

## IM-9 세포에 있어서 세라마이드에 의한 세포주기 변화와 아포프토시스

윤기호 · 최관수 · 김원호\* · 최경희\* · 김미영\*

중앙대학교 약학대학, \*중앙대학교 이과대학

(Received November 12, 1995)

### Cell Cycle Alteration and Apoptosis Induced by Ceramide in IM-9 Cells

Ki Ho Yoon, Kwan Soo Choi, Won Ho Kim\*,  
Kyung Hee Choi\* and Mie Young Kim\*

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

\*College of Natural Science, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

**Abstract**—Sphingolipids play important roles in cell regulation and signal transduction. Recently, a sphingomyelin cycle has been described in which activation of neutral sphingomyelinase leads to the breakdown of sphingomyelin and the generation of ceramide. Ceramide, in turn, has emerged as a candidate intracellular mediator for the action of certain cell agonists and has multiple biologic actions. Ceramide is a potent suppressor of cell growth and an inducer of apoptosis. The present studies show that exposure of IM-9 cells to ceramide resulted in internucleosomal cleavage of DNA, yielding ladder patterns of oligonucleosomal fragments characteristic of apoptosis. DNA fragmentation induced by ceramide was also confirmed by diphenylamine assay. The effect of ceramide on cell cycle progression was also studied. The addition of ceramide increased G<sub>1</sub> phase distribution in cell cycle. Cell cycle-related cyclin D<sub>1</sub> gene expression was decreased in a time-dependent manner. These results suggest that apoptosis induced by ceramide is related to cell cycle associated with the alteration of cell cycle in IM-9 cells.

**Keywords** □ Ceramide, Apoptosis, Cell Cycle, Cyclin D<sub>1</sub>.

Sphingolipid와 그 분해산물은 세포기능의 조절에 중요한 역할을 하며 또한 signal transduction에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 이와 관련하여 최근에는 sphingomyelin cycle이 발견되었고<sup>1)</sup> 세포자극제에 의하여 sphingomyelin의 가수분해가 촉진되며, 이때 생성된 ceramide는 생물학적 활성물질임이 밝혀졌다.<sup>2-5)</sup> Ceramide는 세포막 sphingomyelin이 sphingomyelinase에 의하여 가수분해되어 생성되며 vitamin D<sub>3</sub>,<sup>2)</sup> TNF- $\alpha$ ,  $\gamma$ -interferon<sup>3)</sup>, interleukin-1<sup>4)</sup>작용의 여

러 세포기능조절의 mediator로 알려져 있다. Ceramide에 의하여 매개되는 세포내 작용으로서는 세포분화 촉진, 세포증식억제, apoptosis, protein trafficking의 조절 및 염증반응 등이 보고되어 있다.<sup>5-10)</sup> 특히 세포증식억제작용은 myeloid, lymphoid, fibroblast세포에서 보고되어 있으며 최근에 이르러 ceramide의 세포증식억제작용은 apoptosis유발에 의한 것으로 알려지기 시작하였다. Ceramide는 myeloid U-937세포와 HL-60세포에서 TNF- $\alpha$ 에 의한 apoptosis의 mediator로 밝혀졌는데 U-937세포에서 ceramide는 3~24시간에 DNA fragmentation과 형태학적 변화를 나타내며 diacylglycerol은 ceramide의 apoptosis효과를 저해하는

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-820-5607 (팩스) 02-816-7338

것으로 보고되고 있다.<sup>8-10)</sup> 이상과 같은 연구결과를 볼 때 일부 세포에 있어서 ceramide의 세포증식억제작용은 apoptosis유발결과에 의한 것으로 밝혀졌으나 이의 확실한 작용기전에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 기존에 보고된 myeloid cell line과는 다른 종류의 세포에서도 apoptosis작용을 가지는지 알아보기 위하여 B-lymphoblastoid cell인 IM-9 세포를 사용하여 ceramide의 apoptosis유발효과를 확인하였으며 이는 세포주기의 G<sub>1</sub>기 분포의 증가와 관련이 있는 것으로 밝혔다.

### 실험방법

**시약** - RPMI 1640과 fetal bovine serum은 Gibco사로부터 구입하였고 C<sub>2</sub>-ceramide와 propidium iodide는 Sigma사로부터 구입했다. 또한 Penicillin-Streptomycin solution, Xho 1, Klenow enzyme와 probe labeling시약은 Bohringer Mannheim로부터 구입했다. [ $\alpha$ <sup>32</sup>P]dCTP(3000 Ci/mmol)는 Amersham사에서 구입했고 기타 다른 시약은 최상품에 준하는 것을 사용하였다.

**세포 배양** - IM-9 세포는 human B-lymphoblastoid cells로써 RPMI 1640 (Gibco)에 10% heat-inactivated fetal bovine serum(Gibco)을 가한 배지를 세포 배양액으로 사용하였고, 5% CO<sub>2</sub>와 습도가 일정하게 유지되는 37°C incubator에서 2×10<sup>5</sup>~1×10<sup>6</sup> cells/ml 농도로 유지시키면서 3일마다 한번씩 배양액을 교환해 주었다.

**세포 증식과 Cell Viability의 측정** - 2×10<sup>5</sup> cells/ml로 심은 세포에 5 μM, 10 μM, 20 μM의 ceramide를 가하고 일정시간 배양 후 hemacytometer로 세포수를 세었다. 세포의 viability는 trypan blue exclusion 방법을 사용하였다.

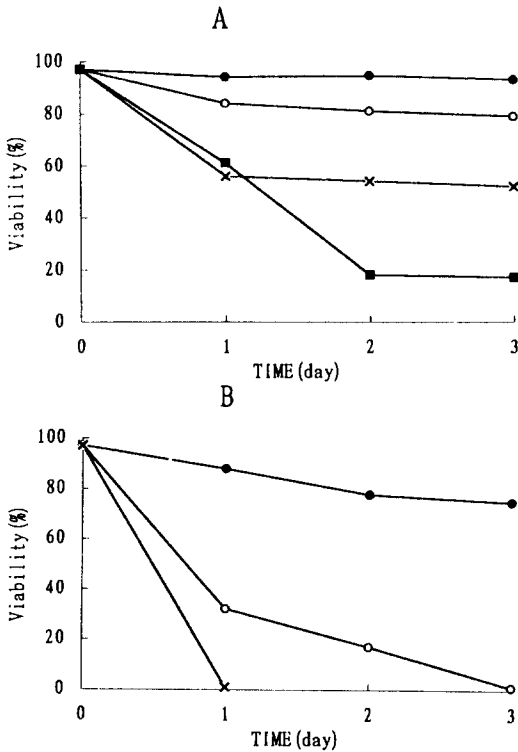
**Diphenylamine assay** - 약 2×10<sup>6</sup>개의 세포를 PBS용액으로 2번 세척한 후 lysis buffer(10 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.2% Triton X-100)를 가하고 얼음에서 15분간 배양한 후 intact DNA와 fragmented DNA를 분리하기 위하여 4°C에서 20분간 원심분리(13000×g)한다.<sup>11)</sup> 수층은 12.5%의 TCA(trichloroacetic acid)로 18시간 동안 DNA를 침전시키고, pellet에는 400 μl의 차가운 12.5% TCA를 가하고 혼합한다. 이를 4°C에서 5분간 원심분리(13000×g)

하고 이 pellet에 30 μl의 5 mM NaOH, 30 μl의 1 M perchloric acid를 가하고 70°C에서 20분간 DNA를 추출한 후, 140 μl의 diphenylamine 시약을 가하고 37°C에서 18시간동안 반응시킨다. 여기서 120 μl를 취해 96 well plates (flat bottomed)로 옮겨서 ELISA Micro Reader (Bio-Rad 1350)를 이용하여 600 nm에서의 흡광도를 측정하여 fragment된 양을 백분율로 나타낸다.

**Fragmented DNA의 분리와 Agarose gel 전기영동에 의한 확인** - 2×10<sup>6</sup>개의 세포를 PBS용액으로 두번 세척한 후 400 μl의 extraction buffer (10 mM Tris, pH8.0, 0.1 M EDTA, pH 8.0, 20 μg/ml RNase, 0.5% sodium dodecyl sulfate)를 가하여 가볍게 흔들며 37°C에서 1시간 반응시키고, 100 μg/ml proteinase K를 가한 후 shaking incubator에서 50°C로 16~18 시간동안 반응시킨다. 이를 4°C에서 20분간 원심분리 (20000×g)하고 수층을 취해 phenol/Chloroform로 추출하고, EtOH에서 농축한 후 TE buffer로 충분히 녹여서, 1.5% agarose gel에서 전기영동 한다.<sup>8)</sup> 이 gel을 ethidium bromide (0.5 μg/ml)로 염색시키고 UV에서 DNA를 확인한다.

**세포 주기 분석** - 2×10<sup>6</sup>개의 세포에 15 μM ceramide를 가하고 지시된 시간에 세포를 PBS용액으로 세척을 한 후, 1 mM EDTA를 함유하는 PBS용액으로 재분산시킨 다음, 70% EtOH로 고정시킨다. 시료를 실온에서 원심분리한 다음 상등액을 버린다. 시료에 RNase A (0.1 mg/ml)를 처리하고 propidium iodide solution (50 μg/ml)로 염색시킨다. FACS (Becton-Dickinson사)로 488 nm에서 형광을 측정한다.<sup>17)</sup>

**RNA의 분리 및 Northern blotting** - 세포를 4°C에서 원심분리하여 pellet을 모으고 PBS용액으로 씻어준 후 pellet에 RNA extraction buffer(140 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-Cl pH 8.0, 0.5% NP-40, 2 mM DTT)을 넣고 원심분리한다. 상층액을 취하여 STE buffer(0.2 M Tris-Cl pH 8.0, 25 mM EDTA pH 8.0, 0.3 M NaCl)를 가하고 phenol/chloroform으로 추출하고 에탄올에서 침전시킨 후 원심분리하고 UV spectrophotometer를 이용하여 260 nm에서 정량한다. 분리한 RNA를 1% formaldehyde agarose gel 상에서 전기영동하여 분리한 후 nitrocellulose filters에 transfer시킨다.

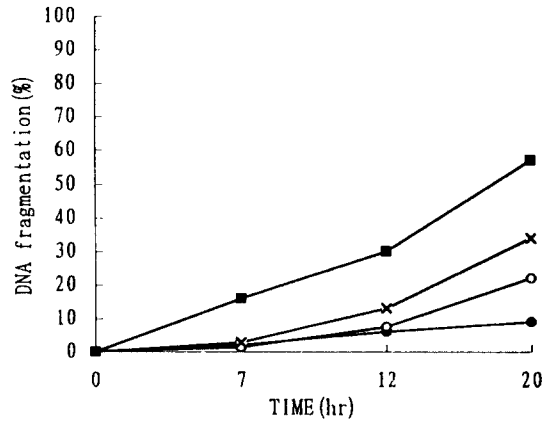


**Fig. 1** - Viability of IM-9 cells by ceramide. Cells were grown in 10% FBS-supplemented media (A) or serum-free media supplemented with insulin (5 mg/l) and transferrin (5 mg/l) (B). Cells were treated with ethanol vehicle or with the indicated concentration of C<sub>2</sub>-ceramide for 3 days. Percentage viability was determined by trypan blue dye. The results shown are representative of three separate experiments. (●-●: Control, ○-○: 5 μM Ceramide, ×-×: 10 μM Ceramide, ■-■: 20 μM Ceramide).

Filter는 42°C에서 2 시간동안 prehybridization하고 나서 random primer labelling방법을 이용하여 만든( $\alpha^{32}P$ )-labelled 1.3 kb Xho1 cyclin D<sub>1</sub> probe을 이용하여 42°C에서 20시간 hybridization한다. Filter를 씻어주고 건조시킨 후 -70°C에서 X-ray film에 노출시킨다.

**결 과**

**IM-9세포에 대한 ceramide의 viability 감소** - 효과 2×10<sup>5</sup>/ml 농도의 세포에 5 μM, 10 μM, 20 μM의 C<sub>2</sub>-ceramide(N-acetyl-sphingosine)를 가하고 cell viability를 3일 동안 측정된 결과, ceramide가 농도 의존



**Fig. 2** - Time- and concentration- dependent DNA fragmentation by C<sub>2</sub>-ceramide in IM-9 cells. Fractional solubilized DNA was quantitated by Diphenylamine assay. The results shown are representative of three separate experiments. (●-●: Control, ○-○: 5 μM Ceramide, ×-×: 10 μM Ceramide, ■-■: 20 μM Ceramide).

적으로 세포사멸을 유발하였다. 10 μM 이상의 ceramide에 대해 1일 후 약 50%의 viability를 나타냈으며 5 μM ceramide에서부터 viability의 감소효과가 나타나기 시작했다(Fig. 1A). 또한 IM-9세포를 serum-free media(5 mg/l의 insulin과 5 mg/l의 transferrin을 함유하는 RPMI-1640)에서 각각의 농도로 ceramide를 처리했을 경우 5 μM C<sub>2</sub>-ceramide에서도 1일 후 약 30%의 viability를 나타내었고, 2일 후에는 거의 세포사멸을 일으킨 것을 볼 수 있었다(Fig. 1B).

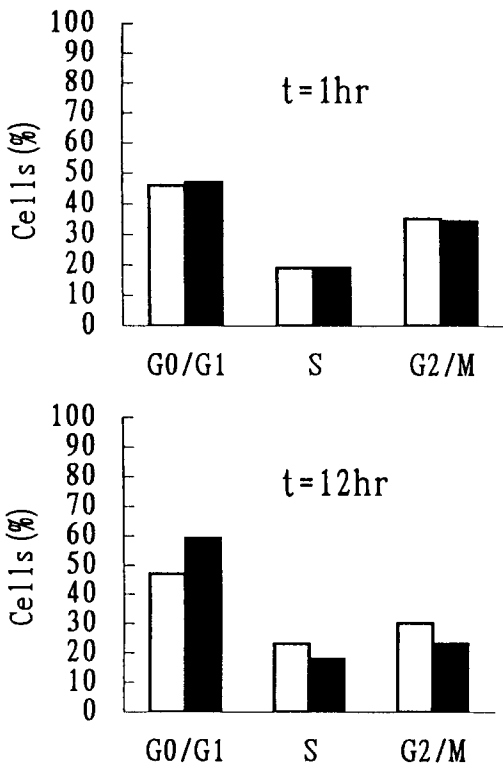
**Diphenylamine assay와 agarose gel 전기영동에 의한 DNA fragmentation 확인**

- Ceramide의 apoptosis 유발 작용을 알아보기 위하여 DNA fragmentation정도를 분석하였다. 2×10<sup>6</sup>개의 세포를 5, 10, 20 μM C<sub>2</sub>-ceramide를 처리하여 지시된 시간별로 세포를 모아 lysis시킨 후 intact DNA와 fragmented DNA를 분리하여 diphenylamine시약을 가하고 600 nm에서 흡광도를 측정된 결과 농도 의존적으로 DNA fragmentation 비율이 증가됨을 보여주었다(Fig. 2). 특히 20 μM C<sub>2</sub>-ceramide를 처리한 후 6시간 뒤에 대조군에 비해 15%의 증가를 보였으며 20시간 후에는 fragmented DNA는 50%이상 증가되었다. 또한 10 μM C<sub>2</sub>-ceramide 존재하에서 24시간 배양후 1.5% agarose gel 전기영동으로 DNA ladder band를 확인할 수 있었다(Fig. 3).

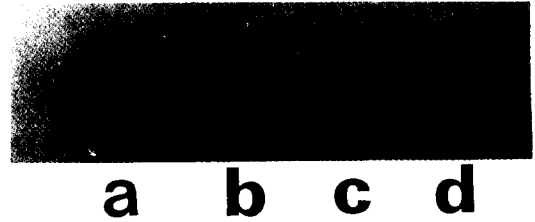
**세포주기의 변화와 cyclin D<sub>1</sub>유전자 발현**



**Fig. 3** — DNA ladder by ceramide in IM-9 cells. Cells were grown in serum-free media for 24 hr in the presence of ethanol vehicle or C<sub>2</sub>-ceramide (10 μM). DNA was analyzed by electrophoresis on a 1.5% agarose gel and stained ethidium bromide(0.5 μg/ml). (a: Control, b: Ceramide).



**Fig. 4** — Effects of ceramide on cell cycle. IM-9 cells were treated with C<sub>2</sub>-ceramide(15 μM) or ethanol vehicle for the indicated time. Cells were fixed, stained and analyzed described under "Method".



**Fig. 5** — Effects of ceramide on cyclin D<sub>1</sub> gene expression in IM-9 cells. Cells were treated with C<sub>2</sub>-ceramide(15 μM) or ethanol vehicle for the indicated time. Total cellular RNA was isolated and analysed by northern blotting. (a: 0 hr, b: 4 hr, c: 8 hr d: 15 hr).

ide에 의한 세포증식억제와 apoptosis가 세포주기의 조절과 관련이 있는 것인지 알아 보기 위하여 2×10<sup>6</sup>개의 세포에 C<sub>2</sub>-ceramide를 처리한 후 propidium iodide로 세포를 염색하여 FACS를 이용하여 세포주기를 분석하였다. 이 결과 대조군은 대략46%의 G<sub>1</sub>기, 19%의 S기, 35%의 G<sub>2</sub>/M 기로 분포하고 있었고 10 μM ceramide를 처리한 후 12시간 후에 59%의 G<sub>1</sub>기, 18%의 S기, 23%의 G<sub>2</sub>/M기를 나타냈다(Fig. 4). 또한 G<sub>1</sub>기에서 S기로의 진행에 관여하는 cyclin D<sub>1</sub> 유전자 발현을 살펴 보면 15 μM C<sub>2</sub>-ceramide를 가한 후 4시간 후부터 감소하기 시작하였다(Fig. 5).

**고 찰**

Ceramide는 TNF-α의 세포분화작용, 세포증식억제작용 및 apoptosis유발 작용의 매개물질로서 알려져 있으며 ceramide자체가 다양한 생물학적 작용을 가지는 것으로 보고되어 있다. 지금까지 본 연구자 등은<sup>4, 11-12)</sup> HL-60, U-937, Swei 세포에서 세포투과성 ceramide가 세포분화촉진, 세포증식억제작용을 가지며 이는 c-myc mRNA 수준의 감소와 관련이 있다는 결과를 얻은 바 있다. 최근에 이르러 myeloid cell에서 ceramide의 세포증식억제작용은 apoptosis유발에 의한 것으로 알려졌으나 아직 apoptosis유발 기전의 연구와 대상세포의 종류가 극히 제한되어 있다. 본 연구에서 ceramide가 lymphoid cell인 IM-9세포에서 세포증식의 억제와 apoptosis를 유발하는 것으로 나타났다. ceramide는 5~20 μM 농도에서 농도 의존적으로 세포사멸을 촉진하였고 특히 serum-free media에서의 억제효과가 더욱 강하게 나타내는 것을 볼 수 있었다. 최근에 Molt-4 세포에서 serum-dep-

rived 상태에서 ceramide의 생성이 증가한다는 보고가 있는데<sup>17)</sup>, serum-free media에서의 억제효과가 크게 나타나는 것은 이와 관련이 있을 것으로 사료된다. Apoptosis는 chromatin condensation, cell shrinkage, apoptic body의 생성등 형태학적 특징과 생화학적 특징인 internucleosomal DNA fragmentation이 일어나 180~200 base pairs 크기의 fragment가 생성되어 gel electrophoresis상에서 DNA ladder band로 확인된다. 본 연구에서는 ceramide의 apoptosis 유발작용을 알아보기 위하여 DNA fragmentation을 확인하였다. DNA fragmentation을 확인하기 위해 diphenylamine assay와 agarose gel 전기영동 실험결과 모두 ceramide에 의하여 DNA fragmentation을 확인할 수 있었다. DNA fragmentation은  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  의존성 endonuclease의 활성이 증가되어 일어나는 현상으로 알려져 있다.<sup>14~16)</sup> Apoptosis유발은  $G_1$ 기 혹은  $G_2$ 기 arrest에 의한 세포주기 조절과 관련이 있는 것으로 밝혀지고 있다.<sup>18~19)</sup> 본 연구에서 ceramide는  $G_1$ 기 분포를 증가시켰으며 cyclin D<sub>1</sub> 유전자 발현을 억제한다는 것으로 나타나 ceramide에 의한 apoptosis생성은 세포주기 조절에 관여하는 유전자가 ceramide의 직접 또는 간접적인 target일 가능성이 있다. D-type cyclin은 CDK와 결합하여 Rb 단백질을 인산화시켜  $G_1$ 기에서 S기로의 진행을 촉진하는 단백질이다. 많은 암세포에서 cyclin D<sub>1</sub>의 과다발현이 관찰되었으며 이는 uncontrolled 세포증식과 관련되어 있다고 보고되어 있다.<sup>18)</sup> p53은 apoptosis유도와 관련된 암 유전자로서 세포주기를 정지시켜 apoptosis유발을 촉진하며 bcl-2 유전자는 이를 억제한다.<sup>18~20)</sup> p53단백질의 전사기능조절에 의하여 cyclin-CDK의 작용을 억제하는 p21단백질이 증가되며  $G_1$ 기 arrest을 유발하는 것으로 알려져 있다. 따라서 ceramide는 tumor suppressor lipid로서의 가능성을 가진다고 볼 수 있으며 앞으로 ceramide의 apoptosis에 유발 작용기전을 규명하기 위하여 암 발생억제유전자와의 관계를 알아보고자 한다.

### 감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 연구과제(931-0700-011-2) 연구비의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 문헌

- 1) Okazaki, T., Bell, R. and Hannun, Y. A. : Sphingomyelin turnover induced by vitamin D<sub>3</sub> in HL-60 cell. *J. Biol. Chem.* **264**, 19076 (1989).
- 2) Okazaki, T., A. Bielawska, Bell, R. M. and Hannun, Y. A. : Role of ceramide as a lipid mediator of 1  $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-induced HL-60 cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **265**, 15823 (1990).
- 3) Kim, M. Y., C. Linardic, L. Obeid, and Hannun, Y. A. : Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of tumor necrosis factor- $\alpha$  and  $\gamma$ -interferon. *J. Biol. Chem.* **266**, 484 (1991).
- 4) Ballou, L. R., Chao, C. P., Maureen, C., Hoeness, M. A., Barker, S. C. and Raghov, R. : Interleukin-1-mediated PGE<sub>2</sub> production and sphingomyelin metabolism. *J. Biol. Chem.* **267**, 20044 (1992).
- 5) Dressler, K. A., S. Mathias, R. N. Kolesnick. : Tumor necrosis factor- $\alpha$  activates the sphingomyelin signal transduction pathway in a cell-free system. *Science* **255**, 1715 (1992).
- 6) Hannun, Y. A. : The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J. Biol. Chem.* **269**, 3125 (1994).
- 7) Hannun, Y. A. and Obeid, L. M. Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 73 (1995).
- 8) Obeid, L. M., C. M. Linardic, L. A. Karolak, and Hannun, Y. A. : Programmed cell death by ceramide. *Science* **259**, 1769 (1993).
- 9) Jarvis, D. W., R. N. Kolesnick, F. A. Fornari, R. S. Traylor, D. A., Gewritz, and S. Grant. : Induction of apoptotic DNA degradation and cell death by activation of the sphingomyelin pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 73 (1994).
- 10) Jarvis, W. D., Fornari, F. A., Browning, J. L., Gewritz, D. A., Kolesnick, R. N and Grant, S. : Attenuation of ceramide-induced apoptosis by diglyceride in human myeloid leukemia cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 31685 (1994).
- 11) Cohen, J. J., and Duke, R. C. : Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in

- thymocyte nuclei leads to cell death. *J. Immunol.* **132**, 38 (1984)
- 12) Choi, K. Y., Cha, J. W. and M. Y. Kim.: Effect of ceramide on c-myc gene expression during differentiation of U-937 cells. *Mol. Cells.* **3**, 217 (1993).
- 13) Kim, M. Y., Kim, M. A., Moon, E. S. and Choi, K. Y.: Effects of sphingomyelin hydrolysis and ceramide on the inhibition of cell growth *Kor. Biochem. J.* **27**, 271 (1994).
- 14) Gerschenson L. E. and Rotello R. J.: Apoptosis : a different type of cell death. *Faseb J.* **23**, 2450 (1993).
- 15) Vaux, D. L.: Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 786 (1993).
- 16) Williams, G. T. and C. A. Smith.: Molecular regulation of apoptosis : genetic controls on cell death. *Cell.* **74**, 777 (1993).
- 17) Jayadev, S., Liu, B., Bielawska, A. E., Lee, J. Y., Nazaire, F., pushkareua, M. Y., Obeid, L. M. and Hannun, Y. A.: Role for ceramide in cell cycle arrest. *J. Biol. Chem.* **270**, 2047 (1995).
- 18) Hunter, T. and Pines, J.: Cyclins and Cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell.* **79**, 573 (1994).
- 19) Ryan, J. J., Danish, R., Gottlieb, C. A. and Clarke, M. F.: Cell cycle analysis of p53-induced cell death in murine erythroleukemia cells. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 711 (1993).
- 20) Miyashita, T. and Reed, J. C.: Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood.* **81**, 151 (1993).