

사람의 간암 세포주에서 p53 유전자의 기능과 p21^{CIP1} 유전자 발현의 상관관계에 관한 연구

아주대학교 의과대학 생화학교실

조 혜 성 · 임 인 경

A Possible Correlation between the Status of Functional p53 and p21^{CIP1} Gene Expression in Human Hepatoma Cell Lines

Hyeseong Cho and In Kyoung Lim

Department of Biochemistry, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

Expression of p21^{CIP1} gene has been known to be regulated by p53. We have examined whether basal expression of p21^{CIP1} is directly correlated to the status of p53 gene expression in seven human hepatoma cell lines. Six hepatoma cell lines except Hep3B expressed significant amount of p53 and Rb transcripts. However, only three of the six cell lines(HepG2, SK-HEP-1, HT-17) showed detectable basal expression of p21^{CIP1} transcripts, whereas three other Huh cell lines(Huh1, 4 and 7) originated from Japan did not. Neither p21^{CIP1} nor p53 transcripts were observed in the Hep3B cell line. There was a considerable correlation between the status of functional p53 and p21^{CIP1} gene expression in these hepatoma cells, since loss of p21^{CIP1} gene expression was observed in the Huh7 cells which have mutated p53 and in the Huh1 and Huh4 cells which have HBV containing HBX gene. Treatment of HepG2 hepatoma cells with 25 nM testosterone resulted in higher mitogenic activities by the ³H-thymidine incorporation assay. However, expression of p21^{CIP1} gene did not seem to be involved in mitogenic enhancement by testosterone in these cells.

Key Words: 간암, p53, p21^{CIP1}, Rb

서 론

간암은 우리나라, 일본 등을 포함한 극동아시아와 남부 아프리카 지역에서 가장 많이 발생하는 암 중의 하나로 알려져 있다. 간암의 발생기전으로는 hepatitis B virus (HBV)에 의한 감염과 aflatoxin B1이나 각종 화학물질등의 발암개시제에 노출된 후, alcohol, 담배, 혈중 testosterone의 농도 그리고 채소 섭취의 부족 등이 발암 촉진제로 작용하여 지속적인 간세포 손상 및 자극을 줌으로써 간암발생을 증가시키는 것으로 알려져 있다¹.

최근의 분자생물학적인 연구의 발전으로 암억제 유

전자의 변이 및 결손이 발암과정에 중요한 요인으로 작용하는 것이 여러 종류의 암에서 발견되었다. 특히 다양한 종류의 암에서 p53 유전자의 변이가 보고되었는데, 간암의 경우는 Quidong이나 Mozambique등 aflatoxin B1에 의한 노출이 많은 지역에서 p53 유전자의 249번째 codon이 AGG에서 AGT로 point mutation이 일어나는 확률이 약 58~69%로 aflatoxin B1에 의한 노출이 적은 지역에 비해 유의하게 높은 것으로 알려졌다^{2,3}. 그러나 HBV의 유전자를 지니고 있는 대부분의 원발성 간암들에서는 p53 유전자 변이는 유의하게 나타나지 않은 것으로 보고되었으므로³ aflatoxin이 관련되지 않은 경우에는 간암과 p53유전자의 변이와의 상관관계는 크지 않은 것으로 생각되고 있다. 또 하나의 중요한 암억제 유전자인 Rb의 경우에는 retinoblastoma를 비

저자연락처: 임인경, (442-749) 경기도 수원시 팔달구 원천동 산 5, 아주대학교병원 생화학교실, Tel (0331) 219-5051

릇한 여러 암에서 Rb 유전자가 존재하는 13q 염색체가 결손되어 있는 것이 보고되었으나, 간암조직에서는 보고된 바가 없으며, 조사된 여러 간암 세포주들에서는 Rb 유전자의 정상적인 발현이 관찰되었다⁴.

Cyclin-dependent kinase inhibitors(CDKI)의 하나인 p21^{CIP1} 단백질은 in vitro에서 cyclinD/Cdk4나 cyclinE/Cdk2 복합체들과 결합함으로써 세포주기의 진행을 억제할 뿐만 아니라 proliferating cell nuclear antigen(PCNA)과 결합함으로써 DNA의 복제를 조절하는 것이 밝혀짐으로써 중요한 세포주기 조절자로 알려졌다⁵. p21^{CIP1}의 발현은 DNA 손상을 받은 세포들에서 p53의 발현에 의해 유도되어, 정상세포나 암세포에서 p53에 의한 세포주기 조절을 매개하는데, 특히 p53의 여러 기능중 G1 arrest에 직접적으로 관여한다는 것이 알려졌다⁶. 최근들어, 난소암 세포주에서 p21^{CIP1}의 발현이 transforming growth factor β (TGF- β)에 의해서 transcriptional level에서 조절된다는 것이 밝혀짐으로써⁷ 정상세포 및 암세포들에서 p21^{CIP1}의 발현 및 역할이 중요성을 더하게 되었다. 그러나 현재까지는 간암조직 및 간암세포주들에서 p21^{CIP1}에 대한 연구보고는 없는 바이다.

본 논문에서는 사람 간암세포주에서 p53 및 Rb 유전자의 발현을 조사하였고, 이때 p21^{CIP1} 유전자의 발현이 p53 유전자의 발현 및 기능과 연관성을 나타내는가를 조사하였다. 또한 testosterone과 EGF(epidermal growth factor)에 의해 간암세포의 세포성장이 어떻게 조절되며, 이들의 조절과정에 p21^{CIP1} 유전자가 관여하는지를 연구하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양

Huh1, Huh4 그리고 Huh7 간암세포주는 Japanese Cancer Research Resource Bank, Okayama University로부터, HT-17은 일본의 Tohoku University로부터 유래되어 배양하고 있으며^{8,9}, HepG2, Hep3B, SK-HEP-1는 American Type Culture Collection(ATCC)에서 구매하여 배양하고 있다. 세포는 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였으며, HepG2 세포는 5% fetal bovine serum(FBS)을 함유한 DME/F12 배양액을, 다른 세포들은 10%의 FBS를 함유한 RPMI1640 배양액을 사용하였다. 모든 세포배양액은 2 mM glutamine, penicillin(100 units/ml), streptomycin (100 μ g/ml)을 함유하고 있다.

2. Northern blot analysis

간암세포주를 배양하면서 guanidinium thiocyanate phenol-chloroform 방법을 사용하여 total RNA를 분리하였다¹⁰. Formaldehyde를 함유한 agarose gel에서 전개된 total RNA를 nitrocellulose membrane에 옮겨 고정시킨 후, random primer 표지방법을 사용하여 ³²P로 표지된 cDNA로 hybridization하였다. 표지된 membrane을 X-ray film에 노출시킨 후, autoradiographs를 Ultrascan Densitometry(Molecular Dynamics)로 분석하였다.

3. ³H-thymidine incorporation assay

HepG2 간암세포주를 5% FBS를 함유한 DME/F12 배양액에서 배양하다가 0.5% FBS를 함유한 DME/F12에 하루 동안 배양한 후 25 nM의 testosterone을 처리하였다. 4시간 후 다시 0.5- μ Ci/ml의 ³H-thymidine(2 Ci/mmol, Amersham)을 처리한 후 4시간 더 배양하였다. Free ³H-thymidine을 제거하고, 세포를 PBS로 여러번 세척한 후 SDS(sodium dodecyl sulfate)를 함유한 lysing buffer로 용해시키고, lysate내에 존재하는 ³H-thymidine의 양을 Liquid Scintillation Counter(Pharmacia)로 측정하였다. 모든 실험은 quadruplicate로 세번 이상 반복하였다.

결 과

1. 사람의 간암세포주에서 p21^{CIP1}과 p53 유전자의 발현

사람의 간암세포주에서 p21^{CIP1}과 p53 유전자의 발현을 조사하고 이들 유전자의 발현이 상호간에 밀접한 연관성을 나타내는가를 조사하였다. 우선, Hep3B를 제외한 6종류의 간암세포주에서 p53 유전자가 유의하게 발현되었다(Fig. 1). Huh1, Huh4, Huh7 세포주에서는 p53 유전자의 발현이 높게 나타난 반면 p21^{CIP1} mRNA는 거의 발현되지 않았다(Fig. 1). 한편, HepG2, SK-HEP-1과 HT-17 간암세포주에서는 p21^{CIP1}과 p53 유전자의 발현이 모두 유의하게 검출되었으며, p53 유전자의 발현이 안되는 Hep3B 세포에서는 p21^{CIP1} 유전자의 발현 역시 검출되지 않았다. 이처럼, 7 종류중 4종류의 간암세포주들(HepG2, SK-HEP-1, HT-17, Hep3B)에서는 p21^{CIP1} 유전자의 발현과 p53 유전자의 발현이 연관성을 나타내었으며 Huh 세포들에서는 높은 p53 mRNA의 발현에도 불구하고 p21^{CIP1} mRNA가 발현되지 않았다.

2. 간암세포주에서 Rb 유전자의 발현

Rb 유전자의 결손은 retinoblastoma를 비롯한 여러 종

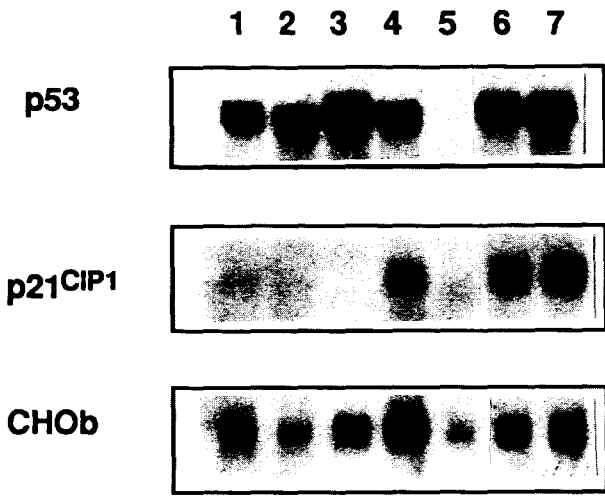


Fig. 1. Expression of p53 and p21^{CIP1} genes in the human hepatoma cell lines. Human hepatoma cells were cultivated in appropriate media containing 5~10% fetal bovine serum until near confluency. Total RNAs were isolated from these cells and analyzed for their mRNA expression of p53 and p21^{CIP1} genes. RNA on each lane is obtained from following cells: lane1; Huh1, lane 2: Huh4, lane 3: Huh7, lane 4: HT-17, Lane 5: Hep3B, lane 6: Lane 7: SK-HEP-1. Chob mRNA was shown for normalization of mRNA content on each lane.

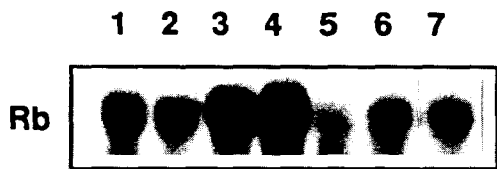


Fig. 2. Expression of retinoblastoma(Rb) gene in the human hepatoma cell lines. Human hepatoma cells were cultivated in appropriate media containing 5~10% fetal bovine serum until near confluency. Total RNAs were isolated from these cells and analyzed for their mRNA expression of Rb gene. RNA on each lane is obtained from following cells: lane1: Huh1, lane 2: Huh4, lane 3: Huh7, lane 4: HepG2, Lane 5: Hep3B, lane 6: SK-HEP-1, Lane 7: HT-17.

류의 암에서 발견되었으며 세포주기 조절에 있어 그 중요성은 잘 연구되어 있다⁴. 간암세포주에서 Rb 유전자의 발현을 조사한 결과 Hep3B 세포주에서 다소 약한 발현을 나타내었으나 나머지 다른 7종류의 간암세포주에서 유의한 발현을 나타내었다(Fig. 2).

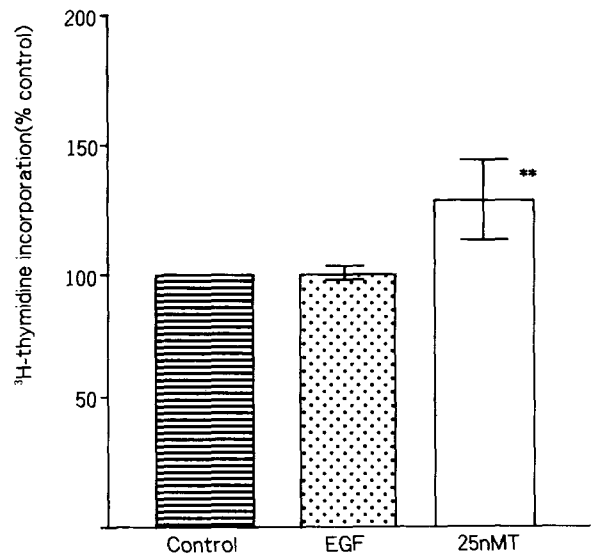


Fig. 3. Effect of testosterone and EGF on DNA synthesis in HepG2 hepatoma cells. Cells were cultivated in an appropriate medium containing 5% fetal bovine serum(FBS) until they reached in 70~80% confluency and then switched to the medium containing 0.5% FBS for 24 h. Testosterone(25 nM) or EGF(10 ng/ml) was treated for 4 h and ³H-thymidine was given for 4 h. Incorporation of ³H-thymidine into DNA was determined by lysing the cells. All the experiments were performed as quadruplicates. Bars represent the means ± standard deviation of three to five separate experiments. **p<0.05 by ANOVA.

3. Testosterone과 EGF가 HepG2 간세포주의 DNA 합성에 미치는 영향

EGF는 간장에서 중요한 세포성장 촉진인자로 알려져 있으며¹¹, testosterone은 남성에서 간암발생률을 높히는 요인으로 알려져 있다¹². HepG2 세포주를 배양하면서 testosterone과 EGF를 각각 처리하고 DNA 합성물의 변화를 ³H-thymidine incorporation assay로 조사하였다. Testosterone에 의해 DNA 합성물은 30~50%의 증가를 나타내었으나, EGF 투여 후에는 별다른 변화를 나타내지 않았다(Fig. 3).

4. Testosterone이 HepG2 간암세포주에서 p21^{CIP1} mRNA의 발현에 미치는 영향

HepG2 간암세포주에서 DNA 합성을 증가시키는 testosterone이 p21^{CIP1} 유전자를 매개하는지를 조사하기 위하여, HepG2 세포를 배양하면서 25 nM의 testosterone 처리한 후 2시간, 6시간, 9시간 그리고 24시간 후에 이

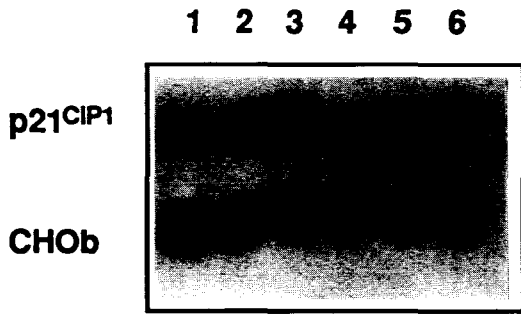


Fig. 4. Effect of testosterone on the expression of p21^{CIP1} mRNA in HepG2 hepatoma cells. Human hepatoma cells were cultivated in the presence or absence of 25 nM testosterone for various periods. Total RNAs isolated from these cells were analyzed for their mRNA expression of p21^{CIP1}. RNA in lane1 was from cultured cells without testosterone while RNAs in lanes 2~6 were from cells treated with 25 nM testosterone for 2 h(lane 2), 4 h(lane 3), 6 h(lane 4), 9 h(lane 5) and 24 h(lane 6), respectively. Chob mRNA was shown for normalization of mRNA content on each lane.

들 세포에서 p21^{CIP1} mRNA의 발현 변화를 조사하였다 (Fig. 4). Autoradiograph를 Densitometer로 분석한 결과 9 시간까지는 대조군과 비교하여 거의 변화가 없었고 24 시간 후에 감소하는 경향을 나타내었으나 유의한 차이를 나타내지는 않았다.

고 찰

p53 암억제 유전자의 변이나 결손이 발암과정에 중요한 요인으로 작용한다는 것은 여러 종류의 암에서 잘 알려진 사실이다. 본 연구에서는 간암세포주에서 p53 유전자의 발현과 p53 유전자에 의해 transcription level에서 유도된다고 알려진 p21^{CIP1} 유전자의 발현이 밀접한 연관성을 나타내는 가를 조사하였다. 또한 최근 들어 간암조직 중 HBV DNA를 포함하는 세포들에서 HBX 단백질이 발현되면 p53 단백질과 결합하여 p53 단백질이 핵 내로 이동되는 것을 방해한다는 것이 알려졌다^{13,14}. 그러므로, p53단백질의 정상기능을 알아보는 척도로서 p21^{CIP1} 유전자의 발현과 p53 유전자의 발현을 비교하였다.

일본에서 유래된 간암세포주중 Huh1과 Huh4 세포주는 HBX 유전자를 포함한 HBV DNA를 포함하고 있는 것으로 알려졌으며 Huh7은 HBV 감염이 없었던 간암환자에서 유래된 간암세포주이다¹⁵. 이들 모두에서 p53 유전자의 발현은 높게 관찰되었으나 p21^{CIP1} 유전자의 발

현은 매우 미약하였다(Fig. 1). Hsu등도¹⁵ 이들 Huh 세포주들에서 immunohistochemistry를 통하여 p53 단백질이 높게 발현됨을 관찰하였다고 보고하였다. 이러한 사실들은 Huh1이나 Huh4 세포주에서 HBX의 발현이 p53 유전자의 기능을 차단함으로써 p21^{CIP1} 유전자의 발현이 억제되었을 가능성을 제시해준다. 또한 Huh7 세포주는 HBV DNA를 포함하고 있지는 않으나 p53의 220 codon의 변이로 인하여 tyrosine이 cysteine으로 전환되었음이 보고되었다¹⁵. 그러므로 Huh7 세포주에서 p53 유전자의 발현은 정상이나 기능의 이상이 나타났을 가능성을 제시해 준다. 한편, HBV DNA를 함유하고 있지 않으며, 정상 p53 유전자를 지니고 있다고 알려진 HepG2와 SK-HEP-1 세포주에서는¹⁶ p53와 p21^{CIP1} 유전자의 발현이 모두 관찰됨으로써, 이들 두 유전자간의 발현이 밀접한 상관성을 나타내었다. 더구나 p53 유전자의 발현이 안되는 Hep3B 세포주에서는 p21^{CIP1} 유전자가 전혀 발현되지 않아 이들 두 유전자 발현사이의 상관성을 나타내었다. 이와같이 간암세포주들에서 정상 기능을 가진 p53단백질과 p21^{CIP1} 유전자의 발현 사이에 밀접한 연관성을 나타내었다. 그러나 p53가 TGF-β와 같은 다른 요인들에 의해 조절될 수 있을 가능성을 아직 완전히 배제된 것은 아니라고 하겠다.

HaCat keratinocyte를 비롯한 몇 세포주에서 TGF-β에 의한 세포성장 억제는 p21^{CIP1} 유전자의 발현을 증가시킴으로써 세포주기의 진행을 억제시킨다고 알려졌다¹⁷. 정상 간세포에서 EGF는 중요한 간세포 성장촉진 인자로 알려져 있으며, 남성호르몬인 testosterone은 간암 발생을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 이들 인자들이 직접 간암세포들의 세포성장률을 촉진시키고 세포성장조절에 p21^{CIP1} 유전자가 관여하는 지를 조사하였다. HepG2 간암세포주는 25 nM의 testosterone에 의해 DNA의 합성이 30~50% 촉진되었으나, EGF 처리는 이들 세포들에서 DNA 합성에 거의 영향을 끼치지 않음으로써(Fig. 3) 이들 간암세포주에서 EGF에 의한 반응(responsiveness)이 변형되었음이 관찰되었다. 이러한 사실들은 다른 중요한 간세포 촉진자인 HGF (hepatocyte growth factor) 역시 간암세포주들에서는 세포 성장을 촉진시키지 못한다거나 오히려 억제시킨다는 보고와 일맥상통한다¹⁸. 한편, testosterone은 본 연구 결과처럼 간암세포주의 세포 성장을 촉진시킴으로써 간암 발생을 촉진시킬 수 있을 것으로 생각되며, HepG2 세포주에서는 testosterone의 세포 내 수용체인 androgen receptor의 발현이 관찰되었다. p21^{CIP1} 유전자의 발현이 간암세포주 성장과 연관성을 나타내는가를 알아보기

위하여 testosterone에 의하여 DNA 합성이 촉진되는 HepG2 세포주에서 testosterone을 처리하고 p21^{CIP1} 유전자의 발현 변화를 Northern blot analysis로 조사한 결과 (Fig. 4), testosterone 처리 후 24시간 후에 다소 감소하는 경향을 나타냈으나 유의한 변화는 관찰되지 않았다. 그러므로 HepG2 세포주에서 testosterone에 의한 DNA 합성의 증가는 p21^{CIP1} 유전자의 발현을 매개하지 않는 것으로 생각된다.

또 하나의 중요한 암억제유전자인 Rb 유전자의 발현은 Hep3B 간암세포주에서 다소 약하게 발현되었으나 6개의 다른 간암세포주들에서는 대체적으로 높은 발현을 나타내었다(Fig. 2). Rb는 여러 암에서 유전자 변이보다는 결손이 많이 보고됨으로 간암발생 과정 동안에 Rb 암억제 유전자에 있어서의 변화는 유의하지 않은 것으로 생각된다.

결 론

간암세포주들에서 HBV DNA의 존재여부와 p53 유전자 변이에 따른 p53 유전자의 기능의 변화는 p21^{CIP1} 유전자의 발현에 영향을 주며, 이들 두 유전자 발현 사이에 밀접한 연관성을 나타내었다. 그러므로, p53 단백질의 정상 기능을 측정하기 위하여 p21^{CIP1} 유전자 발현여부가 이용될 가능성을 제시해준다.

감사의 말씀

본 논문은 아주대학교 연구비(수혜자: 조혜성) 및 과학재단 연구비(수혜자: 임인경)의 지원을 받아 이루어졌다. Huh1, Huh4, Huh7 간암세포주를 제공하여 주신 Dr. Masayashi Namba(Okayama University, Okayama, Japan)께 깊은 감사를 드린다. 또한 세포배양을 도와준 이수한군에게 감사드린다.

참 고 문 헌

1. Yu MW and Chen CJ: Elevated serum testosterone levels and risk of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 53: 790-794, 1993
2. Aguilar F, Haris CC, Sun T, Hallstein M and Cerutti P: p53 mutations in nonmalignant human liver: fingerprints of aflatoxins. *Hepatology* 21: 600-601, 1995
3. Unsal H, Yakicier C, Marcais C, Kew M, Volkmann M, Zentgraf H and Leselbacher KJ: p53 mutations and hepatitis B virus: cofactors in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 21: 597-599, 1995
4. Puisieux A, Galvin K, Troalen F, Bressac B, Marcais C, Galun E, Ponchel F, Yakicier G, Ji J and Ozturk M: Retinoblastoma

- and p53 tumor suppressor genes in human hepatoma cell lines. *FASEB J* 7: 1407-1413, 1993
5. Luo Y, Hurwitz J and Massague J: Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21^{CIP1}. *Nature* 375: 159-161, 1995
6. El-Deiry WS, Harper JW and O'Connor PM: WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 54: 1169-1174, 1994
7. Elbendary A, Berchuck A, Davis P, Havrilesky L, Bast RC Jr, Iglehart JD and Marks Jr: Transforming growth factor beta 1 can induce C1P1/WAF1 expression independent of the p53 pathway in ovarian cancer cells. *Cell Growth Differ* 5: 1301-1307, 1994
8. Huh N and Utakoji T: Production of HBs-antigen by two new human hepatoma cell lines and its enhancement by dexamethasone. *Gann* 72: 178-179, 1981
9. Nakabayashi H, Taketa K, Miyzno K, Yumane T and Sato J: Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* 42: 3858-3863, 1982
10. Chomczynski P and Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987
11. Michalopoulos GK: Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control *FASEB J* 4: 176-187, 1990
12. Matsuura B, Taniguchi Y, Ohta Y: Effect of antiandrogen treatment on chemical hepatocarcinogenesis in rats. *J Hepatology* 21: 187-193, 1994
13. Feitelson MA, Zhu M, Duan L and London WT: Hepatitis B X antigen and p53 are associated in vitro and in liver tissues from patients with primary hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 8: 1109-1117, 1993
14. Ueda H, Ullrich SJ, Gangemi J, Kappel CA, Ngo L, Feitelson MA and Jay G: Functional inactivation but not structural mutation of p53 causes liver cancer. *Mol Genetics* 9: 41-47, 1995
15. Hsu IC, Tokiwa T, Bennet W, Metcalf RA, Welsh JA, Sun T and Harris CC: p53 gene mutation and integrated hepatitis B viral DNA sequences in human liver cancer cell lines. *Carcinogenesis* 14: 987-992, 1993
16. Lukas J, Parry D, Aagaard L, Mann DJ, Bartkova J, Strauss M, Peters G and Bartek J: Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumor suppressor p16. *Nature* 375: 503-506
17. Datto MB, Li Y, Panus JF, Howe DDJ, Xiong Y and Wang X: Transforming growth factor β induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5545-5549, 1995
18. Shiota G, Rhoads DB, Wang TC, Nakamura T and Schmidt EV: Hepatocyte growth factor inhibits growth of hepatocellular carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 373-377, 1992