

Thioredoxin peroxidases의 조직내 분포 및 인체 종양 질환에서 발현에 관한 연구

연세대학교 의과대학 내과학교실¹⁾, 아주대학교 의과대학 내과학교실²⁾
서울대학교 의과대학 외과학교실³⁾, Lab. of Cell Signalling, NHLBI, NIH⁴⁾

김형중¹⁾ · 황성철²⁾ · 노동영³⁾ · 김성규¹⁾
이원영¹⁾ · 채호준⁴⁾ · 이서구⁴⁾

서 론

산소를 이용하는 모든 세포는 reactive oxygen species(ROS: O₂⁻, H₂O₂, OH⁻)들에 의한 세포손상으로부터 자신을 보호하기 위하여 ROS를 제거하기 위한 기전을 가지고 있다. ROS들은 세포 호흡과정(cell respiration)이나 빛, 방사선, redoxcycling 약제 및 phagocytes의 활성화 등에 의해 생성되며 단백질 및 지질의 산화, DNA의 변형(modification) 및 변이(mutation)를 초래하여 세포 손상에 아주 중요하게 작용한다^{1, 2)}.

효모의 glutamine synthetase는 thiol-oxidation system(dithiotreitol, Fe³⁺, oxygen)으로부터 유리되는 ROS에 의하여 불활성화되며 이같은 작용을 방어하는 25 kDa의 단백을 효모로부터 분리하여 thiol-specific antioxidant(TSA)로 명명하였다³⁾. 특히 TSA는 ascorbate-oxidation system에서 유리되는 ROS의 작용을 방어할때 thioredoxin system(NADPH, thioredoxin reductase, thioredoxin)으로부터 전자를 받아 peroxide를 물로 환원시키는 생화학적 성질을 가져 thioredoxin peroxidase(TPx)로 다시 명명하였다^{6, 7)}.

TPx는 효모뿐만 아니라 포유류의 세포에서도 발견되는데 mouse에서 산화 스트레스에 의해 복강 대식세포에서 유도되는 MSP23⁸⁾와 erythroleukemic 세포에서 주로 발현되는 MER5⁹⁾ 및 인체의 상피세포에서 분리되는 PAG¹⁰⁾, chronic myelogenous leukemic cell(K-562)의 natural killer enhancing

factor-A, B(NKEF-A, B)¹¹⁾, T-임파구에서 발현되는 372와 acute myelogenous leukemic cell(KG-1)의 Orf-06 등이 그것이다(Fig. 1).

포유류계에 존재하는 NKEF-A/PAG, NKEF-B/TPx와 MER5의 recombinant 단백질 역시 thioredoxin dependent peroxidase 활성도를 보였으며¹²⁾ 생물학적으로는 산화 스트레스 등에 의해 유도되는 유전자 혹은 단백질로 알려져 있고 Prosperi 등은 mRNA 차원에서 PAG가 세포 증식시 발현이 증가하고 세포 분화에 의해 발현이 감소하는 것으로 보고 하

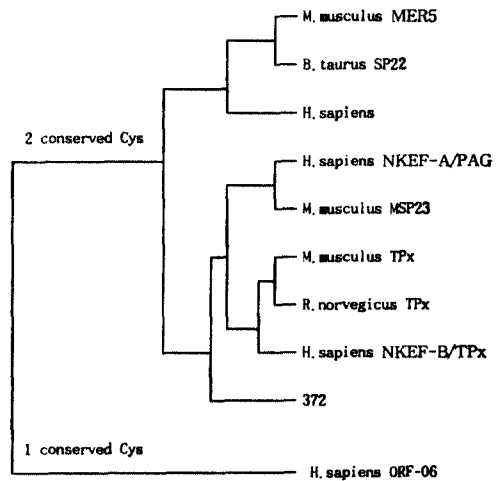


Fig. 1. Clustering tree of mammalian thioredoxin peroxidase family. In mammalian system, there are four subtypes of TPx which has two conserved cysteines (NKEF-A/PAG, NKEF-B/TPx, ME5 and 372) and one subtype of TPx which has one conserved cystein(ORF-06).

접 수 : 1996년 2월 17일
봉 과 : 1996년 3월 26일

었다. 특히 종양 질환에 있어서 ROS와 항산화 방어 기전에 관한 연구는 ROS의 발생 증가와 항산화 방어 기전의 감소가 종양 성장의 촉진(cancer promotion) 및 종양 질환의 전이(metastasis)에 작용 한다는 보고가 있다.

이에 이들 단백질에 대한 항체를 이용하여 세포내 분포 및 여러 조직에 분포 양상을 규명하고, 단백질 차원에서 HL-60 세포에서 세포 증식 및 분화시에 NKEF-A/PAG의 발현 양상을 관찰하고, 절제된 폐암, 위암 및 유방암과 이들의 정상 조직에서 발현을 비교 관찰하였으며 종양 세포 형태에 따른 발현을 비교 관찰하였다.

대상 및 방법

1. 항체 합성

단백 정제 과정에서 NKEF-A/PAG, NKEF-B/TPx 및 MER5의 N-terminus 및 C-terminus peptides에 대한 항체를 만들었으며 NKEF-A/PAG, NKEF-B/TPx 및 MER5의 정제된 recombinant 단백질(Fig. 2)에 대한 항체를 만들었다. 이들 항체중 NKEF-A/PAG 및 NKEF-B/TPx는 정제된 단백질에 대한 polyclonal 항체가 MER5는 C-terminus peptides(SPTASKEYFEKVHO)에 대한 항체가 alka-

line phosphatase 방법으로 각각의 정제된 단백질 10 ng을 확실하게 인지하였고 서로 교차 반응을 보이지 않아 본 실험에서 이들 항체를 이용하였다.

2. 세포질 및 Mitochondria 분리 및 여러 조직의 확보

원위의 간을 취하여 차가운 0.25 M sucrose 용액에 넣어 세척후에 잘게 썰어 간 1gm을 9ml의 차가운 0.25 M sucrose 용액에 넣은후 비교적 강력한 회전 모터에 의해 600에서 1000rpm으로 회전하는 분쇄 유봉으로 시험관을 빨리 움직여 조직을 분쇄하였다. 10 ml의 0.34 M sucrose 용액 상층에 10ml의 분쇄액을 띄운후 2000rpm으로 10 분간 원심 분리하여 상층액을 취하여 9200rpm으로 10 분간 원심 분리하여 상층액에서 세포질을 취한후 단단한 침전물만을 다시 0.25 M sucrose 용액에 넣어 분쇄한후 20,000rpm으로 원심 분리하여 침전물을 취한다. 이과정을 3-4 차례 시행하여 침전물 mitochondria를 분리한다 이렇게 확보한 mitochondria를 일정량의 20 mM HEPES 완충액(pH 7.0)에 넣어 초음파 처리하여 원심 분리한후 상층액을 취하여 세포질과 함께 Bicinchoninic(BCA) 단백질정량시약을 이용하여 단백질 농도를 측정하였다. 원위의 뇌, 간, 폐, 신장, 비장 및 부신을 취하여 차가운 phosphate-buffered saline (PBS)로 3-4번 정도 세

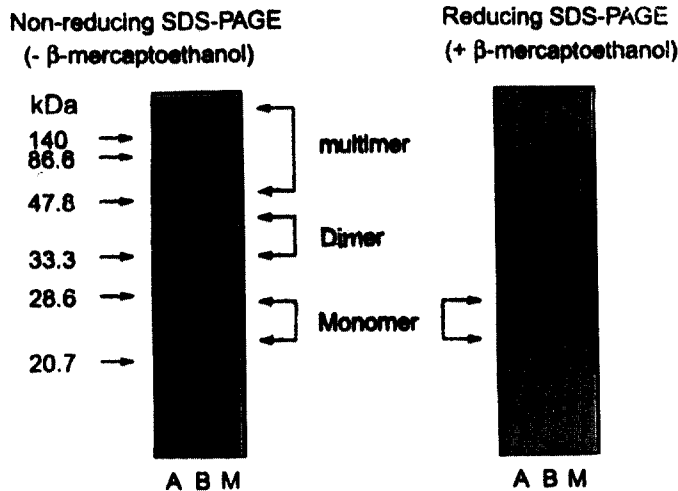


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of purified recombinant thioredoxin peroxidases(A: NKEF-A/PAG, B: NKEF-B/TPx and M: MER5).

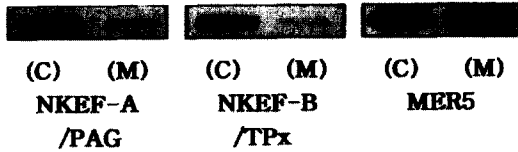


Fig. 3. Intracellular distribution of mammalian thioredoxin peroxidases. The cytosolic and mitochondrial protein were purified from rat liver and Immunoblot analysis of 40 μ g cytosolic and mitochondrial protein. The NKEF-A/PAG and NKEF-B/TPx was cytosolic protein like Cu, Zn-SOD and The MER5 was mainly mitochondrial protein like Mn-SOD. C: cytosolic protein and M: mitochondrial protein.

척후 적당량의 2mM phenylmethylsulfonyl fluoride, aprotinin(5 μ g/ml)과 leupeptin(1 μ g/ml)을 함유한 20mM HEPES 완충액(pH 7.0)로 균질화한후 20000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 상층액을 취하여 BCA 단백질정량시약을 이용하여 단백 농도를 측정하였다.

3. HL-60 세포의 증식 및 분화 유도

150-mm petri dish에 10% fetal bovine serum을 함유한 RPMI 1640 배지에 HL-60 세포를 배양하여 충분한 세포량을 확보한후 성장 정지 세포는 1×10^7 세포를 fetal bovine serum을 함유하지 않은 MEM 배지에 2일 동안 배양하여 확보하였으며 혈청 기아 상태후 증식 세포는 10% fetal bovine serum을 함유한 MEM 배지에 3일 배양하여 확보하였으며 혈청 기아 상태후 분화 세포는 1.3% Me₂SO(dimethyl sulfoxide, DMSO)와 10% fetal bovine serum을 함유한 MEM 배지에 3일 배양하여 확보하였다. HL-60의 분화는 형태학적으로 관찰하였으며 이렇게 얻어진 세포를 차거운 PBS로 3-4차례 세척후 일정량의 20mM HEPES 완충액(pH 7.0)에 넣어 초음파 처리하여 원심 분리후 상층액을 BCA 단백질정량시약을 이용하여 단백 농도를 측정하였다.

4. 암 조직과 정상 조직의 확보

절제된 폐암(3예), 위암(3예) 및 유방암(8예)에서 육안적으로 피사 소견이 없는 종괴의 중앙 부위 조직과 같은 환자의 정상 조직을 취하여 즉시 liquid nitrogen tank에 넣어 운반하여 -70 $^{\circ}$ C 냉동고에 보

관후 함께 꺼내 차거운 PBS로 3번 정도 세척후 적당량의 2mM phenylmethylsulfonyl fluoride, aprotinin(5 μ g/ml)과 leupeptin(1 μ g/ml)을 함유한 20mM HEPES 완충액(pH 7.0)로 균질화한후 20000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상층액을 취하여 BCA 단백질정량시약을 이용하여 단백 농도를 측정하였다.

5. 세포 배양 및 배양 조건

HTB-56(Anaplastic carcinoma), HTB-58(Squamous carcinoma), HTB-119(Small cell carcinoma) 및 HTB-174(Papillary adenocarcinoma)등 폐암 세포주를 American Type Culture Collection (Rockville, MD)으로부터 구입하였다. HTB-56 와 HTB-58 세포는 10% fetal bovine serum, non-essential amino acids, 1mM sodium pyruvate 및 Earle's BSS를 함유한 MEM 배지에 배양하였으며 HTB-119 및 HTB-174 세포는 10% fetal bovine serum을 함유한 RPMI 1640 배지에 배양하였다. 배양은 37 $^{\circ}$ C에서 5% CO₂의 상태의 항온기에 배양하였다. 충분한 양의 세포를 배양후 원심 분리하여 세포 침전물을 얻은후 차거운 PBS 으로 3-4 차례 세척후 일정량의 20mM HEPES 완충액(pH 7.0)에 넣어 초음파 처리하여 원심 분리후 상층액을 BCA 단백질정량시약을 이용하여 단백 농도를 측정하였다.

6. Immunoblot 분석

상기와 같이 준비된 crude extract 40 μ g을 정제된 단백 20ng과 함께 12% SDS-polyacrylamide gel에 전기 영동 시행후 nitrocellulose membrane에 이동시켜 2% BSA로 15 분 정도 차단한후 NKEF-A/PAG(1:2000), NKEF-B/TPx(1:2000) 및 MER5 (1:5000) 등의 항체를 밤새 처리하여 3 차례이상 TTBS 용액으로 세척한후 immunoreactive band를 alkaline phosphatase conjugated goat anti-rabbit IgG(Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) 방법을 이용하여 관찰하였다.

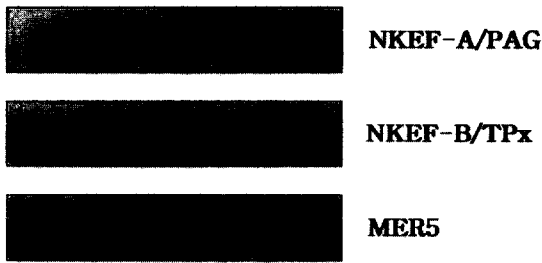


Fig. 4. Distribution of NKEF-A/PAG, NKEF-B/TPx and MER5 in various tissues. Immunoblot analysis of 40 μ g crude extract of rat brain(lane 1), liver(lane 2), lung(lane 3), kidney(lane 4), spleen(lane 5) and adrenal gland(lane 6). The NKEF-A/PAG, NKEF-B/TPx and MER5 were evenly distributed and adrenal gland had relatively strong band of MER5.

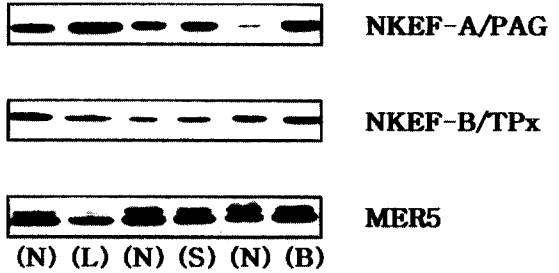


Fig. 6. Immunoblot analysis of NKEF-A/PAG, NKEF-B/TPx and MER5 in human cancers. Immunoblot was performed with 40 μ g of crude extract of lung(L), stomach(S) and breast(B) cancer tissue and paired normal tissue(N). The expression of NKEF-A/PAG was increased in lung and breast cancer tissues compared to paired normal tissues but was not changed in stomach cancer tissues.

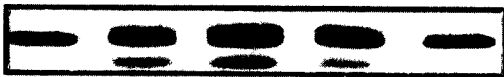


Fig. 5. Immunoblot analysis of NKEF-A/PAG in HL-60 cells after cell proliferation and differentiation. Normal growth cell(lane 1), growth arrest(lane 2) was performed by feeding cells with serum free RPMI 1640 medium cell proliferation(lane 3) was performed by feeding cells with MEM supplemented with 10% fetal bovine serum cell differentiation(lane 4) was performed by feeding cells with MEM supplemented with 10% fetal bovine serum and 1.3% DMSO and 20 ng of recombinant NKEF-A/PAG protein(lane 5). The expression of NKEF-A/PAG in HL-60 cell was increased after cell proliferation and decreased after cell differentiation.

결 과

1. NKEF-A/PAG, NKEF-B/TPx 및 MER5의 세포내 및 여러 조직내 분포

우선 NKEF-A/PAG, NKEF-B/TPx 및 MER5의 세포내 분포를 관찰하기 위하여 흰쥐의 간을 적출하여 세포질과 mitochondria를 얻어 immunoblot을 시행한 결과 NKEF-A/PAG 와 NKEF-B/TPx는 Cu, Zn-SOD와 같이 세포질에 존재하였으며 MER5은 Mn-SOD와 같이 주로 mitochondria에 존재하였다 세포질에도 일정한 량 존재하였다(Fig. 3). NKEF-

A/PAG, NKEF-B/TPx 및 MER5의 여러 조직내 분포는 흰쥐의 여러 장기로부터 얻은 단백을 immunoblot을 시행하였다. 조직마다 NKEF-A/PAG, NKEF-B/TPx 및 MER5의 immunoreactive band의 intensity에 다소 차이는 있었지만 모든 조직에서 고루 존재하였으며 특히 부신에 MER5가 많이 존재하였다(Fig. 4).

2. HL-60 세포의 증식과 분화에 따른 NKEF-A/PAG의 발현의 변화

Prosperi 등이 보고한 mRNA 차원에서 HL-60 세포의 증식과 분화에 따른 PAG의 발현 연구를 본 실험에서는 NKEF-A/PAG의 항체를 이용하여 단백 차원에서 시행한 결과 혈청 자극에 의한 세포 증식 증가하였으며 DMSO처치로 세포 분화시 형태학적 변화와 함께 NKEF-A/PAG의 발현이 감소하였다(Fig. 5).

3. NKEF-A/PAG, NKEF-B/TPx 및 MER5의 여러 종양에서 발현의 변화

NKEF-A/PAG, NKEF-B/TPx 및 MER5의 여러 종양에서 발현의 변화를 보기위해 폐암, 위암 및 유방암 환자의 종양 조직과 정상 조직을 같이 immunoblot을 시행하여 발현의 변화를 관찰한 결과 폐 및 유방암에서 같은 환자의 정상조직에 비하여 NKEF-A/PAG의 발현이 증가 하였고 위장암에서는 발현에 변화가 없었다. NKEF-B/TPx 및 MER5는

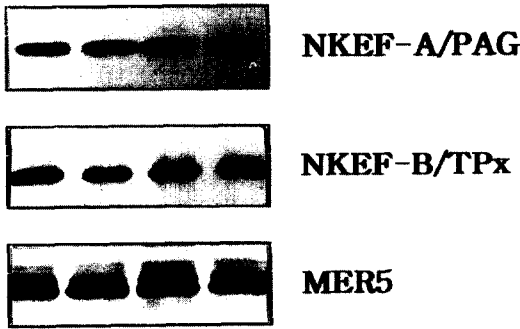


Fig. 7. Expression of NKEF-A/PAG, NKEF-B/TPx and MER5 in lung cancer cell lines. Immunoblot analysis of 40 μ g crude extract of lung cancer cell lines such as anaplastic carcinoma(lane 1), squamous carcinoma(line 2), small cell carcinoma(lane 3) and adenocarcinoma(lane 4). There was no obvious difference of expression according to cancer cell types.

폐암, 위장암 및 유방암에서 발현의 변화가 없었다(Fig. 7).

4. 폐암 세포주에서 NKEF-A/PAG, NKEF-B/TPx 및 MER5의 발현의 비교

여러 폐암 세포주를 배양한후 단백을 취하여 immunoblot을 시행한 결과 모든 폐암 세포에 NKEF-A/PAG, NKEF-B/TPx 및 MER5가 존재하며 폐암 세포 형태에 따른 발현의 뚜렷한 차이는 없었다(Fig. 6).

고 찰

Reactive oxygen species(ROS)는 세포의 대사과정에서 발생하는 산소를 물로 환원하는 과정에서 불완전 환원에 의해 형성된다 즉 산소가 하나의 전자를 받아 superoxide anion(O_2^-)을 형성하고 2 분자의 superoxide anion이 superoxide dismutase의 작용에 의해 H_2O_2 를 형성하며 이렇게 형성된 2 분자의 H_2O_2 은 catalase에 의한 dismutation 혹은 glutathione과 같은 물질로부터 전자를 받은 peroxidase에 의해 H_2O 로 완전 환원되거나 생체내 존재하는 nM 범주의 Fe^{2+} 과 빠르게 반응하여 hydroxyl radical(OH^{\cdot})을 형성한다(Fenton reaction). 그외에도 생체내에 존재하는 glutathione 혹은 cyteine 등과 같은 thiol 화합물들은 환원과정에서 thiyl

radical(RS^{\cdot}), disulfide radical anions($RSSR^{\cdot-}$), peroxyulfenyl radicals($RSOO^{\cdot}$)과 sulphinyl radical(RSO^{\cdot}) 등의 reactive sulfur radical을 형성한다^{1,2}.

생체는 이렇게 형성된 reactive oxygen species와 reactive sulfur radical 등에 대한 방어 기전으로 glutathione, thioredoxin 및 gutaredoxin 등의 분자량이 적은 단백들을 가지고 있고 Cu, Zn-SOD, Mn-SOD, catalase, glutathione peroxidase, cytochrome C peroxidase, NADPH peroxidase 및 non-specific peroxidase 등의 항산화 단백을 가지고 있으며 그외에도 Ascorbic acid 및 Vitamine E 등 비특이적 항산화 물질을 가지고 있다^{1,13}.

Chae 등¹²은 효모의 thioredoxin peroxidase와 아미노산 서열의 유사성을 보이는 NKEF-A/PAG, NKEF-B/TPx 및 MER5의 유전자를 *E. coli* system에 발현후 정제한 단백 역시 thioredoxin dependent peroxidase 활성도를 가지며 catalase의 H_2O_2 에 대한 Km 치 25mM에 비해 이들의 H_2O_2 에 대한 Km 치는 10 μ M 이하이었으며 thioredoxin에 대한 Km 치 역시 10 μ M 이하로 NKEF-A/PAG, NKEF-B/TPx 및 MER5 등은 thioredoxin으로부터 아주 효과적으로 전자를 받아 catalase에 비해 미세한 H_2O_2 의 변화에 작용하는 것으로 보고하였다.

본 연구의 결과를 보면 NKEF-A/PAG 및 NKEF-B/TPx는 Cu, Zn-SOD와 같이 세포질에 MER5는 Mn-SOD와 같이 mitochondria에 주로 존재하고 여러 조직에 고루 분포하였다. 따라서 포유류의 TPx는 SOD와 같은 양상으로 여러 조직의 세포내 특정 소기관에 발생하는 H_2O_2 을 제거하기 위하여 부위에 따라 다른 동종 단백을 가지고 있는 것으로 생각되고 부신에 MER5가 많이 존재하는 소견은 특별한 생물학적 역할을 생각하여 볼수 있으며 이에 대한 연구가 좀더 필요 할것으로 사료된다.

ROS들중 H_2O_2 은 특히 세포내로 침입 해에 도달하여 transition metal ions과 반응하여 OH^{\cdot} 을 형성하며 빠른 속도로 DNA와 반응하여 DNA strand의 절단, DNA base의 변화 및 DNA와 단백질의 cross linkage 등을 포함한 DNA 손상을 유발하며(OH^{\cdot} mediated damage) 지질의 산화와 단백질의 불활성화를 초래하여 세포손상 기전에 중요하게 작용하며 염증성 질환에서부터 여러가지 중앙 질환의 발생기전에 작

용하는 것으로 알려져 있다¹⁴). 특히 DNA의 손상 및 손상된 DNA의 복구 장애 및 지속적인 산화 스트레스에 의한 *NF- κ B*와 같은 transcription factor의 자극 및 *c-fos*, *c-jun* 및 *c-myc* 같은 protooncogene의 발현 유도등이 종양 질환의 개시(cancer initiation)에 주된 기전으로 알려져 있으며 보고자에 따라서 DNA base 산화의 중요한 산물로 알려진 8-hydroxy-2-deoxyguanosine(8-OH-dG)이 신장, 폐 및 유방암에서 다른 암보다 높은 것으로 보고하였다¹⁴).

1984년 Oberley 등¹⁵)이 종양 세포에서 Cu, Zn-SOD 및 Mn-SOD 활성도 저하 소견을 관찰하여 ROS의 발생 증가와 항산화 방어 기전의 감소가 종양 성장 촉진(cancer promotion)에 관여 한다고 보고하였으며 간암에서 catalase gene의 발현이 감소하고 종양 질환에서 glutathione peroxidase와 glutathione reductase의 활성도는 다양한 양상을 보이는 것으로 알려져 있다^{14, 16, 17}). 종양 질환에서 지속적인 산화 스트레스가 주변 조직의 침습(invasion) 및 원격전이(metastasis)의 하나의 기전으로 알려져 있으며¹⁴) 특히 종양 질환에서 지속적인 산화 스트레스가 항암제 내성의 하나의 기전으로 알려진 암세포 파괴를 억제하는데 관여하는 단백질로 알려진 adult T-cell derived factor(ADF), glutathione-S-transferase (GST-p) 및 glutathione 등의 유도를 초래 하며^{14, 18-20}) 특히 선암에서 과발현되는 것으로 알려져 있다¹⁸).

이런 보고를 고려할때 본 연구의 종양 질환에서 NKEF-A/PAG의 발현 증가 소견은 생물학적으로 NKEF-A/PAG이 항산화 기능외에 다른 역할을 생각할수 있으며 특히 이 단백질의 H₂O₂에 대한 Km치는 10 μ M 이하등 생화학적 특성이 이를 강력히 시사한다.

1993년 Prosperi 등¹⁰)은 mRNA 차원에서 PAG의 발현이 형질 전환이 되지 않은 HBL-100 세포에서 혈청 자극에 의한 세포 증식시 증가하며 ras 형질 전환된 HBL-100 세포에서는 더욱 증가 하고 HL-60 세포에서 DMSO 처치에 의한 세포 분화시 형태학적 변화와 과립백혈구의 표지자 발현과 함께 PAG의 발현이 감소한다고 보고하였다. 본 연구 결과 HL-60 세포에서 단백질 차원에서 NKEF-A/PAG의 발현이 세포 증식에 의해 증가하고 세포 분화에 의해 발현이

감소 하였다. 뿐만아니라 1994년 Biguet 등²¹)은 NKEF-A/PAG에 전자를 제공하는 thioredoxin이 protein kinase C(PKC) 활성화를 통해 세포 증식에 관여하는 것으로 보고하였으며 1994년 Gasdaska 등은 폐암 조직에서 thioredoxin의 mRNA 발현의 증가를 보고하였다. 따라서 본 연구 결과 폐 및 유방암 조직에서 NKEF-A/PAG의 뚜렷한 발현 증가는 NKEF-A/PAG가 단독으로 혹은 thioredoxin과 함께 상승적으로 세포 증식 및 분화에 작용하여 종양의 성장 촉진(cancer promotion)에 관여하리라고 사료된다.

본 연구에서 분화 양상에 따른 NKEF-A/PAG의 발현을 관찰하기 위해 폐암 세포형에 따른 발현 양상을 관찰한 결과 NKEF-A/PAG의 발현에 뚜렷한 차이가 없었으나 이에 대한 체계적인 연구가 필요할것으로 사료된다.

향후 면역조직화학적 검사를 통한 검증 및 본 연구에서 보여준 조직의 특이성을 알아보기 위해 여러 다른 장기의 종양 질환에 대한 연구와 동시에 임상적인 자료와 비교 연구가 필요할것으로 사료된다.

요 약

목적: 최근 효모에 존재하며 기존의 항산화 단백질과 작용 기전 및 아미노산 서열이 전혀 다른 새로운 항산화 단백질인 thioredoxin peroxidase(TPx)가 보고 되었으며 이 단백질과 아미노산 서열의 유사성을 보이며 포유류에 존재하는 NKEF-A/PAG, NKEF-B/TPx 및 MER5 등의 생화학적 성격이 보고되었다. 특히 PAG는 보고에 의하면 세포 증식 및 분화에 관여하는 것으로 알려져 있으며 thioredoxin peroxidase에 전자를 제공하는 thioredoxin은 protein kinase C을 활성화 하여 세포 증식에 관여하는 것으로 알려져 있다. 뿐만아니라 조직내 reactive oxygen species와 antioxidant의 균형이 종양 성장의 촉진에 작용하는 것으로 알려져 있다.

이에 이들 단백질에 대한 항체를 이용하여 세포내 및 여러 조직에 분포, HL-60 세포를 이용하여 세포 증식 및 분화시 NKEF-A/PAG의 발현을 살펴보고 여러가지 종양 질환에서 NKEF-A/PAG, NKEF-B/TPx 및 MER5의 발현을 관찰하고자 한다.

방법 : NKEF-A/PAG, NKEF-B/TPx은 단백질에 대한 polyclonal antibody와 MER5은 C-terminus에 대한 peptide antibody를 이용하였다. 세포질과 mitochondria를 쥐의 간으로부터 분리하여 crude extract을 얻었다. 흰 쥐의 뇌, 간, 폐, 신장, 비장 및 부신, 폐암, 위암 및 유방암 조직과 같은 환자의 정상 조직을 취하여 분쇄하여 crude extract을 얻었다. 이들 crude extract을 immunoblot 방법으로 발현을 비교 관찰하였다.

결과 :

1) NKEF-A/PAG 및 NKEF-B/TPx는 Cu, Zn-SOD와 같이 세포질에 존재하였고 MER5는 Mn-SOD와 같이 주로 mitochondria에 분포하였으며 NKEF-A/PAG, NKEF-B/TPx 및 MER5가 여러 조직에 고루 분포하였으며 부신에는 MER5가 많이 존재하였다.

2) HL-60 세포에서 NKEF-A/PAG의 발현은 혈청 자극에 의한 세포 증식시 증가하고 DMSO 처치에 의한 세포 분화시 감소하였다.

3) NKEF-A/PAG 발현은 폐 및 유방암에서 같은 환자의 정상조직에 비교하여 발현이 증가 하였으나 위장암에서는 발현에 변화가 없었으며 NKEF-B/TPx 및 MER5 발현은 폐암, 위암 및 유방암에서 발현에 변화가 뚜렷하지 않았다.

4) 폐암 세포 형태에 따른 NKEF-A/PAG, NKEF-B/TPx 및 MER5 발현에는 뚜렷한 차이가 없었다.

결론 : NKEF-A/PAG, NKEF-B/TPx 및 MER5는 세포질 및 mitochondria에 존재하고 여러 조직에 고루 분포한다. 특히 NKEF-A/PAG는 세포의 증식 및 분화에 관여하며 폐암 및 유방암에서 발현이 증가 하였으며 폐암 세포 형태에 따른 발현의 차이는 보이지 않았다.

= Abstract =

Distribution of Thioredoxin Peroxidases and Expression of Thioredoxin Peroxidases in Various Human Cancers

Hyung Jung Kim, M.D.¹, Sung Chul Hwang, M.D.²
Dong Young Noh, M.D.³, Sung Kyu Kim, M.D.¹
Won Young Lee, M.D.¹, Ho Zoon Chae, Ph.D.⁴
and Sue Goo Rhee, Ph.D.⁴

Department of Internal Medicine, Yonsei University, College of Medicine¹, Department of Internal Medicine, Ajou University, College of Medicine², Department of Surgery, Seoul National University, College of Medicine³, Lab. of Cell Signalling, NHLBI, NIH⁴, Bethesda, MD, USA

Objectives : Thioredoxin peroxidase(TPx), which does not exhibit similar activity and amino acid sequence homology to conventional antioxidant enzymes has been purified from *S cerevisiae* and bovine brain. Natural killer enhancing factor-A(NKEF-A)/proliferation associated gene(PAG), natural killer enhancing factor-B(NKEF-B)/TPx and MER5 which has sequence homology to yeast TPx has been recently characterized biochemically.

Prospieri has reported that the level of PAG in HL-60 cells was increased after serum stimulation and decreased after differentiation induced by DMSO treatment. It is well known that thioredoxin, the electron donor to thioredoxin peroxidase, also implicated in cell proliferation via protein kinase C pathway. Disturbed balance of reactive oxygen species and antioxidant in tumor tissue could enhance the cancer promotion

This study was designed to investigate the distribution of NKEF-A/PAG, NKEF-B/TPx and MER5 in various tissues, and the expression of NKEF-A/PAG, NKEF-B/TPx and MER5 in human cancers.

Methods : We used antibodies against the purified recombinant protein of NKEF-A/PAG and NKEF-B/TPx and C-terminus amino acids(SP-TASKEYFEKVHO) of MER5, We separated cytosole and mitochondria from rat liver and prepared crude extract from these. We prepared crude extract of various tissues from rat and cancer tissue from lung, stomach and breast and paired normal tissue. Immunoblot analysis of these crude extracts was performed.

Results :

1) NKEF-A/PAG and NKEF-B/TPx existed in cytosolic fraction as Cu, Zn-SOD and MER5 mainly exist mainly in mitochondrial fraction as Mn-SOD. Although the level of NKEF-A/PAG, NKEF-B/TPx and MER5 was different, all tissues exhibited NKEF-A/PAG, NKEF-B/TPx and MER5 immunoreactive bands. The adrenal gland had relatively strong band of MER5.

2) The expression of NKEF-A/PAG in HL-60 cell was increased after serum stimulation and decreased after cell differentiation induced by DMSO treatment.

3) The expression of NKEF-A/PAG was increased in lung and breast cancer tissues compared to paired normal tissues but was not changed in stomach cancer tissues and the expression of NKEF-B/TPx and MER5 was not changed in lung, stomach and breast cancer tissues compared to paired normal tissues.

4) The level of NKEF-A/PAG, NKEF-B/TPx and MER5 was not different among various lung cancer cell lines.

Conclusion : The NKEF-A/PAG, NKEF-B/TPx and MER5 are present in the cytosol and mitochondria of various tissues. The NKEF-A/PAG, in particular, is associated with cell proliferation and differentiation and overexpressed in lung and breast cancer.

Key Words : Thioredoxin peroxidase, Antioxidant, Cancer

REFERENCES

1) Halliwell B, Gutteridge JMC: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford. 1989
2) Sies H: *Strategies of antioxidant defense*. *Eur J Biochem* 215:213, 1993
3) Kim K, Kim IH, Lee KY, Rhee SG, Stadtman ER: *The Isolation and Purification of a Specific "Protector" Protein Which Inhibits Enzyme Inactivation by a Thiol/Fe(III)/O₂ Mixed-function Oxidation System*. *J Biol Chem* 263:4704, 1987
4) Chae HZ, Kim IH, Kim K, Rhee SG: *Cloning, Sequencing, and Mutation of Thiol-specific Antioxidant Gene of Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 268:16815, 1993
5) Lim YS, Cha MK, Kim HK, Kim IH: *The thiol-specific antioxidant protein from brain:*

Gene cloning and analysis of conserved cysteine regions. *Gene* 140:279, 1994
6) Chae HZ, Chung SJ, Rhee SG: *Thioredoxin-dependent Peroxide Reductase from Yeast*. *J Biol Chem* 269:27670, 1994
7) Lim YS, Cha MK, Yun CH, Kim HK, Kim IH: *Purification and Characterization of thiol-specific antioxidant protein from human red blood cell: A new type of antioxidant protein*. *Biochem Biophys Res Commun* 199(1), 199, 1994
8) Ishii T, Yamada M, Sato H, Matsue M, Taketani S, Nakayama K, Sugita Y, Bannai S: *Cloning and Characterization of a 23-kDa Stress-induced Mouse Peritoneal Macrophage Protein*. *J Biol Chem* 268:18633, 1993
9) Yamamoto T, Matsui S, Obinata M: *Cloning of a housekeeping-type(MER5) preferentially expressed in murine erythroleukemia cells*. *Gene* 80:337, 1989
10) Prosperi M-T, Ferbus D, Karczinski I, Goubin G: *A Human cDNA Corresponding to a Gene Overexpressed during Cell Proliferation Encodes a Product Sharing Homology with Ameobic and Bacterial Proteins*. *J Biol Chem* 268:11050, 1993
11) Shau H, Kim A: *Identification of natural killer enhancing factor as a major antioxidant in human red blood cells*. *Biochem Biophys Res Commun* 199:83, 1994
12) Chae HZ, Kim HJ, Kim KH, Rhee SG: *Thioredoxin-Dependent Peroxide Reductase And Peroxiredoxin Family*. *FASEB J* 9:A1478, 1995
13) Holmgren A: *Thioredoxin and Glutaredoxin system*. *J Biol Chem* 264:13963, 1989
14) Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J, Hiai H: *Persistent oxidative stress in cancer*. *FEBS Letters* 358:1, 1995
15) Oberley LW: *The role of superoxide dismutase and gene amplification in carcinogenesis*. *J Theor Biol* 106:403, 1984
16) Aida Y, Maeyama S, Takakuwa T, Uchikoshi T: *Immunohistochemical expression of manganese superoxide dismutase in hepatocellular carcinoma, using a specific monoclonal antibody*. *J Gastroenterology* 29:443, 1994
17) Durak I, Perk H, Kavutcu M, Canbolat O: *Adenosine deaminase, 5' nucleotidase, xanthine oxidase, superoxide dismutase and catalase activities in cancerous and noncancerous human bladder tissues*. *Free Radic Bio Med* 16:825, 1994

- 18) Fujii S, Nanbu Y, Nonogaki H, Konishi I, Mori T, Masutani H, Yodoi J: *Coexpression of Adult T-Cell Leukemia-Derived Factor, a Human Thioredoxin Homologue, and Human Papillomavirus DNA in Neoplastic Cervical Squamous Epithelium. Cancer 68:1583, 1991*
- 19) Nakamura H, Masutani H, Tagaya Y, Yamauchi A, Inamoto T, Nanbu Y, Fujii S, Ozawa K, Yodoi J: *Expression and Growth-Promoting Effect of Adult T-Cell Leukemia-Derived Factor. Cancer 69:2091, 1992*
- 20) Gasdaska PY, Oblong JE, Cotgreave IA, Powis G: *The predicted amino acid sequence of human thioredoxin is identical to that of the autocrine growth factor human adult T-cell derived factor(ADF): Thioredoxin mRNA is elevated in some human tumors. Biochimica et Biophysica Acta 1218:292, 1994*
- 21) Biguet C, Wakasugi N, Mishal Z, Holmgren A, Chouaib S, Tursz T, and Wakasugi H: *Thioredoxin Increases the Proliferation of Human B-cell Lines Through a Protein Kinase C-dependent Mechanism. J Biol Chem 269:28865, 1994*