약학회지 제41권 제5호 629~637(1997)
Yakhak Hoeji Vol. 41, No. 5

종양괴사인자(TNF)가 ME-180 사람 경부 암종세포에서 종양 발생 유전자의 발현에 미치는 영향

한형미# · 김형수 · 손경희 · 최경백 · 정승태 · 김진호 · 이병무* · 김주일
식품의약품안전본부 독성부 면역독성과, *성균관대학교 약학대학

(Received July 4, 1997)

Effect of Tumor Necrosis Factor-α(TNF) on the Expression of Oncogenes in ME-180 Human Cervical Carcinoma Cells

Hyung-Mee Han#, Hyung Soo Kim, Kyung Hee Sohn, Kyoung Baek Choi, Seung Tae Chung, Jin Ho Kim, Byung Moo Lee* and Jooil Kim
Immunotoxicology Division, Department of Toxicology, National Institute of Toxicological Research, Korea Food and Drug Administration, 5 Nokbun-Dong, Eunpyung-Ku, Seoul, 122-020, Korea
**College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea*

Abstract—Tumor necrosis factor-α (TNF) induced a cytotoxic response in ME-180 cervical carcinoma cells *in vitro*. This cytotoxic response was accompanied by a temporal series of mitogenic stimuli : increased c-fos, c-jun and jun-B expression. Depletion of protein kinase C (PKC) by exposure of ME-180 cells to 100 ng/ml phorbol myristate acetate (PMA) for 24 hours almost completely abolished TNF-mediated increase in these signals, indicating that a PKC-dependent pathway is involved in TNF-mediated increases in the expression of c-fos, c-jun and jun-B. Characteristics of TNF receptors after exposure to 100 ng/ml PMA or 24 hours were not altered, suggesting that diminished induction of these oncogenes by TNF after PMA treatment is not due to any changes at the receptor level. To examine whether a PKC-dependent pathway is involved in TNF-mediated cytotoxicity in ME-180 cells, cytotoxicity was measured after depletion of PKC. No apparent changes in cytotoxicity after PKC depletion suggest that a PKC-dependent pathway is not involved in TNF-mediated cytotoxicity. Furthermore, results from cytotoxicity tests after exposure to staurosporine (PKC inhibitor) did not show any changes in the TNF-mediated cytotoxicity, confirming that a PKC-dependent pathway is not involved in this process. These data indicate that 1) TNF induces expression of c-fos, c-jun and jun-B oncogenes via a PKC-dependent pathway and 2) PKC-dependent expression of these three oncogenes by TNF may not be involved in TNF-mediated cytotoxicity in ME-180 cells.

Keywords □ TNF-α, oncogene expression, protein kinase C, cytotoxicity.

Tumor necrosis factor-α(TNF, 종양괴사인자)는 활성화된 대식세포에 의하여 주로 생성되며 세균감염이나 악성종양 발생시 숙주의 반응에 있어서 중요한 역할을 한다.[1-3] TNF는 대식세포(macrophage), 섬유아세포 (fibroblast) 및 혈관내피세포(endothelial cell) 등에 작용하여 면역반응 및 국소적인 염증반응 등을 매개하며, 또한 각종 감염증, 악성종양 등에서 악액질(cachexia)을 일으키기도 한다.

TNF는 tumor mass의 모세혈관벽에 염증반응을 유발함으로써 tumor mass의 출혈성 괴사를 일으키는 물질로 맨 처음 발견되었다.[1-3] 또한 TNF는 이와 같은 모세혈관벽에 염증반응을 일으키는 작용이외에도 암세포에 직접 작용하여 어떤 암세포에서는 독성을 유발하

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-380-1811~3 (팩스) 02-352-9446

여 죽이기도 하고 또한 다른 암세포에서는 암세포의 성장을 억제하기도 한다. 그러나 TNF는 모든 암세포에서 다 효력이 있는 것은 아니고 다른 일련의 암세포들에 대하여는 TNF가 세포독성작용을 나타내지 않는 것으로 알려져 있다.[4] 따라서 TNF의 면역치료 효과를 올바로 이해하기 위해서 암세포에 대하여 독성을 나타내는 기전을 올바로 이해하는 것이 중요하다.

TNF가 종양 발생 유전자의 발현에 미치는 영향에 대하여는 연구자에 따라 또는 연구에 사용된 세포종에 따라 엇갈린 보고들이 되어 오고 있다. Katakami 등[5]과 Kronke 등[6]은 TNF에 의한 c-myc 유전자의 발현 억제가 TNF에 의한 세포분열 억제와 같이 일어난다는 것을 보고하였고, 이와는 대조적으로 Reem[7] 등은 TNF에 의한 c-myc 유전자 발현의 증가 및 proliferation 촉진을 보고하였다. 한편 Manchester 등[8]은 TNF에 의하여 세포독성을 나타내는 ME-180 cell에서도 c-myc 및 c-fos 등의 종양 발생 유전자의 발현이 증가되는 현상이 나타남을 보고하였다. 본 연구에서는 TNF에 의한 종양 발생 유전자의 발현이 어떠한 경로를 통하여 일어나는지, 또한 이러한 종양 발생 유전자의 발현이 TNF에 의한 세포독성에 관련이 있는지를 밝히고자 하였다.

실험방법

실험재료 - 재조합 사람 TNF는 한효과학기술원(Daejeon, Korea)으로부터 공급받았으며, ME-180 사람 경부 암종세포는 American Type Culture Collection(Washington, U.S.A.)으로부터 구입하였다. 본 연구에서 사용된 ME-180 cell의 doubling time은 24시간 정도이고, 모든 실험은 cell은 confluency를 이룬 상태가 아닌 세포분열이 왕성하게 일어나는 상태에서 수행되었다. c-fos, c-jun, jun-B, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 등의 probe들도 American Type Culture Collection(Washington, U.S.A.)으로부터 구입하였다. [alpha-^{32}P]-dCTP(3000 Ci/mmol) 및 [^{125}I]-TNF(1400~1500 Ci/mmol)는 Amersham Corp.(Buckinghamshire, England)으로부터 구입하였으며 그 외 다른 시약들의 구입처는 다음과 같다. Qiagen Plasmid Midi Kit(Qiagen Inc., California, U.S.A.), Qiaex II Agarose Gel Extraction Kit(Qiagen Inc., California, U.S.A.), TRI reagent kit(Molecular Research Center Inc., Ohio, U.S.A.), Megaprime DNA labelling kit (Amersham Corp., Buckinghamshire, England), Nytran membranes(Schleicher and Shuell, Germany). 그 외 다른 시약들은 표준시약 제조회사로부터 최상급의 시약을 구입하여 사용하였다.

RNA 분리 - ME-180 cell로부터 total RNA를 TRI reagent kit을 사용하여 분리하였다. 간략히 설명하면 지름이 10 cm인 culture dish에 1×10^6개의 세포를 넣어 배양하였다. 48시간 후 각 dish당 1 m*l*의 TRI reagent를 넣어 균질화 시켰다. 균질액을 5분간 상온에 보관한 다음 0.2 m*l* chloroform을 넣고 섞은 후 15분간 상온에서 보관하였다. 12,000 g, 4°C에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 0.5 m*l* isopropanol을 가한 다음 다시 상온에서 10분간 보관하였다. 12,000 g, 4°C에서 15분간 원심분리하여 RNA 결정을 형성시킨 다음 RNA 결정을 다시 한 번 1 m*l* 75% ethanol로 세척한 후 상온에 10분간 방치하여 ethanol을 증발시킨 후 0.1%의 diethylpyrocarbonate를 함유한 물에 녹여 -20°C에 보관하였다.

Northern Hybridization - 20 μg RNA를 2% formaldehyde를 함유한 1% agarose gel를 사용하여 분리한 다음 capillary action을 이용하여 Nytran membrane에 전이하였다. Nytran membrane은 prehybridization solution (50% formamide, 0.1% polyvinylpyrrolidine, 0.1% bovine serum albumin, 0.1% Ficoll 400, 2.5% sodium dodecyl sulfate, 0.05M phosphate buffer pH 7.0, 0.25 mg/m*l* salmon sperm DNA)으로 적셔서 42°C에서 3시간 동안 prehybridization을 실시하였다. c-fos, c-jun, jun-B 및 GAPDH의 cDNA fragment를 template로 하여 Megaprime DNA labelling kit을 사용하여 random priming에 의하여 labelled probe를 제조하였다. [alpha-^{32}P]-dCTP로 label된 probe를 hybridization solution(50% formamide, 0.02% polyvinylpyrrolidine, 0.02% bovine serum albumin, 0.02% Ficoll 400, 5X SSC, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 0.05M phosphate buffer pH 7.0, 0.25 mg/m*l* salmon sperm DNA)과 혼합하여 42°C에서 24시간 동안 반응시켰다. Membrane을 low stringency의 세척액으로부터 high stringency의 세척액(final stringency : 0.1X SSC, 1% SDS, 50°C, 1h)을 사용

하여 차례로 세척한 다음 -70°C에서 2~5일 동안 autoradiography를 실시하였다.

[^{125}I]-TNF Binding - 48 well plate의 각 well당 3×10^4개의 cell을 배양하였다. 24시간 후에 100 ng/ml phorbol myristate acetate(PMA) 혹은 vehicle (media)로 처치한 다음 적절한 시간에 수용체 결합시험을 실시하였다. Binding buffer의 조성은 1 nM [^{125}I]-TNF, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.001% aprotinin, 0.001% leupeptin 및 0.5% bovine serum albumin을 함유한 Hank's balanced salt solution (HBSS)이었다. 4°C에서 4시간 동안 배양한 다음 세포를 차가운 HBSS로 2번 세척한 다음 남아 있는 방사능의 양을 1N NaOH를 사용하여 회수하여 γ-counter로 측정하였다. 비특이적 결합량은 10^{-7} M TNF하에서 잔존하는 방사능의 양으로 정의하였다. Cold saturation experiment의 경우는 0.1 nM [^{125}I]-TNF를 함유한 binding buffer에 점진적으로 많은 양의 cold TNF를 가하여 실험을 실시하였으며 그 외의 다른 사항은 상기에 서술한 바와 같은 방법으로 실험하였다.

세포독성시험 - 96 well plate의 각 well당 5×10^3개의 ME-180 cell을 넣은 다음 24시간동안 배양하여 monolayer를 형성시켰다. 배지를 교환한 후 100 ng/ml PMA로 24시간 동안 처치한 다음 TNF를 가하여 48시간 후에 cell viability를 측정하였다. Cell viability 측정을 위하여는 일반적으로 많이 사용되고 있는 시험법중의 하나인 MTT를 이용한 시험법을 사용하였는데, MTT 시험법은 살아 있는 세포의 mitochondrial dehydrogenase의 활성정도를 측정함으로써 cell viability를 측정하는 시험법으로 알려져 있다. 간략히 서술하면 5 mg/ml MTT 20 μl를 각 well에 넣어 37°C에서 4시간 동안 배양하여 침전물을 형성시켰다. 상등액을 제거하고 dimethylsulfoxide 100 μl를 넣은 다음 10분간 잘 혼합하여 침전물을 용해시킨 후 560 nm에서 optical density를 측정하였다. Cell viability의 정도는 control cell에 대한 percent로 하였다. Staurosporine을 사용한 실험에서는 cell을 넣은 다음 24시간 후에 배지를 교환한 다음 또 다시 24시간 후 3nM staurosporine으로 처치하였다. 처치 2시간 후에 TNF를 가하여 48시간 배양한 다음 MTT assay를 사용하여 cell viability를 측정하였다.

실험결과 및 고찰

TNF의 여러 가지 작용들 중 가장 관심을 끄는 작용은 암세포에 대하여 세포독성을 나타내는 작용이라 할 수 있다. 그러나 TNF가 모든 암세포에 대하여 세포독성을 나타내는 것은 아니고 세포에 따라서는 번식정지 또는 무영향, 심지어는 번식증가 현상을 나타내기도 한다.[9] TNF를 암치료에 올바로 사용하기 위하여는 이러한 TNF가 세포성장에 미치는 여러 가지 다른 효과를 제대로 이해하는 것이 필수적이라 하겠다. 본 실험에서는 사람 경부 암종세포인 ME-180 cell을 사용하여 시험을 실시하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 TNF는 용량의존적인 양상으로 세포독성을 나타내었음을 알 수 있었다.

TNF에 의하여 유도된 세포성장 정지작용은 HL-60 cell에서 c-myc 유전자의 발현억제와 동시에 일어남이 밝혀져 있다.[5-6] 본 연구자들은 ME-180 cell에서의 TNF에 의한 세포독성도 HL-60 cell의 경우와 마찬가지로 c-fos, c-jun 및 jun-B 등의 종양 발생 유전자 들의 발현억제와 같이 일어나는지의 여부에 대하여 시험하였다. 이러한 실험결과 예상했던 바와는 다르게 TNF는 이들 종양 발생 유전자 들의 발현을 오히려 증가시킴을 알 수 있었으며, Fig. 2에 나타난 바와 같이

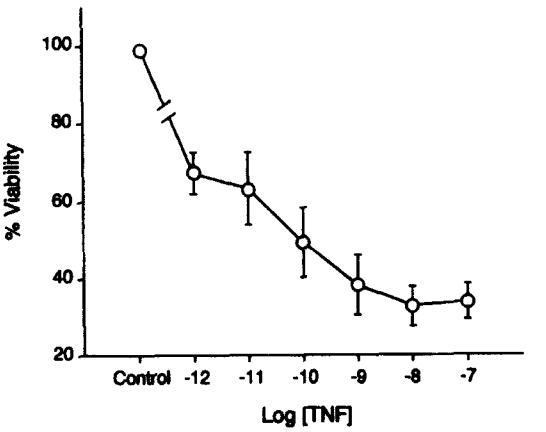

Fig. 1 — Effect of TNF on the viability of ME-180 cells. 5×10^3 ME-180 cells were plated in 96-well tissue culture plates and media were changed after 24 hours. One day later, various concentrations (final concentration : 10^{-12}~10^{-7}M) of TNF were added to each well and 48 hours later cell viability was measured as described in "Experimental Procedures". Data shown are mean±standard deviation of 3 separate experiments each performed in triplicate.

TNF는 c-fos, c-jun 및 jun-B mRNA의 level을 증가시켰다. c-fos의 경우는 TNF 처치 30분 후에 최고에 도달하였으며 2시간 후에는 TNF 처치 전의 상태로 되돌아가고 c-jun 및 jun-B의 경우는 1시간 후에 최고에 도달함을 알 수 있었다.

TNF의 신호전달 기작에 대하여는 nuclear factor-kB activation, protein phosphorylation 및 phospholipase activation 등의 여러 가지 측면에서 연구되어 오고 있는데 그 중 TNF의 action과 관련이 있는 것으로 추정되는 protein kinase로서는 Ser/Thr protein kinase, MAP2 kinase 등이 있으며[4], 이들 kinase 이외에 protein kinase C(PKC)도 TNF의 작용과 관련이 있는 것으로 제안되었다. Brenner[10] 등은 TNF에 의한 collangenase 유전자의 발현이 PKC가 관련된 경로를 경유하여 일어난다고 하였고, 또한 Johnson과 Baglioni[11]도 melanoma cell에서 TNF에 의하여 나타나는 plasminogen activator inhibitor-type 2의 유전자발현 및 합성에 PKC가 관여한다고 하였다. 이들 이외에도 Munoz-Fernandez[12] 등과 Zachow와 Terranova[13]도 PKC-dependent pathway가 TNF의 작용에 관련이 있다고 보고하였다. 또한 PKC는 종양 발생 유전자 들을 활성화 시키는 것으로도 잘 알려져 있는데 본 연구자들은 이와 같은 지금까지의 연구보고를 근간으로 하여 ME-180 cell에서의 TNF에 의한 c-fos, c-jun, jun-B 등의 종양 발생 유전자 들의 발현이 PKC-dependent pathway에 의하여 일어나는 가를 규명하고자 하였다.

이와 같은 실험을 위하여 먼저 cell에 존재하는 PKC를 고갈시키고자 강력한 PKC activator인 PMA로 24시간 배양하였다.[14] 24시간 배양 후 PKC가 고갈되었는지의 여부를 확인하기 위하여 ME-180 cell을 다시 100 ng/ml PMA로 처치한 다음 c-fos, c-jun 및 jun-B 유전자의 발현정도를 측정하였다. Fig. 3의 Panel A에 나타난 바와 같이 PMA는 TNF와 유사한 양상으로 이들 세가지 종양 발생 유전자 들의 발현

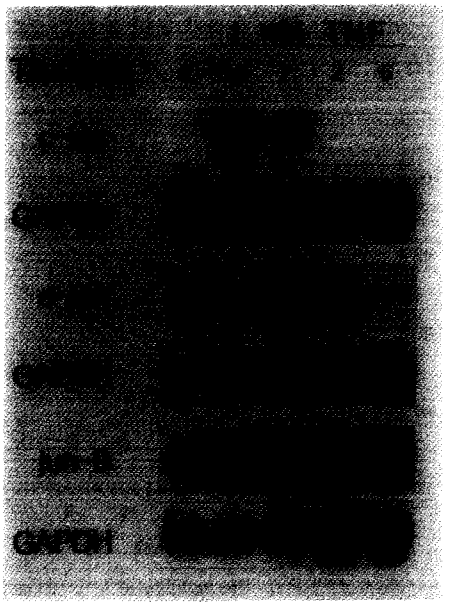

Fig. 2 — Effect of TNF on the expression of c-fos, c-jun and jun-B mRNAs. ME-180 cells were exposed to 1 nM TNF for the indicated times, after which total RNA was isolated. Northern blot analysis was performed as described in "Experimental Procedures". Labelled GAPDH cDNA was used to check the loading of each lane of the gel.

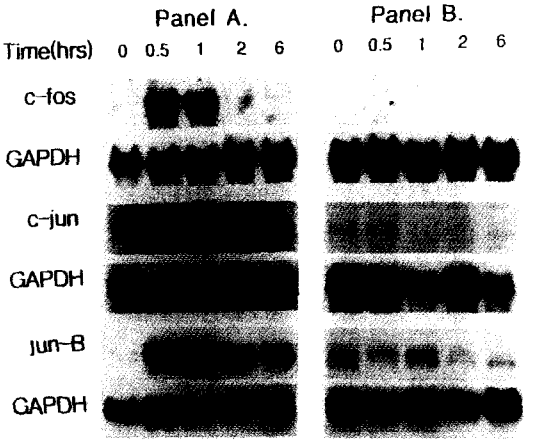

Fig. 3 — Effect of PMA pretreatment on the PMA-induced expression of c-fos, c-jun and jun-B. Panel A. ME-180 cells were exposed to 100 ng/ml PMA for the indicated times, after which total RNA was isolated. Northern blot analysis was performed as described in "Experimental Procedures". Labelled GAPDH cDNA was used to check the loading of each lane of the gel. Panel B. 100 ng/ml PMA was added to cells. After 24 hours, cells were exposed to additional 100 ng/ml PMA for the indicated times, after which total RNA was isolated. Northern blot analysis was performed as described in "Experimental Procedures". Labelled GAPDH cDNA was used to check the loading of each lane of the gel.

을 증가시켰다. 그러나 100 ng/ml PMA로 24시간 처치 후 다시 PMA로 처치했을 경우에는 PMA에 의한 이들 종양 발생 유전자 들의 발현이 모두 사라졌음을 알 수 있었다(Fig. 3, Panel B). 이상의 실험결과 100 ng/ml PMA로 24시간동안 배양함으로써 이들 종양 발생 유전자 들의 발현에 관여하는 PKC를 완전히 고갈시켰음을 알 수 있었다.

다음 단계 실험으로서 TNF에 의한 이들 세 종양 발생 유전자 들의 발현이 PKC가 관련된 경로에 의하는 것인지를 시험하였다. ME-180 cell을 먼저 PMA로 처치하여 PKC를 모두 고갈시킨 다음 TNF에 의한 c-fos, c-jun 및 jun-B 유전자의 발현정도를 측정하였다. Fig. 4에 나타난 바와 같이 PKC 고갈시 TNF에 의한 이들 세가지 종양 발생 유전자 들의 발현은 현저하게 감소하였으며 이러한 실험결과는 TNF에 의한 이들 종양 발생 유전자 들의 발현이 PKC를 경유한 경로를 통하여 일어난다는 것을 보여주고 있다고 할 수 있다. 그러나 Fig. 4에 있는 바와 같이 PKC를 고갈시킨 다음에도 TNF에 의하여 이들 세가지 종양 발생 유전자 들이 미약하나마 발현되었음을 알 수 있었으며, 이와 같은 실험결과는 TNF에 의한 c-fos, c-jun 및 jun-B 유전자의 발현에 PKC를 경유한 경로이외에도 PKC를 경유하지 않는 경로도 존재한다는 것을 시사하고 있다.

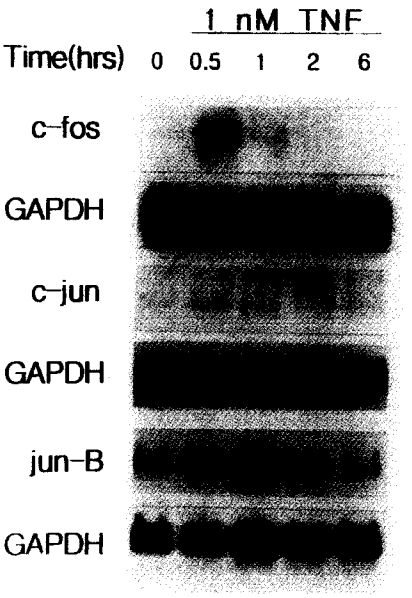

Fig. 4 — Effect of TNF on the expression of c-fos, c-jun and jun-B mRNAs in PMA-pretreated cells. 100 ng/ml PMA was added to ME-180 cells. After 24 hours, cells were exposed to 1 nM TNF for the indicated times, after which total RNA was isolated. Northern blot analysis was performed as described in "Experimental Procedures". Labelled GAPDH cDNA was used to check the loading of each lane of the gel.

PKC activator로 세포를 처치하면 TNF 수용체에 변화를 일으킨다는 보고가 여러 연구자들에 의하여 되어 오고 있다.[15 19] 이들 연구자들은 human HeLa cell, U937 human leukemia cell, human T lymphocyte 등 여러 가지 다른 세포 들을 사용하였으며, 대체적으로 이들 세포들을 PKC activator로 처치시 2시간 이내에 TNF 수용체의 affinity 및 숫자가 감소한다는 결과를 발표하였다. 따라서 본 연구자들이 관찰한 PMA 처치후 TNF에 의한 종양 발생 유전자 들의 발현이 감소하는 실험결과에 대한 한가지 가능한 해석은 PMA처치 후에 TNF 수용체가 감소하였기 때문이라고 할 수 있겠다. 이와 같은 가능성에 대하여 시험하기 위하여 ME-180 cell을 100 ng/ml PMA로 처치한 후 [^{125}I]-TNF binding capacity를 측정하였다. Fig. 5에 나타난 바와 같이 PMA 처치 30분 이내에 [^{125}I]-TNF binding capacity가 현저하게 감소하였고(60±

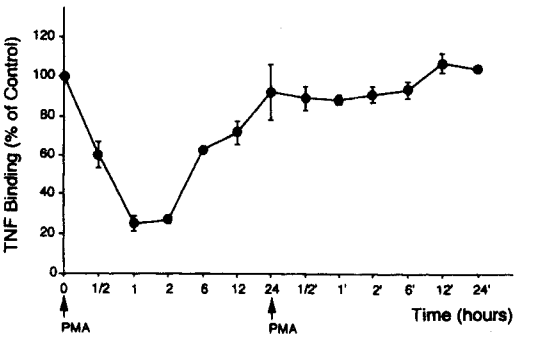

Fig. 5 — Effect of PMA on [^{125}I]-TNF binding to ME-180 cells. ME-180 cells were plated in 48-well plates (3×10^4 cells/well). After incubation for 1 day, cells were treated with 100 ng/ml PMA or vehicle(HBSS). At the indicated times, binding assay was performed as described in "Experimental Procedures". After 24 hours, cells were treated with additional 100 ng/ml PMA or vehicle and binding assay was performed at the indicated times. Binding assay in vehicle-treated cells was conducted at each time point in parallel. Binding data were normalized based on the data in control cells and plotted as a percentage of control against time. Data shown are mean ± standard deviation of 3 separate experiments.

Table I — Characteristics of TNF receptors after treatment with 100 ng/ml PMA for 24 hours

Group	K_d (nM)	B_{max} (pM)
vehicle	16.1±7.2	24.3±9.2
PMA	10.5±5.7	17.0±11.1

Data shown are mean±standard deviation of 4 experiments each performed in triplicate.

7% of control), 이와 같은 감소는 1시간 후에 최고를 나타내었으며(25±4% of control) 6시간부터는 회복하기 시작하여 24시간 후에는 완전히 회복됨을 알 수 있었다(92±14% of control). 24시간 후 다시 100 ng/ml PMA로 처치하였을 경우 [^{125}I]-TNF binding capacity는 PMA로 처치하지 않은 세포와 비교하여 아무런 차이가 없었으며, 이와 같은 실험결과는 본 연구자들이 사용한 PKC를 고갈시키는 protocol에 의하여 PKC가 실제로 완전히 고갈되었음을 다시 한 번 확인시켜 주었다.

PMA 처치 후의 TNF 수용체의 특성을 규명하기 위하여 100 ng/ml PMA로 24시간 처치한 다음 cold saturation experiment를 수행하여 TNF 수용체에 대하여 Scatchard analysis를 하였다. Table 1에 있는 바와 같이 vehicle(media) 처치시와 비교하여 PMA 처치시는 TNF 수용체의 특성에 아무런 영향을 미치지 않았다(vehicle-treated, Kd : 16.1±7.2 nM, B_{max} : 24.3±9.2 pM; PMA-treated, Kd : 10.5±5.7 nM, B_{max} : 17.0±11.1 pM). 따라서 이와 같은 시험결과는 PKC를 고갈시킨 후의 TNF에 의한 종양발생 유전자들의 발현 감소는 TNF 수용체의 감소에 의한 것이 아니고 수용체 이후 단계의 변화에 의한 것임을 시사하고 있다.

다음 실험에서는 이와 같은 PKC를 통한 경로가 TNF에 의한 ME-180 cell에서의 궁극적인 작용인 세포독성에 어떠한 영향을 미치는가에 대하여 시험하였다. 지금까지의 실험과 마찬가지로 100 ng/ml PMA로 ME-180 cell을 24시간 처치한 다음 TNF에 의한 세포독성을 측정하였다. Fig. 6에 나타난 바와 같이 PMA 처치에 의한 PKC 고갈은 TNF에 의한 ME-180 cell의 세포독성에 아무런 영향을 미치지 않았다. 이와 같은 실험결과를 다시 한 번 확인하기 위하여 PKC 저해제로 알려진 3 nM staurosporine(Fig. 7)으로 처치후 TNF에 의한 ME-180 cell에서의 세포독성을 측정한 결과 역시 세포독성에 아무런 영향을 미치지 않았음을 알 수 있었다. 따라서 이상의 실험결과(Fig. 6~7)를 종합해 보면 PKC를 경유하는 경로는 아마도 TNF에 의

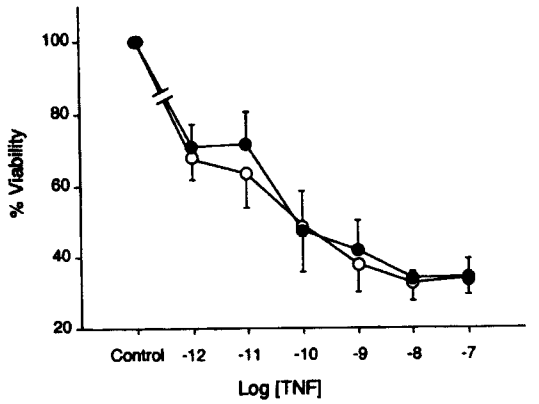

Fig. 6 — Effect of PKC depletion on TNF-mediated cytotoxicity. ME-180 cells were plated in 96 well plates (5×10^3 cells/well). After 24 hours, cells were treated with 100 ng/ml PMA or vehicle (media). 24 hours later, various concentrations of TNF were added to the cells and incubated. After 48 hours, cytotoxicity was measured as described in "Experimental Procedures". Data shown are mean±standard deviation of 3 separate experiments each performed in triplicate. ○ : Vehicle, ● : PMA.

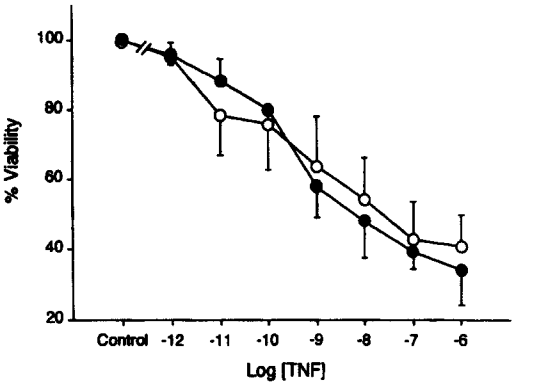

Fig. 7 — Effect of staurosporine on the TNF-mediated cytotoxicity. ME-180 cells were plated in 96 well plates(5×10^3 cells/well). After 24 hours, media were changed. 24 hours later, cells were treated with 3 nM staurosporine or vehicle (media) and various concentrations of TNF were added to the cells. After 48 hours, cytotoxicity was measured as described in "Experimental Procedures". Data shown are mean±standard deviation of 3~5 separate experiments each performed in triplicate. ○ : Vehicle, ● : Staurosporine.

한 ME-180 세포에서의 세포독성에 관여하지 아니하는 것으로 생각되고, 또한 PKC-dependent pathway를 경유하여 일어나는 것으로 관찰된 이 cell에서의 c-fos, c-jun 및 jun-B 유전자의 발현은 세포독성이외의 다른 작용에 관여하는 것으로 생각된다.

TNF의 항암치료에 있어서의 문제점은 높은 용량의 TNF에 의하여 유발되는 여러 가지 부작용들과 각종 암세포의 TNF에 대한 감수성이 일정치 않다는 것이다.[4] 실제로 어떤 암세포에 있어서는 TNF가 세포독성 작용이 아닌 성장 정지 작용만을 나타내기도 하며 또한 암세포의 종류에 따라서는 TNF에 반응하지 않는 것도 있다. 이러한 TNF에 대한 반응성을 미리 예측하기는 어려우며 암세포의 조직적인 기원과의 관련성은 없는 것으로 생각되어진다. 따라서 TNF의 신호전달 기전을 밝히는 것은 항암치료에 있어서 TNF의 유용성을 높일 수 있다고 생각되며, 다른 약물과의 병용투여 및 보다 더 선택적으로 작용하는 변이형 TNF 등의 개발에도 유용하다고 사료된다.

본 논문에서는 ME-180 cell에 있어서 TNF의 신호전달 경로에 대하여 연구한 결과 TNF는 PKC를 경유한 경로에 의하여 c-fos, c-jun, jun-B 등의 종양 발생 유전자 들의 발현을 증가시키며 이러한 PKC를 경유한 경로는 ME-180 cell에서의 TNF에 의한 세포독성과는 직접적인 관련은 없는 것을 보여주었다. TNF의 작용에 있어서 PKC의 관련 여부는 오랫동안 많은 연구자들의 연구대상이었는데 실험에 사용된 세포와 어떤 반응을 측정하는 가에 따라서 TNF가 PKC를 경유한 경로를 통하여 작용을 나타낸다고 한 연구보고도 있고[10-12], 또한 TNF에 의한 interleukin-1 수용체 binding capacity 감소나[20] TNF에 의한 nuclear factor kB의 activation[21]등은 PKC와 관련이 없다는 연구보고도 있다.

본 논문에서 관찰된 TNF에 의한 c-fos, c-jun, jun-B 등의 종양 발생 유전자 들의 발현증가는 PKC를 경유한 경로에 의하여 대부분 일어난다고 생각되어진다. 그리고 TNF에 의한 이들 종양 발생 유전자 들의 발현증가는 ME-180 cell에서의 세포독성을 일으키는데 관여하지 않고 다른 작용에 관여할 것으로 생각된다. 그러나 PKC를 완전히 고갈시킨 이후에도 TNF에 의하여 이들 종양 발생 유전자 들이 미약하게나마 발현되고 또한 이러한 경우에 TNF에 의한 세포독성은 아무런 영향을 받지않는 것으로 미루어 또 한가지 가능한 해석은 이러한 종양 발생 유전자 들이 실제로 세포독성을 일으키는데 어떤 역할을 하지만, 극소량만 발현이 되어도 TNF가 세포독성을 일으키기에 충분하기 때문에 PKC 고갈 이후에도 세포독성이 영향을 받지 않았다고 생각할 수도 있다.

본 논문에서 관찰된 PMA 처치후 30분내의 급격한 TNF binding capacity의 감소는 여러 다른 연구자들의 보고와 일치한다.[15-19] 이들 연구자들은 대부분 PMA처치후 단시간(2시간)내의 수용체 변화를 측정하였는데, 본 논문에서는 이런 단시간 처치시와는 달리 PMA로 24시간 처치하였을 경우는 untreated cell과 비교하여 TNF binding capacity가 차이가 없음을 보였으며, 이러한 실험결과는 PKC 고갈 후의 TNF에 의한 종양 발생 유전자 들의 발현감소가 PMA 처치에 의한 TNF 수용체의 변화에 의한 것이 아님을 보여주었다.

결론적으로, TNF는 ME-180 cell에 있어서 시험관내에서 세포독성을 유발하며, 이러한 세포독성은 c-fos, c-jun 및 jun-B 등의 종양 발생 유전자 들의 발현과 동시에 일어나고 이들 종양 발생 유전자 들은 대부분 PKC를 경유한 경로를 통하여 일어남이 관찰되었다. 또한 이러한 PKC를 경유한 경로를 통한 종양 발생 유전자 들의 발현은 TNF에 의한 세포독성작용에는 관련이 없는 것으로 생각되어진다.

결 론

TNF가 ME-180 cell에서 c-fos, c-jun 및 jun-B 등의 종양 발생 유전자 들의 발현에 미치는 영향 및 이들 종양 발생 유전자 들의 발현과 PKC 경로와의 관계를 규명하고 또한 PKC를 경유한 경로에의 이들 종양 발생 유전자 들의 발현과 TNF에 의한 세포독성과의 상관 관계를 규명하고자 본 연구를 수행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. TNF는 ME-180 cell에서 세포독성을 일으킴과 동시에 c-fos, c-jun 및 jun-B 등의 종양 발생 유전자 들의 발현을 유도하였다.

2. ME-180 cell에서의 TNF에 의하여 유도되는 이들 종양 발생 유전자 들의 발현은 대부분 PKC 경로를 경유하여 일어남을 확인하였다. 그러나 PKC를 경유하지 않는 경로로도 미약하나마 TNF에 의한 이들 종양 발생 유전자 들의 발현이 일어나는 것으로 생각된다.

3. PMA(100 ng/ml) 처치 30분 후부터 TNF수용체

의 binding capacity의 감소를 관찰할 수 있었으나 6시간 경과 후에는 회복하기 시작하여 24시간 후에는 완전히 회복됨을 알 수 있었다. 따라서 PMA를 사용하여 PKC를 고갈시켰을 경우에 나타나는 TNF에 의한 종양 발생 유전자 발현의 감소는 PMA가 TNF의 수용체에 대한 작용이 아닌 수용체 이후 단계의 변화에 의한 것으로 생각된다.

4. PMA 처치를 하여 PKC를 고갈시키거나 또는 PKC 저해제인 staurosporine으로 처치한 후 TNF에 의한 세포독성을 측정한 결과 이러한 처치들은 아무런 영향을 미치지 않았다.

이상의 실험결과 ME-180 cell에 있어서 c-fos, c-jun, jun-B 등의 종양 발생 유전자 들은 대부분 PKC를 경유하는 경로를 통하여 유도되며, PKC 경로를 통하여 유도되는 이들 종양 발생 유전자 들은 TNF에 의한 세포독성작용에는 관련이 없는 것으로 생각되어진다.

감사의 말씀

본 연구에 사용된 사람 재조합 TNF는 한효과학기술원의 신항철 박사님으로부터 공급받았으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1) Tracey, K. J. and Cerami, A. : Metabolic responses to cachectin/TNF. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **587**, 325 (1990).
2) Feldmann, M., Brennan, F. M., Elliott, M. J., Williams, R. O. and Maini, R. N. : TNF-α is an effective therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 766, 272 (1995).
3) Beutler, B. and Grau, G. E. : Tumor necrosis factor in the pathogenesis of infectious diseases. *Crit. Care. Med.* **21**, S423 (1993).
4) Beyaert, R. and Fiers, W. : Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity, what we do understand and what we do not. *FEBS. Lett.* **340**, 9 (1994).
5) Katakami, Y., Nakao, Y., Katakami, N., Koizumi, T., Ogawa, R., Yamada, H., Takai, Y. and Fujita, T. : Cooperative effects of tumor necrosis factor-α and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on growth inhibition, differentiation, and c-myc reduction in human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **214**, 1197 (1995).
6) Kronke, M., Schluter, C. and Pfizenmaier, K. : Tumor necrosis factor inhibits MYC expression in HL-60 cells at the level of mRNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 469 (1987).
7) Reem, G. H., Duggan, A. and Schleuning, M. : Immunoregulation and production of tumor necrosis factor-α by human thymocytes. *Cancer Res.* **49**, 3568 (1989).
8) Manchester, K. M., Heston, W. D. W. and Donner, D. B. : Tumor necrosis factor-induced cytotoxicity is accompanied by intracellular mitogenic signals in ME-180 human cervical carcinoma cells. *Biochem. J.* **290**, 185 (1993).
9) Sugarman, B. J., Aggarwal, B. B., Hass, P. E., Figari, I. S., Palladino, M. A. Jr. and Shepard, H. M. : Recombinant tumor necrosis factor-α : Effect on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* **230**, 943(1985).
10) Brenner, D. A., O'Hara, M., Angel, P., Chojkier, M. and Karin, M. : Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumor necrosis factor-α. *Nature* **337**, 661 (1989).
11) Johnson, S. E. and Baglioni, C. : Positive and negative regulation of a tumor necrosis factor response in melanoma cells. *J. Biol. Chem.* **265**, 6642 (1990).
12) Munoz-Fernandez, M. A., Pimentel-Muinos, F. X., Alonso, M. A., Campanero, M., Sanchez-Madrid, F., Silva, A., Alonso, J. L. and Fresno, M. : Synergy of tumor necrosis factor with protein kinase C activators on T cell activation. *Eur. J. Immunol.* **20**, 605 (1990).
13) Zachow, R. J. and Terranova, P. F. : Involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinase pathways in tumor necrosis factor-α-induced clustering of ovarian theca-interstitial cells. *Mole. cell. Endocri.* **97**, 37 (1993).
14) Boscoboinik, D., Galeotti, T. and Azzi, A. : Vinblastine-dependent down-modulation of TNF receptors in human osteosarcoma cells is medi-

ated by protein kinase C activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**, 374 (1994).

15) Scheurich, P., Unglaub, R., Maxeiner, B., Thoma, B., Zugmaier, G. and Pfizenmaier, K. : Rapid modulation of tumor necrosis factor membrane receptors by activators of protein kinase C. *Biophys. Res. Commun.* **141**, 855 (1986).

16) Galeotti, T., Boscoboinik, D. and Azzi, A. : Regulation of the TNF-α receptor in human osteosarcoma cells : role of microtubules and of protein kinase C. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 287 (1993).

17) Unglaub, R., Maxeiner, B., Thoma, B., Pfizenmaier, K. and Scheurich, P. : Downregulation of tumor necrosis factor(TNF) sensitivit*y via modulation of TNF binding capacity by protein kinase C activators. *J. Exp. Med.* **166**, 1788(1987).

18) Johnson, S. E. and Baglioni, C. : Tumor necrosis factor receptors and cytocidal activity are down-regulated by activators of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **263**, 5686(1988).

19) Aggarwal, B. B. and Eessalu, T. E. : Effect of phorbol esters on down-regulation and redistribution of cell surface receptors for tumor necrosis factor-α. *J. Biol. Chem.* **262**, 16450 (1987).

20) Bird, T. A. and Saklatvala, J. : IL-1 and TNF transmodulate epidermal growth factor receptors by a protein kinase C-independent mechanism. *J. Immunol.* **142**, 0126 (1989).

21) Meichle, A., Schutze, S., Hensel, G., Brunsing, D. and Kronke, M. : Protein kinase C-independent activation of nuclear factor kB by tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.* **265**, 8339 (1990).