

인체 대장암 세포주(HT-29)에서 담즙산 합성유도체(HS-1200)의 세포 사망 기전

동아대학교 의과대학 치료방사선과학교실*, 해부학교실†, 부산대학교 자연대학 화학과‡

오신근* · 양광모* · 허원주* · 유영현† · 서홍석‡ · 이형식*

목적: 인체 대장암 세포주인 HT-29에 새로운 CDCA 합성유도체인 HS-1200을 처치하여 암세포의 증식에 미치는 영향과 아포토시스 유도 활성을 관찰하고 기전을 연구하고자 하였다.

대상 및 방법: 지수증식기의 HT-29 세포에 다양한 농도의 CDCA 합성유도체인 HS-1200을 투약하여 IC₅₀를 구하였다. IC₅₀의 농도를 참조하여, 세포 생존능의 실험은 trypan blue exclusion assay를 이용하였고, 아포토시스 유도에 관한 관찰 실험은 agarose gel electrophoresis, TUNEL assay 및 Hoechst staining을 이용하였다. Western blotting을 통한 PARP [poly (ADP-ribose) polymerase], caspase-3 및 DFF (DNA fragmentation factor)의 degradation 및 cleavage 등을 관찰하였다. Immunofluorescent method를 통한 cytochrome c 방출 측정 및 미토콘드리아 막전위 측정을 실시하였다.

결과: HS-1200은 agarose gel electrophoresis 실험에서 DNA ladder의 관찰, TUNEL assay 및 Hoechst staining 에서 아포토시스 세포들이 대량으로 관찰되는 결과로 미루어 아포토시스에 의한 세포 사망을 유도하는 것으로 사료되었다. 아포토시스에 의한 세포 사망을 검증하기 위한 Western blotting을 통한 PARP cleavage, caspase-3 및 DFF 발현 관찰에서 공히 HS-1200 처치 후 4시간 째부터 PARP, caspase-3 및 DFF의 degradation 및 cleavage가 관찰되었다. HS-1200의 아포토시스 유도에 이르는 기전연구에서 미토콘드리아의 역할에 주목하고 시행한 cytochrome c 방출 측정 및 미토콘드리아막 전위 ($\Delta\psi_m$) 측정에서 공히 cytochrome c 방출 및 미토콘드리아막 전위 ($\Delta\psi_m$)의 감소가 관찰되었다.

결론: 인체 대장암 세포주(HT-29)에서 CDCA 합성유도체인 HS-1200을 이용한 세포 증식억제 및 세포 사망 기전 연구에서, 아포토시스의 유도가 HS-1200의 세포 사망 기전에 중요한 역할을 하는 것을 확인하였다. 이러한 아포토시스의 유도에는 미토콘드리아의 역할이 중요하게 관련되는 것으로 관찰되었다. 상기 결과를 토대로 HS-1200의 항암 치료제로서의 역할에 관한 기초 자료로서의 유용성을 제시할 수 있었다.

핵심용어: 인체 대장암 세포주(HT-29), 담즙산 합성 유도체(HS-1200), 아포토시스

서 론

담즙산이 간세포 내에 축적되면 담즙울체(cholestasis) 동안 발생하는 간 손상에 결정적인 역할을 한다는 사실은 담즙산의 세포 손상 기전을 연구하는 중요한 연구의 시발점이 된다. 이러한 세포 손상은 원발 담즙성 간병변증과 같이 면역학적 요인에 의한 세포 손상 요인도 있지만 대체로 소수성(hydrophobic) 담즙산에 의한 직접적인 화학 손상에 의한 것

이라고 많은 연구자들이 동의한다. 대표적인 담즙산인 cholic acid (CA), chenodeoxycholic acid (CDCA), deoxycholic acid (DCA) 및 ursodeoxycholic acid (UDCA)들의 세포 살상 기전에 대한 연구에서, 여러 가지 암 세포주를 이용하여 세포 증식의 억제 효과 및 아포토시스의 유도에 관한 연구 보고들이 있다¹⁻⁴⁾. 이러한 연구는 서구인에서 발생 빈도가 많은 대장암 환자의 발생 기전의 연구와도 긴밀한 관계가 있다. 동물 실험을 통한 대장암 발생에 있어서, DCA와 CDCA는 강력한 암 촉진인자로서, UDCA는 암 예방인자로서 연구되었고, CA는 DCA로 대사 되지 않으면 특별한 역할을 하지 않는 것으로 연구된 바 있다⁵⁻⁷⁾. DCA는 PKC-의존성 신호 전달 통로를 통해 아포토시스를 유도하며, CA 및 UDCA는 아포토시스의 유도에는 관여하지 않으며, CDCA 및 UDCA는 일정량의 농도에서 세포 증식을 억제한다는 연구 결과들도 있다^{8,9)}. 또한 최근의 연구들에서 담즙산의 합성 유도체의 개발을 통

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-2001-00145) 지원으로 수행되었음.

이 논문은 2002년 8월 12일 접수하여 2002년 11월 20일 채택되었음.

책임저자: 이형식, 동아대학교병원 치료방사선과

Tel: 051)240-5380, Fax: 051)254-5889

E-mail: hyslee@daunet.donga.ac.kr

하여 암세포의 성장을 억제하거나 아포토시스의 유도를 통한 암 치료제로서의 가능성을 모색하는 여러 연구 결과들이 발표되었다¹⁻⁴⁾. 친수성(hydrophilic) UDCA와 taurine 및 glycine conjugates는 여러 소수성 담즙산에 의한 아포토시스로부터 세포를 보호하는 작용이 보고된바 있으며, 이러한 작용은 직접적인 미토콘드리아의 교란(mitochondrial perturbation)으로부터 보호하는 역할에 의한 것으로 보고된다^{8, 10)}. 하지만 UDCA의 glycine methyl ester conjugate인, HS-1030은 HepG2 인체 간암 세포주 및 MCF-7 인체 유방암 세포주에서 아포토시스를 유도하였고, HS-1183은 SV40 DNA 복제를 초기단계에서 억제하였다^{3, 11)}. CDCA는 HCT116 및 HT29 인체 대장암 세포주에서 아포토시스를 유도한다는 보고가 있었고, protein kinase C가 CDCA의 신호매개체로 제시되기도 하였다⁹⁾. 새로운 UDCA와 CDCA의 합성 유도체들이 암세포주의 아포토시스를 유발한다고 보고되고 있으나 그 기전에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 연구자는 대장암 세포주인 HT-29에 새로운 CDCA 유도체인 HS-1200을 처리하여 암세포의 증식과 아포토시스 유도를 관찰하고 이에 미치는 기전을 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

1. Chemicals : Conjugate form of CDCA with β -alanine benzyl ester (N-[(3 α , 5 β , 7 α)-3,7-dihydroxy-24-oxocholan-24-yl] β -alanine benzyl ester) (HS-1200)

4°C에서 20 ml N,N-Dimethylformamide (DMF, Sigma, St.Louis, MO)에 CDCA 1.0 g (2.76 mmol), dicyclohexylcarbodiimide (DCC, Sigma, St. Louis, MO) 631 mg (3.06 mmol) 및 hydroxybenzotriazole (HOBT, Sigma, St.Louis, MO) 400 mg (2.96 mmol) 혼합용액을 조성하였다. 4°C에서 40분간 교반 후 DMF 10 ml에 1.0 g (4.64 mmol)의 β -alanine benzyl ester p-toluenesulfonate salt를 넣은 후 590 μ l의 triethylamine (TEA, Sigma, St. Louis, MO) (4.24 mmol)를 첨가하였다. 상온에서 하룻밤동안 교반 후 200 ml ethyl acetate로 희석 후, magnesium sulfate로 세척 후 감압 하에서 농축하였다. 잔분을 flash chromatography를 이용하여 1.05g (67%) (N-[(3 α , 5 β , 7 α)-3,7-dihydroxy-24-oxocholan-24-yl] β -alanine benzyl ester) (HS-1200)으로 정제하였다. 화학식 및 분자 구조는 Fig. 1에 도식하였다.

2. 대상 세포주

인체 대장암 세포주인 HT-29 세포는 한국 세포주 은행에서 구입하였으며, 10회 이내의 계대 배양을 거치면서 지수증

식기의 세포들만 선택하여 실험에 이용하였다. 세포 배양은 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/mL streptomycin을 함유한 RPMI-1640 배지 (GIBCO, Grand Island, NY)를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 실시하였다. 세포는 2 \times 10⁵/ml로 seeding하면서 1주에 2~3회씩 계대 배양하고, 1개월 단위로 교체하였다.

3. 세포 성장 및 사망 분석

적절한 조건으로 처리된 세포를 다양한 시간별로 배양한 다음 세포현탁액과 동량의 0.4% trypan blue용액을 혼합하여 hemocytometer를 이용하여 세포의 수를 계수한 후, 전체세포에 대한 염색된 세포의 수의 비율을 계산하였다.

4. 아포토시스 분석

1) DNA 전기영동 분석

각 실험 조건에서의 아포토시스 유발 유무를 확인하기 위하여 아포토시스로 형성되는 세포의 DNA 절편을 agarose gel 전기 영동 상에서 관찰하였다. 세포를 회수하여 2.5 ml의 NET buffer (1M Tris(pH 7.5), 0.5M EDTA, 5M NaCl, Sigma, St. Louis, MO)로 현탁시키고 proteinase K를 200 g/ml, sodium dodecyl sulfate (SDS)를 1% 되도록 첨가하여 55°C 수조에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 포화된 NaCl을 675 μ l 넣고 시료가 균일하게 되도록 15초 동안 진탕하였다. 8000 rpm으로 20분간 원심 분리하고 상층액을 따로 모아, Tris 완충액으로 포화된 phenol을 2.5 ml 넣고 1시간 동안 흔들어서 잘 섞이게 하고 3000 rpm으로 20분간 원심하여 다시 상층액을 따로 모아 2.5 ml의 phenol-chloroform-isoamyl alcohol을 넣어 15분간 처리하여 단백질을 제거하였다. 상층액에 2배 용량의 차가운 ethanol을 넣고 4°C 에서 하룻밤 동안 방치하여 DNA가 침전되게 한 후 TE 완충액에 녹였다. 260 nm와 280 nm 에서 OD를 측정하고 OD 값이 1.7 이상인 시료만을 RNase로 1시간 처리하여 ethidium bromide (10 mg/ml)가 첨가된 2% agarose gel에서 전기영동하여 조각난 DNA를 UV transilluminator로

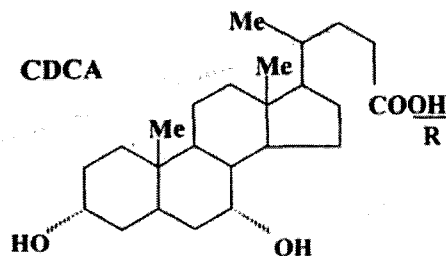


Fig. 1. Structure of CDCA and its derivatives HS-1200.

관찰하였다.

2) Tdt-mediated dUTP biotin nick end-labelling (TUNEL) 정량

Boehringer Mannheim사의 in situ cell detection kit를 사용하였다. $10^6/ml$ 의 세포를 PBS로 2회 세척한 후 4% paraformaldehyde (PFA, Sigma, St. Louis, MO) 로 실온에서 30분간 고정하였다. phosphate buffered saline (PBS)으로 2회 세척한 후, 0.15 M sodium citrate 200 μl 를 처리하여 얼음속에서 2분간 방치한 후 세척하였다. Terminal deoxynucleotidyl transferase, fluorescein-dUTP 50 μl 가 포함된 표지용액을 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 PBS로 2회 세척하여 PBS 200~300 μl 에 현탁하여 형광현미경으로 관찰하였다. 각각의 조건마다 적어도 300개 이상의 세포를 계수하여 TUNEL 양성 세포 수의 퍼센트를 계산하였다.

3) Hoechst 33258 핵염색

$5 \times 10^4/ml$ 의 세포를 원심부착 하여 4% PFA로 실온에서 30분간 고정하였다. PBS로 2회 세척한 후 20 μl 의 Hoechst 33258 (4 $\mu g/ml$)을 첨가하여 37°C에서 30분간 반응하였다. PBS로 2회 세척한 후 전체 세포의 수는 위상차 현미경의 DIC 렌즈를 이용하여 계수하였고, 핵 아포토시스를 일으킨 세포는 형광현미경을 이용하여 관찰하고 계측하였다.

5. Western blotting

PARP (poly (ADP-ribose) polymerase) cleavage, caspase 및 DFF (DNA fragmentation factor) 단백질의 발현정도를 알아보기 위하여 SDS-PAGE 및 Western blot을 실행하였다. Stacking 겔과 separating 겔은 4%와 12% polyacrylamide의 조성으로 하였다. bovine serum albumin (BSA, Sigma, St. Louis, MO)을 표준 단백질로 하여 Coomassie brilliant blue 방법으로 측정된 단백질을 약 2 mg/ml가 되도록 조정하여 각 홈에 20 μl 씩 넣고 수직형 전기 영동을 200 V에서 45분 동안 실시하였다. 단백질 분자량은 SDS molecular weight markers kit (Sigma, MW-SDS-70L)를 기준으로 정하였다. 상기방법으로 전기영동한 겔은 Mini transblot cell (BIO-RAD Mini-Protean II)를 이용하여 4°C에서 250 mA, 100 V로 1시간동안 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 그 후 3% BSA가 포함된 25°C Blotto solution (pH 7.4)에서 1시간동안 blocking한 후 각 암유전자의 산물에 대한 항체가 들어있는 4°C 0.2% Tween-20 in PBS에서 밤새 교반하였다. 이를 alkaline phosphatase conjugated anti-rabbit immunoglobulins (Sigma, A-2306)로 25°C에서 60분간 반응시키고 세척한 후 3% 5-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphate p-toluidine salt (BCIP)와 0.015% p-nitroblue

tetrazolium chloride (NBT)가 들어있는 carbonate buffer (0.1M NaHCO₃, 1.0 mM MgCl₂, pH 9.8)로 발색시켰다. PARP cleavage 관찰을 위해서는 1 mg/ml 농도의 anti-PARP antibody (Clone NO. C-2-10, Oncogene Research Products)를 이용하였고 1:2,000 희석된 HR P(horseradish peroxidase)-conjugated anti-rabbit immunoglobulin을 이차 항체로 이용하였다. 항원의 관찰은 enhanced chemiluminescence (ECLTM, Amersham Co.)를 이용하였다.

6. 면역형광염색(Immunofluorescent staining)

$5 \times 10^4/ml$ 의 세포를 약물 처리하여 원심분리한 후 PBS 100 μl 에 현탁하여 슬라이드 글라스에 원심 부착 (1,000 rpm, 1 min) 하였다. 원심 부착된 세포를 1시간 말린 후 4% PFA에서 10분간 고정하였다. PBS buffer로 3회 수세 후 anti-cytochrome C antibody를 1시간, 37°C에서 적용한 후 FITC-conjugated 이차 항체로 1시간, 37°C에서 처리하였다. 커버글라스를 덮은 후 형광현미경으로 관찰하였다.

7. 미토콘드리아 막전위 실험(Assay of mitochondrial membrane potential)

24 well plate에 세포를 융합하여 배양한 후 (5×10^5 cells) 약물 처리하였다. 약물 처리 시간만큼 배양한 후 배양 배지를 제거하고, 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazol carbocyanine iodide (JC-1)를 최종농도 1 μM 이 되게 배양배지 1 ml로 희석해서 15분간 처리하였다. 처리된 세포를 트립신 200 μl 를 넣어 plate에서 떨어뜨린 후 원심분리하여 PBS

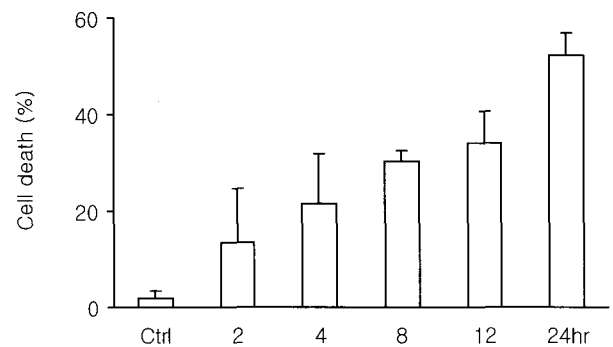


Fig. 2. Effects of HS-1200 on the viability of HT-29 human colon cancer cells. Cells were treated with 100 μM bile acids for 2, 4, 8, 12 and 24 h, and then the percentage of cell viability was determined using the trypan blue exclusion assay. Each value is a mean calculated from at least three independent experiments. Values from each treatment were expressed as a percentage relative to control (100%). Bars represent the mean \pm SD. 1 ml로 씻어주었다. PBS buffer 1 ml로 현탁하여 20 μl 를 덜

1 ml로 씻어주었다. PBS buffer 1 ml로 현탁하여 20 μ l를 덜어서 세포 수를 계수하였다. 가장 적은 세포 수에 맞추어서 세포를 덜어내어 세포 수를 같게 한 후 PBS buffer로 2 ml을 맞추었다. Fluorimetric system (Spex Edison, NJ)에서 495 nm로 측정하였고 계산은 정상 세포 측정치에 대한 미토콘드리아 막전위 상실 ($\Delta\psi_m$)로 나타내었다.

결 과

1. trypan blue exclusion assay를 이용한 세포 생존능 실험

HS-1200의 세포 증식에 미치는 영향과 IC₅₀ (half maximal inhibition concentration)을 측정하기 위하여 trypan blue exclusion assay를 시행하였다. 각 약제의 농도는 50~300 μ M 까지 50 μ M의 농도 차를 두고 검색하였다. HS-1200의 IC₅₀은 100~150 μ M로 판정되었고, 이 후의 HS-1200을 이

용한 추가 실험은 100 μ M 농도로 진행하였다. HS-1200 투여 후 배양 시간 경과에 따른 세포 생존능의 관찰을 위해 배양 후 4, 8, 12 및 24시간째 세포 생존능을 관찰하였다. 시간의 경과에 따라 점차 생존능이 감소하는 결과를 보여, 24시간째에는 50~60% 세포가 생존능이 상실되었다(Fig. 2).

2. 아포토시스의 관찰

1) agarose gel 전기 영동

HS-1200의 약제 투여 후 배양 시간대에 따른 DNA ladder 관찰은 배양 후 4시간째 부터 DNA ladder가 관찰되었고, 시간의 경과에 따라 선명한 양상을 보였다(Fig. 3A).

2) TUNEL assay

HS-1200 약제 투여 후 배양 시간대에 따른 아포토시스 세포들의 관찰에서는 4시간째 약 20%의 아포토시스 세포들이 관찰되었고, 시간대에 따라 점차 증가되어 24시간째에는 80~90%까지 많은 아포토시스 세포들이 관찰되었다(Fig. 3B).

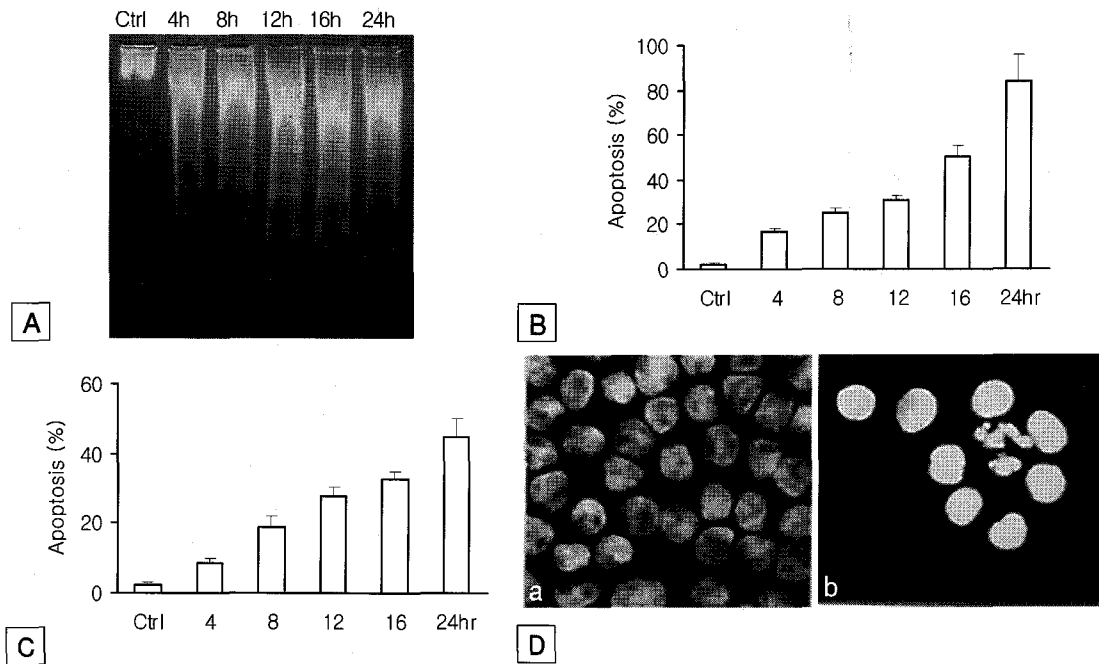


Fig. 3. A) Agarose gel electrophoresis of HS-1200-treated HT-29 human colon cancer cells. Cells were treated with 100 μ M concentrations of HS-1200 for 4, 8, 12, 16 and 24 h. B) DNA fragmentation of HS-1200-treated HT-29 human colon cancer cells. TUNEL positive cells were counted under an epifluorescence microscope from a random sampling of 250~300 cells for each condition. Cells were treated with 100 μ M HS-1200 for 4, 8, 12, 16 and 24 h. DNA fragmentation was determined as a percentage to total cells. Four independent assays were performed and data shown are the mean \pm SD of the means obtained from triplicates of each experiment. C) Hoechst staining of HS-1200-treated HT-29 human colon cancer cells. Cells were treated with 100 μ M HS-1200 for 4, 8, 12, 16 and 24 h. The number of cells having condensed or fragmented nuclei was determined from a random sampling of 250~300 cells for each condition. Four independent assays were performed and data shown are the mean \pm SD of the means obtained from triplicates of each experiment. D) Nuclear morphology 8 h after treatment of 100 μ M HS-1200. Cells were fixed, immunostained, and costained with Hoechst, (a) Upper panel, control, (b) Lower panel, the cells showing condensed or fragmented nuclei (\times 400).

3) Hoechst staining

HS-1200 처리 후 배양 시간대에 따른 아포토시스 세포들의 관찰에서는 4시간째 약 10%의 아포토시스 세포들이 관찰되었고, 시간대에 따라 점차 증가되어 24시간째에는 40~55% 까지 이르렀다(Fig. 3C).

대조세포에 비하여 확인한 세포핵의 주변부 농축 현상을 HS-1200 약제 처리 후 8시간 짜 촬영한 사진에서 확인하였다(Fig. 3D).

3 아포토시스 기전 검증 Western blot

1) PARP cleavage

HS-1200 처리 후 배양 시간대에 따른 PARP cleavage 관찰에서는, HS-1200 처리 후 배양하여 4시간째 부터 PARP

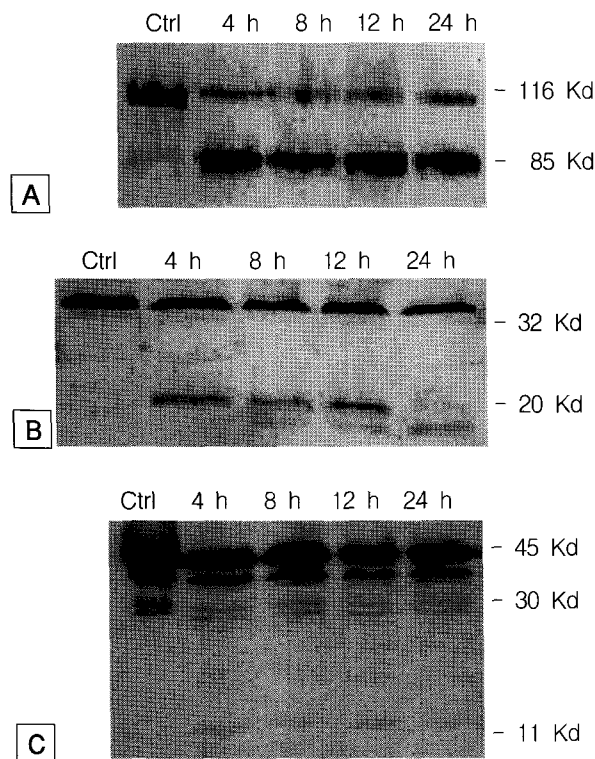


Fig. 4. A) Induction of PARP cleavage by HS-1200 on the HT-29 human colon cancer cells. Cells were treated with 100 μ M bile acids for 4, 8, 12, and 24 h. B) Caspase-3 expression of HS-1200 on the HT-29 human colon cancer cells. Cells were treated with 100 μ M bile acids for 4, 8, 12 and 24 h. HS-1200 induced caspase-3 degradation and cleavage from 4 h. Intact 32 Kd caspase-3 and its 20 Kd cleaved products are indicated. Data shown are a representative of four independent experiments. C) DFF expression of HS-1200 on the HT-29 human colon cancer cells. Cells were treated with 100 μ M bile acids for 4, 8, 12 and 24 h. HS-1200 induced DFF degradation and cleavage from 4 h. Intact 30 Kd DFF and its 11-Kd cleaved products are indicated. Data shown are a representative of four independent experiments.

cleavage가 관찰되었고 이러한 현상은 24시간째까지 지속되었다(Fig. 4A).

2) Caspase-3 degradation 및 cleavage

HS-1200 처리 후 배양 시간대에 따른 caspase-3의 발현 관찰에서는, HS-1200 처리 후 배양하여 4시간째 부터 caspase-3의 degradation 및 cleavage가 관찰되었고 이러한 현상은 12시간째까지 지속되었다(Fig. 4B).

3) DFF (DNA fragmentation factor) degradation 및 cleavage

HS-1200 처리 후 배양 시간대에 따른 DFF의 degradation 및 cleavage 관찰에서는, HS-1200 처리 후 배양하여 4시간 짜 부터 DFF의 발현이 관찰되었고 이러한 현상은 24시간째까지 지속되었다(Fig. 4C).

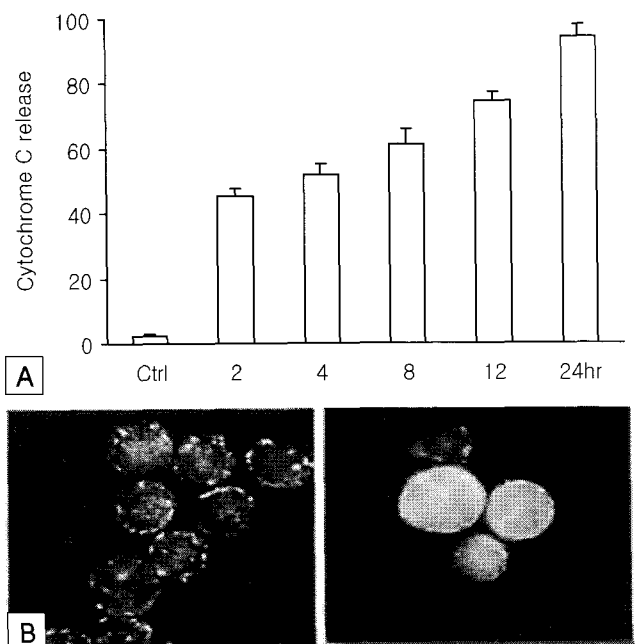


Fig. 5. A) Percent loss of cytochrome c 2, 4, 8, 12 and 24 h after treatment of 100 μ M of HS-1200 on the HT-29 human colon cancer cells. Cells were fixed, immunostained, and costained with Hoechst, immunofluorescent micrographs exhibiting diffuse cytochrome c staining. The number of cells was determined with 250~300 cells counted for each condition. Four independent assays were performed and data shown are the mean \pm SD of the means obtained from triplicates of each experiment. B) Cells were fixed, immunostained, and costained with Hoechst, immunofluorescent micrographs exhibiting diffuse cytochrome c staining (Upper panel: control, Lower panel: subcellular distribution of cytochrome c 8 h after treatment of 100 μ M of HS-1200 on the HT-29 human colon cancer cells. \times 400). The number of cells was determined with 250~300 cells counted for each condition. Four independent assays were performed and data shown are the mean \pm SD of the means obtained from triplicates of each experiment.

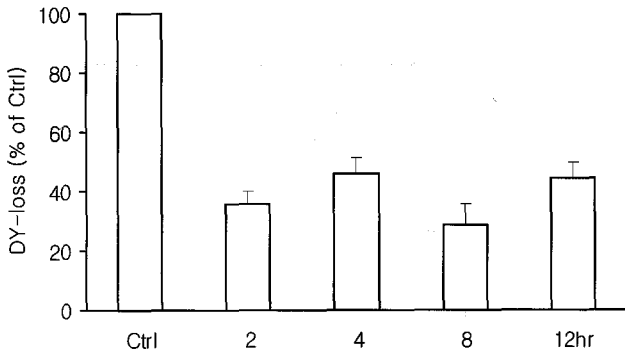


Fig. 6. Loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) at 2, 4, 8 and 12 h after exposure of HT-29 human colon cancer cells to 100 μm of HS-1200. $\Delta\Psi_m$ was quantitated by measurement of J aggregate (JC-1) fluorescence in cells. The percent of control is calculated $\Delta\Psi_m$ of treated cells/ $\Delta\Psi_m$ of untreated control cells. Four independent assays were performed and data shown are the mean \pm SD of the means obtained from triplicates of each experiment.

4. 미토콘드리아의 연관성 연구

1) Cytochrome c의 방출

HS-1200 처리 후 배양 시간대에 따른 cytochrome c의 방출 관찰에서는 배양 후 2시간째부터 약 20%의 cytochrome c의 방출이 관찰되었고, 시간대에 따라 점차 증가되어 24시간째에는 90%까지 cytochrome c의 방출이 관찰되었다(Fig. 5A). 대조세포에서는 세포질에 점상으로 cytochrome c가 분포하는데 비하여, 세포질 전반에 퍼져서 cytochrome c가 염색되는 현상이 HS-1200 약제 처리 후 8시간째 촬영한 사진에서 관찰되었다(Fig. 5B. lower panel).

2) 미토콘드리아 막전위(Mitochondrial membrane potential)

HS-1200 처리 후 배양 시간대에 따른 미토콘드리아 막전위($\Delta\Psi_m$) 관찰에서는 2시간 후 관찰된 약 40~50%의 미토콘드리아 막전위($\Delta\Psi_m$) 감소가 12시간까지 지속되는 현상을 관찰하였다(Fig. 6).

고안 및 결론

본 실험에서 CDCA의 합성 유도체인 HS-1200의 세포 증식 억제제는 agarose gel 전기영동 실험에서 DNA ladder의 관찰, TUNEL assay 및 Hoechst staining에서 아포토시스 세포의 대량으로 관찰되는 결과로 미루어 아포토시스에 의한 세포 사멸을 유도하는 것으로 사료되었다. 아포토시스에 의한 세포 사멸을 검증하기 위한 Western blotting을 통한 PARP cleavage, caspase-3 activity 및 DFF 발현 관찰에서 공히 HS-

1200 처리 후 4시간째부터 PARP cleavage, caspase-3 activity 및 DFF 발현 등이 관찰되었다. 이러한 관찰 결과를 토대로, 연구자는 CDCA의 합성 유도체인 HS-1200의 세포 생존 억제능은 아포토시스에 의한 세포사멸 기전의 일환으로 이해하였다.

담즙산 합성유도체들의 아포토시스를 유도하는 기전 연구에서, Baek 등은³⁾ HepG2 간암 세포주를 이용한 실험에서 담즙산, UDCA 및 LCA에 의한 아포토시스 유도와 세포 내 Ca^{2+} 의 증가에 주목하여 간암의 생성 억제와의 연관성을 제시하였다. Choi 등은⁴⁾ human leukemic T cell을 이용한 담즙산의 합성 유도체에 의한 caspase 활성화를 통한 아포토시스의 유도를 보고하였다.

최근의 연구에 의하면, 세포사멸 경로에 미토콘드리아의 역할이 대두되고 있다. 아포토시스를 연구하기 위한 무세포 체계(cell-free system)에서 어떠한 처치도 하지 않은 HeLa cells의 S-100 추출물에서 dATP의 첨가로 caspase-3를 활성화시키고, DNA fragmentation을 관찰한 실험에서, cytochrome c가 caspase-3 활성화 및 DNA fragmentation에 필요한 성분이며, 세포질 취득과정에서 미토콘드리아로부터 방출된다는 사실이 발견되었다¹²⁾. 새로운 130 kDa molecule인 Apaf-1 또한 caspase 활성화에 기여하는 것으로 연구되었으며, 이는 C. elegans 세포 사망 조정, CED-3 및 CED-4와 유사한 서열을 공유한다¹³⁾. Xenopus egg 추출물을 이용한 또 다른 무세포 체계에서도 미토콘드리아의 관련이 확인되었다. Xenopus egg cytosol을 추출한 미토콘드리아와 함께 배양하였을 때, 미토콘드리아로부터 cytochrome c가 방출되며 DEVD-specific caspases와 핵 아포토시스를 유도하는 것도 시험관 내에서 관찰되었다¹⁴⁾. 또한 Bcl-2 또는 Bcl-xL이 cytochrome c의 세포질로의 유입을 억제하는 것도 알려졌다^{15, 16)}. 미토콘드리아 cytochrome c는 수용성 단백질로, 양전하를 띠며 미토콘드리아 막간 공간에 느슨하게 부착되어 있다. 아포토시스 과정에서 cytochrome c가 미토콘드리아로부터 세포질로 이동하는 분자생물학적 기전은 아직도 규명되어있지 않다. 많은 경우에서 아포토시스의 초기 과정에서 미토콘드리아 막 전위($\Delta\Psi_m$)의 감소가 보고되었다. 세포 사망 억제제인 Bcl-2는 미토콘드리아 외막에 위치하며, 세포 사망 및 미토콘드리아 막 전위($\Delta\Psi_m$)의 감소를 억제한다. 미토콘드리아 막 전위($\Delta\Psi_m$)의 감소는 미토콘드리아 막전위공(mitochondrial transmembrane potential pore (PTP))이 여닫히는 현상에 의해 매개되어진다는 연구결과가 많지만^{17, 18)}, 미토콘드리아로부터 세포질로의 cytochrome c의 유입이 DEVD-specific caspase 활성화도와 미토콘드리아 막 전위($\Delta\Psi_m$)의 감소에 의존적인지 또

는 비의존적인지는 아직 규명되어 있지 않다.

본 연구에서 HT-29 인체 대장암 세포주에 새로운 CDCA 합성유도체인 HS-1200을 투여한 후, 아포토시스 유도 기전과 관련된 cytochrome c의 방출을 관찰하고 미토콘드리아 막 전위($\Delta\psi_m$)를 측정 한 결과, 시간대에 따라 뚜렷이 증가되는 cytochrome c의 방출 및 미토콘드리아 막 전위($\Delta\psi_m$)의 감소를 관찰 할 수 있었다. 이러한 연구 결과를 종합할 때 새로운 CDCA 합성유도체인 HS-1200에 의한 아포토시스의 유도에는 미토콘드리아의 역할이 중요하게 관련되는 것으로 사료되었다. 상기 결과를 토대로 HS-1200의 항암 치료제로서의 가능성 역할에 관한 기초 자료를 제시할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Im EO, Lee S, Suh H, Kim KW, Bae YT and Kim ND. A novel ursodeoxycholic acid derivative induces apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. *Pharm Pharmacol Commun* 1999;5:293-98
2. Im EO, Choi YH, Paik KJ, et al. Novel bile acid derivatives induce apoptosis via a p53-independent pathway in human breast carcinoma cells. *Cancer Lett* 2001;163:83-93
3. Baek JH, Kim JA, Kang CM, Lee YS and Kim KW. Induction of apoptosis by bile acids in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells, *Korean J Physiol Pharmacol* 1997; 1:107-115
4. Choi YH, Im EO, Suh HS, et al. Apoptotic activity of novel bile acid derivatives in human leukemic cells through the activation of caspases. *Int J Oncol* 2001;18:979-984
5. Hill MJ, Drasar BS, Hawksworth G, et al. Bacteria and aetiology of cancer of large bowel. *Lancet* 1971;1(7690):95-100
6. Hill MJ, Drasar BS, Williams RE, et al. Faecal bile-acids and clostridia in patients with cancer of the large bowel. *Lancet* 1975;1(7906):535-539
7. Earnest DL, Holubec H, Wali RK, et al. Chemoprevention of azoxymethane-induced colonic carcinogenesis by supplemental dietary ursodeoxycholic acid. *Cancer Res* 1994;54: 5071-5074
8. Martinez JD, Stratagoules ED, LaRue JM, et al. Different bile acids exhibit distinct biological effects: the tumor promoter deoxycholic acid induces apoptosis and the chemopreventive agent ursodeoxycholic acid inhibits cell proliferation. *Nutr Cancer* 1998;31:111-118
9. Heuman DM, Mills AS, McCall J, Hylemon PB, Pandak WM and Vlahcevic ZR. Conjugates of ursodeoxycholate protect against cholestasis and hepatocellular necrosis caused by more hydrophobic bile salts. In vivo studies in the rat. *Gastroenterology* 1991;100:203-211
10. Rodrigues CM, Fan G, Ma X, Kren BT and Steer CJ. A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *J Clin Invest* 1998;101:2790-2799
11. Kim DK, Lee JR, Kim A, et al. Inhibition of initiation of simian virus 40 DNA replication in vitro by the ursodeoxycholic acid and its derivatives. *Cancer Lett* 1999;146:147-153
12. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R and Wang X. Induction of the apoptotic program in cell-free extracts: requirement for DATP and cytochrome c. *Cell* 1996;86:147-157
13. Zou H, Henzel, WJ, Lui X, Lutschg A and Wang X. Apaf-1 a human protein homologous to C elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997; 90:405-413
14. Newmeyer DD, Farschon DM and Reed JC. Cell-free apoptosis in Xenopus egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell* 1994;79:353-364
15. Kim CN, Wang X, Huang Y, et al. Overexpression of Bcl-xL inhibits ara-C induced mitochondrial loss of cytochrome c and other perturbations that activate the molecular cascade of apoptosis. *Cancer Res* 1997;57:3115-3120
16. Yang J, Liu X, Bhalla K, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997;275:1126-1132
17. Zamzami N, Susin SA, Masse B, et al. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* 1995;182:367-377
18. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, et al. Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial membrane potential during apoptosis. *FEBS Lett* 1996;384:153-157

Abstract

A Novel Chenodeoxycholic Derivative HS-1200 Induces Apoptosis in Human HT-29 Colon Cancer Cells

Sin Geun Oh, M.D.*, Kwang Mo Yang, M.D.*, Won Joo Hur, M.D.*,
Young Hyun Yoo, M.D.†, Hong Suk Suh, Ph.D.† and Hyung Sik Lee, M.D.*

*Department of Radiation Oncology, †Anatomy, and Cell Biology, College of Medicine, Dong A University,

†Department of Chemistry, Pusan National University, Busan, Korea

Purpose: To investigate the growth inhibitory effects, and the underlying mechanism of human colon cancer cell (HT-29) death, induced by a new synthetic bile acid derivative (HS-1200).

Materials and Methods: Human colon cancer cells (HT-29), in exponential growth phase, were treated with various concentrations of a new synthetic bile acid derivative (HS-1200). The growth inhibitory effects on HT-29 cells were examined using a trypan blue exclusion assay. The extent of apoptosis was determined using agarose gel electrophoresis, TUNEL assays and Hoechst staining. The apoptotic cell death was also confirmed by Western blotting of PARP, caspase-3 and DNA fragmentation factor (DFF) analysis. To investigate the involvement of mitochondria, we employed immunofluorescent staining of cytochrome c and mitochondrial membrane potential analyses.

Results: The dose required for the half maximal inhibition (IC₅₀) of the HT-29 cell growth was 100~150 μ M of HS-1200. Several changes, associated with the apoptosis of the HT-29 cells, were revealed by the agarose gel electrophoresis, TUNEL assays and Hoechst staining, following their treatment with 100 μ M of HS-1200. HS-1200 treatment also induced caspase-3, PARP and DFF degradations, and the western blotting showed the processed caspase-3 p20, PARP p85 and DFF p30 and p11 cleaved products. Mitochondrial events were also demonstrated. The cytochrome c staining indicated that cytochrome c had been released from the mitochondria in the HS-1200 treated cells. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) was also prominently decreased in the HS-1200 treated cells.

Conclusion: These findings suggest that the HS-1200 - induced apoptosis of human colon cancer cells (HT-29) is mediated via caspase and mitochondrial pathways.

Key Words: Bile acids, CDCA derivatives-induced apoptosis, Mitochondrial pathway