

HL-60 세포에서 Camptothecin의 apoptosis 유도작용

김해중 · 천영진 · 김미영*

중앙대학교 약학대학

(Received April 9, 1999)

Induction of Apoptosis by Camptothecin in HL-60 Cells

Hae Jong Kim, Young Jin Chun and Mie Young Kim*

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

Abstract — Camptothecin (CPT) has been known to induce apoptosis in various cancer cell lines. To examine the intracellular apoptotic death signal initiated by CPT, we investigated the possible connection between caspase-3 activation and GSH depletion during CPT-induced apoptosis in HL-60 cells. Treatment of cells with 1 μ M CPT induced PARP cleavage accompanied by DNA fragmentation. z-VAD-fmk, a caspase-3 inhibitor, blocked the CPT-induced DNA fragmentation. Pretreatment of cells with N-acetylcysteine, a precursor of GSH biosynthesis, failed to inhibit CPT-induced PARP cleavage and DNA fragmentation. No significant changes in GSH levels were observed during 6 hr after CPT treatment. Taken together, these results show that GSH depletion is not essential for caspase activation during CPT-induced apoptosis. We also investigated whether CPT-induced apoptosis is associated with changes of the levels of Bax and Bcl-2, two proteins involved in the control of apoptosis. Bcl-2 levels exhibited a late decrease compared with the kinetics of DNA fragmentation, whereas Bax levels increased more rapidly after CPT treatment. These results suggest that Bax plays more important role than Bcl-2 in inducing DNA fragmentation and may function upstream of proteolytic activation of caspase-3 pathway in CPT-induced apoptosis.

Keywords □ Camptothecin, PARP cleavage, caspase-3, GSH depletion, Bcl-2, Bax.

항암제에 의한 항암효과는 암세포의 비정상적인 증식을 억제하거나 암세포를 죽음으로 유도함으로써 나타난다. 최근 여러 종류의 항암제나 DNA 손상 물질에 의한 종양 퇴행현상이 apoptosis 라는 특이한 형태의 죽음을 통하여 이루어진다고 밝혀졌다. Apoptosis는 죽음의 신호에 반응하여 일어나는 능동적 죽음의 과정으로서 nuclear condensation, membrane blebbing 등의 형태학적 변화와 DNA fragmentation 현상이 나타난다. Apoptosis는 비정상적인 세포의 제거를 위한 방어적인 기전의 역할을 하며 이 과정이 손상되면 항암제에 대한 내성이 생기는 경우도 보고되고 있다.^{1,2)} 따라서 항암제의 apoptosis 유도기전을 밝히는 것이 효율

적인 항암치료에 매우 중요하다고 하겠다.

Apoptosis의 생화학적 기전은 세포의 종류나 apoptosis 유도물질의 종류에 따라 어느 정도 다른 양상을 나타내지만 그 과정이 후기로 갈수록 공통적인 과정을 거치게 된다. 최근의 연구 결과에 의하면 세포내 aspartate-specific cysteine protease 집단인 caspase가 apoptosis 유도에 공통적으로 관여하는 중요한 인자인 것으로 알려졌다.³⁻⁵⁾ Caspase는 세포내 여러 목표 단백질을 쪼개어 불활성화 시킴으로써 세포를 죽음으로 유도하는데 caspase의 기질로서 가장 잘 알려져 있는 것으로서 caspase-3 기질인 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)가 있다. 또한 미토콘드리아 막에 존재하는 bcl-2 유전자 집단도 apoptosis 조절에 관여하는 공통적인 조절인자인 것으로 알려져 있다.^{6,9)} Bcl-2 집단은 apoptosis를 억제하는 것과 촉진하는 집

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

단으로 나눌수 있는데, Bcl-2나 Bcl-xL은 apoptosis를 억제하며 Bax, Bcl-xS등은 촉진하는 작용을 한다. Bcl-2는 caspase의 활성화를 저해하며 reactive oxygen species (ROS)의 생성을 저해함으로써 apoptosis를 억제한다고 한다. 최근에는 ROS가 caspase-3의 활성화 과정에 관여한다는 연구가 보고 되었다.¹⁰⁾ TNF- α ,¹²⁾ FAS,¹³⁾ chemotherapeutic agent¹⁴⁾ 등의 apoptosis유도제에 의하여 ROS 생성이 촉진되며, ROS는 세포내 glutathione (GSH) pool을 고갈시켜 apoptosis 유도 신호전달계를 자극한다고 보고 있다.^{12,15)}

항암제에 의한 apoptosis 유도기전은 아직까지 확실히 밝혀지지는 않고 있다. 따라서 항암제의 apoptosis 유도 경로를 알기 위하여 본 연구에서는 topoisomerase I 저해제인 camptothecin (CPT)을 선택하여 apoptosis 유도의 공통적인 과정에 관여하는 caspase-3에 대한 작용과 이에 대한 ROS의 관련성을 분석하였으며, apoptosis 조절 단백질인 Bcl-2와 Bax에 대한 영향을 조사하였다. 본 연구 결과 CPT는 caspase-3를 활성화하였으며 항산화제인 NAC는 이에 대한 저해작용을 나타내지 않았다. 또한 CPT의 caspase 활성화 과정에서 세포내 GSH 고갈이 일어나지 않았다. 이와 같은 결과에서 ROS는 CPT의 apoptosis 유도과정에서 caspase-3 활성화에는 관여하지 않는 것임을 제시하였다.

실험방법

시약 - RPMI 1640 및 fetal bovine serum은 Gibco (USA)사의 것을 사용하였고 N-acetylcysteine, glutathione은 Sigma 사로부터, PARP antibody는 Behringer Mannheim사로부터, z-VAD-fmk는 Update Biotechnology (UBI) 사로부터 구입하였고, bax 및 bcl-2 항체는 Santa Cruz Biotech (USA) 제품을 사용하였다.

세포배양 - HL-60 세포는 5% CO₂ 배양기에서 10% 소태아혈청이 포함된 RPMI 1640 성장배지에서 배양하였다. 배양 온도는 37°C이며, 배지에는 항생제로서 penicillin (100 units/ml)과 streptomycin (100 µg/ml)을 처리하였다. 약물처리를 위해서는 2% FBS를 포함하는 RPMI 1640 배지에 5×10⁵ cells/ml의 농도로 세포를 심었다. Cell viability는 trypan blue exclusion 방법으로 측정하였다.

DNA fragmentation - 5×10⁶의 세포를 차가운

PBS완충액으로 두 번 세척한 후 300 µl의 extraction buffer를 가하여 50°C에서 16시간동안 shaking incubation하였다. 동량의 phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) 혼합액을 가해 단백질을 제거하고 얻어진 수층에 7.5 M ammonium acetate 0.5배와 2배의 무수에탄올을 넣고 혼화하여 -20°C에서 밤새 방치한 후 20,000 g로 20분간 원심분리하여 DNA침전물을 얻었다. 이것을 centrifugal evaporator에서 에탄올을 날려 버리고, 100 µl의 TE buffer로 resuspension한 후 0.1% SDS, 20 µg/ml DNase-free RNase A로 처리하여 RNA를 제거한 후, 1% agarose gel에 10 µl의 시료를 loading 하여 50V로 2시간 전기영동한 후 ethidium bromide (0.5 µg/ml)로 염색한 후 UV transilluminator에서 관찰하였다.

GSH level 측정 - GSH는 Calbiochem(cat. # 354102)에서 구입한 GSH assay kit를 가지고 측정하였다. 5×10⁶의 세포를 원심분리하여 모은 다음, ice-cold PBS를 200 µl 가하였다. sonication하여 얻은 cell lysates를 원심분리하여 얻은 상정액은 Bradford 법으로 단백질 정량하였다. 1 mg에 해당하는 상정액에 동량의 10% metaphosphoric acid를 가하여 침전시키고 난 상정액을 가지고 제조자의 지시에 따라 total GSH를 측정하였다.

Western blot - 각각의 실험군에서 모아진 세포를 lysis buffer로 세포를 용해시키고 Bradford 방법을 통하여 단백질의 양을 정량적으로 측정한 후, 총 단백질 50µg에 해당하는 추출물을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동 (SDS-PAGE)하고 이를 nitrocellulose paper에 옮긴 후 알고자 하는 단백질의 항체(PARP, Bcl-2, 혹은 Bax)로 반응시켰다. 1차 항체 반응 후 peroxidase가 부착된 2차 항체로 반응시킨 후 ECL(enhanced chemiluminescence) 방법으로 단백질 발현의 변화를 알아보았다.

실험결과

HL-60 세포에서 CPT의 세포증식 억제작용을 보기 위하여 세포에 1 µM CPT를 가하여 trypan blue exclusion 방법으로 viability를 측정하였다. CPT를 가한후 6 시간에 세포증식이 억제되기 시작하였으며 24 시간 후에는 90% 이상이 억제되었다(Fig. 1A). 세포 증식 억제작용이 apoptosis에 의한 죽음인지 알아 보

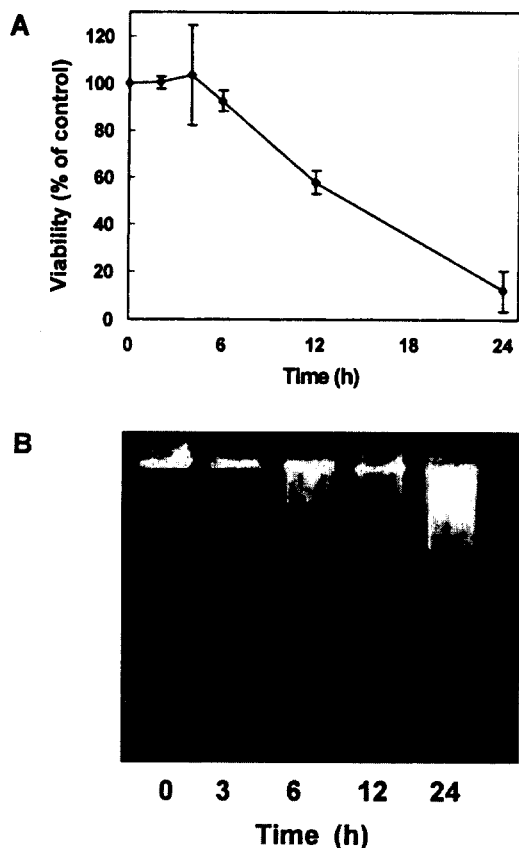


Fig. 1 - Induction of apoptotic cell death by CPT in HL-60 cells. (A) Exponentially growing cells were exposed to $1 \mu\text{M}$ CPT for various times and the viability was evaluated using trypan blue dye exclusion. (B) Cellular DNA was extracted and subjected to electrophoresis by 1% agarose gel.

기 위하여 apoptosis의 특징인 DNA fragmentation의 생성 여부를 관찰하였다. 아가로즈 젤 상에서 $1 \mu\text{M}$ 의 CPT를 가한후 6시간에 180-200 base pair의 DNA ladder를 관찰할 수 있었다(Fig. 1B). 이와 같은 결과에서 CPT는 혈액암 세포인 HL-60 세포에서 apoptosis를 일으킴을 알 수 있었다.

CPT에 의한 apoptosis 유도과정이 apoptosis 유도 과정에 공통적으로 관여하는 caspase-3 활성화와 관련이 있는가 알아보기 위하여 caspase-3 기질인 PARP가 CPT에 의하여 절단되는가 알아보았다. Caspase-3가 활성화되면 그 기질인 PARP(116 kDa)가 85 kDa의 카르복실 말단 fragment와 28 kDa 아미노말단으로 잘라진다. CPT에 의한 PARP cleavage는 Western blot의 방법으로 확인하였다. CPT를 가한후 4시간 후

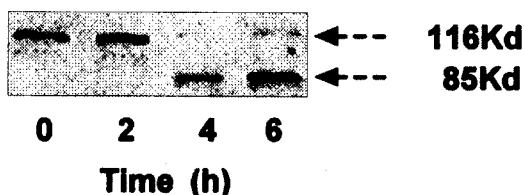


Fig. 2 - CPT-induced cleavage of PARP. HL-60 cells were treated with CPT ($1 \mu\text{M}$) for 0-6 h. Cell lysates were resolved by SDS-PAGE and blotted onto nitrocellulose membrane, and PARP cleavage was visualized with anti-PARP antibody (Behringer Mannheim).

에 116 kDa의 fragment는 없어지고 85 kDa fragment가 나타나기 시작하였다(Fig. 2). 이는 HL-60 세포에서 CPT에 의한 apoptosis유도에는 caspase-3가 관여함을 나타낸다.

Apoptosis 유도 기전으로서 ROS가 세포죽음과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. ROS는 GSH에 의하여 제거되며 따라서 세포내 항산화제 pool이 고갈되면 ROS에 의한 apoptosis 유도 신호전달계가 자극된다. 본 실험에서는 CPT에 의한 apoptosis에서 ROS의 관련성을 알아 보기 위하여 H_2O_2 scavenger인 NAC와 GSH가 CPT의 DNA fragmentation, caspase활성화에 미치는 영향을 관찰하였다. 20 mM의 NAC와 20 mM의 GSH를 각각 가하고 2 시간동안 전배양 한후 CPT를 가했을 때 CPT에 의한 DNA fragmentation이 억제 되지 않았으나, caspase 저해제인 benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone (z-VAD-FMK)의 존재하에서는 DNA fragmentation이 억제되었다(Fig. 3A). CPT에 의한 PARP cleavage는 NAC에 의하여 저해를 받지 않았다(Fig. 3B). 이와 같이 NAC나 GSH가 CPT의 apoptosis 유도작용에 영향을 미치지 않았으므로, CPT가 세포내 GSH level을 변화시키는지 알아 보았다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 CPT를 가한후 6시간까지는 GSH level에 변화가 없었으나 12시간 후에 감소하기 시작하여 24시간 후에는 50%까지 감소하였다. 이와 같은 결과는 HL-60 세포에서 CPT의 apoptosis 유도과정 중 caspase-3 활성화 과정에서는 ROS가 작용하지 않음을 시사한다.

Bcl-2와 Bax level의 변화가 CPT의 apoptosis 유도 과정에 관련이 있는지 알아 보았다. CPT는 Bcl-2 protein level을 감소하였으며 Bax level을 증가하였다. Bcl-2 단백질은 DNA fragmentation이

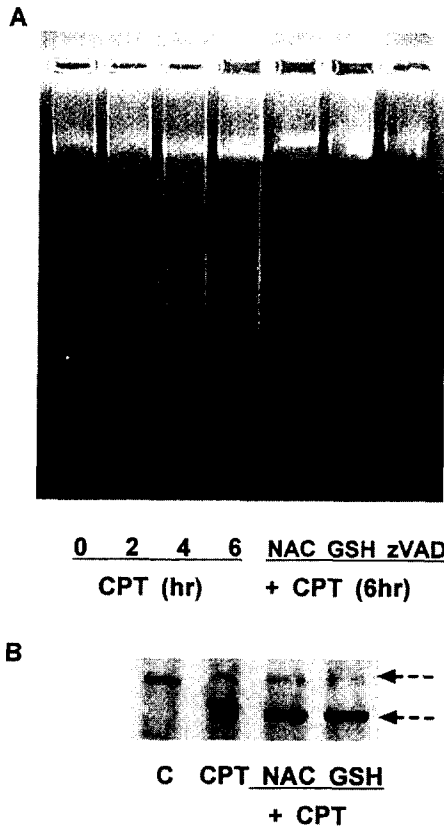


Fig. 3 – Effect of NAC on CPT-induced apoptosis and PARP cleavage. (A) HL-60 cells were pretreated with 20 mM NAC or GSH for 2 h and then exposed to 1 μ M CPT for indicated time. Cellular DNA was extracted and subjected to electrophoresis by 1% agarose gel. (B) HL-60 cells were pretreated for 2 h with 20 mM NAC or GSH followed by treatment with 1 μ M CPT for 4 h. Cells were harvested, lysed, and mixed with SDS sample buffer. The proteins were analyzed with a 7.5% SDS-PAGE and PARP cleavage was analyzed by Western blot as described under the Materials and methods section.

일어나기 시작한후 16 시간에 저하되기 시작하였으나 Bax 단백질은 4시간부터 증가되기 시작하였다 (Fig. 5).

고 찰

CPT는 topoisomerase I (Topo I) 저해제로서 Topo I-DNA cleavable complex를 안정화시켜 DNA합성을 저해한다. 최근에는 CPT를 비롯한 여러 항암제가 apoptosis경로를 통하여 암세포를 죽음으로 유도한다는 결과가 계속 보고되고 있다. 그러나 항암제에 의한

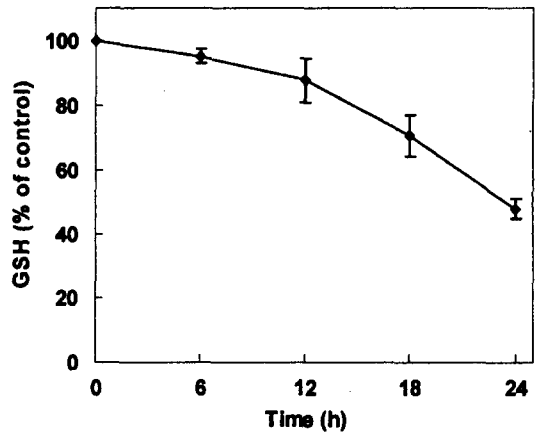


Fig. 4 – Glutathione levels in HL-60 cells treated with CPT. Cells were harvested and glutathione levels were measured as described under the Materials and methods section.

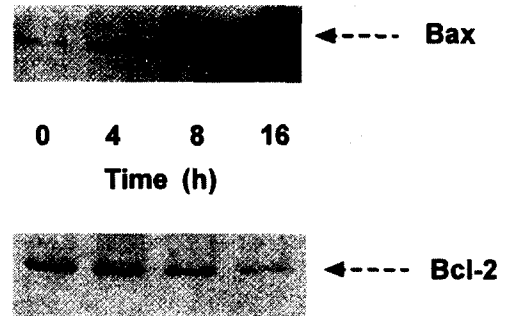


Fig. 5 – Effects of CPT on levels of Bcl-2 and Bax protein. Total cellular homogenates were analysed by SDS-PAGE, followed by Western blotting using anti-bcl-2 or anti-bax antibody, as described in the Materials and methods section.

apoptosis의 유도가 DNA손상에 의한 직접적인 결과인지, 혹은 세포와 결합하여 세포를 자극하여 세포죽음 신호전달계를 활성화하여 나타나는 것인지에 대해서는 잘 알려지지 않고 있다. 본 연구에서 CPT의 apoptosis 유도과정은 caspase-3가 필수적으로 관여하는 것으로 나타났다. 즉, caspase-3에 의한 PARP cleavage가 일어나면서 DNA fragmentation이 일어나기 시작하였으며 caspase-3 저해제인 z-VAD-FMK에 의하여 DNA fragmentation 유도가 억제되었다. TNF- α ,¹²⁾ FAS,¹³⁾ 항암제¹⁴⁾등의 apoptosis 유도과정에서 ROS의 생성이 증가되고 따라서 세포내 항산화제 pool 인 GSH의 고갈이 일어나 apoptosis가 일어난다는 보고가 있으므로 caspase-3의 활성화에 대한 항산화제의 영향을 분석하였다. 본 연구의 결과 NAC와 GSH 모두 CPT에 의한 PARP cleavage를 억제하지 못하였으며

DNA fragmentation 유도에도 억제작용을 나타내지 못하였다. 또한 CPT에 의한 DNA fragmentation 유도 시 세포내 GSH의 고갈이 일어나지 않았다. CPT를 가한 후 약 6시간까지는 세포내 GSH 농도의 변화가 없었으나, 12시간후에 GSH의 농도가 감소되기 시작하여 24시간후에는 50% 정도가 감소가 되는 것으로 보아 ROS는 caspase-3의 활성화에 직접적으로 관여하지 않으며 caspase 활성화 이후의 세포사 과정에 어떠한 역할을 할 것이라 판단된다. 사람의 small cell lung carcinoma에서 CPT는 apoptosis 과정에서 H_2O_2 생성을 유도 하였으며 이는 NAC에 의하여 억제된다는 보고가 있다.¹⁶⁾ 또한 항산화제인 NAC 존재 하에 CPT의 작용이 억제 되었으나 PARP cleavage는 억제되지 않았기 때문에 항암제에 의한 H_2O_2 의 생성은 caspase-3의 활성화에 의하여 일어나는 것으로 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 HL-60 세포에서 CPT의 DNA fragmentation 유도작용은 세포내 GSH 고갈과는 무관한 것임이 밝혀졌다. 이는 세포의 종류에 따라서 세포내 GSH의 농도에 차이가 있으며¹⁴⁾ 세포내 GSH 농도가 높은 경우 ROS 농도가 증가되기 힘들기 때문인 것으로 판단된다. 또한 CPT의 작용 후기에 세포내 GSH 고갈이 일어나므로 caspase-3의 활성화에 의하여 H_2O_2 가 생성되며 이 때 생성된 H_2O_2 가 apoptosis를 유도 할 것이라는 가능성을 생각해 볼수 있으나, 본 연구에서는 DNA fragmentation은 GSH 고갈이 일어나기 이전에 유도되기 시작 하였으므로 HL-60세포에서 ROS는 CPT의 apoptosis 유도 과정에 필수적인 것은 아니라고 판단된다.

Bcl-2는 미토콘드리아 외막에 존재하는 apoptosis 억제 단백질로서 caspase 활성화 억제, ROS 생성 억제 작용을 한다.^{7,11)} Bcl-2 집단인 Bax는 미토콘드리아로부터 cytosol로 cytochrome c의 유리를 촉진하여 caspase-3를 활성화 하여 apoptosis를 유도한다.¹²⁾ 본 연구에서 CPT에 의한 Bcl-2 단백질의 감소는 DNA fragmentation이 일어나기 시작한 후 비교적 늦게 일어나기 시작했으나 Bax 단백질은 4 시간부터 증가하기 시작하였다. 이와 같은 결과에서 CPT에 의한 DNA fragmentation 유도의 초기 과정에는 Bcl-2 단백질의 감소보다 Bax 단백질의 증가가 더 큰 영향을 미친다고 볼 수 있으며, Bax는 caspase-3 활성화보다 upstream에 작용하는 것으로 추정된다.

감사의 말씀

이 연구는 1997년도 중앙 대학교 교내 학술 연구비 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) Baily, J. D., Skladanowski, A., Bettaieb, A., Mansat, V., Larsen, A. and Laurent, G. : Natural resistance of acute myeloid leukemia cell lines to mitoxantrone is associated with lack of apoptosis. *Leukemia* **11**, 1523 (1997).
- 2) Kojima, H., Endo, K., Moriyama, H., Tanaka, Y., Alnemri, E. S., Slapak, C. A., Teicher, B., Kufe, D. and Datta, R. : Abrogation of mitochondrial cytochrome c release and caspase-3 activation in acquired multidrug resistance. *J. Biol. Chem.* **273**, 16647 (1998).
- 3) Salvesen, G. and Dixit, V. M. : Caspases: Intracellular signaling by proteolysis. *Cell* **14**, 443 (1997).
- 4) Janicke, R. U., Sprengart M. L., Wati, M. R., Porter A. G. : Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J. Biol. Chem.* **273**, 9357 (1998).
- 5) Benjamin, C. W., Hiebsch, R. D. and Jones, D. A. : Caspase activation in MCF-7 cells responding to etoposide treatment. *Mol. Pharmacol.* **53**, 446 (1998).
- 6) Schmitt, E., Cimoli, G., Streyart, A., and Bertrand, R. : Bcl-xL modulates apoptosis induced by anticancer drugs and delays DEVDase and DNA fragmentation-promoting activities. *Exp. Cell Res.* **240**, 107 (1998).
- 7) Allouche, M., Bettaieb, A., Vindis, C., Rouse, A., Grignon, C. and Laurent, G. : Influence of Bcl-2 overexpression on the ceramide pathway in daunorubicin-induced apoptosis of leukemic cells. *Oncogene* **14**, 1837 (1997).
- 8) Borner, C. : Diminished cell proliferation associated with the death-protective activity of Bcl-2. *J. Biol. Chem.* **271**, 12695 (1996).
- 9) Korsmeyer, S., Yin, X. M., Oltvai, Z. N., veis, N. D. and Linette, G. P. : Reactive oxygen species and the regulation of cell death by the Bcl-2 gene family. *Biochem. Biophys. Acta* **1271**, 63 (1995).

- 10) Jacobson, M. D. : Reactive oxygen species and programmed cell death. *TIBS* **21**, 83 (1996).
- 11) Mignotte, B. and Vayssiere, J. L. : Mitochondria and apoptosis. *Eur. J. Biochem.* **252**, 1 (1998).
- 12) Liu, B., Andrieu-Abadie, N., Levade, T., Zhang, P., Obeid, L. M. and Hannun, Y. A. : Glutathione regulation of neutral sphingomyelinase in tumor necrosis factor- α -induced cell death. *J. Biol. Chem.* **273**, 11313 (1998).
- 13) Krippner, A., Matsuno-Yagi, A., Gootieb, R. A. and Babior, B. M. : Loss of function of cytochrome c in Jurkat cells undergoing Fas-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* **271**, 21629 (1996).
- 14) Chau, Y. P., Shiah, S. G., Don, M. J. and Kuo, M. L. : Involvement of hydrogen peroxide in topoisomerase inhibitor β -lapachone-induced apoptosis and differentiation in human leukemia cells. *Free Radical Biol. Med.* **24**, 660 (1998).
- 15) Macho, A., CAstedo, M., Marchetti, P., Dallaporta, B., Susin, S. A., Zamzami, N. and Koroemer, G. : Glutathione depletion is an early and calcium elevation is a late event of thymocyte apoptosis. *J. Immunol.* **158**, 4612 (1997).
- 16) Simizu, S., Takada, M., Umezawa, K., Imoto, M. : Requirement of caspase-3(-like) protease-mediated hydrogen peroxide production for apoptosis induced by various anticancer drugs. *J. Biol. Chem.* **273**, 26900 (1998).