

Okadaic Acid에 의한 FRTL-5 갑상선 세포주의 Apoptosis 유도

계명대학교 의과대학 외과학교실,* 면역학교실**

조지형* · 정기용* · 박종우**

= Abstract =

Induction of Apoptosis in FRTL-5 Thyroid Cells by Okadaic Acid

Ji Hyoung Cho, M.D.,* Ki Yong Chung, M.D.,* Jong Wook Park, M.D.**

Department of Surgery* and Immunology,** Keimyung University College of Medicine, Daegu, Korea

Objective : Okadaic acid is a specific inhibitor of serine/threonine protein phosphatase 1 and 2A. In order to know the mechanism of apoptosis induced by okadaic acid, we treated FRTL-5 thyroid cells with okadaic acid and measured the changes of important proteins that are involved in apoptosis.

Materials and Methods : We measured caspase 3 activity, PLC- γ 1 degradation, the expression of XIAP, cIAP1, cIAP2, and cytochrome c release in okadaic acid-treated FRTL-5 thyroid cells.

Results : Okadaic acid-induced caspase 3 activation and PLC- γ 1 degradation and apoptosis were dose-dependent with a maximal effect at a concentration of 80 nmol and time-dependent with a maximal effect at 24 hours after treatment. The elevated caspase 3 activity in okadaic acid treated FRTL-5 thyroid cells are correlated with down-regulation of XIAP and cIAP1, but not cIAP2. General and potent inhibitor of caspases, z-VAD-fmk, abolished okadaic acid-induced caspase 3 activity and PLC- γ 1 degradation. The release of cytochrome c in okadaic acid-induced FRTL-5 thyroid cells was dose-dependent with a maximal effect at a concentration of 80 nmol.

Conclusions : These findings suggest that mechanism of okadaic acid-induced apoptosis is associated with cytochrome c release and increase of caspase 3 activation in FRTL-5 thyroid cells.

KEY WORDS : Thyroid carcinoma · Okadaic acid · Apoptosis · Caspase 3.

서 론

갑상선암은 전체 암 중에서 약 1%를 차지하며 병리학적으로 유두암, 여포암, 수질암, 미분화암으로 나누어진다. 갑상선암의 치료는 수술이 가장 중요하며 주로 갑상선을 완전히 제거하는 전절제술을 한다. 그러나 전절제술을 시행하여도 갑상선 암의 특성상 암세포의 완전한 제거가 되지 않을 수도 있으며, 수술 후 수술한 자리에 남아있는 암세포에 의해 암의 재발빈도가 매우 높기 때문에 이를 제거하기 위해 방사성 육소치료를 실시한다. 이러한 방사성 육소치료와 더

불어 장기적인 종양 화학예방제(cancer chemopreventive agent)의 투여는 갑상선 암의 재발을 막는데 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

최근에 각종 화합물들의 종양 화학예방 효과에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. 종양 화학예방은 천연물 화합물이나 합성 화합물을 이용하여 암을 조절, 예방 및 치료하는 의미를 함축한다¹⁻⁵⁾. 종양 화학예방이 중요한 이유는 화학요법이나 수술 등의 방법만으로 충분한 암 치료 효과를 증대할 수 없기 때문이다. 최근에 천연물로부터 추출한 여러 종류의 물질이 종양 화학예방 효과가 우수함이 보고 되고 있다. 대부분의 종양 화학예방제의 항암 기전은 암세포에 대하여 세포주기의 부적절한 조절과 apoptosis를 유도하여 이루어진다. 여러 가지 종양 화학예방제 가운데 하나인 okadaic acid는 protein phosphatase 1과 2A의 저해제로 가

장 일반적으로 사용되는 C38 지방산의 polyether 화합물이며⁶⁾, okadaic acid에 의한 암 유발 또는 억제기능을 가지고, 세포분화 및 apoptosis 유도 등 다양한 생물학적 효과가 보고 되었으나^{7~11)}, apoptosis 유도에 대한 명확한 기전은 아직 밝혀지고 있지 않다. 본 연구에서는 갑상선 암에서 okadaic acid가 종양 화학예방제로 활용될 수 있는가를 알아보기 위하여 FRTL-5 갑상선 세포에서의 생육억제 및 apoptosis 유도과정에 미치는 영향을 규명하고, 더 나아가 apoptosis 과정에 관련된 여러 단백질의 발현조절을 분자생물학적 방법으로 조사하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양과 유지

실험에 사용한 세포는 Rat의 FRTL-5 갑상선 세포주를 ATCC사(미국)에서 분양 받아서 사용하였다. 갑상선 세포주는 diploid 상태의 5~20 정도 passage 세포를 사용하였다. FRTL-5 갑상선 세포주는 6H 배지를 이용하여 세포 성장 최적조건인 37°C, 5% CO₂로 평형된 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 6H 배지는 Coon's의 변형된 F12 배지에 5% calf serum, 1 mmol nonessential amino acid, bovin thyrotropin(1milliunit/mL), insulin(10 μg/mL), cortisol(0.4ng/mL), transferrin(5 μg/mL), glycyl-L-histidyl-L-lysine acetate(10ng/mL)과 somatostatin(10 ng/mL)을 첨가하여 제조하였다. 배양된 세포는 약 48시간 간격으로 계대 배양하여 6-well plate 또는 12-well plate에서 동일한 수의 세포를 분주하여 실험하였다.

2. 종양 화학예방제

종양 화학예방제로서 protein phosphotase inhibitor인 okadaic acid(Ok), PKC inhibitor인 Ro 31-8220(Ro), arsenic trioxide, curcumin 및 protein kinase C(PKC) activator인 phorbol myristate acetate(PMA)는 Sigma사(미국)에서 구입하여 사용하였다.

3. 세포 성장을 측정

세포의 성장을 살피는 세포를 trypan blue로 1:1 염색하여 hemocytometer로 측정하였다. 즉, 1×10⁶cells/mL의 세포를 6-well plate에 분주하고, 종양 화학예방제를 처리하여 24시간 동안 배양한 후, trypan blue 염색하여 세포의 수를 측정하였다.

4. 종 단백질 추출 및 단백질 전기영동

세포를 6-well plate에 동일한 수를 분주하고 종양 화학예방제를 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 세포를 cold-phosphate buffered saline(PBS)로 세척하고

trypsin 처리한 후 3000rpm에서 5분간 원심분리하여 세포를 수거하였다. 수거한 세포는 각종 단백질 분해효소 저해제가 함유된 lysis buffer(50mmol Tris-HCl, pH 8.0, 5mmol EDTA, 150mmol NaCl, 0.5% Nonidet-40)로 용해한 다음, 10,000g에서 20분간 원심분리하여 상층액을 취하여 총 단백질 분획을 얻었다. 총 단백질 추출액의 단백질은 Bradford 시약을 사용하여 정량 하였다. 정량된 총 단백질 추출액 50 μg을 8% reducing SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동을 통하여 분리하였다.

5. Western Blot 분석

세포에서 추출한 총 단백질을 전기영동을 하여 분리한 다음 20% methanol, 25mmol Tris, 및 192mmol glycine buffer하에서 nitrocellulose 막으로 단백질을 이동시켰다. 이 막을 Ponceau 용액으로 염색하여 단백질 이동 유무를 확인한 후, 5% non-fat dry milk solution으로 30분간 실온에서 반응시켰다. Blocking 후 blocking buffer로 1000 배 희석한 특이한 항체와 membrane을 4시간 이상 반응시켰으며, 반응이 끝난 막을 Tris-Tween buffered saline (TTBS)으로 5분 간격으로 6회 세척하였다. 계속하여 horse radish peroxidase가 부착된 이차항체인 goat anti-IgG 항체와 2시간 반응시키고 다시 한번 TTBS로 6회 세척하였다. 최종적으로 증류수로 세척한 후 ECL 용액으로 1분간 반응시켰으며, Kodak film에 감광하여 나타난 band의 두께를 비교하여 단백질 발현 유무 및 발현 정도를 확인하였다. 대부분의 실험에서 Western blot은 2~3회 반복하여 실험하였다.

6. Okadaic acid에 의한 apoptosis 조절 단백질의 발현조사

Okadaic acid에 의한 apoptosis 조절 단백질의 발현을 조사하기 위하여 FRTL-5 갑상선 세포에 okadaic acid를 처리한 후 수거한 세포를 PBS로 세척하고 lysis buffer로 용해하였다. Apoptosis를 조절하는 단백질의 발현 정도를 조사하기 위하여 동일한 량의 단백질을 SDS-gel에 전기영동하여 nitrocellulose 막에 전달하였으며, B-cell leukemia/lymphoma-2(Bcl2), BclxL, Bax, caspase 3와 phospholipase C-gamma 1(PLC-γ 1)에 대한 항체로 반응시킨 후 이차 항체를 다시 반응시켜 항체 결합여부를 ECL방법으로 측정하였다.

7. Cytochrome c 유리 측정

FRTL-5 갑상선 세포에 다양한 농도의 okadaic acid를 처리하고 24시간 배양하여 수확한 세포를 PBS buffer로 1회 세척한 후 0.16 μmol PMSF가 함유된 50 μL의 hypotonic buffer(20mmol HEPES, pH 7.4 ; 10mmol KCl ; 2mmol MgCl₂ ; 1mmol EDTA)를 첨가하여 약하게 진탕

혼합하면서 4°C에서 20분간 반복하여 용해시켰다. 15,000 rpm에서 원심하여 세포질 단백질을 회수한 후 spectrophotometer를 이용하여 단백질을 정량하였으며, 40 μg의 단백질을 12% reducing SDS-PAGE상에서 전기영동하여 Western Blot 분석을 수행하였다.

8. Caspase 3 활성도 측정

6-well plate에 동일한 수의 세포를 분주하고 혈청이 첨가되지 않은 RPMI 배지를 이용하여 세포를 24시간 배양하였다. 그 후 다양한 농도로 okadaic acid을 처리하고 24시간 동안 배양한 후 단백질을 추출하여 정량하였다. 30 μg의 단백질을 100 μmol의 caspase 3 substrate I이 첨가된 200 μL의 PBS와 혼합하여 시간 별로 405nm에서 caspase 활성도를 측정하였다.

성 적

1. 여러 종양 화학예방제에 의한 apoptosis 유도

갑상선 세포에서의 여러 종양 화학예방제에 의한 apoptosis 유도 과정을 조사하기 위하여 protein kinase C(PKC) activator인 PMA, protein phosphatase inhibitor인 okadaic acid, PKC inhibitor인 Ro, arsenic trioxide, curcumin 등을 24시간 처리 한 후 apoptosis 유도 시 발현하는 caspase 3 효소 활성과 PLC-γ 1의 절단 현상을 측정하였다. 갑상선 세포는 PMA, Ro, arsenic trioxide에 의하여 apoptosis가 유도되지 않았으나, okadaic acid 및 curcumin 처리 시 caspase 3 활성과 PLC-γ 1의 절단 현상을 확인하였다. 특히 protein phosphatase inhibitor인 okadaic acid에 의하여 apoptosis가 잘 유도됨을 알 수 있었다(Fig. 1).

2. Okadaic acid에 의한 caspase 3 활성 및 PLC-γ 1의 절단

Okadaic acid 처리에 의한 FRTL-5 갑상선 세포에서 caspase 3 활성 및 PLC-γ 1의 절단 현상을 측정하기 위하여 10, 20, 40, 60 및 80mmol 농도의 okadaic acid을 24시간 처리한 후 단백질을 추출하여 caspase 3 활성과 pro-caspase 3 발현 정도 및 PLC-γ 1의 절단 현상을 측정하였다. Okadaic acid 40 nmol 농도에서부터 caspase 3 활성이 급격하게 증가하였다. Okadaic acid에 의한 caspase 3 활성은 농도 의존적으로 증가하였다. Caspase 3 기질로 알려진 PLC-γ 1의 분절을 확인한 결과 okadaic acid 40nmol 농도에서부터 분절형성이 증가됨을 확인하였다 (Fig. 2).

3. Okadaic acid 처리에 의한 Bcl-2 family 단백질의 발현

Okadaic acid가 Bcl-2 family 단백질 발현에 미치는 영

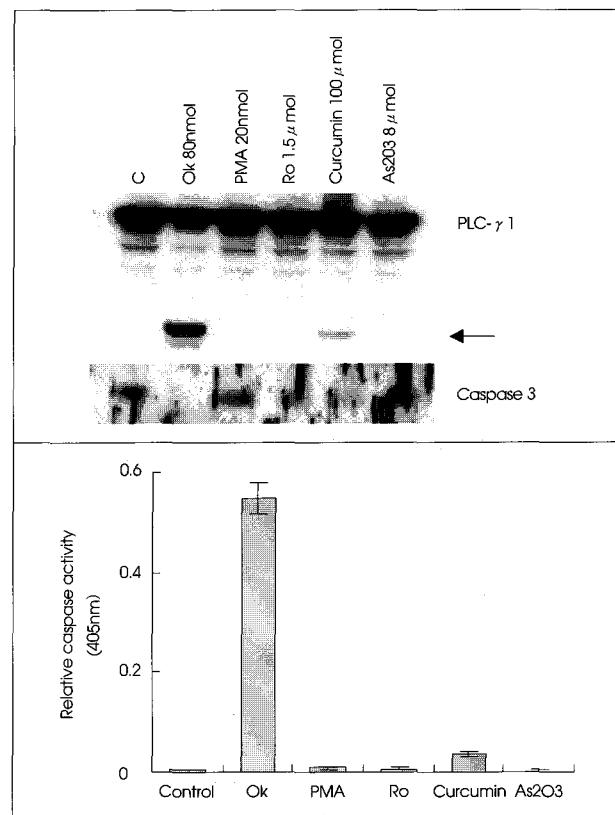


Fig. 1. Effect of various drugs on caspase 3 activity in FRTL-5 thyroid cells. FRTL-5 thyroid cells were treated with 80nmol okadaic acid, 20nmol PMA, 1.5 μmol Ro, 100 μmol curcumin and 8 μmol arsenic trioxide for 24 hours. Equal amounts of cell lysates (40 μg) were subjected to electrophoresis and analyzed by Western blot for caspase 3 and PLC-γ 1. The proteolytic cleavage of PLC-γ 1 was indicated by arrow. Enzymatic activities of caspase 3 were determined by incubation of 20 μg of total protein with 200 μmol chromogenic substrate (DEVD-pN) in a 100 μL assay buffer for 2 hours at 37°C. The release of chromophore p-nitroanilide (pNA) was monitored spectrophotometrically (405nm).

향을 조사하기 위하여 FRTL-5 갑상선 세포에 10, 20, 40, 60 및 80mmol 농도의 okadaic acid을 24시간 처리한 후 단백질을 추출하여 Western blot 분석을 시행하였다 (Fig. 3). 일반적으로 anti-apoptosis 기능이 알려진 Bcl-2 단백질의 발현은 okadaic acid 처리에 따라 단백질 발현이 미약하게 감소하는 현상을 보였다. Bcl-2와 같이 anti-apoptosis 기능을 함유한 Bcl-xL 단백질은 okadaic acid에 의하여 농도 의존적으로 감소하였다. 이상의 결과는 okadaic acid에 의한 apoptosis 유도는 Bcl-xL 단백질 발현 감소와 관련성이 있음을 제시한다.

4. Okadaic acid 처리에 의한 IAP family 단백질의 발현

Okadaic acid에 의한 caspase 저해제로 밝혀진 inhibitor of apoptosis protein(IAP) family 단백질의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 FRTL-5 갑상선 세포에 10, 20, 40, 60 및 80mmol 농도의 okadaic acid를 24시간 처

리한 후 cIAP1과 cIAP2 및 XIAP 단백질의 발현을 Western blot 방법으로 확인하였다. cIAP2 단백질은 okadaic acid 처리에 의해 단백질 발현 변화가 나타나지 않았다. 그러나 cIAP1과 XIAP 단백질은 okadaic acid에 농도 의존적으로 발현이 감소하는 현상을 보였다. 특히 XIAP 단백질 발현 감소는 okadaic acid를 20nmol 농도로 처리할 때부터 나타났다(Fig. 4).

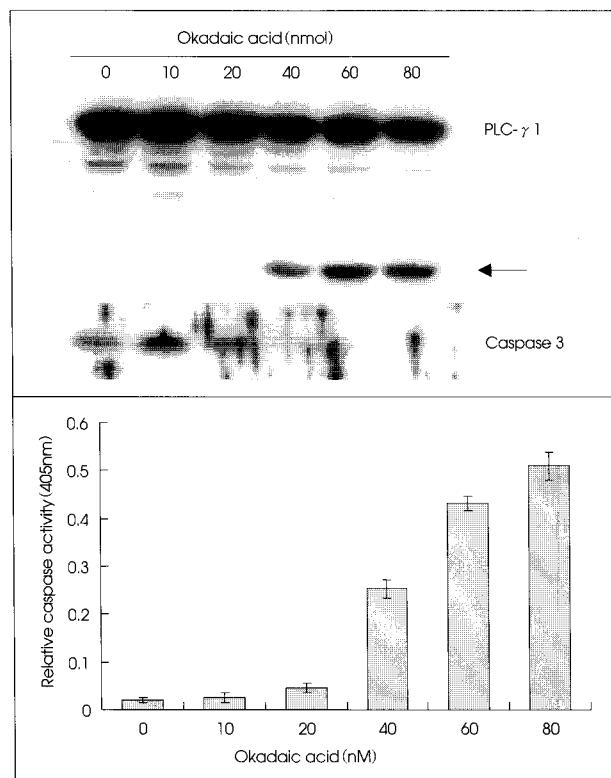


Fig. 2. Effect of okadaic acid on caspase 3 activity and proteolytic cleavage of PLC- γ 1. FRTL-5 thyroid cells were treated with indicated concentrations of okadaic acid. Equal amounts of cell lysates(40 μ g) were subjected to electrophoresis and analyzed by Western blot for caspase 3 and PLC- γ 1. The proteolytic cleavage of PLC- γ 1 was indicated by arrow. FRTL-5 thyroid cells were treated with the indicated concentrations of okadaic acid for 24 hours and harvested in lysis buffer. Caspase activity was determined as described in Fig. 1. Data are mean values from three independent experiments and bars represent standard deviations.

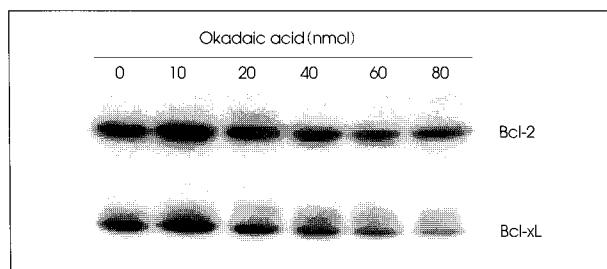


Fig. 3. The expression levels of Bcl-2 family proteins in FRTL-5 thyroid cells after treatment with okadaic acid. FRTL-5 thyroid cells were treated with indicated concentrations of okadaic acid. Equal amounts of cell lysates(40 μ g) were resolved by SDS-PAGE, transferred to membrane and probed with specific antibodies(anti-Bcl-2 and anti-Bcl-xL).

5. Okadaic acid 처리 시간에 따른 caspase 3 활성 및 PLC- γ 1 분절 변화

Okadaic acid 처리 시간에 따른 caspase 3 활성 및 PLC- γ 1 분절 영향을 조사하기 위하여 okadaic acid를

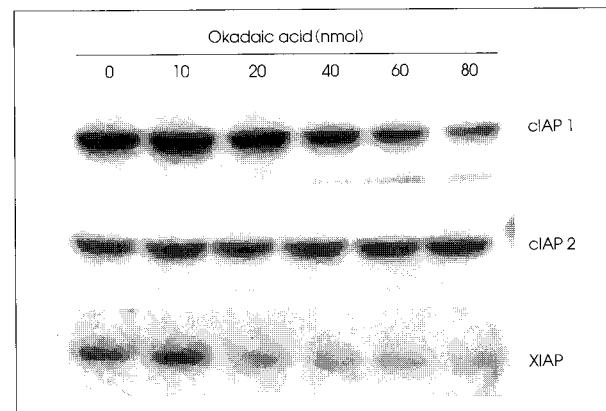


Fig. 4. The expression levels of IAP family proteins in FRTL-5 thyroid cells after treatment with okadaic acid. FRTL-5 thyroid cells were treated with indicated concentrations of okadaic acid. Equal amounts of cell lysates(40 μ g) were resolved by SDS-PAGE, transferred to membrane and probed with specific antibodies(anti-cIAP1, anti-cIAP2, and anti-XIAP).

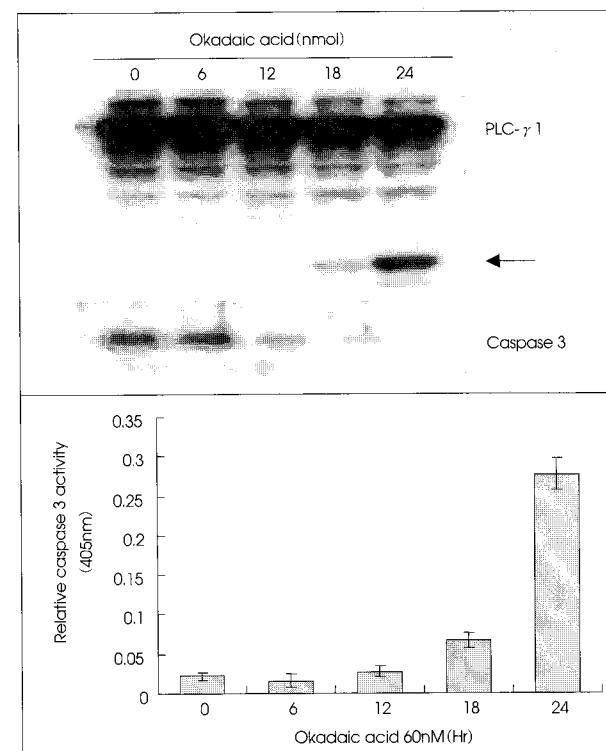


Fig. 5. Kinetic analysis of okadaic acid mediated caspase 3 activity and proteolytic cleavage of PLC- γ 1. FRTL-5 thyroid cells were treated or untreated with 60nmol okadaic acid for the indicated periods of time. Equal amounts of cell lysates(40 μ g) were subjected to electrophoresis and analyzed by Western blot for caspase 3 and PLC- γ 1. The proteolytic cleavage of PLC- γ 1 was indicated by arrow. FRTL-5 thyroid cells were treated with the indicated concentrations of okadaic acid for 24 hours and harvested in lysis buffer. Caspase activity was determined as described in Fig. 1. Data are mean values from three independent experiments and bars represent standard deviations.

발현은 12시간부터 감소하였다. Okadaic acid 처리 시간에 의한 PLC- γ 1 분절 현상은 18시간 때부터 관찰되었다 (Fig. 5).

6. Okadaic acid 처리 시간에 따른 IAP 및 Bcl-2 family 단백질의 발현 변화

Okadaic acid 처리 시간에 따른 IAP 및 Bcl-2 family 단백질의 발현 변화를 조사하기 위하여 okadaic acid를 60 nmol 농도로 처리한 후 6시간 간격으로 단백질을 추출하여 IAP family 단백질의 발현을 측정하였다. cIAP1과 XIAP 단백질은 12시간부터 감소하였으며, 이들 단백질 감소는 okadaic acid 처리 시간에 의존적으로 감소함을 보였다. Bcl-2 발현은 24시간에서 감소 현상을 보였으나, Bcl-xL 단백질은 12시간부터 감소하기 시작하였다. Okadaic acid에 의한 Bcl-xL 감소는 처리 시간에 의존적으로 감소하였다 (Fig. 6).

7. Okadaic acid에 의한 apoptosis 유도과정에서 caspase 3 의존성에 대한 영향

Okadaic acid에 의한 apoptosis 유도과정에서 caspase 3 의존성을 조사하기 위하여 caspase 3의 특이적인 저해제로 알려진 Z-VAD-fmk (VAD peptide)를 단독 또는 60 nmol 농도의 okadaic acid와 동시에 처리한 후 caspase 3 활성 및 PLC- γ 1 단백질의 절단 현상을 조사하였다. Caspase 3 저해제인 VAD peptide는 caspase 3 활성을

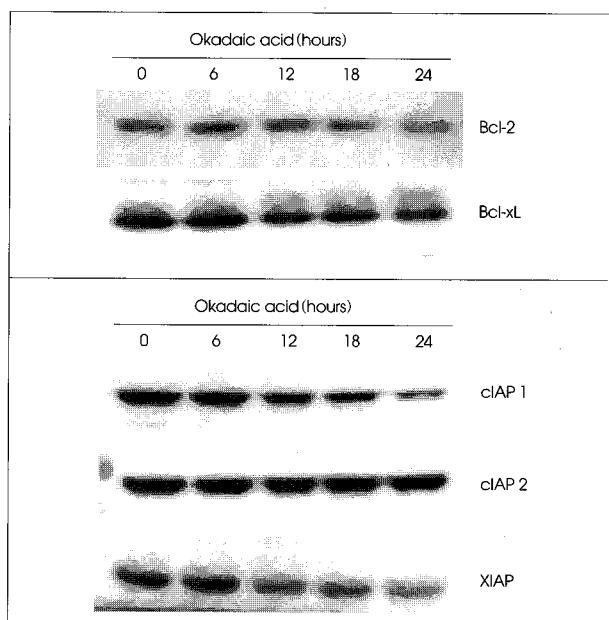


Fig. 6. Kinetic analysis of okadaic acid mediated expression levels of Bcl-2 and IAP family proteins. FRTL-5 thyroid cells were treated with 60nmol okadaic acid for the indicated periods of time. Equal amounts of cell lysates (40 μ g) were resolved by SDS-PAGE, transferred to membrane and probed with specific antibodies (anti-Bcl-2, anti-Bcl-xL, anti-cIAP1, anti-cIAP2 and anti-XIAP).

okadaic acid를 처리하지 않은 대조군 수준으로 저해하였다. 또한 caspase 3의 기질 단백질로 작용하는 PLC- γ 1 단백질의 절단 현상도 방지함을 확인하였다 (Fig. 7).

8. Okadaic acid 처리에 의한 세포질로 cytochrome c 의 유리 현상

Okadaic acid에 의한 apoptosis 유도과정에서 미토콘드리아의 cytochrome c가 세포질로 유리되는지를 조사하기 위하여 여러 농도의 okadaic acid를 처리한 후 세포질에 유

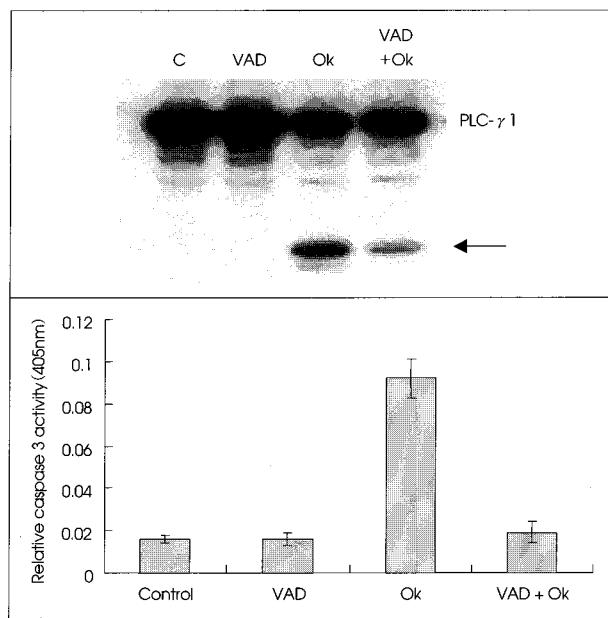


Fig. 7. Caspase-mediated apoptosis induced by okadaic acid. FRTL-5 thyroid cells were incubated with z-VAD-fmk or solvent for 1 hour before treatment with okadaic acid. Equal amounts of cell lysates (40 μ g) were subjected to electrophoresis and analyzed by Western blot for caspase 3, PLC- γ 1, and Bax. The proteolytic cleavage of PLC- γ 1 was indicated by arrow. FRTL-5 thyroid cells were incubated with z-VAD-fmk or solvent for 1 hour before treatment with okadaic acid. Caspase activity was determined as described in Fig. 1. Data are mean values from three independent experiments and bars represent standard deviations.

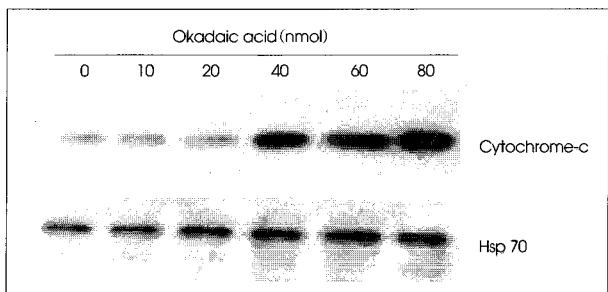


Fig. 8. Release of cytochrome c in okadaic acid-treated FRTL-5 thyroid cells. FRTL-5 thyroid cells were treated with indicated concentrations of okadaic acid. Cytosolic extracts were prepared as described under Material and Methods. Cytosolic protein (30 μ g) was resolved on 12% SDS-PAGE and then transferred to membrane and probed with specific anti-cytochrome c antibody, or with anti-Hsp 70 to serve as control for the level of protein loaded.

리된 cytochrome c를 확인하였다. 세포질로의 cytochrome c 유리 현상은 40nmol 농도의 okadaic acid를 처리할 때부터 급격히 증가하는 현상을 보였다. 세포질 단백질의 정량을 위하여 Hsp70 단백질을 Western blot으로 확인한 결과 동일량의 단백질 loading을 확인 할 수 있었다(Fig. 7).

고 찰

Okadaic acid는 protein phosphatase 1과 2A의 저해제로 가장 일반적으로 사용되는 C38 지방산의 polyether 화합물로서 해조류인 *Halicontria okadai* 등에서 처음 분리되었다⁶⁾¹²⁾. Okadaic acid에 의한 암 유발 또는 억제, 암 분화 및 apoptosis 유도 등 다양한 생물학적 효과가 보고 되었으나, apoptosis 유도 기전에 대한 명확한 기전은 아직 밝혀지고 있지 않다^{7~11)}. 본 연구에서는 okadaic acid에 의한 FRTL-5 갑상선 세포의 생육억제 및 apoptosis 유도에 미치는 영향을 규명하고, 더 나아가 apoptosis과정에 관련된 여러 단백질의 발현조절을 분자 생물학적인 방법으로 이해하고자 하였다.

Okadaic acid는 암세포주에 apoptosis를 일으키며 그 기전으로서 caspase 3가 관련되어 있는 것으로 알려져 있다¹³⁾¹⁴⁾. 본 연구에서는 okadaic acid가 갑상선 세포주에 apoptosis를 유발시키며 그 기전으로서 caspase 3가 관여하는지를 규명하기 위해 먼저 FRTL-5 갑상선 세포주에 다양한 농도의 okadaic acid(10~80nmol)를 24시간 처리 한 후 caspase 3 활성과 caspase 3 기질로 작용하는 PLC-γ1 단백질의 분절 현상을 분석하였다. 이 결과 okadaic acid에 의한 FRTL-5 갑상선세포의 apoptosis는 농도와 시간의 준적으로 유도되었다. 32 kDa의 caspase 3는 비활성화 형태이며 상위(upstream)의 caspase 8, 9에 의해 절단되면 활성화된 형태로 존재한다¹⁵⁾¹⁶⁾. 따라서 비활성화 형태의 caspase 3 단백질의 양적 감소는 활성 형태의 caspase 3가 증가함을 의미한다¹⁵⁾¹⁶⁾. FRTL-5 갑상선 세포에 okadaic acid를 처리한 결과 caspase 3의 비활성 형태의 caspase 3 단백질의 양적 감소와 caspase 3 활성의 증대가 확인되었으며 이런 현상은 okadaic acid에 의한 FRTL-5 세포주의 apoptosis 유도에 caspase 3가 관여함을 시사한다.

세포주기 조절의 주요한 기능을 하는 Rb 단백질 및, 세포의 신호 전달계의 PKC delta와, PLC-γ1 단백질 등이 caspase 3의 기질로 작용한다고 보고되고 있다^{17~19)}. 본 실험에서도 okadaic acid를 처리한 결과 PLC-γ1 단백질의 분절 생성이 확인되었으며 이 결과는 okadaic acid에 의한 apoptosis 유도 과정에 caspase 3가 관여하여 그 결과로서 PLC-γ1의 분절화가 유도된 것으로 생각된다. 또한 caspase 3의 활성화가 okadaic acid에 의한 apoptosis 유발

과 관련이 있는지를 확인하기 위하여 caspase 3효소 활성을 저해하는 VAD peptide를 okadaic acid과 동시에 처리하였다. VAD peptide는 caspase에 경쟁적 저해제로 작용함으로서 caspase 3의 활성을 억제하는 작용을 한다²⁰⁾²¹⁾. Okadaic acid를 처리한 군에 VAD peptide를 동시에 작용 시킬 때 caspase 3 활성의 억제 및 PLC-γ1 단백질의 분절의 방지가 나타났으며 이 결과는 okadaic acid에 의한 apoptosis과정에 caspase 3가 직접적으로 관여함을 보여준다.

최근에 caspase 활성을 저해하는 여러 단백질들의 기능이 밝혀지고 있다¹⁶⁾²²⁾²³⁾. 이들 단백질 중 대표적인 IAP family 단백질은 Bcl-2의 작용 기전과 달리 직접적으로 caspase의 활성을 저해한다고 알려지고 있다¹⁶⁾²²⁾²³⁾. 본 연구에서 okadaic acid 처리에 따른 caspase inhibitor인 cIAP1, cIAP2과 XIAP의 발현 정도를 Western Blot 법으로 확인한 결과 okadaic acid 처리는 cIAP2 단백질 발현이 미약하게 감소시켰으며, IAP family 단백질 중 cIAP1과 XIAP 단백질 발현은 cIAP2 보다 더 현저히 감소함을 보였다. 이 결과는 okadaic acid에 의한 cIAP1과 XIAP 단백질 발현 감소는 직접적으로 caspase 3 활성 증가를 야기하여 PLC-γ1 단백질 분절을 유도하는 것으로 생각된다. Caspase의 활성은 IAP family 단백질 외에도 cytochrome c와의 관련성이 보고 되고 있다^{24~26)}. Cytochrome c는 미토콘드리아에 존재하는 단백질로서 apoptosis가 유도될 때는 미토콘드리아에서 세포질 쪽으로 유리된다. Caspase 3 활성의 신호전달의 과정에서의 상위단계의 조절인자로 cytochrome c가 미토콘드리아 막에서 해리되어 cytosol로 분리되면 caspase 9와 Apaf-1 단백질과 결합하여 caspase 9를 활성화 시키며, 활성화된 caspase 9는 다시 caspase 3을 활성화시킨다고 알려지고 있다^{24~26)}. 본 연구에서 okadaic acid 처리에 의해 FRTL-5 갑상선세포에서 cytochrome c가 세포질 내로 유리되는지를 측정한 결과 cytochrome c의 유리가 okadaic acid 처리농도에 의존적으로 유리됨이 관찰되었으며, 이 결과로 보아 okadaic acid는 caspase 3 활성화는 물론 그 위 단계의 apoptosis 신호전달과정에도 관여함을 알 수 있다.

이상의 결과를 통해 해조류 등에서 분리되는 okadaic acid는 갑상선세포주인 FRTL-5에 apoptosis를 유발할 수 있으며, 그 기전으로서 caspase 3가 관여함을 알 수 있다. Okadaic acid에 의한 apoptosis 유도는 이 물질이 종양 화학 예방제로서 사용될 가능성이 있음을 시사하며, 향후 본 연구의 결과와 더불어 okadaic acid의 apoptosis 유도기전이 보다 명확히 규명됨으로서 이 물질의 활용성이 밝혀지리라고 생각된다.

요 약

본 연구에서는 FRTL-5 갑상선세포에서 protein phosphatase type 1(PP-1)과 type 2A(PP-2A) 효소의 억제제인 okadaic acid에 의한 apoptosis 유도 기전에 대하여 이해하고자 하였다. FRTL-5 갑상선세포에 다양한 농도(10~80nmol)의 okadaic acid를 처리 한 후 caspase 3 와 PLC-γ1 분자를 확인 한 결과 40nmol 농도에서부터 caspase 3 활성과 PLC-γ1 분자가 나타남을 확인하였다. Okadaic acid에 의한 apoptosis 유도 기전을 조사한 결과 anti-apoptotic 기능이 있는 Bcl-2 단백질 발현은 미약하게 감소하였으나 Bcl-xL은 농도 의존적으로 급격한 감소를 보였다. Caspase 3 효소활성을 저해하는 IAP 단백질 중 cIAP2는 okadaic acid에 영향을 받지 않았으나 cIAP1과 XIAP 단백질 발현은 농도 의존적으로 감소하였다. Okadaic acid에 의한 apoptosis 유도는 caspase 3 의존적인 기전을 보였다. Caspase 3 특이억제제를 okadaic acid와 동시에 처리 시 apoptosis가 억제되었으며 PLC-γ1 단백질의 절단 현상도 방지되었다. Caspase 3의 활성을 유도하는 cytochrome c의 유리는 okadaic acid 처리 농도에 의존적으로 유리하였다. 결론적으로, okadaic acid에 의한 apoptosis 유도는 caspase 3 의존적이며, Bcl-2와 IAP family 단백질 감소현상에 의하여 야기되는 것으로 생각된다.

중심 단어 : 갑상선암종 · Okadaic acid · Apoptosis · Caspase 3.

References

- 1) Pal S, Choudhuri T, Chattopadhyay S, et al : Mechanisms of curcumin-induced apoptosis of Ehrlich's ascites carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 ; 288 : 658-665
- 2) Gupta S, Mukhtar H : Chemoprevention of Skin Cancer through Natural Agents. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001 ; 14 : 373-385
- 3) Lippman SM, Spitz MR : Lung cancer chemoprevention : an integrated approach. *J Clin Oncol.* 2001 ; 19 : 74S-82S
- 4) Kelloff GJ, Johnson JR, Crowell JA, et al : Approaches to the development and marketing approval of drugs that prevent cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1995 ; 4 : 1-10
- 5) Ames BN, Gold LS, Willett WC : The causes and prevention of cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995 ; 92 : 5258-5265
- 6) Fujiki H, Saganuma M : Tumor promotion by inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A : the okadaic acid class of compounds. *Adv Cancer Res.* 1993 ; 61 : 143-194
- 7) Kiguchi K, Glesne D, Chubb CH, Fujiki H, Huberman E : Differential induction of apoptosis in human breast tumor cells by
- okadaic acid and related inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A. *Cell Growth Differ.* 1994 ; 5 : 995-1004
- 8) Ishida Y, Furukawa Y, Decaprio JA, Saito M, Griffin JD : Treatment of myeloid leukemic cells with the phosphatase inhibitor okadaic acid induces cell cycle arrest at either G1/S or G2/M depending on dose. *J Cell Physiol.* 1992 ; 150 : 484-492
- 9) Kiguchi K, Giometti C, Chubb CH, Fujiki H, Huberman E : Differentiation induction in human breast tumor cells by okadaic acid and related inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 ; 189 : 1261-1267
- 10) Giese G, Wiegers W, Kubbe M, Scherbarth A, Traub P : Okadaic acid Co-induces vimentin expression and cell cycle arrest in MPC-11 mouse plasmacytoma cells. *J Cell Physiol.* 1995 ; 163 : 145-154
- 11) Morimoto Y, Morimoto H, Okamura H, et al : Upregulation of the expression of Fas antigen and Fas ligand in a human submandibular gland ductal cell line by okadaic acid. *Arch Oral Biol.* 2000 ; 45 : 657-666
- 12) Saganuma M, Fujiki H, Suguri H, et al : Okadaic acid : an additional non-phorbol-12-tetradecanoate-13-acetate-type tumor promoter. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988 ; 85 : 1768-1771
- 13) Li DW, Xiang H, Mao YW, et al : Caspase-3 is actively involved in okadaic acid-induced lens epithelial cell apoptosis. *Exp Cell Res.* 2001 ; 266 : 279-291
- 14) Kwon TK : Phorbol myristate acetate inhibits okadaic acid-induced apoptosis and downregulation of X-linked inhibitor of apoptosis in U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 ; 287 : 135-141
- 15) Grutter MG : Caspases : key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol.* 2000 ; 10 : 649-655
- 16) Deveraux QL, Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salvesen GS, Reed JC : Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J.* 1999 ; 18 : 5242-5251
- 17) An B, Dou QP : Cleavage of retinoblastoma protein during apoptosis : an interleukin 1 beta-converting enzyme-like protease as candidate. *Cancer Res.* 1996 ; 56 : 438-442
- 18) Koriyama H, Kouchi Z, Umeda T, et al : Proteolytic activation of protein kinase C delta and epsilon by caspase-3 in U937 cells during chemotherapeutic agent-induced apoptosis. *Cell Signal.* 1999 ; 11 : 831-888
- 19) Park JW, Choi YJ, Suh SI, et al : Bcl-2 overexpression attenuates resveratrol-induced apoptosis in U937 cells by inhibition of caspase-3 activity. *Carcinogenesis.* 2001 ; 22 : 1633-1639
- 20) Decker P, Isenberg D, Muller S : Inhibition of caspase-3-mediated poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) apoptotic cleavage by human PARP autoantibodies and effect on cells undergoing apoptosis. *J Biol Chem.* 2000 ; 275 : 9043-9046
- 21) Qi XM, He H, Zhong H, Distelhorst CW : Baculovirus p35 and Z-VAD-fmk inhibit thapsigargin-induced apoptosis of breast cancer cells. *Oncogene.* 1997 ; 15 : 1207-1212
- 22) Deveraux QL, Stennicke HR, Salvesen GS, Reed JC : Endogenous inhibitors of caspases. *J Clin Immunol.* 1999 ; 19 : 388-398
- 23) Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC : The

- c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases.* EMBO J. 1997 ; 16 : 6914-6925
- 24) Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al : *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade.* Cell. 1997 ; 91 : 479-489
- 25) Yang J, Liu X, Bhalla K, et al : *Prevention of apoptosis by Bcl-2 : release of cytochrome c from mitochondria blocked.* Science. 1997 ; 275 : 1129-1132
- 26) Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD : *The release of cytochrome c from mitochondria : a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis.* Science. 1997 ; 275 : 1132-1326