

인체 혈구암세포 U937에서 해양해면동물에서 추출된 Pectenotoxin-2에 의한 Apoptosis의 유발에 관한 연구

신동역¹ · 강호성¹ · 배송자² · 정지형³ · 최영현^{4*}

¹부산대학교 자연과학대학 및 ³약학대학 약학과

²신라대학교 자연과학대학 식품영양학과 및 Marine-Bio 산업화 지원 Center

⁴동의대학교 한의과대학 생화학교실 및 대학원 바이오품질제어학과

Induction of Apoptosis by Pectenotoxin-2 Isolated from Marine Sponges in U937 Human Leukemic Cells. Dong Yeok Shin¹, Ho Sung Kang¹, Song-Ja Bae², Jee H. Jung³ and Yung Hyun Choi^{4*}. ¹Department of Molecular Biology, ³Department of Pharmacy, Pusan National University, Busan 609-735, Korea, ²Department of Food and Nutrition, and Marine Biotechnology Center for Bio-Functional Material Industries, Silla University, Busan 617-736, Korea, ⁴Department of Biochemistry, College of Oriental Medicine and Department of Biomaterial Control, Donggeui University Graduate School, Donggeui University, Busan 614-052, Korea

Abstract Natural product compounds are the source of numerous therapeutic agents. The marine environment produces natural products from a variety of structural classes exhibiting activity against numerous disease targets including anticancer agents. Among these, pectenotoxin-2 (PTX-2), which was first identified as a cytotoxic entity in marine sponges, which depolymerizes actin filaments, was found to be highly effective and more potent to activate an intrinsic pathway of apoptosis in p53-deficient tumor cells compared to those with functional p53 both *in vitro* and *in vivo*. However, the anti-proliferative mechanism of the compound at non-cytotoxic concentrations has not yet been explored. In the current study, we sought to investigate anti-proliferation and apoptosis of PTX-2 against U937 human leukemic cells and its underlying molecular mechanism. Exposure of U937 cells to PTX-2 resulted in growth inhibition and induction of apoptosis in dose- and time-dependent manner as measured by MTT assay, fluorescent microscopy and flow cytometric analysis. The anti-proliferative effect of PTX-2 was associated with a marked increase in the expression of cyclin-dependent kinase p21 (WAF1/CIP1) mRNA which was tumor suppressor p53-independent. The increase in apoptosis was connected with a time-dependent down-regulation of anti-apoptotic Bcl-X_L and inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) family such as XIAP and cIAP-2. Though additional studies are needed, these findings suggested that PTX-2-induced inhibition of U937 cells was associated with the induction of apoptotic cell death and the results provided important new insights into the possible molecular mechanisms of the anti-cancer activity of PTX-2.

Key words : Pectenotoxin-2, marine sponge, U937, apoptosis

서 론

세포의 응축, 원형질막 blabbing 및 염색질 응축 등으로 특성화되는 세포 죽음의 한 양식인 apoptosis (a programmed cell death)는 개체 수준에서 불필요하거나 손상 받은 세포를 제거함으로써 항상성의 유지

에 매우 중요한 역할을 하고 있다[4,7,18]. 최근까지 apoptosis 조절에 필요한 많은 유전자들이 동정되어져 오고 있는데, caspase로 명명된 cysteine proteases는 apoptosis 유발에 중심적인 역할을 하는 유전자 산물이다. Caspase는 proenzyme의 형태로 합성되어지며, Bcl-2 및 inhibitor of apoptosis proteins (IAPs)

* Corresponding author

Phone: +82-51-850-7413, Fax: +82-51-853-4036

E-mail: choiyh@deu.ac.kr

family, Fas/FasL system 등에 속하는 인자들이 이들의 활성화를 조절하는 주요 유전자 그룹에 속한다. Bcl-2 family에 속하는 Bcl-2 member는 apoptosis를 억제하는 반면, Bax member가 과발현 되었을 때 apoptosis를 유도하는데, 두 단백질은 서로 dimer를 형성하면서 cytochrome *c*와 같은 apoptosis 유발에 관여하는 인자들의 조절에 관여한다[1,13]. 그리고 IAPs family에 속하는 여러 단백질들은 caspase와의 선택적 결합을 통한 anti-apoptotic 활성을 지닌다 [10,12,17]. 이러한 근거를 바탕으로 현재 수행중인 화학적 항암제의 궁극적 개발 목표 달성을 위해서 암세포만을 선택적으로 증식을 차단함과 동시에 암세포의 apoptosis 유발을 위한 관련 유전자들의 활성 및 억제 기전 해석이 선행되어야 할 가장 기본적인 과정이다.

한편 현재까지 인류가 의존해 온 육상생물 자원으로 부터 의약품, 산업소재 등 다양한 신소재 개발은 한계에 도달한 상태이다. 그리고 지구표면의 3/4이 해양환경이며 지구상에 서식하는 생물종의 80%(약 30만 종)가 해양에 서식하고 있으나 취사성의 문제로 활발한 연구가 진행되지 않았으나, 최근 선진국에서는 생명과학 소재 개발의 대상을 육상생물에서 해양생물로 점차 이전하는 추세이다. 이는 육상 환경에 비하여 해양 환경은 폭 넓은 생태환경 변이에 따른 특이 생물 종이 다양하게 존재하며, 육상생물에 비하여 외부로부터의 감염에 대한 방어기작이 발달되어 있어 유용 신소재 생산 가능성이 높은 무궁무진한 유전자원의 보고이기 때문이다[2,9]. 특히 해양 해면동물(Sponges)은 기원적으로 가장 오래된 다세포 해양생명체로서 현재까지 보고 된 해양천연물 중 30-40%가 해면동물에서 유래되었으며, 각각은 독특한 구조와 antimicrobial, antifouling, HIV inhibitory, anticancer, antiviral, antifungal 등의 강력한 생리활성을 가지고 있는 것으로 보고되어져 오고 있다[16,20].

본 연구에서는 항암활성을 가지는 해양생물 유래 천연물의 분자생물학적 기전 해석 연구의 일환으로 해양해면동물에서 높은 세포독성을 보이는 물질중의 하나로 처음 보고된 이후[5], actin-depolymerizing agent로 분류된 바[11] 있는 pectenotoxin-2 (PTX-2)가 U937 인체 백혈병 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하였다. 특히 PTX-2는 최근 종양억제 유전자 p53

이 결손된 암세포주에서 특히 높은 항암활성을 가지는 것으로 보고된 바 있으나[3] 동일 농도 범주에서 정상세포에서는 유의적인 세포독성을 나타내지 않았기 때문에 항암제 후보물질로서 잠재적 개발 가능성이 매우 물질 중의 하나이다.

재료 및 방법

세포배양 및 PTX-2 처리

실험에 사용한 U937 인체 혈구암세포는 한국생명공학연구소(KRIBB, Taejeon, Korea)에서 분주 받아 사용하였으며, 암세포의 배양을 위해 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에 1%의 penicillin 및 streptomycin (Gibco BRL)이 포함된 90%의 RPMI-1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. PTX-2 (Fig. 1)는 부산대학교 약학대학 정지형 교수에게서 제공받았으며, 선행연구에 준하여 methanol에 희석한 후 적정농도로 배지에 처리하였다[3].

MTT assay를 이용한 세포 성장률의 측정

세포 배양용 6 well plate에 U947 세포를 1 X 10⁵개/ml로 분주하고 PTX-2를 각 well 당 적정농도로 처리하였다. 24시간 및 48시간 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Amresco, Solon, OH, USA)를 0.5 mg/ml 농도가 되게 성장배지로 희석하여 2 ml씩 분주하고 3시간 동안 CO₂ incubator에서 배양시킨 다음 다시 2,000 rpm에서 원심분리 하여 MTT 시약을 깨끗하게 제거하고 DMSO를 1 ml씩 분주하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 96 well plate에 200 µl씩 옮겨서 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정은 모두 세 번을 하였으며, 그

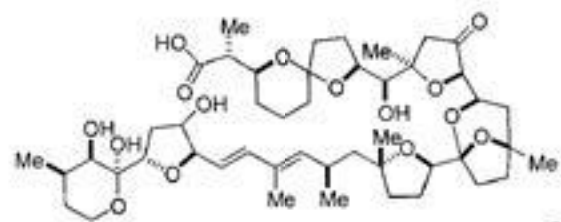


Fig. 1. Chemical structure of pectenotoxin-2.

에 대한 평균값과 표준 오차를 Sigma Plot 4.0 프로그램(SPSS Ins.)으로 구하였다.

Hemocytometer를 이용한 세포 생존율의 측정

세포 배양용 6 well plate에 U937 세포를 1×10^5 개/ml의 개수로 well당 2 ml씩 분주하고 PTX-2를 각 well당 50 ng/ml의 농도로 처리한 후 적정 시간 별로 세포를 모아 phosphate-buffered saline (PBS)로 수세하였다. 준비된 세포에 PBS 1 ml를 첨가하여 잘 섞은 후 세포 부유액과 0.5% trypan blue (Gibco BRL)를 동량으로 섞은 후 2분간 염색 하였다. Pasteur pipette의 모세 현상을 이용하여 세포를 hemocytometer로 옮긴 후 위상차 현미경(Carl Zeiss, Germany)을 이용, 200배의 배율 하에서 푸른색으로 염색된 죽은 세포로, 염색이 되지 않은 세포를 살아 있는 세포로 계수하였다. 이에 따른 결과를 Microsoft EXCEL program을 사용하여 분석하였다.

DAPI staining에 의한 세포핵의 형태 관찰

PTX-2 처리에 의한 U937 세포의 apoptosis 유발 여부 확인을 위한 핵의 형태적 변화를 관찰하기 위하여 정상 및 PTX-2가 처리된 배지에서 48시간 동안 배양된 세포를 모은 다음 37% formaldehyde 용액과 PBS를 1:9의 비율로 섞은 fixing solution을 처리한 후, slide glass 위에 적정량 떨어뜨려 900 rpm에서 5분간 cytospin하였다. PBS로 2~3회 washing하고 PBS가 다 마르기 전에 0.2%의 triton X-100 (Amresco)을 첨가하여 실온에서 10분간 고정하였다. 15분가량 염색시킨 후, PBS로 washing하고 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액을 세포가 고정된 slide glass 위에 적당량을 떨어뜨린 후 빛을 차단하고 실온에서 염색시켰다. 15분가량 염색시킨 후, PBS로 DAPI 용액을 충분히 washing하고 1차 증류수로 재빠르게 washing한 다음 absolute alcohol을 처리하고 cover glass를 덮는다. 그 후 형광 현미경(Carl zeiss)을 이용하여 400배의 배율로 각 PTX-2처리 농도에 따른 인체혈구암세포의 핵의 형태 변화를 관찰하였다.

DNA flow cytometry에 의한 세포 주기의 분석

동일 조건에서 준비된 세포를 PBS로 씻어 내고

잘 부유시킨 후, cold-ethanol을 적정량 첨가하여 4°C에서 한 시간 동안 고정시켰다. 5×10^6 개의 고정된 세포들을 원추형 vial에 넣어서 1,000 rpm으로 수 분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고, 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma)이 함유된 PBS로 2~3회 washing 과정을 거친 후 다시 수 분간 원심 분리한 후 상층액을 제거하였다. 세포 침전물을 1% BSA를 함유한 PBS 0.8 ml로 부유시키고 핵산에 특이적으로 결합하는 형광 물질인 DNA intercalating dye propidium iodide (PI, concentration, 50ug/ml; Sigma)와 0.1 mg/ml의 RNase (Sigma)를 처리하여 암실 (4°C)에서 1시간 동안 염색 과정을 거쳤다. PBS로 두 번 washing 과정을 거친 후, 부유액을 만들고, 35 μ m pore size의 nylon mesh에 부유액을 pipette으로 통과시켜 단일 세포로 분리시킨 후 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 Modifit LT (Becton Dickinson) program을 사용하여 분석하였다.

RT-PCR에 의한 mRNA 발현의 분석

동일한 조건에서 준비된 U937 인체 혈구암세포를 대상으로 TRIzol B (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, ONE-STEP RT-PCR PreMix Kit (Intron, Biotechnology, Korea)를 이용하여 2 μ g의 RNA에서 cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 template로 사용하여 관찰 대상 유전자(Table 1)를 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 증폭하였다. 이때 house keeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr, Sigma)로 염색한 후 ultra violet (UV) 하에서 확인하였다.

결과 및 고찰

인체 혈구암세포의 증식에 미치는 PTX-2의 영향

U937 인체 백혈병세포의 증식에 미치는 PTX-2의 영향을 알아보기 위하여 PTX-2를 24시간 및 48시간 동안 정상세포에 유의적인 세포독성을 나타내지 않는 다양한 농도별로 처리한 후 MTT assay를 실시하

Table 1. Gene-specific primers for RT-PCR

Gene name		Sequence
GAPDH	Sense	5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3'
	Antisense	5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3'
Fas	Sense	5'-TCT AAC TTG GGG TGG CTT TGT CTT C-3'
	Antisense	5'-GTG TCA TAC GCT TTC TTT CCA T-3'
FasL	Sense	5'-GGA TTG GGC CTG GGG ATG TTT CA-3'
	Antisense	5'-AGC CCA GTT TCA TTG ATC ACA AGG-3'
Bax	Sense	5'-ATG GAC GGG TCC GGG GAG-3'
	Antisense	5'-TCA GCC CAT CTT CTT CCA-3'
Bcl-2	Sense	5'-CAG CTG CAC CTG ACG-3'
	Antisense	5'-GCT GGG TAG GTG CAT-3'
Bcl-X _L	Sense	5'-CAG CTG CAC CTG ACG-3'
	Antisense	5'-GCT GGG TAG GTG CAT-3'
XIAP	Sense	5'-GAA GAC CCT TGG GAA CAA CA-3'
	Antisense	5'-CGC CTT AGC TGC TCT CTT CAG T-3'
cIAP-1	Sense	5'-TGA GCA TGC AGA CAC ATG C-3'
	Antisense	5'-TGA CGG ATG AAC TCC TGT CC-3'
cIAP-2	Sense	5'-CAG AAT TGG CAA GAG CTG G-3'
	Antisense	5'-CAC TTG CAA GCT GCT CAG G-3'
cyclin A	Sense	5'-TCC AAG AGG ACC AGG AGA ATA TCA-3'
	Antisense	5'-TCC TCA TGG TAG TCT GGT ACT TCA-3'
cyclin B1	Sense	5'-AAG AGC TTT AAA CTT TGG TCT GGG-3'
	Antisense	5'-CTT TGT AAG TCC TTG ATT TAC CAT G-3'
cdc2	Sense	5'-GGG GAT TCA GAA ATT GAT CA-3'
	Antisense	5'-TGT CAG AAA GCT ACA TCT TC-3'
cdk2	Sense	5'-GCT TTC TGC CAT TCT CAT CG-3'
	Antisense	5'-GTC CCC AGA GTC CGA AAG AT-3'
p53	Sense	5'-GCT CTG ACT GTA CCA CCA TCC-3'
	Antisense	5'-CTC TCG GAA CAT CTC GAA GCG-3'
p21	Sense	5'-CTC AGA GGA GGC GCC ATG-3'
	Antisense	5'-GGG CGG ATT AGG GCT TCC-3'

였다. Fig. 2에 나타난 결과에서 알 수 있듯이 PTX-2의 처리에 따라 U937 세포의 증식은 처리 시간 및 농도 의존적으로 매우 감소되었음을 알 수 있었다. 예를 들어 48시간 처리군의 경우 정상배지에서 배양된 U937 세포에 비하여 20 ng/ml 처리군에서 거의 50% 정도의 증식 억제 효과가 있었으며, 50 ng/ml 처리군에서는 약 70% 이상의 증식억제 효과를 나타내었다. 이는 대장암세포를 비롯한 고형 암세포주들에서 나타난 경우 보다 훨씬 낮은 농도에서 U937 세포의 증식이 효과적으로 억제되었음을 보여주는 결과로서[3], 더 많은 세포주를 대상으로 비교해야겠지만 PTX-2가 고형암보다는 혈구암세포에서 더 효과적인 항암효과가 있을 가능성을 보여 주는 결과로 추정된다.

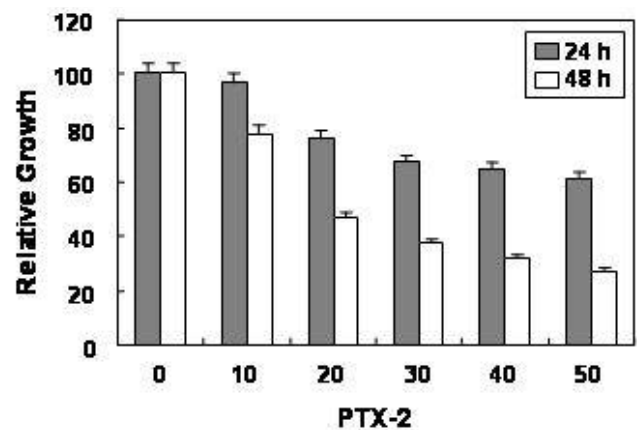


Fig. 2. Anti-proliferative effects of PTX-2 in U937 human leukemia cells. After cells were seeded, the cells were treated with 0, 10, 20, 30, 40 and 50 ng/ml PTX-2 for 24h and 48h, respectively. Then, MTT assay was performed. Results are expressed as averages \pm SD from separate experiments.

PTX-2에 의한 생존율 저하 및 apoptosis 유발

PTX-2의 처리에 의한 U937 세포의 증식억제가 생존율 감소 및 apoptosis의 유발과 연관성이 있을 것으로 기대되어 PTX-2 처리에 따른 생존율 및 U937 세포의 핵의 형태를 비교 조사하였다. Fig. 3A는 50 ng/ml 농도의 PTX-2를 U937 세포에 처리한 후 처리 시간 의존적 생존율 변화 정도를 조사한 결과로서, PTX-2 처리 시간 의존적으로 U937 세포의 생존율이 매우 저하되었음을 알 수 있었다. 이러한 생존율 저하 현상은 MTT assay의 결과와 매우 유사한 경향성을 보여주는 결과였다. 다음은 PTX-2에 의한 apoptosis 유발 여부를 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 3B에 나타난 바와 같다. Fig. 3B의 결과에서 알 수 있듯이 DAPI 염색법에 의해 염색이 된 U937 세포의 핵은 정상 배지에서 배양되었을 경우, 핵의 전체가 완전

한 형태로 염색되는 양상을 보였으나 PTX-2의 처리 시간이 증가할수록 염색체 응축에 의한 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 apoptotic body의 형성 정도가 증가되었다. 이는 PTX-2의 처리에 따른 암세포의 생존율의 감소는 apoptosis 유발과 밀접한 연관성이 있음을 보여주는 결과로 생각되어진다.

세포주기 분포도에 미치는 PTX-2의 영향

이상의 PTX-2에 의한 U937 세포의 증식억제 및 apoptosis 유발이 세포주기 교란 현상과의 연관성이 있는지를 조사하기 위하여 정상 및 PTX-2가 처리된 세포를 대상으로 flow cytometry 분석을 실시하였다. Fig. 4의 결과는 PTX-2 처리에 따른 U937 세포의 histogram 변화 및 각 세포주기에 속하는 세포빈도를 정량적으로 나타낸 결과로서, 정상배지에서 자란 세포의 경우 G1기에 속하는 세포의 빈도가 약 47.1% 정도였고, S기 및 G2/M기에 속하는 세포는 각각 19.3% 및 30.1% 정도로 나타났다. 그리고 apoptosis 유발군에 속하는 sub-G1기의 경우 약 3.5% 정도였다. 그러나 50 ng/ml의 PTX-2가 처리된 U937 세포의

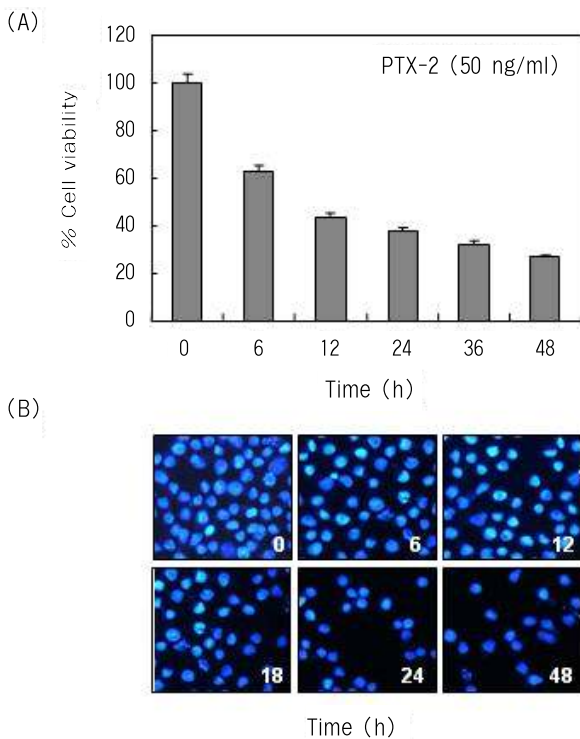
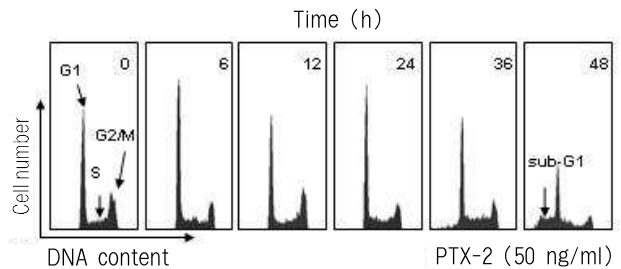


Fig. 3. (A) Inhibition of cell viability by PTX-2 in U937 human leukemia cells. Cells were seeded as described in materials and methods, and treated with 50 ng/ml PTX-2 for the indicated times. The viable cells were counted by hemocytometer. Results are expressed as averages +/- SD from three separate experiments. (B) Induction of apoptotic bodies by PTX-2 treatment in U937 human leukemia cells. After treated with PTX-2 for indicated times, cells were fixed and stained with DAPI. The nuclear morphology was photographed with a fluorescence using blue filter. Magnification, X400.



Time (h)	Sub G1	G1	S	G2M
0	3.47	47.11	19.33	30.09
6	5.40	50.20	21.95	22.45
12	6.68	38.87	19.84	34.61
18	8.65	42.49	25.00	23.86
24	10.64	41.34	24.36	23.66
36	35.08	32.95	16.60	15.37

Fig. 4. Effect of PTX-2 on the cell cycle distribution in U937 human leukemia cells. U937 cells were treated with PTX-2 50 ng/ml for indicated times. Cells were fixed and then stained with PI. The percentages of each fraction were determined by DNA flow cytometry. Data are means average of two separate experiments.

경우 1시간 처리군에서 G1기에 속하는 세포는 약 38.9%였으며, S기 및 G2/M기에 속하는 세포는 각각 19.8% 및 34.6% 정도로 나타났고, sub-G1기에 속하는 세포의 경우 6.7% 정도였다. 그러나 PTX-2가 36시간 처리된 세포의 경우, sub-G1기는 약 35.1% 정도로 증가된 반면, G1기 및 G2/M기에 속하는 세포의 빈도는 각각 33.0% 및 15.4% 정도로 나타났다. 즉 12시간 처리까지는 G2/M기에 속하는 세포의 빈도가 다소 증가되는 현상을 보였으나, 처리 시간이 늘어날수록 뚜렷한 세포주기 특이적 교란 현상을 관찰할 수는 없었다. 이는 PTX-2가 actin 형성 억제제로서 mitosis 특이적 세포주기 교란을 유도할 것이라는 선행연구와는 다소 차이가 있음을 알 수 있었다[3].

p53 및 p21의 발현에 미치는 PTX-2의 영향

다음은 PTX-2의 처리에 의한 U937 세포의 증식억제 현상이 종양억제 유전자 또는 세포주기 조절 억제인자들의 발현 변화와 상관성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 현재까지 알려진 종양억제 유전자 중 가장 중요한 p53 및 전체적인 세포주기 조절에 중요한 역할을 하는 Cdk inhibitor p21의 발현에 미치는 PTX-2의 영향을 조사하였다. p21은 종양 억제 유전자인 p53에 의하여 활성화되어 G2/M의 진행을 억제하기도 하며[14,19], p21의 활성화에는 p53이 관여하는 것이 일반적이지만 세포주에 따라서 p53 비의존적인 경로를 통하여 p21이 활성화 된다고 알려져 있다[6,8,15]. Fig. 5의 결과는 동일한 조건에서 PTX-2가 다양한 시간 동안 배양된 U937 세포를 대상으로 RNA를 분리하여 RT-PCR 방법으로 p53 및 p21의 전사발현 수준에 미치는 PTX-2의 영향을 조사한 것으로서, PTX-2 처리에 따른 p53의 발현은 매우 감소된 반면 p21의 경우 PTX-2 처리 시간 의존적으로 전사활성이 증가되었음을 확인하였다. 따라서 PTX-2에 의한 p21의 전사활성은 p53 비의존적일 가능성이 매우 높으며, 이러한 결과는 PTX-2가 p53 유전자가 결손된 암세포에서 항암효능이 매우 높을 것이라는 선행 연구와도 연관성이 있으며[3] 이에 관한 보다 구체적인 연구가 요구된다.

Bcl-2 family의 발현에 미치는 PTX-2의 영향

Bcl-2 family에 속하는 몇 가지 중요한 인자들은

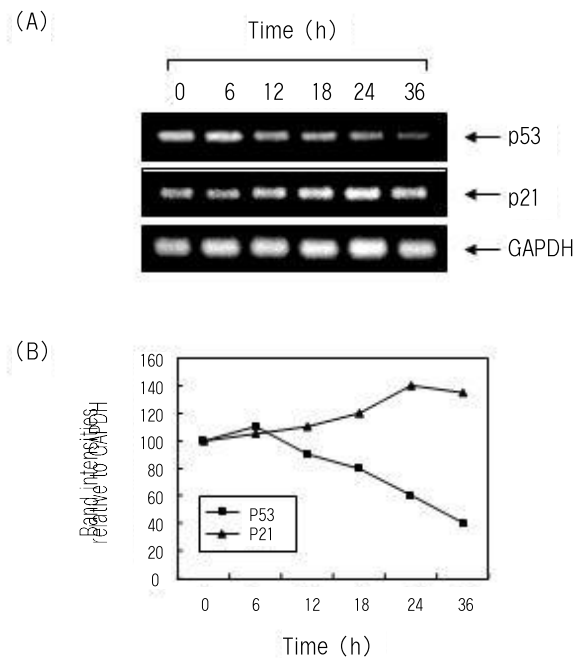


Fig. 5. Induction of Cdk inhibitor p21 and inhibition of tumor suppressor p53 by PTX-2 treatment in U937 human leukemia cells. After treated with 50 ng/ml PTX-2 for each time incubation, total RNAs were isolated and RT-PCR analysis were performed using p53 and p21 primers. The resulting cDNAs were subjected to PCR with indicated primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in a 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as a house-keeping control gene (A) and mRNA levels were normalized against GAPDH (B).

apoptosis 유발 조절에 가장 대표적인 유전자로 알려져 있는데, 그중 Bcl-2는 anti-apoptotic 분자로서 apoptosis의 유발을 억제하는 기능을 가지며, Bax는 apoptosis 유발을 촉진하는 pro-apoptotic 분자이다[1]. 이들 두 유전자는 세포 내 소기관 중 mitochondria로부터의 cytochrome c를 유리시켜 cysteine-related protease인 caspase, 종양억제 유전자인 p53, DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성을 조절한다. 이들은 서로 dimer의 형태로 존재하며 그들의 발현 수준에 변화가 초래되면 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다[1,13]. 본 연구에서는 U937 세포에서 PTX-2에 의한 apoptosis 유발에 이들 유전자가 관련되어 있는지의 여부를 RT-PCR 방법으로 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 6에 나타난 바와 같다. 결과에서 알 수 있듯이 apoptosis를 유발하는 것과 관련이 있는 Bax 및 apoptosis 억제에 관여하는 Bcl-2 유전자의 발현은 PTX-2 처리에 따라 큰 변화가 없었다. 그러나 Bcl-2 member에 속하는 anti-apoptotic Bcl-X_L의

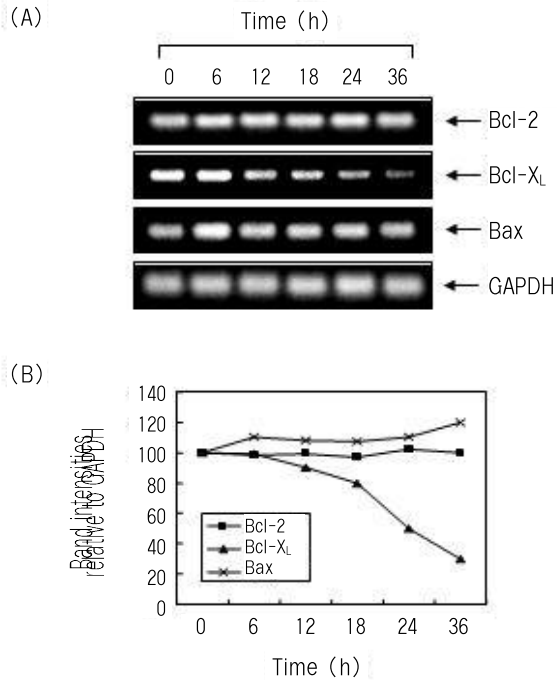


Fig. 6. Induction of Bax and inhibition of Bcl-X_L by PTX-2 in U937 human leukemic cells. After incubation with 50 ng/ml PTX-2 for indicated times, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with Bax, Bcl-2 and Bcl-X_L primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in a 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control (A) and mRNA levels were normalized against GAPDH (B).

경우 PTX-2 처리 시간의존적으로 전사활성이 매우 감소되었다. 따라서 PTX-2에 의한 U937 세포의 apoptosis 유발에는 Bcl-2 family 중 Bcl-X_L의 발현 감소와 연관성이 있으며, PTX-2 처리에 의한 apoptosis의 유발에는 최소한 Bcl-2 family가 중요한 역할을 하고 있음을 의미한다.

IAPs family의 발현에 미치는 PTX-2의 영향

Apoptosis 조절에 관여하는 여러 인자들 중 최근 밝혀진 또 다른 class인 IAPs family에 속하는 여러 유전자 산물은 곤충세포에서 바이러스 감염에 의한 apoptosis를 억제하기 위한 baculoviral 단백질 군들로서 외부 신호에 의한 세포 내 anti-apoptotic 활성을 지닌다. IAPs family는 caspase의 활성화와 연관된 조절 인자이며, caspase와의 직접적인 결합을 통하여 그들의 활성을 억제 할 수 있다[10,12,17]. 따라서 PTX-2 처리에 의한 U937 세포의 apoptosis 유발에 IAPs

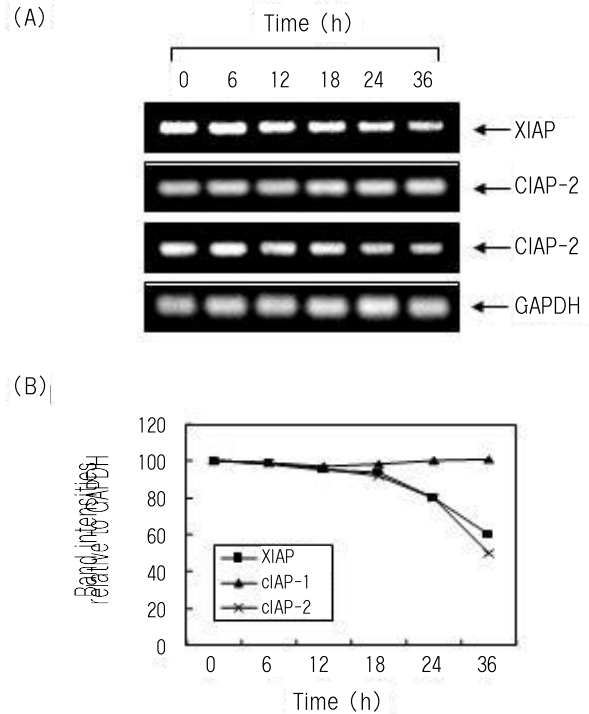


Fig. 7. Effects of PTX-2 treatment on the level of IAPs family in U937 human leukemia cells. After incubation with 50 ng/ml PTX-2 for indicated times, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with indicated primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in a 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control (A) and mRNA levels were normalized against GAPDH (B).

family가 관여하는지의 여부를 조사하였다. Fig. 7에 나타난 바와 같이 PTX-2에 의한 apoptosis 유발에 이러한 IAPs family의 관여 여부를 조사한 결과, 전사 조절 단계에서 cIAP-1은 큰 변화가 없었으나 XIAP 및 cIAP-2의 발현은 PTX-2 처리 시간 증가에 따라 점차 감소되었음을 알 수 있었는데, 이러한 IAPs family의 발현 감소는 caspase의 활성을 초래하여 U937 세포의 apoptosis 유발에 최소한 어느 정도 관여하였을 것으로 추정된다.

요 약

본 연구에서는 U937 인체 백혈병 세포의 증식에 미치는 PTX-2의 영향을 조사한 결과, PTX-2의 처리에 따라 U937 세포는 처리 농도 및 처리 시간 의존적으로 심한 형태적 변형과 함께 증식이 억제되었다.

이러한 PTX-2 처리에 의한 U937 세포의 증식억제는 apoptosis 유발과 관련이 있었으며, 이를 DAPI staining에 의한 apoptotic body 형성, flow cytometry를 이용한 sub-G1 세포 빈도의 정량적 분석을 통하여 확인하였다. 이러한 PTX-2 처리에 의한 U937 세포의 apoptosis 유발은 Bcl-2 family에 속하는 anti-apoptotic 인자인 Bcl-X_L의 발현 감소 및 IAPs family에 속하는 유전자들의 선택적 발현 감소와 연관성이 있음을 알 수 있었다. 이상의 결과들은 인체 암세포에서 PTX-2의 항암작용을 이해하는데 중요한 자료가 될 것이고 나아가 PTX-2을 포함한 그와 유사한 항암제 후보물질들의 연구에 있어서 기초 자료로서 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 해양수산부 마린바이오21사업의 해양 바이오프로세스연구단 연구비 지원(과제관리번호 B-2005-12)에 의해 수행되었습니다.

참고 문헌

1. Antonsson, B. and Martinou, J.C. 2000. The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell Res.* **256**, 50-57.
2. Blunt, J. W., Copp, B. R., Munro, M. H., Northcote, P. T. and Prinsep, M. R. 2006. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **23**, 26-78.
3. Chae, H. D., Choi, T. S., Kim, B. M., Jung, J. H., Bang, Y. J. and Shin, D. Y. 2005. Oocyte-based screening of cytokinesis inhibitors and identification of pectenotoxin-2 that induces Bim/Bax-mediated apoptosis in p53-deficient tumors. *Oncogene* **24**, 4813-4819.
4. Chiarugi, V., Magneli, L., Cinelli, M. and Basi, G., 1994. Apoptosis and the cell cycle. *Cell. Mol. Biol. Res.* **40**, 603-612.
5. Draisci, R., Lucentini, L., Giannetti, L., Boria, P. and Poletti, R. 1996. First report of pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (*Dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe. *Toxicon* **34**, 923-935.
6. Eastman, A. 2004. Cell cycle checkpoints and their impact on anticancer therapeutic strategies. *J. Cell. Biochem.* **91**, 223-231.
7. Evans, V. G. 1993. Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol. Int.* **17**, 461-476.-1
8. Gartel, A. L. and Tyner, A. L. 2002. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol. Cancer Ther.* **1**, 639-649.
9. Hentschel, U., Fieseler, L., Wehrl, M., Gernert, C., Steinert, M., Hacker, J. and Horn, M. 2003. Microbial diversity of marine sponges. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **37**, 59-88.
10. Holcik, M., Gibson, H. and Korneluk, R. G. 2001. XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis* **6**, 253-261.
11. Hori, M., Matsuura, Y., Yoshimoto, R., Ozaki, H., Yasumoto, T. and Karaki, H. 1999. Actin depolymerizing action by marine toxin, pectenotoxin-2. *Nippon Yakurigaku Zasshi* **114**, Suppl 225-229.
12. Hussein, M. R., Haemel, A. K. and Wood, G. S. 2003. Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. *J. Pathol.* **199**, 275-288.
13. Lenaz, G., Bovina, C., Formiggini, G. and Parenti Castelli, G. 1999. Mitochondria, oxidative stress, and antioxidant defences. *Acta. Biochim. Pol.* **46**, 1-21.
14. Li, Y., Jenkins, C. W., Nichols, M. A. and Xiong, Y. 1994. Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene* **9**, 2261-2268.
15. Liu, S., Bishop, W. R. and Liu, M. 2003. Differential effects of cell cycle regulatory protein p21(WAF1/Cip1) on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy. *Drug Resist. Update* **6**, 183-195.
16. Proksch, P., Ebel, R., Edrada, R. A., Wray, V. and Steube, K. 2003. Bioactive natural products from marine invertebrates and associated fungi. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **37**, 117-142.
17. Salvesen, G. S. and Duckett, C. S. 2002. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 401-410.
18. Schultz, D. R. and Harrington, W. J. Jr. 2003. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin. Arthritis Rheum.* **32**, 345-369.
19. Taylor, W. R. and Stark, G. R. 2001. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* **20**, 1803-1815.
20. Yuan, G., Wahlqvist, M. L., He, G., Yang, M. and Li, D. 2006. Natural products and anti-inflammatory activity. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **15**, 143-152.