Proteomic Profiling of Human Small Cell Lung Cancer Cell Line NCI-H211

Hee Young Cho, M.S., Mi Kyung Kim, B.S., Young Do Yoo, Ph.D.¹, Myung Ju Ahn, M.D.² and Joung Soon Jang, M.D.

Department of Internal Medicine, GyeongSang National University College of Medicine and GyeongSang Institute of Health Sciences, Jinju; ¹Genomic Research Center for Lung and Breast/Ovarian Cancers, Korea University College of Medicine, Seoul; ²Department of Internal Medicine, Hanyang University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Small cell lung cancer is one of the major causes of death from cancer worldwide. To explore the expressions of global protein in small cell lung cancer cells, a proteomic approach, to identify the proteins, was used and the establishment of a protein reference map attempted.

Materials and Methods: Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE), with subsequent analysis by mass spectrometry (MS), was applied to the study of protein identification from a small cell lung cancer cell line, NCI-H211. The cells were lysed, and the extracts subjected to isoelectric focusing, with immobilized pH gradients, followed by second dimension SDS-PAGE. The polypeptides were identified by peptide mass fingerprinting, with MALDI-TOF MS, after in-gel protein digestion.

Results: From silver staining of the gel, around two

thousands protein spots were separated by the 2-DE. Of these protein spots visualized in the gel, one hundred and ten were identified by peptide mass fingerprinting. Different proteins, such as enzymes, cytoskeletal proteins and proteins common to eukaryotic cells, were identified.

Conclusion: The protein expressions of the small cell lung cancer cells were analyzed to establish a protein reference map. The reference map presented here may serve as a working tool for the further study of small cell lung cancer. (*Cancer Research and Treatment* 2003;35:489-496)

Key Words: Proteome, Small cell lung cancer, Reference map

서론

프로티움 연구(proteomics)는 2차원 전기영동(Two-dimensional gel electrophoresis), mass spectrometry 및 생물정보학(bioinformatics)을 근간으로 하여 단백질을 총체적으로 분석하는 연구방법으로 기존의 유전체 연구 결과를 보완하는 유용한 연구기법이다(1). 최근에 프로티움 연구기법의 발전에 의하여 인간 종양세포에서의 단백질발현 양상이 빠르게 밝혀지고 있어 방광암, 간암, 위암, 유방암 등의 인체 종양 조직 및 세포주에의 분석에 응용되어 연구범위를 넓혀가고

있으며 이를 이용한 종양 표식자 등의 진단 법 및 목적 단백질 발굴을 통한 치료제 개발이 진행되고 있으나 최근 국내에서 발생률이 증가하고 있는 폐암에 대해서는 높아지는 사회적인 손실에도 불구하고 아직 진단 및 치료법 개발에 획기적 진전이 없는 상태이다. 특히 소세포 폐암은 선암이나 편평상피세포암 등에 비하여 진행이 빠르고 조기에 전이를 일으켜 예후가 좀더 불량하다(2~6). 최근 분자 생물학의 발전에 의하여 폐암의 병태 생리의 연구에 대한 많은 발전이 있었으나 전반적으로 단백질 발현을 조망하는 연구는 활성화되지 못하였다. 본 연구에서는 소세포 폐암 세포주에서의 단백질 발현 양상을 mass spectrometry를 기반으로 한 peptide mass fingerprinting에 의하여 단백질 동정을 하여 구명하고 이를 표준 단백질 지도로 삼아 향후 종양 표식자 개발 및 암 백신 개발 등의 치료제 개발의 기반 연구로 삼고자 하였다.

Correspondence: Joung Soon Jang, Division of Hematology- Oncology, Department of Internal Medicine, GyeongSang National University Hospital, 90 Chiram-dong, Jinju 660-702, Korea. (Tel) 055-750-8054, (Fax) 055-758-9122, (E-mail) jsjang@nongae.gsnu.ac.kr

Received October 13, 2003, Accepted December 17, 2003
This work was supported by grant No. R01-2001-000-00151-0 from the Basic Research Program of the Korea Science & Engineering Foundation.

대상 및 방법

1) 대상

연구에 사용된 폐암 세포주(NCI-H211, 전이성 소세포 폐암 유래)는 ATCC (Rockville, MD)에서 구하였으며 암 세포는 10% 태아 우혈청 및 1% penicillin/amphotericin 복합 항균/항진균제가 함유된 RPMI-1640배지에서 37°C 5% CO₂에서 3~4일 마다 계대 배양하였으며 70% confluent 상태에서 수집하여 즉시 분석하였다. 프로티움 분석에 사용한 Ampholyte, immobilized pH gradients (IPG) strip은 Amersham Co. (Cleveland, OH), protease cocktail, urea, CHAPS는 Sigma Co. (St. Louis, MO)에서 구하여 사용하였다.

2) 세포성분 분리 및 프로티움 분석 시료 전(前) 처리

수집된 암 세포에 lysis buffer (8 M urea, 4% CHAPS, 40 mM Tris, 100 mM DTT, 2% Ampholyte)와 protease inhibitor (1mM EDTA (pH 8.0), protease cocktail)를 넣어 녹인 다음 실온에서 1시간 반응시킨 후 원심분리(4°C, 15,000 rpm, 10 분)하여 상등 액을 취하여 Bradford 방법으로 단백질을 정량 후 -70°C에 보관하였다가 사용하였다.

3) 이차원 전기영동(Two-dimensional gel electrophoresis; 2-DE)

일차원 전기영동인 isoelectric focusing (IEF)은 immobilized pH gradients (linear pH gradient 4-7, 17 cm) strip으로 Protean IEF cell (Bio-Rad, Hercules, CA)을 사용하여 수행하였다. Gel은 focusing tray (Bio-Rad)에 in-gel loading 방식으로 시료 (100µg)와 같이 rehydration solution (7 M urea, 2 M Thiourea, 2% CHAPS, 100 mM DTT, 0.5% Ampholyte, Bromophenol Blue 소량)을 넣은 다음 12~14시간 정도 rehydration과정을 거친 후에 250 V에서 15분, 10,000 V로 3시간, 최종 40,000 vhr까지 전압을 올려주었다. 일차원 전기영동 후 Equilibration buffer I (6 M urea, 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 30% glycerol, 2% SDS, 소량의 Bromophenol Blue, 10 mM DTT)을 실온에서 10분간 반응시킨 후 이 조성에 2.5% iodoacetamide를 첨가한 Equilibration buffer II에서 다시 10분간 실온에서 반응시킨 후 용액을 제거하였다. 이차원 전기영동은 PROTEAN II xi Cell (Bio-Rad) 전기영동기에 7.5~17.5% SDS-polyacrylamide gradient gel (20×20 cm)을 만들어 equilibration이 끝난 strip을 10°C에서 5 mA/gel로 1시간 전기영동 후 10 mA/gel로 15시간 정도 수행하였다.

4) Image analysis

전기영동이 끝난 gel은 은 염색과 Coomassie blue 염색을 하였다. 은 염색을 위하여 SDS-PAGE가 끝난 gel을 methanol: acetic acid: water (50 : 10 : 38)용액에 1.5시간 적시고 50% ethanol로 20분간 2회 세척 후 0.02% Na₂S₂O₃용액에 1분간 전처리하였다. 단백질은 0.2% AgNO₃, 0.075% v/v formalin 용액에 20분간 염색하여 수세하고 0.06% v/v formalin, 2% Na₂CO₃, 0.0004% Na₂S₂O₃가 함유된 용액에서 발색시켰다. Coomassie blue 염색은 2% phosphoric acid가 함유된 30% ethanol용액에 20분간 3회 고정하고 2% phosphoric acid로 세척한 후 18% ethanol, 2% phosphoric acid, 15% ammonium sulfate 함유 용액에 30분간 반응시킨 다음 Coomassie Brilliant Blue G-250을 1%의 농도가 되게 가하여 밤새 염색하였다. 이런 과정을 거쳐 발색된 단백질 패턴은 고해상도 스캐너(GS-710 Calibrated imaging Densitometer, Bio-Rad)로 스캐닝하여 저장하여 gel 이미지 분석을 하였다.

5) In-gel digestion

Gel에 Coomassie blue 염색을 한 후 목표로 하는 단백질 스폿을 gel에서 잘라내어 증류수로 수세 후 50% acetonitrile로 15분씩 2회 세척하였다. 용액을 제거한 후 다시 100% acetonitrile용액에 5분간 두었다가 용액을 제거하고 0.1 M NH₄CO₃용액에 5분간 넣어 재함수시킨 후 동일 부피의 100% acetonitrile을 첨가하여 15분간 반응시킨 후 용액을 완전히 제거한 후 vacuum centrifuge를 이용하여 gel을 완전히 건조시켰다.

건조된 gel조각에 10 mM DTT/0.1 M NH₄CO₃을 넣고 56°C에서 45분간 반응시킨 후 실온에서 55 mM iodoacetamide/0.1 M NH₄CO₃을 넣고 어두운 곳에서 30분간 반응시킨 후 용액을 제거하였다. Gel을 0.1 M NH₄CO₃용액에서 5분간 세척 후 같은 부피의 100% acetonitrile을 넣고 15분간 두었다가 용액을 제거하였으며 이 과정을 2회 반복하였다. Gel을 수세 후 Vacuum centrifuge로 완전히 건조시키고 digestion buffer (50 mM NH₄CO₃, 5 mM CaCl₂, 12.5 ng/µl trypsin)를 넣고 45분간 얼음 속에서 반응시킨 후 용액을 제거하고 다시 trypsin이 제거된 digestion buffer를 넣고 37°C에서 16~20시간 동안 반응시켜 단백질을 가수 분해시켰다. 그 다음 25 mM NH₄CO₃가 포함된 50% acetonitrile을 넣고 30분간 두었다가 5% formic acid/acetonitrile (1 : 1 volume)을 넣고 30분간 두기를 2회 반복해 펩타이드를 추출하였고 펩타이드 추출용액은 vacuum centrifuge로 완전히 건조하였다.

6) Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry 분석에 의한 단백질 동정

Trypsin분해에 의하여 얻어진 각 펩타이드는 water, acetonitrilematrix 및 trifluoroacetic acid (93 : 5 : 2 volume)의 용액에 용해 후 'solution phase nirocellulose법'에 의하여 처리하였다. α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (40 mg/ml)와 nitrocellulose (20 mg/ml)용액 및 2-propanol을 2 : 1 : 1로 섞은 후 peptide calibrant로 des-Arg-bradykinin (monoisotopic mass, 904.4681)과 neurotensin (1672.9715)을 첨가한 후 잘 혼합하여 분석용 플레이트에 올려 건조한 후 5% formic acid와 Milli-Q water로 세척하고 MALDI-TOF mass spectrometry (Voyager-DE STR, PerSeptive Biosystems, Framingham, MA)에 의하여 질량 값을 분석하였다. 이렇게 얻어진 질량 값은 보정 후 MS-FIT (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>)와 ProFound (http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe)에서의 탐색 도구를 이용하여 SWISS-PROT이나 NCBI 데이터베이스를 이용하여 peptide mass fingerprinting 법에 의하여 단백질을 동정하였다.

결 과

1) 폐암 세포주 NCI-H211에서의 2-DE 이미지

은 염색에서 약 2000개의 단백질이 분리되었다(data not shown). 은 염색 이미지에서 목표로 하는 단백질 스폿을 선별한 후 In gel digestion을 위하여 Coomassie blue염색을 하였다. Fig. 1은 Coomassie blue염색을 한 전형적인 2-DE 이미지로서 고유번호가 표시된 스폿은 MALDI-TOF mass spectrometry 분석에 의하여 단백질이 동정되었다.

2) 단백질 동정

MALDI-TOF mass spectrometry 분석 및 database탐색을 통하여 110종의 단백질이 동정되었으며 Table 1에 정리되어 있다. MALDI-TOF mass spectrum 중의 대표적인 예는 Fig. 2에 나타나 있다.

고 찰

프로티옴(proteome)이라는 용어는 protein과 genome을 합

Fig. 1. 2-DE map of small cell lung cancer cell line NCI-H211.

Fig. 2. (A) Peptide mass fingerprinting of protein spot 11 in 2-DE map. (B) Matching of protein spot 11 peptide mass fingerprint data (SWISS PROT No. p 09211).

성하여 만들어진 용어로 어떤 세포나 조직에서 발현되는 단백질의 총체를 뜻하며 프로티옴 분석연구는 기능적 유전체 연구와 생물정보학 연구와 결합하여 기존의 유전체 연구를 상호 보완하는 방법으로 기존의 완성된 유전체 연구를 보완 발전시켜 실제에 이용할 수 있게 하는 postgenome 영역에 중요한 연구방법이다. 프로티옴 연구의 스케일 면에서의 단백질 분석의 방향은 현재 사용되는 단백질의 전사 후 수식화(posttranslational modification)를 포함한 단백질 발현의 검색 및 분리 동정, 단백질 활성 검색, 복합체 내에서의 단백질 상호반응 및 세포 내 단백질 국재화(localization) 등을 통한 단백질 기능 분석 등이다(7). 이러한 프로티옴 분석연구를 통한 전체적인 단백질의 성상 및 활성 연구를 통하여 암 등의 질병의 병리기전에 대한 이해를 넓힐 수 있고 임상적으로는 신약개발이나 새로운 진단 표식자를 개발하는 데 이용될 수 있다(8~10). 현재 사용되는 프로티옴 분석연구는 2차원 전기영동 및 이미지분석, mass spectrometry 및 단백질 분석 데이터베이스를 근간으로 하는

단백질 분석기술을 기초로 하여 여러 방향으로 응용이 되고 있는데 복합체를 이루는 단백질을 polypeptide 성분으로 나누어 분리하여 분석하는 연구, 정상과 악성세포 혹은 세포의 분화단계별 단백질 발현 패턴 등 각 시료에 따른 단백질 발현 경향을 비교 분석하거나 세포에 약제 등을 처리하는 조건을 만들어 이에 대한 세포의 반응을 단백질 발현을 통하여 연구하는 것이다.

이러한 연구를 통해 얻은 자료는 유전체 정보와의 관계 데이터베이스를 구축하기도 하는데 표준 gel format을 사용하여 이차원 전기영동으로 분리한 단백질 스폿을 단백질미량분석기술과 접목하여 gel상에 나타난 모든 단백질을 계량정보의 특정 유전자와 연결시켜 유전자-단백질(유전자산물)의 대응관계를 데이터베이스로 구축하여 활용할 수 있다(11). 이러한 연구의 일환으로 편평상피세포 폐암 환자의 조직에서 단백질을 동정하여 프로티옴 데이터베이스를 구축한 후 향후 연구를 위한 molecular marker를 스크리닝하고자 하는 연구가 있고 소세포 폐암을 비롯한 여러 종류의

Table 1. Proteins identified in small-cell lung cancer cell line NCI-H211

Spot No.	Protein name	Accession No.	Masses matach	Mw (kDa)/pI	Seq. coverage
2	Alpha-tubulin	37492	15 (40)	50,158/5.0	36
3	Beta-tubulin	2119276	12 (52)	48,880/4.7	24
4	Actin, beta	14250401	13 (43)	41,005/5.6	39
5	Nucleolar phosphoprotein B23, numatrin	16307090	5 (26)	29,465/4.5	28
6	Nucleolar phosphoprotein B23, numatrin	16307090	6 (37)	29,465/4.5	28
7	Laminin-binding protein	34234	11 (35)	31,794/4.8	43
8	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	13097279	18 (50)	32,338/4.9	47
9	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	P07910	12 (52)	33,688/5.0	32
10	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	P09936	7 (21)	24,825/5.3	30
11	Glutathione S-transferase P	P09211	10 (25)	23,356/5.4	60
12	Peroxiredoxin 2	P32119	8 (16)	21,892/5.7	40
17	Tropomyosin alpha 3 chain	P06753	7 (38)	32,819/4.7	20
18	14-3-3 protein epsilon	P42655	16 (50)	29,174/4.6	49
19	14-3-3 protein gamma	P35214	14 (36)	28,303/4.8	45
20	14-3-3 protein beta/alpha	P31946	5 (21)	28,083/4.8	20
21	14-3-3 protein zeta/delta	P29312	14 (41)	27,745/4.7	44
23	Proteasome subunit beta type 6 precursor	P28072	6 (19)	25,358/4.8	25
24	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	P52565	7 (21)	23,207/5.0	25
26	Lactoylglutathione lyase	Q04760	10 (50)	20,720/5.2	38
27	Lactoylglutathione lyase	Q04760	11 (39)	20,720/5.2	51
28	Tubulin-specific chaperone B	Q99426	7 (36)	27,326/5.1	34
29	Chloride intracellular channel protein 1	O00299	11 (45)	26,923/5.1	53
30	Proteasome subunit alpha type 3	P25788	12 (40)	28,433/5.2	38
32	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	P09936	5 (21)	24,825/5.3	29
33	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-25 kDa	P27924	8 (28)	22,407/5.3	43
34	ATP synthase D chain, mitochondrial	O75947	7 (30)	18,491/5.2	44
44	Small nuclear ribonucleoprotein F	Q15356	5 (20)	9,725/4.7	31
45	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 2	Q13347	11 (55)	36,502/5.4	36
46	Inorganic pyrophosphatase	Q15181	10 (45)	32,660/5.5	37
47	F-actin capping protein beta subunit	P47756	12 (54)	31,351/5.4	42
48	Annexin A4	P09525	21 (61)	35,883/5.8	56
49	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB beta subunit	Q29459	5 (18)	25,569/5.6	15
50	Prohibitin	P35232	10 (30)	29,804/5.6	30
51	Peroxiredoxin 4	Q13162	12 (40)	30,540/5.9	45
54	Endoplasmic reticulum protein ERp29 precursor	P30040	8 (30)	28,994/6.8	30
55	Antioxidant protein 2	P30041	11 (35)	25,035/6.0	48
56	Proteasome subunit alpha type 1	P25786	11 (45)	29,556/6.1	34
57	Adenosylhomocysteinase	P23526	15 (51)	47,717/5.9	34
58	Tubulin beta-5 chain	P05218	20 (47)	49,671/4.8	39
59	T-complex protein 1, beta subunit	P78371	20 (52)	57,489/6.0	56
60	Ubiquinol-cytochrome C reductase complex core protein I	P31930	16 (55)	52,619/5.9	30
61	RuvB-like 2	Q9Y230	15 (55)	51,157/5.5	34
62	Keratin, type II cytoskeletal 8	P05787	16 (61)	53,675/5.5	34
63	Protein disulfide isomerase A3 precursor	P30101	17 (51)	56,782.9/5.99	32
64	Advillin (p92)	O75366	20 (71)	92,087/5.3	26
65	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	P55072	18 (51)	89,323/5.1	20
66	HEAT SHOCK 70 KDA PROTEIN 4	P34932	12 (50)	94,301/5.2	20
68	Splicing factor 3 subunit 1	Q15459	14 (60)	88,887/5.2	17
69	HSPC108	6841440	8 (42)	37,145.7/5.83	33
70	HSPC140	6841502	7 (36)	38,419/5.0	28
71	SEC13-related protein	P55735	6 (40)	35,568.9/5.22	27
72	p47	5531827	9 (36)	40,572/5.0	26
73	p47 protein	20149635	11 (37)	40,573/5.0	34
74	26S protease regulatory subunit 6A	P17980	17 (50)	49,204.0/5.13	30
75	p47 protein	20149635	15 (68)	40,573/5.0	41
76	Gamma enolase	P09104	13 (48)	47,137.8/4.91	36

Table 1. Continued

Spot No.	Protein name	Accession No.	Masses matach	Mw (kDa)/pI	Seq. coverage
77	Histone acetyltransferase type B subunit 2	Q16576	9 (45)	47,820.5/4.89	20
78	Chromatin assembly factor 1 subunit C	Q09028	12 (52)	47,656.1/4.74	25
79	Placental ribonuclease inhibitor	P13489	10 (29)	49,842.8/4.71	36
82	Glycyl-tRNA synthetase	P41250	8 (53)	83,140.3/6.61	13
83	T-complex protein 1, alpha subunit	P17987	14 (51)	60,344.1/5.80	28
84	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	P05091	10 (37)	56,382/6.6	20
85	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	P31943	9 (34)	49,230/5.9	25
87	Ezrin (p81)	P15311	16 (64)	69,399/5.9	22
88	T-complex protein 1, gamma subunit	P49368	16 (57)	60,403/6.1	30
90	Heat shock-related 70 kDa protein 2	P54652	9 (50)	70,022/5.6	19
91	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Q07244	8 (27)	50,977/5.4	18
92	Lamin B1	P20700	18 (62)	66,409/5.1	32
93	Lamin B1	P20700	19 (67)	66,409/5.1	35
94	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Q07244	15 (57)	50,976.7/5.39	31
95	60 kDa heat shock protein	P10809	11 (44)	61,055.2/5.70	28
96	Serine/threonine protein phosphatase 2A	P30153	18 (54)	65,092.9/4.97	35
97	ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor	P06576	24 (51)	56,560.4/5.26	43
98	26S protease regulatory subunit 6B	P43686	14 (50)	47,366.7/5.09	36
99	Protein disulfide isomerase precursor	P07237	17 (56)	57,116.8/4.76	32
100	Elongation factor 1-delta	P29692	10 (47)	31,122.1/4.90	32
101	Thioredoxin-like protein	O43396	5 (45)	32,251.6/4.84	22
102	Nucleoside diphosphate kinase A	P15531	6 (40)	17,148.9/5.83	47
103	Proteasome activator complex subunit 1	Q06323	14 (51)	28,723.3/5.78	53
104	G-rich sequence factor-1	Q12849	6 (46)	47,999.9/5.51	15
105	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	P52597	9 (52)	45,672.3/5.38	27
110	My027 protein	I2001996	10 (52)	33,233.1/5.40	29
111	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	Q15691	10 (55)	29,999/5.0	42
113	Keratin, type I cytoskeletal 19	P08727	13 (56)	44,106/5.0	28
116	Branched-chain amino acid aminotransferase, cytosolic	P54687	9 (47)	42,806/5.2	19
117	53 kDa BRG1-associated factor A	O96019	12 (54)	47,461/5.4	25
118	Keratin, type I cytoskeletal 18	P05783	19 (50)	48,058/5.3	38
119	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1	O95433	8 (25)	38,275/5.4	23
120	Proteasome subunit beta type 4 precursor	P28070	6 (31)	29,192/5.7	21
121	Transaldolase	P37837	13 (76)	37,540/6.4	32
123	Septin 2	Q15019	8 (40)	41,488/6.1	23
124	Glutathione synthetase	P48637	10 (40)	52,385/5.7	22
127	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Q07244	5 (22)	50,977/5.4	12
128	LaminB2	Q03252	9 (45)	67,689/6.1	16
129	Mitochondrial inner membrane protein	Q16891	10 (40)	83,679/6.1	15
130	Mitochondrial inner membrane protein	Q16891	7 (46)	83,679/6.1	11
132	Elongation factor 1-delta	P29692	7 (31)	31,122/4.9	33
134	Cytochrome b5	P00167	5 (38)	15,199.0/4.88	49
136	Spermidine synthase	P19623	7 (41)	33,825/5.3	22
137	Alpha-soluble NSF attachment protein	P54920	9 (45)	33,247/5.2	40
138	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Q07244	6 (27)	50,977/5.4	14
139	Glutaminase, kidney isoform, mitochondrial precursor	O94925	6 (24)	73,462/7.8	10
142	Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase	Q15274	6 (42)	30,815.9/5.81	23
143	Serine/threonine protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	P37140	9 (37)	37,187.2/5.84	28
145	Transaldolase	P37837	8 (36)	37,540.5/6.36	18
146	60S acidic ribosomal protein P0	P05388	5 (38)	34,273.8/5.72	16
148	60S acidic ribosomal protein P0	P05388	6 (35)	34,273.8/5.72	23
149	F-actin capping protein alpha-2 subunit	P47755	5 (22)	32,949.4/5.57	23
150	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) beta subunit 1	P04901	5 (33)	37,377.3/5.60	15

폐암환자의 혈청에서 암 세포에 대한 자가 면역 반응을 유발하는 종양항원을 프로티움 연구를 통하여 동정하고자 하는 연구한 연구결과도 보고되고 있다(12,13). 본 연구에서 구축한 소세포 폐암에서의 단백질 지도는 이러한 연구의 상호 보완적인 기반자료가 될 수 있다. 암세포 이외에 혈액, 침, 양수 등의 다양한 체액에 대한 분석도 시도되었고(14~16), 항암약제내성, 세포사멸 등과 관련된 특이 항원도 동정되기 시작하였으며 이를 기반으로 한 암 세포생리 연구를 통하여 진단 및 치료법 개발에 역할을 할 수 있을 것으로 보인다(17,18).

한편 아직 개선해야 할 여러 기술적인 문제들도 남아있다. 통상적으로 유핵세포에서 분리할 수 있는 총 단백질은 염색에서 4,000~5,000개의 스폿이 분리될 수 있으나 통상은 그 절반에 그치고 있으며 비용해성 단백질 동정의 어려움도 용해 buffer의 개량 등을 통하여 향후 개선해야 할 문제들이다. 조직 분석에서 여러 세포의 혼입에 의한 자료의 일관성 부족 문제, 재현성 부족에 의한 연구 결과 편차의 문제 등도 해결해야 할 문제들이다. 이러한 난점의 개선 방안의 하나로 각 시료 간 비교를 주로 하는 연구의 경우 연구방법의 편차를 줄이기 위하여 각기 다른 fluorescent 색소를 단백질에 붙여 2개 이상의 시료를 한번의 전기영동으로 분석하는 방법도 실용화되어 향후의 연구에서는 응용이 가능하다(19). 본 연구에서는 1종의 암 세포주를 분석하였는데 암 세포주의 특성상 배양 조건에 따라 상이한 단백질 발현양상이 나타날 수 있고 같은 폐암종이라 할지라도 세포 아형에 따라 생물학적 양상이 상이함으로 본 연구 결과는 폐암세포에서의 단백질 발현 양상을 대표한다고 할 수는 없다. 따라서 이러한 다양한 조건에서의 단백질 발현 양상을 연구하는 추가 연구가 따라야 할 것이다. 또한 체외 배양된 세포주에서의 단백질 발현 양상이 생체조직에서의 발현을 많은 부분 반영하지만 기원이 다른 여러 세포가 섞여있는 생체조직에서 내에서는 발현 양상에 차이를 보일 수 있으므로 환자의 조직을 대상으로 한 단백질 동정도 향후 연구에서 이루어져야 할 부분으로 본 연구에서의 자료들은 이러한 연구 결과들과 상호보완적으로 해석하여야 할 것이다.

결 론

본 연구에서는 이차원 전기영동을 통한 단백질 분리 및 MALDI-TOF MS를 이용한 단백질 분석을 통하여 소세포폐암세포주에서 발현되는 단백질들을 동정하여 단백질 표준 지도를 구축하였다. 본 연구에 이용된 이차원 전기영동 및 mass spectrometry에 의한 단백질 분석법을 이용한 프로티움 분석법은 암 세포에서 분리된 단백질들의 스크리닝을 위한

빠르고, 민감하며 신뢰성 있는 연구방법이다. 이렇게 얻어진 자료는 향후 소세포 폐암의 병태 생리 연구 및 진단 치료제 개발 등에 초석이 될 수 있을 것이다.

REFERENCES

1. Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. *Nature* 2003;422:193-197.
2. Ostergaard M, Rasmussen HH, Nielsen HV, Vorum H, Orntoft TF, Wolf H, Celis JE. Proteomic profiling of bladder squamous cell carcinoma: Identification of markers that define their degree of differentiation. *Cancer Res* 1997;57:4111-4117.
3. Kim J, Kim SH, Lee SU, Ha GH, Kang DG, Ha NY, Cho HY, Kang SJ, Lee YJ, Hong SC, Ha WS, Bae JM, Lee CW, Kim JW. Proteome analysis of human liver tumor tissue by two-dimensional gel electrophoresis and matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry for identification of disease-related proteins. *Electrophoresis* 2002;23:4142-4156.
4. Ha GH, Lee SU, Kang DG, Ha NY, Kim SH, Bae JM, Kim JW, Lee CW. Proteome analysis of human stomach tissue: separation of soluble proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and identification by mass spectrometry. *Electrophoresis* 2002;23:2513-2524.
5. Chen ST, Pan TL, Tsai YC, Huang CM. Proteomics reveals protein profile changes in doxorubicin-treated MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Lett* 2002;181:95-107.
6. Shin H, Ahn Y, Bae J, Shin M, Lee D, Lee C, Ohrr H, Ahn D, Ferlay J, Parkin DM, Oh D, Park J. Cancer incidence in Korea. *Cancer Res Treat* 2002;34:405-408.
7. Phizicky E, Bastiaens PI, Zhu H, Snyder M, Fields S. Protein analysis on a proteomic scale. *Nature* 2003;422:208-215.
8. Hanash S. Disease proteomics. *Nature* 2003;422:226-232.
9. Cellis JE. Proteomics: key technology in drug discovery. *Drug Discov Today* 1998;3:193-195.
10. Bergman A, Benjamin T, Alaiya A, Waltham M, Sagaguchi K, Lincer S, Bergman T, Auer G, Appella E, Wirth PJ, Jornvall H. Identification of gel-separated tumor marker proteins by mass spectrometry. *Electrophoresis* 2000;21:679-686.
11. Cellis JE, Rasmussen HH, Leffers H, Madsen P, Honore B, Gesser B, Vanderkerckhove J. Human cellular protein patterns and their link to genome DNA sequence data: usefulness of two dimensional gel electrophoresis and microsequencing. *FASEB J* 1991;5:2200-2208.
12. Li C, Chen Z, Xiao Z, Wu X, Zhan X, Zhang X, Li M, Li J, Feng X, Liang S, Chen P, Xie JY. Comparative proteomics analysis of human lung squamous carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:253-260.
13. Brichory F, Beer D, Le Naour F, Giordano T, Hanash S. Proteomics-based identification of protein gene product 9.5 as a tumor antigen that induces a humoral immune response in lung cancer. *Cancer Res* 2001;61:7908-7912.
14. Beeley JA, Khoo KS. Salivary proteins in rheumatoid arthritis and Sjogren syndrome. *Electrophoresis* 1999;20:1652-1660.
15. Liberatori S, Bini L, De Felice C, Magi B, Marzocchi B, Frutiger S, Sanchez J, Wilkins MR, Hughes G, Hochstrasser DF, Bracci R, Pallini V. A two-dimensional protein map of human amniotic fluid at 17 weeks' gestation. *Electrophoresis* 1997;18:2816-2822.
16. Bini L, Magi B, Marzocchi B, Cellesi C, Berti B, Rossolini A, Pallini V. Two-dimensional electrophoretic patterns of acute-phase human serum proteins in the course of bacterial and viral diseases. *Electrophoresis* 1996;17:612-616.

17. Jang JS, Cho H, Lee W, Lww CW, Park Y. Differential protein profile analysis of breast cancer cell line with drug resistance. *Proc Am Asso Cancer Res* 2003;44:962(abst 4839)
18. Brockstedt E, Rickers A, Kostka S, Laubersheimer A, Dorken B, Bommert K, Otto A. Identification of apoptosis-associated proteins in a human Burkitt lymphoma cell line. *J Biol Chem* 1998;273:28057-28064.
19. Kondo T, Seike M, Mori Y, Fujii K, Yamada T, Hirohashi S. Application of sensitive fluorescent dyes in linkage of laser microdissection and two-dimensional gel electrophoresis as a cancer proteomic study tool. *Proteomics* 2003;3:1758-1766.