

구강편평세포암종 세포주 SCC15에서 Mycolactone에 의한 apoptosis 효과

김재우 · 송재철 · 이희경 · 이태윤*
 영남대학교 의과대학 치과학교실, 미생물학교실*

Abstract

RUNNING TITLE: APOPTOTIC EFFECT OF MYCOLACTONE IN SCC15 CELLS

Jae-Woo Kim, Jae-Chul Song, Hee-Kyung Lee, Tae-Yoon Lee*

Department of Dentistry, Department of Microbiology*, College of Medicine, Yeungnam University

The effect of mycolactone, a recently reported apoptosis-inducing factor, was investigated in SCC15 oral squamous cell carcinoma (OSCC) cell line. Mycolactone rapidly induced cell death in OSCC cells in 2days, which was similar to that found in apoptotic cell such as detaching from culture plate and rounding-up of cells. Apoptotic cells were increased 4hrs after mycolactone treatment and more than half of cells showed apoptosis after 72hrs. Caspase 3 activation, a biochemical evidence of apoptosis, was determined by Western blotting. Caspase 3 activation was started at 2hrs that lasted until 8hrs after mycolactone treatment. The expression of bcl-2 family genes was determined to explain the mechanism of apoptosis found in OSCC cells. The expressions of bad, bak, and bax (pro-apoptotic genes) and bcl-w and bcl-2 genes (anti-apoptotic genes) were not changed by mycolactone treatment. The expression of bcl-x_L was decreased 8 hrs after mycolactone treatment. Mcl-1 expression was initially increased at 2 hrs which was decreased 8 hrs after mycolactone treatment. The down-regulation of these two anti-apoptotic genes might explain the mycolactone-induced apoptosis in OSCC cells.

In this study, mycolactone was revealed to induce cell death in OSCC cells via apoptosis and the apoptosis mechanism of OSCC cells was shown to be down-regulation of anti-apoptotic genes, bcl-x_L and mcl-1. These results suggested the applicability of mycolactone for the development of an anti-cancer drug candidate by inducing apoptosis of OSCC cancer cell.

Key words : Mycolactone, SCC15 oral squamous cell carcinoma

I. 서 론

전체 암 발생빈도에서 약 3~4%를 차지하는 구강암은 혀, 뺨, 치주조직, 또는 구인두의 어느 부위에도 침범할 수 있다. 구강 내의 발생위치에 따라 다르나 여자보다는 남자에게서 약 2내지 6 배 가량 많이 발생하며 우리 나라에서는 년 간 약 1000 내지 2000 명의 새로운 구강암 환자가 발생하며, 구강암으로 투병중인 환자만도 수만 명에 이른다. 전체 구강암 환자의 평균 5년 생존율은 약 46%로 반 이상의 환자가 5년 이내에 사망하는 것으로 알려져 있다¹⁾.

구강암 치료 방법은 대표적으로 외과적 수술, 방사선요법, 항암요법으로 이루어지며 단독으로 또는 복합적으로 시행된다²⁾. 많은 종류의 항암제들이 개발되어 사용되고 있으나 이들은 대부

분 세포독성을 유발하는 물질들로서 그 부작용이 심각하다. 최근에는 apoptosis를 유발하는 항암제의 개발이 본격적으로 연구되고 있으며 이는 이러한 부작용을 감소시킬 것으로 기대되고 있다. Apoptosis (혹은 programmed cell death)는 발생, 분화과정과 같은 생리적인 환경뿐만 아니라, 세포손상이나 미생물감염 등의 병리적인 환경 하에서도 일어나는 적극적인 세포 기전 (active cellular mechanism)을 통한 일종의 세포사멸 과정이다³⁾.

Apoptosis를 조절하는 유전자들 중 대표적인 것들이 bcl-2이며 이와 유사한 염기서열을 지니는 유전자들을 bcl-2 family 유전자라고 부른다⁴⁾. Bcl-2 family에 속하는 단백질들은 크게 apoptosis를 억제하는 anti-apoptotic protein들과 오히려 apoptosis를 촉진시키는 pro-apoptotic protein들로 나뉜다. 이들은 서로간의 상호작용을 통하여 apoptosis를 유발하거나 혹은 억제하는 기능을 수행하고 있다. 예를 들면, anti-apoptotic (즉, pro-survival) Bcl-2 단백질 중 대표적인 Bcl-x_L은 mitochondria를 통한 apoptotic signaling에 관여하는 Apaf-1 단백질이 Pro-caspase 9과 결합할 수 있는 구조로 변화하지 못하게 함으로써 apoptosis를 억제하는 기능을 수행한다. 한편 이러한 Bcl-x_L의 anti-apoptotic function은 pro-apoptotic 단백질인 BIK에 의하여 억제된다⁵⁾.

Bcl-2나 Bcl-x_L과 같은 anti-apoptotic 단백질들은 궁극적으로는 mitochondria로부터의 cytochrome c 해리를 억제함으로써 apop-

김 재 우

705-717, 대구광역시 남구 대명동 317-1

영남대학교 의과대학 치과학교실

Jae-Woo Kim

Dept. of Dentistry, College of Medicine, Yeungnam University

317-1 Daemyung-Dong, Nam-Gu, Daegu, 705-717, Korea

Tel.: 82-53-620-3281 Fax: 82-53-629-1772

E-mail: dental@med.yu.ac.kr

tosis를 방해하는 것으로 알려져 있으며 이들은 모두가 적어도 BH1과 BH2 domain을 함유하고 있다. 한편, apoptosis를 촉진하는 pro-apoptotic Bcl-2 member들은 크게 Bcl-2의 구조와 유사한 Bax, Bak, Bok 등이 포함되는 Bax subfamily와 BH3 domain만을 가진 BH3 family로 나뉜다. BIK과 같은 BH3 domain을 갖는 pro-apoptotic 단백질들은 Bcl-xL과 같은 anti-apoptotic 단백질의 antagonist로 작용함으로써 apoptosis를 유발하는데 관여하고 있다⁹⁾.

또한, pro-apoptotic Bcl-2 family와 anti-apoptotic Bcl-2 family에 속하는 Bcl-2 family들은 상호간에 heterodimer를 형성하여 상호간의 기능을 약화시켜 세포사멸기전의 조절자로 작용하는 것으로 알려져 있다.

Apoptosis를 유발하는 항암제로는 미국 Cell Pathway사의 Aptosyn 및 미국 Genta사의 Genasense 등이 있다. Aptosyn은 cGMP phosphodiesterase를 억제함으로써 apoptosis를 촉진하며 현재 임상 3상 시험 중이다. Genasense는 안티센스 유전자 요법을 통하여 apoptosis를 억제하는 bcl-2의 mRNA 합성을 저해하는 apoptosis 유발 항암제로서 역시 임상 3상 시험이 진행 중에 있다. 이러한 apoptosis 유발 항암제들은 세포가 원래 가지고 있는 apoptosis 기전을 자극함으로써 암세포를 사멸시키므로 기존의 항암제와 비교하여 독성이 현저히 낮은 장점을 가지고 있다.

최근 apoptosis를 유발하는 세균 독소로서 mycolactone이 보고되었다⁹⁾. Mycolactone은 Buruli ulcer라는 피부 궤양을 유발시키는 *Mycobacterium ulcerans*의 병독인자로서 그 구조는 매우 작은 지질인 것으로 보고되었다^{10,11)}. Mycolactone은 위암, 간암, 유방암, 방광암, 대장암, 백혈병, 림프종, 피부암 등 다양한 유형의 배양 암세포들을 사멸시키며 그 기전은 apoptosis의 유발에 의함이 알려져 있다. 그러나, mycolactone이 구강암에서 어떠한 효과를 나타내는지에 관한 보고는 전무한 실정이다.

이에 본 연구에서는 구강편평세포암종 (oral squamous cell carcinoma) 세포주에서 mycolactone의 세포사멸 효과를 관찰하고 그 과정이 apoptosis 유발에 의한 것인지를 조사하며 mycolactone이 영향을 미치는 유전자들 중 bcl-2 family 유전자들의 발현 변화를 규명함으로써 구강편평세포암종의 새로운 치료법을 제시하고자 실험을 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포배양

구강편평세포암종 세포주인 SCC-15 (ATCC, USA)를 10% 우태아 혈청, 페니실린(100unit/ml), 스트렙토마이신(100ug/ml), hydrocortisone (0.4ug/ml)이 함유된 Ham's F12/Dulbecco's modified Eagle's (1:1, vol) 배지를 사용하여 75cm²의 플라스크에서 5% CO₂, 37°C의 조건으로 배양하였다.

2. Mycolactone의 분리 및 정제

Mycolactone을 생성하는 *Mycobacterium ulcerans* 1615 균주를

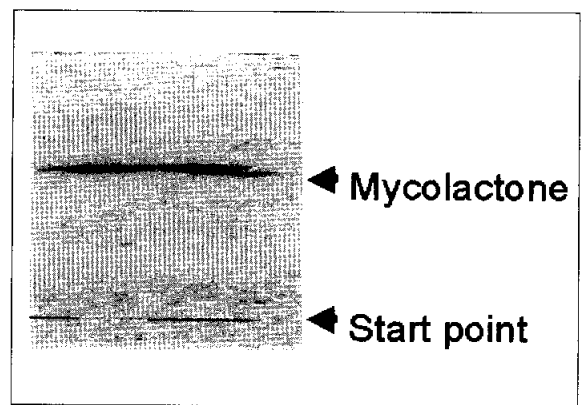


Fig. 1. Preparative thin layer chromatography for purification of mycolactone.

ATCC (USA)로부터 구입하여 0.2% glycerol, 10% oleic acid, albumin, dextrose, 및 catalase enrichment (OADC, Difco)가 첨가된 Middlebrook 7H9 액체배지에 접종하여 100 rpm으로 약간 흔들면서 32°C에서 배양하였다. 균을 수집하여 chloroform과 메탄올이 2:1로 혼합된 용매로 4시간 처리하여 균 찌꺼기를 제거하고 상층액에 0.2배 용적의 증류수를 가하였다. Organic phase를 제거하고 말린 후 남아있는 지질에 ice-cold acetone을 가하여 phospholipid를 침전시켰다. Chloroform, methanol 및 증류수를 90:10:1의 비율로 혼합한 용매를 사용하여 silica thin layer chromatography로 각 지질 분획을 분리하였다 (Fig. 1). 0.23의 Rf 값을 갖는 부위를 긁어내어 mycolactone을 분리하고 acetone에 녹여 4°C에 보관하며 사용하였다. mycolactone을 세포에 처리할 때에는 acetone을 증발시킨 후 ethanol에 녹여 사용하였다⁷⁾.

3. Mycolactone 처리 및 세포사멸 관찰

세포주를 1×10⁶으로 6-well plate에 배양하면서 mycolactone을 1ug/ml 농도로 처리 후 2시간, 4시간 8시간, 12시간 및 24시간 켜 세포사멸을 광학현미경으로 관찰하였다.

4. Apoptosis 분석

Mycolactone에 의한 apoptosis는 FACS에 의한 DNA 양의 변화 및 apoptosis시의 대표적인 생화학적 변화인 caspase 3 (CPP32)의 활성화를 Western blotting 법으로 분석하였다.

FACS 분석을 위해 세포를 60mm dish (Corning Costar Corporation, Cambridge, MA)에 5×10⁶정도의 세포를 부착시킨 후 12시간 동안 배양하였다. 우태아혈청이 없는 배지에서 24시간 배양한 후 mycolactone을 시간별로 처리하고 세포를 수집하였다. 수집한 세포를 인산완충액으로 세척한 후 450μl의 인산 완충액에 잘 현탁하였다. 여기에 1ml의 70% ethanol을 한 방울씩 떨어뜨린 후 얼음에서 30분간 고정하였다. 그 후 세포를 원침하여 상등액을 버리고 1ml의 FACS 완충액 (10μg/ml RNase [Sigma, St. Louis, MO] and 50μg/ml propidium iodide [Sigma, St. Louis, MO] in

PBS)에 잘 현탁하였다. 세포 현탁액을 37°C에서 30분간 정치한 후 FACS (Beckton-Dickinson Immunocytometry Systems)를 분석하였다.

Western blotting은 다음과 같이 시행하였다. 우선 1×10^6 정도의 세포를 사용하여 세포질성 단백질을 분리하였다. 일단 플라스크에 있는 배지를 제거하고 cold PBS를 첨가한 후 scraper로 세포를 수집하였다. 10초간 원침하여 상등액을 버린 후 $400 \mu\text{l}$ 의 cold buffer A (10mM HEPES-KOH [pH7.9], 1.5mM MgCl_2 , 10mM KCl, 0.5mM DTT, 0.2mM PMSF, 0.1% NP-40)에 잘 현탁하여 얼음에서 30분간 방치하였다. 30분 후 10초간 vortex한 후 원침하여 상등액을 취하여 단백질의 농도를 측정 후 -70°C에서 보관하면서 사용하였다. 각 세포주의 단백질을 40 μg 을 9% SDS-polyacrylamide gel에서 Tris-glycine buffer로 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 gel을 분리하여 Western blotting apparatus (BioRad)에 설치하였다. 여기에 transfer buffer (12mM Tris, 96mM Glycine, 20% methanol, pH 8.3)를 채우고, 50V로 2시간 전이한 후 membrane을 분리하여 30분간 blocking solution (5% non-fat milk, 0.02% sodium azide in PBS)으로 blocking 한 후 CPP32에 대한 항체 (Oncogene, USA)를 첨가하여 1시간 동안 반응시켰다. Membrane을 PBS로 한 번, PBS에 0.02% Tween20을 첨가한 PBST로 두 번 세척하고 마지막으로 PBS로 한 번 세척하였다. 다음으로 membrane을 blocking solution (5% non-fat milk in PBS)으로 잘 soaking한 후 여기에 horseradish peroxidase (HRP) 또는 alkaline phosphatase가 conjugate되어 있는 anti-mouse immunoglobulin G antibody 또는 anti-rabbit immunoglobulin G antibody를 첨가하여 30분간 반응시켰다. 위에서와 같이 PBS, PBST를 바꾸어가면서 membrane을 세척한 다음 membrane에 ECL 발색 시약을 첨가하여 반응시킨 후 X-ray film에 적정 시간 동안 노출시켰다.

5. Mycolactone 처리시의 bcl-2 family 유전자들의 발현 분석

SCC15 세포에 mycolactone을 처리하였을 때 발생하는 apoptosis의 기전을 설명하기 위하여 apoptosis를 조절하는 기능을 가지는 bcl-2 family 유전자들의 mRNA 발현을 multi-probe RPA system (Pharmingen, USA) kit를 사용하여 ribonuclease protection assay (RPA) 법으로 다음과 같이 분석하였다.

우선 1×10^6 정도의 세포를 사용하여 RNeasy Mini kit (Qiagen Inc., Chatsworth, Ca)로 total RNA를 분리하였다. 먼저 세포를 PBS로 세척하고 β -mercaptoethanol이 함유된 lysis buffer를 첨가한 후 세포를 잘 현탁시켰다. 이렇게 현탁된 세포를 20-G 주사기로 5번 이상 통과시킨 후, 동일한 용적의 70% 에탄올을 첨가한 다음 잘 혼합하였다. 혼합액을 RNeasy mini spin column에 loading하여 10,000rpm에서 15초간 원침한 다음 washing buffer로 2회 세척하고, PRE buffer를 첨가하여 세척하였다. Column에 부착되어 있는 total RNA는 RNase-free water로 용출하여 -70°C에 보관하면서 사용하였다.

RPA는 *in vitro*에서 방사능 동위원소로 표지된 특이적인 RNA

probe를 합성하여 각 시료에서 분리한 RNA와 hybridization시킨 후 RNase로 hybridization하지 않은 single strand RNA 및 riboprobe를 제거하고 이를 변성 polyacrylamide gel상에서 전기영동하여 autoradiography를 시행하여 그 density를 비교함으로써 mRNA transcript의 양을 정량하는 방법이다. RPA는 크게 3과정으로 나눌 수 있는데 그 과정을 기술하면 다음과 같다.

1) Probe 합성

In vitro transcription 혼합액 (10 μl [α - ^{32}P]UTP, 1 μl GACU pool, 2 μl DTT, 4 μl 5X transcription buffer, 1 μl RPA template set, 1 μl T7 polymerase)을 잘 혼합한 후 37°C에서 1시간 반응하여 probe를 합성하였다. 여기에 2 μl 의 DNase를 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 phenol 처리하여 원침한 후 상등액을 에탄올 침전하여 50 μl 의 hybridization buffer에 용해시켰다.

2) RNA 준비 및 hybridization

위에서 분리한 total RNA (10-20 μg)를 -70°C에서 15분간 방치한 후 vacuum evaporator에서 완전히 건조시켰다. 여기에 8 μl 의 hybridization buffer를 첨가한 후 vortex하여 짧게 원침하였다. 3×10^5 cpm/ μl 정도로 희석한 probe를 2 μl 첨가하여 잘 섞은 후 mineral oil를 첨가하여 hybridization을 시행하였다. 먼저 hybridization 혼합액을 90°C에서 짧게 정치한 후 온도를 56°C로 조절하여 12-16시간 동안 반응시켰다. 마지막으로 37°C에서 15분간 반응하여 hybridization을 종료하였다.

3) RNase 처리, 전기영동 및 autoradiography

Hybridization 용액에 100 μl 의 RNase cocktail를 첨가한 후 30°C에서 45분간 반응시켜 hybridization이 되지 않은 부분의 RNA를 제거하였다. 여기에 proteinase K cocktail 용액을 첨가하여 RNase digestion을 종료시킨 다음 phenol을 처리하고 에탄올 침전을 시행한 후 건조시켰다. 준비된 시료를 5 μl 의 1 \times loading buffer에 녹인 후 90°C에서 3분간 가열하고 얼음에 방치하였다. 미리 준비된 변성 polyacrylamide gel에 loading하고 bromophenol blue가 gel 끝까지 이동할 때까지 전기영동 한 후 건조하여 X-ray film에 노출시켰다.

III. 성 적

1. Mycolactone 처리에 의한 세포사멸의 형태학적 관찰

SCC15 구강편평세포암종 세포주를 대상으로 mycolactone을 처리하였다. 그 결과 세포사멸은 처리 후 1일째부터 시작되어 2일 부터는 매우 급속하게 세포가 사멸하였다. 즉, 바닥에 붙어서 자라는 암세포들이 mycolactone 처리에 의하여 세포의 형태가 둥글게 되고, 배양플레이트 (culture plate)에서 떨어지면서 세포가 죽는 전형적인 apoptosis의 양상을 보였다. 이러한 양상은 mycolactone의 처리 시간에 의존적으로 증가하였다 (Fig. 2).

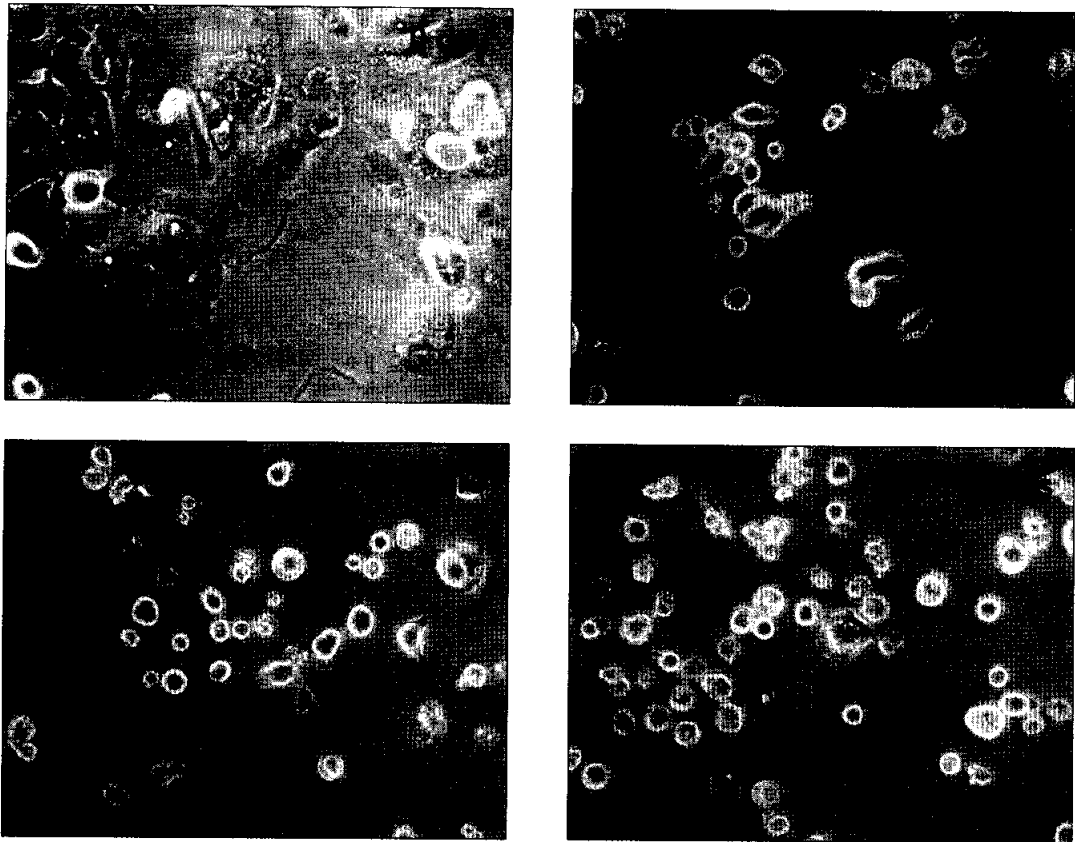


Fig. 2. Cell death of SCC15 oral squamous cell carcinoma(OSCC) cells by mycolactone.

2. FACS 분석

Mycolactone을 처리한 후 4시간 후 (12.44%)부터 sub-G1기의 apoptotic cell들의 수가 증가하기 시작하여 48시간 후에는 27.12%로 증가하였고 72시간 이후에는 반 이상 (51.34%)의 세포들이 사멸하였다 (Fig. 3, 4).

3. Caspase 3 (CPP32) Western blotting

Apoptosis의 전형적인 현상 중의 하나는 caspase의 활성화이다. Caspase는 10여 개의 종류가 있는 것으로 알려져 있는데 그 중에서 apoptosis시에 활성화되는 대표적인 caspase 중의 하나가 caspase 3 (CPP32)이다. Caspase 3가 활성화 될 경우 잘려져 나간 단백질의 단편이 관찰된다. 본 연구에서는 활성화된 caspase 3를 인식하는 항체를 사용하여 Western blotting을 시행하였다. 그 결과 mycolactone 처리 후 2시간째부터 caspase3의 cleavage가 관찰되어 4시간째에 가장 많이 발현되었고 8시간까지 관찰되었다 (Fig. 5).

4. Bcl-2 family 유전자들의 발현 양상

Mycolactone 처리 시에 apoptosis를 유발하는 pro-apoptotic bcl-2

유전자들인 bad, bak, bax 등은 발현 양상에 차이를 보이지 않았다. 한편 apoptosis를 억제하는 anti-apoptotic bcl-2 유전자들인 bcl-w, bcl-x_l, mcl-1 및 bcl-2 등 중에서 bcl-w는 발현양상에 변화가 없었고 bcl-2는 매우 미미한 발현을 보였으며 발현양상의 유의한 변화는 없었다. 그러나, bcl-x_l의 경우는 mycolactone 처리 후 8시간째부터 발현이 감소하였고, mcl-1의 경우는 2시간째 일시적인 발현증가를 보인 후 8시간째부터는 감소하였다 (Fig. 6).

IV. 고 찰

구강암의 유병률은 40세 이후에 발생률이 극적으로 증가하기 시작하여 60세의 연령에서 일정한 유지곡선을 형성한다. 위험요인으로는 흡연과 알코올이 모든 구강암의 75%에 연관되어 있으며, 이 두 가지 요인의 복합효과에 의한 구강암의 발암율은 약 30배 이상으로 증가한다¹²⁾. 구강암의 흔한 전구병변으로 알려진 것은 백반증으로 일반적으로는 10에 중 1이 구강암으로 이행되는 것으로 알려져 있다¹³⁾. 그 외의 위험요인으로는 잘 적합하지 않는 틀니나 오래 사용하여 마모되고 날카로워진 금관 등에 의하여 구강 내에 발생하는 궤양성 병변 등이 알려져 있다. 다른 암과 마찬가지로 구강암의 위험요소 중에는 유전적 요소도 존재한다. 특정 집단 중에는 암을 가지고 있는 가족이 있으면 구강암의 발생 위험성이 높은 것으로 알려져 있다. 인유두종 바이러스

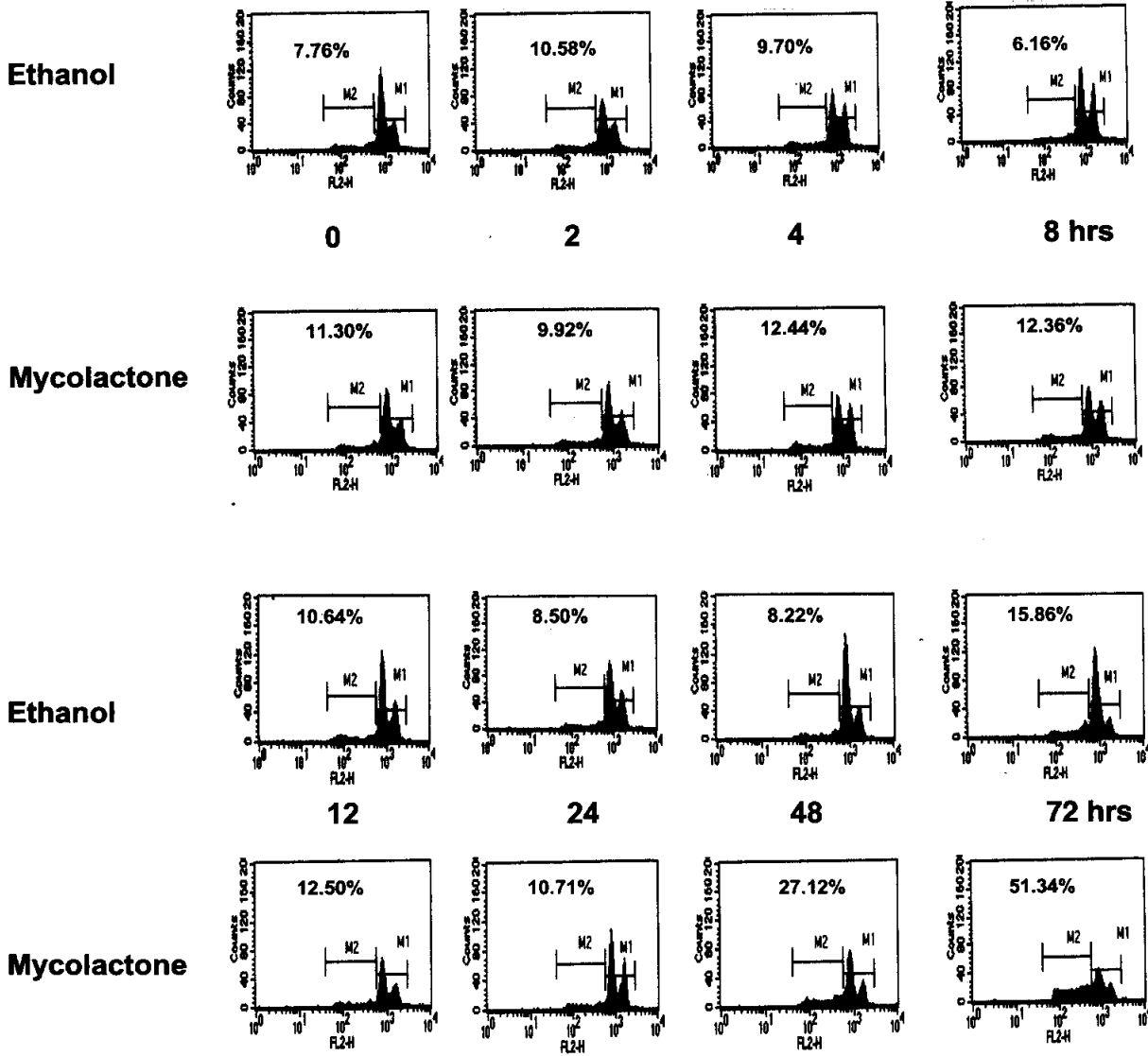


Fig. 3. FACS analysis of mycolactone-treated SCC15 cells.

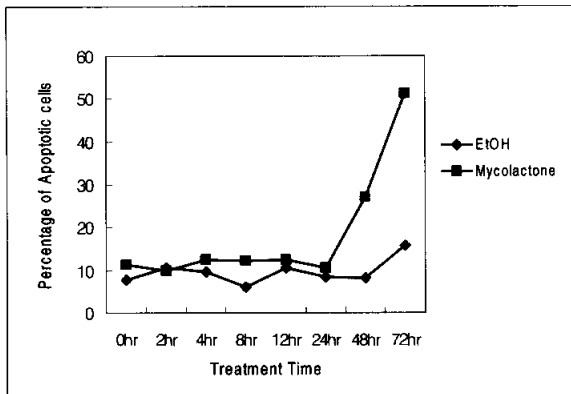


Fig. 4. Time-sequence change of the FACS results of mycolactone-treated SCC15 cells. EtOH; ethanol.

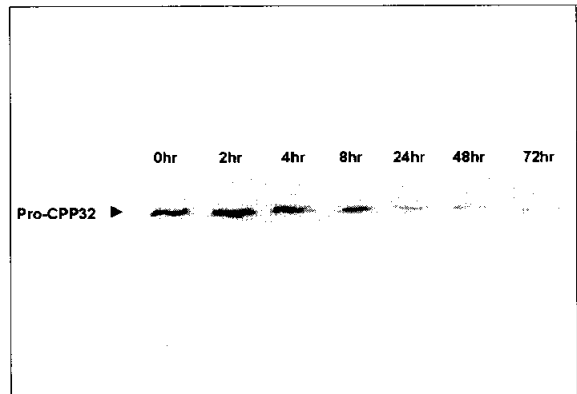


Fig. 5. Caspase 3 activation in mycolactone-treated SCC15 cell.

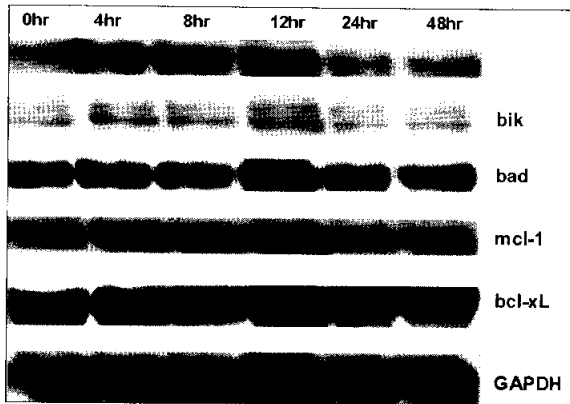


Fig. 6. Down-regulation mcl-1 genes in mycolactone-treated SCC15 cell.

(human papilloma virus, HPV)의 발현이나 p53 유전인자의 돌연변이와 같은 유전학적 이상도 구강암과 관련이 있다고 보고되어 있다^{14,15}.

구강암은 발생초기에는 별다른 증상을 보이지 않고 서서히 진행되기 때문에 조기발견이 매우 어렵다. 구강 악안면 영역의 암의 조기 발견은 여러 가지 임상적인 발견이 기초가 되는데 초기에는 대개 붉은 홍반증을 보이며 점막이 거칠어지고 약간 움기되나 이때는 염증성 병소와 비슷하여 감별이 곤란하다. 이후 진행되어 입안에 흰 막이 생기거나 입안이 헐어 궤양이 생기고 2주 이상 지속되는 경우도 있다¹.

Apoptosis는 세포가 원래 가지고 있는 세포사멸 기전으로서 발생, 분화와 같은 정상적인 환경뿐만 아니라 세균 및 바이러스 감염 혹은 항암제 처리 등의 병리적인 조건하에서도 일어나는 능동적인 세포활동을 통한 일종의 세포사멸 기전이며 기존에 알려져 있던 외부의 병리적인 자극에 의한 수동적인 세포사멸인 necrosis와는 다른 종류의 세포사멸 기전이다.

Apoptosis시의 세포내 생화학적 변화에 관한 연구가 최근 활발히 이루어지고 있다. 그 중 첫 번째 큰 발견은 *Caenorhabditis elegans*에서 이루어졌다. *C. elegans*의 발생과정 중 일어나는 apoptosis 과정에는 ced-3, ced-4 및 ced-9 등의 유전자들이 관여하고 있다^{16,17}. 이들 중 ced-3 및 ced-4는 killer gene인데 반하여 ced-9은 부적절한 apoptosis시에 세포 survival에 관여하는 survival gene이다^{18,19}. 이들 유전자들의 homolog들이 mammalian cell에서도 밝혀졌는데, ced-3 homolog는 apoptosis시에 활성화되는 다양한 protease들인 caspase들이고²⁰, ced-4 homolog는 mitochondria에서 cytochrome C release에 의하여 활성화되어 다른 caspase들을 활성화시키는데 관여하는 Apaf1이며, ced-9 homolog는 apoptosis를 억제하는 것으로 알려진 bcl-2이다²¹. Ced-3 homolog로서 apoptosis 과정 중에 일련의 다양한 protease들이 활성화됨이 알려지고 이들은 기질 단백질의 특정 aspartate 잔기를 cleave 하므로 caspase라고 명명되었는데, caspase들은 절단하는 기질의 peptide sequence에 따라 3개의 subfamily로 분류된다^{22,23}; (1) ICE-like proteases: caspases 1, 4, 5, 13 및 14, (2) CED-3 subfamily: caspases 3, 6, 7, 8, 9 및 10 및 (3) 기타 caspase: caspase 2

Apoptosis를 유발시키는 외부 자극들은 크게 death receptor를 경유하는 자극과 그렇지 않은 것으로 나뉜다²⁴. 특정 ligand가 death receptor에 결합하여 apoptosis를 유발하는 경우의 death receptor들로는 Fas/CD95/Apo-1, TNFR1, TRAIL, TRAMP 및 NGF (nerve growth factor) 등이 있으며^{24,25}, death receptor를 경유하지 않는 자극들로는 UV, γ -irradiation, heat shock, ceramide, 항암제, 활성산소종 (reactive oxygen species), 바이러스 감염 및 성장인자의 제거 등이 알려져 있다^{26,27}. 이와 같이 apoptosis를 유도하는 외부 자극들이 있을 때, 불활성화 상태의 pro-form으로 존재하고 있던 initiator caspase는 일차적으로 C-말단의 작은 subunit가 제거되고 autocatalytic activity에 의해 활성화된 caspase가 된다²⁸. 이와 같이 활성화된 initiator caspase는 다른 caspase들의 proteolytic cleavage를 유도함으로써 proteolytic cascade를 시작하게 되고, 궁극적으로 세포사멸에 관여하는 effector caspase들이 활성화되어 다양한 세포사멸 기질 (cell death substrate)들에 작용함으로써 apoptosis의 전형적인 형태 변화 및 생물화학적 현상들이 유발된다. Apoptosis시의 세포들은 nuclear chromatin condensation, membrane blebbing, apoptotic body의 형성, cytoskeleton의 변화, DNA fragmentation 등의 특징적인 변화를 보이며 사멸하게 된다^{29,30}.

Death receptor를 경유하는 경로에서는 death receptor에 수용된 자극이 세포질 단백질인 FADD와 같은 adaptor molecule에 의하여 pro-caspase 8으로 전달되어 caspase-8을 활성화시키고 이는 death substrate에 작용하여 cell death에 직접 관여하는 effector caspase들인 caspase-6 및 caspase-3를 활성화시켜 세포사멸이 유발된다.

Death receptor를 경유하지 않는 자극들 (ionizing irradiation 및 cytotoxic drug등)은 직접 mitochondria에 작용하여 mitochondria의 inner membrane space에 존재하는 cytochrome c의 release를 유발하게 된다. Release된 cytochrome c는 apoptotic protease-activating factor 1 (Apaf1)을 활성화시켜 [Apaf-1/cytochrome c/pro-caspase 9]으로 구성된 apoptosome을 형성하게 되고, pro-caspase 9이 활성화된다. 활성화된 caspase 9은 effector caspase들인 caspase 3, caspase 7 및 caspase 6 등을 활성화시켜 apoptosis를 유발하게 된다³¹.

이러한 apoptosis를 조절하는 단백질로는 apoptosis를 억제하는 Bcl-2가 가장 먼저 알려졌다. Bcl-2와 유사한 아미노산 서열을 갖는 단백질들은 약 15 종류가 존재하며 이들은 Bcl-2 family라고 불린다³². 모든 Bcl-2 family들은 4개의 Bcl-2 homology domain (BH1 to BH4) 중 적어도 하나의 domain을 가지고 있다³³. Bcl-2 family 단백질들은 apoptosis를 억제하는 anti-apoptotic protein들과 오히려 apoptosis를 촉진시키는 pro-apoptotic protein들로 나뉜다. 이들은 서로간의 상호작용을 통하여 apoptosis를 유발하거나 혹은 억제하는 기능을 수행하고 있다. 예를 들면, anti-apoptotic Bcl-2 단백질 중 대표적인 Bcl-xL은 mitochondria를 통한 apoptotic signaling에 관여하는 Apaf-1 단백질이 Pro-caspase 9과 결합할 수 있는 구조로 변화하지 못하게 함으로써 apoptosis를 억제하는 기능을 수행한다³⁴. 한편 이러한 Bcl-xL의 anti-apoptotic function은 pro-apoptotic 단백질인 BIK에 의하여 억제된다.

Bcl-2나 Bcl-xL과 같은 anti-apoptotic 단백질들은 궁극적으로는 mitochondria로부터의 cytochrome c 해리를 억제함으로써 apop-

tosis를 방해하는 것으로 알려져 있으며 이들은 모두가 적어도 BH1과 BH2 domain을 함유하고 있다. Apoptosis를 촉진하는 pro-apoptotic Bcl-2 member들은 크게 Bcl-2의 구조와 유사한 Bax, Bak, Bok 등이 포함되는 Bax subfamily와 BH3 domain만을 가진 BH3 family로 나뉜다. BIK과 같이 BH3 domain을 갖는 pro-apoptotic 단백질들은 Bcl-xL과 같은 anti-apoptotic 단백질의 antagonist로 작용함으로써 apoptosis를 유발하는데 관여하고 있다. 즉, pro-apoptotic Bcl-2 family와 anti-apoptotic Bcl-2 family에 속하는 Bcl-2 family 단백질들은 상호간에 heterodimer를 형성하여 상호간의 기능을 약화시켜 세포사멸기전의 조절자로 작용하는 것으로 알려지고 있다^{54,55)}.

이와 같이 death receptor를 경유하지 않는 apoptosis의 조절에는 Bcl-2 family 단백질이 매우 중요한 역할을 담당하고 있다. 그렇다면 death receptor-independent apoptosis의 경우 apoptotic signal의 중요 표적은 Bcl-2 family 유전자들이라고 할 수 있을 것이다.

*M. ulcerans*는 slow-growing mycobacteria에 속하는 항산균으로 사람에서 Buruli ulcer라는 피부 궤양을 유발시킨다. Buruli ulcer의 병독인자로서 최근 미국 Rocky Mountain Laboratories의 Kathleen George등⁵⁶⁾은 *M. ulcerans*로부터 일종의 lipid toxin을 분리, 정제하고 그 구조를 규명하여 이를 mycolactone이라고 명명하였다.

Mycolactone은 정상세포 및 다양한 종류의 암세포들을 사멸시키는 특성을 가지고 있다. 이에선 위암, 간암, 대장암, 방광암, 유방암, 피부암, 백혈병 및 림프종 등이 포함된다. Mycolactone에 의한 암세포의 사멸은 apoptosis 유발을 통하여 일어나는 것임이 보고된 바 있으나, 구강편평세포암종에서의 효과에 관하여는 보고된 바 없다. 즉 mycolactone은 세포내에 특정 receptor를 갖지 않으며 따라서, 다양한 세포들을 모두 사멸시키며, 특히 retinoblastoma (Rb) 단백을 발현하지 않는 세포에서 보다 효과적인 세포사멸을 유도함이 보고되었다. 그러나, mycolactone의 apoptosis 유도 기전에 관하여는 자세히 알려져 있지 않은 실정이다.

Mycolactone과 같이 death receptor를 경유하지 않는 apoptosis 유발인자의 경우 그 표적 molecule로서 관심을 가져야 할 것은 Bcl-2 family 유전자들이라고 할 수 있다. 본 연구에서는 새로운 apoptosis 유발인자인 mycolactone이 구강편평세포암종 세포에 미치는 영향을 조사하였다. Mycolactone 처리 후 2일째부터 세포의 형태가 둥글게 변하고 3일째부터는 사멸해 가는 모습이 광학현미경으로 관찰되었다. 이러한 mycolactone의 구강편평세포암종 세포의 사멸효과가 apoptosis 유발에 기인하는지를 살펴보고자 FACS 분석 및 apoptosis시에 활성화되는 caspase 중의 하나인 CPP32 (caspase 3)의 변화를 Western blotting으로 관찰하였다. 그 결과 mycolactone 처리 후 약 8시간째부터 FACS 분석시 sub-G1기의 세포들이 증가하였고 이는 CPP32 Western blotting 상에서 CPP32의 cleavage가 일어나기 시작하는 시점과 일치하였다. 이는 mycolactone이 구강편평세포암종 세포에서 apoptosis를 유발한다는 증거이다.

한편, 이러한 mycolactone의 apoptosis 유발효과가 구강편평세포암종 세포내의 어떠한 유전자 발현에 영향을 주는지를 조사하

고자 apoptosis를 조절하는 유전자들인 bcl-2 family 유전자들의 mRNA 발현 양상을 RPA 법으로 분석하였다. 그 결과 bcl-xL의 발현은 처리 후 8시간째부터 mcl-1 유전자 발현은 12시간째부터 감소하였다. 이 2가지 유전자 모두 apoptosis를 억제하는 유전자들로서 이는 mycolactone이 영향을 주는 유전자들 중 실제 apoptosis의 유발에 관여하는 유전자임을 알 수 있었다.

본 연구에서는 구강편평세포암종 세포에서 mycolactone이 apoptosis를 유발함을 규명하였고 이는 apoptosis를 억제하는 bcl-xL 및 mcl-1 유전자들의 발현 감소에 기인함을 알 수 있었으며 따라서, 본 연구의 결과는 추후 mycolactone을 이용한 구강편평세포암종의 치료제 개발에 응용될 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결 론

최근 보고된 apoptosis 유도인자인 mycolactone이 구강편평세포암종 세포에 미치는 영향 및 그 기전을 조사하였다. Mycolactone은 SCC15 구강편평세포암종 세포에서 처리 1일째부터 시작되어 2일째에는 급격한 세포사멸을 유도하였고 그 양상은 광학현미경상 배양평판 플레이트에서 세포가 떨어져 둥글게 되는 전형적인 apoptosis의 양상을 보였다. FACS 분석 결과 mycolactone 처리 후 4시간째부터 apoptosis의 유발이 관찰되었으며 72시간 후에는 반 이상의 세포가 apoptosis의 현상을 나타내었다. Apoptosis의 생화학적인 특징인 Caspase 3의 활성화를 Western blot법으로 관찰한 결과 처리 후 2시간째부터 caspase 3의 활성화가 관찰되었고 이는 처리 후 8시간까지 지속되었다. Mycolactone에 의한 구강편평세포암종 세포의 apoptosis 기전을 설명하고자 apoptosis를 조절하는 bcl-2 family 유전자들의 발현을 조사한 결과 apoptosis를 촉진하는 bad, bak, bax 및 apoptosis를 억제하는 bcl-w 및 bcl-2 유전자들은 그 발현양상의 변화가 관찰되지 않았고 그 중 bcl-2는 매우 미미한 발현을 보인 반면 apoptosis를 억제하는 유전자들 중 bcl-xL는 mycolactone 처리 후 8시간째부터 발현이 감소하였고, mcl-1의 경우는 4시간째 일시적인 발현증가를 보인 후 12시간째부터는 감소하였다.

본 연구의 결과 mycolactone은 구강편평세포암종 세포에서 apoptosis를 통하여 세포사멸을 유도하며 이는 bcl-2 및 mcl-1 유전자들의 발현 감소에 기인함을 알 수 있었고 추후 mycolactone이 구강편평세포암종의 치료제 개발에 유용하게 사용될 수 있음을 제시하였다.

참고문헌

1. Woolgar JA, Scott J, Vaughan ED, Brown JS, West CR, Rogers S: Survival, metastasis and recurrence of oral cancer in relation to pathological features. *Ann R Coll Surg Engl* 77:325-31, 1995.
2. Taybos GM: Oral cancer: dentistry's disease to prevent, diagnose, and treat. *Northwest Dent* 1997 76:29-32, 1997.
3. Scully C: Advances in oral medicine. *Prim Dent Care* 7:55-58, 2000.
4. Ellis RE, Yuan J, Horvitz HR: Mechanisms and functions of cell death. *Ann Rev Cell Biol* 7:663-698, 1991.
5. Krammer PH, Behnmann I, Daniel P, Dhein J, Debatin K: Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr Biol* 6:279-289,

- 1994.
6. Adams JM, Cory S: The bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281: 1322-1326, 1998.
 7. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X: Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90:405-413, 1997.
 8. Conradt B and Horvitz HR: The *C. elegans* Protein EGL-1 Is Required for Programmed Cell Death and Interacts with the Bcl-2 like Protein CED-9. *Cell* 93: 519-529, 1998.
 9. George KM, Pascopella L, Welty DM, Small PL: A *Mycobacterium ulcerans* toxin, mycolactone, causes apoptosis in guinea pig ulcers and tissue culture cells. *Infect Immun* 68:877-883, 2000.
 10. George KM, Barker LP, Welty DM, Small PL: Partial Purification and Characterization of Biological Effects of a Lipid Toxin Produced by *Mycobacterium ulcerans*. *Infect Immun* 66: 587-593, 1998.
 11. George KM, Chatterjee D, Gunawardana G, Welty D, Hayman J, Lee R, Small PL: Mycolactone: a polyketide toxin from *Mycobacterium ulcerans* required for virulence. *Science* 5;283(5403):854-857, 1999.
 12. Rosin MP, Cheng X, Poh C: Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. *Clin Cancer Res* 6:357-362, 2000.
 13. Rosin MP, Cheng X, Poh C: Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. *Clin Cancer Res* 6:357-362, 2000.
 14. Schwartz SR, Yuch B, McDougall JK, Daling JR, Schwartz SM: Human papillomavirus infection and survival in oral squamous cell cancer: a population-based study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 125:1-9, 2001.
 15. Shima K, Kobayashi I, Saito I, Kiyoshima T, Matsuo K, Ozeki S, Ohishi M, Sakai H: Incidence of human papillomavirus 16 and 18 infection and p53 mutation in patients with oral squamous cell carcinoma in Japan. *Br J Oral Maxillofac Surg* 38:445-450, 2000.
 16. Ellis HM and Horvitz HR: Genetic Control of Programmed Cell Death In the Nematode *C. elegans*. *Cell* 44:17-29, 1986.
 17. Chinnaiyan AM, Chaudhary D, O'Rourke K, Koonin EV, Dixit VM: Role of CED-4 in the activation of CED-3. *Nature* 388:728-729, 1997.
 18. Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR: *Caenorhabditis elegans* gene ced-9 protects cells from programmed cell death. *Nature* 356:494-499, 1992.
 19. Hengartner MO: CED-4 is a stranger no more. *Nature* 388:714-715, 1997.
 20. Xue D, Shaham S, Horvitz HR: The *Caenorhabditis elegans* cell death protein CED-3 is a cysteine protease with substrate specificities similar to those of the human CPP32 protease. *Genes Dev* 10:1073-1083, 1996.
 21. Hengartner MO and Horvitz HR: *C. elegans* cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian protooncogene bcl-2. *Cell* 76:665-676, 1994.
 22. Thornberry NA and Lazebnik Y: Caspases: Enemies Within. *Science* 281: 1312-1316, 1998.
 23. Los M, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K: The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity* 10:629-639, 1999.
 24. Rabizadeh S, Oh J, Zhong LT, Yang J, Bitter CM, et al: Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science* 261:345-348, 1993.
 25. Martin SJ, Finucane DM, AmaranteMendes GP, O'Brien GA, Green DR: Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. *J Biol Chem* 271:28753-28756, 1996.
 26. Hickman JA: Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev* 11:121-139, 1992.
 27. Nagata S: Apoptosis by Death Factor. *Cell* 88:355-365, 1997.
 28. King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kirschner MW: How Proteolysis Drives the Cell Cycle. *Science* 274:1652-1659, 1996.
 29. Schulze-Osthoff K, Walczak H, Droge W, Kramer PH: Cell nucleus: DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J Cell Biol* 127:15-20, 1994.
 30. Oberhammer FA, Hochegger K, Froschl G, Tiefenbacher R, Pavelka M: Chromatin condensation during apoptosis is accompanied by degradation of lamin A+B, without enhanced activation of cdc2 kinase. *J Cell Biol* 126:827-837, 1994.
 31. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S: A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391: 43-50, 1998.
 32. Kelekar A and Thompson CB: Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol* 8:324-330, 1998.
 33. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G, Thompson CB: Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74:597-608, 1993.
 34. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer Sj: Bcl-2 Heterodimerizes In Vivo with a Conserved Homolog, Bax, That Accelerates Programmed Cell Death. *Cell* 74:609-619, 1993.
 35. Farrow SN and Brown R: New members of the Bcl-2 family and their protein partners. *Curr Opin Genet Dev* 6: 45-49, 1996.