는 pEF vector에 클로닝된 Bcl-w를 electroporation으로 transfection하고, hygromycin (0.5mg/ml)으로 transfectant를 선별하였다. 또한 MKK4의 dominant negative mutant를 발현하기 위해서는 이 유전자를 pcDNA vector에 클로닝하고 같은 방법으로 transfection 한 후 G418 sulfate (1mg/ml)를 사용하여 transfectant를 선별하였다. 선별된 transfectant 및 기타 모든 세포주들은 10%

heat-inactivated fetal bovine serum (FBS)와 50 $\mu$ g/ml gentamicine을 포함한 RPMI1640에서 배양하며 유지하였다. 사멸 자극들을 주기 위해서는 이들을  $1 \times 10^5$  cells/ml로 분주하고 anti-Fas (100-500ng/ml), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 $\mu$ M-250 $\mu$ M), etoposide (5 $\mu$ M-40 $\mu$ M)로 처리하였다. 또, 세포주들을 PBS로 두 번 씻은 후 0-1%의 FBS가 함유된 배양액으로 현탁하였다.

### 3. 세포 사멸 측정

다양한 시간동안 처리한 세포와 그렇지 않은 대조세포를 10 $\mu$ g/ml의 propidium iodide (PI)로 염색하고 PI 염색강도 (FL-2 channel)와 세포의 크기(foward light scatter)를 동시에 측정하는 multiparameter flow cytometry를 실시하였다. 이 때 PI 염색이 약하고 정상적인 크기를 나타내는 세포군을 viable cells로, 나머지 세포군은 dead cells로 인식하였다.<sup>38,39</sup>

### 4. Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 분석

RNA를 분리하기 위하여, 세포를 Tri-reagent (Sigma, St. Louis, MO)을 사용하여 파괴하고, chloroform 처리를 하여 15분 후에 12,000g에서 15분 동안 원심 분리하였다. 상층액을 새 tube에 옮겨 RNA를 isoprophyl alcohol로 침전시키고, 75% ethanol로 세척한 후, 이 건조된 침전물을 55 $^{\circ}$ C에서 dH<sub>2</sub>O-DEPC를 사용하여 다시 녹인 후, RNA의 양을 DU 650 spectrophotometer (Beckman, USA)으로 정량하였다.

Reverse transcription은 2.5  $\mu$ g RNA, 1.5 mM의 each dNTP, 0.5  $\mu$ g random hexamer, 0.1 M DTT와 10 units avian myeloblastosis virus

reverse transcriptase를 포함하는 용액 20 $\mu$ l를 94 $^{\circ}$ C에서 5분, 상온에서 10분, 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켰다.

cDNA를 증폭하기 위해서는 상기 반응 용액 4 $\mu$ l, 1 unit Taq DNA polymerase (Takara, Shiga, Japan), 0.2  $\mu$ M의 each dNTP와 25 pmol primers를 포함하는 용액 25 $\mu$ l를 GeneAmp PCR System 2400 (Perlin Elmer, USA)을 사용하여 18-24 cycles동안 증폭하였다. 각 cycle은 94 $^{\circ}$ C에서 30초간 denaturation, 60 $^{\circ}$ C에서 30초간 primer annealing과 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 확장을 하였다. 마지막 cycle이 끝난 다음 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 extension을 실시하였다. 본 연구에 사용된 primer는 하나의 strand (5' - CCT GTG CTG GAA CAC CCA G - 3')는 met1의 N-terminal region에 특별하고 또 다른 하나 (5' - CCA GAG TTT ATG GAA CAG AAC - 3')는 met2의 c-terminal region에 특별하다. RT-PCR 생산물의 10 $\mu$ l를 5% acrylamide gels에서 100V로 40분간 전기영동 후, 증폭 정도를 autoradiography로 비교하였다.

## 5. Western blot analysis

세포를 120 mM NaCl, 0.5% NP-40, 1 mM PMSF, 2  $\mu$ g/ml aprotinin 이 함유된 Tris-Cl (40mM, pH 8.0) 완충액으로 파괴한 후, 원심 분리하여 (1,500rpm, 15분, 4 $^{\circ}$ C) 상층액을 얻고, Bradford 방법으로 단백질을 정량하였다. 그런 후 동일양의 단백질 (100 $\mu$ g)을 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 통하여 100V에서 90분간 분리하고, 다시 전기력 (200mA, 55분)을 이용하여 Immobilon membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)으로 전이하였다. 이 막을 상온에서 10% 탈지분유로 3시간 동안 처리하고 200 mM Tris-Cl, 1.4 mM NaCl,



0.1% Tween 20이 함유된 용액에서 1차 항체를 반응시키고, horseradish peroxidase가 부착된 2차 항체를 사용하여 화학 발광법 (chemiluminescence, NEN<sup>TM</sup> Life Science, Boston, MA, USA)을 실시하였다.

## 6. In vitro kinase assay

세포를 50 mM Hepes buffer (pH 7.4), 100 mM NaCl, 10% glycerol, 1% NP-40, 1 mM EDTA (pH 8.0), 20 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM NaF와 protease inhibitors인 1 mM PMSF와 1 mM sodium orthovanadate 로 파괴한 후 원심 분리 (1,500rpm, 15분, 4°C)하여 상층액을 얻고 Bradford 용액으로 단백질을 정량하였다. 그런 후 동일양의 단백질 (400 $\mu$ g)을 원하는 1차 항체로 면역 침전을 실시하였다. 이 침전물을 20 mM Hepes (pH 7.4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 10 mM NaF, 1 mM DTT, 0.5 mM sodium orthovanadate, 50  $\mu$ M ATP와 10 $\mu$ Ci[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP가 함유된 완충액 (20 $\mu$ l)으로 용해하였다. Kinase 반응은 SAPK/JNK의 기질인 c-Jun을, 혹은 Erk와 p38의 기질인 PHAS-1을 2  $\mu$ g를 첨가하여 30°C에서 30분간 유도하였다. 기질들의 인산화 정도는 12% SDS-PAGE (100V, 100분)와 PhosphoImager (Tina 2.0 software 사용)를 사용하여 분석하였다.

## 7. 면역 조직 화학 염색

위암 조직의 파라핀 블록을 조직 절편으로 제작한 뒤 xylene으로 파라핀을 제거하였다. 100% ethanol, 95% ethanol, 80% ethanol에 각각 2분씩 담가 흡수한 후, 흐르는 물에 씻었다. Citrate buffer (0.01M, pH 6.0) 처리

(121°C, 1분)에 이은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3% in methanol) 처리 (15분)로 endogenous peroxidase를 불활성화하였다. 이것을 PBS 용액으로 5분씩, 3회 세정하였다. 세정이 끝난 조직은 biotin 표지 2차 항체가 비 특이적으로 절편과 반응하는 것을 막기 위해 blocking 용액을 20분간 처리했다. 그런 후 goat anti-human Bcl-w IgG을 1/50로 희석하여 처리하고 4°C에서 overnight incubation했다. 0.05% Tween이 함유된 PBS로 5분씩 3회 세정후, biotinylated donkey anti-goat IgG (Santa Cruz Biotechnology)를 1/50로 희석하여 처리하고 상온에서 30분간 incubation하여 PBS로 5분씩 3회 세정하였다. 발색물질 (chromogen)인 3'3'-diaminobenzidine (DAB)을 처리하고 DW로 세정하여 관찰하였다. 대조 염색으로 핵을 염색하기 위해 hematoxylin으로 5회 dipping하고 DW로 세정하였다. 과정이 끝난 slide는 수세 후 80% ethanol, 95% ethanol, 100% ethanol로 2분씩 탈수하였다. Xylene으로 반응하고 mounting하여 보관하였다.

## 8. DNA microarray assay

상술한 방법으로 획득한 RNA를 Incyte corporation에 의뢰하여 9,800 개의 DNA spot을 분석하였다.

### III. 결과

#### 사멸 자극들에 대한 위암 세포주들의 반응도 비교

SNU-1, SNU-16과 SNU-620 세포들을 다양한 방법으로 처리하고, 그들의 반응도를 비교하고자 하였다. 이를 위하여 10% FBS 존재 하에서 anti-Fas (100-500ng/ml), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50-250 $\mu$ M), etoposide (5-40 $\mu$ M)로 처리하거나, 이 세포들을 세척한 후 0-1% FBS가 함유된 배양액으로 현탁하였다. 이러한 처리를 40시간 지속한 후 세포의 생존도를 flow cytometer로 측정한 결과, 이 모든 처리에 대하여 SNU-1과 SNU-16 세포들은 SNU-620 세포보다 더 민감하게 사멸함이 확인되었다 (Fig. 1). SNU-1, SNU-16과 SNU-620 세포들이 같은 위암 세포주임에도 불구하고 사멸 자극들에 대한 반응도가 다르다는 사실에 근거하여, 이들의 특성을 비교 연구함으로써 위암 세포의 생존 기전을 이해하고자 하였다.

#### DNA microarray assay를 통한 유전자 발현 비교

사멸 자극에 민감한 SNU-1 세포와 그렇지 않은 SNU-620 세포에서 차별적으로 발현되는 유전자를 찾기 위하여 DNA microarray assay를 수행하였다. 9,800개의 DNA spot을 분석한 결과, 이들 중 c-met을 포함한 114개가 SNU-620에서 상대적으로 많이 발현됨이 확인되었다 (Table 1).

#### c-met의 기능 분석

다른 세포에서 생존 신호를 유도할 수 있는 c-met이 상대적으로 낮은 사

멸 반응을 보이는 SNU-620에서 많이 발현된다는 관점에서 c-met이 위암 세포의 세포 사멸을 억제할 가능성이 제기되었다. 먼저, c-met의 발현 양상을 좀 더 확인하기 위하여 SNU-1, SNU-16과 SNU-620 세포들에서 c-met의 발현 정도를 RT-PCR로 비교하였다. 18-24 cycles의 RT-PCR을 수행한 결과, c-met의 발현은 SNU-620에서 가장 높은 것이 확인되었으며, SNU-1에서는 RT-PCR을 24 cycles 수행하여도 발현이 되지 않았고, SNU-16에서는 발현은 되었으나 SNU-620에 비하여 상대적으로 낮았다 (Fig 2). c-met이 위암 세포주에서 실제로 세포 사멸 억제 효과를 나타내는지 조사하기 위하여 c-met을 발현하는 SNU-16 세포의 사멸이 c-met의 ligand인 HGF에 의하여 억제되는지를 조사하였다. 그러나, anti-Fas 및 etoposide에 의한 세포 사멸은 HGF (0.5-5unit/ml)에 의하여 사멸이 억제되지 않았고, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 serum withdrawl의 세포 사멸 작용은 오직 미약하게 억제되었다. 따라서, c-met이 이 모든 사멸 자극들로부터 위암 세포를 보호하는 인자는 아니라고 생각되었다.

#### 위암 세포주에서 Bcl-w의 발현 및 기능

세포 사멸을 조절하는 주된 인자로는 Bcl-2 family protein들을 들 수 있다. 따라서 이들의 발현 정도를 western blotting으로 비교하였다. Fig. 3에서 보듯이, Bak, Bax, Bid, Bcl-xL의 발현 정도는 SNU-1, SNU-16, SNU-620에서 비슷하게 나타났다. Bad와 Bcl-2의 발현 정도는 SNU-1에서 가장 많이 발현되었고, Bcl-w는 SNU-1과 SNU-620에서 높은 발현을 보였다. SNU-1이 pro-apoptotic인자인 Bad와 pro-survival 인자인 Bcl-2와 Bcl-w도 상대적으로 많이 발현한다는 사실에 미루어, SNU-1이 사멸 자극에 민감한 이유를 Bcl-2 family protein들만 사용하여 해석하기는 어려워 보였고, 아마도 다른 인자들의 영향도 있으리라 추정되었다. 그러나 SNU-16

과 SNU-620을 비교하면 조사한 Bcl-2 family protein들 중 오직 Bcl-w만이 발현에 차이를 보였다. 즉, Bcl-w의 발현이 SNU-620에서 선택적으로 낮다는 사실은 Bcl-w가 최소한 SNU-16과 SNU-620사이의 사멸 반응의 차이를 유도한다고 예상되었다. 이 가능성을 조사하기 위하여 Bcl-w를 과발현하는 SNU-16 transfectant와 그렇지 않은 대조 transfectant를 각각 확립하였다 (Fig. 5(A)). 이들에 anti-Fas, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, etoposide, serum withdrawl를 처리하여 세포 사멸 정도를 비교한 결과, Bcl-w가 과발현된 세포에서는 이 모든 자극들에 의한 세포 사멸이 모두 억제됨이 관찰되었다 (Fig. 5(C)). 따라서, Bcl-w는 anti-Fas, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, etoposide, serum withdrawl로부터 위암 세포를 보호할 수 있는 인자라고 생각되었다.

#### 위암 세포 사멸에서 SAPK/JNK의 역할

Bcl-w의 작용 기전을 이해하기 위해서는 위에서 사용한 사멸 자극들이 위암 세포를 사멸하는 기전을 먼저 확립할 필요성이 대두되었다. 특히, 다양한 다른 실험 조건에서 유도되는 세포 사멸이 SAPK/JNK에 의해서 매개된다는 사실에 미루어,<sup>48-51</sup> SAPK/JNK가 본 실험 조건에서 유도되는 세포 사멸에도 관여할 가능성을 조사하였다. 이를 위하여 anti-Fas, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, etoposide, serum withdrawl이 위암 세포에서 SAPK/JNK를 활성화 할 가능성을 in vitro kinase assay로 분석하였고, 그 결과, 이 모든 사멸 자극들은 빠르고 일시적인 SAPK/JNK 활성화를 유도하였다 (Fig. 4(A)). 이러한 현상은 사멸 자극 처리 후에 5분 (anti-Fas, serum withdrawl), 15분 (etoposide)과 30분 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)에 가장 적절하게 관찰되었다. 그러나 Erk와 p38와 같은 다른 MAPK family member들의 활성화는 관찰되지 않았다 (Fig. 4(A)).

SAPK/JNK의 기능을 확인하기 위하여 그 상위 신호 전달 인자인 MKK4의 dominant negative mutant를 SNU-16 세포에 발현하였다. 이러한 처리는 anti-Fas, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, etoposide, serum withdrawl에 의해 유도되는 SAPK/JNK의 활성화를 효과적으로 차단하였고, 또한 그들의 세포 사멸 작용도 억제하였다 (Fig. 4(C)). 이에 반하여 Erk와 p38의 억제제인 PD 98059와 SB 203580은 세포를 보호하는 효과를 나타내지 않았다 (data not shown). 이상의 실험 결과에 미루어 anti-Fas, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, etoposide, serum withdrawl는 SAPK/JNK를 통하여 위암 세포를 사멸하리라 생각되었다.

### Bcl-w에 의한 SAPK/JNK의 활성화 억제

상기 결론에 미루어, Bcl-w는 SAPK/JNK 활성화를 억제함으로써 위암 세포를 보호할 가능성이 제기되었다. 이를 확인하기 위하여 Bcl-w를 과다 발현시킨 SNU-16 transfectant와 그렇지 않은 대조 transfectant를 anti-Fas, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, etoposide, serum withdrawl로 처리하고 SAPK/JNK의 활성화 정도를 비교하였다. 그 결과, Bcl-w를 과다 발현하는 세포에서는 처리한 모든 자극들에 의한 SAPK/JNK의 활성도가 감소됨이 관찰되었다 (Fig. 5(B)). 따라서 Bcl-w는 SAPK/JNK 활성을 억제함으로써 다양한 사멸 자극들로부터 위암 세포를 보호한다고 생각되었다.

상술한 기전이 SNU-620의 생존 기전으로 적용될 가능성을 조사하기 위해서, anti-Fas, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, etoposide, serum withdrawl에 의한 SAPK/JNK의 활성화 정도를 SNU-16 과 SNU-620 세포를 사용하여 비교하였다. 그 결과 조사한 모든 사멸 자극들에 의해 효과적으로 활성화되는 SAPK/JNK가 SNU-620 세포에서는 상대적으로 억제됨을 볼 수 있었다 (Fig. 6). Bcl-w를 상대적으로 많이 발현하는 SNU-620 세포에서는 SAPK/JNK의 활성도가 감

소되어 있다는 사실에 미루어, Bcl-w에 의한 SAPK/JNK 활성화 억제가 SNU-620 세포가 다양한 사멸 자극들에 저항하는 하나의 기전이라 생각되었다.

#### **위암 환자 조직에서 Bcl-w의 발현**

Bcl-w가 위암 세포의 사멸을 억제한다는 *in vitro* 실험 결과에 근거하여, 이 단백질이 위암 환자에서 발현될 가능성을 조사하였다. 이를 위하여 advanced gastric adenocarcinoma 환자의 조직 표본을 Bcl-w 항체를 사용하여 면역 화학 염색하였다. 다섯 환자를 조사한 결과, 그 중 두 case에서 Bcl-w의 발현이 관찰되었다. 특히 Bcl-w의 발현은 위암 세포에 특이적으로 나타났으며 주변 정상 세포에서는 인식되지 않았다. 이러한 실험 결과는 Bcl-w가 실제로 위암 환자에서 암 세포에 특이적으로 발현될 수 있음을 제시한다.

#### IV. 고찰

위암 세포의 생존 기전을 조사하기 위하여 본 연구에서는 SNU-1, SNU-16, SNU-620 위암 세포주들을 사용한 비교 연구를 실시하였다. 흥미롭게도, SNU-620 세포는 SNU-1과 SNU-16 세포들에 비하여 anti-Fas, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, etoposide, serum withdrawl과 같은 다양한 사멸 자극들에 저항함이 관찰되어 이러한 현상의 기전을 탐구하고자 하였다. 먼저 모든 사멸 자극들에 대한 감수성이 높은 SNU-1 세포와 감수성이 낮은 SNU-620 세포에서 차별적으로 발현되는 유전자를 DNA microarray assay로 조사하였다. 그 결과 조사한 9,800개의 유전자 중에서 114개가 SNU-620 세포에서 3배 이상 높게 발현됨이 확인되었다. 이는 위암 세포의 생존이 어느 한 인자가 아닌 multiple factor에 의존할 가능성을 제시한다. 과연 114개 유전자 모두가 위암 세포의 생존에 관여하는지는 향후에 세밀히 조사되어야 하지만, c-met이 SNU-620에서 높게 발현되는 현상은 본 연구에서 RT-PCR로 다시 한번 확인하였다. 그러나, SNU-16 세포를 c-met의 ligand인 HGF로 처리하였을 때, 이 세포가 c-met를 발현함에도 불구하고 anti-Fas 및 etoposide에 의한 세포 사멸은 억제되지 않았으며, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 serum withdrawl의 세포 사멸 작용은 오직 미약하게 억제되었다. 따라서, HGF/c-met system이 일부 사멸 자극들로부터 위암 세포를 어느 정도 보호할 수는 있지만, 본 연구에 사용한 모든 자극들의 세포 사멸 기능을 억제하는 인자는 아니라고 생각된다.

본 연구의 주목할 만한 결과 중의 하나는 Bcl-w가 위암 세포에서 anti-Fas, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, etoposide, serum withdrawl의 모든 사멸 자극들의 사멸 작용을 억제할 수 있는 인자라는 것이다. 이러한 사실은 SNU-16이 SNU-620과 비교하여 유독 Bcl-w의 발현만이 상대적으로 낮다는 사실로부터 유추되었고, 실제로 Bcl-w를 SNU-16에 과다 발현하였을 때 네 가지 사멸 자극



모두에 대한 감수성이 감소되었다. 이와 유사하게 Bcl-w가 hematopoietic과 장 상피 세포에서 dexamethsone, 5-florouracil, IL-3-deprivation에 의한 세포 사멸을 억제한다고 보고되었다.<sup>20,21,26</sup> 따라서 Bcl-w는 receptors ligands, cytotoxic drugs와 environmental stresses와 같은 다양한 사멸 자극들로부터 위암 세포를 보호할 수 있다고 믿어진다. 특히 위암 환자의 조직을 조사하였을 때, Bcl-w가 정상 세포에 비하여 위암 세포에서 선택적으로 발현될 수 있다는 사실에 미루어, Bcl-w는 위암 세포에서 하나의 생존 인자로 작용할 가능성이 있다고 믿어진다.

Bcl-w가 암 세포의 생존 인자로 작용할 가능성은 위암에만 국한된 것은 아닌 것 같다. 일 예로, Bcl-w knockout mouse를 5-florouracil와  $\gamma$ -radiation으로 처리를 하였을 때 정상 mouse와 비교하여 장 상피 세포가 매우 민감하게 사멸함이 보고되었다.<sup>25</sup> 또한 Bcl-w는 다양한 대장암 세포주 뿐만 아니라 대장암 환자 조직에서도 빈번하게 발현되는 것으로 보고되었다.<sup>26,27</sup> 이러한 보고에 미루어, 사멸 자극들로부터 대장암을 보호하는 중요한 인자일 가능성이 높다할 수 있다. 그러나 유방암 및 자궁암 환자에서는 Bcl-w의 발현이 전무하거나 아주 낮은 것으로 제기된 바 있다.<sup>26</sup> 이러한 기존의 연구와 본 연구 결과를 종합하여 고려해 보건데, Bcl-w의 발현은 최소한 소화기 계통의 암에서는 중요하리라 생각된다.

본 연구의 또 다른 중요한 결론 중의 하나는 Bcl-w가 SAPK/JNK의 활성화를 방해함으로써 위암 세포의 사멸을 억제한다는 것이다. 먼저, 본 연구에 사용된 모든 사멸 자극들이 SAPK/JNK의 활성화를 통하여 위암 세포를 사멸하였고, 이러한 SAPK/JNK의 활성화 및 세포 사멸이 Bcl-w를 과발현하는 SNU-16 transfectant 및 SNU-620 세포에서 억제되었다. 이러한 연구 결과는 Bcl-w의 세포 사멸을 처음으로 규명한 것이라는 점에서 그 의미가 있다 할 수 있다.

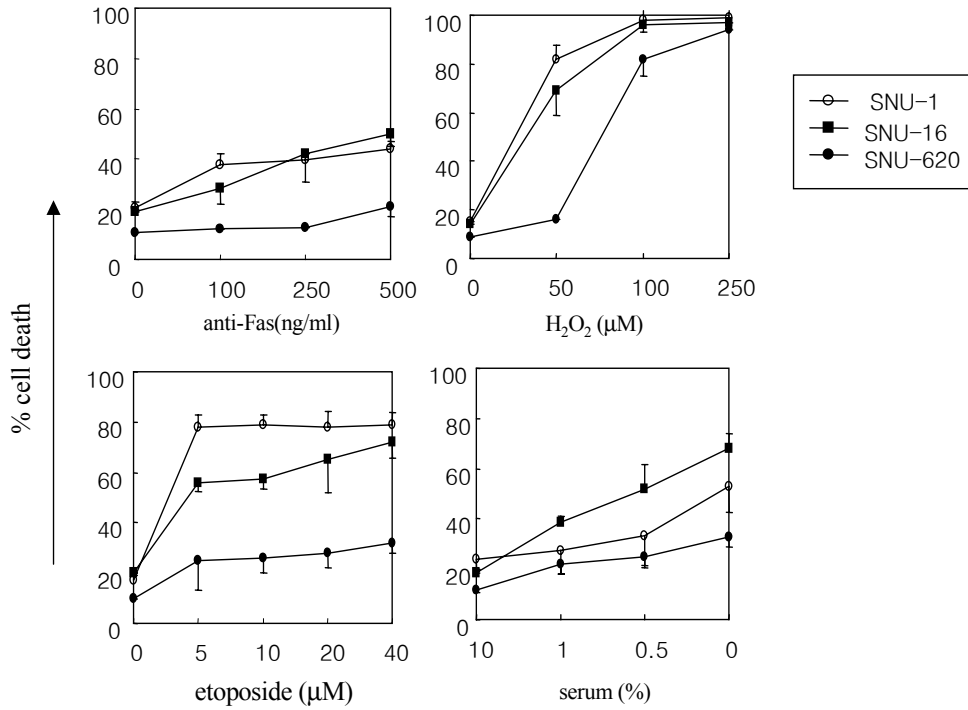
흥미롭게도, 기존의 연구 결과와 본 연구 결과를 비교하여 보면 Bcl-w는 다른 pro-survival Bcl-2 family member, 특히 Bcl-2와 그 작용 양상에 다음과 같은 유사성을 나타낸다. (i) Bcl-w는 Bcl-2와 마찬가지로 미토콘드리아와 nuclear envelopes에 위치한다고 보고되었다.<sup>22,40</sup> (ii) 또한 Bcl-w, Bcl-2 모두 미토콘드리아에서 pro-apoptotic Bcl-2 family member 들과 결합할 수 있으며 cytochrome C의 유출을 감소시킨다고 알려져 있다.<sup>22,41-43,45</sup> (iii) 그리고 Bcl-w가 SAPK/JNK 활성을 억제하는 본 연구 결과와 유사하게 Bcl-2도 SAPK/JNK 활성화를 억제한다고 보고되었다.<sup>10-12,46,47</sup> (iv) 본 연구에서는 anti-Fas로 유도되는 위암 세포 사멸을 Bcl-w가 억제한다고 하였지만, hematopoietic cells에서는 anti-Fas에 의한 세포 사멸을 억제하지 않았다고 보고되었다.<sup>20,22,23</sup> Bcl-2도 세포 종류에 따라서 anti-Fas로 유도되는 세포 사멸을 억제한다고 제시되었다.<sup>22,44</sup> 따라서 pro-survival Bcl-2 family member들의 작용 기전은 진화상 공통적으로 보존되어 온 것이라 추정된다.

결론적으로 본 연구자는 위암 세포에서 Bcl-w의 발현, 작용 양상 및 그 기전에 대한 연구를 수행하였다. 그 결과는 Bcl-w가 위암 세포주 및 위암 환자에서 발현될 수 있으며, Bcl-w의 발현은 SAPK/JNK의 활성화를 방해함으로써 위암 세포 사멸을 억제함을 제시한다. 따라서, Bcl-w는 위암 세포의 중요한 생존 인자 중의 하나라고 판단된다.

## V. 결론

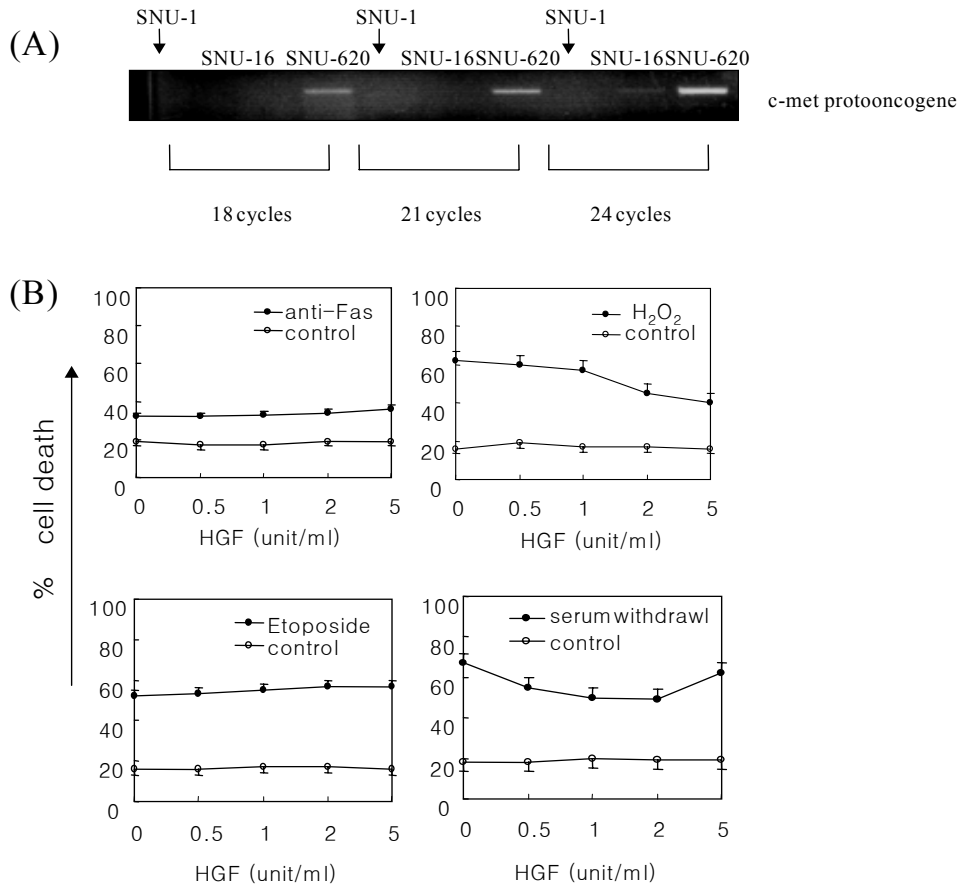
1. SNU-620은 SNU-1과 SNU-16에 비해 저항성이 높다.
2. SNU-620은 Bcl-w를 상대적으로 많이 발현한다.
3. Bcl-w는 anti-Fas, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, etoposide, serum withdrawl에 의한 위암 세포 사멸을 억제한다.
4. 이러한 모든 자극들은 SAPK/JNK를 통하여 위암 세포를 사멸한다.
5. Bcl-w는 이러한 자극들로 유도되는 SAPK/JNK 활성화를 억제한다.
6. Bcl-w는 위암 환자에서 암 세포에 특이적으로 발현될 수 있다.
7. 따라서 Bcl-w는 일부의 위암 세포에서 중요한 생존 인자 중 하나라고 판단된다.

## Figure Legends



**Fig 1. Differential susceptibility of SNU-1 cells, SNU-16 cells, SNU-620 cells to death stimuli.**

SNU-1, SNU-16과 SNU-620 세포들을 10% FBS 존재 하에서 anti-Fas (100-500ng/ml), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50-250μM)와 etoposide (5-40μM)로 처리하거나, 이 세포주들을 세척한 후 0-1%의 FBS가 함유된 배양액으로 현탁하였다. 이러한 처리를 40시간 지속한 후, 세포의 생존도를 flow cytometer로 측정하였다.



**Fig 2. Expression and function of c-met and differential susceptibility in gastric cancer cells to death stimuli.**

(A) SNU-1, SNU-16과 SNU-620 세포들에서 c-met mRNA의 발현 정도를 RT-PCR로 비교하였다.

(B) SNU-16 세포를 다양한 농도 (0-5unit/ml)의 HGF 존재 하에서 anti-Fas (100ng/ml), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 $\mu$ M), etoposide (5 $\mu$ M) 및 serum withdrawl 로 처리하였다. 이러한 처리를 24시간 지속한 후, 세포의 생존도를 비교하였다.

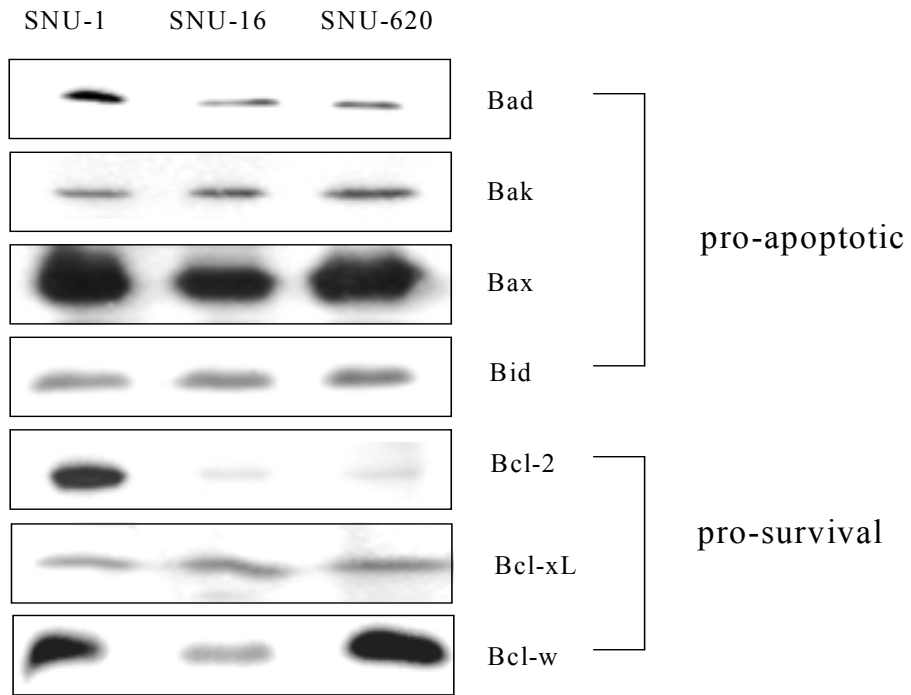
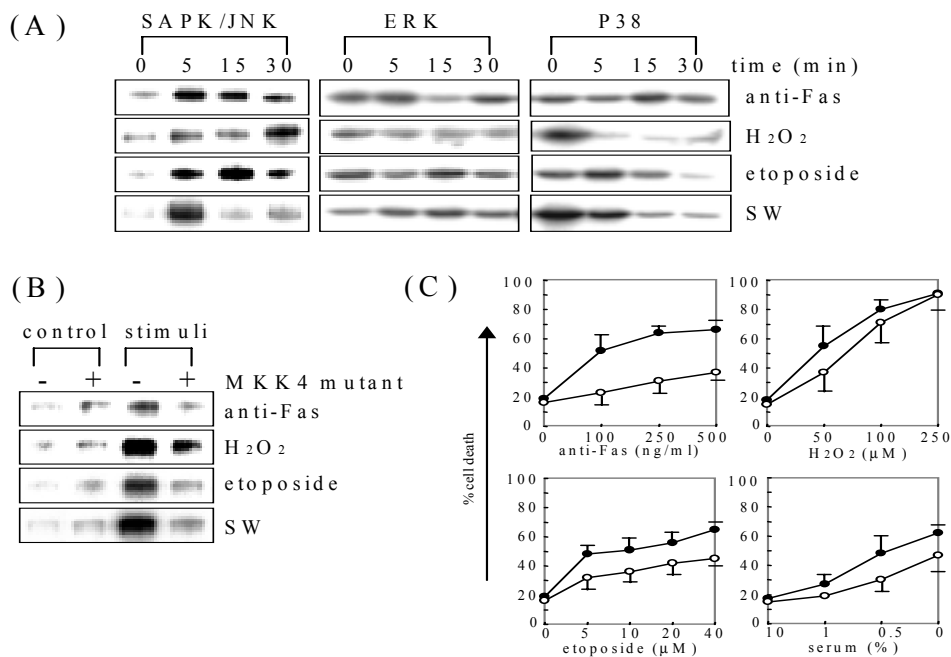


Fig 3. Comparison of Bcl-2 family member levels between SNU-1, SNU-16 and SNU-620 cells.

SNU-1, SNU-16과 SNU-620 세포들에서 Bcl-2 family protein들의 발현 정도를 western blotting으로 비교하였다.



**Fig 4.** SAPK/JNK is a common mediator of the SNU-16 cell death induced by anti-Fas, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, etoposide, and serum withdrawal.

(A) SNU-16 세포를 anti-Fas (100ng/ml), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100μM), etoposide (5μM)와 serum withdrawl로 다양한 시간 처리한 후, SAPK/JNK, Erk, p38의 활성을 in vitro kinase assay로 비교하였다. SAPK/JNK의 기질은 recombinant c-Jun을, Erk와 p38의 기질로는 PHAS-1을 사용하였다. (B) SNU-16 세포에 MKK4의 dominant negative mutant를 발현시키고 이 세포와 그렇지 않은 대조 세포를 anti-Fas (100ng/ml) 5분, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100μM) 30분, etoposide (5μM) 15분, serum withdrawl 5분으로 처리하고 SAPK/JNK 활성을 비교하였다. (C) 이러한 처리를 40시간 지속한 후, 세포의 생존도를 비교하였다 (closed circle : control transfectant, open circle : MKK4 mutant).

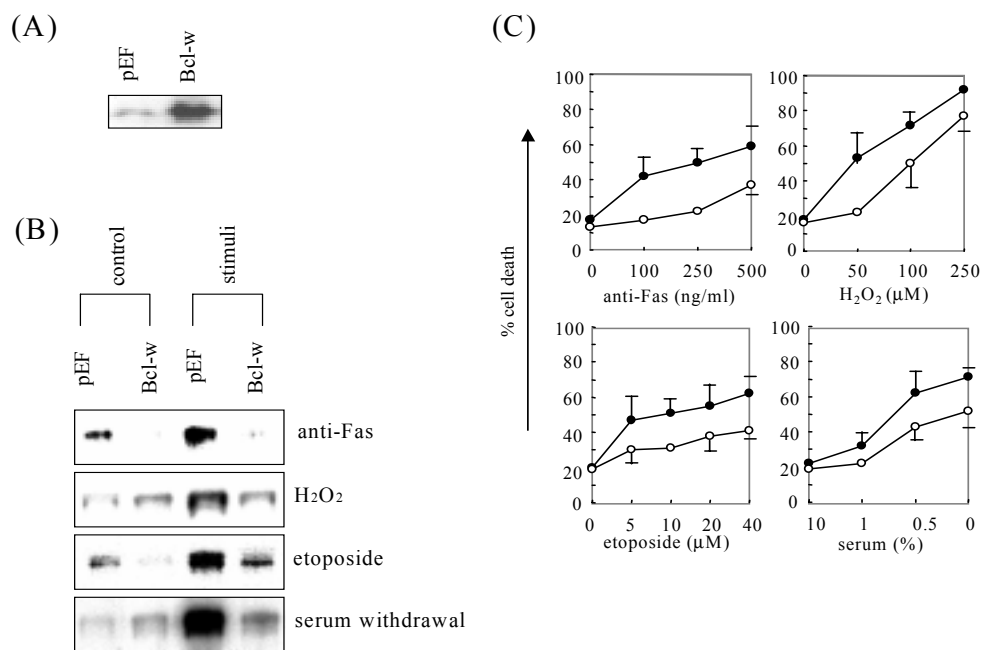


Fig 5. Bcl-w suppresses gastric cancer cell death by blocking the SAPK/JNK activation.

(A) SNU-16 세포에 control pEF vector 또는 Bcl-w cDNA vector 를 안정하게 transfection하고 Bcl-w의 발현을 western blotting으로 비교 하였다. (B) 이 transfectants에 anti-Fas (100ng/ml) 5분, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100μM) 30분, etoposide (5μM) 15분, serum withdrawl 5분을 처리하고 SAPK/JNK 활성을 비교하였다. (C) 이러한 처리를 40시간 지속한 후, 세포 생존도를 비교하였다 (closed circle : control transfectant, open circle : Bcl-w transfectant).



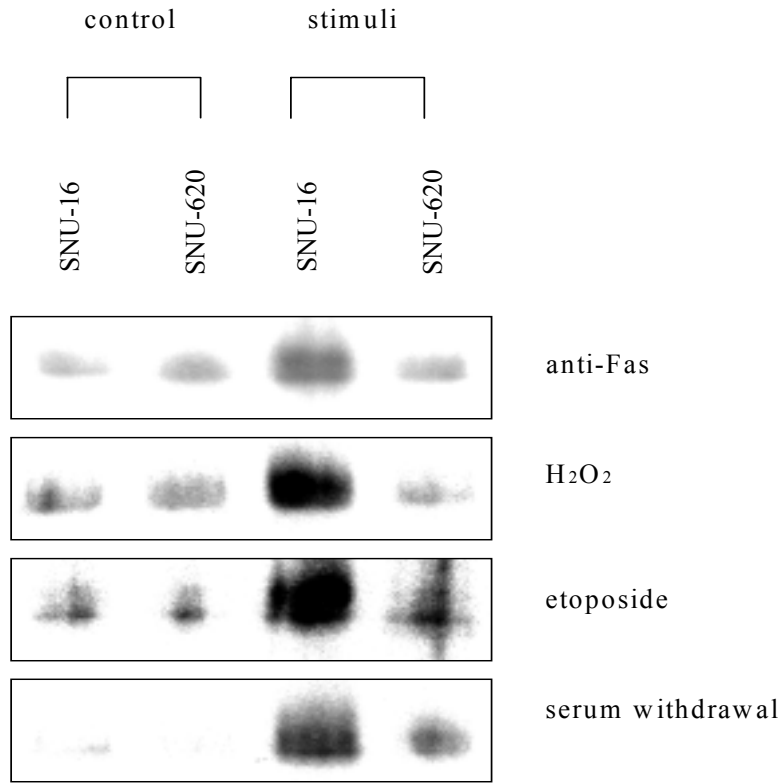


Fig 6. Suppression of SAPK/JNK activation in SNU-620 cells.

SNU-16과 SNU-620 세포들을 anti-Fas (100ng/ml) 5분, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100μM) 30분, etoposide (5μM) 15분, serum withdrawal 5분으로 처리하였다. 처리한 세포군과 처리하지 않은 세포군의 SAPK/JNK 활성을 비교하였다.

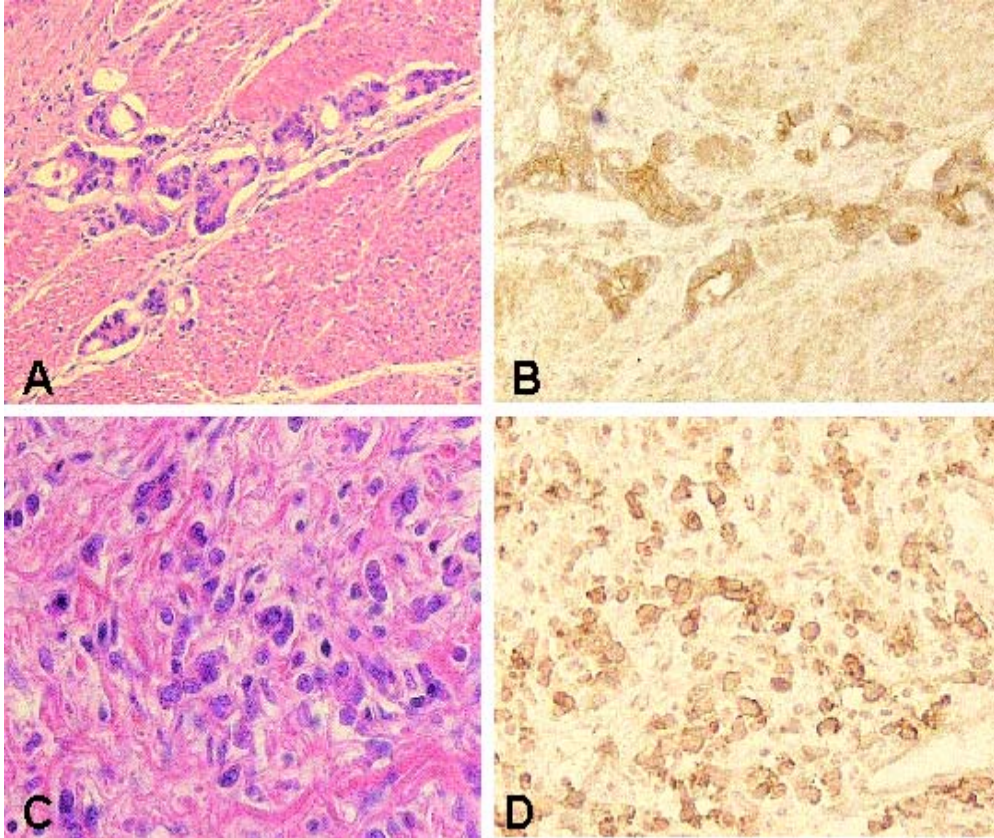


Fig 7. Expression of Bcl-w in AGC patients.

AGC 환자로부터 암 조직 표본을 획득하여 파라핀 블록을 만들고 면역 화학 염색 (B, D)을 하여, Bcl-w 발현을 분석하였고 대조 염색으로 hematoxylin 염색(A, C)을 하였다. 결과는 암 조직의 glands (A, B)와 세포 (C, D)에만 특이적으로 발현됨을 확인하였다.

Table 1. Comparison of DNA microarray assay between SNU-1 cells and SNU-620 cells. - 114 genes were expressed in SNU-620 cells to higher levels than in SNU-1 cells.

Spot NO	발현 차이	유전자
1	36.4	Human nonspecific cross-reacting antigen(NCA) mRNA
2	27.7	Human mRNA for calcium-binding protein S100P
3	22.0	Human neutrophil-activating ENA-78 prepeptide gene
4	18.2	Sequence 117 from Patent W0995340
5	16.4	Human keratin 18 mRNA
6	15.1	Human nonspecific crossreacting antigen mRNA
7	13.8	Human annexin 14 (ANX14)mRNA
8	13.4	Human pregnancy-specific beta-glycoprotein mRNA
9	12.9	Human CO-029
10	12.6	Human keratin 18 mRNA
11	12.2	Human PSG9 mRNA for pregnancy specific glycoprotein 9
12	11.3	Human Keratin 18 (KRT18) gene
13	11.2	putative secreted protein XAG
14	11.0	Human pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 11 (PSG11)
15	10.7	Human p27 mRNA
16	10.5	Human 11kd protein mRNA
17	10.4	Human mRNA for squalene epoxidase
18	10.3	Human pepsinogen gene, exon 9, clone PCG401
19	10.0	Human mRNA; cDNA DKFZp564B1264
20	9.2	Human cDNA: FLJ21279 fis, clone COLO1871

Spot NO	발현 차이	유전자
21	9.0	Human mRNA for KIAA0180 gene
22	8.9	Human mRNA for met proto-oncogene
23	7.9	Human KRT8 mRNA for keratin 8
24	7.8	Human GW112 protein (GW112) mRNA
25	7.6	REMOVED FROM DATABASE
26	7.5	Human (clone L6) E-cadherin (CDH1) gene, exon 16
27	7.1	Human mRNA for plakoglobin
28	6.9	Human vacuolar protein pump 116 kDa accessory subunit
29	6.9	Human keratin 18 mRNA
30	6.3	Human ADP/ATP carrier protein (ANT-2) gene
31	6.2	Human mRNA for rapa-2 (rapa gene)
32	6.2	Human cDNA: FLJ21165 fis, clone CAS10833
33	6.1	Human full length insert cDNA clone YB24D08
34	6.0	Human pleckstrin protease mRNA
35	6.0	Human pleckstrin protease mRNA
36	5.9	Human mRNA ; cDNA DKFZp434C107
37	5.9	Human zinc finger transcriptional regulator (GOS24) gene
38	5.8	Sequence 27 from Patent WO9954448
39	5.5	Incyte EST
40	5.4	Human NK4 mRNA
41	5.4	Human aspartyl protease (BACE2) mRNA
42	5.3	Human mRNA for integrin beta(4)subunit
43	5.1	Human mRNA ; cDNA DKFZp434C107
44	5.0	Human KRT8 mRNA for keratin 8

Spot NO	발현 차이	유전자
45	4.9	Human chloride channel protein 7 (CLCN7) mRNA
46	4.9	Sequence 102 from Patent WO9953040
47	4.9	Human collagenase and stromelysin genes
48	4.9	Human cDNA FLJ11513 fis, clone HEMBA 1002215
49	4.8	Human mRNA for galectin-4
50	4.8	Human matrilpatase mRNA
51	4.7	Human zinc finger transcriptional regulator (GOS24) gene
52	4.7	Sequence 30 from patent WO9947669
53	4.7	Human antigen CD9 gene, exon 8
54	4.5	Human cDNA FLJ20276 fis, clone KAIA294
55	4.5	Human Kruppel-like factor 5 (KLF5) mRNA
56	4.5	Human cDNA: FLJ20171 fis, clone COLO9761
57	4.5	Human X104 mRNA
58	4.4	Sequence 122 from patent WO9954461
59	4.4	Human glutathione S-transferase a4-4 (GSTA4) mRNA
60	4.3	Human cDNA : FLJ22228 fis, clone HRCO1786
61	4.2	Human mRNA for KIAA0021 protein, partial CDs
62	4.3	Human 50 kDa type I epidermal keratin gene
63	4.2	Human occludin mRNA
64	4.1	cDNA: FLJ22774 fis, clone HRCO1786
65	4.0	cardiac muscle tensin
66	3.9	Human carboxyl terminal LIM domain protein(CLIMI)mRNA
67	3.8	Human mRNA for lipocortin II
68	3.8	Human MHC class II DR beta mRNA

Spot NO	발현 차이	유전자
69	3.8	Human cytokine (GRO-beta) mRNA
70	3.7	Sequence 30 From Patent WO9947669
71	3.7	Human episialin variant A mRNA, 3' end
72	3.6	Human ppar gamma gene for perxisome proliferator
73	3.5	Human BDR-2 mRNA for hippocalcin
74	3.5	Human T-cell receptor beta locus, 3' trysinogen repeats
75	3.5	Human serine protease-like protease (nes1) mRNA
76	3.5	Human microsomal glutathione S-transferase 2 mRNA
77	3.5	Human mRNA expressed in thyroid gland
78	3.5	Human cDNA : FLJ22657 fis, clone HSI07791
79	3.5	Human serine protease inhibitor kazal type 1 (SPINK1) gene
80	3.4	Human Ets-related transcription factor (ERT) mRNA
81	3.4	Human carcinoembryonic antigen (CEA) gene, exon 7
82	3.4	Human cDNA FLJ11888 fis, clone HEMBA1007243
83	3.4	Human Na,K-ATPase beta subunit (ATP1B) gene, exon 3
84	3.4	Human mRNA for CD44E (epithelial form)
85	3.3	Human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase isozyme 1
86	3.3	Human mitochondrial creatine kinase (CKMT) gene
87	3.3	Human cDNA FLJ13593 fis, clone PLACE009493
88	3.3	Human ADDL mRNA for adducin-like protein
89	3.3	Human mRNA mRNA for TGF-beta superfamily protein
90	3.3	Human prostaglandin E2 receptor mRNA
91	3.3	Human mRNA for matrilin-3
92	3.2	Human serine protease mRNA

Spot NO	발현 차이	유전자
93	3.2	testosterone 16-alpha-hydroxyxylase
94	3.2	Human cDNA : FLJ21873 fis, clone HEPO2484
95	3.2	Human mRNA for KIAA6517 protein, partial CDs
96	3.2	Human mRNA for p cadherin
97	3.2	Human mRNA for KIAA0389 gene
98	3.2	Human rasGAP-related protein (IQGAP2) mRNA
99	3.1	Human mRNA for insulin-like growth factor binding protein
100	3.1	Human mesothelin or CAK1 antigen precursor mRNA
101	3.1	Human mRNA for neuromedin U
102	3.1	Human cDNA: FLJ23044 fis, clone LNG02454
103	3.1	Human cDNA: FLJ21212 fis, clone COL00502
104	3.1	Human chemokine alpha 3 (CKA-3) mRNA
105	3.0	thymosin beta-10
106	3.0	Sequence 8 from Patent WO9955858
107	3.0	Human retionic acid inducible factor (MK) gene exon 1-5
108	3.0	Human cDNA: FLJ22998 fis, clone KAT11985
109	3.0	Human mRNA for phenylalklamine binding protein
110	3.0	Human IL-17B receptor (IL17BR) mRNA
111	3.0	Human IgG Fc receptor hFcRn mRNA
112	3.0	Human gro (growth regulated) gene
113	3.0	Human arylceramide deacetylase mRNA
114	2.9	Human cysteine-rich heart protein (hCRHP) mRNA

## 참고문헌

1. J Houghton, JG Fox, TC Wang Helicobacter pylori and other causes of gastric ulceration. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2002 ; 17 : 495-502.
2. P Pisani, DM Parkin, F Bray, J Ferlay Estimates of the world mortality from 25 cancers in 1990. *Int. J. Cancer* 1999 ; 83 : 18-29.
3. XM Zhou, BCY Wang, XM Fan, HB Zhang, MCM Lin, HF Kung, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis in gastric cancer cells through up-regulation of bax and bak. *Carcinogenesis* 2001 ; 22 : 1393-1397.
4. P Ernst Review article : the role of inflammation in the pathogenesis of gastric cancer. *Aliment Pharmacol. Ther.* 1999 ; 13(suppl.1) : 13-18.
5. T Watanabe, M Tada, H Nagai, S Sasaki, M Nakao Helicobacter pylori infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. *Gastroenterology* 1998 ; 115 : 642-648.
6. HHX Xia, NJ Talley Apoptosis in gastric epithelium induced by Helicobacter pylori infection: Implications in gastric carcinogenesis. *The American Journal of Gastroenterology* 2001 ; 96 : 16-26.



7. Y Hippo, H Taniguchi, S Tsutsumi, N Machida, JM chong, M Fukayama, et al. Global gene expression analysis of gastric cancer by oligonucleotide microarrays. *Cancer Research* 2002 ; 62 : 233-240.
8. H suzuki, H ishii Nitric oxide, helicobacter pylori and gastrointestinal disorders. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2000 ; 15(suppl.) : 46-54.
9. N Inohara, TS Gourley, R Carrio, M Muniz, J Merino, I Garcia, et al. Diva, a Bcl-2 homologue that binds directly to Apaf-1 and induces BH3-independent cell death. *The Journal of Biological Chemistry* 1998 ; 273 : 32479-32486.
10. JM Adams, S Cory The bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science* 1998 ; 281 : 1322-1326.
11. B Antosson, JC Martinou The Bcl-2 protein family. *Experimental Cell Research* 2000 ; 256 : 50-57.
12. K Maundrell, B Antonsson, E Magnenat, M Camps, M Muda, C Chabert, et al. Bcl-2 undergoes phosphorylation by c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinases in the presence of the constitutively active GTP-binding protein Rac1. *Journal of Biological Chemistry* 1997 ; 272 : 25238-25424.

13. B Antonsson, F Conti, AM Ciavatta, S Montesuit, S Lewis, I Martinou, et al. Inhibition of Bax channel forming activity by Bcl-2. *Science* 1997 ; 277 : 370-372.
14. S Lewis, SS Bethell, S Patel, JC Martinou, B Antonsson Purification and biochemical properties of soluble recombinant human Bax. *Protein Exp. Purif.* 1998 ; 13 : 120-126.
15. B Antonsson, S Montessuit, S Lauper, R Eskes, JC Martinou Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome C release from mitochondria. *Biochem. J.* 2000 ; 345 : 271-278.
16. L O'Connor, A Strasser, LA O'Reilly, G Hausmann, JM Adams, S Cory, et al. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *The EMBO Journal* 1998 ; 17 : 384-395.
17. JA Dominov, CA Houlihan-Kawamoto, CJ Swap, JB Miller Pro- and anti-apoptotic members of the bcl-2 family in skeletal muscle: A distinct role for bcl-2 in later stages of myogenesis. *Developmental Dynamics* 2001 ; 220 : 18-26.
18. PC Kanturek, SJ Konturek, Z Sulekova, H Meixner, W Bielanski, T Starzynska, et al. Expression of hepatocyte growth factor, transforming growth factor alpha, apoptosis related proteins Bax and Bcl-2, and

gastrin in human gastric cancer. *Aliment Pharmacol. Ther.* 2001 ; 15 : 989-999.

19. RY Shyu, HL Su, JC Yu, SY Jiang Direct growth suppressive activity of interferon- $\alpha$  and - $\gamma$  on human gastric cancer cells. *Journal of Surgical Oncology* 2000 ; 75 : 122-130.

20. L Gibson, SP Holmgreen, DCS Huang, O Bernard, NG Copeland, NA Jenkins, et al. Bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene* 1996 ; 13 : 665-675.

21. S Hamner, Y Skoglosa, D Lindholm Differential expression of Bcl-w and Bcl-xL messenger RNA in the developing and adult rat nervous system. *Neuroscience* 1999 ; 91 : 673-684.

22. LA O'Reilly, C Print, G Hausmann, K Morilshi, S Cory, DCS Huang, et al. Tissue expression and subcellular localization of the pro-survival molecule Bcl-w. *Cell Death and Differentiation* 2001 ; 8 : 486-494.

23. CG Print, KL Loveland, L Gilson, T Meehan, A Stylianou, N Wreford, et al. Apoptosis regulator Bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998 ; 95 : 12424-12431.

24. AJ Ross, KG Waymire, JE Palow, MK Skinner, LD Russell, GR

Macgregor Testicular degeneration in Bcl-w-deficient mice. *Nat. Genet* 1998 ; 18 : 251-256.

25. DM Pritchard, C Print, L O'Reilly, JM Adams, CS Potten, JA Hickman Bcl-w is an important determinant of damage-induced apoptosis in epithelia of small and large intestine. *Oncogene* 2000 ; 19 : 3955-3959.

26. JW Wilson, MC Nostro, M Balzi, P Faraoni, F Cianchi, A Becciolini, et al. Bcl-w expression in colorectal adenocarcinoma. *Cancer Research* 2000 ; 82 : 178-185.

27. S Kitamura, S Kondo, Y Shinomura, S Kanayama, Y Miyazaki, T Kiyohara, et al. Met/HGF receptor modulates bcl-w expression and inhibits apoptosis in human colorectal cancers. *British Journal of cancer* 2000 ; 83 : 668-673.

28. KA Furge, YW Zhang, GFV Woude Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene* 2000 ; 19 : 5582-5589.

29. S Giordano, A Maffe, TA Williams, S Artigiani, P Gual, A Bardelli, et al. Different point mutations in the met oncogene elicit distinct biological properties. *The FASEB Journal* 2000 ; 14 : 399-406.

30. A Baradelli, P Longati, D Albero, S Goruppi, C Schneider, C Ponzetto, et al. HGF receptor associates with the anti-apoptotic protein BAG-1 and prevents cell death. *The EMBO J.* 1996;15:6205-6212.
31. C Ponzetto, A Bardelli, F Maina, P Longati, G Panayotou, R Dhand, et al. A novel recognition motif for phosphatidylinositol 3-kinase binding mediates its association with the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor. *Mol. Cell. Biol.* 1993 ; 13 : 4600-4608.
32. A Graziani, D Gramaglia, LC Cantley, PM Comoglio The tyrosine-phosphorylated hepatocyte growth factor/scatter factor receptor associates with phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 1991 ; 266 : 22087-22090.
33. L Tacchini, P Dansi, E Matteucci, MA Desiderio Hepatocyte growth factor signalling stimulates hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) activity in HepG2 hepatoma cells. *Carcinogenesis* 2001 ; 22 : 1363-1371.
34. L Schmidt, K Junker, G Weirich, G Glenn, P Choyke, I Lubensky, et al. Two north american families with hereditary papillary renal carcinoma and identical novel mutations in the MET proto-oncogene *Cancer Research* 1998 ; 58 : 1719-1722.
35. M Olivero, G Valente, A Bardelli, P Longati, N Ferrero, C Cracco, et al. Novel mutation in the ATP-binding site of the MET oncogene

tyrosine kinase in a HPRCC. *International Journal of Cancer* 1999 ; 82 : 640-643.

36. G Maulik, T Kijima, PC Ma, SK Ghosh, J Lin, GI Shapiro, et al  
Modulation of the c-met/hepatocyte growth factor pathway factor pathway in small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research* 2002 ; 8 : 620-627.

37. JP Brody, BA willians, BJ Wold, SR Quake Significance and statistical errors in the analysis of DNA microarray data. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002 ; 99 : 12975-12978.

38. DK Kim, ES Cho, JK Seong, HD Um Adaptive concentrations of hydrogen peroxide suppress cell death by blocking the activation of SAPK/JNK pathway. *Journal of Cell Science* 2001 ; 114 : 4329-4334.

39. C Matteucci, S Grelli, ED Smaele, C Fontana, A Mastino  
Identification of nuclei from apoptotic, necrotic, and viable lymphoid cells by using mutiparameter flow cytometry. *Cytometry* 1999 ; 35 : 145-153.

40. C Yan, J Chen, D Chen, M Minani, W Pei, XM Yin, et al.  
Overexpression of the cell death suppressor Bcl-w in Ischmic brain: Implications for a neuroprotective role via the mitochondrial pathway. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2000 ; 20 : 620-630.

41. A Strasser, L O'Connor, VM Dixit Apoptosis signaling *Annu. Rev. Biochem.* 2000 ; 69 : 217-245.
42. A Gross, JM McDonnell, SJ Korsmeyer Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 1999 ; 13 : 1899-1911.
43. K Morushi, DCS Huang, S Cory, JM Adams Bcl-2 family members do not inhibit apoptosis by binding the caspase activator Apaf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999 ; 96 : 9683-9688.
44. SY Hsu, A Kaipia, E Mcgee, M Lomeli, AJW Hsueh Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997 ; 94 : 12401-12406.
45. DR Green, JC Reed Review *Mitochondria and apoptosis.* 1998 ; 28 : 1309-1312.
46. JL Herrmann, DG Menter, A Beham, A Eschenbach, TJ McDonnell Regulation of lipid signaling pathways of cell survival and apoptosis by Bcl-2 in prostate carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 1997 ; 234 : 442-451.
47. HT Chung, HO Pae, BM Choi, TR Brilliar, YM Kim Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001 ; 282 : 1075-1079.

48. MT Osborn, TC Chambers Role of the stress-activated/c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal protein kinase pathway in the cellular response to adriamycin and other chemotherapeutic drugs. *The Journal of Biological Chemistry* 1996 ; 271 : 30950-30955.
49. MT Lin, CY Juan, KJ Chang, WJ Chen, ML Kuo IL-6 inhibits apoptosis and retains oxidative DNA lesions in human gastric cancer AGS cells through up-regulation of anti-apoptotic gene mcl-1. *Carcinogenesis* 2001 ; 22 : 1947-1953.
50. YR Chen, X Wang, D Templeton, RJ Davis, TH Tan The role c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet c and γ radiation *The Journal of Biological Chemistry* 1996 ; 271 : 31929-31936.
51. X Deng, L Xiao, W Lang, F Gao, P Ruvolo, WS May Novel role for JNK as a stress-activated Bcl2 kinase *The Journal of Biological Chemistry* 2001 ; 276 : 23681-23688.



## Abstract

Bcl-w supresses gastric cancer cell death by blocking SAPK/JNK  
activation

Hye Won Lee

*Department of Medical Science  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Ho Guen Kim)

To determine a cellular factor supporting the survival of gastric cancer cells, a comparative study was performed using three human adenocarcinoma cell lines, SNU-1, SNU-16 and SNU-620. SNU-620 cells were significantly less susceptible than SNU-1 and SNU-16 to various lethal stimuli including anti-Fas, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, etoposide, and serum withdrawal. DNA microarray analyses revealed that 114 genes were expressed in SNU-620 cells to relatively higher levels than in SNU-1 cells. c-met proto-oncogene was one such gene. While the higher expression of c-met in SNU-620 cells was further confirmed by a RT-PCR analysis, it was found that c-met was not such a component that can protect the gastric cancer cells from all the tested stimuli. Interestingly, anti-Fas, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, etoposide, and serum withdrawal were found to kill SNU-16 cells by activating SAPK/JNK. The activation of SAPK/JNK was not

efficiently induced in SNU-620 cells, suggesting that these cells expressed a protein that can interfere with the SAPK/JNK activation. Given that Bcl-2 can suppress the SAPK/JNK activation under other experimental conditions, the levels of various Bcl-2 family members in SNU-620 and SNU-16 cells were compared by Western blot analysis. While these cells expressed Bad, Bak, Bax, Bid, Bcl-2, Bcl-xL to almost equal levels, the levels of Bcl-w were significantly higher in SNU-620 than SNU-16 cells. Moreover, elevation of the Bcl-w levels in SNU-16 cells by its stable transfection attenuated both the SAPK/JNK activation and cell death induced by all the tested stimuli. These results suggest that the susceptibility of gastric cancer cells to death stimuli is determined, at least in part, by levels of Bcl-w that suppresses the cell death by blocking the SAPK/JNK activation. To explore whether Bcl-w is expressed in patients, tumor specimens were obtained from 5 consecutive cases of advanced gastric adenocarcinomas. An immunohistochemical analysis showed that Bcl-w was expressed in the cancer cells, but not in neighboring normal mucosa, of 2 cases. The sum of the data suggest that Bcl-w can be expressed not only in gastric cancer cell lines but also in AGC patients, and is important for the survival of gastric cancer cells.

---

Key Words : cell death, gastric adenocarcinoma, Bcl-w, SAPK/JNK