

U-937 세포에서 세라마이드의 세포증식과 세포주기 조절단백질에 대한 작용

이재훈 · 최관수 · 김미영[#]

중앙대학교 약학대학

(Received December 23, 1996)

Effect of Ceramide on Cell Growth and Cell Cycle Related Proteins in U-937 Cells

Jae Hoon Lee, Kwan Soo Choi and Mie Young Kim[#]

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

Abstract— Ceramide, a product of sphingomyelin hydrolysis, has been proposed as a lipid second messenger mediating antiproliferative activation. In this study, we examined the role of the cell cycle-related proteins in the ceramide-mediated growth suppression. Treatment of U-937 cells with C₂-ceramide(N-acetylsphingosine) resulted in growth suppression in a time- and concentration dependent manner. Ceramide induced concentration-dependent dephosphorylation of retinoblastoma gene product (Rb). Rb remains hypophosphorylated in synchronized cells even after serum stimulation in the presence of ceramide. Ceramide decreased the expression of cyclin D₁ and cyclin E levels. These results suggest that antiproliferative effect of ceramide is associated with hypophosphorylation of Rb and decreased expression of cyclin D₁ and cyclin E.

Keywords □ ceramide, growth suppression, cell cycle, Rb, cyclin.

최근에 보고된 sphingomyelin cycle은 세포 분화와 세포증식 억제 및 apoptosis 유발의 조절에 관여하는 새로운 signaling 과정으로 주목받고 있다.¹⁻⁴⁾ 1,25-dihydroxyvitamin D₃²⁾, TNF- α , r-interferon³⁾, interleukin-1⁴⁾과 같은 세포자극제에 의하여 sphingomyelinase가 활성화되어 세포막 sphingomyelin이 가수분해되며 이때 생성된 ceramide는 이들 세포자극제의 세포기능조절의 mediator로 작용한다.

Ceramide에 의하여 배개되는 세포 내 작용으로서는 세포분화억제, apoptosis, protein trafficking의 조절 및 염증반응 등이 보고되어 있다.⁵⁻⁹⁾ 특히 세포증식 억제작용은 myeloid, lymphoid, fibroblast 세포에서 보고되어 있으며 세포투과성 합성 ceramide는 HL-60 세

포 및 Molt-4 세포에서 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 있다. 또한 serum-deprivation¹⁰⁾, Ara-C¹¹⁾, Fas activation¹²⁾에 의하여 세포증식 억제 및 apoptosis가 일어나며 세포 내 ceramide의 양이 증가되는 것으로 관찰되므로 ceramide는 apoptosis과정에 관여하는 공통된 mediator라고 추정되고 있다.

Ceramide에 의한 세포증식 억제와 apoptosis 유발 작용은 Molt-4 세포에서 retinoblastoma gene product(Rb) 탈인산화에 의한 세포주기 억제가 관여함이 알려졌다.¹³⁾ 그러나 다른 세포에서 세포증식 억제기전 및 Rb 탈인산화와 다른 세포주기 조절인자들과의 관계에 대해서는 알려진 바 없다. 따라서 본 연구에서는 U-937 세포에서 ceramide에 의하여 유도되는 세포증식 억제와 세포주기 조절 단백질들간의 관계에 대하여 연구하여 ceramide에 의한 Rb 탈인산화의 조절이 어떻게 이루어지는지 밝혀내고자 하였다.

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-820-5607 (팩스) 02-816-7338

본 연구에서 ceramide에 의한 Rb 단백질의 탈인산화 조절과 G1 세포주기 조절에 관여하는 cyclin 단백질의 발현정도를 측정하여 U-937 세포에서 ceramide의 Rb 탈인산화작용을 확인하였으며 이는 cyclin D1과 cyclin E 단백질의 감소와 관련이 있음을 제시하였다.

실험방법

시약

RPMI 1640과 fetal bovine serum은 Gibco(USA) 사의 것을 사용하였고 C₂-ceramide, phenylmethylsulfonylfluoride, aprotinin, leupeptin은 Sigma 사로부터 구입하였다. polyclonal rabbit antibody to human Rb, cyclin D₁, cyclin E 및 goat anti-rabbit secondary antibody는 Santa Cruz Biotech (USA) 제품을 사용하였다.

세포배양

U-937 세포 (American Type Culture Collection)는 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS)을 가한 RPMI 배양액에서 5% CO₂와 습도가 일정하게 유지되는 37°C 배양기에서 1×10⁶~2×10⁵ cells/ml의 농도로 배양했다. Ceramide를 가할 때는 2% FBS를 가한 RPMI 1640배양액에 5×10⁵ cells/ml의 농도로 세포를 심었다. Ceramide는 ethanol에 용해해서 사용하였다. Cell viability는 trypan blue exclusion 방법으로 측정하였다.

Cell lysate의 제조

Ceramide로 처리한 세포를 원심분리하여 분리하고 2×10⁷ cells/ml lysis buffer (50 mM Tris HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% nonidet P-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin)를 가하여 0°C, 30분간 방치한 후 12000×g에서 10분간 원심분리하여 lysate를 얻는다.

Western blotting

Lysate를 Bradford 방법으로 단백질을 정량한 후 3×SDS sample buffer를 섞은 후 90°C에서 4분간 변성시킨다. 50 µg의 단백질을 loading 하여 SDS-PAGE 한 다음 Gel을 Immobilon-NC transfer mem-

brane (Millipore Co, USA)에 transfer 시킨 후 5% skim milk (Difco lab, USA)을 가한 TBS-T 용액에서 blocking하여 TBS-T 용액으로 세척하고 polyclonal primary antibody (1:2000)를 가하여 1시간 상온에서 배양한다. membrane을 세척한 후 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (1:5000 dilution) 배양하여 ECL (enhanced chemiluminescence) assay system (Amersham, England), 또는 4-chloro-1-naphtol을 발색기 질로 사용하여 단백질을 검출한다.

결과 및 고찰

U-937 세포에서 ceramide의 세포증식 억제작용을 보기 위하여 세포를 20 µM ceramide를 가하여 trypan blue exclusion 방법으로 viability를 측정하였을 때 ceramide 처리 후 12시간 후 세포증식이 억제되면서 48시간 후에는 90%이상 억제되었다(Fig. 1A). 또한 ceramide 5 µM, 10 µM, 20 µM을 가하고 24시간 viability를 측정한 결과 ceramide가 농도 의존적으로 세포증식을 억제하였다(Fig. 1B). Trypan blue로 염색된 세포는 15%미만으로 관찰되어 ceramide는 세포독성작용보다는 세포증식억제작용을 나타내는 것으로 판단된다.

Ceramide가 세포의 G₁ 기 분포를 증가시킨다는 보고가 있으므로 세포주기관련 단백질의 발현에 미치는 영향을 알아보았다. Retinoblastoma gene product인 Rb는 세포주기 조절에 중요한 역할을 하는 단백질로서 G₁→S 세포주기의 진행에 필요하다.^{13~14)} Rb는 인산화 형태와 탈인산화 형태로 존재하는데 탈인산화 형태로 되면 G₁→S 세포주기진행의 억제를 일으키며 tumor suppressor로 작용한다. 또한 여러 antimitogenic agent는 Rb 단백질의 탈인산화에 의하여 그 작용을 나타내는 경우가 많다. Fig 2에서 나타난 바와 같이 U-937 세포를 ceramide로 24시간 처리한 후 cell lysate를 제조하여 SDS-PAGE를 실시하여 band의 shift에 의한 Rb의 탈인산화 정도를 측정하였다. 10 µM 농도에서 탈인산화 형태가 나타나기 시작하여 20 µM, 40 µM에서 농도 의존적으로 탈인산화 형태가 증가하였다.

세포 배양 시 serum을 제거하면 G₁→S 세포주기 진행의 억제가 유발되는데 이는 serum 제거 시 세포 내

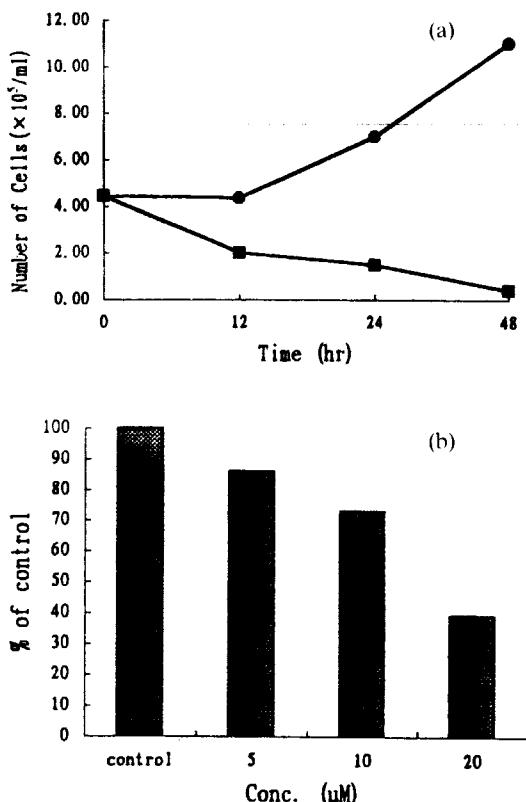


Fig. 1 — Time(A)- and concentration(B)-dependent growth inhibition by ceramide. U-937 cells were treated with ethanol vehicle or various concentration of C₂-ceramide for 24 hr. (—●—: control, —■—: C₂-ceramide)

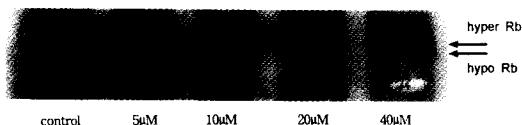


Fig. 2 — Effect of ceramide on Rb dephosphorylation. U-937 cells were treated with the indicated concentration of C₂-ceramide for 24 hr. The status of Rb dephosphorylation was determined by Western blot analysis as described under "Materials and Methods".

ceramide의 생성이 증가되기 때문인 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾ 따라서 본 실험에서 U-937 세포를 72시간 동안 serum deprivation 상태로 유지하여 G₁→S 세포주기 진행을 억제시킨 후 10% serum과 ceramide (20 μM)를 가하고 일정 시간 배양 후 Rb의 탈인산화를 측정하였다. G₁→S 세포주기 진행을 억제시킨 세포에서 ceram-



Fig. 3 — Effect of ceramide on Rb dephosphorylation in synchronized U-937 cells. The cells were grown in RPMI 1640 plus 0.2% FBS for 72 hr and refed with 10% FBS. C₂-ceramide (20 μM) was subsequently added and incubated for 24 hr. Western blot using polyclonal anti-human Rb antibody was carried out according to the method as described under "Materials and Methods" (a Normal-growing cell, b. 0 hr, c. 8 hr, d. 24 hr after addition of C₂-ceramide, e. 24 hr after addition of ethanol vehicle.).

ide는 24시간 후에도 탈인산화 상태를 유지하였으나 10% serum만을 가한 경우에는 인산화 상태로 되었다 (Fig. 3). 또한 Rb 단백질 발현의 감소현상이 나타나 ceramide는 Rb 탈인산화 작용과 함께 Rb 단백질 생성을 억제하는 작용을 가지는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과는 ceramide가 Molt-4 세포에서뿐만 아니라 U-937 세포에서도 G₁→S 세포주기 진행을 억제하며 이는 Rb의 탈인산화와 발현의 조절이 관련 있음을 의미한다.

G₁→S 세포주기 진행을 억제하는 기전으로서 p21 발현의 증가와 세포주기 관련 cyclin 단백질 발현의 down regulation이 관여한다.¹⁵⁻¹⁷⁾ p53-null cell인 U-937 세포에서는 세포분화 혹은 증식 억제 과정에서 p53-비의존성 기전에 의하여 p21 발현이 유발되며 이 때 유발된 p21은 cyclin dependent kinase(CDK) 저해제로 작용하여 Rb 인산화를 억제한다. 또한 cyclin은 CDK와 complex를 이루며 Rb 단백질의 인산화를 촉진하는 것으로 알려져 있으며 특히 cyclin D₁은 수종의 암세포에서 과다 발현되어 있는 경우가 있다.¹⁷⁾ 본 실험에서는 U-937 세포에서 ceramide에 의한 p21의 발현이 전혀 나타나지 않았기 때문에 (data not shown) cyclin 단백질 발현의 변화를 보았다.

본 실험에서는 Rb 인산화-탈인산화 조절에 관여하는 G₁ 세포주기 관련 cyclin 단백질인 cyclin D₁과 cyclin E의 발현정도를 western blotting에 의하여 측정하였다. Fig. 4에서 나타난 바와 같이 ceramide는 농도 의존적으로 D₁ 및 E cyclin 단백질 발현을 감

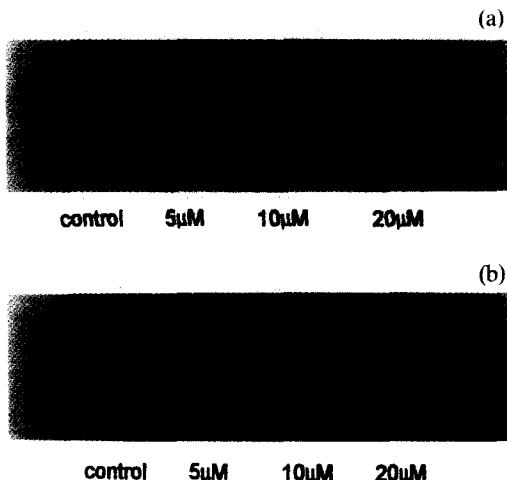


Fig. 4 — Effect of ceramide on the expression of cyclin D₁ (A) and cyclin E (B). U-937 cells were treated with various concentration of C₂-ceramide for 24 hr and were analyzed for the expression of cyclin D₁ and cyclin E by Western blot analysis as described under "Materials and Methods".

소시켰다. 특히 cyclin D₁에 대한 효과가 크게 나타나 20 μM에 의하여 거의 단백질 발현이 되지 않았다. 이는 U937 세포에서 Rb의 탈인산화는 p21에 의한 CDK 저해와는 무관하며 CDK를 활성화시키는 cyclin D₁이나 cyclin E 단백질의 감소로 인하여 나타남을 제시하고 있다.

Cyclin D₁과 cyclin E는 각각 CDK4와 CDK2와 complex를 이루어 CDK에 의한 Rb의 인산화를 촉진한다.^{14, 16-17)} 본 연구의 결과 ceramide는 U-937 세포에서 Rb 탈인산화 유발 및 Rb 단백질 발현을 저해하였으며 이는 cyclin D₁과 cyclin E 단백질 발현 저하와 관련이 있는 것으로 판단된다.

Rb의 탈인산화는 serum factor의 제거나 ceramide 처리에 의한 경우뿐만 아니라 항암제에 의한 세포 주기 진행의 억제 시에도 나타난다.¹⁸⁾ 또한 Ara-C, vincristine 등의 항암제는 세포 내 ceramide 생성을 촉진하는 작용이 있다고 알려져 있으므로¹⁹⁾ ceramide는 이들 항암제 작용의 mediator일 가능성이 있다. 따라서 ceramide의 Rb 탈인산화작용기전을 연구함으로써 항암제의 작용기전을 밝힐 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 말씀

본 연구는 1995년도 중앙대학교 연구지원처 학술연

구비의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- Okazaki, T., Bell, R. and Hannun, Y. A. : Sphingomyelin turnover induced by vitamin D₃ in HL-60 cell. *J. Biol. Chem.*, **264**, 19076-19086 (1989).
- Okazaki, T., Bielawska, A., Bell, R. M. and Hannun, Y. A. : Role of ceramide as a lipid mediator of 1α, 25-dihydroxyvitamin D₃-induced HL-60 cell differentiation. *J. Biol. Chem.*, **265**, 15823-15831 (1990).
- Kim, M. Y., Linardic, C., Obeid, L. and Hannun, Y. A. : Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of tumor necrosis factor-α and γ-interferon. *J. Biol. Chem.*, **266**, 484-489 (1991).
- Ballou, L. R., Chao, C. P., Maureen, C., Holeness, M. A., Barker, S. C. and Raghow, R. : Interleukin-1-mediated PGE₂ production and sphingomyelin metabolism. *J. Biol. Chem.*, **267**, 20044-20050 (1992).
- Dressler, K. A., Mathias, S. and Kolesnick, R. N. : Tumor necrosis factor-α activates the sphingomyelin signal transduction pathway in a cell-free system. *Science*, **255**, 1715-1718 (1992).
- Hannun, Y. A. : The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J. Biol. Chem.*, **269**, 3125-3128 (1994).
- Hannun, Y. A. and Obeid, L. M. : Ceramide : an intracellular signal for apoptosis. *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 73-77 (1995).
- Obeid, L. M., Linardic, C. M., Karolak, L. A. and Hannun, Y. A. : Programmed cell death by ceramide. *Science*, **259**, 1769-1771 (1993).
- Jarvis, D. W., Kolesnick, R. N., Fornari, F. A., Traylor, R. S., Gewritz, D. A. and Grant, S. : Induction of apoptotic DNA degradation and cell death by activation of the sphingomyelin pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 73-77 (1994).
- 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**, 2047-2052 (1995).
- 11) Strum, J. C., Small, G. W., Pauig, S. B. and Daniel, L. W. : 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine stimulates Ceramide and Diglyceride formation in HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 15493-15497 (1994).
- 12) Tepper, C. G., Jayadev, S., Liu, B., Bielawska, A., Wolff, R., Yonehara, S., Hannun, Y. A. and Seldin, M. F. : Role for ceramide as an endogenous mediator of Fas-induced cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 8443-8447 (1995).
- 13) Dbaibo, G. S., Pushkareva, M. Y., Jayadev, S., Schwarz, J. K., Horowitz, J. M., Obeid, L. M. and Hannun, Y. A. : Retino blastoma gene product as a downstream target for a ceramide-dependent pathway of growth arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1347-1351 (1995).
- 14) Weinberg, R. A. : The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323-330 (1995).
- 15) Xiang, Y., Hannon, G. J., Casso, H. G. D., Kobayashi, R. and Beach, D. : p21 is a universal inhibitor of cyclin kinase. *Nature* **366**, 701-704 (1993).
- 16) Morgan, D. O. : Principles of CDK regulation. *Nature* **374**, 131-134 (1995).
- 17) Hunter, T., and Pines, J. : Cyclins and cancer II : Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* **79**, 573-582 (1994).
- 18) Dou, Q. P., An, B., and Will, P. L. : Induction of a retinoblastoma phosphatase activity by anticancer drugs accompanies p53-independent G₁ arrest and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9019-9023 (1995).
- 19) Zhang, J., Alter, N., Reed, J. C., Borner, C. and Obeid, L. M. : Bcl-2 interrupts the ceramide-mediated pathway of cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5325-5328 (1996).