

## 사람 폐암세포주에서의 *bcl-2* 안티센스 처리에 의한 효과

김선미 · 정자영 · 오호정 · 손여원\*

식품의약품안전청 생물의약품평가부 생물공학과

## Antisense *bcl-2* Treatment in Human Lung Cancer Cell Lines

Seonmi Kim, Jayoung Jeong, Hojung Oh and Yeowon Sohn\*

Division of Biotechnology, Biologics Evaluation Department

Korea Food and Drug Administration, 5 Nokbun-Dong, Eunpyung-Gu, Seoul Korea

(Received November 8, 2002)

(Accepted November 29, 2002)

**ABSTRACT:** Apoptosis, or programmed cell death, is a genetically regulated pathway that is altered in many cancers. Overexpression of *bcl-2* leads to resistance to apoptosis and promotes tumorigenesis. To determine the effects of *bcl-2* antisense treatment in human lung cancer cell lines, a 20 mer full phosphorothioate oligonucleotide (ODN) targeted at the coding region of the *bcl-2* mRNA was synthesized. Western blot analyses were used to examine *bcl-2* protein level in five human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines (NCI-H226, SK-MES-1, NCI-H358, NCI-H522 and NCI-H1299) and four human small cell lung cancer (SCLC) cell lines (NCI-H69, NCI-H417, HCC-2108 and SW2). Three out of five NSCLC (NCI-H226, SK-MES-1 and NCI-H1299) and all of SCLC cell lines expressed *Bcl-2* protein. Treatment of these cells with antisense ODN for 48 hours reduced their viability and *Bcl-2* protein levels. As a conclusion, *bcl-2* antisense treatment appears reduction of the *Bcl-2* protein levels and cytotoxic effect including apoptosis in human lung cancer cell lines.

**Key Words :** Apoptosis, Antisense *bcl-2* ODN, NSCLC, SCLC

### I. 서 론

1998년도에 미국에서 160,000명 이상의 사람이 폐암으로 사망했다는 발표 아래로(Patrick 등, 1999) 우리나라에서도 점차 폐암환자의 수가 증가하고 있다. 간암이나 폐암 환자의 수보다는 위암환자수가 월등히 높지만 위암과 간암환자는 점차 감소하는 반면, 폐암환자는 해마다 늘고 있으며 사망률 또한 계속적으로 증가하는 추세이다. 현재 폐암 발병 후 낮은 생존율은 그 치료방법에 있어 항암제 외에 다른 수단의 연구를 필요로 한다. 그 예로서, 암의 성장 및 조절에 관여하는 단백질에 대한 안티센스 치료법, 암 면역치료법, tumor 백신 및 유전자치료법 등이 있다.

1980년대 중반 외부에서 유입시킨 oligonucleotides (ODN)를 세포에 처리하여 특정 단백질의 발현을 선택적으로 억

제하는 방법을 개발한 것은 의·약학 분야에 큰 기대를 불러 일으켰다. 특정 효소나 단백질을 표적할 수 있는 능력은 새로운 치료법의 폭을 넓힐 수 있을 뿐 아니라, 신약개발의 새로운 전략으로써 이용될 수 있기 때문이다. 신약개발 분야에 이용되는 이 방법은 특정 약물을 정확하게 목표부위에 결합시킬 수 있는 특성을 가지고 있기 때문에 약물의 부작용을 현저하게 줄일 수 있다는 것이 가장 큰 장점이라 할 수 있다. 최근 연구에 의하면, *Bcl-2*와 같은 apoptosis 관련 단백질의 발현이 안티센스 ODN에 의해 억제되는 것으로 보고되고 있는데(Patrick 등, 1999; Elizabeth 등, 1999; Susanna 등, 1997; Effects, 1994; Anne-marie 등, 1997) 이는 안티센스 ODN이 표적 유전자의 mRNA에 결합하여 DNA-RNA hybrid를 형성함으로써 관련 단백질의 생성을 억제시키는 것으로 이해되고 있다. 안티센스 ODN은 세포내로 원활히 유입되어야 하며 또한 nucleases에 대한 내성을 갖도록 화학적으로 합성된다. 이 때 특정 modified linkage나 말단기의 변형으로 oligomer의 형태를 바꿔주게 되는데(James and Murray) phosphodiester

\*To whom correspondence should be addressed

List of Abbreviation: NSCLC, Non-Small Cell Lung Cancer; SCLC, Small Cell Lung Cancer; ODN, Oligonucleotide; PCD, Programmed Cell Death

oligonucleotide(ODN)의 골격에 internucleotide 결합에 다리가 없는 산소분자를 -CH<sub>3</sub>(methylphosphonate) 또는 -S(phosphothioate), -O-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>(alkyl phosphotriester)등으로 치환한 30 mer 이하의 길이의 oligomer를 이용하게 된다. 암은 세포의 항상성이 깨어짐으로서 유발되는 질병으로, 암 치료수단과 관련한 기전연구로서 apoptosis 또는 programmed cell death(PCD)에 관심이 집중되고 있다. 대부분의 암세포에서 apoptosis는 정상세포와 다른 방식으로 조절되며, 이 같은 특성 때문에 항암제에 대한 저항성도 갖게 된다(Patrick 등, 1999). 그러므로 apoptosis를 조절하는 유전자의 활성화 및 비활성화는 암세포의 증식과 사멸을 조절하는 중요한 수단이 된다. Apoptosis에 관여하는 대표적 유전자는 *bcl-2*인데, *bcl-2* proto-oncogene은 결절성 림프종에서 14, 18번의 chromosomal translocation으로 인해 동정되었으며, *Bcl-2* 단백질은 내형질세망, 미토콘드리아 및 핵막에 위치하는 것으로 보고되고 있다(Annemarie 등, 1997; Tsujimoto과 Croce, 1986). *bcl-2*가 apoptosis를 억제하는 정확한 분자적 기전이 명료하게 밝혀지지는 않았지만, 최근 발표된 연구들에 따르면 *bcl-2*의 세포내 분포가 결정적인 요인인 것으로 추정되고 있다. 인산화된 *bcl-2*가 apoptosis 억제기능이 있음이 보고되고 있는데(Patrick 등, 1999; Ito 등, 1997), 이 기전들 가운데 하나는 미토콘드리아의 외막에서 cytochrome c가 세포질로 유리되는 것을 막음으로써 세포의 사멸을 억제하는 것으로 추정되는 결과들이 보고되고 있다(Patrick 등, 1999; Kluck 등, 1997; Yang 등, 1997). 또한 *bcl-2*는 세포내 칼슘이온의 함량을 조절하며(Patrick 등, 1999; Lam 등, 1994; Murphy 등, 1996; Reynolds과 Eastman, 1996), 항산화 기능을 하여 세포를 사멸로부터 보호하는 것으로 알려지고 있다(Hockenberry 등, 1993; Lee과 Shacter, 1997; Pourzand 등, 1997; Steinman, 1995). 임파구성 백혈병, non-Hodgkin's 림프종, 전립선암 및 유방암 세포주 등을 대상으로 안티센스 *bcl-2* vector 혹은 oligonucleotide(ODN)의 처리에 의하여 *Bcl-2*가 감소되는 것이 이미 확인되었다(Annemarie 등, 1997; Teixeira,

1995). 또한 암세포에서 *Bcl-2*의 양이 감소되면, 상대적으로 항암요법제에 대한 감수성이 높아지는 것으로 알려져 있어 암 치료법으로의 적용 가능성이 크다고 할 수 있다(Teixeira, 1995). 본 연구에서는 *bcl-2*에 대한 안티센스 ODN를 합성하여 사람의 폐암에서 유래된 소세포암(small cell lung cancer, SCLC) 세포주와 비 소세포암(non-small cell lung cancer, NSCLC) 세포주를 대상으로 안티센스을 이용한 치료법의 효용성을 조사하였다. 사람의 폐암 세포주 중 4개의 소세포암 세포주(NCI-H69, NCI-H417, HCC-2108, SW2) 및 5개의 비 소세포암 세포주(NCI-H226, SK-MES-1, NCI-H358, NCI-H522, NCI-H1299)를 대상으로 내재적인 *bcl-2*의 발현을 조사하였으며, *bcl-2*에 대한 안티센스를 처리하여 실제 그 발현 양이 얼마나 감소되는지, 그리고 이들 세포주를 대상으로 세포독성 및 apoptosis에 대한 변화를 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 세포주

실험에 사용한 사람 폐암세포주, NSCLC 세포주인 NCI-H226, SK-MES-1, NCI-H358, NCI-H522, NCI-H1299와 SCLC 세포주인 NCI-H69, NCI-H417, HCC-2108은 한국 세포주 은행에서 분양받아 사용하였으며 SW2는 University of Pittsburgh, Department of Pharmacology에서 분양 받아 실험에 사용하였다. 이들의 특성은 Table 1에 정리하였으며, 모든 세포주는 각 배지에 10% FBS를 첨가하여 5%의 CO<sub>2</sub>로 37°C에서 배양하였다.

### 2. *bcl-2* 안티센스 oligonucleotide(ODN)

*bcl-2* mRNA의 coding region을 target으로 하는 20-mer의 phosphorothioate oligonucleotide(ODN)와 대조군으로 안티센스 ODN의 sense sequence인 ODN 및 안티센스

Table 1. List of human lung cancer cell lines used in this experiment

Classification	Cell line	KCLB No.*	Histopathology	Growth pattern	Culture medium
NSCLC (non-small cell lung cancer)	NCI-H226	90226	squamous	adherent	RPMI1640, 10% FBS
	SK-MES-1	30058	squamous		DMEM, 10% FBS
	NCI-H358	25807	bronchioalveolar		RPMI1640, 10% FBS
	NCI-H522	90522	adenocarcinoma		
	NCI-H1299	25803	large cell		
SCLC (small cell lung cancer)	NCI-H69	30119	SCLC	aggregates in suspension	RPMI1640, 10% FBS
	NCI-H417	90417	variant SCLC		
	HCC-2108	72108	metastasis SCLC	adherent	
	SW2		SCLC	aggregates in suspension	

\*KCLB No. (Korean Cell Line Bank Number): 한국 세포주은행 세포주 목록번호

**Table 2.** Phosphorothioate oligonucleotides used for the antisense effect on *bcl-2* expression

Name	Size (base)	Sequence
antisense	20	5'-AATCCTCCCCCAGTTCACCC-3'
sense	20	5'-GGGTGAACCTGGGGGAGGGATT-3'
scrambled	20	5'-ACACCCCAATTCTCCGCC-3'

ODN과 같지만 염기서열을 순서없이 섞어놓은 scrambled ODN을 (주)제노텍에서 제작하였다. 이 ODN들은 3차 중류수에 녹여 사용하였으며 -20°C에 보관하였다. 각각의 염기서열은 Table 2에 정리하였다.

### 3. 세포독성 측정

NSCLC, SCLC 세포주에서 ODN의 세포독성을 알아보기 위해 MTT assay를 수행하였다. 이 실험을 수행하기 위해 먼저  $2 \times 10^5$  cell/ml을 96 well plate에 100 μl를 넣고 하룻밤 배양한다. 0.2 μM, 2 μM의 2가지 농도로 만든 ODN과 lipofectamine mixture를 각 well에 100 μl씩 넣어주고 72시간 동안 37°C에서 배양한 후 0.5 mg/ml의 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium) 용액을 10 μl씩 넣고 3시간 동안 37°C 배양기에서 반응시킨 후 배지액을 제거하고 isopropanol 100 μl씩 넣고 녹인 후 UV spectrophotometer (Pharmacia, USA)를 이용하여 562 nm에서 읽는다.

### 4. *bcl-2* 안티센스 ODN 처리

세포주는  $2 \times 10^5$  cells/ml로 6 well plate에서 10% RPMI 1640배지에서 하룻밤 배양하고 RPMI 1640 무혈청 배지에 *bcl-2* 안티센스 ODN(2 μM)와 lipofectamine(2 mg/ml)를 섞어 상온에서 30분 동안 complex를 형성하도록 반응시킨다. 세포들은 무혈청 배지로 2번 씻어낸 후 ODN mixture를 각 well에 넣어주고 8시간 동안 37°C, CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한 후 각 well의 FBS의 농도가 5%가 되게 넣어주고 48시간 배양해준다.

### 5. Western blot

안티센스를 처리한 세포들에 RIPA buffer(1×PBS, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, protease inhibitor cocktail 20 μg/ml)를 넣어주어 세포를 lysis 시킨다. lysis된 세포들을 모아서 30분간 4°C에서 방치한 후 원심분리하여 수용성 단백질 extract를 만든다. 단백질 농도는 BCA protein assay kit(Pierce, USA)를 사용하여 정량하였다. 단백질 extract 60 μg을 12% polyacrylamide-sodium dodecyl sulfate gel(SDS-PAGE)에 100 V로 전기영동한 후

nitrocellulose transfer membrane에 0.2 mA/cm<sup>2</sup>로 1시간 동안 transfer한다. Membrane을 5% skim milk/TTBS(1 mM Tris-HCl pH 7.5, 15 mM NaCl, 0.05% Tween-20)로 1시간 동안 blocking한 후 5% skim milk/TTBS에 *bcl-2* mouse monoclonal antibody(Santa Cruze Biotechnology, USA)를 1:2000으로 희석한 mixture에 4°C에서 overnight 한다. Anti-mouse IgG-HRP로 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 ECL kit를 이용하여 autoradiography한다.

### 6. Apoptotic 세포 관찰

Apoptosis가 일어난 세포를 관찰하기 위해 2 μM *bcl-2* 안티센스 ODN을 처리, PBS로 세척한 후 propidium iodide(PI)를 10 μg/ml로 처리한 후 형광현미경으로 관찰한다.

## III. 결 과

### 1. Western blot

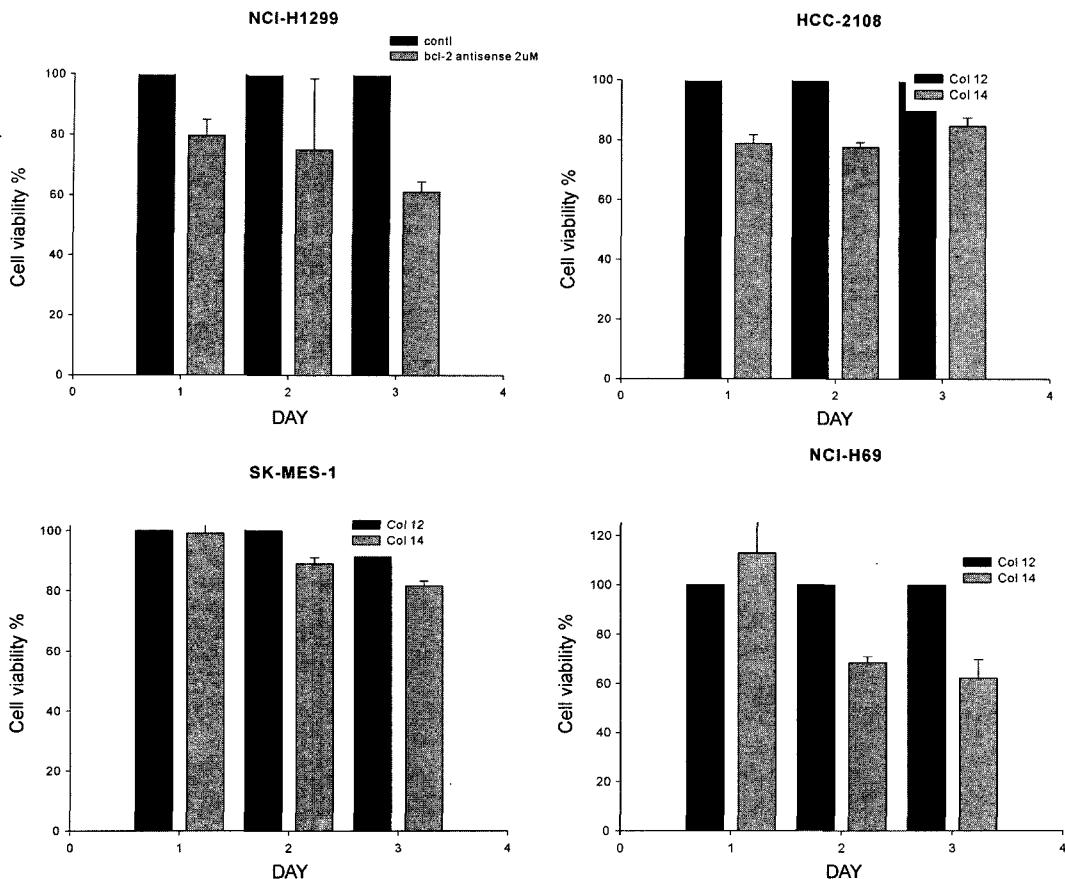
9개의 사람 폐암세포주에서 Bcl-2 단백질의 발현여부를 Western blot을 통해 알아보았다(Fig. 1). 비 소세포암(NSCLC) 세포주인 NCI-H226, SK-MES-1, NCI-H358, NCI-H522, NCI-H1299와 소세포암(SCLC) 세포주인 NCI-H69, NCI-H417, HCC-2108, SW2의 Bcl-2 단백질 발현여부를 알아본 결과 NSCLC 세포주들 중에서 NCI-H226과 SK-MES-1, NCI-H1299에서 Bcl-2 단백질이 발현되는 것을 확인하였고 SCLC 세포주들은 모두 Bcl-2 단백질이 발현되었다. NSCLC 세포주에서 보다 SCLC 세포주에서 Bcl-2 단백질 발현정도가 더 크게 나타났으며 NSCLC 세포주는 형태학적으로 squamous 특성을 갖는 세포주와 large cell에서만 Bcl-2가 발현하는 것으로 나타났다.

### 2. 세포독성

NSCLC 세포주 SK-MES-1, NCI-H1299와 SCLC 세포주 NCI-H69, HCC-2108을 선택하여 *bcl-2* 안티센스 ODN의 세포독성효과를 확인해 보았다(Fig. 2). 그 결과 각 세포주의 대조군과 비교하여 *bcl-2* 안티센스 ODN을 처리한 군에서는 시간이 지남에 따라 세포의 생존율이 떨어지는 것



**Fig. 1.** Detection of Bcl-2 protein in human lung cancer cell lines by western blot analysis. Lane 1; NCI-H226, 2; SK-MES-1, 3; NCI-H358, 4; NCI-H522, 5; NCI-H1299, 6; NCI-H69, 7; NCI-H417, 8; HCC-2108, 9; SW2.



**Fig. 2.** Cytotoxic effect of oligonucleotide on human lung cancer cell lines. Left Column; NSCLC, Right Column; SCLC.

을 볼 수 있었다. NSCLC 세포주는 SCLC 세포주와 비교하여 보았을 때 생존율이 떨어지는 정도가 크지 않게 나타난 반면 HCC-2108 세포주에서는 대조군과는 차이를 보였으나 *bcl-2* 안티센스 ODN을 처리한 군 사이에서 시간이 지남에 따른 큰 변화는 볼 수 없었다.

### 3. *bcl-2* 안티센스 ODN 처리

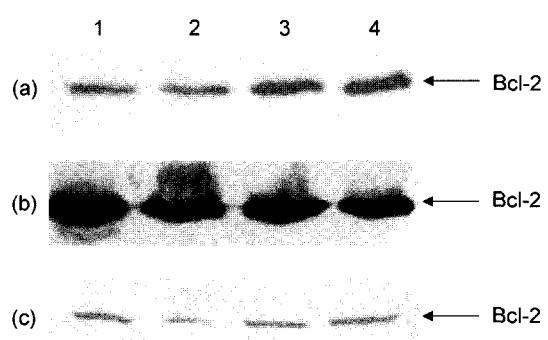
*bcl-2*를 발현하는 NSCLC 세포주인 NCI-H1299를 이용하여 endogenous하게 발현되는 Bcl-2 단백질의 양이 감소되는지 알아보기 위하여 *bcl-2* 안티센스 ODN을 처리하여 보았다. 그 결과 Bcl-2 단백질의 양이 감소함을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). SCLC 세포주인 HCC-2108, SW2, NCI-H417에서도 *bcl-2* 안티센스 ODN을 처리하였을 때 Bcl-2 단백질 양이 감소함을 알 수 있었다(Fig. 4).

### 4. Apoptosis 유도

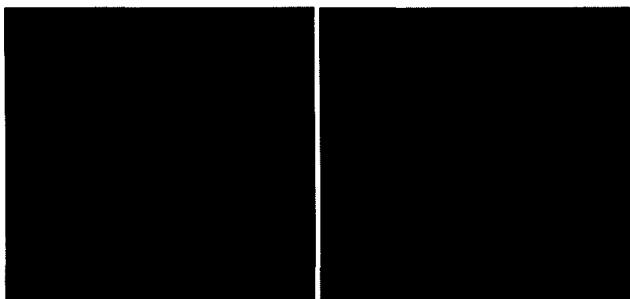
Bcl-2 단백질을 발현하는 NSCLC 세포주와 SCLC 세포



**Fig. 3.** Western blot analysis of Bcl-2 protein in NCI-H1299 cell line treated with antisense ODNs. Lane 1; control, 2; antisense, 3; sense, 4; scrambled.



**Fig. 4.** Western blot analysis of Bcl-2 protein in SCLC cell line treated with antisense ODNs. (a) HCC-2108, (b) NCI-H417, (c) SW2, Lane 1; control, 2; antisense, 3; sense, 4; scrambled.



**Fig. 5.** Intact cells show regular round form, whereas cells undergoing apoptosis display blebbing of the nuclei (Left) and many fragments around the apoptotic cells (Right). Non small cell lung cancer cells (NCI-H1299) were treated with 2  $\mu$ M *bcl-2* antisense, Propidium Iodide, X100 (Left), X200 (Right).

주 모두에서 *bcl-2* 안티센스 ODN을 처리하였을 때 그 양이 감소함을 앞의 결과로 확인할 수 있었다. 그렇다면 사람 세포주에서 dysregulated 될 때 cell death를 억제하는 것으로 알려진 Bcl-2 발현이 *bcl-2* 안티센스 ODN 처리로 감소하였을 때 과연 apoptosis pathway를 따라 cell death가 일어나는지 확인하기 위해 NSCLC 세포주인 NCI-H1299에 *bcl-2* 안티센스 ODN을 처리한 후 apoptosis로 유도되는 cell death를 확인할 수 있는 방법 중 하나로 핵의 형태적 변화를 확인하기 위해 PI로 염색하였다. 그 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 *bcl-2* 안티센스 ODN을 처리한 세포에서는 그 핵의 형태적인 변화, 핵들의 blebbing이 관찰되고 apoptosis가 일어나는 세포 주위에 많은 fragment가 보이는 것을 확인할 수 있었다.

#### IV. 고 찰

인간의 여러 질병은 유전정보의 비정상적 표현 및 조절에 따른 것으로 밝혀지고 있다. 유전정보의 흐름은 DNA-RNA-단백질의 순으로 이루어진다. 이러한 유전정보의 전달과정은 다양한 기작에 의해 완급이 조절됨으로서 생화학적 및 생리적 homostasis가 유지된다. 따라서 분자 생물학적 방법을 이용한 질병의 정확한 진단 및 치료에 대한 가능성은 많은 관심을 받고 있다. 암은 세포의 homeostasis의 변화에 의해 생기는 대표적인 질병으로 비정상적이거나 과다한 유전자 표현이 질병의 발생 및 진행에 영향을 끼친 경우에 인위적으로 유전정보의 전달과정에 개입하여 유전자 산물인 단백질의 생성을 억제함으로서 치료효과를 기대할 수 있다. 그 대표적인 방법 중의 하나가 상보적인 안티센스 분자를 사용하여 목적 유전자의 전사체인 mRNA를 target으로 단백질의 생성을 억제하는 것이다. 안티센스 분자를 사용하는 방법은 크게 synthetic 안티센스 oligomer와 expressed 안티센스 sequence가 주로 이용되어 왔지만 치

료목적의 약제개발은 용량조절 및 시행상의 장점들로 인해 주로 synthetic 안티센스 oligomer가 이용되어 왔다.

과거 수년동안 암의 치료수단은 수술을 통한 암세포 제거와 화학요법이 병행되어 왔으나 치료과정 중 화학요법 제에 대한 저항성이 생기는 등의 부작용으로 환자들의 치료에 문제가 생긴다(Annemarie 등, 1997). 그리하여 최근 암에 대한 치료방법으로 cellular homeostasis와 관련한 생리학적인 기작인 apoptosis (programmed cell death, PCD)에 관심이 증가하고 있으며 실제 암세포는 apoptosis의 정도에서 벗어나 조절되고 있다. Apoptosis를 조절하는 유전자의 genetic manipulation은 proliferation과 cell death 사이에서 세포들에 변화된 균형을 다시 조절하게 한다. Apoptotic pathway에서 알려진 대표적인 regulator로서 *bcl-2*가 있다. 이 유전자는 PCD를 억제하는 antiapoptotic agent로서 현재 많은 연구가 수행되고 있다(Patrick 등, 1999).

최근 4년 동안 미국에서는 폐암의 사망율이 1위를 기록하고 있으며 우리나라도 점차 폐암환자의 수가 증가하고 있다. 폐암 환자들의 치료과정에서 화학요법제에 대한 저항성의 출현은 화학요법에 반응이 좋음에도 불구하고 주요 문제점으로 남아왔다(Annemarie 등, 1997). 이는 SCLC에서 drug transport와 activity에 수반되는 단백질과 cell cycle checkpoint control에서 잘못된 발현을 포함하여 약물 저항성에 관련된 많은 유전적 변이들이 알려져 있지만 치료방법의 선택의 폭을 증가시키기 하는 진보는 없었다. 이 연구는 NSCLC와 SCLC에 대한 유전자치료 전략의 하나로서 apoptosis induction을 발생시키는 것을 목적으로 하는 일련의 시작 단계의 실험으로 apoptosis pathway의 regulator인 *bcl-2*를 대상으로 안티센스 ODN을 이용하여 그 발현을 줄일 수 있음을 보고하며 NSCLC와 SCLC의 생존율에서 변화된 Bcl-2 발현의 영향을 시험하였다. 세포독성 실험은 SK-MES-1, NCI-H1299와 NCI-H69, HCC-2108, 4개의 세포주를 이용하여 수행하였을 때, 그 중 NCI-H1299가 시간에 따라 ODN을 처리하지 않은 대조군과 비교했을 때 뚜렷한 독성을 보였으며 SK-MES-1과 HCC-2108은 반응이 작았다. 하지만 이들 모두 ODN을 처리하고 48시간 후에 대조군과 비교했을 때 가장 큰 세포독성을 나타내는 것으로 나타났다. NSCLC 세포주 중에서 NCI-H1299를 이용하여 *bcl-2* 안티센스 ODN을 처리하였을 때 그 양의 감소를 볼 수 있었으며 SCLC 세포주인 HCC-2108, SW2, NCI-417에서도 그 양이 감소함을 알 수 있었다. 이는 Ziegler 등(Annemarie 등, 1997)의 결과와 같았다. Bcl-2 발현이 감소하였을 때 이들 폐암세포주가 apoptotic pathway를 따라 cell death가 일어나는지 확인하기 위해 propidium iodide로 DNA 염색을 하였을 때 핵의 형태학적 변화가 관찰됨으로써 NSCLC나 SCLC 모두에서 *bcl-2*가 apoptosis를 억제하는데 중요한 역할을 하는 것을 확인할 수 있었다. 또한

*bcl-2* proto-oncogene의 안티센스 ODN을 처리함으로서 내인성 Bcl-2의 양적 감소가 apoptosis를 유도할 수 있음을 보여주어 앞으로 이 안티센스 ODN이 전임상 및 임상 연구에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

## V. 결 론

1. NSCLC 세포주 중에서 NCI-H226과 SK-MES-1, NCI-H1299에서 Bcl-2 단백질이 발현 되는 것을 확인하였고, SCLC 세포주는 모두 Bcl-2 단백질이 발현되는 것을 알 수 있었다.
2. NSCLC 세포주에서 보다 SCLC 세포주에서 Bcl-2 단백질 발현정도가 더 크게 나타났으 며, NSCLC 세포주는 Bcl-2 단백질 발현에 있어 그 세포주의 형태학적인 특성에 따라 차 이를 보였다.
3. NSCLC와 SCLC 세포주 중에서 SK-MES-1, NCI-H1299, NCI-H69, HCC-2108에 *bcl-2* 안티센스 ODN을 처리하였을 때 각 세포주의 대조군과 비교하여 *bcl-2* 안티센스 ODN을 처리한 군에서 시간이 지남에 따라 세포생존율이 떨어지는 것을 볼 수 있었다.
4. NSCLC 세포주인 NCI-H1299에 *bcl-2* 안티센스 ODN을 처리한 후 apoptosis로 유도되는 cell death를 확인할 수 있었다.

## 감사의 글

1998년 보건의료사업 연구비로 진행되었던 사업으로 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Patrick, P., Haifan, K., Mark, Z. and Leivitt, L. (1999): Antisense *bcl-2* treatment increases programmed cell death in non-small cell lung cancer cell lines. *Lung cancer*, **23**, 115-127s.
- Elizabeth, J., Jennifer, A., Taylor, K., Narayana, R. and Bennett, C.F. (1999): The role of antiapoptotic Bcl-2 family members in endothelial apoptosis elucidated with antisense oligonucleotides. *J Bio Chem*, **274**, 11245-11252.
- Susanna, M., Domenico, D., Sergio, C., Alessandro, Q., Nicola, S., Anna, B., Silvia, T. and Angelo, N. (1997): The antisense *bcl-2-IgH* transcript is an optimal target for synthetic oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 8150-8155.
- Effects of BCL-2 antisense oligonucleotides on *in vitro* proliferation and survival of Lydia Campos, Odile Sabido, Jean-Pierre Rouault, and Denis Guyotat (1994): normal marrow progenitors and leukemic cells. *Blood*, **84**, 595-600.
- Annemarie, Z., Gerd, H.L., Dorian, F., Karl-Heinz, A., Rolf, A.S. and Uwe, Z.-W. (1997): Induction of Apoptosis in Small-Cell Lung Cancer Cells by an Antisense Oligonucleotide Targeting the Bcl-2 Coding Sequence. *J Natl Cancer Inst*, **89**, 1027-1036.
- James, A.H. Murray: Antisense RNA And DNA. Wiley-Liss.
- Tsujimoto, Y. and Croce, C.M. (1986): Analysis of the structure, transcripts and protein products of *bcl-2* the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, **83**, 5214-5218.
- Ito, T., Deng, X., Carr, B. and May, W.S. (1997): Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. *J Bio Chem*, **272**, 11671-11673.
- Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R. and Newmeyer, D.D. (1997): The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, **275**, 1132-1132.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K. et al. (1997): Prevention of apoptosis by Bcl-2: releases of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, **275**, 1129-1132.
- Lam, M., Dubyak, G., Chen, L., Nunez, G., Miesfield, R.L. and Distelhorst, C.W. (1994): Evidence that Bcl-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated  $Ca^{2+}$  fluxes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 6569-6573.
- Murphy, A.N., Bredesen, D.E., Cortopassi, G., Wang, E. and Fiskum, G. (1996): Bcl-2 potentiates the maximal calcium uptake capacity of neural cell mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 9893-9898.
- Reynolds, J.E. and Eastman, A. (1996): Intracellular calcium stores are not required for Bcl-2-mediated protection from apoptosis. *J Biol Chem*, **271**, 27739-27743.
- Hockenberry, D.M., Oltvar, Z.N., Yin, X.M., Miliman, C.L. and Korsmeyer, S.J. (1993): Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*, **75**, 241-251.
- Lee, Y. and Shacter, E. (1997): *bcl-2* does not protect Burkitt's lymphoma cells from oxidant-induced cell death. *Blood*, **89**, 4480-4492.
- Pourzand, C., Rossier, G., Reelfs, O., Bormer, C. and Tyrrell, R.M. (1997): Overexpression of Bcl-2 inhibits UVA-mediated immediate apoptosis in rat 6 fibroblast: evidence for the involvement of Bcl-2 as an antioxidant. *Cancer Res*, **57**, 1405-1411.
- Steinman, H.M. (1995): The Bcl-2 oncoprotein functions as a pro-oxidant. *J Biol Chem*, **270**, 3487-3490.
- Teixeira, C., Reed, J.C., Pratt, M.A. (1995): Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving Bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells. *Cancer Res*, **55**, 3902-3907.