간염바이러스 X단백질 유전자를 핵산전달감염시킨 간암세포주에서 17-DMAG의 항종양효과 상승 효과

이철승 · 김옥희 · 홍하은 · 전상진 · 원성수 · 김세준

가톨릭대학교 의과대학 서울성모병원 외과

17-DMAG has the Potentiated Anticancer Effects Against Hepatocellular Carcinoma Cells by Transfection of the Gene Encoding Hepatitis B Viral X Protein

Chul-Seung Lee, Ok-Hee Kim, Ha-Eun Hong, Sang-Jin Jeon, Seong-Soo Won, Say-June Kim

Department of Surgery, Seoul St. Mary's Hospital, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Background/Aims: Hepatitis B viral protein X (HBx) is implicated in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma (HCC) as well as the elevation of heat shock proteins (HSPs) after hepatitis B virus (HBV) infection. We thus investigated the anticancer effects of an HSP90 inhibitor 17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG) in HBx-transfected hepatocellular carcinoma cells.

Methods: pcDNA-HBx was made by inserting the HBx gene derived from the HBV-infected patient into pcDNA3.1 using the restriction enzymes (XbaI/HindIII). HBx-expressing HepG2 cells were then generated by transfecting HepG2 cells with pcDNA containing HBx gene. To compare the anticancer effects of 17-DMAG between pcDNA-HBx transfected HepG2 cells and the control cells (pcDNA-transfected HepG2 cells), we performed various molecular studies, including Ez-cytox proliferation assay, Western blot analysis, and flow cytometry.

Results: 17-DMAG inhibited the proliferation of pcDNA-HBx transfected HepG2 cells better than control cells ($P < 0.05$). After treating with a various concentration of 17-DMAG (50–1,000 nM), pcDNA-HBx transfected HepG2 cells exhibited higher expression of pro-apoptotic proteins (c-caspase-3, c-caspase-8, and c-caspase-9) than did control cells ($P < 0.05$). pcDNA-HBx transfected HepG2 cells showed higher activities of caspase-3, caspase-8, and caspase-9 than did control cells ($P < 0.05$). Finally, we found that the expression of pro-apoptotic proteins (PARP and c-caspase-3) was considerably decreased by the use of a caspase inhibitor suggesting that 17-DMAG induces the cell death of HepG2 cells caspase-dependently.

Conclusions: Our study strongly suggests that 17-DMAG has antiviral effects against HBV as well as anticancer effects against HepG2 cells. Thus, the application of 17-DMAG appears to be particularly advantageous to the HCC patients related with HBV infection.

(J Liver Cancer 2017;17:126-135)

Keywords: 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin; Apoptosis; Caspases; hepatitis B virus X protein; Hepatocellular carcinoma

Received Feb. 13, 2017

Revised May. 23, 2017

Accepted Jun. 9, 2017

Corresponding author : Say-June Kim

Department of Surgery, Seoul St. Mary's Hospital, College of Medicine, The Catholic University of Korea, 222 Banpo-daro, Seocho-gu, Seoul 06591, Korea
Tel. +82-2-2258-6764, Fax. +82-2-595-2822
E-mail; sayjunekim@gmail.com
<http://orcid.org/0000-0001-5171-4837>

서론

B형 간염 바이러스(hepatitis B virus, HBV)는 noncytopathic DNA 바이러스에 해당한다.¹ HBV에 감염된 사람들은 전 세계적으로 400만 명에 이르며, HBV는 만성 간염, 전격성 간염 및 간암 등의 원인이 된다. HBV는 감염된 5%의 성인과 95%의 신생아에게 지속적인 감염을 유발한다. 숙주 간세포의 핵 내로 이동한 HBV의 이중나선 바이러스 DNA는 Covalently closed circular DNA (cccDNA)로 전환된다. 이 cccDNA를 주형으로 하여 4개의 주요한 RNA (3.5-, 2.4-, 2.1-, 0.7-kb)가 만들어지는데, 이때 0.7-kb RNA로부터 만들어지는 단백질이 X단백질(hepatitis B viral X, HBx)이다. 많은 연구에서 HBx가 간암발생과 밀접하게 관련된다는 것을 밝혔다. 즉, HBx는 1) 종양억제유전자인 p53의 활성을 억제하고,^{2,3} 2) 종양유전자를 활성화시키며^{4,6}, 3) 세포증식과 관련된 여러 전사인자의 활성을 높이고,⁷⁻¹⁰ 4) MAPK나 PI3K와 같은 종양 유발신호계를 활성화시키는 것^{11,12}을 통해 간암발생을 촉진시킬 수 있다. 전 세계적으로 HBV로 인한 간암은 전체 간암의 70%가량을 차지한다.¹³ 현재까지 간세포암에 대한 유일한 완치적 접근은 수술적 절제이다. 하지만, 전체 간세포암 환자의 20-30% 정도만이 완치적 절제가 가능한 초기간암에 해당하므로, 항암화학요법을 포함한 간세포암의 비수술적 치료법들이 치료율 향상이 요구된다.

최근 heat shock protein (HSP) 90억제제가 새로운 항암요법제제로서 주목을 받고 있다. Heat shock protein 90 (HSP90)은 ATP 의존적인 샤페론(chaperone)으로 내담자 단백질(client protein)과 결합하여 내담자 단백질의 구조적 변화(structural conformation)를 일으켜서 안정화시키는 기능을 지닌다. 식도, 폐, 유방 및 췌장에서 유래하는 다양한 암종에서 HSP90의 발현이 증가되고,¹⁴ HSP90의 높은 발현은 암종의 임상병리적 특징 및 예후와 관련된다고 보고되었다.¹⁵⁻¹⁷ HSP90의 내담자 단백질은 다양한 종양형성 단백질(oncogenic protein)을 포함하고 있으므로, HSP90 억제제는 새로운 항종양요법이 될 수 있다.¹⁸ 더 나아가 HSP90 억제제는 다른 항암화학요법과 다른 장점들을 가지고 있다. 즉, HSP90 억제제는 1) 한 개의 종양형성단백질만을 표적으로 하지 않고 다양한 종양형성단백질을 표적으로 하며, 아울러 2) 종양세포의 항암화학요법에의 민감성을 높인다. 임상적으로, HSP90 억제제는 흑색종, 골수양 백혈병(myeloid leukemia), 전립선암, 비소세포성 폐암 및 다발골수종에 항암효과를 나타냈다.¹⁹ 17-DMAG는 HSP90 억제제의 일종으로 benzoqui-

none ansamycin 합성물인 geldanamycin의 유도체이다. 17-DMAG는 geldanamycin 유도체 중 간독성을 낮추고, 항종양 효능을 높였으며, 반감기도 길어지고, 무엇보다도 경구투여가 가능한 제제이므로 임상적용 가능성을 높이기 위한 폭넓은 임상연구가 진행되고 있다.^{19,20} 다양한 암종뿐만 아니라,²¹ 간암에 대해서도 preclinical models에 대해 몇몇 성공적인 연구결과가 보고되었다.^{22,23}

한편, HBV는 HSP를 증가시키며, 이 작용에 있어서 HBx가 중요한 역할을 한다는 보고가 있다.²⁴ 즉, HBx가 Ras/Raf/ERK1/2신호계를 활성화시켜서 c-Myc 발현을 유도하며, 그 결과 활성화된 HSP90 α 프로모터(promoter)에 의해 HSP90 α 발현이 증가되었다고 보고되었다. HSP90 α 의 과다발현은 종양세포의 침윤과 연관되어 있다.

이에 저자들은 17-DMAG가 HSP90 억제제로 작용하여 HBV 감염으로 인한 HSP의 증가를 억제하는 효과가 있으므로 HBx에 의해 감염된 간세포암에서 HBx에 의해 감염되지 않은 간세포암보다 더 큰 항종양효과를 지닐 수 있다고 가정했다. 이를 입증하기 위해 본 연구에서는 HBx 유전자를 핵산전달감염(transfection)한 간암세포주와 대조군 간암세포주(HBx 유전자를 핵산전달감염하지 않은 간암세포주)에서의 17-DMAG의 항종양효과를 비교하였다.

대상과 방법

1. 간암 세포주의 배양

간암 세포주인 HepG2 세포는 한국 세포주 은행(Korean cell line bank, South Korea, KCLB)에서 분양받았다. HepG2 세포를 해동한 뒤 37°C/5% CO₂ 조건하에서 High-glucose Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Thermo Scientific, Hemel Hempstead, UK)에 10% 태아 소 혈청(fetal bovine serum [FBS], Thermo Scientific, Hemel Hempstead, UK) 및 1% 항생제(Streptomycin 및 Penicillin; Thermo Scientific, Hemel Hempstead, UK)를 첨가하여 배양하였으며 1주일에 두 번씩 증식배지를 교환했다.

2. pcDNA-HBx plasmid 제직

HBV 감염 환자의 간조직에서 genomic DNA (gDNA)를 추출하는 장치(FavorPrepTissue Genomic DNA Extraction Kit; Favorgen, Ping-Tung, Taiwan)를 이용하여 gDNA를 추

출하였다. 추출한 gDNA를 HindIII와 XbaI의 제한효소를 포함하는 primer를 사용하여 465bp HBx PCR 산물을 획득했다(HBx primer: 5-AAG CTT ATG GCT GCT CGG GTG TGC-3 [Forward primer] Reverse: 5-AGA TCT TTA GGC AGA GGT GAA AAA GTT-3 [Reverse primer]). 획득한 HBx PCR 산물을 Agarose gel에서 확인한 후 Gel elution kit (Favorgen)를 이용하여 분리한 순수한 HBx 산물만을 실험에 이용했다. HBx 산물을 넣을 vector를 준비하기 위해 pcDNA3.1의 Multi-cloning site에 있는 HindIII와 XbaI 제한효소와 ligase 효소를 이용하여 삽입해서 pcDNA-HBx를 제작하였다.

3. RNA 추출 및 역전사효소반응(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)

HepG2 간암세포주에 Tri-RNA reagent (Favorgen, Ping-Tung, Taiwan)를 사용하여 제조사의 설명에 따라서 RNA를 추출하였다. 추출한 1 µg의 RNA를 사용하여 cDNA kit (Elpis Biotech, Daejeon, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 사용하여 유전자에 특이적으로 반응하는 primer로 PCR을 수행하였다. 사용한 Primers는 다음과 같다. Forward: AAA ATG GCT GCT CGG GTG TGC, Reverse: GCG TTA GGC AGA GGT GAA AAA GTT. 465bp의 HBx산물을 agarose gel에서 확인하였다.

4. 간암 세포 증식 분석(Cell proliferation assay)

간암 세포 증식 확인은 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium (water soluble tetrazolium salt, WST-1)을 이용한 Ez-Cytox (Itsbio, Seoul, Korea)를 사용하여 측정하였다. HepG2 세포주를 96 well 배양접시에 10^4 cells/well의 밀도로 도포하고, 24시간 배양 후 17-DMAG를 농도(50–1,000 nM)별로 처리한 후 24시간 및 48시간에서 세포증식을 제조사의 지시에 따라 450 nm에서 흡광도로 측정하였다.

5. Western blot analysis

17-DMAG (50–1,000 nM)를 처리한 HepG2 간암 세포주에 RIPA Lysis kit (ATTO Corporation, Tokyo, Japan)을 사용하여 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 1차 항체(1:1,000 희석)를 4°C에서 12시간 동안 반응시켰고, horse-

radish peroxidase (HRP)-결합된 2차 항체(1:2,000 희석)를 상온에서 1시간 반응시킨 뒤, Western Blotting Plus Chemiluminescence Reagent (Millipore, Bedford, MA, USA)를 이용하여 검출하였다. 사용한 항체는 다음과 같다. Pro-apoptotic proteins (PARP), c-caspase 3, c-caspase 8, c-caspase 9, Mcl-1, Bax, β -actin, HRP-conjugated anti-rabbit IgG 및 HRP-conjugated anti-mouse IgG (모두 Cell Signaling, Beverly, MA, USA).

6. Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

HepG2 간암 세포주를 6 well 배양접시에 2×10^5 cells/well의 밀도로 도포하고, 24시간 후에 17-DMAG를 농도별(50–1,000 nM)로 처리하였다. 48시간 동안 처리한 간암 세포주를 Trypsin-EDTA를 이용해서 수확했다. 수확한 세포에서 apoptosis를 확인하기 위해서 FITC AnnexinV apoptosis detection kit (BD biosciences, San Jose, CA, USA)를 이용하여 Annexin V/Propidium iodide (PI)로 10분 동안 실온에서 염색했다. Reactive oxygen species (ROS)를 측정하기 위해서는 H2DCF-DA (Molecular probe, Waltham, MA, USA)를 이용하여 30분 동안 염색했다. 염색된 세포는 BD FACSCANTO II cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)로 분석하였다.

7. Caspase activity assay

HepG2 간암 세포주를 100 mm-dish에 도포하여 배양했다. 24시간 후에 1 µg pcDNA와 pcDNA-HBx를 Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Hemel Hempstead, UK)을 이용하여 간암 세포주 내에 도입하였다. 핵산전달감염 24시간 뒤에 100 nM 17-DMAG를 처리하고, 세포를 획득하여 caspase 3, caspase 8, 및 caspase 9 활성도를 caspase 3, caspase 8, caspase 9 colorimetric assay kit (Biovision, Milpitas, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

8. Caspase inhibitor test

HepG2 간암 세포주에 20 µM caspase inhibitor Z-VAD-FMK (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 처리하고, 1시간 후 17-DMAG (100 nM)에 처리하였다. 24시간 후에 세포에서 RIPA Lysis kit (ATTO Corporation, Tokyo, Japan)을 사

용하여 단백질을 추출한 뒤, 이를 이용해서 Western blot을 수행했다.

9. 통계처리

실험결과와 측정치는 '평균 $\pm$ 표준편차'로 나타내었다. 자료의 통계분석으로는 Wilcoxon ran-sum test를 이용했다. 통계 프로그램으로 SPSS 18.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 이용했으며, P 값이 0.05 미만인 경우에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. HepG2 간암세포주로의 HBx 유전자의 핵산전달 감염

HBV의 유전체는 부분적인 duplex DNA이며, 4개의 open-reading frame (P, PreC/C, PreS1/S2/S, X)을 가지고 있다(Fig. 1A left). HBV 감염 환자의 간조직에서 genomic DNA를 추출하여 HindIII/XbaI의 제한효소를 포함하는 primer로 HBx PCR산물을 pcDNA에 Cloning하여 pcDNA-HBx를 제작하였다(Fig. 1A). 그 후 제작한 pcDNA-HBx를 HepG2 간암세포주로 핵산전달감염(transfection)하였다. HepG2 간암세포주로의 핵산전달감염이 성공적으로 이루어졌는지 확인하기 위해 RT-PCR을 시행했다. Housekeeping gene인 GAPDH로 정량을 확인했다. 실험결과 pcDNA와 pcDNA-HBx를 핵산전달감염시킨 군에서는 GAPDH만 발현되었으나, pcDNA-HBx를 핵산전달감염시킨 군에서는 465bp의 HBx 유전자가 발현되어 성공적인 HBx 핵산전달 감염이 이루어졌음을 확인할 수 있었다(Fig. 1B).

2. HBx 유전자의 HepG2 간암세포주로의 핵산전달 감염에 따른 17-DMAG의 간암세포에 대한 성장 억제 효과

17-DMAG는 경구복용이 가능한 HSP90 억제제로서 quinone 링을 지니는 geldanamycin 유도체이다(Fig. 2A). 우리는 간암세포주로의 HBx 핵산전달감염 여부가 간암세포에 대한 17-DMAG의 항증식 효과(antiproliferative effect)에 미치는 영향을 알아보고자 했다. 이를 위해 HepG2 간암세포주에 pcDNA와 pcDNA-HBx를 각각 핵산전달감염시킨 뒤,

17-DMAG를 처리하여 각각의 세포에서 세포증식의 차이를 비교하였다(Fig. 2B). 처리한 17-DMAG의 모든 농도(50–1,000 nM)에서 pcDNA-HBx를 핵산전달감염시킨 HepG2 세포주가 대조군(pcDNA를 핵산전달감염시킨 간암세포주)보다 더 유의하게 HepG2 세포의 증식을 억제하였다($P<0.05$).

3. HBx 유전자의 HepG2 간암세포주로의 핵산전달 감염에 따른 17-DMAG의 간암세포에 대한 apoptosis 유도 효과

우리는 HepG2세포에서 HBx의 발현 여부가 17-DMAG의 pro-apoptotic effect에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. 이를 위해 Western blot 분석을 통해 HBx 유전자를 핵산전달감염시킨 HepG2 간암세포주와 대조군의 세포주에서 17-DMAG 처리를 하였을 때 pro-apoptotic marker인 c-caspase 3, c-caspase 8, c-caspase 9 및 Bax의 발현을 비교하였다. 그리고 anti-apoptotic marker로는 Mcl-1의 발현을 조사하였다(Fig. 3A, Supplementary Fig. 1) 17-DMAG의 모든 농도(50–1,000 nM)에서 HBx를 핵산전달감염시킨 HepG2세포에서 대조군보다 pro-apoptotic marker들의 발현이 의미있게 증가하였고, anti-apoptotic marker는 의미있게 감소하였다($P<0.05$).

다음으로 apoptosis가 일어난 세포를 검출하기 위해 pcDNA와 pcDNA-HBx를 각각 핵산전달감염시킨 간암 세포주에 17-DMAG를 48시간 동안 처리한 후 AnnexinV/PI로 염색하여 유세포분석을 시행하였다(Fig. 3B). 모든 농도대(50–1,000 nM)에서 pcDNA-HBx를 핵산전달감염시킨 HepG2세포에서 대조군보다 17-DMAG에 의해 발생하는 apoptosis가 발생한 세포분율(%)이 의미있게 증가하였다($P<0.05$). 다음으로, ROS 생성을 확인하기 위해 DCF-DA로 염색하여 유세포분석을 시행하였다. pcDNA-HBx를 핵산전달감염시킨 HepG2세포에서 대조군보다 17-DMAG에 의해 발생하는 ROS의 발생률이 100–250 nM의 농도에서 의미있게 증가하였다(Supplementary Fig. 2).

4. HBx 유전자 HepG2 간암세포주에서 17-DMAG가 caspase 활성화도에 미치는 영향

다음으로 우리는 HBx 단백을 핵산전달감염시킨 HepG2 세포에서 17-DMAG가 caspase 활성화도에 미치는 영향을 알

Figure 1. Identification of pcDNA-HBx transfection into HepG2 hepatocellular carcinoma cells. (A) (Left) Hepatitis B virus genome. (Right) Construction of plasmid pcDNA3.1 containing HBx gene using the restriction enzyme XbaI and HindIII. (B) Identification of successful transfection of pcDNA-HBx into HepG2 cells as detected by RT-PCR. To identify successful integration, RT-PCR was performed after transfection of HepG2 cells with HBx gene. To exclude any artificial effects of vector transfection on cell response, a control vector (pcDNA) was used in transfection studies. The expression of HBx was detected in the HepG2 cells transfected with pcDNA-HBx plasmid. Data show means and standard deviation for three independent experiments. HBx, hepatitis B viral protein X; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction.

아보았다. HBx 단백을 핵산전달감염시킨 HepG2세포는 대조군의 HepG2세포보다 17-DMAG를 처치할 때 caspase 3, caspase 8, 및 caspase 9 활성도 모두가 증가하였다 (Fig. 4A).

마지막으로, 우리는 HepG2 간암세포주에서 caspase 억제제 처치 여부에 따른 17-DMAG의 pro-apoptosis 효과의 변화를 조사하였다 (Fig. 4B). Caspase억제제로는 z-VAD-FMK를 이용하였고, apoptosis 정도는 western blot analysis

에서 apoptotic marker인 PARP 및 c-caspase 3의 발현을 통해 평가하였다. pcDNA를 핵산전달감염시킨 HepG2 간암세포주에서 17-DMAG처치는 apoptotic marker인 PARP와 c-caspase 3를 큰 폭으로 증가시켰다. 그 후 caspase 억제제인 z-VAD-FMK를 전처리한 뒤 17-DMAG에 의한 apoptotic marker의 변화를 비교했을 때 전처리군에서 17-DMAG에 의한 pro-apoptotic effect가 의미있게 감소되었음을 알 수 있

Figure 2. Anti-proliferative effect of 17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG) against HepG2 cells according to the presence of HBx transfection. (A) Chemical structure of 17-DMAG. (B) Effects of 17-DMAG on the proliferation of HepG2 cells with or without HBx transfection as detected by Ez-cytox proliferation assay. To determine the effects of HBx transfection on antiproliferative potential of 17-DMAG, we compared the effects of 17-DMAG on the proliferation of HepG2 cells with or without HBx transfection. 17-DMAG inhibited the proliferation of pcDNA-HBx transfected HepG2 cells better than control cells (pcDNA-transfected HepG2 cells) ($P < 0.05$). Data show means and standard deviation for three independent experiments. HBx, hepatitis B viral protein X. $^*P < 0.05$ compared to control; $^{\dagger}P < 0.05$.

었다. pcDNA-HBx를 핵산전달감염시킨 HepG2 간암세포주에서도 caspase 억제제인 z-VAD-FMK를 전처리했을 때 17-DMAG에 의해 증가된 apoptotic marker의 발현을 의미 있게 감소시켰다(Fig. 4C). 이상의 결과는 17-DMAG에 의한 세포사멸이 caspase 의존적임을 의미한다(Fig. 4C).

고 찰

우리는 본 실험에서 pcDNA-HBx를 핵산이동감염시킨 HepG2 간암세포주와 대조군의 HepG2 간암세포주(pcDNA-transfected HepG2 cells)에서 17-DMAG의 항종양효과를 비교하여 HBx 핵산이동감염이 간세포암에 대한 17-

DMAG의 항종양효과에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. 17-DMAG는 pcDNA-HBx를 핵산전달감염시킨 HepG2 간암세포주에서 더 의미있게 세포증식을 억제했고, pro-apoptotic marker인 c-caspase 3, c-caspase 8, 및 c-caspase 9 및 Bax의 발현을 더 의미있게 증가시켰으며, anti-apoptotic marker인 Mcl-1의 발현은 대조군에 비해 HBx 단백을 핵산전달감염시킨 HepG2세포에서 의미있게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 AnnexinV/PI로 염색 후 시행한 유세포분석을 통한 apoptosis 분석에서도 모든 농도대(50–1,000 nM)에서 pcDNA-HBx를 핵산전달감염시킨 HepG2세포가 대조군의 세포보다 17-DMAG에 의해 발생하는 apoptosis의 세포분율(%)이 의미있게 증가하였으며, 17-DMAG에 의한 ROS의 생성은 17-DMAG 100–250 nM에서 대조군에 비해 HBx 단백을 핵산전달감염시킨 HepG2세포에서 의미있게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. HBx 단백을 핵산전달감염시킨 HepG2세포는 또한 대조군의 HepG2 세포보다 17-DMAG를 처리할 때 caspase 3, caspase 8, 및 caspase 9 활성도 모두가 증가하였다. 마지막으로 우리는 caspase억제검사를 통해 17-DMAG가 caspase 의존적으로 간암세포의 사멸을 유도함을 보였다. 이상의 연구결과는 17-DMAG가 간암세포에 대해서 항종양효과를 지닐 뿐만 아니라 HBV에 대해서 항바이러스 효과까지 지니고 있음을 시사한다.

지금까지 여러 전임상연구는 HSP90 억제제가 간세포암에 대해 항암효과를 지닌다는 것을 입증하였다. Breinig 등²²은 quinone 계통의 HSP90 억제제인 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG)와 17-DMAG뿐만 아니라 non-quinone HSP90 억제제인 8-(6-iodobenzo[d][1,3]dioxol-5-ylthio)-9-(3-(isopropylamino)propyl)-9H-purin-6-amine (PU-H71)도 다양한 간암세포주에 대해 세포주기를 정지시켜 세포사멸사를 유도하는 방식으로 항암효과를 나타낸다고 보고하였다. 또한 HSP90 억제제인 17-DMAG는 간암세포에서 1) 직접적으로 survivin을 파괴하거나, 2) p53 억제제를 파괴하여 p53을 상향조절하며, 3) NF-κB와 cyclin D1발현을 감소시키는 방식을 간암에 대해 항종양효과를 나타낸다는 사실이 밝혀졌다.²³ 한편, Lang 등²⁵은 생쥐 간암 모델에서 HSP90 억제제와 Rapamycin을 함께 투여했을 때 항종양효과가 상승함을 보고하였다. 이때 HSP90 억제제는 Rapamycin에 의한 AKT 및 NFκB가 활성화되는 것을 억제하여 Rapamycin의 항종양 효과를 증가시켰다.

HBV는 인체에 침투하면 HSP를 증가시킬 수 있다. Kon-do 등¹은 HBV에 감염된 간세포에서 HSP60의 생성이 증가

함을 발견하였다. 이렇게 분비된 HSP60은 HBV DNA 양과 상관관계를 보였으며, 면역기능을 억제시켜 HBV 감염이

지속시키는 데 기여했다. HBx는 HBV가 HSP를 증가시키는 데 있어서 중요한 역할을 한다. Li 등²⁴은 HBx가 Ras/Raf/

Figure 3. Anti-apoptotic effect of 17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG) against HepG2 cells according to the presence of hepatitis B viral protein X (HBx) transfection. (A) Western blot analysis comparing the effects of 17-DMAG on the expression of pro-apoptotic proteins of HepG2 cells with or without HBx transfection. After treating with a various concentration of 17-DMAG (50–1,000 nM), pcDNA-HBx transfected HepG2 cells exhibited higher expression levels of pro-apoptotic proteins, such as c-caspase-3, c-caspase-8, and c-caspase-9, than did control cells (pcDNA-transfected HepG2 cells) ($P<0.05$). (B) Flow cytometric analysis using Annexin-V/propidium iodide (PI) staining in HepG2 cells for the detection of 17-DMAG-induced apoptosis. To determine the mode of cell death (apoptosis or necrosis) induced by 17-DMAG, flow cytometric analysis using Annexin-V and PI staining were applied to HepG2 cells with or without HBx. Different concentrations of 17-DMAG (50–1,000 nM) were subjected to HepG2 cells after 24 hours of treatment. pcDNA-HBx transfected HepG2 cells exhibited higher rates of apoptosis than did control cells ($P<0.05$). Data show means and standard deviation for three independent experiments. PARP, pro-apoptotic proteins. * $P<0.05$ compared to control; † $P<0.05$.

ERK1/2신호계를 활성화시켜 c-Myc발현을 유도하며, 증가된 c-Myc발현에 의해 HSP90 α 발현이 증가됨을 발견했다. 또한 HBx 유전자를 핵산이동감염시킨 간암세포에서의

HSP90 α 의 과다발현시켰을 때 종양세포의 침윤이 증가함을 보고하였다. 이상을 정리하면 HBV감염 시 발생한 다양한 스트레스가 숙주세포로부터 다양한 HSP들을 분비하게

Figure 4. Identification of caspase dependency of 17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG) pro-apoptotic potential. (A) Caspase activity assay in HepG2 cells with or without hepatitis B viral protein X (HBx) transfection. pcDNA-HBx-transfected HepG2 cells showed higher activities of caspase-3, caspase-8, and caspase-9 than did control cells ($P<0.05$). (B) Effect of caspase inhibition on the pro-apoptotic potential of 17-DMAG to the HepG2 cells. Western blot analysis identified the expression of pro-apoptotic proteins (PARP and c-caspase-3) was considerably decreased by the use of a caspase inhibitor, z-VAD-FMK, suggesting that 17-DMAG induces the cell death of HepG2 cells caspase-dependently. (C) Effect of caspase inhibition on the pro-apoptotic potential of 17-DMAG to the HBx-transfected HepG2 cells. Similar to the control HepG2 cells, the caspase inhibitor (z-VAD-FMK) significantly decreased the expression of pro-apoptotic proteins. PARP, pro-apoptotic proteins. DMSO, dimethyl sulfoxide; Ct, control. * $P<0.05$.

하며, 이렇게 분비된 HSP들은 HBV에 의한 지속적인 감염을 일으키고, 간암세포의 경우 종양세포의 침윤을 일으켜 예후를 악화시키는 것으로 보인다.

본 연구는 간암세포주에 HBx 유전자를 핵산이동감염시켰을 때 17-DMAG에 의한 항종양효과가 더 증가되었음을 보였다. 이는 17-DMAG가 바이러스성 단백질에 대한 억제 효과를 지니고 있음을 시사한다. Kim 등²⁶은 HCVcc로 감염시킨 인간 간암세포주(Huh7 세포)에서 17-DMAG를 통해 HSP90을 억제시켰을 때 HCV증식이 억제되었다고 보고하였다. 이는 17-DMAG가 PDK1을 불안정화시키고, 불안정화된 PDK1이 viral RNA polymerase의 인산화를 억제한 결과 HCV의 증식이 억제되는 것으로 생각된다. 17-DMAG는 또한 엡스타인바 바이러스(Epstein-Barr virus)의 복제에 필요한 다양한 단백질을 표적으로 해서 발현을 감소시켜 엡스타인바 바이러스의 세포내 증식 및 감염성 바이러스입자의 분비도 억제시킨다.²⁷ 이외에도, HSP90은 Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)의 증식을 촉진하는 단백질인 Tax를 활성화시키므로, HSP90 억제제는 HTLV-1의 복제와 HTLV-1에 의한 종양 유도작용을 억제할 수 있다.²⁸

결론적으로, 우리는 본 연구를 통해 17-DMAG가 HBx가 핵산전달감염된 간암세포주에서 대조군의 간암세포주(HBx를 핵산전달감염하지 않은 간암세포주)보다 더 큰 항종양효과가 있음을 알 수 있었다. 즉, 17-DMAG는 대조군의 세포주보다 pcDNA-HBx를 핵산전달감염시킨 HepG2 간암세포주에서 더 의미있게 간암 세포의 증식을 억제시켰고, pro-apoptotic marker들의 발현을 증가시키고, anti-apoptotic marker의 발현을 감소시켰으며, ROS도 의미있게 증가함을 확인하였다. 또한, 17-DMAG의 처리는 HBx 단백을 핵산전달감염시킨 HepG2 간암세포주에서 caspase 3, caspase 8, 및 caspase 9 활성도 모두를 증가시켰다. 17-DMAG는 caspase 의존적으로 간암세포의 사멸을 유도하는 것으로 보인다. 이상의 연구결과는 17-DMAG가 간암세포에 대해서 항종양효과를 지닐 뿐만 아니라 HBV에 대해서 항바이러스 효과까지 지니고 있음을 시사한다. 따라서 HBV로 인한 간세포암에서의 17-DMAG의 처리는 간세포암에 대한 항종양효과뿐만 아니라 HBV에 대한 항바이러스 효과까지 지니므로 고려할 만한 가치가 있다고 하겠다.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SJ Kim designed the study, analyzed data, and finally ap-

proved the version to be published, CS Lee, OH Kim, HE Hong, SJ Jeon, and SS Won contributed equally to performing experiments, and CS Lee wrote the paper.

ACKNOWLEDGMENT

This study was supported by an academic research fund of the Korean Liver Cancer Study for 2014.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary data can be found with this article online <http://www.e-jlc.org/html/>.

Conflicts of Interest

The authors have no conflicts to disclose.

REFERENCES

1. Kondo Y, Ueno Y, Kobayashi K, Kakazu E, Shiina M, Inoue J, et al. Hepatitis B virus replication could enhance regulatory T cell activity by producing soluble heat shock protein 60 from hepatocytes. *J Infect Dis* 2010;202:202-213.
2. Elmore LW, Hancock AR, Chang SF, Wang XW, Chang S, Callahan CP, et al. Hepatitis B virus X protein and p53 tumor suppressor interactions in the modulation of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:14707-14712.
3. Truant R, Antunovic J, Greenblatt J, Prives C, Cromlish JA. Direct interaction of the hepatitis B virus HBx protein with p53 leads to inhibition by HBx of p53 response element-directed transactivation. *J Virol* 1995;69:1851-1859.
4. Abraham R, Doerr HW, Braun W, Stemler M, Will H, Hess G, et al. Antibodies to hepatitis B virus x-protein in sera of patients with acute and chronic active hepatitis. *Med Microbiol Immunol* 1989;178:187-197.
5. Kekulé AS, Lauer U, Weiss L, Lubert B, Hofschneider PH. Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumour promoter signalling pathway. *Nature* 1993;361:742-745.
6. Twu JS, Lai MY, Chen DS, Robinson WS. Activation of proto-oncogene c-jun by the X protein of hepatitis B virus. *Virology* 1993;192:346-350.
7. Lara-Pezzi E, Armesilla AL, Majano PL, Redondo JM, López-Cabrera M. The hepatitis B virus X protein activates nuclear factor of activated T cells (NF-AT) by a cyclosporin A-sensitive pathway. *EMBO J* 1998;17:7066-7077.

8. Lucito R, Schneider RJ. Hepatitis B virus X protein activates transcription factor NF-kappa B without a requirement for protein kinase C. *J Virol* 1992;66:983-991.
9. Seto E, Mitchell PJ, Yen TS. Transactivation by the hepatitis B virus X protein depends on AP-2 and other transcription factors. *Nature* 1990;344:72-74.
10. Tanaka Y, Kanai F, Ichimura T, Tateishi K, Asaoka Y, Guleng B, et al. The hepatitis B virus X protein enhances AP-1 activation through interaction with Jab1. *Oncogene* 2006;25:633-642.
11. Lee YI, Kang-Park S, Do SI, Lee YI. The hepatitis B virus-X protein activates a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *J Biol Chem* 2001;276:16969-16977.
12. Shih WL, Kuo ML, Chuang SE, Cheng AL, Doong SL. Hepatitis B virus X protein inhibits transforming growth factor-beta -induced apoptosis through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* 2000;275:25858-25864.
13. Chacko S, Samanta S. "Hepatocellular carcinoma: A life-threatening disease". *Biomed Pharmacother* 2016;84:1679-1688.
14. Shiota T, Ojima H, Hiraoka N, Shimada K, Rokutan H, Arai Y, et al. Heat shock protein 90 is a potential therapeutic target in cholangiocarcinoma. *Mol Cancer Ther* 2015;14:1985-1993.
15. Chen MH, Chiang KC, Cheng CT, Huang SC, Chen YY, Chen TW, et al. Antitumor activity of the combination of an HSP90 inhibitor and a PI3K/mTOR dual inhibitor against cholangiocarcinoma. *Oncotarget* 2014;5:2372-2389.
16. Pick E, Kluger Y, Giltzane JM, Moeder C, Camp RL, Rimm DL, et al. High HSP90 expression is associated with decreased survival in breast cancer. *Cancer Res* 2007;67:2932-2937.
17. Song CH, Park SY, Eom KY, Kim JH, Kim SW, Kim JS, et al. Potential prognostic value of heat-shock protein 90 in the presence of phosphatidylinositol-3-kinase overexpression or loss of PTEN, in invasive breast cancers. *Breast Cancer Res* 2010;12:R20.
18. Neckers L, Neckers K. Heat-shock protein 90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Expert Opin Emerg Drugs* 2002;7:277-288.
19. Jhaveri K, Miller K, Rosen L, Schneider B, Chap L, Hannah A, et al. A phase I dose-escalation trial of trastuzumab and alvespimycin hydrochloride (KOS-1022; 17 DMAG) in the treatment of advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2012;18:5090-5098.
20. Eiseman JL, Lan J, Lagattuta TF, Hamburger DR, Joseph E, Covey JM, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 17-demethoxy 17-[[[(2-dimethylamino)ethyl]amino]geldanamycin (17DMAG, NSC 707545) in C.B-17 SCID mice bearing MDA-MB-231 human breast cancer xenografts. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005;55:21-32.
21. Pacey S, Wilson RH, Walton M, Eatock MM, Hardcastle A, Zetterlund A, et al. A phase I study of the heat shock protein 90 inhibitor alvespimycin (17-DMAG) given intravenously to patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2011;17:1561-1570.
22. Breinig M, Caldas-Lopes E, Goeppert B, Malz M, Rieker R, Bergmann F, et al. Targeting heat shock protein 90 with non-quinone inhibitors: a novel chemotherapeutic approach in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009;50:102-112.
23. Leng AM, Liu T, Yang J, Cui JF, Li XH, Zhu YN, et al. The apoptotic effect and associated signalling of HSP90 inhibitor 17-DMAG in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Biol Int* 2012;36:893-899.
24. Li W, Miao X, Qi Z, Zeng W, Liang J, Liang Z. Hepatitis B virus X protein upregulates HSP90alpha expression via activation of c-Myc in human hepatocarcinoma cell line, HepG2. *Virol J* 2010;7:45.
25. Lang SA, Moser C, Fichtner-Feigl S, Schachtschneider P, Hellerbrand C, Schmitz V, et al. Targeting heat-shock protein 90 improves efficacy of rapamycin in a model of hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology* 2009;49:523-532.
26. Kim MG, Moon JS, Kim EJ, Lee SH, Oh JW. Destabilization of PDK1 by Hsp90 inactivation suppresses hepatitis C virus replication through inhibition of PRK2-mediated viral RNA polymerase phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;421:112-118.
27. Sun X, Bristol JA, Iwahori S, Hagemeyer SR, Meng Q, Barlow EA, et al. Hsp90 inhibitor 17-DMAG decreases expression of conserved herpesvirus protein kinases and reduces virus production in Epstein-Barr virus-infected cells. *J Virol* 2013;87:10126-10138.
28. Gao L, Harhaj EW. HSP90 protects the human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) tax oncoprotein from proteasomal degradation to support NF-kappa B activation and HTLV-1 replication. *J Virol* 2013;87:13640-13654.