

형질전환된 *Nicotiana tabacum* 현탁세포배양에서 항산화제가 세포생존도 및 hGM-CSF 생산에 미치는 영향

김 용 훈 · 이 상 윤 · † 김 동 일
인하대학교 공과대학 생명화학공학부
(접수 : 2004. 9. 2., 게재승인 : 2004. 10. 19.)

Effects of Antioxidants on Cell Viability and hGM-CSF Production by Transgenic *Nicotiana tabacum* Suspension Cultures

Yong-Hoon Kim, Sang-Yoon Lee, and Dong-Il Kim†
Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
(Received : 2004. 9. 2., Accepted : 2004. 10. 19.)

Production of therapeutic proteins by transgenic plant cell suspension cultures is an attractive system alternative to the other expression system. However, plant cell cultures have shown low expression level of foreign proteins and decreased cell viability by the changes of culture conditions. Therefore, it is necessary to enhance cell viability during the culture period. In this study, a quantitative analysis technique was designed to measure relative cell viability for plant suspension cells which have cell wall and aggregates. It was found that the programmed cell death of plant cells by apoptosis was essentially linked with the apoptotic pathway of animal cells. Therefore, effects of nicotinamide, 3-aminobenzamide and antioxidants on cell viability and apoptosis were examined in transgenic *Nicotiana tabacum* cells producing hGM-CSF. With those additives, cell viability could be maintained and apoptosis could be reduced. In the result, the extracellular production of hGM-CSF could be enhanced 2.5 fold. It was also found that the supplementation of glutathione and ascorbic acid suppressed both the cold stress-induced decrease in cell viability and the increase of total genomic DNA fragmentation.

Key Words : Cell viability, apoptosis, antioxidants, *Nicotiana tabacum*, hGM-CSF

서 론

재조합된 유용 단백질의 생산성은 세포 생존율과 직접적으로 비례한다. 최근에는 동물세포와 식물세포의 죽음에 이르는 경로의 유사성이 밝혀지고 있으며(1) 재조합된 유용 단백질을 생산하는 형질전환 식물세포의 경우도 이와 유사할 것으로 판단된다. 따라서 재조합된 유용 단백질의 생산성을 높이기 위해서 여러 외부 스트레스로 인한 세포 생존율 저하의 억제 및 세포사멸 방지기술의 개발이 더욱 필요하다. 한편, 식물세포는 동물세포와는 달리 두꺼운 세포벽을 가지고 있기 때문에 염료를 이용하여 죽은 세포를 관찰하는 데는 어려움이 있으며, 더욱이 식물세포 현탁배양에서는 세포간 세포 응집체를 형성하기 때문에 생존 단일 세포를 정량하는 것은 더

욱 어려움이 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해 원형질막을 자유로이 투과하는 비형광성, 비극성 물질인 fluorescein diacetate(FDA)를 이용함으로써 가수분해 효소인 esterase의 활성을 매개변수로 하여 식물 현탁 세포의 상대적 생존율(%)을 측정할 수 있다(2). 반면 죽은 세포는 FDA를 분해할 수 없어 형광을 발하지 못한다. 이러한 분석 방법은 재조합 유용 단백질의 생산성을 높이기 위한 세포사멸 방지기술 개발에서의 분석 방법으로 이용될 수 있을 것이다.

동물세포의 핵 내에 많이 존재하는 염색질 단백질인 Poly (ADP-ribose) polymerase는 DNA 수리, 복제, 유전체 보전에 관련된 생리학적 기능을 하는 효소이다(3). 동물세포에서는 apoptosis 경로 중에 caspase-3에 의한 Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)의 절단은 필수적인 과정이다. 한편, 여러 자극에 의한 DNA의 손상은 poly(ADP-ribosyl)ation을 이끄는 PARP를 활성화시키며, 과도한 PARP 활성화는 세포내 많은 에너지 소비의 원인이 된다(4). 이 과정에서 NAD⁺가 감소하고, ATP가 고갈된다. 이와 같은 세포내 에너지의 과도한 소비는 세포의 apoptosis를 이끈다(4). 여기에 NAD⁺의 전구체가

† Corresponding Author : Department of Biological Engineering,
Inha University, Incheon 402-751, Korea
Tel : +82-32-860-7515, Fax : +82-32-872-4046
E-mail : kimdi@inha.ac.kr

며, PARP의 공동기질로 이용되어 억제 작용을 하는 것으로 알려진 수용성 비타민 B₃인 nicotinamide (NIC)를 첨가하여 NAD⁺의 감소를 방지하고, ATP의 고갈을 억제시킴으로써 세포의 apoptosis를 억제하였다(4, 5). 배양된 soybean 세포에서도 PARP가 oxidative stress에 대한 반응과 관련이 있고, PARP 활성 억제물질로 알려진 NIC와 3-aminobenzamide (3-AB)의 첨가시 과산화수소에 의해 유도된 apoptosis가 줄었다고 보고된 바 있다(6). 또한, Reactive oxygen species (ROS)는 여러 다른 개체에서 apoptosis 유도인자로 알려져 있다(7). 특히, ROS에 의한 세포내 자유 Ca²⁺의 증가는 세포내 물질들의 분해효소인 phosphatase, protease, endonuclease 등과 같은 Ca²⁺ 의존적 효소의 활성화에 의한 apoptosis 증가를 매개한다(8). 또한 Ca²⁺는 염색질의 형태를 변화시켜 DNase I과 다른 endonucleases의 접근을 용이하게 한다(9). 이러한 endonucleases를 통하여 DNA가 절편화되고 apoptosis가 일어난다. 동물세포에서의 caspase-3와 세포내 Ca²⁺에 대한 항산화제의 역할은 이미 연구된 바 있으며, 배지 첨가제로써 항산화제와 환원제는 핵의 응축, DNA 절편화 및 caspase-3 활성을 억제한다(10). 이러한 Ca²⁺에 의해 매개된 산화적인 세포의 손상에서 항산화제의 apoptosis 억제 기능은 직접적인 free radical과의 상호작용에 의한 세포내 free radical scavengers로서의 역할을 통한 Ca²⁺ 섭취의 저해, 세포내 Ca²⁺ chelator, Ca²⁺ 방출에 의한 것이라 설명하고 있다(11). 또한 세포내 산화-환원 전위는 세포 독성 및 apoptosis의 조절에서 중요한 역할을 수행한다(10). 여기서 산화-환원제들은 전위차에 의해 활성화되는 채널이나 Ca²⁺에 의해 활성화되는 채널들을 조절하는 역할을 수행하며, 동물세포에서 다양하게 연구되고 있다. 또한 최근 식물세포에서도 glutathione의 환원된 형태인 dithiothreitol (DTT)이나 다른 환원체인 ascorbic acid가 핵포 안의 이온 채널 활성화를 조절하며, 이를 통하여 산화적 스트레스에 대한 반응, 중금속에 대한 저항성, 무독화와 같은 세포내 주요 방어 기작들에 관련된 이온 수송을 매개한다고 보고되었다(12).

본 연구에서는 먼저 두꺼운 세포벽과 응집체를 형성하고 있어 생존 단일세포의 정량이 어려운 형질전환된 현탁 식물세포의 상대적 생존율 정량법을 구축하고자 하였다. 또한 세포의 형태적 변화, DNA 절편화, caspase-3 정량 등을 통하여 식물세포에서도 apoptosis가 일어남을 확인하였다. 배양환경 변화에 따른 세포생존률 저하 및 apoptosis의 증가를 억제하기 위하여 항산화제를 포함한 여러 가지 배지 첨가물들이 세포의 증식 및 유전자재조합 human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF)생산에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

세포주

본 연구에 사용한 형질전환된 식물세포는 전북대학교로부터 분양받은 *Nicotiana tabacum* 세포주이다. 이는 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용하여 형질전환 되었으며, hGM-CSF를 생산한다.

세포배양 및 배지

생장 배지로는 Murashige & Skoog (MS) 기본 배지에 0.2 mg/L 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D), 0.02 mg/L kinetin, MS vitamin, 0.1 g/L myo-inositol, 30 g/L sucrose를 첨가하여 사용하였다. pH는 5.9로 맞춘 뒤 121°C, 1.2 기압에서 가압 증기 멸균한 뒤 0.2 mm filter로 여과한 kanamycin 농축 용액을 100 mg/L의 농도가 되도록 첨가하였다. 배양 조건은 25°C, 120 rpm, 암조건을 유지하였다.

세포량 측정

세포 증식을 측정하기 위해서 세포생체량 (fresh cell weight, FCW)과 세포건조량 (dry cell weight, DCW)을 측정하였다. 100-mL Erlenmeyer flask에서 배양한 현탁세포를 Buchner funnel을 이용하여 Whatman No. 1 여과지 상에서 시료의 배양액을 걸러내었다. 배지와 동량의 증류수로 2~3회 세척한 후, 진공펌프를 이용하여 수분을 제거하고 미리 무게를 측정한 weighing dish에 세포를 옮겨 담아 화학저울로 FCW를 측정하였다. FCW 측정 후 60°C drying oven에서 24 시간동안 향량이 될 때까지 건조하여 DCW를 측정하였다.

변형 FDA법

세포생장과 관련하여 세포의 생존율은 FDA법을 응용하여 측정하였으며, 각각의 시료는 spectrofluorophotometer (RF-5301PC, Shimadzu)를 이용하여 491 nm excitation filter와 510 nm emission filter에서 형광도를 측정하였다. 배양기간 중 절대적인 형광세기가 가장 높은 세포를 100% 생존세포로 가정하고, 세포크지수 (cell size index, F/D)를 고려하여 일정량의 DCW당 형광도로 환산하여 상대적인 생존율을 측정하였다. 또한, 100% 생존 세포로 가정한 세포를 이용하여 인위적으로 생존율을 조절한 후, 형광도를 측정하여 생존율에 대비한 형광세기의 표준 곡선을 작성했다. 배양 중 세포의 형광도를 표준 곡선과 비교하여 상대적인 세포 생존율을 측정하였다. 세포 형광도 측정의 자세한 방법은 다음과 같다. FCW 0.1 g 세포에 0.7 mL Tris buffer (pH 6.7)를 넣은 후 vortexing하여 세포간 응집체를 단일 세포로 분리시킨다. 여기에 용매로 acetone을 사용하여 만든 0.01% FDA 용액을 0.1 mL 넣은 후, 30초 동안 vortexing하면서 반응시킨다. 초음파 세포 파쇄기를 이용하여 얼음 속에서 1분 30초 동안 세포를 파쇄한다. 저온 원심분리기를 이용하여 4°C, 13,000 rpm에서 10분 동안 원심분리한다. 상등액 0.6 mL를 취한 후, 증류수로 1/5 희석하여 spectrofluorophotometer를 이용하여 형광도를 측정하였다.

Caspase-3 활성 측정

FCW 0.2 g 세포에 0.8 mL Tris buffer (pH 6.7)를 넣고 vortexing한 후, 5분 동안 얼음에서 온도를 낮춘 다음 초음파 세포 파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 4°C, 14,000 rpm으로 7분 동안 원심분리한 후, 상등액 50 mL를 취하였다. Caspase-3 inhibitor를 처리할 시료에는 2 mL의 inhibitor를 섞어 상온에서 5분 이상 정치하였다. 10 mM DTT를 첨가한 2 × reaction buffer를 50 mL씩 첨가하였다. 각각의 반응액에 substrate (AC-DEVD-AMC)를 2 mL씩 첨가하여 37°C

에서 30분 동안 반응시켰다. 반응이 진행된 샘플을 spectrofluorophotometer를 이용하여 360 nm excitation filter와 460 nm emission filter에서 형광도를 측정하였다. Caspase-3 활성의 정량을 위한 AMC 표준 적정곡선을 작성하는 방법은 먼저 1 mM AMC를 DMSO에 녹인 후, 희석하여 각각 0, 5, 10, 25, 50 mM stock 용액을 만든다. 각각을 증류수 또는 Tris buffer로 희석하여 최종 농도 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 mM로 만든다. 각각을 spectrofluorophotometer를 이용하여 360 nm excitation filter와 460 nm emission filter에서 형광도를 측정하였다. Caspase-3 활성 unit 환산을 위하여 표준 적정곡선 기울기 (Δ Fluorescence Intensity/ Δ mM AMC)를 사용하였다. $\{(\text{assay F.I.} - \text{blank F.I.}) / \text{hr}\} * (1 / \text{curve slope})$ 식을 이용하여 caspase-3 unit으로 환산할 수 있다. 여기서 hr은 반응시간이며, curve slope는 Δ F.I./ Δ mM AMC이다.

Total genomic DNA 분석

FCW 1~2 g의 세포에 액체 질소를 붓고 급속히 얼린 후, 24시간 동안 동결 건조기에 넣어 세포 내 수분을 완전히 제거하였다. 동결 건조된 세포를 막자사발에 넣어 심하게 갈고, powder를 0.1 g씩 eppendorf tube에 나누어 담는다. DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)를 사용하여 DNA를 추출하고 1.2% agarose gel에 10 mL씩 loading한 후 전기영동 장치를 이용하여 100 V 전압으로 DNA를 크기별로 분리하였다. 젤을 10 mg/mL ethidium bromide에 15분 동안 담가 염색한 후 3차 증류수에서 5분간 탈염한 후, UV로 촬영하였다. DNA 추출 방법은 kit 제작회사의 표준 방법을 사용하였다.

hGM-CSF 정량

생산된 hGM-CSF의 양은 배양액을 ELISA 분석 kit (PharMingen Inc., USA)를 사용하여 450 nm에서 측정하였으며, 분석 방법은 ELISA kit 제작회사의 표준 방법을 사용하였다.

결과 및 고찰

현탁 식물세포에서의 apoptosis 확인

동물세포에서의 apoptosis 특징은 세포의 수축, 염색질의 응축, DNA 절편화, 원형질 막의 기포화 등과 같은 생리학적, 형태학적 변화이다. 이러한 세포의 형태학적 변화를 야기시키는 중심적인 역할을 하는 효소가 caspase인데, 이러한 특이적 합성 기질을 분해하는 caspase 활성의 정량화를 통해 apoptosis 정도를 확인할 수 있다(13). 또한 동물세포의 apoptosis 특징들이 식물세포에서도 똑같이 나타나며, 진화과정에서의 공통점과 방어기작을 설명하는데 유리하다(14). 또한 식물체에서의 programmed cell death (PCD)가 단일세포에서도 나타남을 모델 종을 포함한 많은 종에서 확인되었고, 여러 가지 PCD 유발인자들을 통해 세포배양에서의 PCD 연구가 가능하게 하였다(15). 본 연구에서는 식물 현탁 세포에서도 apoptosis의 특징들이 나타남을 확인하기 위해 세포의 형태적인 변화, DNA 절편화, 생존도 측정, caspase-3 정량화 등을 수행하였다. 먼저, 담배 현탁세포에서 apoptosis 유발인자로 알려진 heat shock(5)과 토마토 현탁세포에서 PCD 유발

인자로 알려진 camptothecin(16)을 처리해서 광학 현미경을 이용하여 100배의 배율로 관찰한 사진이다(Fig. 1). 특히, 담배 현탁세포에서 PCD 유발인자로 알려진 cold stress를 가했을 시 DNA 절편화 현상을 관찰할 수 있다(17). 본 연구에서는 apoptosis 유발인자로 알려진 heat shock과 camptothecin을 처리하여 DNA 절편화 현상이 나타남을 확인하였다(Fig. 2). 식물 현탁세포에서의 apoptosis 정도를 확인하기 위하여 이미 동물세포에서 apoptosis 기작의 수행역할을 하는 것으로 알려진 caspase-3의 정량 분석을 수행하였다. 현재 식물세포에서도 caspase 3-like activity가 있음을 확인하였고, 특히 caspase-3 inhibitor에 의해 그 작용이 억제됨이 확인되었다(18). Caspase-3 정량 분석을 위하여 특이적으로 반응하여 형광을 띠는 합성 기질 (Ac-DEVD-AMC)의 절단 정도를 측정하였다(13). Cold stress를 가했을 시, 대조구에 비하여 높은 caspase-3 활성을 나타냈고, caspase-3 inhibitor를 첨가했을 시, 대조구에 비하여 낮은 caspase-3 활성을 나타내었다(Fig. 3). 이러한 cysteine protease로 알려진 caspase를 통한 apoptosis 연구는 동물세포와 식물세포(19)에서는 물론 곤충세포(20)에서도 연구되고 있으며, cysteine protease inhibitor를 배지에 첨가하여 proteolytic activity 변화를 관찰한 바 있다(20).

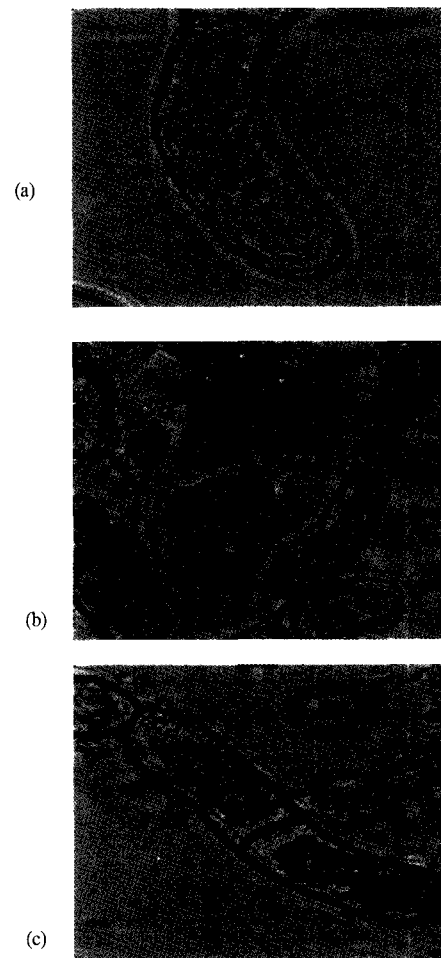


Figure 1. Micrographs of (a) normal cells, (b) dying cells by heat shock for 4 hr and (c) dying cells by camptothecin.

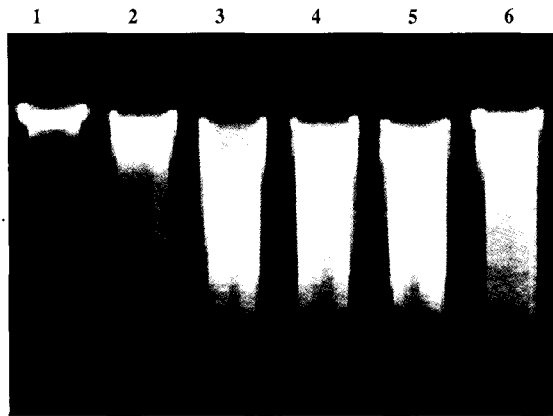


Figure 2. DNA fragmentation during heat shock or camptothecin-induced apoptosis in *Nicotiana tabacum* cells. Lanes 1-3, DNA from cells cultured for 5, 7 and 9 days; lanes 4 and 5, DNAs from cells with recovery time for 20 hours after exposed to 44°C for 4 hours at 4 day; lane 6, DNAs from cells with time for 24 hours after treated camptothecin(5 μ M) at 4 day.

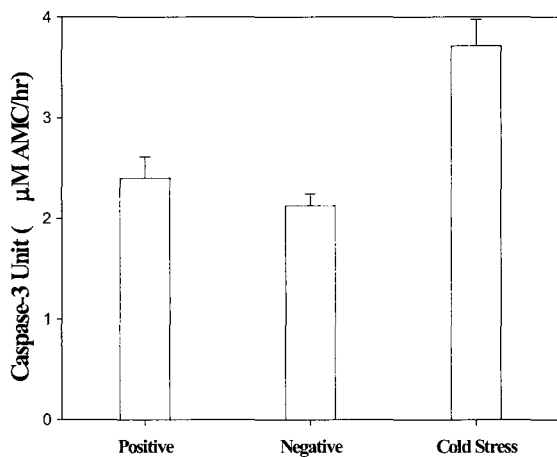


Figure 3. Caspase-3 unit of apoptotic cells by cold stress (4°C for 5 days). Blank, Tris buffer + reaction buffer + substrate; positive, not treated control cell lysates + buffer + substrate; negative, apoptosis induced cell lysates + buffer + inhibitor + substrate; cold stress, apoptosis induced cell lysates + buffer + substrate.

Heat shock과 camptothecin 처리시 NIC와 3-AB의 효과

배양 4일째 세포의 apoptosis 유발인자로서 heat shock (44°C, 120 rpm, 4 hr)와 camptothecin을 처리할 경우, DNA 절편화를 관찰할 수 있었다(Fig. 4, lanes 4-6). Heat shock를 가하기 30분 전에 NIC와 3-AB를 전처리했을 경우, DNA의 절편화를 억제할 수 있었다(Fig. 4, lanes 8-12). 또한 camptothecin을 protease inhibitor cocktail과 함께 처리할 경우, DNA 절편화를 다소 억제할 수 있었다(Fig. 4, lane 7). Camptothecin을 처리했을 때 DCW는 대조구 세포의 DCW에 비하여 적었으며, 여기에 NIC을 전처리할 때는 camptothecin만을 처리했을 때의 DCW보다 증가된 DCW를 확인할 수 있었다(Fig. 5a). 또한 NIC만 첨가했을 때는 대조구 세포에 비하여 많은 DCW를 얻을 수 있었다(Fig. 5a). 세포 생존율은 apoptosis 유발인자인 camptothecin을 처리했을 경우, 3일 후

급격히 감소하였으며 여기에 NIC을 전처리했을 경우에는 camptothecin 처리 후 24시간 동안 약간의 세포 생존율 감소를 보였으나 곧 회복되어 급격한 세포 생존율 감소를 억제시켜 대조구 세포와 유사한 세포 생존율을 유지하였다(Fig. 5b).

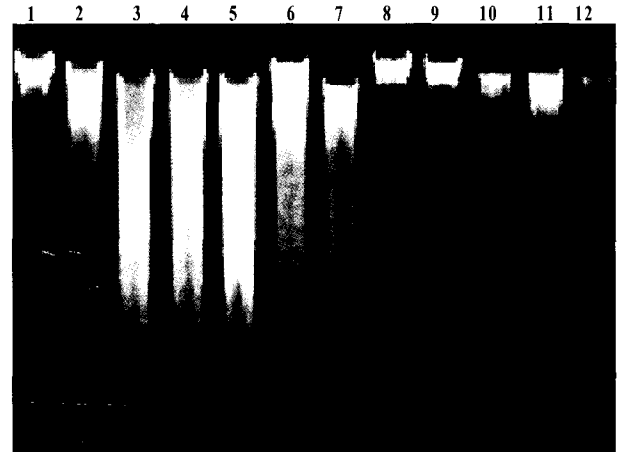


Figure 4. Inhibition of DNA fragmentation in cells pretreated with NIC and 3-AB prior to HS treatment. Lanes 1-3, DNAs from control cells cultured for 5, 7 and 9 days; lanes 4 and 5, DNAs from HS-treated (44°C, 120 rpm, 4 hr, 20 hr recovery) cells at 4 days; lane 6, DNAs from camptothecin (5 μ M)-treated (24 hr recovery) cells at 4 days; lane 7, DNAs from camptothecin (5 μ M)-treated (24 hr recovery) cells with protease inhibitor cocktail (300 μ L) at 4 days; lanes 8-9, 10-11 and 12, DNA from cells pretreated with NIC (2 mM), 3-AB (4 mM) and NIC (4 mM) respectively prior to HS (44°C, 120 rpm, 4 hr, 20 hr recovery) at 4 days.

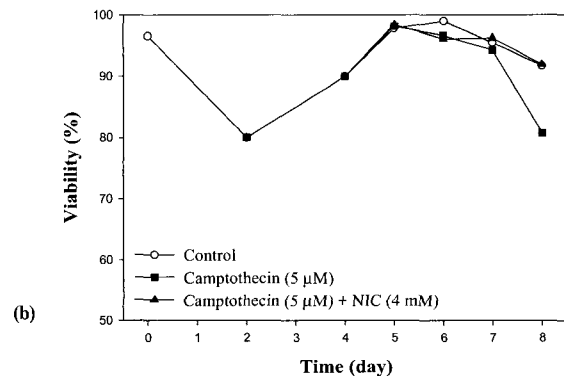
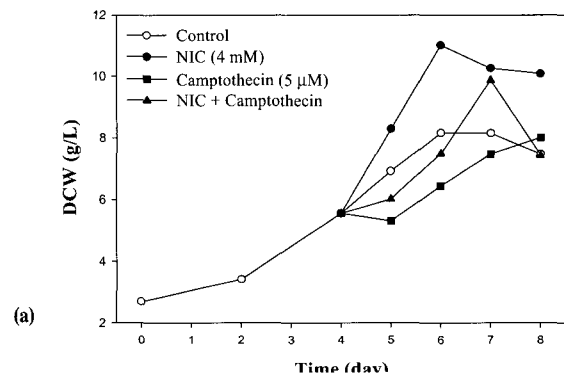


Figure 5. Effect of NIC on (a) cell growth and (b) cell viability during the culture.

배양초기 nicotinamide와 3-aminobenzamide 첨가 효과
 접종 직후 세포는 지연기를 거치게 되는데 이때 세포는 원래의 배지 환경보다 많은 당을 포함한 고삼투압 환경을 접하기 때문에 생존율이 떨어진다. 또한 세포의 대수증식기 이후 DNA 절편화가 일어나기 시작했으며, 필수 영양성분의 고갈 및 배지내 해로운 대사산물의 축적 등으로 인해 사멸기에는 명확한 DNA 절편화를 관찰할 수 있었다(Fig. 4, lanes 1~3).

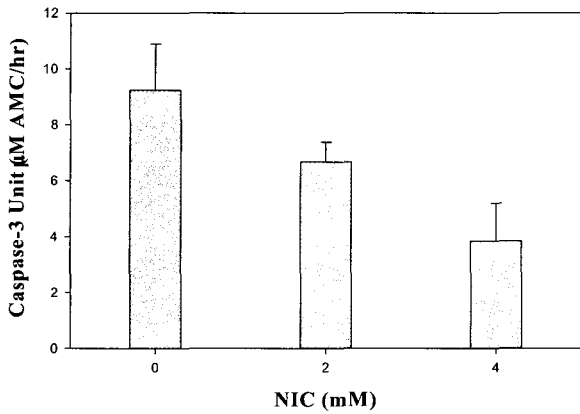
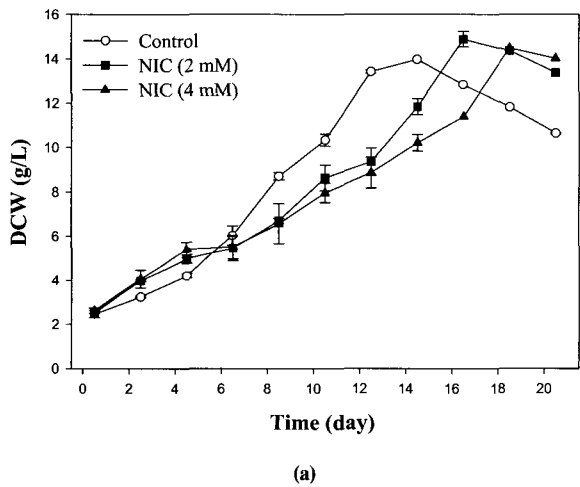
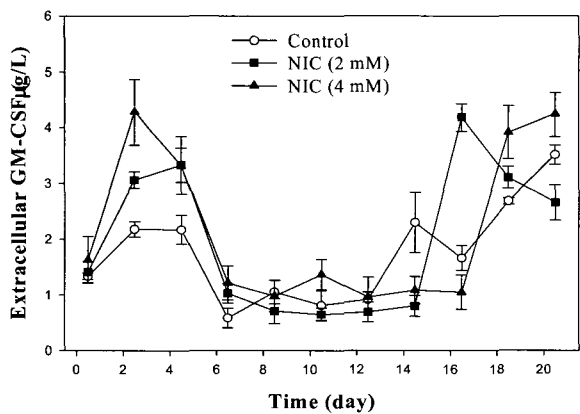


Figure 6. Effect of NIC on caspase-3 activity at culture of 2.5 days.



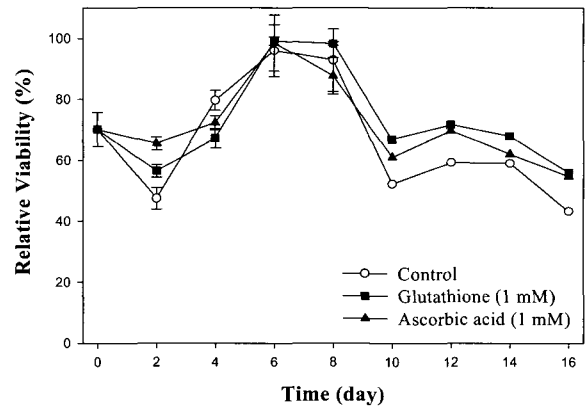
(a)



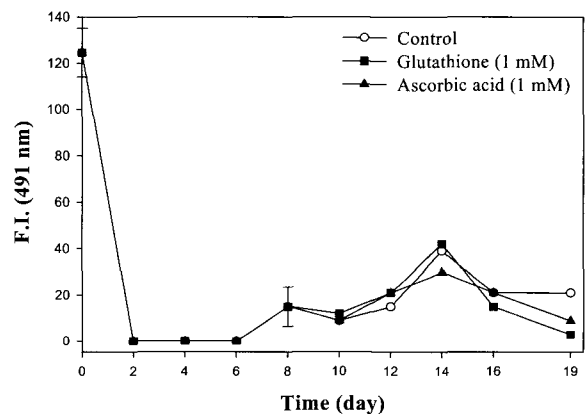
(b)

Figure 7. Effect of NIC on (a) cell growth and (b) the production of extracellular hGM-CSF by *Nicotiana tabacum*.

이러한 생존율의 감소나 apoptosis로 인한 DNA의 절편화를 억제하기 위하여 배지 첨가제로 NIC을 첨가한 결과, 배양 초기 대조구 세포보다 다소 증가된 DCW를 얻을 수 있었고, 사멸기에는 대조구 세포보다 최대 32% 증가된 DCW를 관찰할 수 있었다. 그러나 대수 증식기에는 대조구 세포보다 적은 DCW를 나타냈다. PARP 억제작용이 있는 것으로 알려진 NIC 첨가로 인해 배양 초기, DCW의 증가와 apoptosis의 초기 활성화 억제를 caspase-3 활성 감소를 통하여 확인할 수 있었고(Fig. 6), 그로 인한 세포 생존율 증가는 hGM-CSF의 생산량을 최대 약 2배까지 증대시켰다(Fig. 7b). 배양 후기의 최대 성장 세포량은 대조구 세포와 비슷했기 때문에 세포량의 증대를 통한 고농도 배양의 효과보다는 전체적인 세포 성장속도의 지연으로 인한 외래 단백질 생산기간의 연장(Fig. 7a)을 통해 hGM-CSF의 생산량을 최대 2.5배까지 증대시켰다(Fig. 7b).



(a)



(b)

Figure 8. Effect of antioxidants on (a) cell viability and (b) extracellular esterase activity in cold stress.

Cold stress에서의 항산화제 효과

배양 초기의 세포 생존율 감소에 대한 항산화제의 효과 뿐만 아니라 이미 동물세포에서 입증된 항산화제 특히, 비타민 C와 E의 Bcl-2와 Bax 단백질 조절을 통한 apoptosis 억제 효과(21)에 주목하여 현탁 식물세포에서도 동일한 효

과를 나타내는지 알아보았다. 입증된 apoptosis 유발인자인 cold stress(17)를 배양 중반에 가함으로써 인위적으로 유발된 apoptosis에 대한 항산화제의 효과를 관찰하였다. 먼저, ascorbic acid와 glutathione를 배지에 첨가하여 정상 환경에서 배양하다가 배양 8일째 4°C의 저온 환경으로 변환하여 세포 생존율 및 lysis ratio의 변화를 측정하였다.

배양 중 cold stress를 가한 결과, 급격한 생존율 감소를 보였으나 ascorbic acid와 glutathione를 첨가한 경우, 첨가물 없이 배양 중 4°C로 변환한 세포보다 높은 세포생존율을 유지하였다(Fig. 8a). Cold stress에 의한 세포 생존율 감소는 ascorbic acid와 glutathione의 첨가에 의해 억제되었다. Extracellular esterase 활성측정을 통한 세포의 lysis 정도는 배양후기 정상 배양환경에서 높은 수치를 보이는데 반해, 저온 배양에서는 낮은 수치를 나타냈다(Fig. 8b). 또한 ascorbic acid와 glutathione를 첨가한 경우, 세포 lysis에는 별다른 영향을 미치지 못했다(Fig. 8b). Ascorbic acid와 glutathione를 첨가하여 배양 중 cold stress를 가한 후 세포의 caspase-3 활성을 측정된 결과, 첨가물 없이 배양 중 4°C로 변환한 세포에 비해 낮은 caspase-3 활성을 보였다. Cold stress에 의한 급격한 세포생존율 감소와 apoptosis는 ascorbic acid와 glutathione의 첨가에 의해 억제되었다.

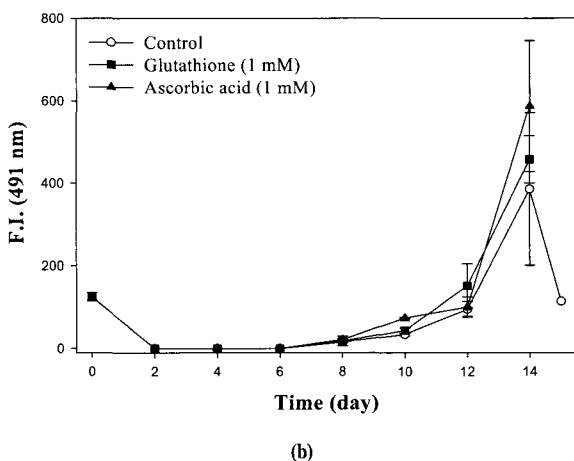
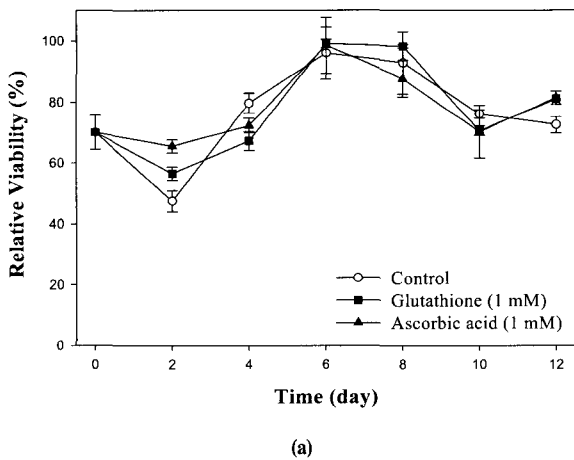


Figure 9. Effect of antioxidants on (a) cell viability and (b) extracellular esterase activity

배양초기 항산화제 첨가 효과

접종 직후나 사멸기의 생존율 감소나 apoptosis로 인한 DNA의 절편화를 억제하기 위하여 배지 첨가제로 non-enzymatic 항산화제인 ascorbic acid와 glutathione를 배지에 첨가하여 세포 생존율, lysis ratio, caspase-3의 변화를 관찰하였고, 그에 따른 hGM-CSF 생산성의 변화를 측정하였다. Ascorbic acid와 glutathione를 첨가하여 배양한 결과 배양초기 대조구 세포의 급격한 생존율 감소는 ascorbic acid와 glutathione 첨가에 의해 억제되었고(Fig. 9a), 배양후기 대조구 세포의 lysis에는 별다른 영향을 미치지 못했다(Fig. 9b). 배양초기 ascorbic acid와 glutathione를 첨가하여 배양한 세포의 caspase-3 활성을 측정된 결과, 대조구 세포에 비해 낮은 caspase-3 활성을 보였다(Fig. 10a). 대조구 세포의 caspase-3 활성을 통하여 배양초기 세포의 급격한 생존율 감소는 apoptosis 때문이며, glutathione와 ascorbic acid 첨가를 통하여 세포의 apoptosis를 억제시킴으로써 배양초기 hGM-CSF의 생산성을 최대 2.4배까지 증대시켰다(Fig. 10b).

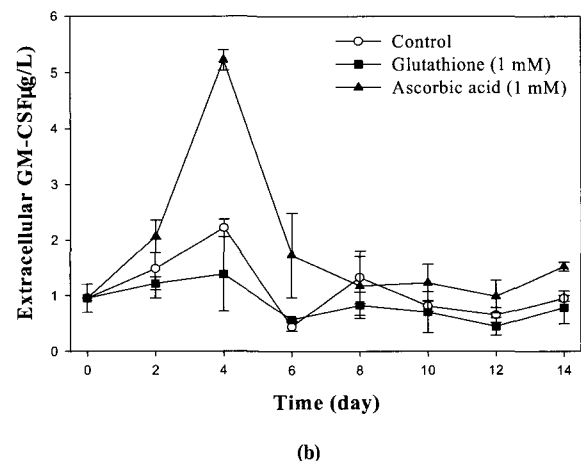
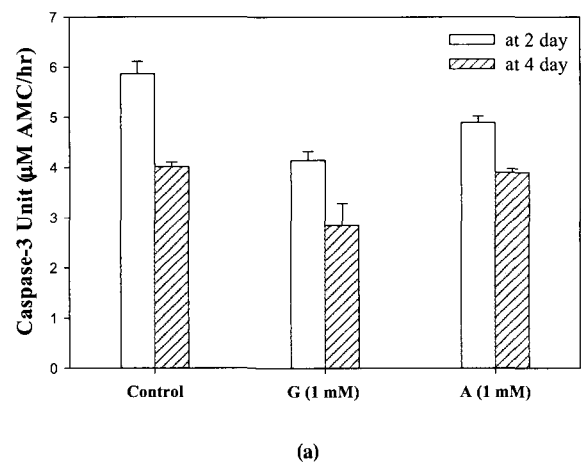


Figure 10. Effect of antioxidants on (a) caspase-3 activity and (b) the production of extracellular hGM-CSF by *Nicotiana tabacum*.

요약

형질전환된 현탁 식물세포 배양을 통한 의약품 단백질의

생산은 post-translational modification, 동물유래 바이러스에 대한 안전성, 저가의 배양 배지, 쉬운 정제과정, 대규모 생산 등의 장점을 가지고 있지만 외래 단백질의 낮은 발현율, 배양환경 변화에 따른 세포 생존율의 저하 등 해결해야 할 과제가 많다. 따라서 배양공정 개발을 통한 세포 생존율 증진에 관한 연구가 수행되어야 하며, 이를 토대로 상업적 생산을 위한 대량 배양에 응용되어야 할 것이다. 본 연구에서는 먼저, 두꺼운 세포벽과 응집체를 형성하고 있어 생존 단일세포의 정량이 어려운 형질전환된 현탁 식물세포의 상대적 생존율 정량법을 구축하였으며, 세포의 형태적 변화, DNA 절편화, caspase-3 정량 등을 통하여 현탁 식물세포에서도 동물세포에서와 마찬가지로 여러 스트레스에 의해 apoptosis가 일어남을 확인하였다. 또한 배양환경 변화에 따른 세포생존율의 저하 및 apoptosis의 증가를 억제하기 위하여 여러 가지 배지 첨가물 (nicotinamide, 3-aminobenzamide, 항산화제 등)을 선택하여 다양한 시기와 환경에서 첨가함으로써 목적 유용 단백질인 hGM-CSF의 생산성을 최대 2.5배까지 증진시켰다. 부가적으로 cold stress에 의한 급격한 세포생존율 감소와 apoptosis 증가는 ascorbic acid와 glutathione에 의해 억제됨을 확인할 수 있었다. 결과적으로 형질전환된 현탁 식물세포의 생존율과 apoptosis 정량법을 기초로 하여 항산화제를 배지에 첨가함으로써 세포 생존도 증진과 apoptosis 억제를 통한 재조합된 의약품 단백질인 hGM-CSF 생산성을 증진시킬 수 있었다.

감 사

본 연구는 한국과학재단지정 인하대학교 초정밀생물분리기술연구센터의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Solomon, M., B. Belenghi, M. Delledonne, E. Menachem, and A. Levine (1999), The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants, *Plant Cell* **11**, 431-443.
- Steward, N., R. Martin, J. M. Engasser, J. L. Goergen (1999), A new methodology for plant cell viability assessment using intracellular esterase activity, *Plant Cell Rep.* **19**, 171-176.
- Lindahl, T., M. S. Satoh, G. G. Poirier, and A. Klungland (1995), Post-translational modification of poly (ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks, *Trends Biochem. Sci.* **20**, 405-411.
- Yang, J., L. K. Klaidman, M. L. Chang, S. Kem, T. Sugawara, P. Chan, and J. D. Adams (2002), Nicotinamide therapy protects against both necrosis and apoptosis in a stroke model, *Pharm. Biochem. Behavior* **73**, 901-910.
- Tian, R. H., G. Y. Zhang, C. H. Yan, and Y. R. Dai (2000), Involvement of poly (ADP-ribose) polymerase and activation of caspase-3-like protease in heat shock induced apoptosis in tobacco suspension cells, *FEBS Lett.* **474**, 11-15.
- Amor, Y., E. Babychuk, D. Inze, and A. Levine (1998), The involvement of poly (ADP-ribose) polymerase in the oxidative stress responses in plants, *FEBS Lett.* **440**, 1-7.
- Korsmeyer, S. J., X. M. Yin, Z. N. Oltvai, D. J. Veis-Novack, and G. P. Linette (1995), Reactive oxygen species and the regulation of cell death by the Bcl-2 gene family, *Biochim. Biophys. Acta* **1271**, 63-66.
- Kruman, I. I. and M. P. Mattson (1999), Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis, *J. Neurochem.* **72**, 529-540.
- McConkey, D. J., P. Hartzell, P. Nicotera, and S. Orrenius (1989), Calcium activated DNA fragmentation kills immature thymocytes, *FASEB J.* **3**, 1843-1849.
- Grub, S., W. E. Trommer, and A. Wolf (2002), Role of antioxidants in the O-hydroxyethyl-D-(Ser)8-cyclosporine A (SDZIMM125)-induced apoptosis in rat hepatocytes, *Biochem. Pharmacol.* **64**, 1725-1736.
- Orrenius, S., D. J. McConkey, G. Bellomo, and P. Nicotera (1989), Role of Ca²⁺ in toxic cell killing, *Trends Pharmacol. Sci.* **10**, 281-285.
- Carpaneto, A., A. M. Cantu, and F. Gambale (1999), Redox agents regulate ion channel activity in vacuoles from higher plant cells, *FEBS Lett.* **442**, 129-132.
- Kohler, C., S. Orrenius, and B. Zhivotovsky (2002), Evaluation of caspase activity in apoptotic cells, *J. Immunol. Methods* **265**, 97-110.
- Greenberg, J. T. (1996), Programmed cell death: A way of life for plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 12094-12097.
- McCabe, P. F., and C. J. Leaver (2000), Programmed cell death in cell cultures, *Plant Mol. Biol.* **44**, 359-368.
- De Jong, A. J., E. T. Yakimova, V. M. Kapchina, and E. J. Woltering (2002), A critical role for ethylene in hydrogen peroxide release during programmed cell death in tomato suspension cells, *Planta* **214**, 537-545.
- Koukalova, B., A. Kovarik, J. Fajkus, and J. Siroky (1997), Chromatin fragmentation associated with apoptotic changes in tobacco cells exposed to cold stress, *FEBS Lett.* **414**, 289-292.
- Korthout, H., G. Berecki, W. Bruin, B. V. Duijn, and M. Wang (2000), The presence and subcellular localization of caspase 3-like proteinases in plant cells, *FEBS Lett.* **475**, 139-144.
- Solomon, M., B. Belenghi, M. Delledonne, E. Menachem, and A. Levine (1999), The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants, *Plant Cell* **11**, 431-443.
- Gotoh, T., Y. Miyazaki, W. Sato, K. I. Kikuchi, and W. E. Bentley (2001), Proteolytic activity and recombinant protein production in virus-infected sf-9 insect cell cultures supplemented with carboxyl and cysteine protease inhibitors, *J. Biosci. Bioeng.* **92**, 248-255.
- Haendeler, J., A. M. Zeiher, and S. Dimmeler (1996), Vitamin C and E prevent lipopolysaccharide-induced apoptosis in human endothelial cells by modulation of Bcl-2 and Bax, *Eur. J. Pharmacol.* **317**, 407-411.