인체 간암세포에서 β -lapachone 처리에 의한 Tight Junction 관련 유전자의 변화

김성옥¹ · 권재임² · 김기영³ · 김남득⁴ · 최영현^{1,2*}

¹동의대학교 대학원 바이오물질제어학과(BK21 program), ²동의대학교 한의과대학 생화학교실,

³제주대학교 해양과학대학, ⁴부산대학교 약학대학 약학과

Received July 3, 2007 / Accepted August 17, 2007

β -lapachone Regulates Tight Junction Proteins, Claudin-3 and -4, in Human Hepatocarcinoma Cells.

Sung Ok Kim¹, Jae Im Kwon², Gi Young Kim³, Nam Deuk Kim⁴ and Yung Hyun Choi^{1,2*}. ¹Department of Biomaterial Control (BK21 program), Dongeui University Graduate School and ²Department of Biochemistry, Dongeui University College of Oriental Medicine and Busan 614-052, South Korea; ³Faculty of Applied Marine Science, Cheju National University, Jeju 690-756, South Korea; ⁴Division of Pharmacy (BK21 Program), Pusan National University, Busan 609-735, South Korea - A hallmark of cancers is "leaky" tight junctions (TJs). TJs mediated paracellular permeability is elevated and TJs maintained cell polarity is frequently lost. Concomitantly, TJs-associated proteins including members of the claudin family of proteins are dysregulated. Recent findings indicate that these TJs changes can contribute to cancer progression. In this study, we examined the effects of β -lapachone, a quinone compound obtained from the bark of the lapacho tree (*Tabebuia avellanedae*), on the TJs-associated regulators in human hepatocarcinoma cell lines, HepG2 and Hep3B. β -lapachone treatment downregulated the levels of insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R) proteins in both HepG2 and Hep3B cells. But the levels of claudin-3 and -4 proteins were increased in β -lapachone-treated HepG2 and Hep3B cells. And also the zonula occludens-1 (ZO-1) and β -catenin protein levels by β -lapachone were increased in a time-dependent manner. However, claudin-3 and -4 mRNA levels were uninhibited by β -lapachone in HepG2 and Hep3B. The present results suggest that the upregulation of claudin-3 and -4 protein levels by β -lapachone occurs by a post-transcriptional mechanism and points to a novel mechanism by β -lapachone.

Key words – β -lapachone, tight junction, IGF-1R, claudins, ZO-1, β -catenin

서 론

Tight junction (TJ)은 apical intercellular junction으로 상피세포의 극성(epithelial polarity)과 세포막의 선택적 투과 기능의 유지에 매우 중요한 역할을 한다. 초기 암의 진행과 전이에서 TJ의 변화와 소실이 동반되는데[15], 예를 들면 TJ를 감싸는 transmembrane 단백질인 claudins-1과 -7은 대부분의 전이성 유방암에서 그 발현이 저해되지만 반대로 유방암뿐 아니라 다른 암 조직에서 claudin-3과 -4 발현량은 현저히 증가되어있다[11,21]. Morin에 의하면 TJ 단백질의 발현 조절은 암 발생 과정의 부가적 결과라기보다 오히려 암의 진행과 전이에 원인적 역할을 하는 것으로 보고되고 있다[15]. 또한 몇몇 다른 암세포에서 정상세포 수준의 claudin 발현 회복은 암세포의 침윤과 전이의 억제와 연관되어 있음이 보고된 바 있다. TJ의 중요한 조절인자인 zonula occludens-1 (ZO-1)은 유방암의 69%에서 그 발현이 감소하거나 소실되었다고 보고되며 이러한 감소는 유방암환자의 나쁜 예후와도 관련이 있는 것으로 보고되어지고 있다[9].

β -lapachone (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol[1,2-b]pyran-5,6-dione)은 남미지역에 자생하는 *Tabebuia avellanedae*라는 나무의 수피로부터 동정된 quinone계 천연물의 하나이다[7,13,18]. 이 물질은 anti-carcinogenic, anti-bacterial, anti-fungal, anti-trypanocidal 및 cytotoxic activities를 포함한 다양한 약리적 작용을 가지고 있는 것으로 알려져 있다[5,6,8,12,17,19]. 이를 바탕으로 한 인체 암세포의 증식억제 가능성과 연관된 β -lapachone을 이용한 최근 연구에서 β -lapachone은 다양한 암세포의 성장을 억제시키고 apoptosis를 유도하는 것으로 보고되어지고 있다[2-4,10,16,20]. 그러나 현재까지 β -lapachone의 다양한 항암작용 연구에도 불구하고 인체암 세포의 다른 조직으로의 침윤과 전이과정에 중요한 역할을 하는 유전자의 변화와 연관된 암세포 전이억제의 분자생물학적 기전은 거의 시도된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 β -lapachone의 항전이 효능에 관한 연구의 일환으로 β -lapachone의 TJ 단백질 변화와 연관된 기초적인 기작에 대한 영향을 조사하였다.

이를 위하여 사용한 HepG2 및 Hep3B 간암세포는 한국생명공학연구소에서 분주 받아 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에 1%의 penicillin 및 streptomycin이 포함된 DMEM 배지(Gibco BRL)를 사용하여 37°C 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. β -lapachone은

*Corresponding author

Tel : +82-51-850-7413, Fax : +82-51-853-4036

E-mail : choiyh@deu.ac.kr

Biomol (Plymouth Meeting, PA, USA)에서 구입하였으며 순수 alcohol에 녹여 10 mM의 stock 용액으로 제조한 뒤 -20℃에 보관하여 적정 농도로 배지에 희석하여 처리하였다. β -lapachone의 처리에 따른 암세포의 형태 변화관찰은 세포배양용 페트리접시에 암세포를 5×10^5 개/ml 또는 1×10^6 개/ml 정도로 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 다음 β -lapachone을 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양한 후, 도립현미경을 이용하여 200배의 배율로 각 농도에 따른 형태의 변화를 관찰하였다. RT-PCR을 통한 mRNA 발현 변화의 관찰을 위해서는 상기와 동일한 조건에서 준비된 세포를 PBS로 세척하고 TRIzol reagent (Invitrogen Co. Carlsbad, CA, USA)를 4℃에서 1시간 동안 처리하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, oligo dT primer와 AMV reverse transcriptase (RT)를 이용하여 2 μ g의 RNA에서 ss cDNA를 합성하였다. 만들어진 RT product (template cDNA)에 2.5 mm dNTP, 10X buffer, DEPC water, premixed primer (GenoTech, Korea) 및 Taq DNA polymerase를 넣고 Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 증폭하였다. RT-PCR을 이용하여 분석을 시도한 유전자의 종류는 Table 1에 나타난 바와 같으며, 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 internal control로 사용하였다. 그리고 Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석을 위하여 정상 및 β -lapachone이 처리된 배지에서 자란 암세포들을 PBS로 씻어내고 0.05% trypsin-EDTA로 부유시킨 다음 원심분리하여 세포를 모았다. 이렇게 모아진 세포에 적당량의 lysis buffer를 첨가하여 4℃에서 30분간 반응시킨 후, 14,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 그 상층액을 취하였다. 상층액의 단백질 농도를 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 방법에 따라 정량한 다음 동량의 Laemmli sample buffer (Bio-Rad)를 섞어서 sample을 만들었다. 이렇게 만든 동량의 단백질을 8-12%

SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)에 전이시킨 후, 10% skim milk를 함유한 PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS)에 담구어 상온에서 2시간 정도 incubation하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 PBS-T로 15분 정도 세척하였다. 준비된 membrane에 1차 항체를 처리하여 상온에서 1시간 이상 또는 4℃에서 overnight 시킨 다음 PBS-T로 세척하고 처리된 1차 항체에 맞는 2차 항체를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 다시 PBS-T로 세척하고 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액(Amersham Life ScienceCorp. Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 암실에서 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 양을 분석하였다. Western blot analysis를 위해 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였으며, 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Life Science에서 구입하였다.

인체 간암세포의 성장에 미치는 β -lapachone의 영향을 조사하기 위해 MTT assay[5]를 실시한 결과 HepG2 및 Hep3B 세포 모두에서 β -lapachone 처리 농도 의존적으로 증식이 억제되었으며, LC_{50} 의 농도는 3.5 μ g/ml 전후였으며(Fig. 1A 및 B), 이러한 결과는 다른 인체 암세포에서 나타난 선행연구의 결과들과 매우 유사하였다[2-4,16]. β -lapachone 처리에 따른 암세포들의 증식억제와 연관된 형태변화를 조사하기 위해서 3.5 μ g/ml 농도의 β -lapachone을 처리한 세포를 시간 의존적으로 도립 현미경을 통하여 관찰한 결과는 Fig. 1 C 및 D에서 나타난 바와 같이 β -lapachone의 처리농도가 증가할수록 암세포의 밀도가 감소할 뿐 아니라 세포막 형태의 변화를 나타내어 길고 분지를 형성하는 듯한 모양으로 바뀌면서 부착력을 상실하고 배지 위로 부유되는 경향성이 증가함을 관찰 할 수 있었으며, 이는 선행연구에서 관찰된 연구들과 매우 유사하였다[2-4,16].

Receptor tyrosine kinase는 세포 내에서의 세포주기, apoptosis, 유전자 발현, 세포골격 형성 등의 다양한 세포기능을 조절하는 signaling pathway와 세포외부 환경을 연결하는데 매우 중요하다[14]. Receptor tyrosine kinase인 type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF-1R)와 그 ligand들은 많은 인체 종양에서 그 발현이 증가되며 mice pancreas에서도 IGF-1R 발현이 종양의 침윤과 전이를 유도한다고 보고됨으로 항암치료의 훌륭한 target marker가 될 수 있음이 제시된 바 있기 때문에[1], 본 연구에서는 IGF-1R 단백질 발현에 미치는 β -lapachone의 영향을 조사하였다. Fig. 2의 결과에서 알 수 있듯이 IGF-1R의 발현은 β -lapachone 처리에 따라 HepG2 및 Hep3B 세포 모두에서 처리 시간 의

Table 1. Oligonucleotides used in RT-PCR

Gene	Primer Sequence
GAPDH	Sense CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT
	Antisense AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC
IGF-1R	Sense ACT TCT GCG CCA ACA TCC TCA
	Antisense CCC TTT AGT CCC CGT CAC TTC C
ZO-1	Sense CGC CAA ATG CGG TTG ATC
	Antisense TTT ACA CCT TGC TTA GAG TCA GGG TT
Claudin-3	Sense AAG GCC AAG ATC ACC ATC GTG
	Antisense AGA CGT AGT CCT TGC GGT CGT
Claudin-4	Sense TGG ATG AAC TGC GTG GTG CAG
	Antisense GAG GCG GCC CAG CCG ACG TA
β -catenin	Sense AGG ATT ACA AGA AGC GGC TTT
	Antisense GAA CGG TAG CTG GGA TCA TC

Fig. 1. Cell growth inhibition and morphological changes of human hepatoma cell lines (HepG2 and Hep3B) by β -lapachone. (A and B) HepG2 (A) and Hep3B (B) cells were seeded into 6-well plates at 2×10^6 cells in 1 ml culture media. After culturing for 24 hr, the cells were treated with β -lapachone at varying concentrations for 24 hr. Thereafter, cell survival and toxicity were determined by MTT test according to dose-dependent activity. Each point represents the mean $\pm$ SD of three independent experiments. (C and D) After incubation with 3.5 μ g/ml β -lapachone for the indicated times, the cells were sampled and examined by an inverted microscopy. Magnification, X200.

Fig. 2. Effects of β -lapachone on levels of insulin like growth factor-1 receptor (IGF-1R) mRNA and protein expression in HepG2 and Hep3B cells. (A) After treating with 3.5 μ g/ml β -lapachone for the indicated times, total RNAs were isolated and RT-PCR analyses were performed using the IGF-1R primer. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) Total protein (40 μ g) was fractionated on SDS-polyacrylamide gels and transferred onto PVDF membranes. The membranes were probed with the anti-IGF-1R antibody. Proteins were visualized using the chemiluminescence detection system. Actin was used as a loading control.

존적으로 감소함을 알 수 있었다. 따라서 β -lapachone 처리가 HepG2와 Hep3B 세포의 증식 억제뿐 아니라 adhesion과 migration에도 영향을 줄 것으로 생각되어, wound healing assay와 matrigel invasion 실험을 실시한 결과 간암세

포의 침윤과 전이에 β -lapachone이 강력한 억제 효과가 있음을 확인한 바 있으므로(data not shown) 세포의 junction과 관련된 단백질 발현에 미치는 β -lapachone의 영향을 조사하였다.

Fig. 3. Effects of β -lapachone on the levels of ZO-1, claudin-3, -4 and β -catenin mRNA and protein expression in HepG2 and Hep3B cells. (A) Cells were grown under the same conditions as Fig. 2, total RNAs were isolated and RT-PCR analyses were performed using the ZO-1, claudin-3, -4 and β -catenin primers. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) Total protein (40 μ g) was fractionated on SDS-polyacrylamide gels and transferred onto PVDF membranes. The membranes were probed with the anti-ZO-1, claudin-3, -4 and β -catenin antibodies. Proteins were visualized using the chemiluminescence detection system. Actin was used as a loading control.

암세포의 전이와 관련한 다양한 생체 반응 중 세포의 adhesion과 junction 관련 단백질의 변화에서 특히 TJ 관련 claudins 단백질의 변화가 중요하게 작용할 것으로 추정되어 β -lapachone이 이들 유전자들의 발현에 미치는 영향을 조사하였는데, 특히 유방암세포를 포함한 상피세포성 암세포의 다른 조직으로의 침윤과 전이성은 사망률을 높이고 있어 환자의 예후가 나빠 암세포의 전이를 막는 새로운 방법이 시급하며, claudin 유전자가 hallmark로서 작용할 수 있을 것으로 기대되고 있다[22]. 본 실험의 결과에 의하면 HepG2 및 Hep3B 세포 모두에서 β -lapachone 처리에 따른 암세포의 증식억제효능은 β -lapachone 처리 시간 의존적인 claudin-3 및 -4 단백질의 발현 증가와 연관성이 있음을 알 수 있었다(Fig. 3). 아울러 β -lapachone은 TJ 단백질인 ZO-1의 발현 역시 전사 및 번역 수준에서 유의적으로 증가시켰으며, β -catenin 발현 또한 β -lapachone 처리 시간 의존적으로 증가되었다. 그러나 claudin-3 및 -4의 mRNA 발현은 HepG2 및 Hep3B 세포 모두에서 β -lapachone 처리에 따라 유의적인 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 3). 따라서 조사된 TJ 관련 유전자의 발현 중 claudin-3 및 -4는 β -lapachone 처리에 따라 전사수준에서 보다는 번역

수준에서 조절 받을 수 있을 것으로 기대되어지며, 이에 관한 추가적인 연구를 실시 중이다. 이상의 결과는 β -lapachone의 처리에 의한 TJ의 강화로 암세포의 전이 억제에 영향을 줄 수 있음을 시사하여 주는 것이며, 부가적인 관련 유전자의 발현에도 유의적인 조절 가능성을 제시하여 주는 결과로서 이에 관한 후속 연구의 실시가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

β -lapachone은 남미지역에서 자생하는 *Tabebuia avellanae*라는 나무의 수피에서 동정된 quinone계 물질로서 다양한 인체암세포에서 항암효과가 있는 것으로 알려져있다. 본 연구에서는 β -lapachone의 암 전이 억제에 대한 연구의 일환으로 HepG2 및 Hep3B 인체 간암 세포의 전이관련 유전자의 발현에 미치는 β -lapachone의 영향을 조사하였다. MTT assay 및 세포형태변화 관찰 결과에서 β -lapachone 처리에 따라 HepG2와 Hep3B 세포들은 β -lapachone 농도 의존적으로 세포의 증식이 억제되었으며 그 형태적 변형도 동반하였다. β -lapachone처리에 의한 암 전이 지표가 되는 IGF-1R,

TJs (ZO-1, claudin-3, -4) 및 TJ 조절인자(β -catenin)의 발현을 RT-PCR과 Western blot analysis를 통하여 확인한 결과, β -lapachone 처리가 IGF-1R의 발현 억제와 TJ 유전자 발현의 증가를 유도함으로써 β -lapachone이 TJ를 강화하여 암세포의 전이 억제작용을 하는 것으로 관찰 되었다. 이상의 결과는 인체 간암세포에서 β -lapachone의 항전이 작용의 이해에 중요한 기초 자료가 될 것으로 생각한다.

감사의 글

김성옥은 2006년도 2단계 두뇌한국21사업의 박사후연구원 지원을 받았으며, 이 논문은 2006년도 정부(과학기술부)의 재원으로 한국과학재단의 지원을 받아 수행된 연구임(R01-2006-000-1117-0).

참 고 문 헌

- Andre, F., C. Rigot, J. Thimonier, C. Montixi, F. Parat, G. Pommier, J. Marvaldi and J. Luis. 1999. Integrins and E-cadherin cooperate with IGF-I to induce migration of epithelial colonic cells. *Int. J. Cancer* **83**, 497-505.
- Chau, Y. P., S. G. Shiah, M. J. Don and M. L. Kuo. 1998. Involvement of hydrogen peroxide in topoisomerase inhibitor β -lapachone-induced apoptosis and differentiation in human leukemia cells. *Free Radic. Biol. Med.* **24**, 660-670.
- Choi, B. T., J. Cheng and Y. H. Choi. 2003. β -lapachone-induced apoptosis is associated with activation of caspase-3 and inactivation of NF- κ B in human colon cancer HCT-116 cells. *Anticancer Drugs* **14**, 845-850.
- Choi, Y. H., H. S. Kang and M. A. Yoo. 2003. Suppression of human prostate cancer cell growth by β -lapachone via down-regulation of pRB phosphorylation and induction of Cdk inhibitor p21(WAF1/CIP1). *J. Biochem. Mol. Biol.* **36**, 223-229.
- Choi, Y. H., M. J. Kim, S. Y. Lee, Y. N. Lee, G. Y. Chi, H. S. Eom, N. D. Kim and B. T. Choi. 2002. Phosphorylation of p53, induction of Bax and activation of caspases during β -lapachone-mediated apoptosis in human prostate epithelial cells. *Int. J. Oncol.* **21**, 1293-1299.
- Don, M. J., Y. H. Chang, K. K. Chen, L. K. Ho and Y. P. Chau. 2001. Induction of CDK inhibitors (p21(WAF1) and p27(Kip1)) and Bak in the β -lapachone-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *Mol. Pharmacol.* **59**, 784-794.
- Guiraud, P., R. Steiman, G. M. Campos-Rakaki, F. Segle-Murandi and M. Semeon de Buochberg. 1994. Comparison of antibacterial and antifungal activities of lapachol and β -lapachone. *Planta Med.* **60**, 373-374.
- Gupta, D., K. Padar, Y. T. Tai, B. Lin, T. Hideshima, M. Akiyama, R. Leblanc, L. Catley, N. Mitsiades, C. Mitsiades, D. Chauhan, N. C. Munshi and K. C. Anderson. 2002. β -lapachone, a novel plant product, overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Exp. Hematol.* **30**, 711-720.
- Hoover, K. B., S. Y. Liao and P. J. Bryant. 1998. Loss of the tight junction MAGUK ZO-1 in breast cancer. *Am. J. Pathol.* **153**, 1767-1773.
- Huang, L. and A. B. Pardee. 1999. β -lapachone induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *Mol. Med.* **5**, 711-720.
- Kominsky, S. L., P. Argani, D. Korz, E. Evron, V. Raman, E. Garrett, A. Rein, G. Sauter, O. P. Kallioniemi and S. Sukumar. 2003. Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma *in situ* and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene* **22**, 2021-2033.
- Li, C. J., C. Wang and A. B. Pardee. 1995. Induction of apoptosis by β -lapachone in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* **55**, 3712-3715.
- Lopez, J. N., F. S. Cruz, R. Docampo, M. E. Vasconcellos, M. C. Sampaio, A. V. Pinto and B. Gilbert. 1978. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the toxicity of 1,4-naphthoquinone and 1,2-naphthoquinone derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **72**, 523-531.
- Lopez, T. and D. Hanahan. 2002. Elevated levels of IGF-1 receptor convey invasive and metastatic capability in a mouse model of pancreatic islet tumorigenesis. *Cancer Cell* **1**, 339-353.
- Morin, P. 2005. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res.* **65**, 9603-9606.
- Pink, J. J., S. Wuerzberger-Davis, C. Tagliarino, S. M. Planchon, X. Yang, C. J. Froelich and D. A. Boothman. 2000. Activation of a cysteine protease in MCF-7 and T47D breast cancer cells during β -lapachone-mediated apoptosis. *Exp. Cell Res.* **255**, 144-155.
- Planchon, S. M., J. J. Pink, C. Tangliarino, W. G. Bornmann, M. E. Varnes and D. A. Boothman. 2001. β -lapachone-induced apoptosis in human prostate cancer cells: involvement of QO1/xip3. *Exp. Cell Res.* **267**, 95-106.
- Schaffner-Sabba, K., K. H. Schmidt-Ruppin, W. Wehrli, A. R. Schuerch and J. W. Wasley. 1984. β -lapachone synthesis of derivatives and activities in tumor models. *J. Med. Chem.* **27**, 990-994.
- Shiah, S. G., S. E. Chuang, Y. P. Chau, S. C. Shen and M. L. Kuo. 1999. Activation of c-Jun NH2-terminal kinase and subsequent CPP32/Yama during topoisomerase inhibitor β -lapachone-induced apoptosis through an oxidation-dependent pathway. *Cancer Res.* **59**, 391-398.
- Tagliarino, C., J. J. Pink, G. R. Dubyak, A. L. Nieminen and D. A. Boothman. 2001. Calcium is a key signaling molecule in β -lapachone-mediated cell death. *J. Biol. Chem.* **276**, 19150-19159.
- Tokés, A. M., J. Kulka, S. Paku, A. Szik, C. Páska, P. K. Novák, L. Szilák, A. Kiss, K. Bögi and Z. Schaff. 2005. Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast Cancer Res.* **7**, R296-305.
- Van Itallie, C. M. and J. M. Anderson. 2004. The Molecular Physiology of tight junction pores. *Physiology (Bethesda)* **19**, 331-338.