



## TALP-32의 인체자궁암 세포주 HeLa에 대한 세포독성

박지훈<sup>1</sup> · 김종석<sup>1</sup> · 윤은진<sup>1</sup> · 송경섭<sup>1</sup> · 서강식<sup>1</sup> · 김훈<sup>1</sup> · 정연주<sup>1</sup> · 윤완희<sup>1</sup> · 임규<sup>1,2,3</sup> · 황병두<sup>1,2,3</sup> · 박종일<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>충남대학교 생화학교실, <sup>2</sup>암연구소, <sup>3</sup>생물공학연구소

## Cytocidal Effect of TALP-32 on Human Cervical Cancer Cell HeLa

Ji-Hoon Park<sup>1</sup>, Jong-Seok Kim<sup>1</sup>, Eun-Jin Yun<sup>1</sup>, Kyoung-Sub Song<sup>1</sup>, Kang-Sik Seo<sup>1</sup>, Hoon Kim<sup>1</sup>,  
Yeon-Joo Jung<sup>1</sup>, Wan-Hee Yun<sup>1</sup>, Kyu Lim<sup>1,2,3</sup>, Byoung-Doo Hwang<sup>1,2,3</sup> and Jong-Il Park<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Biochemistry, College of Medicine,

<sup>2</sup>Cancer Research Institute,

<sup>3</sup>Institute of Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon, Korea

Received December 9, 2006; Accepted December 26, 2006

**ABSTRACT.** TALP-32 is highly basic protein with a molecular weight of 32 kDa purified from human term placenta. Some basic proteins such as defensins and cecropins are known to induce cell death by increasing membrane permeability and some of them are under development as an anticancer drug especially targeting multi-drug resistant cancers. Therefore, we investigated cytotoxic effect and mechanism of TALP-32. When HeLa cell was incubated with TALP-32, cytotoxicity was increased in time and dose dependent manner. As time goes by, HeLa cells became round and plasma membrane was ruptured. Increase of plasma membrane permeability was determined with LDH release assay. Also in transmission electron microscopy, typical morphology of necrotic cell death, such as cell swelling and intracellular organelle disruption was observed, but DNA fragmentation and caspase activation was not. And necrotic cell death was determined with Annexin V/PI staining. The cytotoxicity of TALP-32 was minimal and decreased on RBC and Hep3B respectively. These data suggests that TALP-32 induces necrosis on rapidly growing cells but not on slowly growing cells implicating the possibility of its development of anticancer peptide drug.

**Keywords:** Necrosis, Peptide drug

### 서 론

자궁경부암은 진단법(application of screening program)의 발달로 발생률이 낮아지고 있지만, 여전히 전세계적으로 여성에게 많이 발생하고 있는 질병이다(Parkin *et al.*, 1999). 자궁경부암의 치료법은 보편적으로 수술치료법, 방사선요법, 항암화학요법 등이 있으며, 경우에 따라 두 세가지 치료법을 병행하기도 한다(Serkies and Jassem, 2005). 그 중 화학적 치료법은 세포내의 여러 가지 기전을 이용하여 암세포에 손상을 입히게 된다. 예를 들면 DNA

intercalating agent인 doxorubicin, topoisomerase I 저해제인 camptothecin, microtubule stabilizing agent인 paclitaxel 등이 많은 연구가 진행되어 임상에 이용되고 있다(Nguyen and Nordqvist, 1999). 이들은 결국 apoptotic signal을 통해 세포를 죽게 한다(Takahashi *et al.*, 1999). 이러한 화학물질 이외에도 세포독성을 갖는 펩타이드(Papo *et al.*, 2004)나 천연단백질(Kim *et al.*, 2003) 등에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다. 이들 중 cecropins, defensins 그리고 mellitin 등의 cationic amphiphathic peptides는 세포막의 투과성을 증가(Vaara, 1992)시켜 원핵세포와 진핵세포의 세포사멸을 유도한다(Fernandez and Weiss, 1996). 이러한 펩타이드를 이용하여 세포사멸을 유도하는 것은 항암치료에 새로운 방법을 제시한다(Papo and Shai, 2003).

Correspondence to: Jong-Il Park, Dept. of Biochemistry, College of Medicine, Cancer Research Institute, Institute of Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon, Korea  
E-mail: [jjpark@snu.ac.kr](mailto:jjpark@snu.ac.kr), [alwaysmile@cnu.ac.kr](mailto:alwaysmile@cnu.ac.kr)

세포사멸의 종류는 크게 apoptosis와 necrosis로 나뉜다. 여러 연구를 통해 기관의 항상성 조절에 관여하는 조절 가능한 세포사멸의 종류를 apoptosis라고 분류하게 되었고(Kerr *et al.*, 1972), 이는 지난 30여 년간 활발하게 연구되어 왔다. 반면 necrotic cell death는 독소의 유입이나 물리적 충격에 의한 사고적 세포 사멸로만 막연하게 생각되어왔다. 하지만 최근 들어 necrotic cell death에(Kitanaka and Kuchino, 1999, Edinger and Thompson, 2004). 이러한 necrotic cell death는 apoptosis와는 전혀 다른 기전을 거침으로써 암세포의 사멸을 유도하는 새로운 방향을 제시할 수 있을 것이다(Do *et al.*, 2003).

TALP-32는 사람 만기 태반 조직에서 분리된 32 kDa 크기의 단백질로서, 양이온 교환수지와 고농도의 potassium phosphate buffer를 이용하여 분리되었다. 따라서 조직 내 다른 단백질들에 비해 양이온을 가진 아미노산이 많이 포함되어 있다. 또한 이 단백질은 *in vitro*에서 tubulin polymerization activity가 있는 것으로 보고 되었지만(Choi and Hwang, 1998), 그 외의 특성에 대해서는 아직 보고된 바가 없다.

이에 본 연구에서는 TALP-32를 여러 세포에 처리하였을 때 강력한 세포독성을 보임을 관찰하였고, 그 중 인체 자궁경부암 세포주인 HeLa 세포에서 세포독성 기전을 살펴 보았다.

## 실험재료 및 방법

### 실험재료

DMEM, Hank's balanced salt solution HBSS, fetal bovine serum, trypsin/EDTA 등은 Gibco-BRL Gaithersburg, MD사에서, ethylene diamine tetraacetate, annexin V-FITC, propidium iodide, leupeptine, phenyl-methylsulfonyl fluoride, sodium dodecyl sulfate, bovine serum albumin, thiazolyl blue tetrazolium bromide 등은 Sigma사에서, phosphocellulose, hydroxyapatite는 Whatmann사에서 구입하여 사용하였다.

### 세포주 및 세포배양

본 실험에 사용된 HeLa 세포와 Hep3B 세포는 ATCC로부터 분양 받았으며, 10% heat-inactivated FBS(Gibco BRL), penicillin(100 units/ml), streptomycin(100 µg/ml)을 첨가한 DMEM(Gibco BRL)을 배양액으로 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 배양기에서 배양하였다.

### TALP-32의 정제

사람 태반 조직에서 taxol-like protein-32(이하 TALP-

32) 정제는 Hwang *et al.*(1995)의 방법에 따라 조제하였다. 즉 정상 만기 태반 조직을 0.154 M NaCl로 수회 세척하여 혈액의 혼입을 적게 하고, 태반 조직 100 g당 0.6 M buffer A(0.6 M K-phosphate, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 0.5 µg/ml leupeptine, 10% glycerol, pH 7.0) 200 ml을 가하여 빙욕중에서 Polytron으로 수회 균질화하고, 이를 2시간 빙욕중에 방치한 다음 두겹의 무명천으로 여과한 후 30,000×g에서 30분간 원심 하여 상청액을 얻었다. 이를 phosphocellulose column (bed volume : 10 ml)에 가한 후 각각 100 ml의 buffer A로 0.4 M에서 0.5 M까지 직선구배용출법으로 용출하였다. 이를 다시 hydroxyapatite column (bed volume : 10 ml)에 가한 후 0.2 M, 0.6 M KCl 용액 각각 50 ml을 이용하여 직선구배용출법으로 용출하였다. 이때 용출된 분획은 12% SDS-PAGE상에서 단일 단백질 밴드를 나타내었고 분자량은 32 kDa이었다. 최종 정제된 단백질은 Vivaspin(Vivascience)을 이용하여 PBS로 투석 및 농축하여 -70°C에 보관하고, 이를 이하 모든 실험의 단백질 표품으로 사용하였다.

### 투과전자현미경을 통한 분석

HeLa 세포를 4×10<sup>5</sup> cell/100 mm dish로 배양하여 TALP-32를 외액에 처리하고 12시간 동안 배양한 후 trypsin/EDTA를 이용하여 수확, 초박절편을 만들었다. 이를 격자(grid, Taab HR 24 type, Aldermaston, Berks, English)에 부착하여 uranyl acetate(Ted pella) 및 lead citrate(Fisher scientific co.)로 이중 전자 염색하여 투과 전자현미경(Hitachi H-600, Japan)으로 가속 전압 75 kV에서 관찰하였다.

### 세포독성의 측정

96 well microtiter tissue culture plate(Falcon)에 HeLa 세포를 5×10<sup>3</sup> cell/well로 배양하고, TALP-32를 처리한 다음 일정 시간 동안 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 세포배양기에서 배양하였다. MTS 용액을 첨가하여 37°C 배양기에서 2시간 동안 반응 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 세포막 투과율 측정 (LDH release assay)

HeLa 세포(5×10<sup>3</sup> cell/96 well plate)에 TALP-32를 처리하여 상청액을 20 µl 취하여 fluoro-96 well plate에 옮긴 후 동량의 LDH 시약을 첨가하여 22°C에서 30분간 반응시켰다. 이를 분광광도계(Perkin Elmer LS-50B)를 이용하여 Excitation wavelength 560 nm, Emission wavelength 590 nm에서 형광을 측정하였다. LDH release (%)는 아래의 계산식으로 계산하였다.

$$\text{LDH release (\%)} = \frac{\text{exp. value} - \text{low control}}{\text{high control} - \text{low control}} \times 100$$

### Caspase-3 활성능 측정

HeLa 세포를  $1 \times 10^5$  cells/6-well plate로 24시간 동안 배양한 후 TALP-32를 처리하였다. 세포를 모아 TTE 용액 (10 mM Tris-HCl, 0.5% Triton X-100, 10 mM EDTA, pH 8.0)으로 용해시킨 후 30분간 빙욕 중에 방치하였다. 효소반응은 효소 반응 용액(100 mM HEPES, 10 mM DTT, 10% sucrose, 0.1% CHAPS, 0.1% BSA)에 세포 용해액을 첨가한 후 100  $\mu$ M Ac-DEVD-AFC(caspase-3에 대한 기질)을 첨가하여 37°C에 4시간 동안 반응시켰다. 효소반응 후 방출되는 형광은 형광분광광도계(Perkin Elmer LS-50B)를 이용하여 Ex380/Em460 nm에서 측정하였다.

### Apoptosis와 Necrosis의 판별

HeLa 세포( $1 \times 10^5$  cell/6 well plate)에 TALP-32를 처리하여 배양한 후 세포를 trypsin/EDTA를 처리하여 모은 후 PBS로 세척하였다. 모은 세포를 반응 용액(10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ )으로 재부유하여 100  $\mu$ l로 만들었다. 이에 5  $\mu$ l의 Annexin V-FITC(1 mg/ml)와 10  $\mu$ l의 PI(50  $\mu$ g/ml)을 처리하여 상온에서 15분간 반응시켰다. 그 후 다시 반응용액 400  $\mu$ l를 첨가하고, FACScan 유세포 계측기를 이용하여 측정하였다.

### 적혈구 용혈 시험

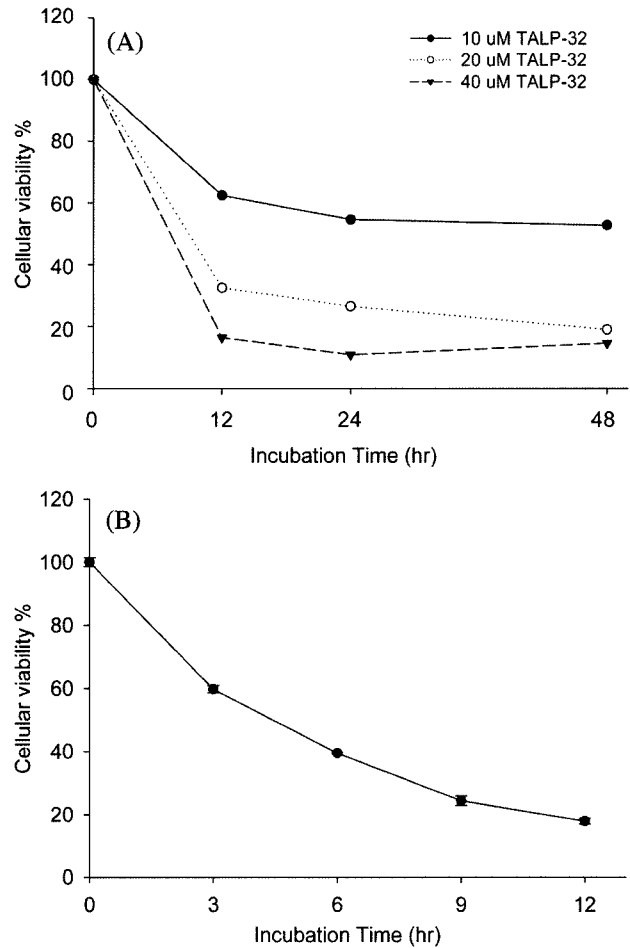
Heparin 처리된 사람 혈액을 900 $\times$ g로 침전시켜 이를 차가운 PBS로 3회 세척하고, 침전된 적혈구를 PBS에 2% v/v로 희석하였다. 이에 TALP-32와 2% 적혈구를 혼합하여 100  $\mu$ l로 만든 후 37°C에서 12시간 동안 반응시켰다. 그 후 1500 $\times$ g로 원심분리하여 상청액을 모아 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 100% 용혈값은 반응액에 1  $\mu$ l의 10% TritonX-100을 첨가하여 얻었다.

$$\text{Hemolysis (\%)} = \frac{\text{exp. value} - \text{low control}}{\text{high control} - \text{low control}} \times 100$$

## 결 과

### HeLa 세포에서의 TALP-32에 의한 세포 독성

HeLa 세포를  $5 \times 10^3$ /96 well로 18시간 동안 배양한 후 10, 20, 40  $\mu$ M의 TALP-32를 처리하여 12, 24, 48시간 배양하여 MTT assay를 시행하였다. 그 결과 12시간 내에 10  $\mu$ M의 TALP-32를 처리한 군에서는 40%, 20  $\mu$ M에서는 70%, 40  $\mu$ M에서는 80% 정도의 세포독성이 있

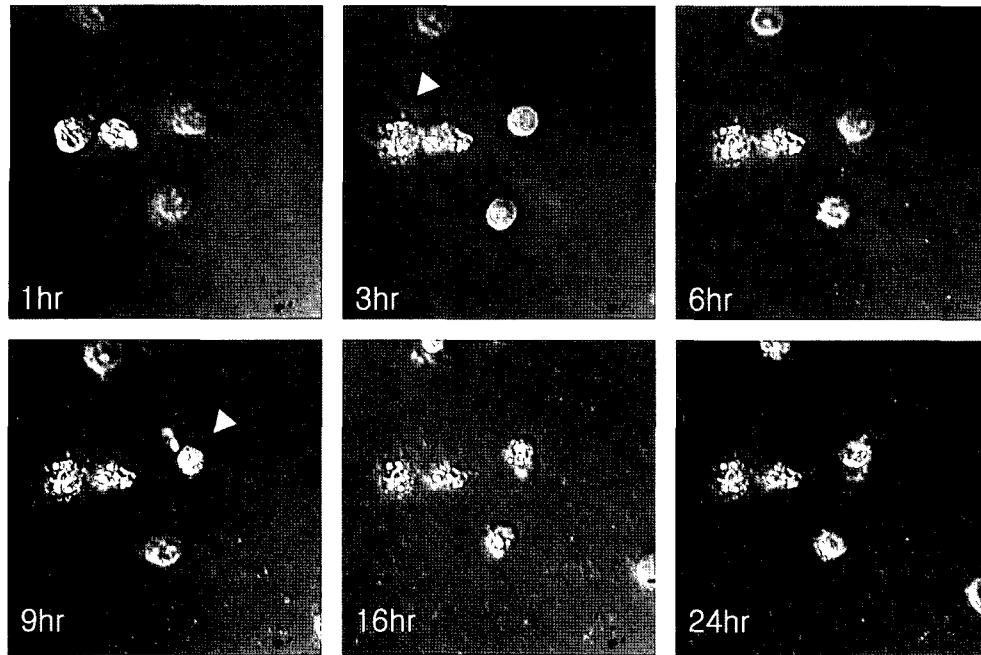


**Fig. 1.** Cytotoxicity of TALP-32 on HeLa cells. (A) Percent of growth inhibition after various concentration of TALP-32 treatment for indicated times. HeLa cells (seeded at a density of  $5 \times 10^3$ /well in 96 well plate) were treated with various concentrations of TALP-32 for the indicated time. (B) Percentage of growth inhibition after 20  $\mu$ M TALP-32 treatment.

는 것으로 보여졌고 12시간 이후의 세포독성은 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 1A). 따라서, 12시간 이내의 변화를 확인하기 위해 3시간 간격으로 20  $\mu$ M의 TALP-32를 처리하였다. 그 결과 시간에 비례하여 세포독성이 점차 증가함을 관찰할 수 있었고(Fig. 1B), 이후의 실험에서는 모두 20  $\mu$ M의 TALP-32를 사용하였다.

### 실시간 현미경을 통한 TALP-32에 의한 HeLa 세포의 형태학적 변화 관찰

TALP-32의 HeLa세포에 대한 독성기전을 유추하기 위해 실시간 세포영상을 기록하여 분석하였다. 즉 HeLa 세포를  $2 \times 10^4$  cells/IVF culture dish에 18시간 동안 배양시켜 세포의 정상적인 모양을 유지하게 한 후 20  $\mu$ M의



**Fig. 2.** Effect of TALP-32 on morphology of HeLa cells. Representative images were obtained by optical microscopy image ( $\times 400$ ). HeLa cells were treated with  $20 \mu\text{M}$  TALP-32 for indicated times. Plasma membrane was ruptured at around 9 hr after TALP-32 treatment. Triangles point to cells in plasma membrane rupture.

TALP-32를 처리하였다. 그 후 일정한 시간 간격으로 실시간 현미경을 이용하여 세포의 형태를 관찰하였다. TALP-32 처리 3시간이 지난 후부터 순차적으로 HeLa 세포가 rounding화 되었고, 세포막에 bubble이 형성된 후 결국 파열이 일어남을 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

#### TALP-32에 의한 HeLa 세포의 전자현미경학적 소견

TALP-32에 의한 세포막, 세포내 소기관 등의 형태학적 변화를 알아보기 위해 투과전자현미경 검경을 시행하였다. 즉, HeLa 세포를  $20 \mu\text{M}$ 의 TALP-32와 함께 12시간 동안 배양한 후 trypsin 처리로 세포를 수확하여 일련의 처리 과정을 거친 후 투과전자현미경으로 관찰하였다. 그 결과 necrosis임을 강력히 의심할 수 있는 소견인 세포막의 rupture(black arrows), cell swelling, cell contents의 leakage, karyolysis, 세포 소기관의 disintegration (black triangles)이 일어났으며(Fig. 3C, E), apoptosis의 소견인 membrane blebbing, nuclear condensation and fragmentation 등은 관찰되지 않았다. 또한 세포막이 터지기 전 세포 내 소기관들이 그 형태를 잃어버리는 것을 관찰할 수 있었다.

#### TALP-32에 의한 HeLa 세포의 apoptosis 검색

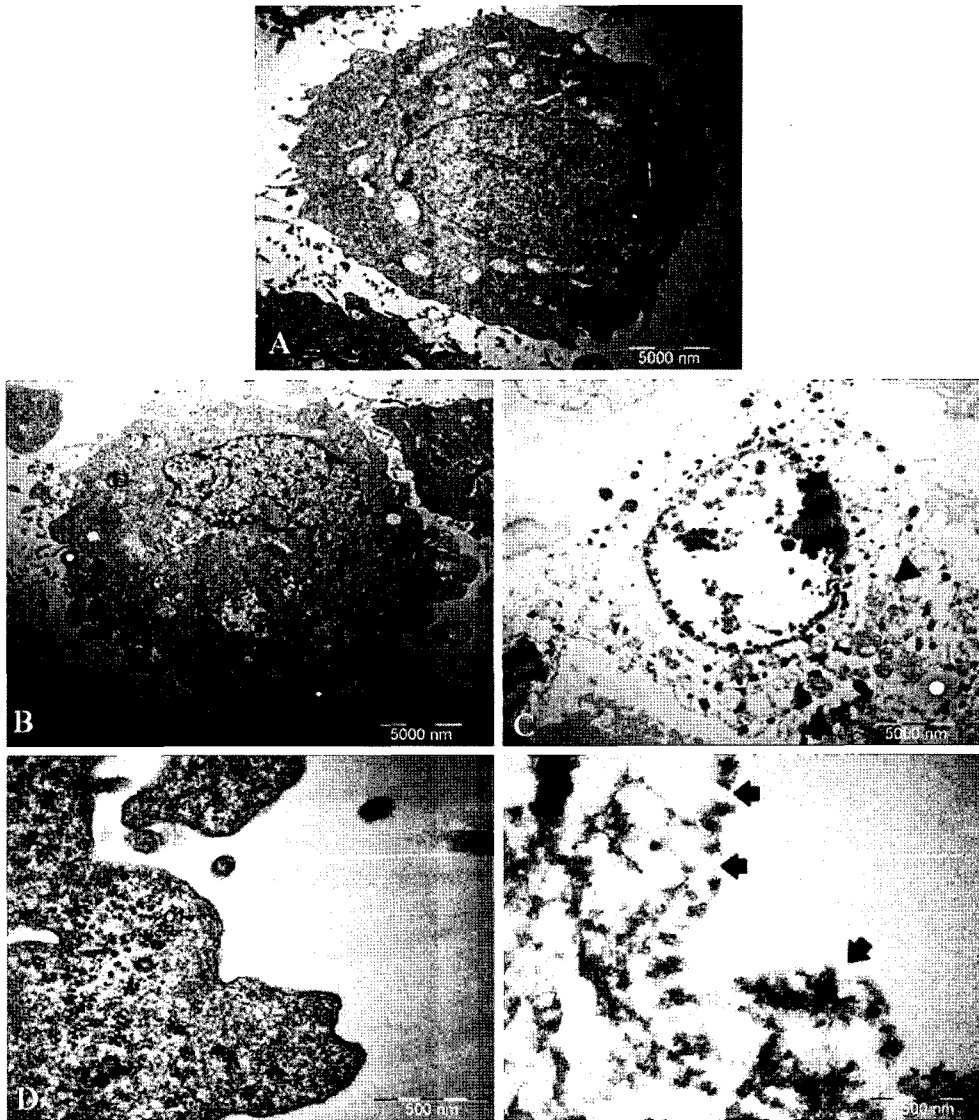
앞선 결과에서 TALP-32에 의한 HeLa세포의 세포독성은 necrosis에 의한 것이 의심되었지만 TALP-32의 HeLa

세포에 대한 세포독성이 apoptosis에 의한 것임을 배제하기 위하여 caspase의 활성을 검색한 결과, caspase의 활성은 나타나지 않았다(Fig. 4A). 또한 HeLa 세포를  $5 \times 10^3/96$  well로 18시간 동안 배양하고 general caspase 억제제인 z-VAD-fmk를  $20 \mu\text{M}$ 로 1시간 전처리 한 후,  $20 \mu\text{M}$ 의 TALP-32를 함께 처리하여 3,6,9,12시간 뒤 MTT assay를 시행하였다(Fig. 4B). TALP-32 단독 처리한 군과 z-VAD-fmk와 TALP-32를 함께 처리한 군은 유의할 만한 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 TALP-32에 의한 HeLa 세포 독성은 caspase를 경유하는 apoptosis가 아님을 시사한다.

#### TALP-32에 의한 HeLa 세포의 막 투과성 증가

Lactate dehydrogenase(LDH)는 세포질 내에 존재하는 안정한 효소로서 세포막에 손상이 생기면 세포배양액으로 빠져 나오게 된다. 세포배양액을 취하여 빠져 나온 LDH의 양을 효소반응을 통해 살펴보고, 그 활성을 세포막 손상의 척도로 삼는다(Korzeniewski and Callewaert, 1983).

$5 \times 10^3/96$  well로 18시간 동안 배양한 후  $20 \mu\text{M}$ 의 TALP-32를 처리하여 3,6,9,12시간 동안 배양한 후 배양액을 취하여 배양액에 유출된 LDH의 효소활성을 측정하였다. 그 결과 3시간 후부터 세포 배양액에 LDH가 유출되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5).



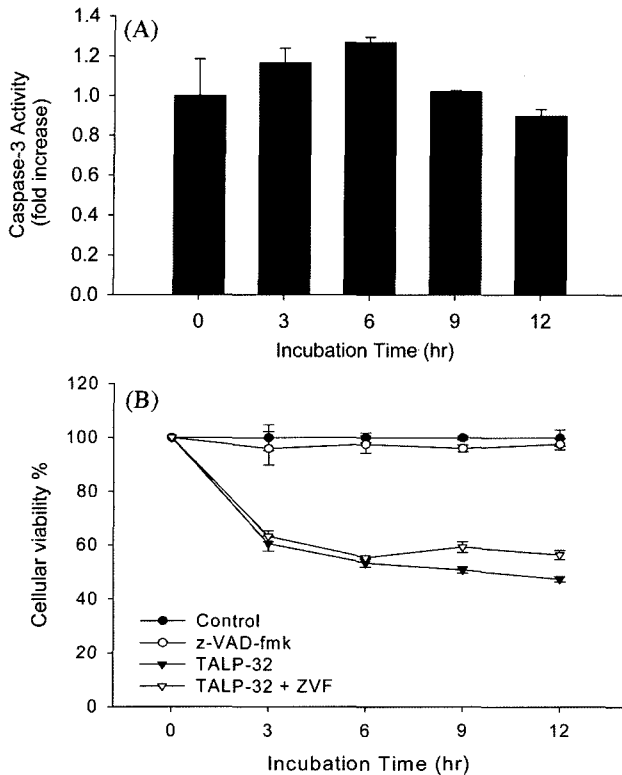
**Fig. 3.** Ultrastructural analysis of the HeLa cell. Transmission electron micrograph shows the ultrastructure of HeLa cell. Normal morphology of HeLa cell (A) and 20  $\mu$ M of TALP-32 treated (B, C). Magnified view of HeLa cell focused in plasma membrane. Control (D) and 20  $\mu$ M of TALP-32 treated (E) HeLa cell membrane. Scale bar: 5000 nm (A, B, C), 500 nm (D, E). Triangles indicate disintegrated cellular organelles and arrows indicate ruptured membrane.

#### Annexin V/PI 염색을 통한 necrosis의 확인

HeLa 세포를 annexin V와 PI로 함께 염색함으로써 nonapoptotic live cells(Annexin V negative/PI-negative), early apoptotic cells(Annexin V positive/PI-negative), late apoptotic 또는 necrotic cells(Annexin V positive/PI-positive)을 확인할 수 있다(Koopman *et al.*, 1994).

HeLa 세포에 TALP-32가 강력한 세포독성을 야기하며 투과전자현미경 소견상 그 기전이 necrosis임이 강력히 의심되었다. 이를 확인하기 위해 Annexin V와 Propidium iodide을 함께 염색하여 유세포 계측을 시행하였다. 즉

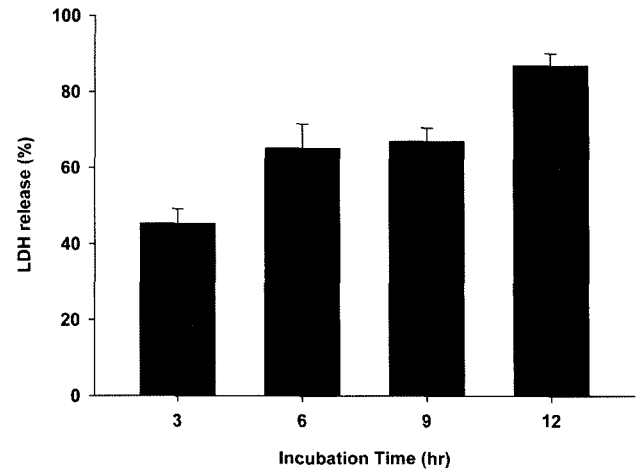
HeLa 세포를  $2 \times 10^5$  cells/6 well plate로 18시간 동안 배양한 후 20  $\mu$ M의 TALP-32를 처리하여 3,6,9,12시간 동안 배양하였다. 각 시간 별로 세포를 모아 Annexin V와 Propidium iodide로 함께 염색하여 유세포 계측을 시행하였다. 그 결과 3시간에서 necrotic cell death를 의미하는 Annexin V/PI double positive region이 36.76%를 차지하였고, 12시간에서는 51.52%에 이르렀다(Fig. 6). 반면 apoptosis를 의미하는 Annexin V positive/PI negative region은 증가하지 않았다. 이는 HeLa 세포에 대한 TALP-32의 세포독성이 apoptosis에 의한 것이 아니라 necrosis에 의한 것임을 의미한다.



**Fig. 4.** Effect of TALP-32 on caspase-3 activity. (A) At indicated time after 20  $\mu$ M of TALP-32 treatment, cells were lysed, and activity assay was performed as described in "Materials and Methods". No significance among each column. (B) HeLa cells (seeded at a density of  $5 \times 10^3$ /well in 96 well plate) were pretreated with 20  $\mu$ M z-VAD-fmk (general caspase inhibitor) for 30 minutes, then treated with 20  $\mu$ M TALP-32 for indicated times.

#### TALP-32의 적혈구 용혈능 검색

적혈구는 핵과 세포 내 소기관이 없고 해당과정 이외의 대사과정이 거의 없는 단순한 구조로 인해 세포 내 다른 영향을 배제하고 지질막에 대한 직접적인 영향을 살펴보기 좋은 세포이다. 따라서 TALP-32가 음전하를 띤 세포막에 직접 작용하여 membrane integrity를 변화시키는지 살펴보기 위하여 사람 적혈구를 이용하여, TALP-32에 의해 유출되는 헤모글로빈의 양을 살펴보았다(Fischer *et al.*, 2003). 즉, 사람의 혈액 10 ml을 채취하여 PBS로 수회 세척하여 적혈구를 모았다. 그 후 다시 PBS로 재부유하고 적혈구가 2%가 포함되게 하여 여러 농도의 TALP-32와 함께 37°C에서 12시간 동안 반응시켰다. TritonX-100을 처리한 균을 100% 용혈 값으로 하고, 아무것도 처리하지 않은 균을 0% 용혈 값으로 하였다. 그 결과 20  $\mu$ M 농도의 TALP-32와 반응시켰을 때, 8% 정도의 용혈능을 보였다(Fig. 7). 이는 TALP-32가 지질막에 직접적 손상을 입히지만 HeLa세포에서의 세포독성과 비교하였을



**Fig. 5.** Plasma membrane integrity was measured by LDH assay. LDH release into media that induced by 20  $\mu$ M TALP-32 for the indicated times.

때, 기대했던 만큼의 결과는 얻지 못하였기에 세포 내에서의 어떠한 기전이 세포사멸에 영향을 미칠 것으로 생각된다. 또는 적혈구는 분열을 하지 못하는 세포이므로 세포분열과정중의 어떠한 기전과 세포독성과 관계가 있을 것으로 생각된다.

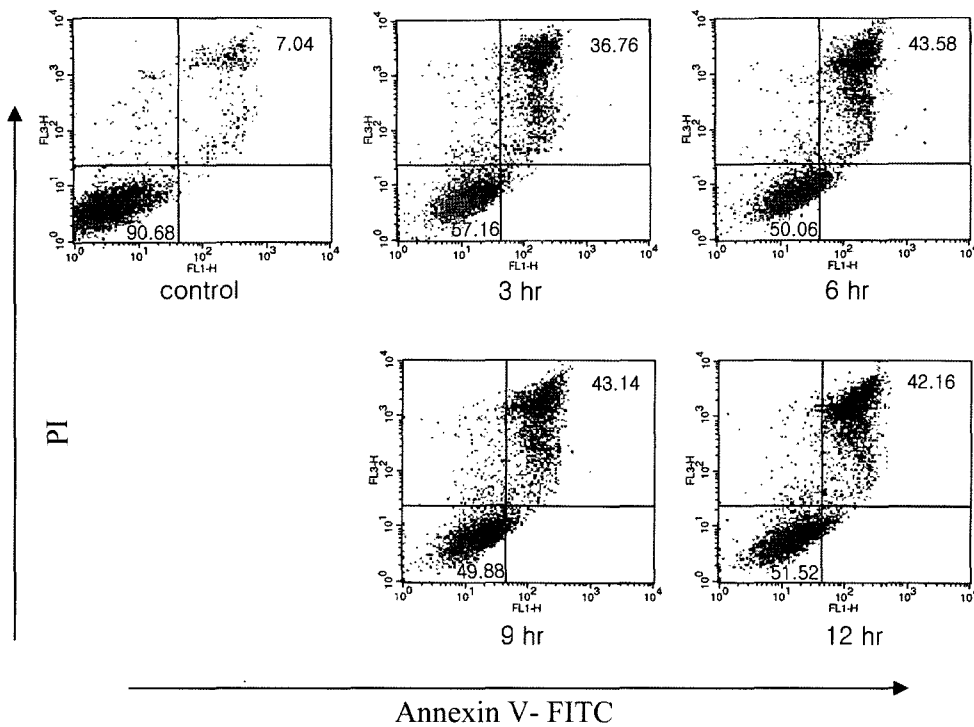
#### 세포분열속도와 TALP-32의 세포독성

세포분열 속도와 TALP-32의 세포독성의 관계를 살펴보기 위해 세포분열 속도가 느린 Hep3B세포에서 세포독성을 조사해보았다. Hep3B 세포는 1세대가 7일 정도 되는 비교적 세포분열 속도가 느린 세포이다. Hep3B 세포를  $5 \times 10^3$ /96 well로 18시간 동안 배양한 후 20  $\mu$ M의 TALP-32를 처리하고 3, 6, 9, 12시간 동안 배양한 후 MTT assay를 통해 세포독성을 살펴본 결과, 각 시간에 HeLa세포에서 59, 39, 24, 18%의 생존률을 보인 반면 Hep3B세포에서는 85, 75, 75, 77%의 생존률을 보였다(Fig. 8). 이는 TALP-32는 세포분열이 활발하지 않은 대부분의 인체 내 정상 세포에는 독성이 약하여 항암제로서의 개발 가능성을 시사하는 결과이다.

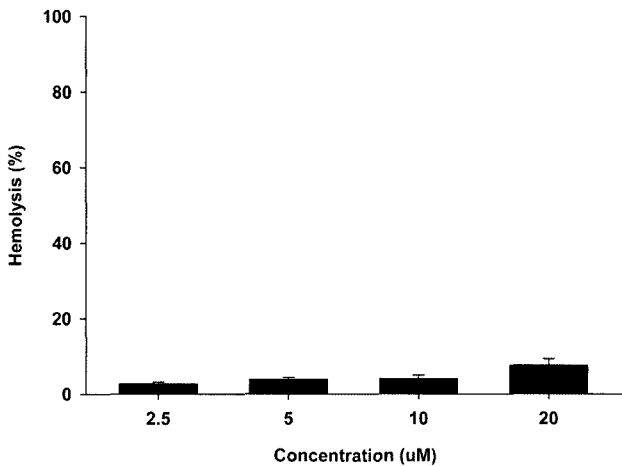
#### 고 찰

본 실험에서 인체 자궁경부암 세포주인 HeLa 세포에 TALP-32가 미치는 영향을 검색해 본 결과 necrosis를 통해 세포사멸을 유도함을 알 수 있었다.

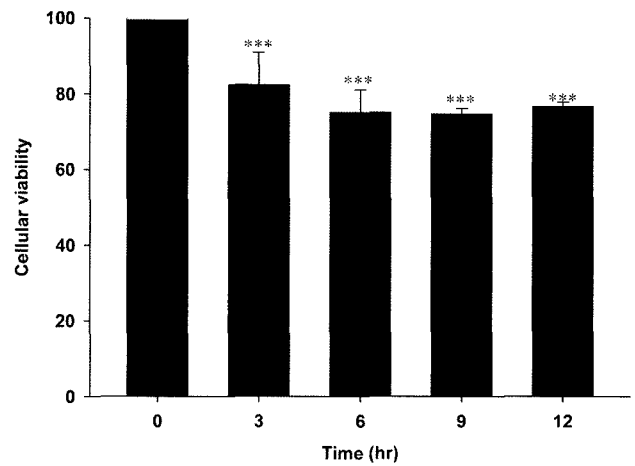
세포사멸은 크게 necrosis와 apoptosis로 나뉜다. 그 중 apoptosis는 조절 가능한, 에너지 의존적인 그리고 염증반응(inflammation)이 일어나지 않는 과정으로 요약되며, necrosis는 그와 반대되는 즉 조절이 불가능하며 에



**Fig. 6.** Annexin V/PI staining for determination of necrosis. Flow cytometry was performed after double-staining of HeLa cells, following treatment with 20  $\mu$ M of TALP-32. Cells negative for Annexin V and PI are considered viable, cells staining positive for annexin V and negative for PI are considered apoptotic, while cells staining positive both annexin V and PI are considered necrotic.



**Fig. 7.** Effect of TALP-32 on plasma membrane of erythrocyte. 2% RBC in PBS was treated with various concentration of TALP-32 for 12 hr.



**Fig. 8.** Cytotoxicity of TALP-32 on Hep3B cells. Percentage of cellular viability after 20  $\mu$ M of TALP-32 treatment for the indicated times. \*\*\* Significant difference at  $P < 0.001$  level compared with 0 hr group.

너지가 고갈 되었을 때 일어나는 염증반응을 유발하는 세포사멸의 형태로 요약된다(Kanduc *et al.*, 2002).

TALP-32에 의한 세포사멸은 전자현미경 관찰 결과에서 보듯 결과적으로 세포막이 완전히 파열되었으며, 세포 내 소기관들 또한 그 형태를 잃었다. 이는 전형적인 necrotic

cell death의 형태이며, annexin V/PI 염색결과에서 다시 한번 확인할 수 있었다. 즉, apoptotic region이라고 할 수 있는 annexin V 단독 염색된 세포수의 증가 없이 necrotic region인 annexin V와 PI가 함께 염색된 세포의 수가 증가한 것이 그 증거이다. 그 뿐 아니라 대부분의

apoptosis과정 중의 중간 물질인 caspase가 관여하지 않는 것으로 apoptosis를 배제시킬 수 있었다. 따라서 TALP-32는 HeLa 세포에 대해서 necrosis를 통해 독성을 유도하리라는 것을 알 수 있었다.

TALP-32를 이용해 용혈능을 살펴보았을 때 20  $\mu$ M의 농도에서 8% 정도의 적혈구만 파괴되었고, HeLa세포와 Hep3B세포에서 독성을 살펴보았을 때 각 시간에 따라 큰 차이를 보였다. HeLa세포는 세포주기가 24시간인 반면에 적혈구는 분열을 하지 않으며 Hep3B는 7일 정도의 주기를 갖는다. 또한 현미경 관찰결과 몇 시간의 차이를 두고 세포가 파괴되는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 세포분열 속도와 TALP-32의 세포독성이 어느 정도 연관성이 있음을 시사한다. 인체 내 대부분의 세포들은 암세포에 비해 현저하게 느린 세포분열 속도를 갖거나 거의 분열을 하지 않는 특성을 가지고 있다. 이에 세포분열속도에 따라 독성의 차이를 보인다면 항암제로서의 개발도 가능하리라 생각된다.

앞으로의 연구에서는 TALP-32가 HeLa세포에 necrosis를 일으키는 정확한 신호 전달 기전을 밝히고 TALP-32 민감성 암세포에 대한 연구와 *in vivo*에서 항암제로서의 활성을 살펴볼 필요가 있을 것이다.

## 감사의 글

이 논문은 2004년도 충남대학교 학술연구비의 지원에 의하여 연구되었음.

## 참고문헌

- Choi, B.-H. and Hwang, B.-D. (1998): Purification and Characterization of Tubulin Polymerization Stimulating Protein-32 from Human Term Placenta.
- Do, T.N., Rosal, R.V., Drew, L., Raffo, A.J., Michl, J., Pincus, M.R., Friedman, F.K., Petrylak, D.P., Cassai, N., Szmulewicz, J., Sidhu, G., Fine, R.L. and Brandt-Rauf, P.W. (2003): Preferential induction of necrosis in human breast cancer cells by a p53 peptide derived from the MDM2 binding site. *Oncogene*, **22**, 1431-1444.
- Edinger, A.L. and Thompson, C.B. (2004): Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, **16**, 663-669.
- Fernandez, R.C. and Weiss, A.A. (1996): Susceptibilities of Bordetella pertussis strains to antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **40**, 1041-1043.
- Fischer, D., Li, Y., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J. and Kissel, T. (2003): *In vitro* cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*, **24**, 1121-1131.
- Hwang, B.D., Kwak, S.T., Kweon, G.R. and Lim, K. (1995): Promotion of microtubule assembly *in vitro* by a novel 35-kDa protein purified from human term placenta. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **208**, 1174-1180.
- Kanduc, D., Mittelman, A., Serpico, R., Sinigaglia, E., Sinha, A.A., Natale, C., Santacroce, R., Di Corcia, M.G., Lucchese, A., Dini, L., Pani, P., Santacroce, S., Simone, S., Bucci, R. and Farber, E. (2002): Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *International Journal of Oncology*, **21**, 165-170.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, **26**, 239-257.
- Kim, S., Kim, S.S., Bang, Y.J., Kim, S.J. and Lee, B.J. (2003): *In vitro* activities of native and designed peptide antibiotics against drug sensitive and resistant tumor cell lines. *Peptides*, **24**, 945-953.
- Kitanaka, C. and Kuchino, Y. (1999): Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death and Differentiation*, **6**, 508-515.
- Koopman, G., Reutelingsperger, C.P., Kuijten, G.A., Keehnen, R.M., Pals, S.T. and van Oers, M.H. (1994): Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, **84**, 1415-1420.
- Korzeniewski, C. and Callewaert, D.M. (1983): An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, **64**, 313-320.
- Nguyen, H.N. and Nordqvist, S.R. (1999): Chemotherapy of advanced and recurrent cervical carcinoma. *Seminars in Surgical Oncology*, **16**, 247-250.
- Papo, N., Braunstein, A., Eshhar, Z. and Shai, Y. (2004): Suppression of human prostate tumor growth in mice by a cytolytic D-, L-amino Acid Peptide: membrane lysis, increased necrosis, and inhibition of prostate-specific antigen secretion. *Cancer Research*, **64**, 5779-5786.
- Papo, N. and Shai, Y. (2003): New lytic peptides based on the D,L-amphipathic helix motif preferentially kill tumor cells compared to normal cells. *Biochemistry*, **42**, 9346-9354.
- Parkin, D.M., Pisani, P. and Ferlay, J. (1999): Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **49**, 33-64, 31.
- Serkies, K. and Jassem, J. (2005): Chemotherapy in the primary treatment of cervical carcinoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **54**, 197-208.
- Takahashi, M., Kataoka, S., Kobayashi, E., Udagawa, Y., Aoki, D., Oie, S., Kozu, A. and Nozawa, S. (1999): Differences in apoptosis induced by anticancer drugs in sublines (SKG-3a, SKG-3b) from a human uterine cervical epidermoid carcinoma. *Oncology Research*, **11**, 71-75.
- Vaara, M. (1992): Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological Reviews*, **56**, 395-411.